

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

**Die Rolle von β -Arrestin-2 in der
hyperglykämieinduzierten Nierenschädigung**

Dissertation

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

vorgelegt von

Clara Frosch

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ivo Quack

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani

In Gedenken an meine Großmutter

Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie ist die führende Ursache terminalen Nierenversagens in den westlichen Industrienationen. Durch die Hyperglykämie kommt es zu einer Schädigung des Nierenfilters, welche als Mikroalbuminurie symptomatisch wird. Die Mikroalbuminurie ist ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor, der auch ein Fortschreiten der renalen Grunderkrankung selbst bewirkt. Die Zunahme der Anzahl terminal niereninsuffizienter Patienten, stellt eine große klinische und wirtschaftliche Herausforderung dar. Aufgrund der eingeschränkten Therapieoptionen sind Forschungen zu hyperglykämieinduzierten Pathomechanismen des Nierenfilters hochaktuell. In neuen Ansätzen werden insbesondere akute Effekte an der glomerulären Schlitzmembran untersucht, deren strukturelle Integrität entscheidend für die Funktion des Nierenfilters ist. Für die Funktion der Schlitzmembran spielt das Protein Nephrin eine kritische Rolle. Quack et al. postulierten in diesem Rahmen einen Mechanismus der hyperglykämieinduzierten β -Arrestin-2 vermittelten Nephrinendozytose. Die Internalisierung des Oberflächennephrins führt zu einem Defekt der Schlitzmembran. Dieser Mechanismus wurde bisher nur im Zellmodell erforscht. In dieser Arbeit wird die Frage nach den Effekten einer Hemmung der Endozytose durch das Ausschalten von β -Arrestin-2 *in vitro* und *in vivo* untersucht. In HEK293T-Zellen konnte durch siRNA-vermittelten β -Arrestin-2 Knockdown eine verringerte Nephrin-Endozytose in hyperglykämien Medium beobachtet werden. Für die *in vivo* Analysen wurde durch Streptozotocininjektion bei homozygoten *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen eine Hyperglykämie induziert und die Albuminurie gemessen. Des Weiteren wurde die Nephrinendozytose mit einer neuen Methode zur *in-vivo*-Quantifizierung oberflächenständiger Moleküle der Schlitzmembran untersucht. Da die Knockoutmäuse auf C57BL/6 Hintergrund stammbedingt nur eine geringe Proteinurie entwickeln, wurde der Knockout zusätzlich auf einen FVB-Hintergrund rückgekreuzt und diese Tiere ebenfalls untersucht. Im Verlauf der 21-tägigen Hyperglykämiephase fanden sich keine signifikanten Unterschiede des Blutzucker- und Gewichtsverlauf bei den Versuchstieren. Eine tendenziell geringere Albuminurie wurde bei allen Knockoutmäusen beobachtet, der Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz. Im Nephrin-Endozytoseassay zeigten die C57BL/6-Knockoutmäuse eine tendenziell geringere Endozytose, die FVB-Knockoutmäuse wiederum eine tendenziell höhere Endozytose. Allerdings erreichte der Unterschied des Oberflächennephrins zwischen Wildtyp- und Knockouttieren ebenfalls nicht das Signifikanzniveau. Es ist bekannt, dass β -Arrestin-1 die Funktion von β -Arrestin-2 kompensieren kann. Es fand sich eine tendenziell erhöhte *beta-Arrestin-1* Expression bei den FVB-Tieren. Des Weiteren konnten gezeigt werden, dass unbehandelte C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse im Gegensatz zu den FVB-Tieren nicht nur eine bereits vorbeschriebene Glukosestoffwechselstörung, sondern auch eine gesteigerte Albuminurie aufweisen. Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse des Zellkulturmodells, dass die β -Arrestin-2 vermittelte Nephrin-Endozytose ein wichtiger zellulärer Pathomechanismus im Rahmen der hyperglykämieinduzierten Nierenschädigung ist. Die *in vivo* Ergebnisse legen jedoch nahe, dass die Endozytose im Zusammenspiel aller Mechanismen an der hochkomplexen Schlitzmembran von untergeordneter Bedeutung für die Gesamtschädigung zu sein scheint. Dies könnte sich unter anderem durch die Systemwirksamkeit des *beta-Arrestin-2* Knockouts erklären lassen, als auch durch die Schädigung aller Anteile des komplexen Nierenfilters durch die Hyperglykämie.

Abstract

Diabetic nephropathy is the leading cause for end stage renal disease in western countries. Hyperglycemia as seen in patients with poorly treated diabetes mellitus causes damage at the glomerular filter. Microalbuminuria is an early symptom of a leaky filter and is associated with increased cardiovascular risk and progression of the kidney disease itself. So far there is no specific treatment for patients with diabetic nephropathy. Once the disease is end stage patients must have dialysis or a kidney transplantation. The increased number of patients with end stage renal disease is challenging for both clinical practice and economy. Due to that fact and the missing therapeutic target research on hyperglycemia induced effects on the glomerular filter are highly up to date. New entries into the field deal with acute effects on the glomerular slit diaphragm, which is very important for the structural integrity of the filter to prevent the loss of plasma proteins through the urine, especially its key protein nephrin, which is expressed on the surface of podocytes. Quack et al. reported a mechanism showing that hyperglycemia leads to a β -Arrestin-2 mediated nephrin endocytosis which impairs slit diaphragm integrity, the last barrier against protein loss, due to a lack of surface nephrin. Until now this was only shown in cell culture. The leading questions in this study was to look for potentially protective effects by inhibiting β -Arrestin-2 mediated effects and to examine the applicability of this model *in vivo*.

This present study showed that a siRNA mediated β -Arrestin-2 knockdown in HEK293T-cells cultured in hyperglycemic media reduced nephrin endocytosis. For *in vivo* studies knockout mice with a homozygote *beta-Arrestin-2* knockout were compared to their wildtype. Acute hyperglycemia was induced by injecting streptozotocin as a model of type 1 diabetes mellitus. After 21 days of high blood sugar levels a nephrin endocytosis assay was performed using a new method to quantify slit diaphragm proteins in proteinuric kidney diseases. Because of the line specific differences concerning glucose tolerance and sensitivity for proteinuric diseases both FVB and C57BL/6 mice were used. Between the 21 days from inducing diabetes to organ removal blood sugar level, protein loss through urine as albumin-creatinin-ratio and weight were measured without showing a significant difference between knockout and wildtype even though by trend the knockouts showed slightly less proteinuria. The performed nephrin endocytosis assay neither showed a significant difference in the amount of surface nephrin comparing wildtype and knockout mice. On trend the C57BL/6 knockout mice had more surface nephrin while the FVB knockouts showed less. Compensatory the *beta-Arrestin-1* expression seems to be elevated on trend in FVB *beta-Arrestin-2* Knockout mice while its reduced in the corresponding C57BL/6 mice. Furthermore we complemented the known glucose tolerance disorders in untreated C57BL/6 *beta-Arrestin-2* knockout mice with findings of increased albuminuria compared to the wildtype. Neither of those effects were seen in FVB *beta-Arrestin-2* knockout mice.

The results from the cell culture experiments underlay the role of β -Arrestin-2 mediated nephrin endocytosis as an important pathomechanism in hyperglycemia induced renal damage. But the *in vivo* studies showed that it seems to play a minor role in interaction with all the hyperglycemia induced mechanisms of the highly complex renal architecture. That might be explained by systemic effects of the *beta-Arrestin-2* knockout and simultaneous damage to all parts of the highly complex glomerular filter.

Abkürzungsverzeichnis

18s	Komponente der kleinen Untereinheit eukaryotischer RNA	DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
§	Paragraph	DNase	Desoxyribonuklease
%	Prozent	dNTP	Desoxyribunokleosidtriphosphat
°C	Grad Celsius	DTT	Dithiothreitol
A	Ampere	ECL	Enhanced Chemiluminescence
Abb.	Abbildung	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ACR	<i>Albumine-Creatinin-Ratio</i>	ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
APS	Ammoniumperoxidisulfat	et al.	und andere
ARRB1	Humanes Gen, Genprodukt: β -Arrestin-1	FBS	Fetal Bovine Serum
ARRB2	Humanes Gen, Genprodukt: β -Arrestin-2	Fc-Fragment	<i>Fragment crystallisable</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
barr2 -/-	Homozygoter <i>Knockout</i> des <i>beta-Arrestin-2</i> Gens	for	<i>forward</i>
bP	Basenpaar	FVB	Eigennamen Mausinzuchtstamm
BSA	Bovines Serumalbumin	g	Gramm
C-terminal	Carboxylende	x g	x-fache der Erdbeschleunigung
C67BL/6	Eigennamen Mausinzuchtstamm	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
C₆H₈O₇	Zitronensäure	GBM	Glomeruläre Basalmembran
CaCl₂	Calciumchlorid	gDNA	<i>genomic DNA</i>
Cat. No.	Katalognummer	GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
cDNA	<i>complementary DNA</i>	GLUT-2	Glukosetransporter Typ 2
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat	GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
cm	Zentimeter	h	Stunde
C_r	<i>Cycle threshold</i>	H₂O	Wasser
dB	Dezibel	HCl	Salzsäure
dest.	destilliert	HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
dl	Deziliter	HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	i.E.	International Einheiten
		i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenös	NaF	Natriumfluorid
ID	Innendurchmesser	NPHS-1 und 2	<i>Nephrin precursor homo sapiens</i> Gen 1 und 2
Ig	Immunglobulin	OD	Außendurchmesser
IgG	Immunglobulin G	OP	Operation
IP	Immunpräzipitation	P	p- Wert: Signifikanzniveau
KCl	Kaliumchlorid	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
kD	Kilodalton	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
kg	Kilogramm	PBSCM	<i>Phosphate buffered saline</i> mit Zusatz von Magnesium und Chlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat	PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
KO	Knockout	pH	pH-Wert
l	Liter	PICK1	<i>Protein interacting with Kinase 1</i>
LANUV	Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz	PKCα	Proteinkinase alpha
M	Mol pro Liter	PM	Proteinmarker
m	Meter	pmol	Picomol
mA	Miliampere	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
mAB	monoclonal antibody	qPCR	Quantitative PCR
MAP	Mitogen aktivierte Protein	rev	<i>reverse</i>
MEM	<i>Minimum essential media</i>	RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
mg	Milligramm	RNA	Ribonukleinsäure
MgCl₂	Magnesiumchlorid	RNase	Ribonuklease
min	Minute	rpm	<i>rounds per minute</i>
ml	Mililiter	rRNA	Ribosomale RNA
mM	Milimol	RT	<i>Real Time (PCR)</i>
mm	Millimeter	SD	<i>Standard Deviation</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
n	Anzahl der Versuchspunkte	sec	Sekunden
N-terminal	Aminosäure Ende	siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Na₂EDTA	Disodiummethylenediaminetetr acetatdihydrat	SPF	Speziellpathogenfrei
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat	Src	Zytosolische Tyrosinkinase
Na₂VO₄	Natriumorthovanadat	STZ	Streptozotocin
Na₂P₂O₇	Tetranatriumpyrophosphat	TAE	Tris-Acetat-EDTA
NaCl	Natriumchlorid	TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>

TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamid		wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
Temp.	Temperatur	α	Alpha
TGF	<i>Transforming growth factor</i>	β	Beta
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>	β-Arr2	β -Arrestin-2
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	Δ	Delta
TschG	Tierschutz	μ	Mikro
V	Volt	μg	Mikrogramm
VE	Vollentsalzt	μl	Mikroliter
WT	Wildtyp	μm	Mikrometer
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und		

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Die Diabetische Nephropathie als führende Ursache terminaler Niereninsuffizienz	1
I.2 Der Aufbau des glomerulären Filters	3
I.3 Nephrin bildet das Grundgerüst der Schlitzmembran	4
I.4 β-Arrestin-2 interagiert mit transmembranären Rezeptoren	6
I.5 β-Arrestin-2 vermittelt Nephrin-Endozytose bei Hyperglykämie	8
I.6 Ziele dieser Arbeit	10
II Material und Methoden	12
II.1 Materialien	12
II.1.1 Zellkultur	12
II.1.2 Tierversuche.....	13
II.1.3 Endozytoseassays (Western Blot).....	16
II.1.4 Genexpressionsanalysen.....	20
II.1.5 Chemikalien	22
II.1.6 Allgemeine Geräte und Materialien	24
II.1.7 Software.....	26
II.2 Methoden	27
II.2.1 Zellkultur	27
II.2.1.1 Kultivierung von HEK-293T Zellen.....	27
II.2.1.2 siRNA-Transfektion.....	27
II.2.1.3 Zellernte und -lyse.....	29
II.2.1.4 Proteinbestimmung und -anpassung	29
II.2.1.5 Nephrin-IP aus HEK-Zelllysaten	30
II.2.2 Tierversuche.....	30
II.2.2.1 Versuchstiere.....	30
II.2.2.2 Versuchstierhaltung.....	31
II.2.2.3 Chemisch induzierter Diabetes mellitus: Injektion von Streptozotocin (STZ).....	32
II.2.2.4 Blutzuckermessung	33
II.2.2.5 Stoffwechsellkäfige und Sammelurin.....	33
II.2.2.6 Bestimmung der Albuminausscheidung im Urin.....	33
II.2.2.7 Perfusion der Nieren und Organentnahme	34
II.2.2.8 Glomeruliisolation und -aufbereitung	36
II.2.2.9 Nephrin-Immunpräzipitation aus Glomerulilysaten.....	37
II.3 Protein-Analyse: Biotinylierungsassay zur Analyse der Nephrin-Endozytose (Endozytoseassay)	38
II.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
II.3.2 Westernimmunoblotting (Western Blot).....	39

II.3.3 Auswertung des Endozytoseassays	40
II.4 Analyse der <i>beta-Arrestin-1</i> Expression.....	40
II.4.1 RNA Isolation aus Mausnieren.....	40
II.4.2 Reverse Transkriptase Reaktion	41
II.4.3 GAPDH-Kontroll-PCR durch konventionelle Polymerasekettenreaktion	42
II.4.4 Quantitative Analyse der mRNA Expression mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qPCR)	43
II.4.5 Auswertung der Expressionsanalysen	45
II.5 Graphische Darstellung und statistische Auswertung	45
III. Ergebnisse	47
III.1 Ergebnisse des Zellkulturmodells	47
III.1.1 siRNA vermittelter β -Arrestin-2 <i>Knockdown</i> in HEK293T-Zellen.....	47
III.1.2 verminderte hyperglykämieinduzierte Nephrin-Endozytose nach β -Arrestin-2 <i>Knockdown</i>	48
III. 2 Ergebnisse des Mausmodells	49
III.2.1 Ergebnisse des 21 Tage Hyperglykämie-modells auf C57BL/6 Hintergrund	49
III.2.1.1 Blutzucker-Verlauf nach STZ-induziertem Diabetes mellitus.....	50
III.2.1.2 Gewichtsverlauf.....	51
III.2.1.3 Albuminausscheidung im Urin (Albumin-Kreatinin-Ratio).....	52
III.2.1.4 Nephrin-Endozytoseassay.....	54
III.2.1.5 RNA-Expressionsanalysen: <i>beta-Arrestin-1</i> RT-qPCR.....	56
III.2.2. Ergebnisse des 21 Tage Hyperglykämie-modells auf FVB Hintergrund.....	57
III.2.2.1 Blutzucker-Verlauf nach STZ-induziertem Diabetes mellitus.....	57
III.2.2.2 Gewichtsverlauf.....	59
III.2.2.3 Albuminausscheidung im Urin (Albumin-Kreatinin-Ratio).....	60
III.2.2.4 Nephrin-Endozytoseassay.....	61
III.2.2.5 RNA-Expressionsanalysen: <i>beta-Arrestin-1</i> qPCR.....	63
III. 2.3 Vergleich der Ergebnisse der zwei genetischen Hintergründe	64
III.2.3.1 Vergleich Blutzuckerspiegel.....	64
III.2.3.2 Vergleich Albuminausscheidung (ACR).....	65
III.2.3.3 Vergleich Nephrin-Endozytose	67
IV. Diskussion.....	68
IV.1 Zellkulturmodell.....	68
IV.2 Mausmodell	69
IV.2.1 Streptozotocin als Modell des Diabetes mellitus Typ 1.....	70
IV.2.2 Blutzucker-Verlauf.....	71
IV.2.3 Verlauf der Albuminausscheidung.....	72
IV.2.4 Nephrin-Endozytoseassay	73
IV.2.5 <i>beta-Arrestin-1</i> Expression	75

IV.2.6 Unterschiede der untersuchten Mauslinien als Eignung für ein Modell der diabetischen Nephropathie	76
IV.2.7 Gestörte Glucosetoleranz der C57BL/6 <i>beta-Arrestin-2</i> Knockoutmäuse	79
IV.3 Schlussfolgerungen	83
Literatur- und Quellenverzeichnis	85
Anhang	90
Bildrechte für reproduzierte Abbildungen.....	90

I. Einleitung

I.1 Die Diabetische Nephropathie als führende Ursache terminaler Niereninsuffizienz

Die diabetische Nephropathie ist in den Industrieländern die führende Ursache für die Entstehung des terminalen Nierenversagens. [1] Sie entsteht als Folge der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus und stellt bei steigender Inzidenz eine große klinische und wissenschaftliche Herausforderung dar.

Im gesunden Organismus produziert die Bauchspeicheldrüse in den β -Zellen das Hormon Insulin, welches den Transport von Glukose in das Zellinnere ermöglicht. Nur so kann die mit der Nahrung aufgenommene Glukose in den Zellen im Rahmen der Glykolyse zur Energiegewinnung genutzt oder als Glykogen gespeichert werden. Bei Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt sind, kommt es zu einem Verlust dieses Mechanismus, die Glucose verbleibt im Blut, der Blutzuckerspiegel steigt und die Zellen erhalten keine Energie. [2]

Die häufigsten Untertypen dieser Erkrankung sind der Diabetes mellitus Typ I und Typ II. Beim Typ I kommt es durch nicht abschließend geklärte Auslöser zu einer autoimmunen Insulinitis, wodurch die β -Zellen des Pankreas zerstört werden. Es entsteht so ein absoluter Insulinmangel. Ab einer Zerstörung von 80% der β -Zellen wird die Erkrankung durch den extremen Blutzuckeranstieg rasch symptomatisch: Zunächst fallen Polyurie und Polydipsie auf, da die Nierenschwelle für die Rückresorption von Glukose aus dem Harn überschritten wird. Durch die resultierende Glukosurie wird osmotisch mehr Wasser ausgeschieden, was eine vermehrte Diurese und eine erhöhte Trinkmenge nach sich zieht. Es folgen körperliche Schwäche, sowie eine Verstoffwechslung von Fettsäuren anstelle der Glucose mit der Bildung von sauren Ketonkörpern bis zur potentiell letalen Ketoazidose. Typ I Diabetiker benötigen therapeutisch eine lebenslange Blutzuckereinstellung mittels Insulininjektionen. [3]

Dem Diabetes mellitus Typ II liegen mehrere Mechanismen zugrunde: eine vor allem postprandial gestörte Insulinsekretion mit Blutzuckerspitzen nach Nahrungsaufnahme, eine Apoptose der β -Zellen, sowie eine herabgesetzte Wirkung des Insulins (Insulinresistenz) an peripheren Rezeptoren. Neben genetischen Formen tritt ein Diabetes mellitus II häufig im Rahmen des Metabolischen Syndroms auf [4], das eine Kombination von kardiovaskulären Risikofaktoren darstellt: stammbetonte Adipositas, Dyslipidämie, essentielle arterielle Hypertonie sowie Glukoseverwertungsstörungen bis zum Diabetes mellitus Typ II. Durch die Insulinresistenz an den Zielzellen wird vermehrt Insulin ausgeschüttet, wodurch das Hungergefühl angeregt wird und der

Blutzuckerspiegel durch Nahrungsaufnahme weiter steigt, aber auch die Dichte der peripheren Rezeptoren wird weiter vermindert (*Down Regulation*). Durch die daraus resultierende Erschöpfung der β -Zellen kann es auch hier zu einem absoluten Insulinmangel kommen. Je nach Ausprägung wird ein Typ II Diabetes diätetisch und durch Änderung des Lebensstils [5], mit oralen Antidiabetika [6] oder mit Insulintherapie behandelt. Durch die schleichende oder gar fehlende Symptomatik wird die Krankheit in einer Vielzahl der Fälle erst spät diagnostiziert und therapiert, sodass diese Patienten häufiger Folgeerkrankungen erleiden. [3]

Bei schlechter Einstellung der Stoffwechsellage kommt es durch toxische Effekte der Hyperglykämie zu diversen Folgeerkrankungen des gesamten Organismus, vor allem des Gefäß- und Nervensystems, der Augen und der Nieren. Mikro- und Makroangiopathien mit gehäuften Gefäßverschlüssen (55% der Diabetiker versterben an einem Herzinfarkt), Retinopathien, Neuropathien und die in dieser Arbeit im Fokus stehende diabetische Nephropathie sind gefürchtete Komplikationen. [3]

In 35% der Fälle einer neu aufgetretenen, dialysepflichtigen Niereninsuffizienz ist diese durch eine diabetische Nephropathie bedingt [3]. Hierbei kommt es durch die toxischen Effekte wiederkehrender Hyperglykämien langfristig zu einer Schädigung des Nierenfilters und somit zu einem Abfall der Nierenfunktion. Die Ausprägung wird durch diverse Risikofaktoren bestimmt. Einige, wie Alter, Geschlecht oder Diabetesdauer, können nicht beeinflusst werden. Andere Risikofaktoren lassen sich therapeutisch beeinflussen, darunter stellen das Ausmaß der Hyperglykämie und die Höhe der Albuminurie die wichtigsten Größen dar. [7, 8] Zudem stellt die Proteinurie, die früh im Verlauf der Krankheit auftritt einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar.

Kommt es zur terminalen Niereninsuffizienz ist die Nierenfunktion, gemessen als Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), soweit eingeschränkt, dass ein Überleben ohne Nierenersatztherapie (Dialyse) oder Nierentransplantation unmöglich ist, da es zu einer Überwässerung und einer potentiell lebensbedrohlichen Ansammlung von Elektrolyten und Giftstoffen im Körper kommt. Per definitionem spricht man ab einer GFR von unter 15 ml/min von einem terminalem Nierenversagen, die normale Leistung beträgt über 90 ml/min. Die diabetische Nephropathie tritt als Langzeitkomplikation bei Typ I und Typ II Diabetikern auf, wobei laut des Projekts „*QuaSi Niere*“ [9] von derzeit 17.000 dialysepflichtigen Patienten dieser Gruppen ausgegangen wird. Etwa 1-2% der Patienten mit Typ I Diabetes erleiden nach 22 Jahren Erkrankungsdauer eine terminale Niereninsuffizienz. [10-12] Bei Typ II Diabetikern ist die Progredienz rascher (0,8% nach 10 Jahren) [13], was unter anderem auf eine späte Diagnosestellung und damit verzögerte Einleitung einer Therapie zurückzuführen ist, sowie auf die Koinzidenz anderer Risikofaktoren, die im Rahmen des Metabolischen Syndroms hinzukommen. [13, 14]

Die diabetische Nephropathie stellt so eine Systemerkrankung dar, die eng mit einem Anstieg von Morbidität und Mortalität verknüpft ist und eine Verringerung von Lebenserwartung und Lebensqualität bedingt, weshalb sie Gegenstand vieler aktueller Studien ist. [15]

I.2 Der Aufbau des glomerulären Filters

Gemäß Definition und Stadieneinteilung ist die diabetische Nephropathie durch einen Verlust der Nierenfunktion und das Auftreten einer Albuminurie gekennzeichnet. [16, 17] Entscheidend für die Nierenfunktion ist das Nephron, die kleinste Funktionseinheit des Organs, zusammengesetzt aus dem Glomerulum, einem kapillären Gefäßknäuel, umgeben von der Bowman Kapsel (siehe Abbildung I.1). In dieser Einheit findet entlang der Blut-Harn-Schranke die Ultrafiltration des Primärharns statt, welcher im folgenden Tubulussystem eine Feinabstimmung durchläuft. Über die Harnausscheidung erfüllt die Niere Entgiftungs- und Entwässerungsfunktionen. [18] Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit Vorgängen bei Hyperglykämie im Glomerulum, weshalb im Folgenden auf die Beschreibung der vielfältigen anderen Bestandteile und Funktionen der Niere verzichtet wird.

Die Blut-Harn-Schranke setzt sich aus dem fenestrierten Gefäßendothel der Kapillaren, den Fußfortsätzen der Podozyten und der glomerulären Basalmembran (GBM) zusammen. [18] Die Basalmembran besteht aus einem dichten Netz von Typ IV Kollagen, Laminin, Nidogen, und Proteoglycanen. [19] Die Podozyten, gelegen auf der Harnseite, sind viszerale Epithelzellen der Nieren mit verzweigt konfigurierten Ausläufern, den Fußfortsätzen. [20] Diese teilen sich in primäre und sekundäre Fortläufer auf, welche sich mit den Fortläufern anderer Zellen verbinden und so um die Kapillarschlingen ein dichtes Netz ausbilden. Zwischen aneinander angrenzenden Fußfortsätzen ist eine dünne extrazelluläre Membran mit 30-40nm weiten Poren, die Schlitzmembran, ausgebildet. [21] Der luminale Teil dieser Membran wird von einer Glykokalix ausgebildet, welche die anionische Oberflächenladung des Filters ausmacht. [22] 1974 stellten Rodewald und Karnowsky [21] mittels Elektronenmikroskopie das erste Modell der Schlitzmembran auf, welches seitdem stetig weiter entwickelt wird. So geht man davon aus, dass die negative Ladung (die durch GBM und Endothel verstärkt wird) und die Schlitzmembranporen eine Selektion der filtrierte Moleküle nach Größe und Ladung ermöglichen. Diese Selektion ist entscheidend dafür, dass negativ geladene Proteine, die größer als das Albuminmolekül sind, nicht filtrierte werden. [23] Details dieses Mechanismus sind weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Debatten. Kommt es zu Schäden an der Schlitzmembran fallen diese Selektionseffekte weg und man beobachtet eine Albuminurie. [24] Die Albuminurie ist ein wichtiger prognostischer Faktor, da sie neben den oben erwähnten Komplikationen auch ein Risikofaktor für den fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion bis zum terminalen Nierenversagen ist. [25]

Der glomeruläre Filter

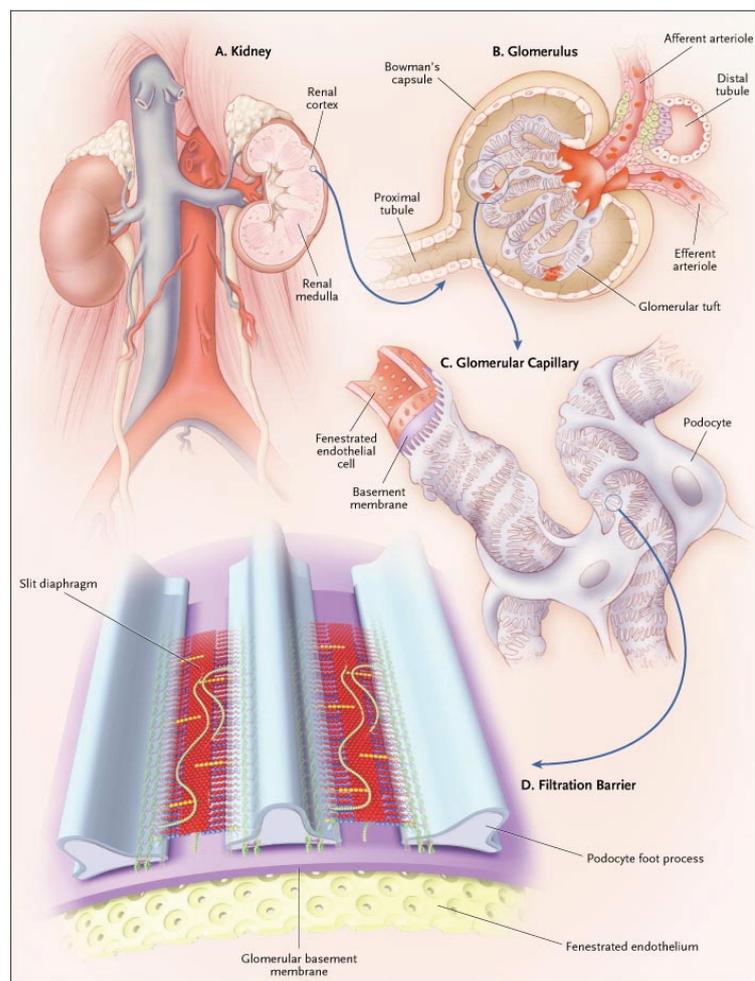


Abb. I.1 Schematischer Aufbau des glomerulären Filters. (Tryggvason *et al.*, 2006).

A. Paarige Lage der Nieren im Retroperitonealraum. In der Nierenrinde liegen dabei jeweils eine Million Glomeruli, die Funktionseinheiten des Filtrationssystems. B. Schematische Darstellung des Glomerulums, bestehend aus einem Kapillarknäuel mit umgebender Kapsel. C. In den glomerulären Kapillaren findet entlang der Blut-Harn-Schranke die Filtration des Primärharns statt. Diese besteht aus dem fenestrierten Gefäßendothel, den Podozytenfußfortsätzen, sowie der glomerulären Basalmembran. D. Zwischen den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten ist die Schlitzmembran ausgebildet. [24] Reproduktion mit freundlicher Genehmigung von Tryggvason *et al.* Reproduced with permission from Tryggvason *et al.*, Copyright Massachusetts Medical Society.

I.3 Nephrin bildet das Grundgerüst der Schlitzmembran

Die strukturelle Integrität der Schlitzmembran wird durch eine Vielzahl von Proteinen bestimmt. Eines der ersten identifizierten Proteine ist Nephrin, dem auch eine besonders große Bedeutung bei der Hemmung der Proteinfiltration zugesprochen wird: Bei einer Mutation des für Nephrin kodierenden *NPHS1*-Gens kommt es zur Ausbildung eines kongenitalen nephrotischen Syndroms, welches bereits *in-utero* mit einer Proteinurie einhergeht und nach Geburt rasch eine terminale Niereninsuffizienz bedingt. Im Rahmen von Studien dieser in Finnland gehäuft vorkommenden Mutation wurde das wegen seiner damals angenommenen nephronspezifischen Bildung Nephrin

genannte 180 kD schwere Protein entdeckt. [26-29] Später konnte ebenso eine Expression von Nephrin im Pankreas und in einigen Teilen des Gehirns nachgewiesen werden. [30]

Die glomeruläre Schlitzmembran

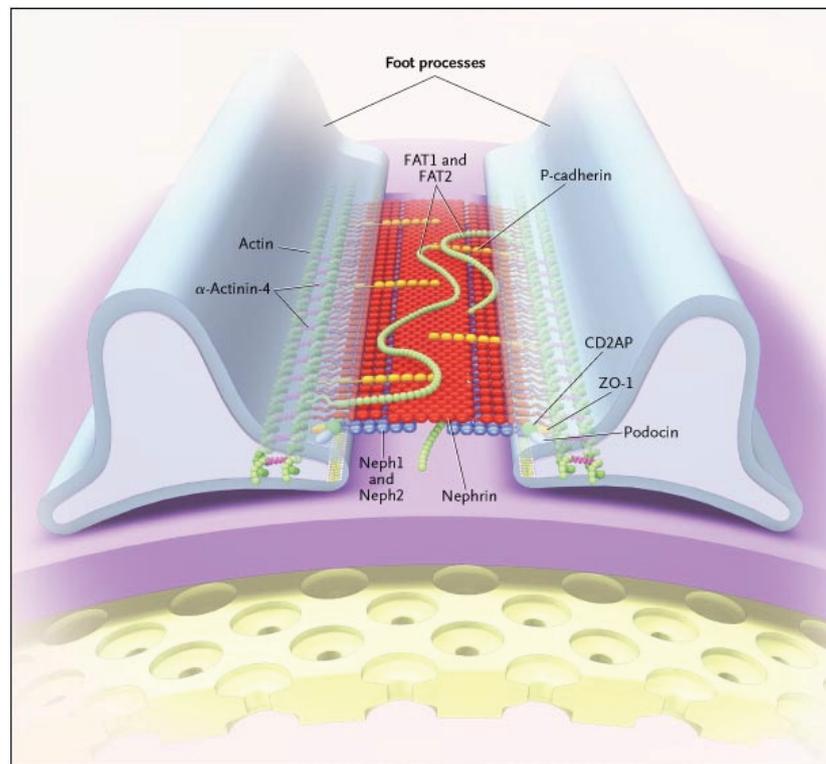


Abb. 1.2. Detaillierte schematische Darstellung des Aufbaus der glomerulären Schlitzmembran. (Tryggvason *et al.*, 2006).

Zwischen benachbarten Podozytenfortsätzen ist die glomeruläre Schlitzmembran ausgebildet. Hauptbestandteil sind Nephrinmoleküle, die mit ihrem extrazellulärem Anteil aus dem Podozyten herausragen und im Zentrum auf Nephrinmoleküle benachbarter Podozyten treffen. Dadurch bilden sie reißverschlussartig das Rückgrat der Schlitzmembran. Sie sind verbunden mit Aktinmolekülen im Podozyten sowie weiteren Proteinen der Schlitzmembran wie zum Beispiel Podocin. [24] *Reproduktion mit freundlicher Genehmigung von Tryggvason et al. Reproduced with permission from Tryggvason et al., Copyright Massachusetts Medical Society.*

Nephrin, das zur Superfamilie der Immunglobuline gezählt wird, besteht aus einem N-terminalen extrazellulären Abschnitt mit acht immunglobulinähnlichen Domänen plus einer Fibronectin-Typ-III-Domäne, einem transmembranären Abschnitt und einem C-terminalen Abschnitt der ins Zytoplasma reicht. Seit einem Modell von Tryggvason, 1999 [31], geht man aufgrund des Molekülaufbaus davon aus, dass es sich bei den Nephrinmolekülen um Adhäsionsmoleküle handelt, die durch reißverschlussartige Interaktionen von Nephrinmolekülen benachbarter Podozyten das Rückgrat der Schlitzmembran bilden. Dabei liegen die intrazellulären Anteile des Nephrin im Podozyten, die extrazellulären Anteile von Nephrinmoleküle benachbarter Podozyten treffen sich im Zentrum der Schlitzmembran. [24] Neuere Untersuchungen konnten dieses Modell bestätigen. [32, 33] Nephrin bildet so das Grundgerüst der Schlitzmembran, in welches sich weitere Proteine wie

Podocin, NEPH1, NEPH2, CD2AP, ZO-1, FAT1 und P-Cadherin eingliedern. [26, 32] Zudem hat Nephrin durch den hohen Tyrosingehalt des zytoplasmatischen Abschnitts viele Phosphorylierungsmöglichkeiten [26, 30, 34] und ist so Teil diverser Signaltransduktionskaskaden, beispielsweise mit dem Nachbarprotein Podocin (siehe Abbildung I.2). [26, 31]

Durch Mutationen des Podocin kodierenden *NPHS2*-Gens kommt es zu einem frühkindlichen steroidresistenten nephrotischen Syndrom. [35] So spielt dieses Molekül ebenfalls eine große Rolle für die Integrität des glomerulären Aufbaus. Das 42 kD schwere Protein wird ausschließlich im Podozyten exprimiert und zur Familie der Stomatinproteine gezählt. Als sogenanntes Protein der *Lipid Raft* Gruppe (auf Signaltransduktion spezialisierte Mikrodomänen der Plasmamembran) vermittelt Podocin diverse Signaltransduktionen, die die Integrität der Schlitzmembran aufrecht erhalten. [36] So interagiert es mit dem zytoplasmatisch liegenden Teil des Nephrinmoleküls, vermittelt Signaltransduktionen an das Nephrinmolekül und sorgt für dessen Eingliederung in die Schlitzmembran. [37, 38]

1.4 β -Arrestin-2 interagiert mit transmembranären Rezeptoren

Signaltransduktionen sind die physiologische Grundlage inter- und intrazellulärer Kommunikation, welche durch diverse Botenstoffe und Rezeptoren vermittelt werden. Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellt mit etwa 800 Mitgliedern die größte Gruppe transmembranärer Rezeptoren dar, sie kann eine Vielzahl an Liganden binden und spielt eine Rolle in den meisten physiologischen und krankheitsbedingenden Signaltransduktionen ins Zellinnere. [39] Anhand dieser Rezeptorgruppe konnten Lefkowitz und Shenoy 2003 [40] einen Signaltransduktionsweg aufzeigen, bei dem es durch β -Arrestin-2 vermittelt zu einer Internalisierung von transmembranären Rezeptoren ins Zellinnere kommt, wodurch nachfolgende Signalkaskaden beeinflusst werden. [41]

Die Arrestin-Familie ist eine kleine Proteinfamilie mit vier Mitgliedern, die in die Signalkaskaden von transmembranären Rezeptoren eingreifen. Arrestin 1 und 4 befinden sich ausschließlich in der Retina. Arrestin 2 und 3 werden ubiquitär, also auch im Podozyten, jedoch am häufigsten im Nervensystem ausgebildet: sie werden vermehrt als β -Arrestin-1 und -2 bezeichnet. [42] Die Hauptmechanismen liegen sowohl in der sterischen Blockade der Rezeptoren [43] als auch bei β -Arrestin-1 und -2 in der Clathrin-vermittelten Endozytose der Rezeptoren ins Zellinnere. [44] Darüber hinaus führen sie als Scaffold-Proteine zu einer Anbindung der Rezeptoren an andere Signalkaskaden, wie den MAP- Kinase Weg. Anhand des TGF- β -III-Rezeptors konnten Chen et al. 2003 [45] zeigen, dass diese Interaktion von β -Arrestin-1 und -2 nicht nur für 7-Transmembranrezeptoren sondern auch für die Gruppe der 1-Transmembranrezeptoren zutrifft und durch Tyrosinphosphorylierung vermittelt wird. Nephrin, das Schlüsselmolekül der podozytären

Schlitzmembran, gehört ebenfalls zu dieser Gruppe der 1-Transmembranrezeptoren und besitzt eine Vielzahl an phosphorylierbaren Tyrosinstellen [46]. Zudem werden im Podozyten Kinasen der Src-Familie exprimiert (Yes, Fyn, Src) [47], die Signalkaskaden durch Tyrosinphosphorylierung vermitteln und zu diesem Zwecke das Nephrinmolekül am C-terminalen Ende abhängig von dessen extrazellulären Bindungsstatus [48] phosphorylieren. β -Arrestin-2 vermittelte Interaktionen in diesen Phosphorylierungskaskaden schienen naheliegend, da Nephrin mehrere potentielle Bindungsstellen für β -Arrestin bietet. [49]

β -Arrestin-2 vermittelte Nephrin-Endozytose

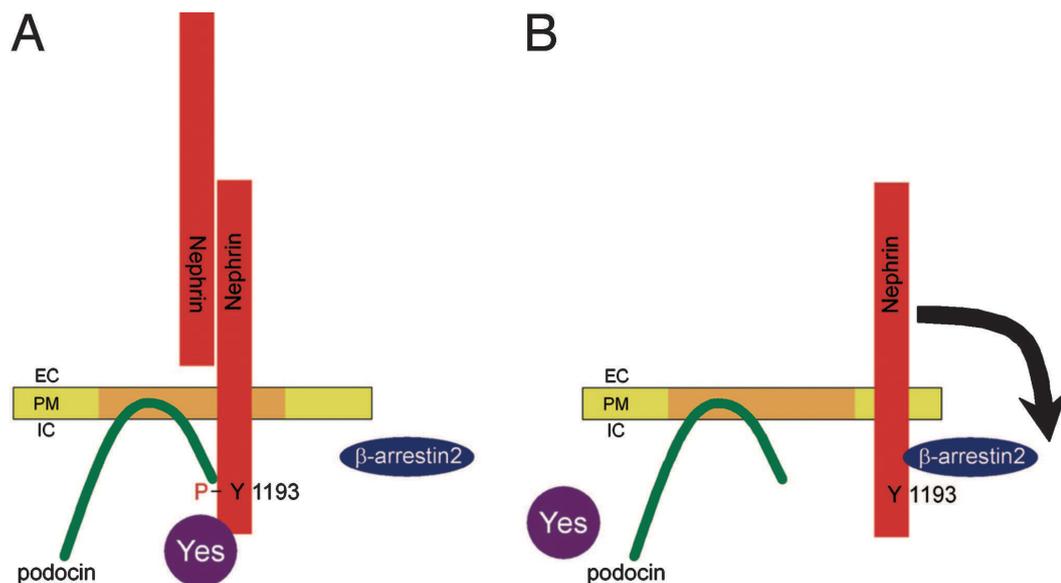


Abb. I.3 Schema der β -Arrestin-2 vermittelten Nephrin-Endozytose: β -Arrestin-2 bindet phosphorylierungsabhängig an Nephrin und bewirkt so eine Endozytose des Moleküls. (Quack *et al.*, 2006).

Abhängig vom Phosphorylierungsstatus an der Tyrosinstelle Y 1193 binden Podocin oder β -Arrestin-2 an das Nephrinmolekül, was die Lage des Moleküls beeinflusst. **A.** Extrazelluläre Bindungen des Nephrinmoleküls zum Beispiel durch Kopplung an Nephrinmoleküle benachbarter Podozyten bewirken eine intrazelluläre Phosphorylierung an der Tyrosinstelle Y 1193 durch die podozytär exprimierte Src-Kinasen (in der Abbildung ist Yes beispielsweise dargestellt). Dadurch bindet Podocin an Nephrin und verankert dieses in der Plasmamembran, wodurch es einen Teil der transzellulären Schlitzmembran ausbildet. **B.** Verliert Nephrin den Kontakt zu seinem extrazellulären Bindungspartner kommt es zur Dephosphorylierung, was die Interaktion mit Podocin beendet und eine Bindungsstelle für β -Arrestin-2 freigibt: Nephrin verschwindet von der Zelloberfläche und die Nephrin vermittelte Signalkaskade ist beendet. [50] Reproduktion mit freundlicher Genehmigung von Quack et al.

Quack et al. [50] konnten 2006 zeigen, dass es phosphorylierungsabhängig zu einer Interaktion zwischen Nephrin und β -Arrestin-2 kommt, was eine Endozytose von Nephrin aus der Schlitzmembran ins Zellinnere bewirkt (Details zum Mechanismus siehe Abb. I.3). Ausgelöst wird dieser Phosphorylierungswechsel durch diverse Stressfaktoren hier beispielsweise dargestellt der Verlust extrazellulärer Bindungspartner. Weitere Auslöser sind Gegenstand der Forschung. Durch Dephosphorylierung verliert Nephrin seine stabilisierende Bindung zu Podocin, das die Rekrutierung in die Plasmamembran steuert, und über welches Nephrin an Signalkaskaden

teilnimmt. Stattdessen kommt es zur Bindung von β -Arrestin-2 an der freigewordenen Bindungsstelle, welches hier wie ein Gegenspieler zum stabilisierenden Podocin fungiert und eine Endozytose von Nephrin ins Zellinnere fördert. Durch diesen Positionswechsel werden Funktionalität und Integrität der Schlitzmembran beeinflusst. Die Nephrin-Endozytose ist als Mechanismus für eine Vielzahl pathologischer Einflüsse denkbar.

1.5 β -Arrestin-2 vermittelt Nephrin-Endozytose bei Hyperglykämie

Die Hyperglykämie im Rahmen des Diabetes mellitus wirkt sich negativ auf die Nierenfunktion insbesondere auf die Vorgänge an der Schlitzmembran aus. Dabei kommt es zu diversen Schäden am glomerulären Apparat, wie z. B. dem Verlust der negativen Ladung der Blut-Harn-Schranke, endothelialer Dysfunktion und Strukturveränderungen am Podozyten selbst. [51] Zudem werden podozytäre Signalkaskaden beeinflusst: eine veränderte Expression und Verteilung von Nephrin bei diabetischen Menschen und Mäusen [52-54], sowie eine Hyperglykämie induzierte Aktivierung der Proteinkinase α (PKC α) [51] wurden beobachtet. Die Gesamtheit dieser und weiterer, noch unbekannter Mechanismen, führen zu einer Hyperglykämie induzierten Beeinträchtigung der Nierenfunktion mit dem bei chronischer Stoffwechsellage eintretenden Vollbild der diabetischen Nephropathie.

Die PKC α spielt dabei eine wesentliche Rolle in der Vermittlung der Schädigungskaskaden. In PKC α defizienten Mäusen mit induzierter diabetischer Stoffwechsellage kam es nicht zur Ausbildung einer Albuminurie. Eine veränderte Transkription wird hierbei als Grundlage des Mechanismus vermutet. [55] Bisher wurden vornehmlich Modelle untersucht, die Langzeitfolgen des Diabetes mellitus darstellen. [56] Aber auch kurzzeitige Einflüsse der Hyperglykämie scheinen die Selektivität des Nierenfilters zu beeinflussen: Axelsson *et al.* [57] konnten zeigen, dass auch eine kurzzeitig induzierte Hyperglykämie in vormals normoglykämischen Ratten zu akuten Veränderungen der Selektivität des Nierenfilters führt.

Einen Molekularmechanismus, der auch diese akuten hyperglykämieinduzierten Veränderungen an der Schlitzmembran mit einbezieht, postulierte die Arbeitsgruppe um Quack, Woznowski *et al.* 2011 [58]. Dieses Modell beschreibt einen Kinasen-vermittelten Mechanismus mit rasch auftretenden Effekten des erhöhten Blutglukosespiegels auf die Durchlässigkeit der Schlitzmembran (Details s. Abb. I.4). Diese Arbeit konnte in HEK-293T Zellen zeigen, dass die vormals beschriebene Bindung von β -Arrestin-2 an Nephrin bei hoher Glukosekonzentration nach etwa 3 Stunden verstärkt wird. Als auslösende Kinase, die diesen Mechanismus steuert, wurde PKC α identifiziert: Unter dem Einfluss hoher Glukosespiegel steigt die Expression dieser Proteinkinase an. Dieser Effekt konnte *in vitro* in murinen Podozyten (nach 3h) als auch *in vivo*, in den Nieren von C57BL/6 Mäusen, die kurzfristig (24h) einer diabetischen Stoffwechsellage ausgesetzt wurden, beobachtet

werden. In der HEK293T-Zellkultur und in C57BL/6 PKC α Knockoutmäusen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es bei Hyperglykämie im Vergleich zur Normoglykämie zu einer vermehrten Bindung von PKC α in Kombination mit dem Protein-interacting with C Kinase-1 (PICK1) an das Nephrinmolekül kommt. Diese Interaktion bewirkt eine vermehrte Phosphorylierung von Nephrin, was die Interaktion von Nephrin und β -Arrestin-2 freigibt, welche die zuvor beschriebene Endozytose des Nephrinmoleküls bewirkt. Wie auch bei anderen Molekülen, die mit β -Arrestin-2 interagieren, konnte auch hier gezeigt werden, dass die Internalisierung von Nephrin durch Endozytose geschieht. Über die GTPase Dynamin und das Vesikel bildende Protein Clathrin läuft so die Internalisierung des vormals oberflächenexprimierten Nephrins ins Zellinnere ab. [59] Somit konnten mit diesem Mechanismus weitere entscheidende Mediatoren aufgezeigt werden, die den pathologischen Einfluss erhöhter Glukosekonzentrationen auf die Schlitzmembran bewirken. Dies bietet neue Anknüpfungspunkte für weitere Fragestellung und mögliche therapeutische Ansätze.

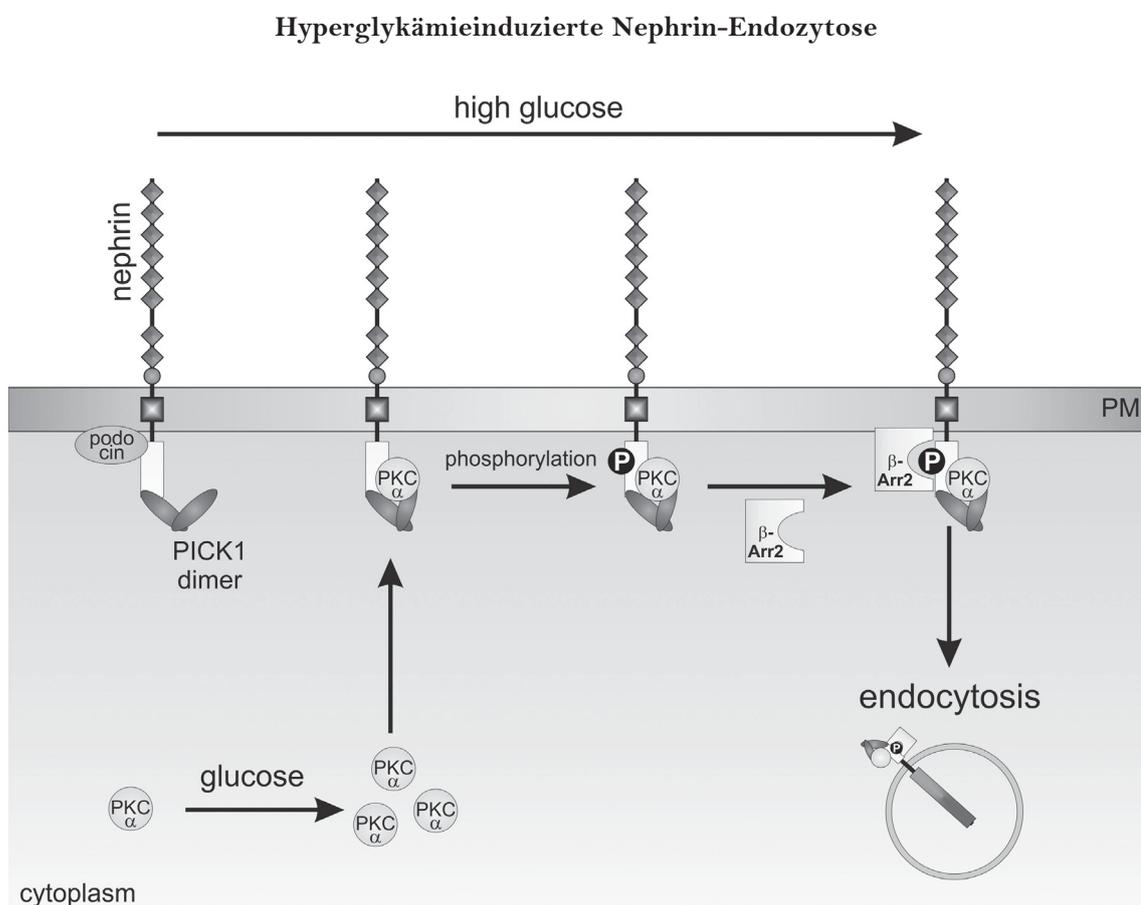


Abb. I.4 Schematische Darstellung des Molekularmechanismus der hyperglykämieinduzierten Nephrin-Endozytose (Quack, Woznowski *et al.*, 2011)

Unter dem Einfluss einer Hyperglykämie kommt es sowohl zum einen zur vermehrten Expression der Proteinkinase PKC α als auch zu einer durch PICK1 Dimere vermittelten Bindung von PKC α an oberflächenständige Nephrinmoleküle. Dadurch werden diese phosphoryliert, was die Bindung von β -Arrestin-2 ermöglicht und die Endozytose über Clathrin und Dynamin ins Zellinnere einleitet. [58] Reproduktion mit freundlicher Genehmigung von Quack, Woznowski *et al.*, Copyright Journal of Biological Chemistry.

I.6 Ziele dieser Arbeit

Vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage, insbesondere der Postulierung des oben beschriebenen Mechanismus der hyperglykämieinduzierten, β -Arrestin-2 vermittelten Nephrin-Endozytose auf zellulärer Ebene stellt sich nun die Frage nach der *in-vivo* Anwendbarkeit des Modells und möglichen protektiven Effekten durch die Ausschaltung der Mediatoren dieses schädigenden Effekts. Im Fokus der Arbeit stehen dabei die Effekte von β -Arrestin-2 auf den Pathomechanismus der Hyperglykämie induzierten Nephrin-Endozytose. Die Grundlagenforschung zu den Mechanismen der hyperglykämieinduzierten Nierenschädigung ist umso wichtiger, da es bisher noch keine kausale Therapie dieser Erkrankung gibt. Man erhofft sich durch ein besseres Verständnis der Pathomechanismen auch die Entdeckung möglicher Therapieansätze.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

- 1.) Zeigt die Verringerung des Einflusses von β -Arrestin-2 auf den Pathomechanismus der hyperglykämieinduzierten Nierenschädigung einen Einfluss auf die Nephrin-Endozytose im Zellmodell?

Quack, Woznowski et al. [58], konnten beobachten, dass es in HEK293T Zellen, die in Medium mit hoher Glucosekonzentration kultiviert wurden, zu einer β -Arrestin-2 vermittelten Nephrin-Endozytose kommt. Umgekehrt stellt sich nun die Frage, ob durch eine Reduktion des Einflusses von β -Arrestin-2 auf diese Signalkaskade diese pathologischen Vorgänge eingeschränkt werden können. Dazu sollen zunächst in der Zellkultur HEK-293T Zellen, bei welchen das Genprodukt durch siRNA verringert wurde, untersucht werden.

- 2.) Lässt sich das in der Zellkultur aufgestellte Modell auch *in vivo* anwenden?

Bisher wurde das Modell der β -Arrestin-2 vermittelten Nephrin-Endozytose vor allem in der Zellkultur untersucht. Zudem konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass die Nephrin-Endozytose auch bei diabetischen Mäusen eine Rolle spielt: diese Tiere zeigten nach Induktion eines Diabetes mellitus Typ 1 eine erhöhte Nephrin-Endozytose und Proteinurie. Hier stellt sich nun die Frage nach der Bedeutung von β -Arrestin-2 in diesem Pathomechanismus. Dafür wird in einer Methode zur Quantifizierung von Schlitzmembranproteinen die Menge des Oberflächennephrins bei Mäusen mit Streptozotocin-induziertem Diabetes Mellitus *in vivo* untersucht [60] und dabei zwischen Mäusen mit- und ohne *beta-Arrestin-2* Knockout verglichen.

- 3.) Gibt es einen protektiven Effekt auf die Albuminurie durch Hemmung des Einflusses von β -Arrestin-2 bei hyperglykämischer Stoffwechsellage?

Die Albuminurie stellt einen wichtigen Risikofaktor, sowohl für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, als auch für die Progression der Nierenerkrankung selbst dar. Bei der Untersuchung des beschriebenen Pathomechanismus stellt sich die Frage, ob eine Inhibition von β -Arrestin-2 durch Knockout einen Einfluss auf die Albuminurie oder andere protektive Effekte auf den Organismus aufweist. Hauptbestandteil dieser Arbeit sind so Untersuchungen in diabetischen Mausmodellen mit und ohne Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens. Hierbei soll untersucht werden, inwiefern diese Mäuse, die das Protein nicht mehr exprimieren, trotz diabetischer Stoffwechsellage vor pathologischen Effekten am Nierenfilter geschützt sind.

Zu den geplanten Untersuchungen gehören die Quantifikation der Endozytose, die Analyse der Proteinurie sowie Expressionsanalysen der an der Signalkaskade beteiligten Proteine. Ziel der Arbeit ist es dabei, den Pathomechanismus der β -Arrestin-2 gesteuerten Nierenschädigung besser zu verstehen und mögliche weitere Einflussfaktoren der hyperglykämieinduzierten Nierenschädigung zu identifizieren.

II Material und Methoden

II.1 Materialien

II.1.1 Zellkultur

Zelllinien

Für die Versuche in der Zellkultur wurden HEK 293T-Zellen (*Human embryonic kidney cells*) verwendet, die uns freundlicherweise vom Labor Prof. Dr. G. Walz, Freiburg überlassen wurden.

In den folgenden Tabellen sind die in der Zellkultur verwendeten Materialien aufgeführt:

Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Dulbecco's MEM Medium (DMEM) 1,0g/l Glucose	Biochrom AG, Berlin	FG0415
Dulbecco's MEM Medium (DMEM) 4,5g/l Glucose	Biochrom AG, Berlin	FG1445
FBS Superior (Lot 0214 X)	Biochrom AG, Berlin	S 0615
Trypsin 0,05% / EDTA 0,02%	Biochrom AG, Berlin	L 2143
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin	L 1825

Tabelle 2.1: Übersicht über Zellkulturmedien und Zusätze für die Kultivierung von HEK 293T-Zellen.

Geräte und Materialien

Produkt	Hersteller
Inversmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Scientific, Darmstadt
Zellinkubator Hera Cell 150	Thermo Scientific, Darmstadt
Pipetten Pipetman Classic™	Gilson, Limburg-Offheim
Filterspitzen für Pipetten	Sarstedt; Nümbrecht
Serologische Pipetten, einzeln verpackt	Corning, Wiesbaden

10cm Zellkulturschalen	Corning, Wiesbaden
6cm Zellkulturschalen	Corning, Wiesbaden

Tabelle 2.2: Übersicht über Geräte und Materialien zur Kultivierung von HEK 293T-Zellen.

Agenzien

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Human ARRB2 siRNA	Thermo Scientific, Darmstadt	AM 16708
Control pool siRNA		
Silencer® Negative Control No.1 siRNA	Thermo Scientific, Darmstadt	AM 4611
5x siRNA Buffer	Dharmacon, Lafayette	B-002000-UB-100
DharmaFECT Duo Transfection Reagent	Dharmacon, Lafayette	T-2010-01
RNase free water	Thermo Scientific, Darmstadt	AM 9916
Nephrin-Plasmide	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Walz, Freiburg	

Tabelle 2.3: Übersicht über sonstigen für Zellversuche verwendeten Agenzien.

Für Proteinisolierung und IP wurden die Zellen mit Puffern in den in Tabelle 2.5 aufgeführten Konzentrationen behandelt

II.1.2 Tierversuche

Mauslinien

Für alle Tierversuche wurden männliche Mäuse aus Inzuchtstämmen mit einem Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens verwendet. In der Vergleichsgruppe Wildtypiere des entsprechenden genetischen Hintergrundes. Der Knockout wurde auf zwei genetischen Hintergründen untersucht:

1. *beta-Arrestin-2* Knockout auf dem genetischen Hintergrund des C57BL/6 Inzuchtstamms (C57BL/6 *barr2*^{-/-})
2. *beta-Arrestin-2* Knockout auf dem genetischen Hintergrund des FVB Inzuchtstamms (FVB *barr2*^{-/-})

Die Wildtyptiere beider Stämme wurden von der Firma *Janvier Labs* bezogen. Die C57BL/6 Linie der Knockoutmäuse wurden uns von Prof. R.J. Lefkowitz, Medizinisches Institut, Duke *University* Durham, North Carolina freundlicherweise zur Verfügung gestellt. [61] Diese von Bohn, Lefkowitz et al. 1999 generierten Knockoutmäuse [61] verfügen über einen homozygoten Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens. Dieser wurde durch das Einbringen einer Neomycinkassette bewirkt, welche den Funktionsverlust des Exons 2 dieses Gens auf Chromosom 11 bewirkt. Durch MitarbeiterInnen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erfolgte die Rückkreuzung auf den FVB Hintergrund. Erst der nach 10 Rückkreuzungen vollständig kongene Stamm wurde für die Versuche verwendet. Tiere beider Stämme wurden regelmäßig durch MitarbeiterInnen unseres Labors genotypisiert (s. Tabelle 2.13) um den homozygoten Knockout zu überprüfen. Die Mäuse gingen im Alter von 8-18 Wochen in die Versuche ein.

Die Genehmigung der tierexperimentellen Untersuchungen erfolgte durch das Landesamt für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz (LANUV) des Landes Nordrhein Westfalen unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A099. Ein Fachkundenachweis zur versuchstierkundlichen Einführung gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes unter der Leitung von PD Dr. M. Sager wurde erworben. Eine ordnungsbehördliche Erlaubnis im Rahmen einer Ausnahmegenehmigung zur Mitarbeit an dem unter oben genannten Aktenzeichen genehmigten Projekts vom 13.11.2013 liegt vor.

Die folgenden Tabellen zeigen die für die Mausversuche verwendeten Verbrauchsmaterialien, Medikamente und Geräte. Die Haltung und Pflege der Tiere wurde durch die TierpflegerInnen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich Heine Universität Düsseldorf übernommen.

Medikamente und Toxine

Produkt	Hersteller	Artikel-/ Katalognummer
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, Darmstadt	S0130
Ketamin als Ketaminhydrochlorid 100mg/ml, Ketavet®	Pfizer, Berlin	F273-06
Xylazin als Xylazinhydrochlorid 200mg/ml, Rompun®	Bayer AG, Leverkusen	KPOA464
Isotonische Kochsalzlösung, 0,9%NaCl	Fresenius Kabi, Bad Homburg	B101153 Rev.01

Tabelle 2.4: Übersicht über Medikamente und Toxine für die Tierversuche.
Streptozotocin wurde kurz vor der Injektion in 10 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH 4,5) gelöst.

Puffer und Lösungen für die Nierenperfusion

PBSCM	1x PBS (s. Tabelle 2.9) + 0,1mM CaCl ₂ + 1mM MgCl ₂
PBSCM + Biotin	0,5mg EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin/ml PBSCM
PBSCM + Glycin	PBSCM + 100mM Glycin
PBSCM + Dynabeads	200µl Dynabeads® Solution/5ml PBSCM Dynabeads® Untouched™ Mouse T-Cells, Invitrogen, Darmstadt, Cat. No. 14413D
PBSCM + Collagenase A	1,5 mg Collagenase A/ml PBSCM

Tabelle 2.5: Übersicht über die Puffer und Lösungen, für die im Tierversuch erfolgte Nierenperfusion. Puffer dieser Zusammensetzung wurden auch für die Behandlung der Zellen vor der Lyse verwendet. Es ist stets die verwendete Endkonzentration angegeben. Details zu den Chemikalien finden sich in der entsprechenden Übersicht.

Materialien und Geräte für die Tierversuche

Produkt	Hersteller	Artikel-/ Katalognummer
10ml Spritzen Inject®	Braun, Aschaffenburg	4606108V
1ml Spritzen Omnifix®	Braun, Aschaffenburg	9161406V
Blutzucker Messgerät: Contour®	Bayer AG, Leverkusen	SN 2041120
Blutzucker Messsticks: Contour®	Bayer AG, Leverkusen	PZN-6690980
Dynamag™-2	Invitrogen, Darmstadt	12321D
Fine Pore Polythene Tubing 0,58 mm ID 0,96 mm OD	SMITH medical, Minneapolis	800/100/200
0,28 mm ID 0,61mm OD		800/100/100
Kanülen, 100 Sterican®		
23G	Braun, Aschaffenburg	4657667
26G		4665457
Kompressen Telacomp®	Hartmann, Heidenheim	401941
Binocular SMZ-168 Series	MOTIC, Wetzlar	
Nahtmaterial Seraflex®	Serag Wiessner, Naila	IC 108000
OP-Unterlage Molinea®	Hartmann, Heidenheim	161220
OP-Licht: CL1500 ECO	Zeiss, Oberkochen	

Wärmeplatte als OP-Tisch Typ OTS 40.3040	MEDITE, Burgdorf	
Perfusor, 11PLUS	Harvard Appartus, Holliston	PY2 70-2209
Rasierklingen (Bügelklingen)	Apollo, Solingen	
Wattestäbchen MaiMed®	MaiMed Medical, Neuenkirchen	204-2451423
Zellsiebe, EASY strainer™, 100µm	Greiner Bio-One, Solingen	542 000

OP Besteck

Chirurgische Pinzetten	Allgaier Instrumente, Frittlingen	08-060-121
Feine gebogene Pinzetten	Allgaier Instrumente, Frittlingen	08-515-007
Chirurgische Scheren	Allgaier Instrumente, Frittlingen	08-320-115
Feinscheren	Allgaier Instrumente, Frittlingen	309-103-110
Gebogene Nadelhalter	KLS martin, Tuttlingen	13-311-12

Tabelle 2.6: Übersicht über die in den Tierversuchen und sich direkt anschließenden Analysen verwendeten Geräte und Materialien.

II.1.3 Endozytoseassays (Western Blot)

Für die Endozytoseassays im Westernblotverfahren aus Zellkultur und Tierversuch wurden die in den folgenden Tabellen aufgelisteten monoklonalen (mAb) und polyklonalen Antikörper verwendet.

Primärantikörper und Streptavidin

Antikörper	Firma	Cat. No.	Verdünnung
Mouse-anti-β-Aktin, mAb	Sigma-Aldrich, Darmstadt	A5316	1:20.000
Rabbit-anti-β-Arrestin-2, mAb	Cell Signalling, Leiden	3857S	1:750
Guinea pig-anti-Nephrin, polyclonal	Progen, Heidelberg	GP-N2	1:250
Streptavidin-HRP, 1µg/µl	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	21126	1:500

Tabelle 2.7: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und Streptavidin.

Die Antikörperkonzentrate wurden nach Herstellerangaben bei 4°C oder -20°C verwahrt. Die Verdünnungen der gewünschten Konzentration erfolgten in TBST-Puffer. Primärantikörper wurden mehrfach verwendet und in der verdünnten Form bei 4°C gelagert. Alle verwendeten

Sekundärantikörper und Streptavidin sind an das Enzym *Horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt, das die Chemilumineszenzreaktion des Luminols katalysiert und so die spektrometrische Messung mittels CDC-Kamera und anschließende densitometrische Auswertungen ermöglicht. [62]

Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Cat. No.	Verdünnung
Donkey-anti-Guinea pig IgG-HRP	Millipore, Burlington	AP193P	1:20.000
Polyclonal-goat-anti-mouse-HRP	Dako, Santa Clara	P0447	1:10.000
Donkey-anti-rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas	SC 2004	1:20.000

Tabelle 2.8: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.

Puffer für Endozytoseassays (Western Blots)

PBS	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 4,29 mM Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 1,47 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
1% Triton X-100 Lysispuffer (Zellkultur Lyse)	20 mM Tris HCl pH 7,5 150 mM KCl 1% Triton X-100 1 mM EDTA 1 mM Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄) 1 Tablette Complete Mini® 0,044 mM PMSF (Zugabe kurz vor Gebrauch)
CHAPS Lysispuffer (Lyse nach Organentnahmen)	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
<hr/>	
2 × Laemmli-Probenpuffer	90 mM Tris-HCl pH 6,8
	3,6% SDS
	18% Glycerin
	0,32% Bromphenolblau
	0,1 M DTT
<hr/>	
SDS Gele	
Trenngelpuffer (pH 8,8)	360 mM Tris Hcl
	1140 mM Tris Base
	0,4% SDS
Sammelgelpuffer (pH 6,9)	484 mM Tris Hcl
	16 mM Tris Base
	0,4% SDS
Polyacrylamidgellösung	
<i>Für 2 Trenngele 10%</i>	3 ml Rotiphorese®
	1,5 ml Aqua dest.
	4,5 ml Trenngelpuffer
	90 µl 10% APS
	15 µl TEMED
<i>Für 2 Sammelgele</i>	0,535 ml Rotiphorese®
	1,135 ml VE-Wasser
	1,665 ml Sammelgelpuffer
	40 µl 10% APS
	5µl TEMED
Laufpuffer für SDS-PAGE Gele	190 mM Glycin
	24 mM Tris Base
	3,5 mM SDS
<hr/>	
<i>Tank Blotting</i> Transferpuffer	31 mM Tris Base

	240 mM Glycin
	20% Methanol
TBST-Puffer	12,9 mM Tris pH 7,5 129 mM NaCl 0,13 % Tween 20
BSA-Blocklösung 5%	2,5 g BSA in 50 ml TBST-Puffer
Chemolumineszenz-Nachweis	
<i>ECL-Lösung A</i>	100 mM Tris pH 8,5 0,4 mM p-Coumarinsäure 2,5 mM Luminol 1,4 % DMSO
<i>ECL-Lösung B</i>	100 mM Tris pH 8,5 5,87 mM H ₂ O ₂

Tabelle 2.9: Übersicht über verwendete Puffer für Endozytoseassays (Westernblot).
Für die Herstellung der Lösungen wurde demineralisiertes Wasser verwendet (Firma: Otto Fischar)

Geräte für Western Blots

Bezeichnung	Hersteller
Gelelektrophoresekammer: Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Hercules
Netzteil: PowerPac™ Universal	Bio-Rad, Hercules
Imager: FluorChem® FC2	Alpha Innotech, Kassendorf

Tabelle 2.10: Übersicht über die bei Western Blots verwendeten Geräte.

Materialien für Western Blots

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Nitrocellulose Membran	Whatman, Maidstone	10401196
Blotting-Papier	Whatman, Maidstone	10426892
Proteinmarker, 7-175 kD	New England Biolabs, Frankfurt a.M.	P7708

Tabelle 2.11: Übersicht über die verwendeten Materialien für Westernblots mit Bezugsquellen.

Der Proteingehalt wurde nach der Lyse mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Cat. No. 23225) bestimmt und anschließend der Gehalt in allen Proben angeglichen.

II.1.4 Genexpressionsanalysen

qPCR Primer

Die folgende Tabelle zeigt die Primer, die für die quantitativen *Real-Time-PCR* (*qPCR*) zur Analyse der *beta-arrestin-1* Expression in den untersuchten Mausnierenrinden verwendet wurden. Diese Primer wurden freundlicherweise von MitarbeiterInnen unserer Arbeitsgruppe mithilfe des Programms *Primer 3* designt.

Die entsprechend synthetisierten Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon erworben. Das Lyophilisat wurde mit Nuklease freiem Wasser rekonstituiert. Die Konzentration der Lösung betrug 100 pmol/μl. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4°C oder längerfristig bei -20°C. Die optimale Annealingtemperatur wurde für jedes Primerpaar anhand der Schmelztemperatur (+/- 5 °C) mittels Gradienten-PCR und anschließender Visualisierung im Agarosegel festgelegt. Die Temperatur für die Fluoreszenzmessung (*Data collect*) wurde mittels einer Schmelzkurve ermittelt. Dabei wurde eine Temperatur ausgewählt, bei der die Primerdimere komplett geschmolzen sind und das Produkt in ausreichender Menge noch vorhanden ist. Die festgelegte Fluoreszenzaufnahmetemperatur ist als *Data collect* Temperatur angegeben.

Primer für konventionelle und qPCRs

Oligoname	Sequenz 5' → 3'	bp PCR-Produkt	<i>Data collect</i> Temp
<i>GAPDH</i>	<i>for</i> GAC AGT CGC CAA GGG AAC T <i>rev</i> GAA AAG GCA GTC GAA GGT CTC	132	81-83,5°C
<i>beta-Arrestin-1</i>	<i>for</i> ATG GGC GAC AAA GGG AC <i>rev</i> GTC CAC GAG GTC AAT GTG GT	105	82°C

Tabelle 2.12: Übersicht über die für RT-Analyse verwendeten Primer mit Sequenz in Richtung 5'→3' Ende, Anzahl der Basenpaare(bp) des PCR Produkts und ermittelter Temperatur der Fluoreszenzmessung (*data collect* Temp). Alle Primerpaare beziehen sich auf die Spezies Maus.

Als endogenes Referenzgen diente das *18S* rRNA Gen. Dafür wurde der QuantiTect Primer Assay für murine *18S* rRNA, Cat. No. QT00324940 von Qiagen, Hilden, verwendet.

Genotypisierungsprimer

Die Genotypisierung der Mauslinien erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiterinnen unseres Labors. Sie verwendeten dafür die in der Tabelle aufgelisteten Primer:

Genotypisierungsprimer

Oligoname	Sequenz 5' → 3'	bp PCR-Produkt
<i>beta-Arrestin-2</i> WT	<i>for</i> TCT TCA AGA AGT CGA GCC CT <i>rev</i> ACA GGG TCC ACT TTG TCC A	678
<i>beta-Arrestin-2</i> KO	<i>for</i> GCT AAA GCG CAT GCT CCA GA <i>(bindet an die Neomycinkassette)</i>	ca. 287

Tabelle 2.13: Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Primer mit Name, Angabe der Sequenz in Richtung 5'→3' Ende , Anzahl der Basenpaare (bp) des PCR-Produkts. Zur Genotypisierung wurde ein Mastermix aller drei Primer erstellt. Bei der Genotypisierung der Wildtyptiere (WT) binden beide WT Primer, bei der Genotypisierung der Knockouttiere (KO) binden der *forward (for)* Primer (an der Neomycinkassette) und der *reverse (rev)* der WT Primer.

Puffer für Genexpressionsanalysen

TAE-Elektrophoresepuffer	40 mM Tris Base 20 mM Eisessig 2 mM Na ₂ EDTA · 2H ₂ O
TAE 5 × Orange G-Ladepuffer	0,25% Orange G 15% Ficoll 400 15% Glycerin In TAE Puffer
Agarose-Gel, 1,5%	1,5 g Agarose, aufgekocht + 4 Tropfen Ethidiumbromid / 100 ml TAE-Puffer, Lagerung bei 60°C

Tabelle 2.14: Übersicht über die verwendeten Puffer für Genexpressions Analysen.

Geräte für Genexpressionsanalysen

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer Agagel	Biometra, Göttingen
PCR Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Real Time PCR System 7300	Applied Biosystems, Foster City
Spectrophotometer NanoDrop 2000c	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tabelle 2.15: Übersicht über die bei Genexpressionsanalysen verwendeten Geräte.

Materialien für Genexpressionsanalysen

Bezeichnung	Hersteller	Cat. No.
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a.M.	N3231
Gießapparatur für Agarosegele	Bio-Rad, München	
96-Well PCR Platten	Starlab, Hamburg	I1402-9700
Klebefolie für 96-Well PCR Platten	BIOplastics, Landgraaf	157300

Tabelle 2.16: Übersicht über die bei der Genexpressionsanalysen verwendeten Materialien.

Reagenzien und Kits für Genexpressionsanalysen

Bezeichnung	Hersteller	Cat. No.
HotStarTaq® DNA Polymerase	Qiagen, Hilden	203205
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City	4367659
QuantiTect® Reverse Transcription	Qiagen, Hilden	205313
RNA later™	Qiagen, Hilden	76104
Rneasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden	74134

Tabelle 2.17: Übersicht über die verwendete Kits im Rahmen der Genexpressionsanalysen.

II.1.5 Chemikalien

Chemikalien

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe	2267.4
APS	Biomol, Hamburg	50404
BSA (<i>Albumin bovine serum protease free</i>)	VWR International, Darmstadt	422361V
Bromphenolblau	Sigma, Darmstadt	B-5525
Calciumchlorid	Sigma, Darmstadt	C-3306
CHAPS hydrate	Sigma, Darmstadt	C3023-25G
Citronensäure	Sigma, Darmstadt	251275
Collagenase A	Roche Applied Science, Basel	10103578001

(Clostridium hystolyticum)

Complete Mini® Tabletten	Roche, Basel	11836153001
Coomassie Brilliant Blue G 250	MP Biomedicals Inc., Eschwege	190343
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Merck, Darmstadt	6574
dNTP-Mix		
5 mM dATP		
5 mM dCTP		
5 mM dGTP		
5 mM dTTP		
DTT	Biomol, Hamburg	04010
EDTA	Sigma, Darmstadt	E5134
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe	6755.2
Ethanol	Merck, Darmstadt	1.11727
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Carl Roth, Karlsruhe	HP47.1
EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific, Darmstadt	21335
Ficoll 400	Pfizer, New York	17-0400-01
D(+)-Glucose-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt	A1349,1000
Glycerin	Sigma, Darmstadt	G5516
Glycerol	Sigma, Darmstadt	G5516-1L
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	0079.4
Isopropanol 100%	Apotheke Uniklinik Düsseldorf	
Kaliumchlorid	Sigma, Darmstadt	12636
Kaliumdihydrogenphosphat	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer	0240
Luminol	Sigma-Aldrich, Darmstadt	09253
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt	1.05833.1000
Methanol	VWR, Langenfeld	20847.307
Na ₂ HPO ₄	SigmaAldrich, Darmstadt	221368
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt	A2942
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Darmstadt	S 4641
Natriumflourid	Sigma-Aldrich, Darmstadt	S 4146

Natriumorthovanadat	Sigma, Darmstadt	450243
Orange G	Sigma-Aldrich, Darmstadt	75380
p-Coumarinsäure	Sigma, Darmstadt	C9008
PMSF	Sigma, Darmstadt	P-7626
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Solingen	17-0963-03
Rnase Away®	Thermo Scientific, Darmstadt	7005-11
Rotiphorese® (Acrylamid) Gel 30%	Carl Roth, Karlsruhe	3029.2
Salzsäure	Merck, Darmstadt	1.09057
SDS	Biomol, Hamburg	04051.1
Nuklease freies H ₂ O	Qiagen, Hilden	129144
TEMED 99%	Carl Roth, Karlsruhe	2367
Tetranatriumdiphosphat Decahydrat	Sigma, Darmstadt	221368
TRIS Base	Carl Roth, Karlsruhe	4855.2
TRIS HCl	Sigma, Darmstadt	T5941
Triton® X-100	Sigma, Darmstadt	T9284
Tween® 20%	Merck, Darmstadt	8.17072.1000
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe	8070.2
Xylol	VWR, Langenfeld	28975.325
β-Mercaptoethanol	Sigma, Darmstadt	M6250

Tabelle 2.18: Alphabetische Auflistung verwendeter Chemikalien. Alle Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe *pro Analysis* (p.A.) verwendet.

II.1.6 Allgemeine Geräte und Materialien

Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank: Function Line	Heraeus, Hanau
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Plattenreader DTX Multimode Detector	Beckmann Coulter, Krefeld
Shaker HS 260 control	IKA®, Staufen

Shaker Mini See-Saw Rocker SSM4	Stuart, Staffordshire
Shaker Rocking Platform	VWR, Langenfeld
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermostat DryBlockHeating BioTDB-100	Biosan, Gelsenkirchen
TissueRuptor	Qiagen, Hilden
Mauswaage HL-400	A&D Company, Toshima-Ku
Feinwaage R 160p	Sartorius AG, Göttingen
Laborwaage	Bizerba, Balingen
Laborwaage	Kern & Sohn, Balingen

Pipetten

Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Multipette® stream	Eppendorf, Hamburg
Research plus (0,1-2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reference (2-20; 50-200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reference 2 (0,1-2,5; 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen

Centrifuge 5417R (Rotor F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg
Pico 21 Centrifuge (Rotor 75003424)	Heraeus, Hanau

Tabelle 2.19: Übersicht über verwendete allgemeine Laborgeräte.

Weitere Materialien

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Combitips advanced® 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030089.72
SafeSeal Tubes (0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg	72.704.200, 72.706.200,72.695.500
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030121.03
Tubes (15; 50 ml), PP, conical bottom, sterile	Greiner Bio-One, Solingen	T1943, T2068
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Dualfilter 10 µl M	Eppendorf, Hamburg	0030077.52
Pipettenspitzen®	Sarstedt, Nürnberg	70.1130.600, 70.1116.100,

Tabelle 2.20: Übersicht über sonstige verwendete Materialien.**II.1.7 Software**

Die im Folgenden aufgeführten Programme wurden für die Auswertungen und Detektionen verwendet:

Verwendete Software

Bezeichnung	Anwendung
FluorChem FC2 Version 6.0.2, Biozym Scientific GmbH	<i>Imaging-System</i> mit CDC-Kamera
AlphaEase FC Version 6.0.0	Densitometrische Auswertung
7300 System SDS Software Version 1.4	Bedienung des <i>Real Time PCR</i> Gerätes
NanoDrop 2000/2000c Version 1.4.2	Bedienung des Spectrophotometers
Microsoft Word for Mac, 2010	Textverarbeitung
Microsoft Excel for Mac, 2010	Statistische Auswertung
EndNote X8	Verwaltung von Literaturangaben
Graph Pad, Prism 6	Diagramme und statistische Auswertung
GIMP 2.10	Nachträgliche Bildbearbeitung der Diagramme zur Korrektur formaler Fehler

Tabelle 2.21: Übersicht über die verwendete Softwareprogramme mit Anwendungsbereich.

II.2 Methoden

II.2.1 Zellkultur

II.2.1.1 Kultivierung von HEK-293T Zellen

Die Zellkulturversuche wurden an HEK-293T Zellen durchgeführt. HEK-Zellen (*engl. human embryonic kidney cells*) sind eine humane Zelllinie, die aus embryonalen Nierenzellen gewonnen wurde. [63] HEK-Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturschalen mit 10cm Durchmesser in MEM-Medium (enthält 4,5 g Glucose) plus 10% fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) kultiviert. Alle verwendeten Lösungen wurden zum Erhalt der Umgebungsbedingungen vor Verwendung auf 37°C erwärmt. Sämtliche Versuchsschritte fanden unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe zwei unter sterilen Arbeitsbedingungen statt.

Alle 2-3 Tage erfolgte das Passagieren der Zellen, dafür wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS vorsichtig gespült und mit 1ml Trypsin für circa 3 min im Brutschrank behandelt, was die Zellen voneinander und vom Schalenboden ablöst. Anschließend wurden die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von Medium beendet und die Zellen durch auf- und ab Pipettieren vereinzelt. Die entstandene Zellsuspension wurde entsprechend einer Passagierung von 1:8-1:10, je nach vorheriger Konfluenz, auf neue Schalen verteilt.

II.2.1.2 siRNA-Transfektion

HEK-293T Zellen wurden mit siRNA transfiziert, um einen *Knockdown* des zu untersuchenden Proteins β -Arrestin-2 zu erzielen. siRNAs (*small interfering ribonucleic acids*) sind doppelsträngige RNA Moleküle mit einer Größe von 20-24bp. Der hier genutzte Effekt der siRNA ist die RNA-Interferenz, die durch den *RNA-induced-silencing-complex* (RISC) vermittelt wird. Einer der Doppelstränge bindet an den katalytischen Teil des RISC, bestehend aus Endonucleasen, genannt *Argonaute Proteine*. Dieser induziert die Verbindung des siRNA Strangs mit der komplementären mRNA. Die mRNA wird so abgebaut noch bevor es zur Translation kommen kann (*transcriptional silencing*). Die Menge des ursprünglichen Genprodukts wird so deutlich verringert (*Knockdown*), was Analysen zur Bedeutung des zu untersuchenden Proteins erlaubt. [64]

Für die Transfektion wurde das Prinzip der Lipid-basierten-Transfektion (Lipofektion) [65] genutzt. Diese Methode nutzt die Eigenschaft der lipophilen Zellmembran, Liposomen durch Endozytose durch die Zellmembran passieren zu lassen. Die in dem Liposom eingeschlossenen Inhalte (hier: Nephin-Plasmid und siRNA) werden dabei im Zellinneren freigesetzt. Die Lipofektion erfolgte mithilfe des *DharmaFECT Duo Transfection Reagent*, das eine Transfektion von Plasmiden und siRNA zugleich ermöglicht. Für den entsprechenden Knockdown des Genprodukts β -Arrestin-2 wurden die HEK-Zellen mit siRNA transfiziert, die an die mRNA des *beta-Arrestin-2* Gens (ARRB2)

II.2.1.3 Zellernte und -lyse

Die folgende Tabelle gibt die für die Zellernte verwendeten Puffer und Lösungen an.

Puffer und Lösungen für die Zellernte und Nephrin-IP

PBSCM	1x PBS (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.11) + 0,1mM CaCl ₂ + 1mM MgCl ₂
PBSCM + Biotin	0,5mg Biotin/ml PBSCM
PBSCM + Glycin	PBSCM + 100mM Glycin

Tabelle 2.22: Übersicht über die Puffer und Lösungen, für die für die Zellernte verwendet wurden. Es ist stets die verwendete Endkonzentration angegeben.

Die wie in II.2.1.2 beschrieben behandelten HEK-Zellen wurden 72h nach Transfektion wie folgt geerntet: (Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt) Die Zellen, wurden mit 10ml (4°C) PBSCM vorsichtig von der Schale abgelöst und in 15ml Falcons überführt, danach bei 239 x g 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 10ml PBSCM vorsichtig gewaschen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Das Zellpellet wurde danach in 5ml der Biotinlösung resuspendiert und inkubiert auf einem Shaker bei 4°C für 30 min. Biotin bindet so an alle Oberflächenmoleküle der Zellen, gelangt aber nicht ins Zellinnere. Wie in Biotinassays der Vorversuche [58] wird auch in diesen Versuchen dabei die Biotinylierung des Oberflächennephrens genutzt, um diese mit der nicht biotinylierten intrazellulären Nephrinmenge vergleichen zu können. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in 5ml der Glycin-Lösung für 20min bei 4°C auf dem Shaker resuspendiert. Dieser Waschschrift mit anschließender Zentrifugation wurde zweimal wiederholt.

Die Zellen in den Pellets wurden in je 300µl des 1% Triton X-100 Lysispuffer aufgenommen und lysierten 30min auf Eis. Anschließend wurden nicht solubilisierte Proteine bei 20817 x g, 4°C, 30 min abzentrifugiert. Die Proteinmenge im Überstand wurde mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* bestimmt (Details siehe II.2.1.4) und die Probenkonzentration der drei Ansätze angeglichen. Erst danach wurden 30µl des Lysats abgenommen, mit 2x Lämmli Puffer bei 95°C für 5min aufgeköcht und bei 1500rpm 5min zentrifugiert (von hier an Lysatproben genannt).

II.2.1.4 Proteinbestimmung und -anpassung

Um den Gehalt spezifischer Proteine in den gewonnen Lysaten unterschiedlicher Ansätze vergleichen zu können, müssen diese auf einen einheitlichen Gesamtproteingehalt angeglichen werden. Dafür wurde der Proteingehalt der Versuchsansätze mithilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay*

Kit bestimmt. Aus dem enthaltenen BSA Standard wurde eine Standardreihe der BSA-Konzentration erstellt (2000–1500–1000–750–500–250–125–25µg/ml). Die Arbeitsreagenzien wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Gewebeproben wurden 1:5 verdünnt, Zellkulturproben wurden 1:2 verdünnt. Auf eine 96-Well Platte wurden je 10 µl der Standardreihe und der Proben pipettiert und mit einer Multipipette 200 µl des Arbeitsreagenz pro Well dazugegeben. Nach 30 Sekunden auf dem Shaker inkubierten die Platten für 30 Minuten bei 37 °C. In der Zeit wurde in der Software des *Plattenreaders* die Plattenbelegung programmiert. Anschließend erfolgte die Photometrie bei 562 nm zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration.

Im Anschluss wurden die Konzentrationen aller Ansätze eines Versuchs vor Weiterverarbeitung auf die geringste gemessene Proteinkonzentration durch Zugabe des in dem Versuch verwendeten Puffers angeglichen.

II.2.1.5 Nephrin-IP aus HEK-Zelllysaten

Der Rest der jeweiligen Proben wurde der Nephrin-Immunpräzipitation (IP) zugeführt. Dabei inkubierten die mit 1µl anti-Nephrin-Antikörpers versetzten Lysate für 1h bei 4°C auf einem Shaker. Es bindet so der anti-Nephrin-Antikörper an alle im Lysat vorhandenen Nephrinmoleküle. Anschließend wird das Fc-Fragment des Antikörpers durch Protein-A Sepharose (1h, 4°C Shaker) gebunden. Die Protein A Sepharose wurde nach Herstellerangaben in 20% Ethanol gelöst und verwahrt. Diese Bindung ermöglicht durch Zunahme des Molekulargewichts das Abzentrifugieren (956 x g, 4°C, 3min) der so präzipitierten Nephrinmoleküle. Es erfolgten 3 Waschstschritte im Lysepuffer mit Abzentrifugation. Der letzte Zentrifugationsschritt bei 17949 x g, 4°C, 1 Minute. Die sogenannten IP-Proben wurden ebenfalls mit 2x Lämmli Puffer aufgekocht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C verwahrt. Im Anschluss wurden die Proben in Western Blots für das Endozytoseassay weiter analysiert.

II.2.2 Tierversuche

II.2.2.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse mit Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens auf C57BL/6 und FVB Hintergrund im Vergleich zur entsprechenden Wildtypgruppe untersucht. Zur besseren Übersichtlichkeit des Versuchsablaufs ist dieser in Abbildung II.2 skizziert.

Schema Ablauf Tierversuche

Versuchsablauf 21 Tage STZ-induzierte Hyperglykämie

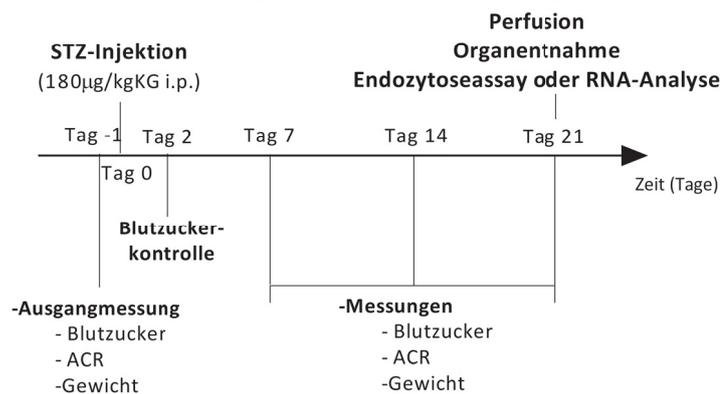


Abb. II.2 Schematische Darstellung des Ablaufs der 21 tägigen STZ-induzierten Hyperglykämie im Mausexperiment.

Die Grafik zeigt die schematische Darstellung des verwendeten Protokolls des 21 Tage Hyperglykämie Modells. Vor der Streptozotocininjektion (STZ) an Tag 0 wurden die Ausgangswerte für Blutzucker, Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) und Gewicht erhoben, welche an den Tagen 7, 14 und 21 erneut gemessen wurden. An Tag 2 wurde die einsetzende Hyperglykämie kontrolliert. An Tag 21 erfolgte die Organentnahme nach Perfusion der Nieren für Endozytoseassay oder RNA-Isolierung.

II.2.2.2 Versuchstierhaltung

Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Institutskriterien in transparenten Käfigen aus Polycarbonat in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich Heine Universität Düsseldorf. Nach §2 TschG und den Leitlinien des europäischen Übereinkommens zum Schutz von Wirbeltieren in Tierversuchen stehen dabei jedem Tier je nach Gewicht 70-80 cm² zu. Für unsere Experimente wurden jeweils maximal 4 C57BL/6 Mäuse in Käfigen vom Typ 2 lang (33cm x 16 cm x 14cm – Länge x Höhe x Breite) gehalten. Die Tiere auf FVB Hintergrund wurden aufgrund des hohen Aggressionspotentials gegenüber Artgenossen für die Versuchszeit in getrennter Käfighaltung verwahrt. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von 20-24 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%, einer Lautstärke von weniger als 60dB und einem Lichtrythmus von 12h gehalten. Ihnen stand Wasser aus Trinkflaschen (entkeimt durch Ozon und angesäuert mit HCl auf einen pH von 2,8-3, Wechsel 1-2 mal pro Woche) und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Zucht und Pflege der Tiere wurde von den TierpflegerInnen des Instituts übernommen. Die Aufzucht der Tiere fand unter SPF-Hygienebedingungen (spezifisch pathogenfrei) statt. Im Alter von 3-4 Wochen wurden die Mäuse abgesetzt, nach Geschlecht getrennt und nach DNA-Extraktion aus der Schwanzspitze genotypisiert. Männliche Tiere im Alter von 8-18 Wochen wurden für den chronischen Versuch verwandt und für die 21 Tage Versuchsdauer in der konventionellen (offenen) Hygienehaltung untergebracht, wo sie vor Versuchsbeginn schonend an die vorübergehende Haltung in Stoffwechsellkäfigen gewöhnt wurden.

In den Hauptversuchen wurde der Einfluss des *beta-Arrestin-2* Knockouts auf die zu untersuchenden Parameter im Verlauf des 21-Tage-Hyperglykämiemodell untersucht. Vorab wurden bei unbehandelten Tieren die gleichen Parameter erhoben, um mögliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockouttieren erkennen zu können, die nicht auf die später induzierte Hyperglykämie zurückzuführen sind.

II.2.2.3 Chemisch induzierter Diabetes mellitus: Injektion von Streptozotocin (STZ)

Als Krankheitsmodell eines Diabetes mellitus Typ 1 wurde chemisch durch Streptozotocin (STZ)-Injektion eine persistierende Hyperglykämie induziert [66]. Dafür wurde den Mäusen an Tag 0 des Versuches, nach Erhebung der Ausgangswerte, für 4 Stunden das Futter entzogen und danach 180 µg Streptozotocin (gelöst in 100 mM Natrium-Citrat-Puffer, pH 4,5)/g Körpergewicht *i.p.* injiziert (*Single-High-Dose-Model*).

Obwohl die STZ-Injektionen ein anerkanntes, häufig verwendetes Modell zur Induktion einer Hyperglykämie darstellen, existiert für die Anwendung von STZ kein Standardprotokoll. [67]Anhand der aktuellen Studienlänge haben wir uns für das *Single-high-dose-model* entschieden, als Modell für eine ausgeprägte Hyperglykämie ähnlich dem Diabetes mellitus Typ 1. [67]Aufgrund seiner geringen Halbwertszeit und der Stabilisierung des Moleküls bei niedrigem pH wurde das STZ erst unmittelbar vor der Injektion in Natrium-Citrat Puffer gelöst. [68]Da männliche Mäuse und Ratten als empfänglicher für die STZ- induzierte Hyperglykämie gelten, wurden in dieser Arbeit ausschließlich männliche Tiere für die Versuche verwendet. [69] Zudem erleichtert der kräftigere Körperbau männlicher Mäuse das Perfusionsvorhaben.

Streptozotocin wurde ursprünglich 1956 als antibiotisch wirksame Substanz aus dem Bakterium *Streptomyces achromogenes* isoliert und wird aktuell als Chemotherapeutikum bei metastasiertem Inzellularcarzinom verwendet. [67, 70] Es wird aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu Glukose über den Glut-2 Transporter in die β -Zellen des Pankreas aufgenommen [69, 71] und steht an diesem Rezeptor in Konkurrenz mit Glukose. Um den Einfluss dieses Agonismus möglichst gering zu halten, ließen wir die Tiere vor der Injektion 4 h hungern. In den β -Zellen bewirkt es eine DNA-Alkylierung und ADP-Ribosylierung, deren Folge der β -Zelluntergang ist. [72, 73] Der dadurch bedingte Verlust der insulinproduzierenden Zellen führt zur Hyperglykämie. Da es zu einem vollständigen Verlust der β -Zellen kommt, dient das beschriebene Verfahren als Modell für einen Diabetes mellitus Typ I (absoluter Insulinmangel).

II.2.2.4 Blutzuckermessung

Zur Kontrolle des induzierten Diabetes mellitus Typ 1 wurde bei den Mäusen nach STZ-Injektion an den Tagen 0,2,7,14 und 21 der Blutzucker gemessen. Nach Anritzen mit einer 22G Kanüle wurde ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das verwendete Messgerät Contour® (Bayer) kann Werte über 600 mg/dl nicht weiter differenzieren, weshalb diese im Folgenden als 600 mg/dl interpretiert wurden. Der Blutzucker wurde nicht nüchtern gemessen.

Wie in Hyperglykämie Studien bei Mäusen [67, 74] üblich, diagnostizierten wir einen Diabetes mellitus Typ 1 bei den Tieren mit einem Blutzucker über 250mg/dl (Hyperglykämieschwelle) und es wurden nur Tiere mit einem konstanten Blutzucker zu den letzten zwei Zeitpunkten über 400 mg/dl für die Organentnahmen vorgesehen.

II.2.2.5 Stoffwechselkäfige und Sammelurin

Die Mäuse wurden jeweils an den Tagen 0, 7, 14 und 21 für circa 12h (über Nacht) in Stoffwechselkäfige gesetzt. Stoffwechselkäfige ermöglichen die Sammlung von Kot und Urin, sowie die Ein- und Ausfuhrbilanzierung der Tiere. Für dieses Versuchsvorhaben wurde der Urin der Tiere gesammelt, zentrifugiert, aliquotiert, bei -20°C verwahrt und danach der weiteren Analyse zugeführt.

II.2.2.6 Bestimmung der Albuminausscheidung im Urin

Die Bestimmung der Albuminausscheidung wurde zum Ausgleich tageszeitlicher Schwankungen der Urinproduktion auf Kreatinin normiert als Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR). In dieser Arbeit wurde die Albumin-Kreatinin-Ratio in über Nacht (ca. 12h) gewonnenen Urinproben zur Analyse der Albuminurie bestimmt. Dazu wurden wie im Folgenden beschrieben Albuminwerte ($\mu\text{g/ml}$) und Kreatininwerte (mg/dl) bestimmt und als Quotient dargestellt. Daraus ergibt sich eine Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) in $\text{mg Albumin/ g Kreatinin}$.

II.2.2.6.1 Albuminbestimmung im Mausurin

Die Bestimmung von Albumin aus dem gewonnenen Sammelurin erfolgte extern durch die Firma CellTrend GmbH in Luckenwalde mittels ELISA. Die kleinste bestimmbare Albuminkonzentration beträgt $0,25 \mu\text{g/ml}$, gab die Analyse Werte $<0,25 \mu\text{g/ml}$ an werden diese als $0,25 \mu\text{g/ml}$ betrachtet.

II.2.2.6.2 Kreatininbestimmung im Mausurin

Die Bestimmung von Kreatinin aus dem gewonnenen Sammelurin erfolgte extern im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf durch Frau Dr. C. Barthuber. Die geringste messbare Kreatininkonzentration beträgt 1,1 mg/dl. Auch Werte, die als <1,1 mg/dl angegeben wurden werden in den Analysen als 1,1 mg/dl bewertet.

II.2.2.7 Perfusion der Nieren und Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte 21 Tage nach Streptozotocininjektion nach bewährtem Protokoll unseres Labors [75] in Anlehnung an ein Protokoll von Liu et al [76], siehe Abbildung II.3. Als Narkose wurde eine Dosis von 100µl/g KG einer Lösung von 10% Ketamin und 10% Xylazin in NaCl 0,9% *i.p.* injiziert. Die Wirkung wurde durch Schmerzstimuli im Bereich der Hinterläufe geprüft. Die Operation zur Organentnahme erfolgte auf einer Wärmeplatte unter mikroskopischer Kontrolle. Im Rahmen der OP wurden saugfähige Unterlagen, Tupfer, Fadenmaterial, Schläuche und 70%iges Isopropanol verwendet. Als Operationsbesteck dienten: 1 große Schere (vorne stumpf), 1 Feinschere, 2 große anatomische Pinzetten, 2 kleine anatomische Pinzette (vorne abgerundet) und 3 Nadelhalter. In den Perfusor wurden 10ml Spritzen eingelegt, die mit einer 23G Kanüle mit einem Schlauch mit Innendurchmesser (ID) 0,58mm und Außendurchmesser (OD) 0,96mm verbunden wurde. In diesen wurde ein kleinerer Schlauch (OD 0,61cm, ID 0,28mm) eingeführt mit dem letztendlich die Kanülierung erfolgt. Die Schlauchlänge betrug zusammen etwa 15-20cm.

Nach Anfeuchten des Fells mit Isopropanol (um Verunreinigungen des OP Gebiets mit Fell zu vermeiden) erfolgte eine mediane Laparatomie mit der chirurgischen Schere. Nach Abtrennung der Haut von der darunter liegenden Muskelfaszie mit großen anatomischen Pinzetten erfolgte ein medianer Schnitt durch die Bauchmuskulatur. Diese wurde anschließend transversal eingeschnitten und die oberen beiden Enden mit Hilfe der Nadelhalter nach oben abgelegt. Anschließend begann die Freilegung des Retroperitoneums durch Auslagerung des Darmkonvoluts nach rechts lateral. Nach Durchtrennung des *Ligamentum hepatophrenicum* unter mikroskopischer Kontrolle mit der Feinschere konnte auch die Leber nach lateral rechts ausgelagert werden. Die weiteren OP-Schritte erfolgten unter dem Mikroskop. Eine Ligatur mit Nahtfaden wurde mithilfe der gebogenen Pinzetten zunächst locker um die großen retroperitonealen Gefäße (*Aorta* und *Vena cava superior*) auf Höhe des oberen Nierenpols angebracht (1. Ligatur). Danach erfolgte die lockere Ligation der Mesenterialgefäße (2. Ligatur). Die Aorta wurde von der Bifurkation bis zum Abgang der *A.renalis* frei präpariert und eine Ligatur grob um die retroperitonealen Gefäße durch den *Musculus iliopsoas* gelegt (3. Ligatur). Vor den folgenden Schritten der Perfusion wurden die weiterhin narkotisierten Tiere durch *Dekapitation* erlöst. Danach wurde die Aorta durch Zuziehen der oberen Ligatur und Anbringen eines Nadelhalters an der *Bifurcatio aortae* abgeklemmt. Durch einen Schnitt mit der Feinschere in die Aorta wurde ein Loch geschaffen, in welches das untere angespitze Ende des

Schlauchs eingeführt wurde. Nach dieser Kanülierung der Aorta wurde die Perfusion mit einer Durchflussrate von 2ml/min gestartet. Bei erfolgreicher Kanülierung entfärbten sich die Nieren durch Ausschwemmen des Blutes nach Start der Perfusion sofort. Die Perfusionslösungen unterschieden sich je nach weiterem Verwendungszweck der Organe. Anschließend wurde der ungewollte Abfluss in das *Mesenterium* durch Abbinden der Mesenterialgefäße (2. Ligatur) verhindert und die Kanüle durch Zuziehen der unteren (3.) Ligatur fixiert. Um einen Harnstau zu vermeiden wurden die *Ureteren* auf Höhe des *Musculus iliopsoas* durchtrennt. Um den venösen Abfluss von Blut und Perfusionsflüssigkeiten aus der Niere zu garantieren wurde in die *V. renalis* mit der Feinschere ein kleines Loch geschnitten.

Schema Nierenperfusion

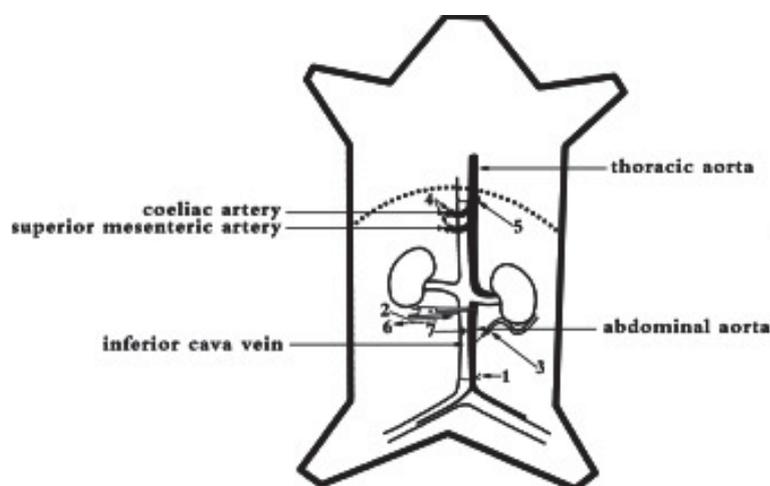


Abb. II.3 Schematische Darstellung der Nierenperfusion (Modifiziert nach Liu et al., 2013).

Die Grafik zeigt die schematische Darstellung des verwendeten Perfusionsprotokolls der Nieren zur Glomeruliisolierung. In Anlehnung an das von Liu et al etablierte Perfusionsprotokoll wurden die Nieren retrograd über die *Aorta abdominalis* perfundiert. Dazu wurde die *Aorta abdominalis* weit distal zusammen mit der *V. cava inferior* ligiert (1), sowie proximal unterhalb des *Diaphragmas* (5). Die Mesenterialgefäße wurden ebenfalls ligiert (4). Nach Einbringen des Perfusions Schlauchs anschließend wurde in die distale Aorta wurden die Ligaturen festgezogen, (3). Der venöse Abfluss aus den Nieren erfolgte über ein Loch in der *V. renalis* (7). [76] Copyright Spandidos Publications.

Nach Abschluss der Perfusion erfolgt die Organentnahme. Dazu wurde die *Capsula renalis* entfernt und Gefäße sowie *Ureter* am Nierenpol durchtrennt. Die Lagerung der Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in dem zur Perfusion verwendetet Puffer (PBS bzw. PBSCM) auf Eis.

II.2.2.7.1 Nierenperfusion für RNA-Analysen

Für die Gewinnung von RNA wurden die Nieren nach oben beschriebener Prozedur mit 5ml sterilem PBS perfundiert. Nach der Entnahme wurden die Organe sofort in kleine Stücke geschnitten. Für RNA-Analysen wurden maximal 30mg schwere Stücke aus dem Nierenkortex verwendet und in RNA-Later[®] konserviert. Die Lagerung der Proben erfolgte für 24h bei 4°C und danach bis zur RNA-Extraktion bei -20°C.

Für die Analysen der Gentranskription wurden die Nieren von unbehandelten Kontrolltieren und Mäusen mit diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens beider untersuchter Stämme verwendet.

II.2.2.7.2 Nierenperfusion für Proteinanalysen

In unserer Arbeitsgruppe wurde von Haase et al. eine Methode entwickelt, die der Quantifizierung oberflächenständiger Proteine der Schlitzmembran im Rahmen proteinurischer Nierenerkrankungen dient [60]. Für Proteinanalysen nach dieser Methode wurden die Nieren nach folgendem Schema perfundiert:

Puffer und Lösungen zur Perfusion für Endozytoseassays

1. 5ml PBSCM	1x PBS (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.9) + 0,1mM CaCl ₂ + 1mM MgCl ₂
2. 5ml PBSCM + Biotin	0,5mg Biotin/ml PBSCM
3. 5ml PBSCM + Glycin	PBSCM + 100mM Glycin
4. 5ml Dynabead Lösung	200µl Dynabeads® Solution/5ml PBSCM

Tabelle 2.23: Übersicht über die Puffer und Lösungen, die für die Nierenperfusion verwendet wurden.

Die Spülung mit PBSCM dient dabei zunächst der blutleeren Waschung der Nieren. Biotin ermöglicht wie in den Zellversuchen durch dessen kovalente Bindung (Biotinylierung), die Markierung der Oberflächenmoleküle (hier besonders betrachtet: des Oberflächenephrens) für das anschließende Biotinylierungsassay. Die Glycinlösung spült unspezifische Biotinbindungen ab. Zur anschließenden Glomeruliisolation [75] wurden die Nieren zuletzt mit einer Dynabeads-Lösung perfundiert. Dynabeads sind ferromagnetische, 1-5 µm große Nanopartikel. Durch ihre Größe embolisieren sie bei der Perfusion das Kapillarknäul. Sie können nicht durch das *Vas efferens* abfließen und verbleiben so im Glomerulum, welches damit als Zielstruktur magnetisch markiert ist und anschließend isoliert werden kann.

Für die Nephren-Endozytoseassays wurden ebenfalls die Nieren von Kontrolltieren und Mäusen mit diabetischer Stoffwechsellaage mit und ohne Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens beider Stämme untersucht.

II.2.2.8 Glomeruliisolation und -aufbereitung

Die wie in II.2.2.7 beschrieben entnommenen Nieren wurden mit einer Rasierklinge zerkleinert bis eine homogene zähflüssige Masse entstand. Diese wurde in 2ml Mikroreaktionsgefäße überführt, mit

je 1 ml Collagenase-A Lösung versetzt und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Collagenase A führt zum Verdau von Membranbestandteilen und so zur Vereinzelung der Gewebsstrukturen. Alle anschließenden Arbeiten fanden auf Eis statt. Die Masse wurde durch 100µm-Zellsiebe gedrückt und diese mit 40-50ml des Perfusionspuffers (PBSCM) gespült. Zellmaterial über 100µm und Bindegewebsstränge können den Filter nicht passieren und wurden verworfen. Die gewonnene Suspension wurde in 50ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen und anschließend 5min bei 239 x g, 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 2ml PBSCM gelöst und in 2ml-Mikroreaktionsgefäße überführt.

Die mit den Dynabeads markierten Glomeruli wurden mittels DynamagTM-2 und mehrfacher Waschung mit PBSCM isoliert. Dazu wurden die Gefäße in die magnetische Einrichtung *DynamagTM-2* eingespannt, die Glomeruli mit den magnetischen Nanopartikeln setzen sich dabei durch Magnetismus an dem Rand zur magnetischen Oberfläche hin ab. Die restlichen Bestandteile verbleiben in Lösung und wurden vorsichtig am Rand abpipettiert. Anschließend wurde erneut PBSCM hinzu gegeben und auf dem Vortexer vermischt. Diese Waschschritte erfolgten abwechselnd, bis die gewünschte Reinheit von mindestens 95% Glomeruli erreicht wurde. Die Reinheitskontrolle erfolgte anhand einzelner etwa 10 µl großen Tropfen der Suspension unter dem Mikroskop. Bei gewünschter Reinheit wurden die Glomeruli für 5min bei 239 x g, 4°C abzentrifugiert und der Überstand entfernt, während das Gefäß auf einem runden Supermagneten steht.

Anschließend wurden die Glomeruli zur Lyse mit 250µl CHAPS-Lysispuffer versetzt, danach die Lösung wird für 30-40s mit dem TissueRuptur homogenisiert. Anschließend erfolgte die eigentliche Lyse für 30min auf Eis. Zur Entfernung der Dynabeads aus dem Lyseprodukt wurden die lysierten Zellen 2 mal 15min, 4°C bei 20817 x g zentrifugiert und dazwischen mit 1ml Lysispuffer gewaschen. Der Überstand wurde jeweils abpipettiert und nach der zweiten Waschung der Proteinbestimmung zugeführt, um die Konzentration der Lysatproben angleichen zu können. Je 30µl des Glomerulilysats wurden mit 2-fach konzentriertem Lämmli versetzt, bei 95°C für 5min aufgeköcht, für 5min bei 329 x g, 4°C zentrifugiert und bei -20°C verwahrt (Lysat-Proben).

II.2.2.9 Nephrin-Immunpräzipitation aus Glomerulilysaten

Die restlichen Lyseprodukte der Glomeruliisolation wurden der Nephrin-IP zugeführt. Zunächst erfolgte eine Inkubation mit je 5µl anti-Nephrin-Antikörper für 12h (über Nacht) bei 4°C auf einem Rotator. Durch Zugabe von 30µl Protein-A Sepharose bindet diese an die Antikörper (Inkubationszeit: 3h). Nach anschließende Zentrifugation (3min, 956 x g, 4°C) wurden nur die Nephrinmoleküle aus dem Lysat gewonnen, der Überstand wurde verworfen. Es folgten drei Zyklen aus Waschen mit 1ml CHAPS-Lysispuffer und Zentrifugation. Der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte bei 17949 x g, 4°C für 1min. Anschließend wurden auch diese Proben wie oben beschrieben

mit Lämmli versetzt, erhitzt und abzentrifugiert (IP-Proben). Die Proben wurden im Anschluss der SDS-Gelelektrophorese zugeführt. Konnte die Elektrophorese nicht zeitnah stattfinden, wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

II.3 Protein-Analyse: Biotinylierungsassay zur Analyse der Nephrin-Endozytose (Endozytoseassay)

Mit der im Folgenden beschriebenen Methode des Biotinylierungsassays zur Analyse der Nephrin-Endozytose wurden sowohl die Lysat- und IP-Proben aus HEK-Zellen als auch die Proben der isolierten Glomeruli der Mausnieren untersucht.

II.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine in den gewonnenen Lysat- und IP-Proben wurden anschließend mittels Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Es wurden 1cm dicke Acrylamidgele bestehend aus 4%igem Sammelgel und 10%igem Trenngel gegossen. Die Lösungen wurden wie in Tabelle 2.9 dargestellt hergestellt und erst kurz vor dem Gießen in den Gießgestellen mit TEMED und APS versetzt, um ein frühzeitiges Polymerisieren zu verhindern. Zuerst wurden darin etwa 4 ml der Trenngellösung eingefüllt und diese zum Begradigen mit 100% Isopropanol beschichtet. Nach Aushärten des Trenngels wurde diese Schicht mit *Aqua dest.* abgetupft und das Gestell mit Sammelgellösung aufgefüllt, in welche Kämme mit 10-15 Taschen eingesetzt wurden.

Nach der vollständigen Auspolymerisierung der Gele wurden diese in die Elektrophoresekammer eingespannt, die Kammer mit Laufpuffer (Tab. 2.9) befüllt und die Kämme aus dem Gel entfernt, wodurch Taschen für das spätere Auftragen der Proben entstehen. Die Taschen wurden vor dem Beladen mit dem Laufpuffer von eventuell verbliebenen Gelresten frei gespült. Anschließend wurde auf jedes Gel zur Kontrolle der Fragmentgrößen 6µl des Proteinmarkers aufgetragen. Pro IP-Probe wurden jeweils 10 µl aufgetragen, pro Lysat-Probe 15 µl.

Zur eigentlichen Auftrennung der Proteine wurde die vorbereitete Elektrophoresekammer an eine Stromquelle angeschlossen. Bei zunächst konstanter Spannung (70V, 30 min), konzentrieren sich die Proteine im Sammelgel, um sich danach bei konstanter Stromstärke (20mA pro Gel, 1,5h) entlang des Stromflusses Richtung Anode aufzutrennen. Kleinere Proteine wandern dabei schneller durch die Poren des Gels, was die Auftrennung nach Molekülgröße ermöglicht. Durch den definierten Proteinmarker können die Moleküle später einer bestimmten Größe zugeordnet werden.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele umgehend dem Westernimmunoblotting zugeführt.

II.3.2 Westernimmunoblotting (Western Blot)

Zur Konservierung und weiteren Analyse wurden die Proteine in den Elektrophoresegelen im Tankblottingverfahren auf Nitrocellulose Membranen fixiert, auf welchen eine anschließende Immunfärbung mit Antikörpern möglich ist. Dazu wurden in einer Halterung Blottingschwämme, Blottingpapier (dickes Filterpapaier), das Gel und eine Membran, gefolgt von erneut Papier und Schwamm (aufgezählt in Richtung Stromfluss) unter Anfeuchtung mit Puffer geschichtet und in die Tankblotkammer eingespannt. Die Kammer wurde zur Temperaturkontrolle mit einem Eisblock versehen und mit kaltem Transferpuffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte das *Blotting* der Proteine vom Gel auf die Membran durch Stromfluss in Richtung Anode bei 200V für 2,5h. Der Transferpuffer wurde für bis zu drei *Blots* wiederverwendet.

Die Membranen wurden anschließend für 1h bei 37°C oder für 12h bei 4°C in 5%iger BSA Lösung auf einem Shaker geblockt. Dadurch werden mögliche freie Bindungsstellen auf der Membran gesättigt, um überschießende Antikörperreaktionen bei der folgenden Färbung zu vermeiden. Vor der Färbung wurde die Membran kurz in TBST-Puffer gelegt, um sie vor der Überführung in die Antikörperlösung von BSA-Resten zu befreien.

Die Membranen wurden für 24 Stunden in einer Lösung des entsprechenden Primärantikörpers (Tab. 2.7) auf einem Shaker bei 4°C inkubiert. Die IP-Proben wurden stets mit den Primärantikörpern *Guinea pig-anti-Nephrin polyclonal Antibody* (kurz: anti-Nephrin-Antikörper) und *Streptavidin-HRP* (kurz: Streptavidin) inkubiert. In diesen Proben befinden sich nur noch die aus dem Lysat mittels Immunpräzipitation extrahierten Nephrinmoleküle. Die Färbung mittels anti-Nephrin-Antikörper markiert dabei die Gesamtheit der Nephrinmoleküle der Probe. Streptavidin bindet hochspezifisch an Biotin und färbt so die in der Zelle ehemals membranständigen und vorher durch Biotinbindung markierten Nephrinmoleküle. Die Lysatproben wurden mit dem gleichen anti-Nephrin-Antikörper und mit *Mouse-anti-β-Aktin, mAb* (kurz: β-Aktin-Antikörper) inkubiert.

Anschließend wurde durch das Waschen (3 mal für je 5 min) der Membranen in TBST-Puffer (Tabelle 2.9) bei Raumtemperatur auf dem *Shaker* die verbliebenen Primärantikörper entfernt. Die Membranen inkubierten danach für 1h bei 4°C auf dem Shaker in den Lösungen der HRP markierten Sekundärantikörper (Tabelle 2.8) mit anschließendem Waschvorgang (3 mal für je 5 min.). Das verwendete Streptavidin ist bereits HRP markiert.

Nach Abschluss der Antikörperinkubation wurde das ECL-Reagenz aus zwei Lösungen hergestellt wie in Tabelle 2.9 beschrieben hergestellt. Die Membranen wurden mit je 1ml des Gemischs beschichtet, dadurch konjugiert das Enzym HRP die Oxidation des Luminols, dabei entstehen in einer Chemilumineszenzreaktion Lichtemissionen, die von der CDC-Kamera des verwendeten *Imagers* aufgezeichnet werden. Die Membranen wurden für 30s, 1 min und 2 min belichtet. Die entstehenden Bilder zeigen die markierten Proteine auf dem Gel und wurden als TIFF gespeichert, dies ermöglicht anschließende densitometrische Auswertungen.

II.3.3 Auswertung des Endozytoseassays

Die densitometrische Auswertung der Westernblots erfolgte mit dem Programm *AlphaViewSA*. In der Programmfunktion *Multiplex Band Analysis* wurden die zu vergleichenden Westernblotbanden markiert, alle zu vergleichenden Banden erhielten dabei eine gleich große Markierung. Innerhalb dieser Markierungen wird die Intensität der Bande nach Abzug der 10 niedrigsten Pixel der markierten Region als Mittelwert aller Pixel dargestellt. Diese wurden in eine Exceldatei importiert, wo die weitere Analyse stattfand. Zur Normierung wurde die Summe der analysierten Banden gebildet und jeder der Einzelwerte durch die Summe geteilt. Dieser normierte Wert ging in die weiteren Analysen ein.

Zur Quantifizierung der Nephrin-Endozytose aus den Biotinylierungsassays wurde der Quotient aus Gesamtnephrin und membranständigem (biotinyliertem) Nephrin, also der Quotient der densitometrischen Intensität der mit Nephrin und der mit Streptavidin markierten Banden, aus den IP-Proben bestimmt. Bei den Lysatproben wurde der Quotient aus Nephrin- zu β -Aktin-Antikörper markierten Proben, als Maß für den Gesamtproteingehalt der Zellen, berechnet (Nephrin/Aktin). In den siRNA Versuchen an HEK293T-Zellen wurde zusätzlich zur Ermittlung des prozentualen β -Arrestin-2 Knockdowns die densitometrische Ratio von β -Arrestin-2 zu β -Aktin ermittelt. Ergebnisse wurden in das Programm *Prism 6* übertragen, das die Daten in Diagrammen darstellte. Dabei wurde als Vergleichseinheit der Quantifizierung des Nephringehalts die Einheit % festgelegt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (Wildtypiere) wurde zur Übersichtlichkeit auf 100% normiert. Die statistische Auswertung erfolgte in dem Programm mittels ungepaartem t-Test mit Welch Korrektur.

II.4 Analyse der *beta-Arrestin-1* Expression

Um den Einfluss des *beta-Arrestin-2* Knockouts in Kombination mit der diabetischen Stoffwechsellage im Hinblick auf Veränderungen der *beta-Arrestin-1* Expression zu untersuchen, wurden Stücke speziell perfundierter Nieren (siehe Kapitel II.2.2.7.1) in *RNAlater* Lösung verwahrt. Daraus wurde später RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und entsprechend des Versuchsvorhabens in quantitativen *Real-Time-PCRs* analysiert. Die Arbeitsschritte sind im Folgenden beschrieben.

II.4.1 RNA Isolation aus Mausnieren

Aus den bei -20°C in *RNAlater* Lösung aufbewahrten Stücken aus Mausnierenrinde (siehe II.2.2.7.1) wurde mittels des *RNeasy® Plus Mini Kits* von Qiagen RNA isoliert. Zusätzlich zu den Materialien aus

dem Kit wurden Ethanol und β -Mercaptoethanol verwendet. Alle Arbeitsschritte fanden unter RNase freien Bedingungen statt.

Die konservierten Nierenstücke wurden aufgetaut und je ein Stück (max. 30mg) pro Ansatz in 5ml Facsröhrchen überführt. Die Reste wurden erneut bei -20°C eingefroren. Die einzelnen Stücke wurden in einen vorgelegten Puffer aus 600 μl RLT-Puffer plus β -Mercaptoethanol (je 10 μl β -Mercaptoethanol pro 1ml RLT-Puffer) gegeben. Die Proben wurden für 30-40 sec mit dem *TissueRuptor* bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert und anschließend 3 min bei 21100 x g zentrifugiert, danach die Überstände auf gDNA-Eliminierungssäulen überführt und 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säulen mit der gebundenen genomischen DNA wurden verworfen und die verbliebene Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen 70%igem-Ethanol vermischt. Das Gemisch wurde in zwei Portionen auf die RNA-Säule aufgetragen und dazwischen 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die RNA-Säule mit 350 μl des RW1-Puffers gewaschen, um nicht benötigte Komponenten, wie Proteine und Kohlenhydrate zu entfernen und erneut 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert und die aufgefangene Flüssigkeit verworfen. Da die Proben einen hohen Anteil genomischer DNA (gDNA) enthalten wurden die Membranen der RNA-Säulen mit DNase1 behandelt, die dort gebundene gDNA eliminiert. Dafür wurden je 10 μl DNase I und 70 μl RDD-Puffer pro Probe auf jede Säulen gegeben und für 15min inkubiert. Danach wurden die Membranen der Säulen mit 350 μl RW-1 Puffer und zweimal mit 500 μl RPE-Puffer gewaschen. Dazwischen wurde für 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert und die flüssigen Überstände verworfen. Anschließend erfolgte die Überführung der Säule in ein neues Auffanggefäß und eine Zentrifugation für 2 min bei 21100 x g zentrifugiert. Zum Abschluss wurden die Säulen auf 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt und die in der Säulenmembran gebundene RNA mit 50 μl RNase-freiem Wasser eluiert und durch einminütige Zentrifugation bei 8000 x g in dem Gefäß aufgefangen. Isolierte RNA wurde sofort auf Eis gelagert. Der Erfolg der Isolation wurde durch spectrophotometrische Messung des RNA Gehalts am NanoDrop® gemessen. So konnte in Folge auch die Konzentration der Proben angeglichen werden. Die isolierte RNA wurde sofort in cDNA umgeschrieben oder bei -20°C verwahrt.

II.4.2 Reverse Transkriptase Reaktion

Um die gewonnene RNA mittels quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (kurz: qPCR) zu quantifizieren muss diese erst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu nutzt man die Reverse Transkriptase Reaktion, um aus RNA einen komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA) zu transkribieren. Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter ständiger Kühlung in Anlehnung an das Protokoll des verwendeten *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* von Qiagen statt.

Um später einen Anhalt für eine eventuelle gDNA-Verunreinigung der RNA-Proben zu haben, wurden zunächst 0,5 μl RNA aus jeder der Proben entnommen. Für die Reverse Transkriptase

Reaktion wurden ca. 300ng RNA in einem Endvolumen von 12 µl (verdünnt mit RNase freiem Wasser) eingesetzt. Die Konzentration der RNA in den einzelnen Proben wurde auf diesen Wert angeglichen.

Die Ansätze wurden mit je 2 µl des im Kit enthaltenen gDNA *Wipeout Buffer* versetzt, kurz an zentrifugiert und für 3,5 min bei 42°C inkubiert. Zur späteren Kontrolle des vollständigen Verdau der gDNA Verunreinigungen wurden 0,5 µl aus jeder der Proben entnommen.

Neben der RNA-abhängigen Synthese des komplementären DNA-Einzelstrangs verfügt das Enzym Reverse Transkriptase auch über eine RNase-Aktivität, wodurch bereits transkribierte RNA-Stränge abgebaut werden. Im Endprodukt der Reaktion liegt also nur noch die cDNA vor. Für die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde ein *Master-Mix* bestehend aus 4µl Quantiscript 5x RT *Buffer* (enthält dNTPs), 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 5µl nuklease freies Wasser und 1 µl RT *Primer Mix* pro Probe hergestellt, davon je 6 µl der mit DNase behandelten RNA zugefügt (Gesamtvolmen: 20 µl) und mit der Pipette vermischt. Die cDNA Synthese fand im Thermocycler statt. Es erfolgte eine Temperatureinstellung von 42°C für 25min für die Reaktion, gefolgt von 3 min bei 95°C zur Hitzeinaktivierung des Enzyms mit anschließender Kühlung der Proben bei 4°C bis zur Entnahme aus dem Cycler. Auch nach diesem Arbeitsschritt wurden erneut 0,5µl aus jeder Probe entnommen, um den Erfolg der cDNA Synthese zu prüfen.

II.4.3 GAPDH-Kontroll-PCR durch konventionelle Polymerasekettenreaktion

Um den Erfolg der einzelnen Arbeitsschritte während der Umschreibung von isolierter RNA aus Mausnieren in cDNA zu kontrollieren wurde eine konventionelle Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) durchgeführt. Dazu wurde das *HotStarTaq® DNA Polymerase Kit* von Qiagen verwendet. Zur Quantifizierung des DNA-Gehalts der Proben wurde der Primer des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Diese wird in allen Zellen konstitutiv exprimiert und eignet sich deshalb als Kontrolle

Es wurde erneut ein *Mastermix* vorgemischt mit 16,78 µl Nuklease freiem H₂O, 2 µl 10x PCR *Buffer* (mit 15 mM MgCl₂), 0,4 µl dNTPs, 0,1 µl GAPDH *Reverse Primer*, 0,1 µl GAPDH *Forward Primer* und 0,12 µl HotStarTaq-DNA-Polymerase pro Ansatz. Zu jeder entnommenen Probe der Zwischenschritte (0,5µl) wurden 19,5 µl der Mischung pipetiert (Endvolumen 20 µl) und kurz an zentrifugiert. Es wurden die drei Arbeitsschritte jeder Probe kontrolliert:

- 1.) RNA Proben, um große Reste genomischer DNA vor dem Verdau auszuschließen
- 2.) Negativkontrolle, um jegliche Reste der genomischen DNA nach dem Verdau auszuschließen
- 3.) Positivkontrollen, um den Erfolg der Reverse-Transkriptase-PCR zu überprüfen

Um Verunreinigungen im Mastermix auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle (*Mastermix* enthält Nuklease freies Wasser statt Proben) mitgeführt.

Die Amplifikationsreaktion fand erneut im Thermocycler statt. Dabei wurde die Polymerase zunächst für 15 min bei 95°C hitzeaktiviert, danach folgten 40 Zyklen der Amplifikation bestehend aus drei Schritten: für 30 sec bei 95°C (Denaturierung der DNA), 30 sec bei 58°C (*Primer-Annealing*) und 30 sec bei 72°C (Elongation des neu synthetisierten DNA-Strangs). Nach den 40 Zyklen erfolgte eine lange abschließende Elongation (72°C, 5min) und der Cycler kühlte bis zur Entnahme der Proben auf 4°C ab.

In der Zwischenzeit wurde ein 1,5% TAE-Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid gegossen (Tab. 2.13). Das nach 2030 min ausgehärtete Gel wurde aus der Gießstation in die Elektrophoresekammer, gefüllt mit TAE-Elektrophoresepuffer (Tab.2.14) überführt. Die fertigen PCR Produkte wurden mit je 5µl 5× Orange G-Ladepuffer (Tab. 2.14) zum visualisieren und beschweren versetzt. Pro Reihe wurde einmal 6µl des 100-bp-Markers aufgetragen, gefolgt von je 9 µl des PCR-Produkts pro Probe. Durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 90V für 35min wanderten die Moleküle in dem entstehenden elektrischen Feld Richtung Anode und die DNA-Moleküle werden so nach Basenpaarlänge aufgetrennt, dabei interkaliert Ethidiumbromid die Doppelstränge und ermöglichten durch so veränderte Fluoreszenzen die Aufzeichnung der DNA-Banden mit der Kamera des Imaging Systems.

Die Eliminierung der genomischen DNA aus den Proben und die Umschreibung in cDNA wurden als erfolgreich gewertet, wenn das Bild nur vereinzelte oder dezente Banden in den Proben vor dem gDNA Verdau, keine Banden nach dem gDNA Verdau und deutliche, gleichmäßige Banden in den cDNA Proben zeigte. Nur in diesem Fall wurden die cDNA Proben für RT-PCR-Analysen weiter verwendet.

II.4.4 Quantitative Analyse der mRNA Expression mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Zur quantitativen Analyse der Expression eines bestimmten Gens in mRNA zu einem bestimmten Zeitpunkt wird das Verfahren der Real-Time Polymerasekettenreaktion (kurz: qPCR) angewandt. Mit dieser Methode kann im Vergleich zur konventionellen PCR nicht nur detektiert werden, ob ein Gen exprimiert wird, sondern auch Vergleiche in der Expressionsstärke zwischen verschiedenen Versuchsgruppen aufgezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dabei die Expression des Gens *beta-Arrestin-1* (für ARRB1) kodierend für das Genprodukt β -Arrestin-1 in den entnommenen Nieren untersucht. Analysiert wurde der Expressionsunterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-tieren, sowie unbehandelten Mäusen und solchen mit STZ-induzierter diabetischer Stoffwechsellage, in beiden verwendeten Mausstämmen. Als endogenes Referenzgen wurde das *18S* rRNA Gen verwendet, für dessen Detektion ein Primermix der Firma QuantiTect verwendet wurde.

Die Methode der qPCR beruht auf der exponentiellen Vervielfältigung von durch spezifisch designten Primern (Tab. 2.12) gekennzeichneten Genabschnitten auf einer DNA-Vorlage (hier die aus den Mausnieren-RNA umgeschriebene cDNA). Dazu wurde der *SYBR® Green PCR Master Mix* der Firma Applied Biosystems verwendet. Der *Master Mix* enthält den Farbstoff *SYBR® Green I Dye* (kurz *SYBR Green*), welcher zwischen DNA Doppelsträngen bindet. Bei der PCR entstehen Doppelstränge, an die der Farbstoff proportional zur entstehenden Menge bindet, wobei eine Fluoreszenz entsteht, die nach Abschluss jedes Zyklus von dem verwendeten Gerät gemessen und von der Software als Diagramm einer Amplifikationskurve dargestellt wird. In diesen Kurven lassen sich unterschiedliche Phasen abgrenzen: Zunächst zeigt sich eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz, genannt Baseline. Ab dem Zyklus, bei dem das Farbstoff-Fluoreszenzsignal erstmals über der Baseline liegt, dem sogenannten *Cycle threshold* (angegeben als C_T -Wert), beginnt die exponentielle Verdopplung der PCR Produkte mit jedem Zyklus. Niedrige C_T -Werte sprechen dabei für ein frühes Erreichen der Exponentiellen Phase und folglich für eine hohe Menge der zu detektierenden cDNA und damit auch der mRNA in der Ausgangsprobe, entsprechend einer hohen Expression des Gens. Umgekehrt lässt sich von hohen C_T -Werten auf eine geringe Expression schließen.

Jeder Durchlauf wurde in der Software des qPCR Geräts (Tab.2.15) vorprogrammiert. Dabei wurde im ersten Schritt (95°C , 15min) die DNAPolymerase aus dem *SYBR Green PCR Master Mix* aktiviert sowie DNA-Moleküle denaturiert. Danach schlossen sich 40 Amplifikationszyklen mit folgender Reihenfolge an: Denaturierung (95°C , 15sec), Primer Annealing (spezifisch für jeden Primer), Elongation der DNA in Richtung $5' \rightarrow 3'$ Ende (72°C , 30 sec), Fluoreszenzmessung (34 sec bei variablen *data collect* Temperaturen). Nach den Amplifikationszyklen schloss sich eine Schmelzkurve an (95°C , 15 sec und 60°C , 1min, danach in jedem Zyklus 1°C weniger). Für die *beta-Arrestin-1* Primer wurde eine *Annealing* Temperatur von 59°C für 15sec und 78°C *data collect* Temperatur ermittelt. Der 18S Primer liefert bei unterschiedlichen Temperaturen gleich gute PCR-Produkte und kann parallel mitlaufen.

Anschließend wurde die PCR-Platte vorbereitet, dafür wurde diese in eine spezielle Hängeplatte auf einem Eisblock eingespannt, ohne das es zu einer Verunreinigung durch Berührung des Plattenbodens kam. Alle Arbeiten fanden auf Eisblöcken statt. Pro Primer wurde ein *Master Mix* vorbereitet. Für Ansätze mit dem 18S Primer der Firma QuantiTect wurden pro Ansatz 2 μl des *Primermixes* mit 10 μl *SYBR Green Master Mix* und 7 μl nukleasefreiem Wasser vermischt. Für die *beta-Arrestin-1* Primer wurde je Ansatz 0,25 μl des *Forward Primers*, 0,25 μl des *Reward Primers* mit 8,5 μl Nuklease freiem Wasser und ebenfalls 10 μl *SYBR Green Master Mix* für den *Master Mix* verwendet. Die RT-qPCR fand in 96-Well Platten, speziell für qPCRs statt. Von dem jeweiligen *Master Mix* wurde pro Well 19 μl mit einer Multipipette vorgelegt. Anschließend wurde 1 μl der jeweiligen cDNA eingespült. Es wurde jeder zu untersuchende Ansatz stets doppelt aufgetragen, um Doppelwerte zu generieren. Für jeden verwendeten *Master Mix* wurden Negativkontrollen (NTC, *no template control*) mitgeführt, bei denen Wasser statt cDNA Probe hinzugefügt wurde, um

Verunreinigungen auszuschließen. Die Platte wurde mit einer speziellen für qPCR-Platten hergestellten Klebefolie verschlossen und in den *Lightcycler* des qPCR Geräts gelegt. Anschließend wurde das vorgeschriebene Programm gestartet.

Nach Ende des Laufs generierte das Programm Amplifikationskurven und bestimmte Baseline und C_T -Werte automatisch (auto C_T). Dabei wird die Baseline in die Mitte des exponentiellen Kurvenanstiegs gesetzt. Die Doppelwerte wurden verglichen und nach Ausschluss von Fehlerquellen ein Mittelwert verwendet, bei stark voneinander abweichenden Doppelwerten wurde der Durchlauf wiederholt. Die Daten wurden aus der PCR-Software in eine Excel-Datei importiert und ausgewertet.

II.4.5 Auswertung der Expressionsanalysen

Die statistische Auswertung erfolgte nach Livak und Schmittgen [77] mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Diese Auswertung lässt von der detektierten Fluoreszenz des an DNA gebundenem SYBR Green (gemessenen als C_T -Werte) auf die Genexpressionsratio des untersuchten Gens schließen.

Die Mittelwerte der gemessenen C_T -Doppelwerte wurden auf das entsprechende Referenzgen normiert ($\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$) zum Ausgleich möglicher Ungleichheiten der eingesetzten Proben. Zur Quantifizierung der Expression des zu untersuchenden Gens wurde eine Differenz aus den ΔC_T -Werten der zu untersuchenden Probe und der Kontrolle gebildet ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Probe}) - \Delta C_T(\text{Kontrolle})$). Nach Anwendung der Methode und Bildung der *Fold Induction* ergab sich für die Kontrollgruppe der Wert Eins. Die Einzelproben jeder Gruppe wurden so untereinander verglichen und daraus der Mittelwert aller $\Delta\Delta C_T$ Werte für eine Probe gebildet. Durch Bildung der *Fold-Induction* ($2^{\Delta\Delta C_T}$) resultierte bei einer Ratio von größer 1 die Annahme eines Anstiegs der Expression des untersuchten Gens, und bei einer Ratio kleiner 1 ein Abfall der Expression. Fand sich kein Unterschied in der Expression des Gens, entsprach die Ratio dem Wert 1. Anschließend erfolgte die graphische Darstellung in Diagrammen erneut in *Prism 6* sowie eine statistische Auswertung mittels ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur. Der Wert 1 der Genexpressionsratio wurde in den graphischen Abbildungen als 100% Expression (Ausgangsexpression) dargestellt.

II.5 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Die in den beschriebenen Versuchen erhobenen Daten wurden mithilfe von *Microsoft Excel 2011* und *Graph Pad Prism 6* verarbeitet, graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau aller Versuche wurde auf 5% festgelegt. Für normalverteilte Daten wurde die statistische Signifikanz mittels ungepaartem t-Tests mit Welch-Korrektur geprüft. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney-Test, sofern sinnvoll angewandt. Zur Prüfung der Normalverteilung diente der *D'Agostino and Pearson Omnibus Normality Test*. Bei einigen Versuchen

konnte die Normalverteilung aufgrund der geringen Endzahl nicht geprüft werden. Bei den oftmals komplexen Versuchsanordnungen zur Grundlagenforschung an der glomerulären Schlitzmembran werden häufig nur geringe Endzahlen erreicht. Wie in der Literatur üblich wurde hier zur statistischen Auswertung der t-Test mit Welch-Korrektur verwendet. Je nach Signifikanzwert (p-Wert) ergeben sich unterschiedliche Signifikanzniveaus. Die Darstellung dieser in den erstellten Abbildungen wird in Tabelle 2.24 erläutert.

Abkürzung der unterschiedlichen Signifikanzniveaus

ns	Nicht signifikant ($p > 0,05$)
*	$0,01 < p < 0,05$
**	$0,001 < p < 0,05$
***	$0,0001 < p < 0,0005$
****	$p < 0,0001$

Tabelle 2.24: Übersicht über verwendete Abkürzungen für unterschiedliche Signifikanzniveaus.

Die erstellten Graphiken enthalten stets die Anzahl der erhobenen Messwerte (n), Mittelwert und Standardabweichung der erhobenen Daten. Die im statistischen Test verglichenen Gruppen sind mit Klammern markiert, dabei wird das Signifikanzniveau oberhalb der Klammer angegeben.

III. Ergebnisse

III.1 Ergebnisse des Zellkulturmodells

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Veränderungen des Anteils oberflächenständigen Nephrens unter hyperglykämischen Bedingungen nach β -Arrestin-2 *Knockdown* untersucht. Dazu wurden HEK293T Zellen wie in Kapitel II.2.1.2 beschrieben mit Nephtrin-Plasmid und β -Arrestin-2 siRNA duotransfiziert und in einem hyperglykämischen Medium mit 30mM Glukosegehalt für 24 Stunden kultiviert. Als Kontrollgruppen dienten eine reine Plasmidtransfektion und eine Transfektion mit einer Mischung kommerziell erwerblicher siRNAs genannt *control pool*.

III.1.1 siRNA vermittelter β -Arrestin-2 *Knockdown* in HEK293T-Zellen

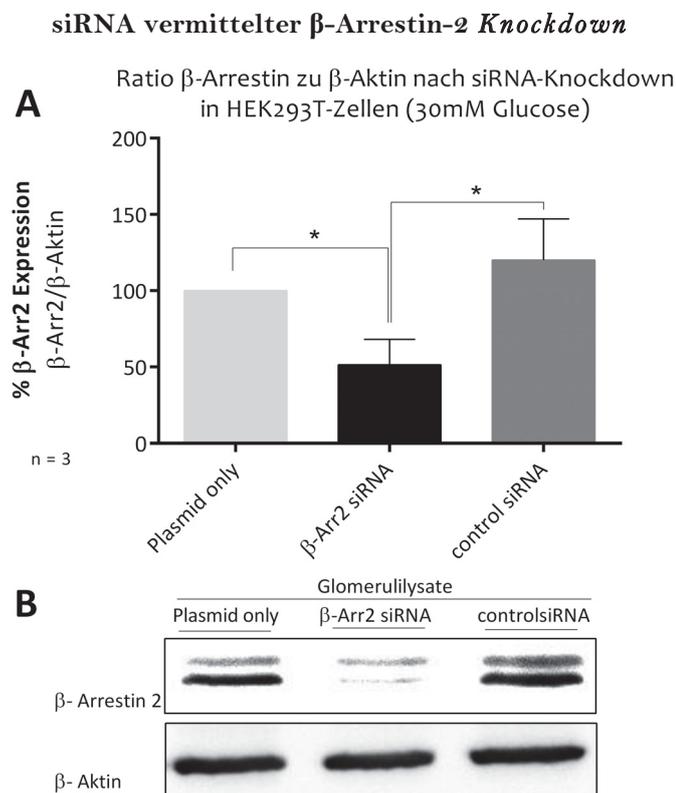


Abb. 3.1. Nachweis des siRNA vermittelten β -Arrestin-2 *Knockdowns* in HEK293T Zellen.

A: Densitometrische Auswertung des β -Arrestin-2 *Knockdowns* durch siRNA (Kontrolle: nur Nephtrin-Plasmid und *Control-Pool* siRNA) unter hyperglykämischen Bedingungen (30mM Glucose) in HEK 293T Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. **B:** Repräsentativer Westernblot. Oben: β -Arrestin-2-Färbung (Zu untersuchendes Genprodukt), Unten: β -Aktin-Färbung (Referenz).

Durch Behandlung mit β -Arrestin-2 siRNA zeigt sich eine signifikante (*) Verminderung (Mittelwert 51,34%, $p=0,0375$) des Genprodukts um 49% im Vergleich zur *plasmid only* Kontrolle (normiert: 100%), und zur *Control pool* Gruppe (Mittelwert 120,2%, $p=0,0270$). Die beiden Kontrollgruppen unterscheiden sich untereinander nicht signifikant ($p=0,3236$). Endzahl aller Gruppen: $n=3$. Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

Mit dem beschriebenen Verfahren konnte das β -Arrestin-2 Genprodukt in den HEK-Zellen um 49% reduziert werden (Von normiert 100% Expression in der *plasmid only* Kontrollgruppe zu 51,34% nach

β -Arrestin-2 Knockdown). Abbildung 3.1 zeigt die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der gefärbten Westernblots. Dabei wurde die Ratio von densitometrisch ermittelter β -Arrestin-2 Färbung zur β -Aktin Färbung der Proben untersucht. Die β -Aktin-Färbung wird hierbei als beständige Referenz verwendet. Die Ratio dient als Maß für die vorhandene Menge des *beta-Arrestin-2* Genprodukts. Dabei wurde die *plasmid only* Kontrollgruppe auf 100% normiert. Für die mit β -Arrestin-2 siRNA transfizierte Gruppe betrug die entsprechende Menge des Genprodukt im Mittel 51,34 % (SD 9,698%) und für die *control pool* Gruppe 120% (SD 15,51%). Es ergibt sich daher eine Reduktion des Genprodukts von der einfach transfizierten Kontrollgruppe zur mit β -Arrestin-2 siRNA behandelten Gruppe um 48,66%. Zu einem Signifikanzniveau von $p=0,0375$ ist der Unterschied der Genproduktmenge zur einfach transfizierten Kontrollgruppe und zur *plasmid only* Kontrollgruppe ($p=0,0270$) signifikant (jeweils $n=3$). Zwischen den beiden Kontrollgruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,3236$) des β -Arrestin-2 Genprodukts.

III.1.2 verminderte hyperglykämieinduzierte Nephrin-Endozytose nach β -Arrestin-2 Knockdown

Nephrin-Endozytose nach β -Arrestin-2 Knockdown

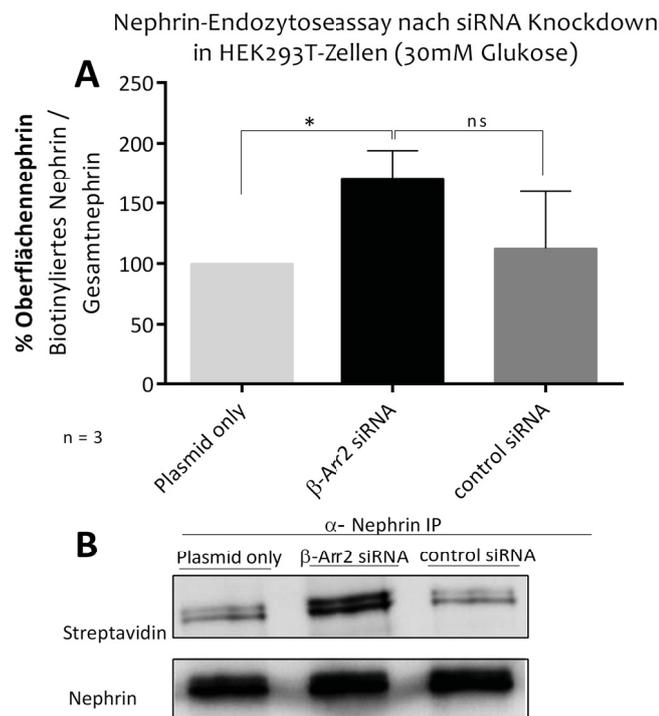


Abb. 3.2 Nephrin-Endozytoseassay nach β -Arrestin-2 Knockdown in HEK293T Zellen.

A: Densitometrische Auswertung des Nephrin-Endozytoseassays nach β -Arrestin-2 Knockdown durch siRNA (Kontrolle: nur Nephrin-Plasmid und Control-Pool siRNA) unter hyperglykämischen Bedingungen (30mM Glukose) in HEK 293T Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **B:** Repräsentativer Westernblot. Oben: Streptavidin gefärbtes, Biotin markiertes Oberflächennephrin. Unten: Gesamtnephrin aus α -Nephrin IP.

Nach siRNA vermitteltem β -Arrestin 2 Knockdown signifikant ($p=0,0334$) mehr Oberflächennephrin in HEK293TZellen mit Knockdown im Vergleich zu den Zellen ohne Knockdown. Kein signifikanter Unterschied ($p=0,1517$) zwischen der β -Arrestin-2 siRNA transfizierten Gruppe und der *Control pool* Gruppe, sowie zwischen der einfach transfizierten Gruppe und der *Control pool* Gruppe. Endzahl aller Gruppen: $n=3$ (IP = Immunpräzipitation.) Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

Abbildung 3.2 zeigt die densitometrische Auswertung eines Nephrin-Endozytoseassays in HEK293T Zellen. Verglichen wurden Zellen, die mit Nephrin transfiziert wurden und gleichzeitig ein siRNA vermittelter β -Arrestin-2 *Knockdown* induziert wurde, mit Kontrollgruppen, die nur mit Nephrin oder mit Nephrin und einer siRNA Kontrollmischung (*control pool*) transfiziert wurden (jeweils $n=3$). Dabei ergibt sich eine signifikante Erhöhung ($p=0,0334$) des prozentuellen Anteils oberflächenständigen Nephrens im unpaarigem t-Test mit Welch-Korrektur am Gesamtnephringehalt der Zellen mit Knockdown von β -Arrestin-2 siRNA (Mittelwert 171,1%, SD 13,33%) im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit Nephrin transfiziert wurde. Diese Gruppe wurde in der densitometrischen Auswertung als Kontrolle (100%) festgelegt. Der Vergleich der Kontrollgruppen einfach transfizierte Plasmidkontrolle und der *Control pool* siRNA Gruppe (Mittelwert: 112,7 %, SD 27,12%) zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,6855$) in der Prüfung mit ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur, ebenso der Vergleich der Zellen mit β -Arrestin-2 Knockdown mit der *Control pool* siRNA transfizierten Gruppe ($p=0,1517$).

III. 2 Ergebnisse des Mausmodells

Wie eingangs beschrieben wurden die Versuche zum Einfluss des Adapterproteins β -Arrestin-2 auf die hyperglykämieinduzierte Nephrin-Endozytose auf zwei genetischen Hintergründen untersucht, um den Einfluss der stammbedingt unterschiedlichen Suszeptibilität für proteinurische Nierenerkrankungen auf die Versuchsergebnisse zu verringern. Dabei wurden Knockouttiere mit homozygotem Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens, im Folgenden *beta-Arrestin 2 -/-* (kurz: *barr2-/-*) genannt, mit Wildtyptieren (kurz: WT) des entsprechenden genetischen Hintergrundes verglichen. Versuchsaufbau und Tierhaltung erfolgten wie in Kapitel II.1.2 beschrieben. In allen Tierversuchen wurden folgenden Parameter erhoben: Gewicht (g), Blutzucker (mg/dl) und Proteinurie gemessen als Albumin-Kreatin-Ratio (mg Albumin/g Kreatinin). Je nach Versuchsziel wurden zudem Organe für Proteinanalysen (Nephrin-Endozytose, gemessen als Anteil des Oberflächennephrin vom Gesamtnephringehalts und Nephrin-Aktin Ratio gemessen in Prozent oder RNA-Expressionsanalysen (*beta-Arrestin-1* Expressionsanalysen) entnommen. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse, sowie die Ergebnisse der statistischen Auswertungen sind im folgenden Kapitel dargestellt.

III.2.1 Ergebnisse des 21 Tage Hyperglykämie-modells auf C57BL/6 Hintergrund

Im folgenden Kapitel werden die Daten der Hauptversuche zum Verlauf von Blutzucker, Gewicht und Albuminausscheidung im Urin innerhalb von 21 Tagen und die Nephrin-Endozytose am 21. Tag nach Induktion eines durch Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus dargestellt. Dabei werden *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse mit dem entsprechenden Wildtyptieren verglichen. In

diesem Kapitel dargestellte Ergebnisse beziehen sich auf Tiere mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6.

III.2.1.1 Blutzuckerlauf nach STZ-induziertem Diabetes mellitus

Bei männlichen Mäusen der beiden Versuchsgruppen wurde im Alter von 9-18 Wochen durch *intrapertoneale* Injektion von 180µg Streptozotocin (STZ)/g Körpergewicht gelöst in Natrium-Citrat-Puffer eine diabetische Stoffwechsellaage induziert (Grenzwert, wie in der vergleichenden Literatur üblich: Blutzucker über 250mg/dl).

An Tag 0 wurden vor der Injektion die Ausgangswerte erhoben, dabei ergab sich für die untersuchten 17 männlichen Tiere der beiden Versuchsgruppen in der Gruppe der C57BL/6 Wildtypiere ein mittlerer Blutzuckerwert von 127,2 mg/dl (SD 28,43 mg/dl) und 163,4 mg/dl (SD 29,96 mg/dl) für die *beta-Arrestin-2* Knockouttiere. Die Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch Korrektur ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,001$) der Blutzuckerspiegel zwischen Wildtyp- und Knockouttieren.

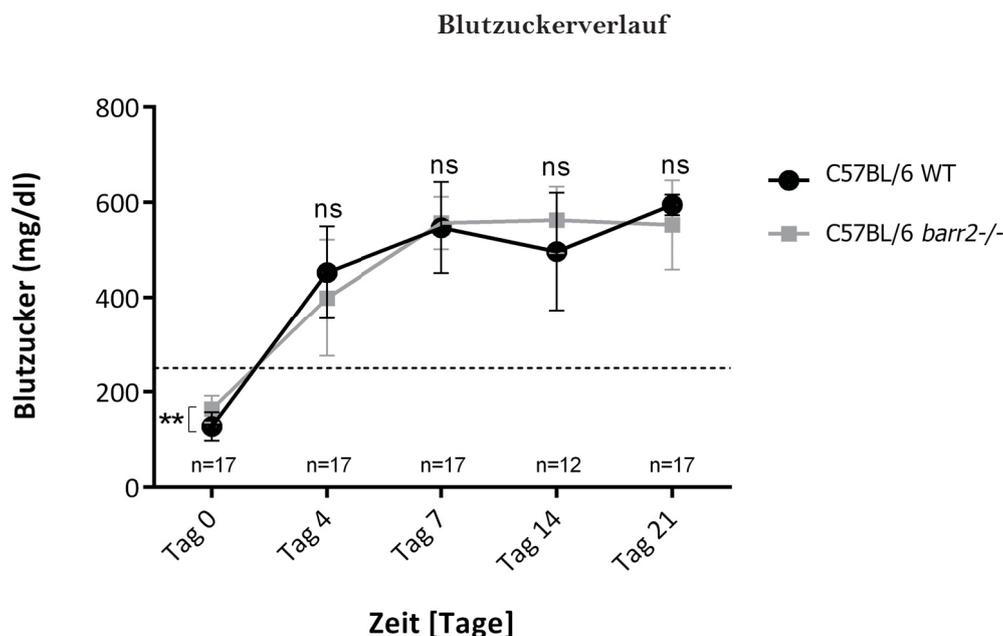


Abb.3.3 Vergleich des Blutzuckerlaufs von Tag 0 bis 21 im Rahmen des 21-Tage Hyperglykämie Modells bei C57BL/6 Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen.

Blutzuckerlauf (mg/dl) der Wildtypiere (WT, schwarz) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau) auf C57BL/6 Hintergrund im Alter von zu Beginn 9-18 Wochen vor Injektion von Streptozotocin (Tag 0) und im Verlauf von 21 Tagen nach induzierter Hyperglykämie. Es zeigt sich an Tag 0 ein signifikanter Unterschied (**, $p = 0,001$) der Blutzuckerspiegel zwischen den Versuchsgruppen. Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns) der beiden Gruppen (Tag 4 $p=0,1682$, $n=17$, Tag 7 $p=0,1965$, $n=17$, Tag 14 $p=0,1584$, $n=12$ Tag 21 $p=0,1026$, $n=17$). Die horizontal verlaufende gestrichelte Linie markiert die Hyperglykämieschwelle (250 mg/dl). Dargestellt sind der Mittelwert und die Fehlerbalken als Standardabweichung, die verbindende Linie stellt ausschließlich eine optische Verdeutlichung des Blutzuckerlaufs dar. (mg= Milligramm, dl= Deziliter). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur, ab Tag 7 Mann-Whitney-Test.

An Tag 4 erfolgte die Prüfung der induzierten Hyperglykämie. Die Knockouttiere (Mittelwert 399,2mg/dl, SD 122,6 mg/dl, $n = 17$) unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant

($p=0,1682$, ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) von den Wildtyptieren (Mittelwert $452,7$ mg/dl, SD $97,09$ mg/dl, $n=17$).

Anschließend wurde in wöchentlichen Abständen der Blutzuckerspiegel der Versuchstiere bis zur Organentnahme an Tag 21 dokumentiert. Mit steigender Hyperglykämie konnte das verwendete Messgerät die entstehenden Werte über 600 mg/dl nicht mehr differenzieren. Da sie alle als 600 mg/dl in die Auswertung eingingen waren die entstandenen Daten nicht mehr normalverteilt. Entsprechend wurde zur statistischen Auswertung der Blutzuckerwerte ab Tag 7 der Mann-Whitney-Test verwendet. An Tag 7 nach Versuchsbeginn zeigten die 17 untersuchten Wildtyptiere einen mittleren Blutzuckerspiegel von $547,3$ mg/dl (SD $95,63$ mg/dl), die 17 entsprechenden Knockouttiere unterschieden sich mit einem Mittelwert von $556,8$ mg/dl (SD $54,9$ mg/dl) im Mann-Whitney-Test nicht signifikant voneinander ($p=0,1965$). An Tag 14 wurde kein signifikanter Unterschied ($p=0,1584$) der beiden untersuchten Gruppen festgestellt. Der mittlere Blutzuckerspiegel der 12 untersuchten Wildtyptiere betrug zu diesem Zeitpunkt $496,8$ mg/dl (SD $123,7$ mg/dl) bei einem mittlerem Wert von $563,2$ mg/dl (SD $69,73$ mg/dl) für die 12 *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse. Vor der Organentnahme an Tag 21 erfolgte die letzte Messung, ohne Erfassung eines signifikanten Unterschieds ($p=0,1026$) im Mann-Whitney-Test. Dabei betrug der Mittelwert der Wildtypgruppe $594,7$ mg/dl (SD $21,83$, $n=17$) und der Mittelwert der Knockoutgruppe $552,9$ mg/dl (SD $93,62$ mg/dl, $n=17$). In Abbildung 3.3 ist der Blutzuckerlauf nach Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie über 21 Tage graphisch dargestellt.

III.2.1.2 Gewichtsverlauf

Vor Versuchsbeginn und im wöchentlichen Abstand bis zur Organentnahme wurden die Tiere gewogen. Die Überprüfung der Gewichtsunterschiede zwischen Wildtyp- und Knockouttieren erfolgte, bei gegebener Normalverteilung, mittels ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur. Die graphische Darstellung des Gewichtsverlaufs zeigt Abbildung 3.4.

Zu Beginn des Versuchs (Tag 0) lag das mittlere Gewicht der C57BL/6 Wildtyptiere bei $26,29$ g (SD $3,428$ g). Für die *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse wurde zu Beginn ein mittleres Gewicht von $26,51$ g (SD $3,648$ g) erhoben. Die Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,8589$) im Ausgangsgewicht der beiden Versuchsgruppen. An Tag 7 betrug das mittlere Gewicht der Wildtypgruppe $23,68$ g (SD $3,714$ g, $n=17$) und das der Knockouttiere $22,60$ g (SD $3,229$, $n=17$). Auch zu diesem Zeitpunkt ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6 Wildtyp- und Knockouttieren ($p = 0,3714$). Die Messungen an Tag 14 zeigten ein Mittelwert von $23,87$ g (SD $3,94$ g, $n=12$) in der Wildtypgruppe und von $24,89$ g (SD $3,885$ g, $n=12$) in der Gruppe der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse. An Tag 14 ergibt sich nach statistischer Auswertung mittels t-Test kein signifikanter Unterschied ($p = 0,5227$) zwischen den verglichenen Gruppen. In der letzten Messung an Tag 21 ergab sich bei den C57BL/6 Wildtyptieren ein mittleres Gewicht von $22,43$ g (SD $2,955$ g, $n=17$) und in der Gruppe der Knockoutmäuse ein Mittelwert von $22,56$ g (SD $4,721$ g, $n=17$). An Tag 21 zeigte die Anwendung

des t-Tests keinen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p=0,921$).

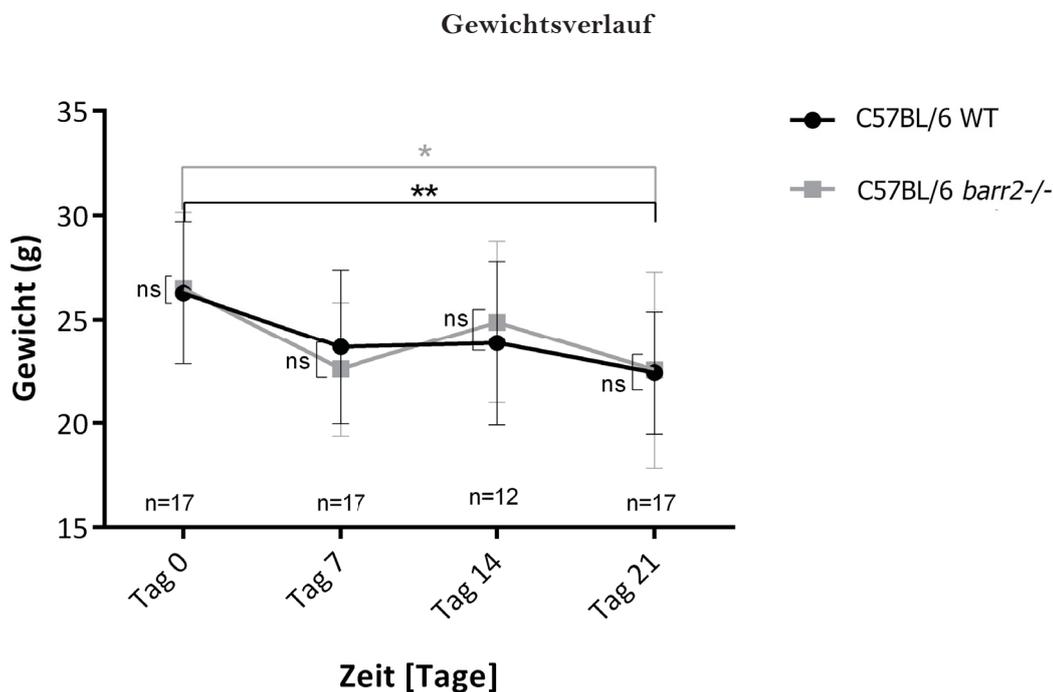


Abb. 3.4 Gewichtsverlauf und Gewichtsabnahme von Tag 0 bis Tag 21 bei Wildtyp- und Knockoutmäusen auf C57BL/6-Hintergrund im 21 Tage Hyperglykämiemodell.

Gewichtsverlauf (g) innerhalb des 21 Tag Hyperglykämie Modells von Wildtyp- (WT, schwarz) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen (*barr2*^{-/-}, grau) auf C57BL/6 Hintergrund im Alter von zu Beginn 9-18 Wochen. Es zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Gewichtsunterschied (ns) zwischen den Versuchsgruppen (Tag 0 $p = 0,8589$, $n=17$, Tag 7 $p = 0,3714$, $n=17$, Tag 14 $p = 0,5277$, $n=12$, Tag 21 $p = 0,9210$, $n=17$). Beide Tiergruppen nehmen im Verlauf von Tag 0 bis Tag 21 signifikant ab (Wildtyp $p=0,0014$ (**), Knockout $p=0,0106$ (*)). Dargestellt sind der Mittelwert und die Fehlerbalken als Standardabweichung, die verbindende Linie stellt ausschließlich eine optische Verdeutlichung des Gewichtsverlaufs dar. (g= Gramm). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur

Vergleicht man das Ausgangsgewicht mit dem Gewicht nach 21 Tagen zeigt sich durch Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur eine signifikante Gewichtsabnahme ($p=0,0014$) der Wildtyp Tiere von durchschnittlich 26,29g auf 22,43g. Die Gewichtsabnahme der Knockout Tiere von im Mittel 26,51g zu Beginn des Versuchs auf 22,56g an Tag 21 ist in der statistischen Auswertung mittels ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur mit einem Signifikanzniveau von $p=0,0106$ signifikant.

III.2.1.3 Albuminausscheidung im Urin (Albumin-Kreatinin-Ratio)

Aus über Nacht gewonnenem Sammelurin wurde im Verlauf der 21-tägigen STZ-induzierten Hyperglykämie die Albuminausscheidung der 9-18 Wochen alten männlichen Mäuse im Urin quantifiziert als Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) bestimmt (siehe Kapitel II.2.2.6). Die graphische Darstellung des Verlaufs zeigt Abbildung 3.5. Einige der Gruppen zeigten aufgrund der hohen Standardabweichung keine ideale Normalverteilung, zur Wahrung der Einheitlichkeit der

statistischen Auswertung der Albuminausscheidung wurde trotzdem der t-Test mit Welch-Korrektur angewendet.

Verlauf der Albuminausscheidung im Urin

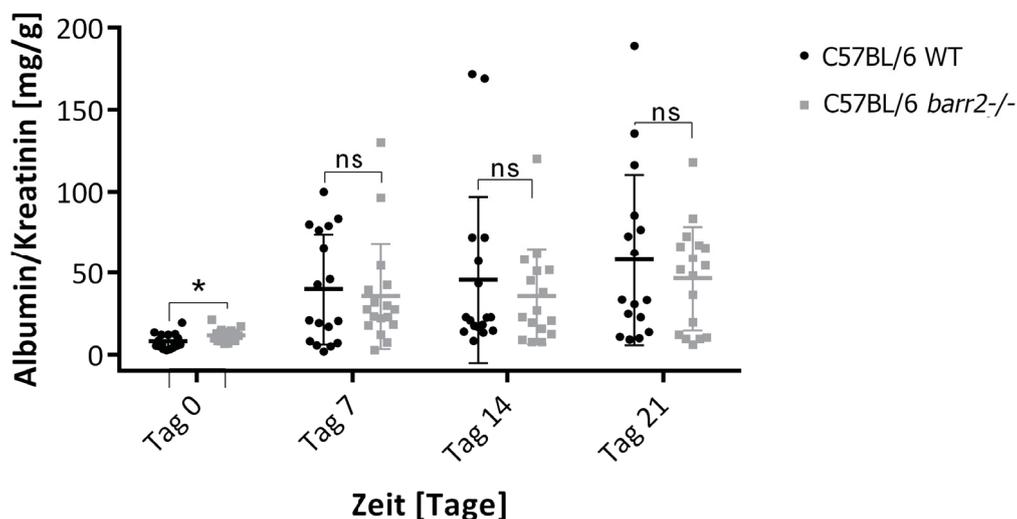


Abb. 3.5 Vergleich der Albuminausscheidung (Albumin-Kreatinin-Ratio, ACR) von Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund im Verlauf von 21 Tagen nach induzierter Hyperglykämie.

ACR (mg Albumin/g Kreatinin) von Wildtyptieren (WT, schwarz) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau) auf C57BL/6 Hintergrund im Alter von zu Beginn 9-18 Wochen An Tag 0 zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Albuminausscheidung (*) zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,0224$, WT $n=17$, *barr2*^{-/-} $n=16$). Zu den übrigen gemessenen Zeitpunkten unterscheiden sich die Versuchsgruppen nicht signifikant (ns). Tag 7: $p=0,7093$, $n=17$, Tag 14: $p=0,7605$, $n=17$, Tag 21: $p=0,4591$ WT $n=16$, *barr2*^{-/-} $n=17$). Die Einzelwerte, sowie der Mittelwert (Querbalken) und die Fehlerbalken als Standardabweichung vom Mittelwert sind dargestellt. (*mg*=Milligramm, *g*= Gramm). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur

An Tag 0 zeigte sich bei den C57BL/6 Wildtyptieren ($n = 17$) eine mittlere ACR von 8,075 mg Albumin/ g Kreatinin (SD 4,558 mg Albumin/g Kreatinin). Für die *beta-Arrestin-2* Knockouttiere ($n=16$) betrug der gemessene Mittelwert 11,66 mg Albumin/ g Kreatinin (SD 4,012 mg Albumin/g Kreatinin). Für $p = 0,0224$ ergibt sich nach Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur ein signifikanter Unterschied der Albuminurie zwischen den beiden Versuchsgruppen. An Tag 7 betrug der gemessene Mittelwert der Wildtypgruppe ($n=17$) 39,92 mg Albumin/g Kreatinin (SD 33,85 mg Albumin/g Kreatinin). Bei einer mittleren Albuminausscheidung der Knockoutgruppe ($n=17$) von 35,56 mg Albumin/g Kreatinin (SD 32,36 mg Albumin/g Kreatinin) unterscheiden sich die beiden Versuchsgruppen nach Anwendung des t-Tests mit Welch-Korrektur nicht signifikant ($p=0,7093$). An Tag 14 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen ($p=0,7605$, beide $n=17$), wobei die Wildtyptiere eine mittlere Albuminurie von 45,75 mg Albumin/g Kreatinin (SD 51,05 mg Albumin/g Kreatinin) aufwiesen und die Knockouttiere von 52,56 mg Albumin/g Kreatinin (SD 75,59 mg Albumin/g Kreatinin). Die Messungen an Tag 21 ergaben einen Mittelwert von 57,94 mg Albumin/g Kreatinin (SD 52,34 mg Albumin/g Kreatinin) für die 17 untersuchten Wildtyptiere. Die 17 untersuchten Knockouttiere präsentierten zu diesem Zeitpunkt eine mittlere Albuminausscheidung von 46,51 mg Albumin/g

Kreatinin (SD 31,87 mg Albumin/g Kreatinin). Die statistische Auswertung der zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,4591$) zwischen den Versuchsgruppen.

III.2.1.4 Nephrin-Endozytoseassay

Die Organentnahme erfolgte 21 Tage nachdem bei den 9-18 Wochen alten Versuchstieren durch Streptozotocininjektion eine diabetische Stoffwechsellage induziert wurde. Die wie in Kapitel II.2.2 beschrieben perfundierten Nieren wurden im Nephrin-Endozytoseassay zur Quantifizierung des Schlitzmembranproteins Nephrin analysiert. Dabei wurden der prozentuelle Anteil des oberflächenständigen Nephrins (in vivo Biotin markiert, Streptavidin gefärbt) am Gesamtnephrin der Glomeruli (Nephrin-Endozytose) als auch der Nephrinanteil an der Gesamtproteinmenge (Gesamtnephrin) bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde der t-Test mit Welch-Korrektur verwendet.

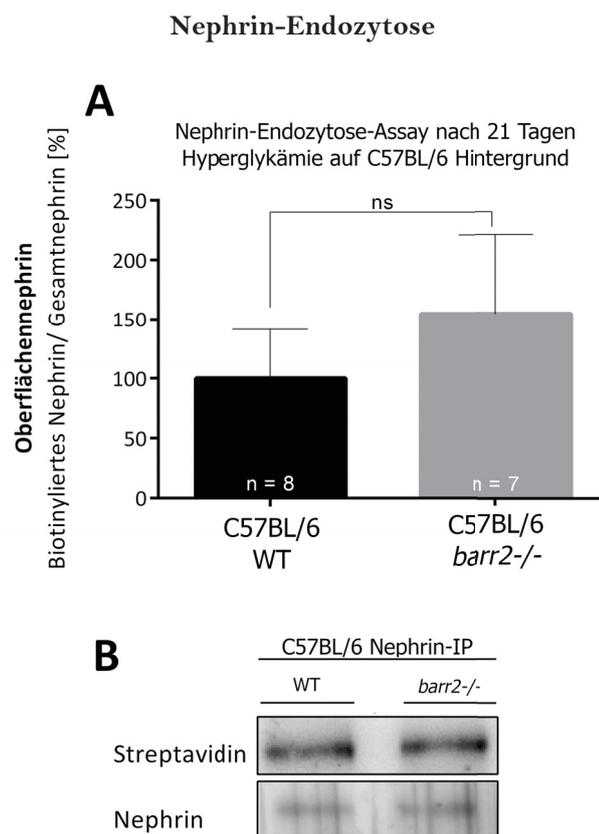


Abb. 3.6 Quantifizierung des Schlitzmembranproteins Nephrin in Mausnieren von C57BL/6 Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen nach 21 Tagen Hyperglykämie.

A Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der Nephrin-Endozytoseassays, durchgeführt an perfundierten Nieren von männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}, grau, n=7), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT, schwarz, n = 8). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns, $p = 0,0918$) der Nephrin-Endozytose als prozentualer Anteil des Oberflächennephrins am Gesamtnephringehalt. Dargestellt sind der Mittelwert sowie die Fehlerbalken als Standardabweichung. **B** Repräsentativer Westernblot der α -Nephrin-Immünpräzipitationen (IP) aus der in A beschriebenen Versuchsreihe. Oben: Streptavidinfärbung (färbt in vivo biotinmarkiertes oberflächenständiges Nephrin) Unten: Nephrin-Antikörper (entspricht Gesamtnephrin aus der IP). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur

Der Quotient aus Oberflächennephrin zum Gesamtnephringehalt wurde aus den IP Proben bestimmt als Maß für die Nephrin-Endozytose. Dabei zeigt der Mittelwert der Wildtypkontrollgruppe (n=8) normiert 100% Oberflächennephrin (SD 41,26%). Der Mittelwert des prozentuellen Anteils des oberflächenständigen Nephrins aus den Nieren der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse (n=7) 154,5 % (SD 66,7%). Nach Anwendung des t-Tests mit Welch-Korrektur ergibt sich mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,0918$ kein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppen. Die graphische Darstellung der Auswertung und einen repräsentativen Westernblot zeigt Abbildung 3.6.

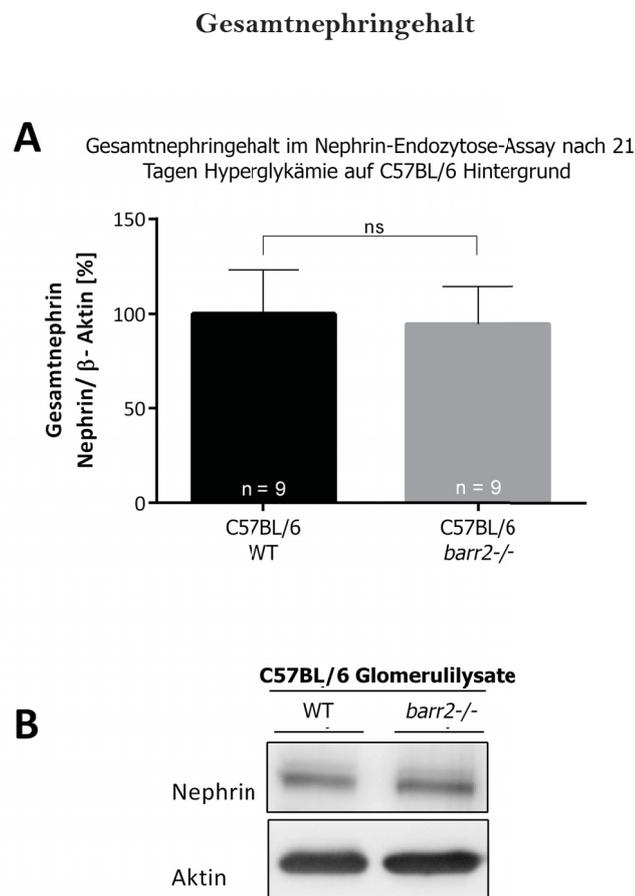


Abb. 3.7 Quantifizierung des Gesamtnephringehalts der Glomeruli aus Mausnieren von C57BL/6 Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen nach 21 Tagen Hyperglykämie.

A Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der Ratio von Nephrin- zu Aktin Gehalt der Lysatproben des Endozytoseassays, als Maß für die Gesamtnephrinmenge, durchgeführt an perfundierten Nieren von männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-} grau, n=9), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT, schwarz, n = 9). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns, $p = 0,5995$) der Gesamtnephrinmenge. Dargestellt sind der Mittelwert, sowie die Fehlerbalken als Standardabweichung. **B** Repräsentativer Westernblot der Lysatproben aus des Nephrin-Endozytoseassays. Oben: Nephrin-Antikörperfärbung. Unten: β-Aktin-Antikörperfärbung (Referenz). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur

Aus den gewonnenen Lysatproben wurde der Anteil von Nephrin am Gesamtproteingehalt (Referenz: β-Aktin-Gehalt) als Maß für den Gesamtnephringehalt der Glomeruli bestimmt. Dabei wurde der Mittelwert der Wildtypkontrollgruppe (n=9) auf 100% normiert (SD 23,11%). Der aus

den Proben der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse (n=9) gewonnene Mittelwert beträgt 94,6 % (SD 19,88%). Nach statistischer Auswertung mittels t-Tests mit Welch-Korrektur zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p = 0,5995) der Versuchsgruppen. Abbildung 3.7 zeigt die graphische Darstellung der Auswertung und einen repräsentativen Westernblot.

III.2.1.5 RNA-Expressionsanalysen: *beta-Arrestin-1* RT-qPCR

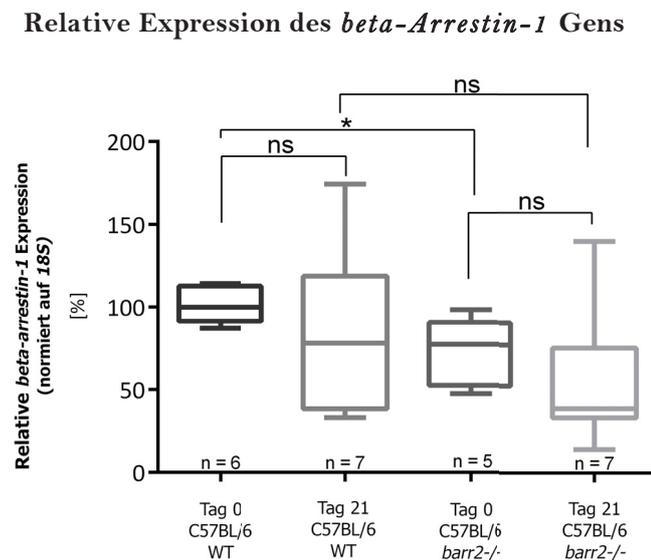


Abb. 3.8 Relative *beta-Arrestin-1* Genexpression im *Cortex renalis* aus Mausnieren von C57BL/6 Wildtyp und *beta-Arrestin-1* Knockoutmäusen unbehandelt und nach 21 Tagen Hyperglykämie.

Graphische Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR, welche die relative, auf das endogene Referenzgen *18s* normierte Genexpression von *beta-Arrestin-1*, bezogen auf die Kontrollgruppe der Wildtypiere an Tag 0 in den verschiedenen Versuchsgruppen zeigt. Durchgeführt an RNA aus den perfundierten Nieren von männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT) unbehandelt (Tag 0) und nach 21 Tagen induzierter Hyperglykämie. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von Tag 0 zu Tag 21 bei den Wildtypieren (Tag 0 n=6, Tag 21 n=5, p=0,4947, ns) und den Knockoutmäuse (p=0,3530, ns, Tag 0 n=7, Tag 21 n=7). An Tag 0 signifikant weniger Expression der Knockouts im Vergleich zum Wildtyp (p=0,0326, *), ohne signifikanten Unterschied an Tag 21 (p=0,2055, ns). Dargestellt sind in *Boxplots* im Kasten Median und obere und untere Quartile, sowie oberes und unteres Extrem (*Whiskers*). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur

Zur Analyse der Bedeutung des ebenfalls in Nieren exprimierten *beta-Arrestin-1* in den hier untersuchten Mechanismen am glomerulären Filter wurde die Expression dieses Gens in den entnommenen Mausnieren mittels RT-qPCR untersucht. Für die Genexpressionsanalysen wurde aus dem Kortex der entnommenen, perfundierten Nieren RNA isoliert und damit eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt zur Untersuchung der relativen Expression des *beta-Arrestin-1* Gens, kodierend für das Protein β -Arrestin-1. Dabei wurden die Ergebnisse auf die gemessene Expression des endogenen Referenzgens *18s* normiert. Die entnommenen Nieren stammten von bei Versuchsbeginn 9-18 Wochen alten C57BL/6 Mäusen mit und ohne Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens. Untersucht wurde die *beta-Arrestin-1* Expression unbehandelter Tiere (Tag 0) und nach 21 tägiger Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie. Die Ergebnisse wurden auf die Gruppe der unbehandelten Wildtypiere als Kontrollgruppe als 100% Ausgangsexpression bezogen. Wie in der

Literatur üblich kam zur Prüfung der statistischen Signifikanz der t-Test mit Welch-Korrektur zum Einsatz.

Die Expression von *beta-Arrestin-1* unterschied sich im ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur nicht signifikant ($p=0,4947$) zwischen den untersuchten Wildtypiere in der Gruppe der unbehandelten Tiere (Tag 0, $n=6$) mit einem Mittelwert von 101,1 % (SD 11,5%) von der Expression der 7 untersuchten Tiere nach 21 tägiger Hyperglykämie (Tag 21, MW 87,44 % SD 48,51%). Ebenso wurde kein signifikanter Unterschied ($p=0,3530$) im Vergleich der unbehandelten Knockouttiere (Tag 0, $n=5$, Mittelwert 72,85 % SD 20,36%) mit den diabetischen Mäusen an Tag 21 mit einer mittleren Expression von 55,02% (SD 41,75%) festgestellt. Die unbehandelten Wildtypiere zeigten eine signifikant höhere *beta-Arrestin-1* Expression ($p=0,0326$) in den Glomeruli als die zum gleichen Zeitpunkt untersuchten *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse. Für Tag 21 ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, die gemessene Expression der Wildtyp und Knockouttiere unterscheidet sich nicht signifikant (t-Test mit Welch-Korrektur, $p=0,2055$). Die Darstellung der Ergebnisse als *box plots* zeigt Abbildung 3.8.

III.2.2. Ergebnisse des 21 Tage Hyperglykämie-modells auf FVB Hintergrund

Analog zur Darstellung der Versuche mit Mäusen des C57BL/6 Stamms in Kapitel III.2.1 werden in diesem Kapitel die Daten von FVB *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen mit den entsprechenden Wildtypieren verglichen. Die Analyse der FVB Tiere erfolgte, um den Einfluss der stammbedingt unterschiedlichen Suszeptibilität für proteinurische Nierenerkrankungen auf die Versuchsergebnisse zu verringern. In den Hauptversuchen wurde bei den Mäusen durch Streptozotocininjektion ein chemischer Diabetes mellitus induziert und in den 21 Tagen bis zur Organentnahme Daten zum Verlauf von Blutzucker, Gewicht und Albuminausscheidung im Urin erhoben.

III.2.2.1 Blutzuckerlauf nach STZ-induziertem Diabetes mellitus

Durch Injektion von 180 μ g Streptozotocin(STZ)/ g KG gelöst in Natrium-Citrat-Puffer i.p. wurde bei männlichen Mäusen der beiden Versuchsgruppen im Alter von 9-18 Wochen eine diabetische Stoffwechsellage induziert (Grenzwert: Blutzucker über 250mg/dl). In Abbildung 3.9 ist der Blutzuckerlauf nach Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie über 21 Tage graphisch dargestellt.

An Tag 0 wurden vor der Injektion die Ausgangswerte erhoben, dabei ergab sich für die untersuchten 13 Tiere der FVB Wildtypgruppe ein mittlerer Blutzuckerwert von 128,5 mg/dl (SD 52,15 mg/dl) und 144,7 mg/dl (SD 24,15 mg/dl) für die 18 *beta-Arrestin-2* Knockouttiere. Damit unterscheiden sich die Blutzuckerspiegel der Versuchsgruppen an Tag 0 bei Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur nicht signifikant ($p = 0,3151$). Der Effekt der STZ-Injektion wurde an Tag 2 überprüft. Die Blutzuckerwerte der untersuchten FVB Knockouttiere

(Mittelwert 411,2mg/dl, SD 102 mg/dl, n =14) unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant ($p= 0,8902$, ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) von denen der entsprechenden Wildttypieren (Mittelwert 418,9 mg/dl, SD 158 mg/dl, n=11). Bis zur Organentnahme an Tag 21 wurde der Blutzuckerspiegel danach wöchentlich dokumentiert. Wie bereits erläutert ergaben sich Versuchsgerät bedingt ab Tag 7 Werte ohne Normalverteilung, weshalb im Folgenden der Mann-Whitney-Test angewendet wurde, um statistische Signifikanzen zu prüfen.

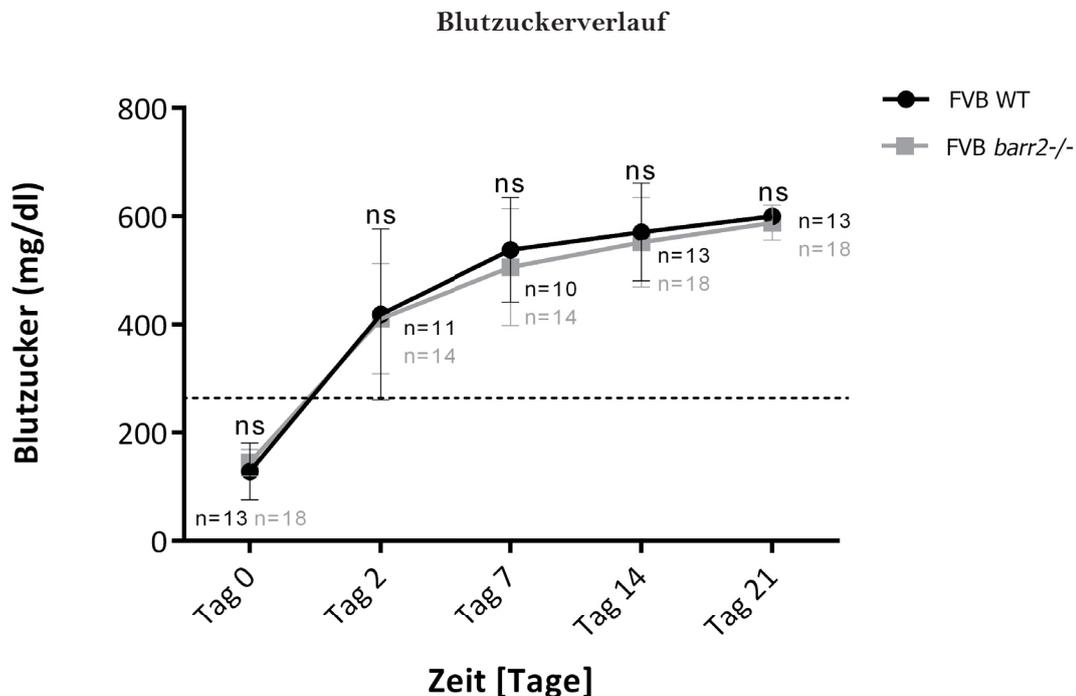


Abb.3.9 Vergleich des Blutzuckerverlaufs von Tag 0 bis 21 im Rahmen des 21-Tage Hyperglykämie Modells bei Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen auf FVB-Hintergrund.

Blutzuckerverlauf (mg/dl) der Wildttypiere (WT, schwarz) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau) auf FVB Hintergrund im Alter von 9-18 Wochen vor Injektion von Streptozotocin (Tag 0) und im Verlauf von 21 Tagen nach induzierter Hyperglykämie. Es zeigt sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied (ns) der beiden Gruppen. Tag 0: $p=0,3151$ mit WT n= 13, *barr2*^{-/-} n=18, Tag 2: $p= 0,8902$ mit WT n= 11, *barr2*^{-/-} n=14, Tag 7: $p= 0,2863$ mit WT n= 10, *barr2*^{-/-} n=14, Tag 14: $p= 0,6866$ mit WT n= 13, *barr2*^{-/-} n=18, Tag 21: $p= 0,2452$ mit WT n= 13, *barr2*^{-/-} n=18. Die horizontal verlaufende gestrichelte Linie markiert die Hyperglykämieschwelle (250 mg/dl). Dargestellt sind der Mittelwert und die Fehlerbalken als Standardabweichung, die verbindende Linie stellt ausschließlich eine optische Verdeutlichung des Blutzuckerverlaufs dar. (mg= Milligramm, dl= Deziliter) Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur, ab Tag 7 Mann-Whitney-Test.

Am 7. Tag nach Versuchsbeginn zeigten die 10 untersuchten Wildttypiere einen mittleren Blutzuckerspiegel von 538,5 mg/dl (SD 96,67 mg/dl), die 14 entsprechenden Knockouttiere, die untersucht wurden, unterschieden sich mit einem Mittelwert von 506,5 mg/dl (SD 108,0 mg/dl) im Mann-Whitney Test nicht signifikant vom Wildtyp ($p=0,2863$). An Tag 14 wurde kein signifikanter Blutzuckerunterschied ($p=0,6866$) bei den beiden untersuchten Gruppen festgestellt. Der mittlere Blutzuckerspiegel der 13 untersuchten Wildttypiere betrug zu diesem Zeitpunkt 571,3 mg/dl (SD 90,35 mg/dl) bei einem mittlerem Wert von 552,3 mg/dl (SD 82,9 mg/dl) für die 18 untersuchten *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse. Die letzte Messung erfolgte vor der Organentnahme an Tag 21. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Blutzuckerspiegel ($p=0,2452$) im Mann-

Whitney-Test. Dabei betrug der Mittelwert der Wildtypgruppe 600 mg/dl (SD 0 mg/dl, n=13) und der Mittelwert der Knockoutgruppe 588,6 mg/dl (SD 32,26 mg/dl, n=18).

III.2.2.2 Gewichtsverlauf

Zur Erfassung des Gewichtsverlaufs (in Abbildung 3.10 dargestellt) wurden die FVB Mäuse vor Versuchsbeginn und im wöchentlichen Abstand bis zur Organentnahme gewogen. Die Überprüfung der Gewichtsunterschiede zwischen Wildtyp- und Knockouttieren erfolgte dabei bei den normalverteilten Gewichtsdaten stets mit ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur.

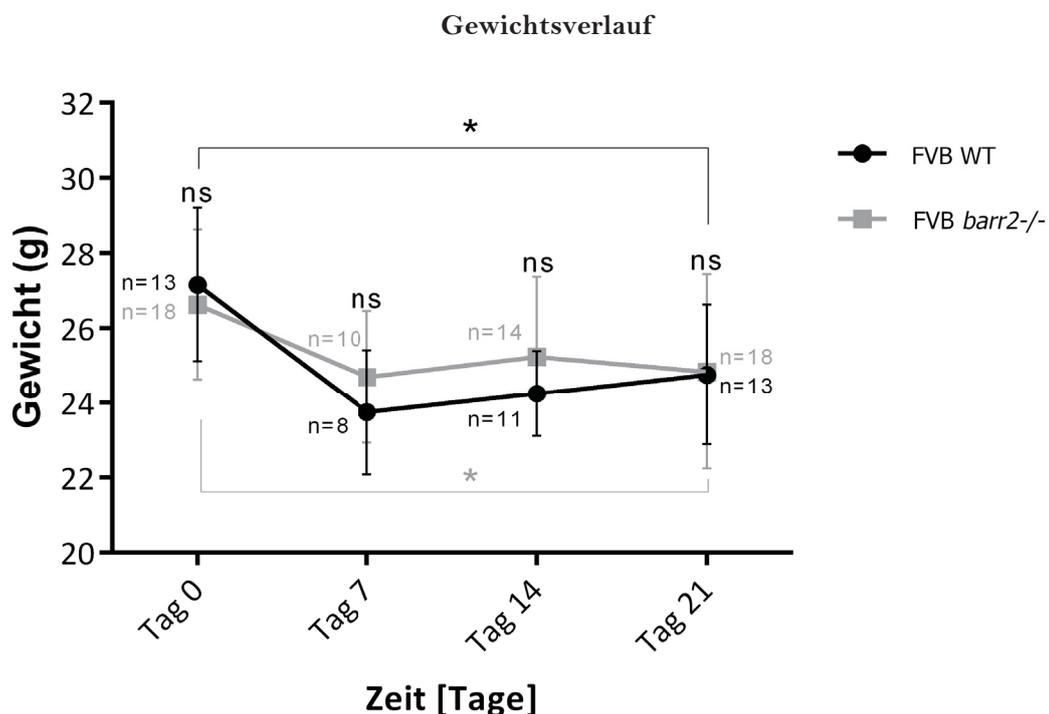


Abb. 3.10 Gewichtsverlauf und Gewichtsabnahme von Tag 0 bis Tag 21 bei Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen auf FVB-Hintergrund im 21 Tage Hyperglykämiemodell.

Gewichtsverlauf (g) innerhalb des 21 Tage Hyperglykämie Modells von Wildtyp- (WT, schwarz) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen (*barr2*^{-/-}, grau) auf FVB Hintergrund im Alter von zu Beginn 9-18 Wochen. Es zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Gewichtsunterschied (ns) zwischen den Versuchsgruppen (Tag 0: $p = 0,4624$ WT $n = 13$, *barr2*^{-/-} $n = 18$; Tag 7: $p = 0,2601$ WT $n = 8$, *barr2*^{-/-} $n = 10$; Tag 14: $p = 0,1526$, WT $n = 11$, *barr2*^{-/-} $n = 14$; Tag 21: $p = 0,844$ WT $n = 13$, *barr2*^{-/-} $n = 18$). Beide Tiergruppen nehmen im Verlauf von Tag 0 bis Tag 21 signifikant ab (Wildtyp $p = 0,0101$ (*), Knockout $p = 0,0271$ (*)). Dargestellt sind der Mittelwert und die Fehlerbalken als Standardabweichung, die verbindende Linie stellt ausschließlich eine optische Verdeutlichung des Gewichtsverlaufs dar. (g= Gramm). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

Vor Versuchsbeginn lag das mittlere Gewicht der 13 gewogenen Wildtyp Tiere bei 27,17 g (SD 1,957 g). Für die 18 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse wurde zu Beginn ein mittleres Gewicht von 26,63 g (SD 1,998 g) erhoben. Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,4624$) zwischen den Ausgangsgewichten der beiden Versuchsgruppen. An Tag 7 betrug das mittlere Gewicht der Wildtypgruppe 23,75 g (SD 1,669 g, $n = 8$) und das der Knockouttiere 24,70 g (SD 1,767, $n = 10$). Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Gewichtsunterschied

zwischen Wildtyp- und Knockouttieren ($p = 0,2601$). Die Messungen an Tag 14 ergaben einen Mittelwert von 24,25 g (SD 1,139 g, $n=11$) in der Wildtypgruppe und von 25,24 g (SD 2,132 g, $n=14$) in der Gruppe der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse. An Tag 14 ergibt sich nach statistischer Auswertung mittels kein signifikanter Unterschied ($p = 0,1526$) zwischen den verglichenen Gruppen. Die letzte Messung wurde an Tag 21 vor der Organentnahme durchgeführt, dabei zeigten die 13 FVB Wildtyptiere ein mittleres Gewicht von 25,01 g (SD 1,991 g) und die 18 Tiere in der Gruppe der Knockoutmäuse einen Mittelwert von 24,84 g (SD 2,597 g). Die letzten Messungen zeigten nach Anwendung des statistischen Tests keinen signifikante Gewichtsunterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ($p=0,844$).

Vergleicht man das Ausgangsgewicht der Wildtyptiere mit dem Gewicht nach 21 Tagen Versuchsdauer erkennt man nach Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur eine signifikante Gewichtsabnahme ($p=0,0101$) von durchschnittlich 27,17g auf 25,01g. Die Gewichtsabnahme der Knockouttiere von im Mittel 26,63g zu Beginn des Versuchs auf 24,84g an Tag 21 ist in der statistischen Auswertung mittels ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur mit einem Signifikanzniveau $p=0,0271$ ebenfalls signifikant.

III.2.2.3 Albuminausscheidung im Urin (Albumin-Kreatinin-Ratio)

Die Albuminausscheidung im Urin wurde als Albumin-Kreatinin Ratio (ACR) im Verlauf der 21-tägigen STZ-induzierten Hyperglykämie aus dem über Nacht gewonnenen Sammelurin der verwendeten zu Versuchsbeginn 9-18 Wochen alten 13 Wildtyptiere und 18 *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse bestimmt (siehe Kapitel II.2.2.6). Die graphische Darstellung des Verlaufs der Albuminausscheidung der FVB-Mäuse zeigt Abbildung 3.11. Analog zur statistischen Auswertung der C57BL/6 Tiere wurde auch hier der t-Test mit Welch-Korrektur angewendet.

Zu Beginn der Messungen (Tag 0) zeigten die FVB Wildtyptieren eine mittlere ACR von 19,22 mg Albumin/g Kreatinin (SD 7,34 mg Albumin/g Kreatinin). Für die *beta-Arrestin-2* Knockouttiere betrug der erhobene Mittelwert 21,13 mg Albumin/g Kreatinin (SD 9,264 mg Albumin/g Kreatinin). Mit einem Signifikanzwert von $p = 0,5233$ ergibt sich nach Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur kein signifikanter Unterschied der Albuminurie in den beiden Versuchsgruppen an Tag 0 der Versuchsreihe. An Tag 7 betrug der gemessene Mittelwert der Wildtypgruppe 494,9 mg Albumin/g Kreatinin (SD 494,8 mg Albumin/g Kreatinin). Bei einer mittleren Albuminausscheidung der Knockoutgruppe von 240,4 mg Albumin/g Kreatinin (SD 371,7 mg Albumin/g Kreatinin) unterscheiden sich die beiden Versuchsgruppen nach Anwendung des t-Tests mit Welch-Korrektur nicht signifikant ($p=0,1298$). Die Auswertung mit t-Test an Tag 14 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen ($p=0,8196$). Hierbei lag die die mittlere Albuminurie der Wildtyptiere bei 479,5 mg Albumin/g Kreatinin (SD 466,1 mg Albumin/g Kreatinin) aufwiesen und der Mittelwert der Knockouttiere 433,9mg Albumin/g Kreatinin (SD 637,3 mg Albumin/g Kreatinin). Die Messungen an Tag 21

ergaben einen Mittelwert von 603,2 mg Albumin/g Kreatinin (SD 566,8 mg Albumin/g Kreatinin) für die untersuchten Wildtyptiere. Die Knockouttiere präsentierten zu diesem Zeitpunkt eine mittlere Albuminausscheidung von 319,9 mg Albumin/g Kreatinin (SD 454,1 mg Albumin/g Kreatinin). Der statistische Vergleich der Albuminausscheidung der Versuchsgruppen mit ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,1503$) an Tag 21 des Versuchs.

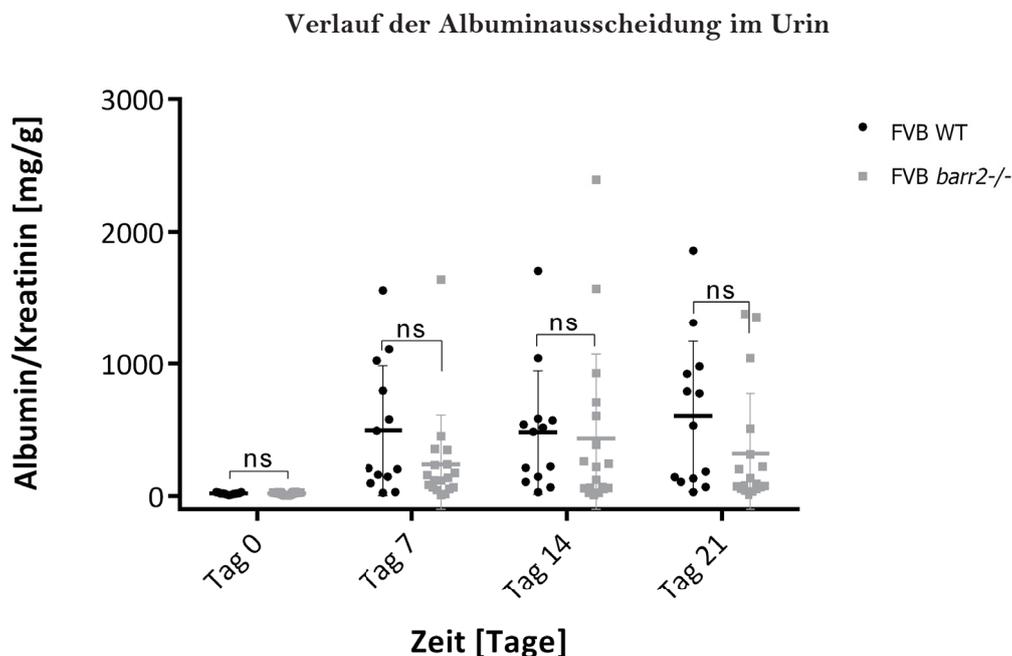


Abb. 3.11 Vergleich der Albuminausscheidung (Albumin-Kreatinin-Ratio, ACR) von Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen auf FVB Hintergrund im Verlauf von 21 Tagen nach induzierter Hyperglykämie.

ACR (mg Albumin/g Kreatinin) von Wildtyptieren (WT, schwarz, $n = 13$) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau, $n = 18$) auf FVB Hintergrund im Alter von zu Beginn 9-18 Wochen Zu den gemessenen Zeitpunkten unterscheiden sich die Versuchsgruppen nicht signifikant (ns). Tag 0: $p=0,5233$, Tag 7: $p=0,1298$, Tag 14 $p=0,8196$, Tag 21: $p=0,1503$ Die Einzelwerte sowie der Mittelwert (Querbalken) und die Fehlerbalken als Standardabweichung sind dargestellt. (*mg=Milligramm, g= Gramm*). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

III.2.2.4 Nephrin-Endozytoseassay

21 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus durch Streptozotocininjektion bei den zu Versuchsbeginn 9-18 Wochen alten FVB Versuchstieren erfolgte die Organentnahme. Die wie in Kapitel II.2.2 beschrieben perfundierten Nieren wurden im Nephrin-Endozytoseassay analysiert, welches die Quantifizierung des Schlitzmembranproteins Nephrin ermöglichte. Dabei wurden der prozentuelle Anteil des oberflächenständigen Nephrins (in vivo Biotin markiert, Streptavidin gefärbt) am Gesamtnephrin der Glomeruli (Nephrin-Endozytose) als auch der Nephrinanteil an der Gesamtproteinmenge (Gesamtnephrin) bestimmt. Als Maß für die Nephrin Endozytose wurde der Quotient aus Oberflächennephrin- zum Gesamtnephringehalt aus den gewonnenen IP Proben bestimmt. Dabei zeigt der Mittelwert der Wildtypkontrollgruppe ($n=6$) normiert 100% Oberflächennephrin (SD 48,47%). Der Mittelwert des prozentuellen Anteils des

oberflächenständigen Nephrins aus den Nieren der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse (n=7) entsprechend 73,27 % (SD 16,49 %). Nach Anwendung des t-Tests mit Welch-Korrektur ergab sich mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,2453$ kein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppen. Die graphische Darstellung der Auswertung und die Abbildung eines repräsentativen Westernblot zeigt Abbildung 3.12.

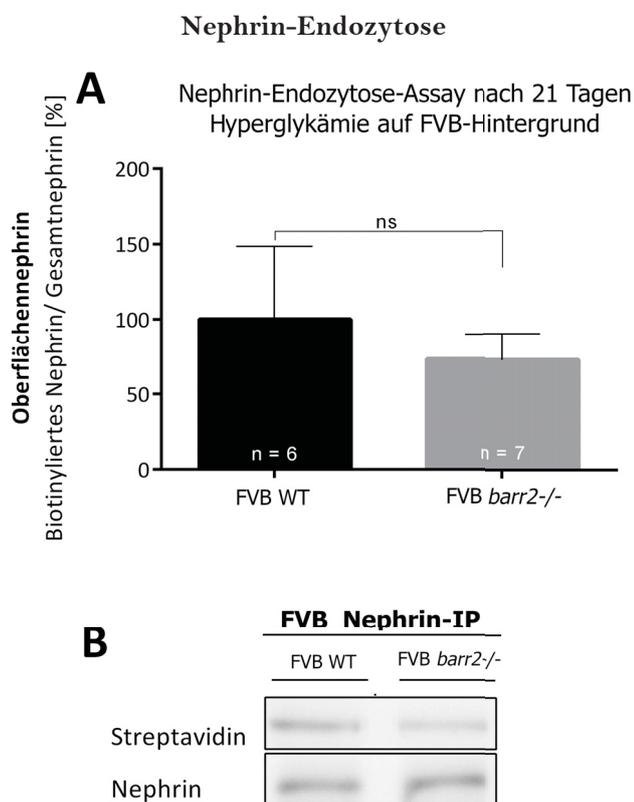


Abb. 3.12 Quantifizierung des Schlitzmembranproteins Nephrin in Mausnieren von Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen auf FVB-Hintergrund nach 21 Tagen Hyperglykämie.

A Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der Nephrin-Endozytoseassays, durchgeführt an perfundierten Nieren von männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}, grau, n=7), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT, schwarz, n = 6). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns, $p = 0,2453$) der Endozytose als prozentueller Anteils des Oberflächennephrins am Gesamtnephringehalt. Dargestellt sind der Mittelwert sowie die Fehlerbalken als Standardabweichung. **B** Repräsentativer Westernblot der α -Nephrin-Immünpräzipitationen (IP) aus der in A beschriebenen Versuchsreihe. Oben: Streptavidinfärbung (färbt in vivo biotinmarkiertes oberflächenständiges Nephrin) Unten: Nephrin-Antikörperfärbung (entspricht Gesamtnephrin der IP). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

Aus den gewonnenen Proben wurde vor Beginn der IP ebenfalls Teile als Lysatproben verwendet. Daraus wurde der Anteil von Nephrin am Gesamtproteingehalt (Referenz β -Aktin Gehalt) als Maß für den Gesamtnephringehalt der Glomeruli bestimmt. Dabei wurde der Mittelwert der Wildtypkontrollgruppe (n=5) auf 100% normiert (SD 19,34%). Entsprechend betrug der Mittelwert aus den Proben der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse (n=7) 72,35% (SD 43,56%). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Tests mit Welch-Korrektur und ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,1723$) des Gesamtnephringehalts der Versuchsgruppen. Abbildung 3.13 zeigt die graphische Darstellung der Auswertung und einen repräsentativen Westernblot.

Gesamtnephringehalt

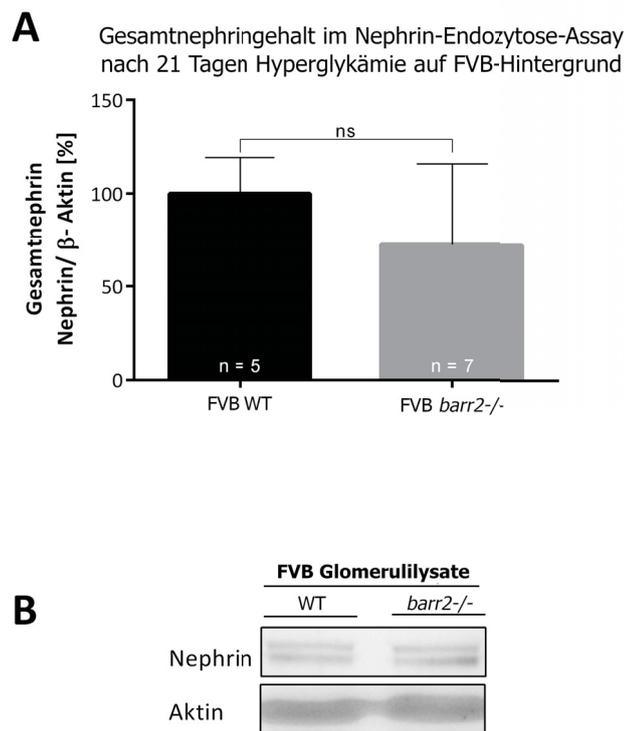


Abb. 3.13 Quantifizierung des Gesamtnephringehalts der Glomeruli aus Mausnieren von Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen auf FVB-Hintergrund nach 21 Tagen Hyperglykämie.

A Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der Ratio von Nephrin- zu Aktin Gehalt der Lysatproben des Endozytoseassays, als Maß für die Gesamtnephrinmenge, durchgeführt an perfundierten Nieren von männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}, grau, n=7), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT, schwarz, n = 5). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns, p = 0,1723) der Gesamtnephrinmenge. Dargestellt sind der Mittelwert sowie die Fehlerbalken als Standardabweichung. **B** Repräsentativer Westernblot der Lysatproben aus den Nephrin-Endozytoseassays. Oben: Färbung mit Nephrin-Antikörper. Unten: Färbung mit β-Aktin-Antikörper (Referenz). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

III.2.2.5 RNA-Expressionsanalysen: *beta-Arrestin-1* qPCR

Auf FVB Hintergrund wurde ebenfalls aus Rindenstücken der entnommenen perfundierten Nieren RNA isoliert und damit eine qPCR zur Untersuchung der relativen Expression des *beta-Arrestin-1* Gens durchgeführt, normiert auf das endogene Referenzgens 18s und bezogen auf die Kontrollgruppe der unbehandelten Wildtypiere. Untersucht wurde die Expression in der Nierenrinde von je 6 zu Versuchsbeginn 9-18 Wochen alten FVB Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen bei unbehandelten Tieren (Tag 0) und nach 21 tägiger Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 als *Boxplots* dargestellt.

Es zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied der untersuchten Wildtypiere (p=0,7924) zu der Gruppe der unbehandelten Tiere (Tag 0: MW 105,4%, SD 26,12%) und den diabetischen Tieren (Tag 21: MW 99,75%, SD 43,79%) im ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur. Ebenso wurde kein signifikanter Unterschied (p=0,5925) im Vergleich der unbehandelten Knockouttiere (Tag 0: Mittelwert 119,3% SD 76,17%) mit den diabetischen Knockoutmäusen festgestellt (Tag 21:

MW 145,1%, SD 77,29%). Der Vergleich der Wildtyp- und Knockouttiere an Tag 0 und Tag 21 zeigt keinen signifikanten Expressionsunterschied im ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur zwischen den Wildtyp- und Knockoutmäusen.(Tag 0: $p=0,7145$, Tag 21: $p=0,2427$).

Relative Expression des *beta-Arrestin-1* Gens

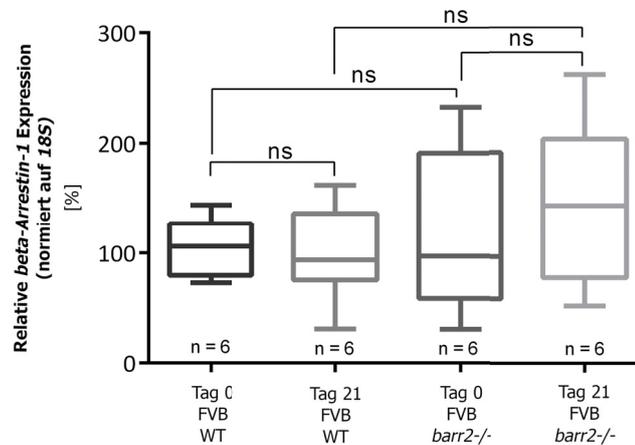


Abb. 3.14 Relative *beta-Arrestin-1* Genexpression im *Cortex renalis* aus Mausnieren von FVB Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen unbehandelt und nach 21 Tagen Hyperglykämie.

Graphische Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR, welche die relative, auf das endogene Referenzgen 18s normierte Genexpression von *beta-Arrestin-1* bezogen auf die Kontrollgruppe der Wildtypiere an Tag 0, in den verschiedenen Versuchsgruppen zeigt. Durchgeführt an RNA aus Glomeruli der perfundierten Nieren von je 6 Wochen alten männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT) unbehandelt (Tag 0) und nach 21 Tagen induzierter Hyperglykämie. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Genexpression von Tag 0 zu Tag 21 bei den Wildtyp- ($p=0,7924$, ns) und den Knockouttieren ($p=0,5925$, ns), sowie keine signifikant unterschiedliche Expression zwischen Wildtyp und Knockouts an Tag 0 ($p=0,7145$, ns) oder Tag 21 ($p=0,2472$, ns). Dargestellt sind in *Boxplots im Kasten* Median und obere und untere Quartile, sowie oberes und unteres Extrem (*Whiskers*). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur.

III. 2.3 Vergleich der Ergebnisse der zwei genetischen Hintergründe

Die Hauptversuche zum Einfluss des *beta-Arrestin-2* Knockouts auf die Hyperglykämie induzierte Nierenschädigung wurden, aufgrund der stammbedingt unterschiedlichen Suszeptibilität für proteinurische Nierenerkrankungen, auf C57BL/6- und FVB-Hintergrund gleichermaßen durchgeführt. Dafür wurden gleichermaßen zu Versuchsbeginn 9-18 Wochen alte männliche Mäuse beider Linien verwendet. Das folgende Kapitel zeigt die statistische Auswertung des Vergleichs der Ergebnisse der beiden untersuchten Linien bei den Hauptparametern Blutzucker, Albuminausscheidung und Nephrin-Endozytose.

III.2.3.1 Vergleich Blutzuckerspiegel

Zum Vergleich der Blutzuckerspiegel wurden die bei FVB und C57BL/6 erhobenen Werte vor Versuchsbeginn (Tag 0) und nach 21 Tagen Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie gegenübergestellt und mögliche Unterschiede der Zuckerspiegel zwischen den Linien bei gegebener

Normalverteilung mittels ungepaartem T-Test mit Welch-Korrektur verglichen. Die graphische Darstellung und Auswertung zeigt Abbildung 3.15. Dabei wurden zum Zeitpunkt Tag 0 und Tag 21 17 Wildtypiere des C57BL/6 und 13 Tiere des FVB Hintergrunds mit 17 C57BL/6- und 18 FVB Knockoutmäusen verglichen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Blutzuckerunterschied ($p=0,9393$) zwischen Wildtypiere an Tag 0, der mittlere Blutzucker betrug 128,5 mg/dl bei den FVB Tieren (SD 52,14 mg/dl) und 127,2 mg/dl (SD 29,96 mg/dl) bei den C57BL/6 Tieren. Die Knockouttiere der C57BL/6 Mäuse haben bei einem Mittelwert von 163,4mg/dl (SD 28,43 mg/dl) im Vergleich zu den FVB Tieren (MW 144,7 mg/dl , SD 24,15 mg/dl) einen signifikant höheren Blutzuckerspiegel ($p=0,0442$). Bei beiden Linien konnte eine Hyperglykämie induziert werden. Die Werte der Linien unterscheiden sich an Tag 21 nicht signifikant voneinander. Bei einem Signifikanzniveau von $p=0,3322$ für die Wildtypiere mit einem mittleren Blutzucker der C7BL/6 Wildtypiere von 594,7 mg/dl (SD 21,83 mg/dl) und 600 mg/dl (SD 0 mg/dl) als Mittelwert der FVB Tiere. Der an Tag 0 erhobene Unterscheid zwischen den Knockoutmäusen beider Stämme zeigte sich an Tag 21 im Vergleich nicht mehr ($p=0,1420$). Hierbei liegt der mittlere Blutzucker der C57BL/6 Knockoutlinie bei 550 mg/dl (SD 95,86 mg/dl) und der FVB Knockoutlinie bei 588,6 mg/dl (SD 32,26 mg/dl).

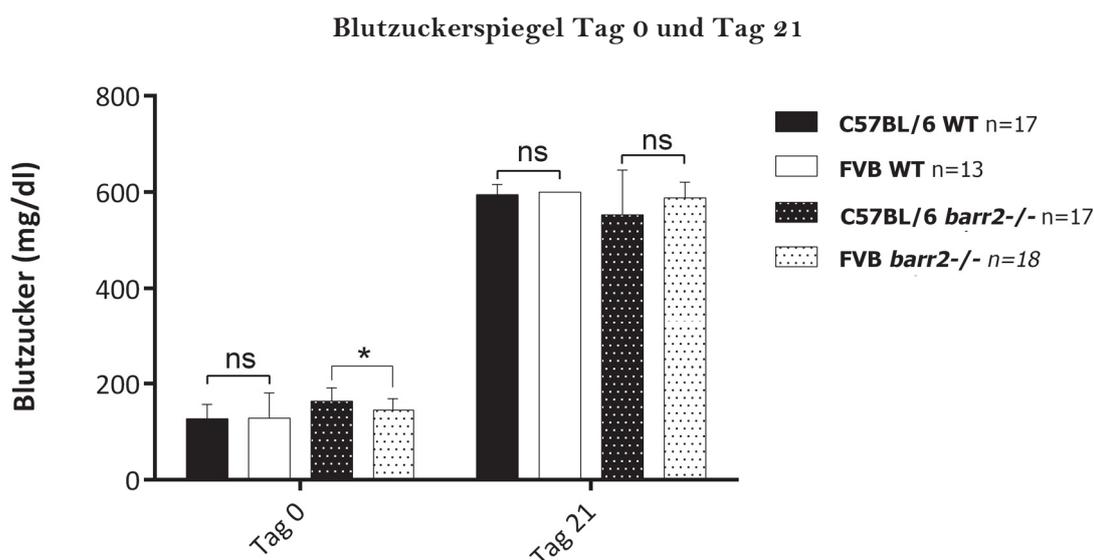


Abb.3.15 Blutzuckerspiegel an Tag 0 und 21 im Rahmen des 21-Tage Hyperglykämie-modells bei Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen auf FVB- und C57BL/6-Hintergrund im Vergleich.

Blutzuckerspiegel (mg/dl) der Wildtypiere (WT, blanko) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen (*barr2*^{-/-}, gepunktet) auf C57BL/6 (schwarz) und FVB (weiß) Hintergrund im Alter zu Beginn von 9- 18 Wochen vor Streptozotocininjektion (Tag 0) und an Tag 21 nach Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie. Die C57BL/6 Knockoutmäuse (n=17) unterscheiden sich an Tag 0 signifikant (*, $p=0,0422$) von der FVB Linie (n=18). In den anderen Vergleichen ergab sich kein signifikanter Blutzuckerunterschied zwischen den Linien (ns). Tag 0: WT $p=0,9339$ ns mit FVB n= 17 C57BL/6 n=18. Tag 21: Wildtypiere $p=0,3322$ ns, *barr2*^{-/-} $p=0,1420$ ns. Dargestellt sind der Mittelwert und die Fehlerbalken als Standardabweichung. (mg= Milligramm, dl= Deziliter). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur.

III.2.3.2 Vergleich Albuminausscheidung (ACR)

Die aus dem Sammelurin erhobenen Werte der Albumin-Kreatinin-Ratio als Maß für die Albuminausscheidung im Urin wurden für die zwei untersuchten Linien bei Wildtyp- und *beta-*

Arrestin-2 Knockoutmäusen auf FVB- und C57/BL/6-Hintergrund miteinander gegenübergestellt und zur Wahrung der Einheitlichkeit der statistischen Auswertung dieses Parameters mittels ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur geprüft. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 3.16.

Dabei wiesen die FVB Mäuse zu den untersuchten Zeitpunkten stets höhere ACR-Werte auf als die entsprechenden Vergleichsgruppen der C57BL/6 Mäuse. An Tag 0 zeigen die FVB Wildtyptiere (n= 13) bei einer mittleren ACR von 19,22 mg Albumin/g Kreatinin (SD 7,234 mg Albumin/g Kreatinin) eine signifikant höhere Albuminausscheidung (p=0,0001) als die 17 C57BL/6 Tiere mit einem Mittelwert von 8,075 mg Albumin/g Kreatinin (SD 4,558 mg Albumin/g Kreatinin). Für die Knockouttiere beträgt das Signifikanzniveau an Tag 0 p=0,0006 bei einer mittleren Ausscheidung von 21,13 mg Albumin/g Kreatinin (SD 9,264 mg Albumin/g Kreatinin) der 18 FVB Knockouts und einem Mittelwert von 11,66 mg Albumin/g Kreatinin (4,012 SD mg Albumin/g Kreatinin) der 16 C57BL/6 Knockouts. An Tag 21 zeigten die Wildtyptiere weiterhin signifikant höhere ACR Werte (p=0,0047, C57BL/6 Mittelwert: 57,94 mg Albumin/g Kreatinin, SD 52,34 mg Albumin/g Kreatinin, FVB Mittelwert: 603,2 mg Albumin/g Kreatinin, SD 566,8 mg Albumin/g Kreatinin). Ebenso ist die Albuminausscheidung der FVB Knockoutmäuse nach 21 Tagen Hyperglykämie im Vergleich zur C57BL/6 Gruppe erhöht (p=0,0207, C57BL/6 Mittelwert: 46,51 mg Albumin/g Kreatinin, 31,87 SD mg Albumin/g Kreatinin, FVB Mittelwert: 319,9 mg Albumin/g Kreatinin, SD 454,1 mg Albumin/g Kreatinin).

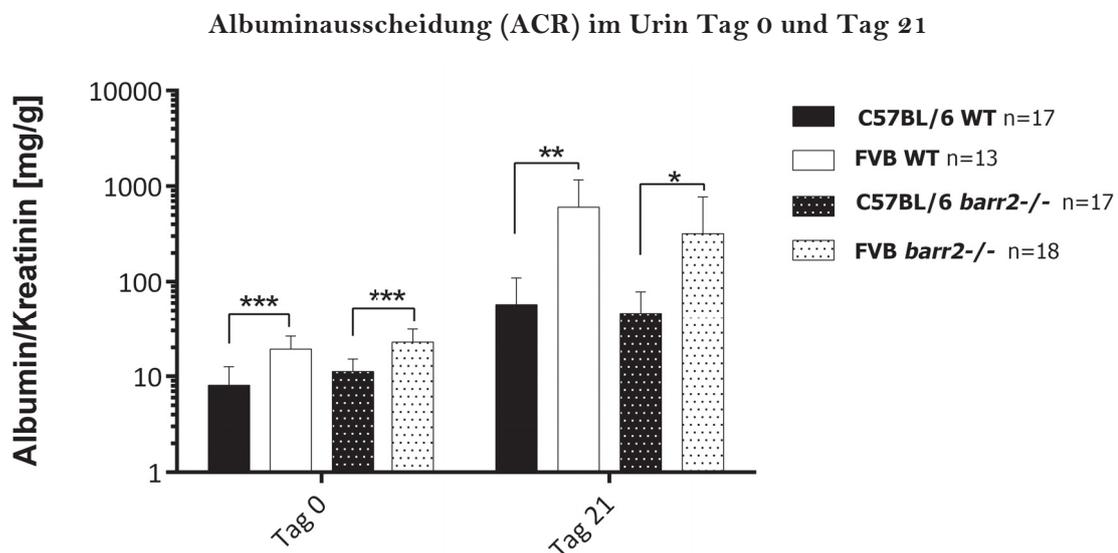


Abb. 3.16 Albuminausscheidung (Albumin-Kreatinin-Ratio, ACR) von Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen auf FVB- und C57BL/6-Hintergrund im Vergleich vor und 21 Tage nach induzierter Hyperglykämie.

ACR (mg Albumin/g Kreatinin) von Wildtyptieren (WT, blanko) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäusen (*barr2*^{-/-}, gepunktet) auf C57BL/6 (schwarz) und FVB (weiß) Hintergrund im Alter von zu Beginn 9-18 Wochen. Die FVB Wildtyptiere (n= 13) zeigen an Tag 0 (p=0,0001(***)) und Tag 21 (p=0,0047(**)) signifikant höhere Werte als die C57BL/6 Wildtyptiere (n=17). Auch die FVB Knockoutmäuse (n=18) haben eine signifikant höhere Albuminausscheidung als die C57BL/6 Tiere (n=17) zu beiden verglichenen Zeitpunkten (Tag 0 p=0,0006 (***), Tag 21 p=0,0207(*)) Dargestellt sind der Mittelwert (Querbalken) und die Fehlerbalken als Standardabweichung. (mg=Milligramm, g= Gramm). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur.

III.2.3.3 Vergleich Nephrin-Endozytose

Im Rahmen des Nephrin-Endozytoseassays wurde der Gehalt von oberflächeständigem Nephrin der Schlitzmembran quantifiziert als Maß für die Nephrin-Endozytose im Podozyten. Dabei (siehe Abbildung 3.17) wurden die densitometrischen Auswertungen der Western-Blots aus Versuchen von C57BL/6 und FVB Linien verglichen, bei denen der Quotient von oberflächenständigen und dadurch biotinyliertem, Streptavidin gefärbtem Nephrin zum Gesamtnephringehalt als Maß für die Endozytose bestimmt wurde. Die entsprechenden repräsentativen Westernblots zeigen die Abbildungen in Kapitel III.2.1 und III.2.2. Hierbei fand sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,9992$) zwischen der ermittelten Endozytose der verschiedenen Wildtypiere. Der mittlere Gehalt des Oberflächennephrins der Wildtypiere wurde auf 100% normiert bei einer Standardabweichung der 8 C57BL/6 Wildtypiere von 41,26% und der 6 FVB Tiere von 48,47%. Die 7 untersuchten C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse zeigten bei einem Mittelwert von 154,5 % Oberflächennephrin (SD 66,7 %) einen signifikant höheren Gehalt ($p=0,0175$) als die 7 entsprechenden FVB Tiere mit einem mittleren Gehalt von 73,27% Oberflächennephrin (SD 16,94 %). Die statistische Überprüfung erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur.

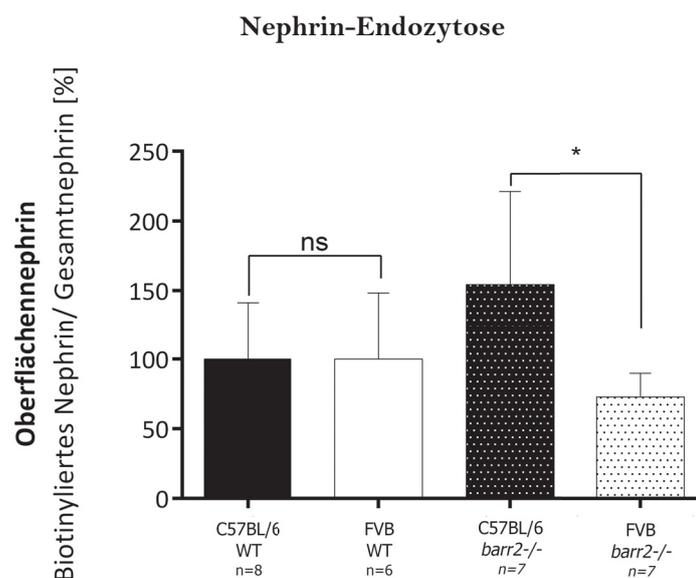


Abb. 3.17 Quantifizierung des Schlitzmembranproteins Nephrin in Mausnieren von Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen auf C57BL/6- und FVB-Hintergrund nach 21 Tagen Hyperglykämie im Vergleich.

Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen des Nephrin-Endozytoseassays, durchgeführt an perfundierten Nieren von männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}, gepunktet), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT, blanko) auf C57BL/6- (schwarz) und FVB- (weiß) Hintergrund. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns, $p=0,9992$) der Endozytose als prozentueller Anteil des Oberflächennephrins am Gesamtnephringehalt im Vergleich der Wildtypiere (C57BL/6 n=8, FVB n=6). Die C57BL/6 *barr2*^{-/-} Tiere (n=7) zeigen signifikant mehr Oberflächennephrin (entspricht weniger Endozytose, $p=0,0175$ (*)) als FVB Knockouts (n=7). Dargestellt sind der Mittelwert sowie die Fehlerbalken als Standardabweichung. Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293T-Zellen mit siRNA induziertem β -Arrestin-2 *Knockdown* und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse unter hyperglykämischen Bedingungen untersucht. Dabei kam eine neue Methode zum Einsatz [60], die eine Quantifizierung oberflächenständiger Moleküle der Schlitzmembran nach Induktion eines nephrologischen Krankheitsmodells ermöglicht.

So konnten folgende wesentliche Punkte gezeigt werden:

- Im HEK293T-Zellkulturmodell konnte nach β -Arrestin-2 Knockdown durch siRNA eine verringerte Nephrin-Endozytose unter Hyperglykämie beobachtet werden.
- An Tag 0 zeigten homozygote C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse signifikant höhere Blutzuckerspiegel und eine signifikant höhere Albuminausscheidung (ACR) in den Urin als der Wildtyp. Bei den entsprechenden Tieren auf FVB-Hintergrund wurde dies nicht beobachtet.
- Nach Induktion eines Diabetes mellitus durch Streptozotocininjektion unterschieden sich Blutzucker-, Albuminurie- und Gewichtsverlauf der *beta-Arrestin-2* Knockouttiere auf C57BL/6 und FVB Hintergrund zu den untersuchten Zeitpunkten nicht signifikant vom Wildtyp. Eine tendenziell geringere Albuminurie der Knockoutmäuse beider Linien wurde beobachtet.
- Im Nephrin-Endozytoseassay zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Oberflächennephrins zwischen Wildtyp- und Knockouttieren. Beim Vergleich der Tiere auf C57BL/6 Hintergrund sieht man eine tendenziell geringere Endozytose der Knockoutgruppe, bei den FVB Tieren wiederum eine tendenziell höhere Endozytose der Knockoutgruppe.
- Bei FVB *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen ist die relative Genexpression von *beta-Arrestin-1* tendenziell höher als bei den entsprechenden Wildtyptieren. Bei den entsprechenden C57/BL6 Tieren ist ein umgekehrter Effekt zu beobachten.

Im folgenden Kapitel erfolgt die detaillierte Einordnung und Diskussion der Einzelergebnisse.

IV.1 Zellkulturmodell

Zuerst wurde die Auswirkung einer Verringerung der Expression von *beta-Arrestin-2* durch siRNA-vermittelten *Knockdown* untersucht. Eine diabetische Stoffwechsellaage wurde durch 24 stündige Kultivierung in hyperglykämischen Medium (30 mM Glucose) simuliert. Hierbei konnte durch die Transfektion mit siRNA ein Knockdown von 49% der β -Arrestin-2 Gesamtmenge im Vergleich zur einfach Nephrin-Plasmid transfizierten Kontrolle erzielt werden.

Die Zellen mit β -Arrestin-2 Knockdown zeigten im Endozytoseassay signifikant mehr Oberflächennephrin als die nur Plasmid transfizierte Kontrollen und tendenziell mehr als die mit *control pool* siRNA duotransfizierte Gruppe. Der ausschließlich tendenzielle Unterschied zur dieser siRNA *control pool* Gruppe lässt sich möglicherweise durch die unspezifische Mischung der siRNAs und die Vielzahl der beteiligten Mediatoren der Endozytose erklären. Andere Mediatoren wie p38 oder PKC α [58] spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Signalkaskade der Endozytose und könnten, falls hier im siRNA *control pool* enthalten, die Endozytose ebenfalls reduzieren.

Zusammenfassend zeigte sich in diesen Versuchen, dass die Inhibierung des β -Arrestin-2 vermittelten Mechanismus einen protektiven Effekt auf den Gehalt des Oberflächennephrins im Zellmodell hat, was die Überlegungen zur Relevanz dieses Mechanismus bestärkt.

IV.2 Mausmodell

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen erfolgten anschließend *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell. Für die Untersuchung renaler Krankheitsmodelle spielen Tierversuche eine besonders große Rolle, da die komplexe dreischichtige Architektur des Filters, speziell der Podozyten mit der dazwischen ausgebildeten Schlitzmembran, von *in vitro* Modellen wie der Zellkultur häufig nur begrenzt dargestellt werden kann. Dazu wurde bei *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen und Wildtypieren durch Injektion von Streptozotocin (STZ) eine diabetische Stoffwechsellage induziert. Bei den Tieren wurden über den Versuchszeitraum von 21 Tagen der Verlauf von Blutzucker, Gewicht und Albuminausscheidung im Urin dokumentiert. Aus internen Gründen (z.B. feiertagsbedingte Schließung der Tierräume, Fehler bei der Nierenperfusion...) konnte zu einigen Zeitpunkten nicht bei allen Tieren die erwähnten Parameter erhoben werden. Am Tag 21 erfolgte die Organentnahme. Aus den entnommenen Nieren wurden die Glomeruli isoliert und darin die Lage des Nephrinmoleküls quantifiziert. Die Versuche wurden zunächst auf dem C57BL/6 Hintergrund durchgeführt, der aufgrund der zuverlässig induzierbaren Hyperglykämie häufig für Studien zu diabetischen Folgeerkrankungen verwendet wird. [78, 79] Die Ergebnisse zeigten die nach den Ergebnissen der Zellversuche erwartete Tendenz der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse zu reduzierter Endozytose und Proteinurie im Vergleich zum Wildtyp jedoch ohne eine eindeutige Signifikanz. Das Ausmaß der Albuminurie war jedoch selbst bei den diabetischen Tieren sehr niedrig. Daher wurden die Versuche nach Rückkreuzung auf dem FVB Hintergrund erneut durchgeführt, da dieser Stamm als empfindlicher für proteinurische Nierenerkrankungen gilt [80]. Hierbei beobachteten wir ebenfalls eine klare Tendenz zu verringerter Proteinurie der Knockouttiere, aber überraschenderweise eine tendenziell höhere Endozytose im Vergleich zum Wildtyp. Einen möglichen Erklärungsansatz könnte bei FVB Tieren kompensatorisch erhöhte Expression von *beta-Arrestin-1* darstellen, da β -Arrestin-1 durch seine strukturelle Ähnlichkeit Funktionen von β -Arrestin-2 ersetzen kann, aber auch für reziproke Effekte bekannt ist [81]. Bei den entsprechenden Tieren auf C57BL/6 Hintergrund zeigt sich ein gegenteiliger Effekt. Da diese

Ergebnisse insgesamt nicht signifikant sind, lässt sich hier jedoch keine abschließende Aussage treffen. Die Diskrepanz der eindeutigen Ergebnisse *in vitro* und der Tendenzen *in vivo* im Mausmodell lassen sich vielfältig diskutieren, wichtige Punkte sind dabei die Komplexität des dreischichtigen Nierenfilters und seine ubiquitäre Schädigung, mögliche toxische Effekte des Streptozotocins, das Fehlen eines idealen Mausmodells, welches gleich suszeptibel für Diabetes sowie für proteinurische Nierenerkrankungen ist.

IV.2.1 Streptozotocin als Modell des Diabetes mellitus Typ 1

Die Streptozotocin (STZ) induzierte Hyperglykämie als Modell des Diabetes mellitus Typ 1 ist ein häufig verwendetes, anerkanntes Modell zur Forschung an diabetischen Folgeerkrankungen, wie den Pathomechanismen der diabetischen Nephropathie. Um akute Effekte der Hyperglykämie zu untersuchen wurde ein kurzfristiges Modell gewählt, bei dem das Einsetzen der Hypoglykämie gut vorauszusagen und steuerbar ist. Akut einsetzende Hyperglykämien treten insbesondere bei Modellen des Diabetes mellitus Typ 1 auf, weshalb Krankheitsmodelle, die den Typ 2 darstellen nicht in Frage kamen. In Mausmodelle aus Inzuchtstämmen in denen die Tiere spontan durch eine genetische Mutation eine Hyperglykämie entwickeln, wie beispielsweise die NOD-Maus, setzt die zum Diabetes führende Insulinitis bei 4-5 Wochen alten Mäusen ein und führt im Alter von 12-30 Wochen zu einer klinisch manifesten Hyperglykämie. [82] Aufgrund dieser großen Zeitspanne zwischen Beginn der Schädigung und einsetzenden Hyperglykämie ist dieses Modell nicht geeignet für das Versuchsvorhaben akute Effekte der Hyperglykämie auf die Schlitzmembran zu untersuchen. Aufgrund dieser Überlegungen wurde für diese Versuchsreihe Streptozotocin zur Induktion der Hyperglykämie gewählt.

Streptozotocin bewirkt einen vollständigen Verlust der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas, indem es durch Strukturähnlichkeit mit Glucose über den Glut-2 Transporter in die Zellen aufgenommen wird [69, 71] und dort durch DNA-Alkylierung und ADP-Ribosylation den Zelluntergang bewirkt. [72, 73] Auch wenn der entscheidende toxische Effekt der Substanz in der β -Zellzerstörung liegt, können unspezifische toxische Effekte auf andere Organe nicht ausgeschlossen werden. [83] So zeigt die Verwendung des *high dose* STZ Modells (150 -200 mg/kg KG als Einzeldosis) einige Besonderheiten: Mithilfe dieses Modells kann auch im als nahezu resistent für proteinurische Nierenerkrankungen geltenden C57BL/6 Stamm eine Albuminurie induziert werden. Bei Mäusen die mit *high- und single dose* STZ Modell gleiche Hyperglykämiespiegel erreichten, war die gemessene Proteinurie der Mäuse, die mit *high dose* Modell behandelt wurden größer [83] als bei der *single dose* Gruppe. Es muss also in Betracht gezogen werden, dass ein Anteil der Albuminurie auf die Toxizität des STZ und nicht auf die hyperglykämieinduzierte Nierenschädigung zurückzuführen sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß oxidativen Stresses in STZ induziertem Diabetes mellitus höher ist als in anderen Diabetesmodellen [84], wobei oxidativer Stress das Potential unspezifischer Organtoxizität hat. Im Rattenmodell untersuchten Palm et al. welche Marker der diabetischen Nephropathie durch die

Hyperglykämie selbst und welche durch eine Nephrotoxizität des STZ induziert wurden. Dazu wurden Ratten, bei denen vormals durch STZ Injektion ein Diabetes mellitus induziert wurde, β -Zellen transplantiert. Dadurch waren die meisten untersuchten Parameter (GFR, Blutzucker, Nierengröße...) reversibel, die Albuminurie war aber auch bei früher Transplantation nicht reversibel, weshalb die Autoren eine Teilverantwortung in der Toxizität von STZ sehen. [85] Nichtsdestotrotz fehlt ein endgültiger Beweis des Mechanismus der Nierentoxizität und die Verwendung von STZ bleibt ein anerkanntes Modell der diabetischen Nephropathie, jedoch sollten die Ergebnisse stets auch vor dem Hintergrund möglicher unspezifischer Toxizität gesehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Organe 21 Tage nach der Streptozotocininjektion entnommen um den Einfluss der insbesondere kurz nach der Injektion auftretenden unspezifisch toxischen Effekte der Substanz zu minimieren, aber trotzdem die frühen Effekte der Hyperglykämie auf die Schlitzmembran untersuchen zu können.

IV.2.2 Blutzucker Verlauf

Bei beiden verwendeten Stämmen konnte bei Mäusen mit- und ohne Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens durch Streptozotocin eine diabetische Stoffwechsellage induziert werden. Wie in der Literatur üblich, werteten wir konstante Werte über 250 mg/dl als Hyperglykämie [67]. Tiere, die initial schon Werte oberhalb dieser Schwelle zeigten, wurden nicht in die Versuche eingeschlossen. Da das verwendete Blutzuckermessgerät keine Werte über 600 mg/dl erfassen konnte, wurden alle Werte oberhalb als 600 mg/dl gewertet. Da es in dieser Arbeit nicht um die Erfassung eines Zusammenhangs von Blutzuckerhöhe und Nephroendozytose ging und dieser systematische Fehler alle Versuchsgruppen betraf, haben wir die Werte in die Analysen einbezogen. Zur Schonung der bereits krankheitsbedingt gestressten Tiere wurde der nicht-nüchtern Blutzucker gemessen.

Bei den untersuchten Tieren auf C57BL/6 Hintergrund zeigten die *beta-Arrestin-2* Knockouttiere vor STZ-Injektion signifikant höhere Ausgangsblutzuckerspiegel als der entsprechende Wildtyp, was auf die bekannte stammspezifische gestörte Glukosetoleranz dieses genetischen Hintergrundes in Kombination mit dem das Pankreas beeinflussenden *beta-Arrestin-2* Knockout zurückzuführen ist (Details siehe IV.2.7)[86] Nach der Injektion konnte bei beiden Versuchsgruppen Blutzuckerwerte oberhalb des Grenzwerts von 250mg/dl ab dem 2. Tag gemessen werden. Zu allen erhobenen Zeitpunkten nach der Streptozotocininjektion zeigten beide Versuchsgruppen gleichermaßen eine Hyperglykämie ohne signifikanten Unterschied zueinander. Bei den untersuchten FVB Tieren unterschieden sich die gemessenen Blutzuckerspiegel der Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse dieses Stamms weder vor noch nach STZ-Injektion signifikant. Vergleicht man die Werte der FVB und C57BL/6 Tiere direkt miteinander, unterscheidet sich der Blutzuckerspiegel der unbehandelten Tiere signifikant. Die Blutzuckerwerte der C57BL/6 Knockouts liegen höher, als die der entsprechenden FVB Tiere. C57BL/6 Knockoutmäuse haben also nicht nur einen höheren Blutzuckerspiegel als ihr Wildtyp sondern auch als die Knockouttiere auf anderen Hintergründen.

Die anderen Vergleiche der Blutzuckerspiegel der untersuchten Linien, insbesondere nach STZ-Injektion, zeigten keinen signifikanten Unterschied.

IV.2.3 Verlauf der Albuminausscheidung

Früh im Verlauf der zu untersuchenden Hyperglykämie induzierten Nierenschädigung kommt es zum Auftreten einer Albuminurie als Zeichen des beginnenden Funktionsverlusts der Niere [12]. Da die Urinproduktion tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, sind Möglichkeiten zur quantitativen Bestimmung der Albuminurie sowohl die Albuminmessung im 24 Stunden Sammelurin, als auch die Normierung des Albumingehalts auf den Kreatiningehalt der Probe im Spoturin. In dieser Arbeit wurde die Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR, mg Albumin/g Kreatinin) aus über Nacht (ca. 12h) gewonnenen Sammelurinproben zur Analyse der Albuminurie verwendet.

Abb. 4.1 Albuminausscheidung (ACR) an Tag 21

Albuminausscheidung, Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR, mg/g).

Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert (Querbalken) und die Fehlerbalken als Standardabweichung vom Mittelwert. (mg=Milligramm, g=Gramm). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

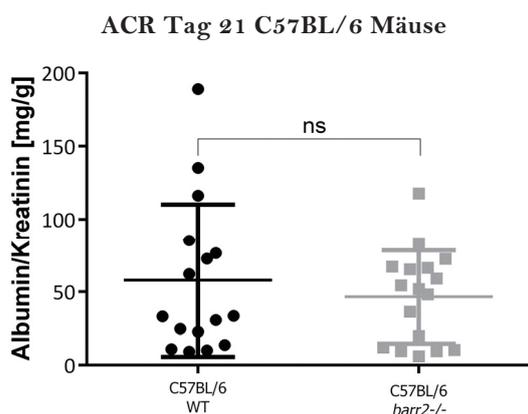


Abb. 4.1a Vergleich der ACR von C57BL/6 Mäusen mit und ohne *beta-Arrestin-2* Knockout an Tag 21.

ACR nach 21 Tagen Hyperglykämie von Wildtypiere (WT, schwarz, n=16) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau, n=17) auf C57BL/6 Hintergrund. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns) der Albuminausscheidung der beiden Gruppen (p= 0,4591).

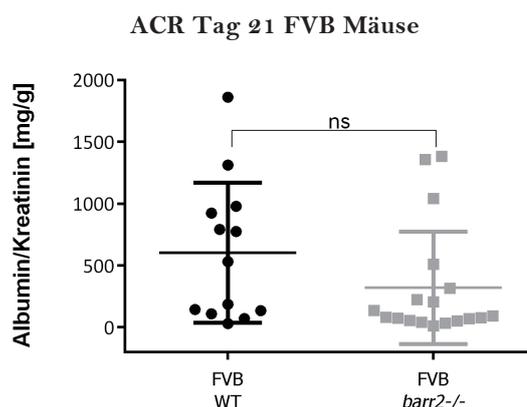


Abb. 4.1b Vergleich der ACR von FVB Mäusen mit und ohne *beta-Arrestin-2* Knockout an Tag 21.

ACR nach 21 Tagen Hyperglykämie von Wildtypiere (WT, schwarz, n=13) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau, n=18) auf FVB Hintergrund. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns) der Albuminausscheidung der beiden Gruppen (p= 0,1503).

Dabei zeigten die C57BL/6 Knockouttiere vor Induktion des Diabetes mellitus durch STZ-Injektion eine signifikant höhere Albuminurie als der entsprechende Wildtyp. Dieser Stamm zeigte aufgrund der Kombination des Knockouts mit der stammspezifisch gestörten Glucosetoleranz ebenfalls erhöhte Blutzuckerspiegel vor Versuchsbeginn, sodass hier davon auszugehen ist, dass diese bereits zu einer milden Schädigung des renalen Filters geführt haben, die mit beginnender erhöhter Eiweißausscheidung einhergeht (Details siehe IV.2.7). Die Albuminausscheidung der FVB Tiere ist zwischen Wildtyp und Knockout zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich.

Zusätzlich wurde die Albuminausscheidung zwischen den Linien FVB und C57BL/6 verglichen. Dabei zeigten sowohl Wildtyp- als auch Knockoutmäuse der FVB Linie vor und nach STZ Behandlung stets signifikant höhere Werte der ACR als die entsprechenden C57BL/6 Mäuse mit unterschiedlich ausgeprägter Signifikanz. Das Signifikanzniveau nimmt aber nach STZ induzierter Hyperglykämie und Albuminurie ab. Dies unterstreicht nochmal die Sensibilität des genetischen Hintergrundes FVB für proteinurische Erkrankungen bei gleichzeitiger relativer Resistenz der C57BL/6 Tiere: trotz erhöhter Albuminurie der C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse im Vergleich zu ihrem Wildtyp zeigen sie immer noch eine geringere Albuminausscheidung als die FVB Tiere.

Wildtyp und Knockouttiere beider Hintergründe entwickeln im Verlauf eine deutlich zunehmende Albuminausscheidung (um Faktor 4-7 erhöht im Vergleich zu Tag 0, siehe Tabelle 4.1 und 4.2), die sich im Ausmaß zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant unterscheidet. Allerdings zeigt sich insbesondere an Tag 21 (siehe Abb 4.1) eine tendenziell niedrigere Albuminurie der Knockouttiere beider genetischer Hintergründe. Auf C57BL/6 Hintergrund wird diese begleitet von einer ebenfalls tendenziell verringerten Endozytose der Knockouttiere, während sich bei den entsprechenden FVB Tieren ein gegenteiliger Effekt zeigt. Hier könnte eine kompensatorische Erhöhung der *beta-Arrestin-1* Expression eine Erklärung bieten. Da alle beschriebenen Effekte nicht signifikant sind, kann letztlich keine abschließende Aussage getroffen werden. Insgesamt scheint der Knockout jedoch aber auch ohne eindeutigen Einfluss auf die Endozytose tendenziell einen protektiven Effekt auf die Proteinurie zu haben. Eine Beteiligung von β -Arrestin-2 als ubiquitär vorhandenes Protein, das mit einer Vielzahl membranständiger Proteine interagieren kann und so die Proteinurie über eine Beteiligung an anderen Pathomechanismen am komplexen Nierenfilter beeinflusst wäre so denkbar.

IV.2.4 Nephrin-Endozytoseassay

Nach 21 Tagen Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie wurden die Nieren zur Erstellung der Nephrin-Endozytoseassays entnommen. Dabei wurde das *in vivo* oberflächenständige Nephrin mittels Biotinylierung bei der Perfusion markiert und ist nachher in den Proben der Nephrin-IP durch Streptavidinfärbung nachweisbar. Die Nephrin Färbung der IP-Proben zeigt den Gesamtnephringehalt der Probe. Durch die Bildung der Ratio der beiden densitometrischen Ergebnisse ergibt sich der relative Anteil von Oberflächennephrin am Gesamtnephrin. Von einer reduzierten Menge an Oberflächennephrin wurde auf eine erhöhte Endozytose in der Versuchsgruppe geschlossen [50]. Dabei stellte der Wildtyp stets die Kontrolle dar, auf die das Ergebnis des Knockouts bezogen wurde.

In den Endozytoseassays aus perfundierten Nieren der beiden verwendeten Mausstämme zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Lage des untersuchten Schlitzmembranproteins Nephrin

zwischen den verglichenen Wildtyp- und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen. In der detaillierten Betrachtung der Ergebnisse der C57BL/6 Linien lässt sich eine tendenziell geringere Endozytose (entsprechend erhöhter Anteil des Oberflächennephrens) der Knockoutmäuse erkennen. Divergierend dazu sind die Ergebnisse des FVB Stamms: Hier beobachteten wir eine tendenziell geringere Endozytose der Wildtypiere. Auffällig ist dabei, dass trotz divergierender Ergebnisse des Endozytoseassays beide Linien an Tag 21 der Hyperglykämie eine tendenziell verringerte Proteinurie zeigten. Es lässt sich daher vermuten, dass der *beta-Arrestin-2* Knockout zwar einen geringen protektiven Effekt auf den Proteinverlust in den Urin im Rahmen der diabetischen Nierenschädigung hat, aber die Nephren-Endozytose dabei nicht der alleinige Mechanismus ist, der diese Tendenz erklärt und sich diese Effekte stammspezifisch unterscheiden. Ein Erklärungsansatz bieten die jedoch ebenfalls nur tendenziell erhöhten kompensatorischen *beta-Arrestin-1* Expression der FVB Knockouttiere Tiere im Vergleich zur verringerten Expression bei den entsprechenden C57Bl/6 Tiere.

Zudem verglichen wir die Ergebnisse der Endozytoseassays nach 21 Tagen Hyperglykämie zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren der untersuchten Linien. Dabei ergab sich zwischen den FVB und C57BL/6 Wildtypieren kein signifikanter Unterschied des Oberflächennephrens. Die hyperglykämieinduzierte Nephrenendozytose unterscheidet sich also zwischen den Wildtypen der beiden Stämme nicht. Bei den C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse ergab die Auswertung einen signifikant höheren Anteil des Oberflächennephrens als bei den entsprechenden FVB Mäusen. Die Reaktionen auf den Knockout in Kombination mit der Hyperglykämie scheinen sich stammspezifisch jedoch zu unterscheiden. Ein Ansatz zur Erklärung der unterschiedlichen Tendenz der Endozytoseergebnisse sind die stammspezifischen Unterschiede der verwendeten Mauslinien als Eignung für ein Mausmodell der diabetischen Nephropathie. Kapitel IV.2.6 geht näher auf diese Unterschiede ein.

Um einen Einfluss der Veränderung der Gesamtnephrenmenge auf die Endozytoseergebnisse ausschließen zu können, wurde aus den densitometrischen Ergebnissen der Lysatwesternblots die Ratio von Nephrenfärbung zu β -Aktinfärbung (ubiquitäres Strukturprotein, stellvertretend für den Gesamtproteingehalt) als Maß für den Gesamtnephringehalt der Zellen gebildet. Bei beiden untersuchten genetischen Hintergründen zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtnephringehalt der untersuchten Glomeruli zwischen Wildtyp- und Knockouttieren. Unterschiede in der Gesamtnephrenmenge der untersuchten Gruppen scheinen also keinen Einfluss auf die beobachteten Tendenzen in der Albuminausscheidung zu haben.

Im Rahmen der diabetischen Nephropathie kommt es ubiquitär am Nierenfilter durch Veränderung vieler Signalwege unterschiedlicher Pathomechanismen zur Nierenschädigung [87], wie zum Beispiel einer Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs des Mesangiums oder einen Anstieg der TGF- β -Signalkaskade im Podozyten, aber auch in extraglomeruläre Zellen [88]. Das Zusammenspiel führt letztlich zur terminalen Glomerulosklerose. Die divergierenden Ergebnisse der

Nephrin-Endozytose zwischen den Stämmen legen nahe, dass der untersuchte Mechanismus der β -Arrestin-2 induzierten Nephrinendozytose eine eher untergeordnete Rolle für die tendenziell verringerte Albuminurie spielt. Da β -Arrestin-2 ubiquitär exprimiert wird, wären andere Effekte in Pathomechanismen am komplexen Nierenfilter im Rahmen der Hyperglykämie ein durchaus denkbarer Erklärungsansatz. Ebenso denkbar ist, dass im Zusammenspiel der Pathomechanismen am Nierenfilter der in den Zellversuchen eindeutig beobachtete Effekt *in vivo* durch Zunahme anderer Mechanismen überlagert wird. Der Zeitpunkt der Organentnahme nach 21 Tagen Hyperglykämie wurde ursprünglich gewählt, um zum einen toxische Effekte, die nach der STZ-Injektion auftraten nicht mehr allzu deutlich abzubilden, aber um den akuten Mechanismus der Endozytose zu untersuchen, den wir noch vor den frühen Effekten des Podozytenverlusts vermuteten. In Folgestudien mit ähnlichem Versuchsaufbau würde sich daher also eine Untersuchung weiterer, früherer Zeitpunkte empfehlen. Zudem ist die Sklerosierung der glomerulären Kapillaren zwar insbesondere ein terminaler Effekt, doch auch in Frühstadien zu beobachten. Eine Verengung der Kapillaren durch beginnende Glomerulosklerose, im Rahmen der hyperglykämischen Schädigung, verringert entsprechend die Erreichbarkeit der Glomeruli für die verwendeten Dynabeads während der Perfusion. Gezielt wurde ein Zeitpunkt für die Versuche gewählt in der die Sklerosierung noch eine untergeordnete Rolle spielt, dennoch können kleinere Verzerrungen der Ergebnisse bei der Proteinquantifizierung durch diesen Effekt bestehen. [60]

IV.2.5 *beta*-Arrestin-1 Expression

Aufgrund der unerwarteten Divergenz der Ergebnisse aus den Endozytoseassays, wurde auf der Suche nach einem möglichen Erklärungsansatz die Expression des *beta*-Arrestin-1 Gens untersucht, das für das Protein β -Arrestin-1 codiert. β -Arrestin-1 und -2 sind die einzigen Mitglieder der Arrestin-Familie, die ubiquitär exprimiert werden [42]. Zudem sind sie beide bekannt dafür eine Clathrin-vermittelte Endozytose von membranständigen Proteinen zu steuern [43]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten und der damit denkbaren kompensatorischen Übernahme der Funktionen von β -Arrestin-2 wurde hier geprüft, welchen Einfluss der Knockout von *beta*-Arrestin-2 auf die *beta*-Arrestin-2 Expression in den Mäusen hat.

Bei den C57BL/6 Mäusen zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Tieren einer Gruppe (Knockout oder Wildtyp) an Tag 0 und 21. Die Hyperglykämie bewirkt also keinen Expressionsunterschied. Vergleicht man Wildtyp und Knockout sieht man bei den gesunden Tieren (Tag 0) eine signifikant niedrigere Expression von *beta*-Arrestin-1 bei den *beta*-Arrestin-2 Knockouttieren im Vergleich zum Wildtyp. Bei den entsprechenden Gruppen nach 21 Tagen Hyperglykämie zeigt sich der gleiche, hier aber nur tendentiell sichtbare Effekt. Bei C57BL/6 Tieren scheint es also durch noch unbekannte Mechanismen der *beta*-Arrestin-2 Knockout auch zu einer verringerten Expression von *beta*-Arrestin-1 zu führen.

Entsprechend eines weiteren Unterschieds zwischen den verwendeten Mausinzuchtstämmen zeigen die FVB Tiere einen gegenteiligen Effekt. Bei den FVB Tieren besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Expression von *beta-Arrestin-1* in Abhängigkeit von der Hyperglykämie. Hier zeigen die Knockouttiere allerdings eine tendenziell höhere *beta-Arrestin-1* Expression im Vergleich zum Wildtyp zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Diese Beobachtungen lassen Überlegungen zur kompensatorischen Übernahme der Funktionen von β -Arrestin-2 durch β -Arrestin-1 auf diesem Hintergrund zu, welche die unerwartete erhöhte Nephriendozytose der FVB Tiere mit Knockout des *beta-Arrestin-2* Gens erklären könnte. Bei fehlender Signifikanz dieser Ergebnisse lässt sich letztlich aber keine abschließende Aussage hierzu treffen.

IV.2.6 Unterschiede der untersuchten Mauslinien als Eignung für ein Modell der diabetischen Nephropathie

Das Mausmodell ist in der Grundlagen- und Therapieforchung proteinurischer Krankheitsbilder, wie der diabetischen Nephropathie, aufgrund der guten Verfügbarkeit, der kurzen Reproduktionszeit der Tiere, der vielen verfügbaren Knockouts und der Vielzahl an Schädigungsmodellen ein anerkanntes, häufig verwendetes Modell. Das Mausmodell ist so gut geeignet, um in der Zellkultur untersuchte Effekte erstmals *in vivo* bei Säugetieren zu untersuchen und deren Relevanz einzuordnen. Wichtig ist dafür auch die Wahl des geeigneten Stamms, insbesondere bei nephrologischen Erkrankungen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse jedoch müssen dabei die Grenzen des Modells, die Übertragbarkeit auf den Menschen und die Eigenarten des verwendeten Mausstammes miteinbezogen werden. Überlegungen zur Eignung und zu Unterschieden der verwendeten Mausmodelle finden sich im Folgenden.

Es wurden Tiere auf zwei verschiedenen genetischen Hintergründen untersucht, da diese rassespezifisch unterschiedliche Eigenschaften im Bezug auf ihre Eignung für ein Tiermodell der diabetischen Nephropathie mitbringen. Die beiden Mauslinien unterscheiden sich also vor allem darin, dass bei den C57BL/6 Tieren das Schädigungsmodell der Hyperglykämie leichter induzierbar ist, daher werden diese Tiere häufig in der Diabetesforschung eingesetzt. In der nephrologischen Forschung werden aufgrund ihrer Sensibilität für proteinurische Nierenerkrankungen besonders FVB Mäuse eingesetzt. Für die Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie als Schnittstelle beider Forschungsrichtungen haben wir uns daher für die Durchführung der Untersuchungen an beiden Stämmen entschieden, da ein allumfassendes Mausmodell der diabetischen Nephropathie fehlt [88]. Die C57BL/6 Mäuse werden häufig in Mausmodellen des Diabetes mellitus verwendet, da sich bei ihnen durch Streptozotocininjektion einfach eine stabile Hyperglykämie erzeugen lässt. Allerdings zeigt dieser Stamm eine relative Resistenz gegenüber Nierenschädigungen [79]. Daher wurden aufgrund der vielversprechenden Tendenz zu verringerter Albuminurie und Nephriendozytose unter Hyperglykämie bei *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen des C57BL/6 Inzuchtstammes die Versuche an Tiere des FVB Stammes wiederholt, die als empfindlich für

proteinurische Nierenerkrankungen gelten. So entwickeln einige, vor allem weibliche Mäuse dieses Genotyps eine spontane Albuminurie im Alter [80]. Es gibt eine deutliche Varianz der diabetogenen Wirkung von STZ zwischen den verschiedenen Mausstämmen [78, 83, 89], sie scheint bei FVB Tieren weniger ausgeprägt als bei den C57BL/6 Tieren. Bei den Versuchen an FVB Tieren beobachteten wir ebenfalls eine Tendenz zur verringerten Albuminurie unter STZ-induzierter Hyperglykämie bei den Knockoutmäusen bei jedoch überraschenderweise eher erhöhter Nephriendozytose, welcher sich eventuell durch unterschiedliche kompensatorische Expressionsunterschiede von *beta-Arrestin-1* erklären lassen.

Der Einfluss der ethnischen Herkunft auf die Sensibilität oder relative Resistenz für bestimmte Krankheitsbilder ist ein bekanntes Phänomen, welches auch beim Menschen für die diabetische Nephropathie und andere proteinurische Krankheitsbilder beobachtet wurde. [90, 91]. Auch wenn die ethnische Herkunft für die Sensibilität für renale Erkrankungen beim Menschen wichtig ist, scheint dies aber für die Spezies Maus noch bedeutsamer zu sein, denn man beobachtete, dass der genetische Hintergrund des verwendeten Mausstamms entscheidender für das Ausmaß der renalen Schädigung zu sein scheint als Höhe des Blutzuckerspiegels. [92]. Die Problematik bei der Übertragbarkeit des Mausmodells auf den Menschen bestätigt sich unter anderem in der Identifizierung mehrerer monogenetischer Mutationen, die im Mausmodell mit einer deutlichen Progression der diabetischen Nephropathie einhergingen, ohne dass man diese auf den Menschen übertragen konnte. [88] Darüberhinaus finden sich zwar die typischen Akuteffekte, wie Albuminurie und einige aber längst nicht alle histologischen Pathologien in Mäusen. Die für den Menschen relevante terminale Niereninsuffizienz wird aber bei Mäusen und Ratten durch eine diabetische Nephropathie nicht erreicht [83].

Da so diverse Mausmodelle im Rahmen der Diabetes mellitus Forschung für unterschiedliche Untersuchungszwecke existieren, ist die Vergleichbarkeit der Modelle und die Wahl des für das eigene Versuchsvorhaben geeignete Modell besonders der Komplikationsmodelle oft erschwert. Daher versucht die Arbeitsgruppe *Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (AMDCC) die Anwendbarkeit der Modelle zu objektivieren und einheitliche Kriterien aufzustellen. Eines der 2009 postulierten Forschungskriterien zur Validierung des verwendeten Mausmodells als Modell einer diabetischen Nephropathie ist ein 10-facher Anstieg der Albuminurie im Vergleich zu Kontrollen des gleichen Stamms, Alters und Geschlechts. [88] Gemäß dieses Kriteriums wurden die erhobenen Mittelwerte zu den unterschiedlichen erhobenen Zeitpunkten nach Induktion der Hyperglykämie mit dem Mittelwert der Gruppe vor Versuchsbeginn verglichen und bei den Knockoutmäusen zusätzlich mit dem Ausgangswert des Wildtyps. Die Tabellen 4.1 und 4.2 zeigen die Mittelwerte zu den verschiedenen Zeitpunkten und den Faktor des Anstiegs der Albuminausscheidung der Versuchsgruppen.

Albuminausscheidung (ACR) der Versuchstiere auf C57BL/6 Hintergrund

Wildtyp (WT)			<i>beta-Arrestin-2</i> Knockout		
Zeitpunkt	Mittelwert ACR (mg Albumin/g Kreatinin)	Faktor Anstieg	Zeitpunkt	Mittelwert ACR (mg Albumin/g Kreatinin)	Faktor Anstieg (im Vgl zum WT)
Tag 0	8,075		Tag 0	11,66	(1,44)
Tag 7	39,92	4,94	Tag 7	35,65	3,06 (4,41)
Tag 14	45,75	5,67	Tag 14	52,56	4,51 (6,51)
Tag 21	57,94	7,18	Tag 21	46,51	3,99 (5,76)

Tabelle 4.1. Mittelwerte der Albuminausscheidung (ACR) der C57BL/6 Mäuse mit und ohne *beta-Arrestin-2* Knockout, sowie der Faktor des Anstiegs nach STZ-induzierter Hyperglykämie.

Der Faktor des Anstiegs wurde berechnet als Quotient des gewählten untersuchten Zeitpunkts nach Induktion der Hyperglykämie (Tag 7-21) durch den erhobenen Ausgangswert der Gruppe (Tag 0). Bei den Knockoutmäusen ist zusätzlich in Klammern der Quotient zum Ausgangswert des Wildtyps angegeben. (*mg=Milligramm, g=Gramm*)

Albuminausscheidung (ACR) der Versuchstiere auf FVB Hintergrund

Wildtyp			<i>beta-Arrestin-2</i> Knockout		
Zeitpunkt	Mittelwert ACR (mg Albumin/g Kreatinin)	Faktor Anstieg	Zeitpunkt	Mittelwert ACR (mg Albumin/g Kreatinin)	Faktor Anstieg (im Vgl zum WT)
Tag 0	19,22		Tag 0	21,13	(1,09)
Tag 7	494,9	25,75	Tag 7	240,4	11,38 (12,51)
Tag 14	479,5	24,95	Tag 14	433,9	20,53 (22,56)
Tag 21	603,2	31,38	Tag 21	319,9	15,14 (16,64)

Tabelle 4.2. Mittelwerte der Albuminausscheidung (ACR) der FVB Mäuse mit und ohne *beta-Arrestin-2* Knockout, sowie der Faktor des Anstiegs nach STZ-induzierter Hyperglykämie.

Der Faktor des Anstiegs wurde berechnet als Quotient des gewählten untersuchten Zeitpunkts nach Induktion der Hyperglykämie (Tag 7-21) durch den erhobenen Ausgangswert der Gruppe (Tag 0). Bei den Knockoutmäusen ist zusätzlich in Klammern der Quotient zum Ausgangswert des Wildtyps angegeben. (*mg=Milligramm, g=Gramm*)

Bei den C57BL/6 Versuchstieren konnte die benötigte Erhöhung der ACR um das 10 fache der Kontrolle nicht erreicht werden (Tabelle 4.1), was die Einschätzung dieses Stammes als relativ resistent für proteinurische Nierenerkrankungen bestätigt. Bei den FVB Tieren wird die gewünschte Steigerung bereits früh erreicht und insbesondere zum Zeitpunkt der Organentnahme deutlich überschritten. Ein früherer Zeitpunkt der Analysen zur Nephro-Endozytose hätte gemäß dieser Auswertung eventuell eher mit den postulierten Kriterien übereingestimmt und einen möglichen Einfluss Überlagerungen durch andere weniger akute Effekte verringert. Dieses Kapitel zeigt deutlich, wie wichtig weitere Forschungen zur Identifizierung eines besseren Mausmodells der

diabetischen Nephropathie insbesondere für die zielgerichtete Ursachen- und Therapieforschung sind.

IV.2.7 Gestörte Glucosetoleranz der C57BL/6 *beta*-Arrestin-2 Knockoutmäuse

Abb. 4.2 Erhobene Ausgangsblutzuckerwerte

Dargestellt sind die Einzelwerte sowie der Mittelwert (Querbalken) und die Fehlerbalken als Standardabweichung vom Mittelwert. (*mg*=Milligramm, *dl*=Deziliter). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

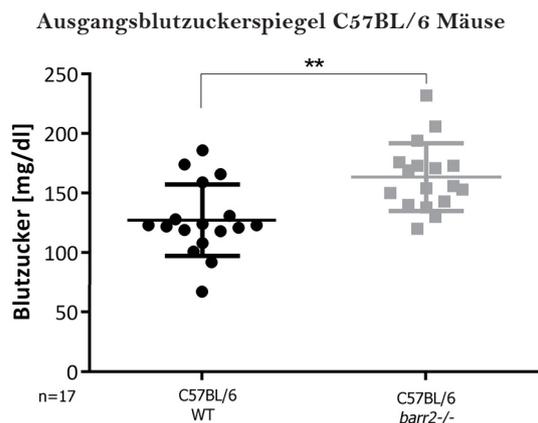


Abb. 4.2a Vergleich des Ausgangsblutzuckerspiegels von C57BL/6 Mäusen mit und ohne *beta*-Arrestin-2 Knockout.

Ausgangsblutzuckerwerte (nicht nüchtern, mg/dl) gesunder Wildtypiere (WT, schwarz, n=17) und *beta*-Arrestin-2 Knockout Mäuse (*barr2* ^{-/-}, grau, n=17) auf C57BL/6 Hintergrund im Alter von 9-18 Wochen. Es zeigt sich ein signifikanter Blutzuckerunterschied (**) der beiden Gruppen (p=0,001).

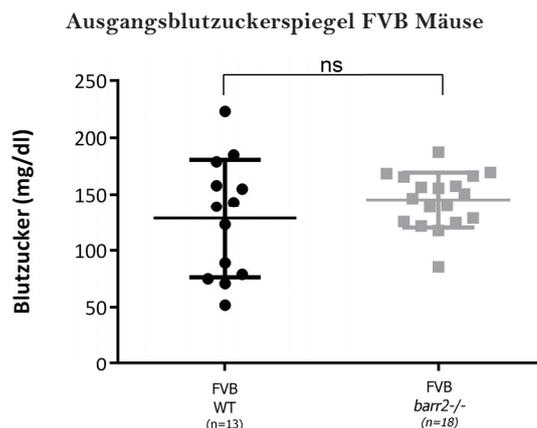


Abb. 4.2b Vergleich des Ausgangsblutzuckerspiegels von FVB Mäusen mit und ohne *beta*-Arrestin-2 Knockout.

Ausgangsblutzuckerwerte (nicht nüchtern, mg/dl) gesunder Wildtypiere (WT, schwarz, n=13) und *beta*-Arrestin-2 Knockout Mäuse (*barr2* ^{-/-}, grau, n=18) auf FVB Hintergrund im Alter von 9-18 Wochen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Blutzuckerspiegel (ns) der beiden Gruppen (p=0,3151).

In der Zusammenfassung des Blutzuckerungsverlaufs fällt ein signifikant höherer Blutzuckerspiegel der C57BL/6 *beta*-Arrestin-2 Knockoutmäuse an Tag 0 auf, also vor der STZ Injektion. Andere Arbeitsgruppen, welche die Rolle von β -Arrestin 2 in den β -Zellen des Pankreas untersuchten, beobachteten ebenfalls eine gestörte Glukosetoleranz von *beta*-Arrestin-2 Knockoutmäusen auf C57BL/6 Hintergrund [86]. Das ubiquitär vorkommende Protein β -Arrestin 2 spielt eine zentrale Rolle in der Funktion der β -Zellen [93]: Zhu et al. zeigten, dass es bei C57BL/6 *beta*-Arrestin-2 Knockoutmäusen zu einer reduzierten Insulinausschüttung und Glucosetoleranz unter physiologischen und pathologischen Bedingungen kommt. Abb 4.2 zeigt eine vergrößerte Darstellung der in dieser Arbeit erhobenen Ausgangsblutzuckerwerte.

Parallel zur bekannten weniger ausgeprägten diabetogenen Wirkung von von STZ auf FVB Mäuse [78, 83, 89] konnte bei *beta*-Arrestin-2 Knockouttieren dieses Hintergrunds in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied der Blutzuckerspiegel im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die zitierten Studien behandelten stets Tiere des C56BL/6 Hintergrundes, sodass die Vermutung besteht, dass die stammspezifischen Glucosestoffwechselunterschiede der Linien so deutlich sind,

dass es unter den physiologischen Ausgangsbedingungen nicht zu einem signifikanten Unterschied durch *beta-Arrestin-2* Knockout auf FVB Hintergrund kommt.

Abb. 4.3 Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) vor Versuchsbeginn

Die Einzelwerte, sowie der Mittelwert (Querbalken) und die Fehlerbalken als Standardabweichung vom Mittelwert sind dargestellt. (*mg=Milligramm, g= Gramm*). Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

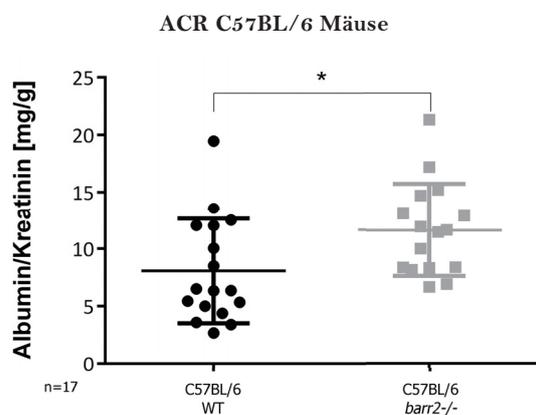


Abb. 4.3a Vergleich der Ausgangs-ACR von C57BL/6 Mäusen mit und ohne *beta-Arrestin-2* Knockout.

Ausgangs-Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR, mg Albumin/g Kreatinin) gesunder Wildtypiere (WT, schwarz, n=17) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau, n=16) auf C57BL/6 Hintergrund im Alter von 9-18 Wochen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Albuminausscheidung (*) zwischen den beiden Gruppen (p= 0,0224).

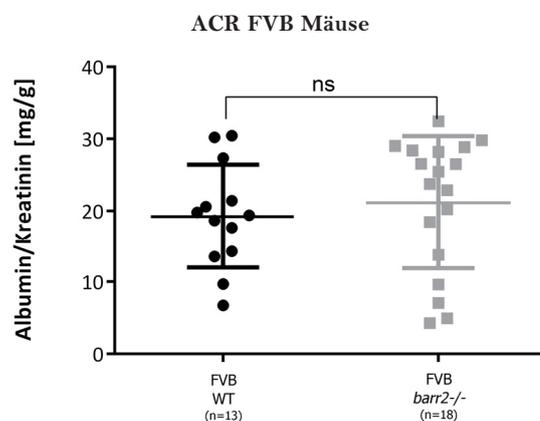


Abb. 4.3b Vergleich der Ausgangs-ACR von FVB Mäusen mit und ohne *beta-Arrestin-2* Knockout.

Ausgangs-Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR, mg Albumin/g Kreatinin) gesunder Wildtypiere (WT, schwarz, n=13) und *beta-Arrestin-2* Knockout Mäuse (*barr2*^{-/-}, grau, n=18) auf FVB im Alter von 9-18 Wochen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Albuminausscheidung (ns) zwischen den beiden Gruppen (p= 0,5233).

Diese Beobachtungen setzen sich bei der Analyse der Urin-Albumin-Konzentration zu diesem Zeitpunkt (Tag 0) fort. Die Albuminausscheidung als Albumin-Kreatinin-Ratio ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse zeigen analog zum erhöhten Blutzuckerlevel eine signifikant erhöhte Albuminurie, welche sich bei den FVB Mäusen (die auch keinen erhöhten Blutzucker hatten) nicht zeigte. Es lässt sich also vermuten, dass bei den C57BL/6 Knockoutmäusen, bei denen durch die Stammeigenschaften in Kombination mit dem *beta-Arrestin-2* Knockout eine Glucosetoleranzstörung besteht, es bereits durch den erhöhten Blutzuckerspiegel zu einer Schädigung des renalen Filters mit erhöhter Proteindurchlässigkeit gekommen ist.

Aufgrund dieser Beobachtungen zur gestörten Glukosetoleranz und zur parallel erhöhten Albuminausscheidung der unbehandelten C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse wurde ein Nephrin-Endozytoseassay bei unbehandelten Tieren durchgeführt, um mögliche Effekte dieser Beobachtung auf die Nephrin-Endozytose zu untersuchen. Bei 14 Wochen alten, männlichen Tiere wurden dafür ohne vorherige STZ-Injektion Nieren wie beschrieben perfundiert und für das Assay entnommen. Abbildung 4.4 zeigt in einer Gegenüberstellung die Ergebnisse der Quantifizierung des Nephringehalts an der Oberfläche der Podozyten als Maß für die Nephrin-Endozytose in den Glomeruli unbehandelter FVB und C57BL/6 Wildtyp- und Knockoutmäuse.

Abb. 4.4 Nephrin-Endozytose bei unbehandelten Tieren

Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der Nephrin-Endozytoseassays.
Angewandter statistischer Test: ungepaarter t-Tests mit Welch-Korrektur.

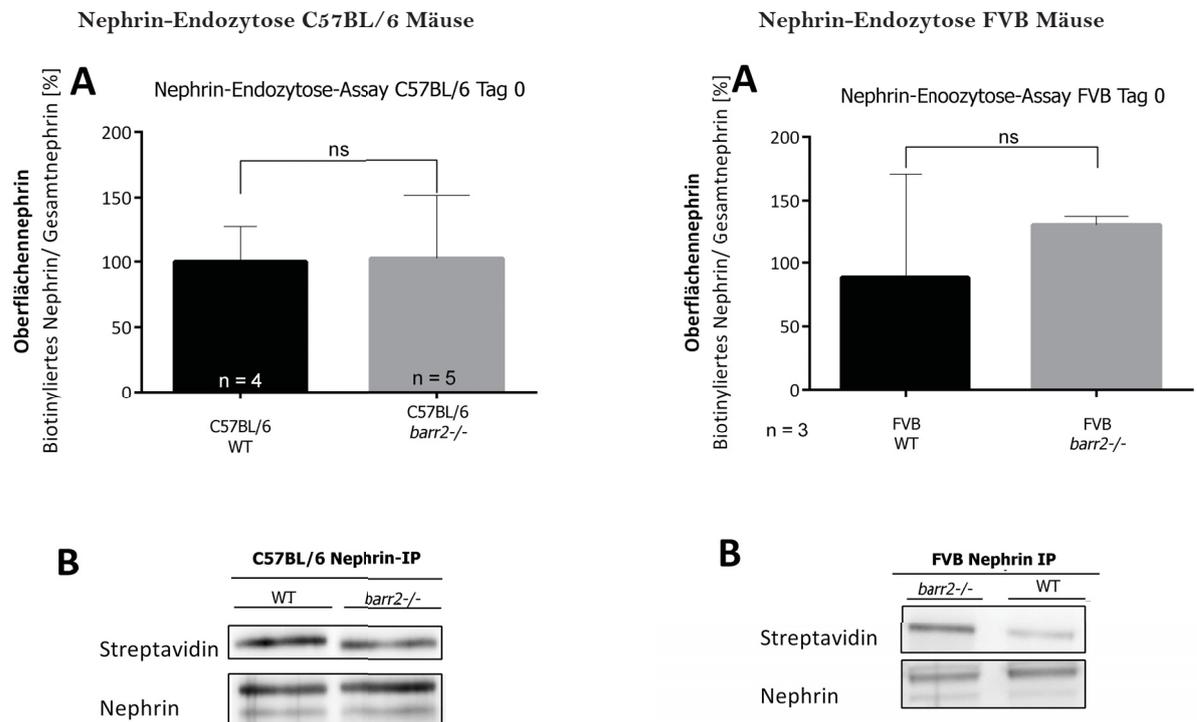


Abb.4.4a Quantifizierung des Schlitzmembranproteins Nephrin in unbehandelten Mausnieren von C57BL/6 Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen

A Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der Nephrin-Endozytoseassays, durchgeführt an perfundierten Nieren von 14 Wochen alten unbehandelten, männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}, grau, n=5), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT, schwarz, n = 4). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns, p = 0,9139) der Endozytose als prozentueller Anteil des Oberflächennephrins am Gesamtnephringehalt. Dargestellt sind der Mittelwert sowie die Fehlerbalken als Standardabweichung. **B** Repräsentativer Westernblot der α -Nephrin-Immünpräzipitationen (IP) aus der in A beschriebenen Versuchsreihe. Oben: Streptavidinfärbung (färbt in vivo Biotin markiertes oberflächenständiges Nephrin) Unten: Nephrin-Antikörperfärbung (Gesamtnephrin der IP).

Abb.4.4b Quantifizierung des Schlitzmembranproteins Nephrin in unbehandelten Mausnieren von FVB Wildtyp und *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen

A Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertungen der Nephrin-Endozytoseassays, durchgeführt an perfundierten Nieren von 14 Wochen alten unbehandelten, männlichen Knockouttieren (*barr2*^{-/-}, grau, n=3), im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (WT, schwarz, n = 3). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns, p = 0,4665) der Endozytose als prozentueller Anteil des Oberflächennephrins am Gesamtnephringehalt. Dargestellt sind der Mittelwert, sowie die Fehlerbalken als Standardabweichung. **B** Repräsentativer Westernblot der α -Nephrin-Immünpräzipitationen (IP) aus der in A beschriebenen Versuchsreihe. Oben: Streptavidinfärbung (färbt in vivo Biotin markiertes oberflächenständiges Nephrin) Unten: Nephrin-Antikörperfärbung (Gesamtnephrin der IP).

In den Nephrin-Endozytoseassays der unbehandelten Tiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Oberflächennephringehalts zwischen Wildtyp- und Knockouttieren der beiden Linien. Bei den 4 untersuchten C57BL/6 Wildtypnieren betrug der normierte Mittelwert 100% (SD 27,13%). Sie unterschieden sich nach Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur nicht signifikant (p=0,9139) von den 5 untersuchten Knockouttieren und ihrer mittleren Oberflächennephringehalt von 102,9 % (SD 48,12%). Gemäß des Modells der β -Arrestin-2

vermittelten hyperglykämieinduzierten Nephrin-Endozytose ist also nicht davon auszugehen, dass die Nierenschädigung, die sich bei den C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen aufgrund ihrer gestörten Glucosetoleranz zeigt, führend über diesen Signalweg abläuft.

Bei den FVB Tieren zeigen die Wildtypiere normiert einen Mittelwert des Oberflächennephrens von 100% (SD 93,02%) und die Knockouttiere einen Mittelwert von 147,9% (SD 7,635 %). Der Oberflächennephringehalt der beiden Gruppen unterscheidet sich nach Anwendung des ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur nicht signifikant ($p=0,4665$). Allerdings sieht man eine Tendenz der unbehandelten FVB Knockouttiere zu mehr Oberflächennephrin. Dies reiht sich ein in die Beobachtung, dass die Tiere auch keine erhöhten Blutglukosewerte und keine Nierenschädigung in Form einer erhöhten Albuminurie im Vergleich zu ihren Wildtyp zeigten.

Während die Nephriendozytose der unbehandelten C57BL/6 Tiere im Vergleich zum Knockout annähernd gleich scheint, zeigt sich nach 21 Tagen Hyperglyämie zu Versuchsbeginn eine tendenziell geringere Endozytose der *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse. Bei den FVB Tieren kehrt sich der bei den unbehandelten Tiere beobachtete Effekt um: die unbehandelten Knockouts zeigten tendenziell mehr Oberflächennephrin, nach 21 Tagen Hyperglykämie zeigen sie tendenziell weniger Oberflächennephrin als der Wildtyp. Da keines der Ergebnisse signifikant ist, sollen diese Ergebnisse nicht überbewertet werden. Aber es zeigt sich, dass die beiden Stämme sich deutlich in den Parametern der diabetischen Nephropathie unterscheiden (ACR; Blutzucker) und auch unterschiedliche Ausprägung dieser Parameter durch *beta-Arrestin-2* Knockout zeigen. Für die Funktion der β -Zellen konnte bereits ein Unterscheid zwischen *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen und Wildtyp bei C57BL/6 Mäusen gezeigt werden, dessen Ergebnis beim FVB Stamm nicht beobachtet wurden. Hier könnte anhand der divergierenden Endozytoseergebnisse vermutet werden, dass es parallele Unterschiede der Ausprägungen der Effekte des *beta-Arrestin-2* Knockouts auch in anderen Organstrukturen, wie der glomerulären Schlitzmembran gibt. Die beiden Mauslinien bilden jeweils unterschiedliche Parameter der untersuchten Krankheit in verschiedenem Ausmaß aus, ohne dass einer Linie der Vorzug gegeben werden kann [88]. Zusätzlich scheinen sie, wie dieses Kapitel zeigt, auch unterschiedlich bezüglich der Effekte eines *beta-Arrestin-2* Knockouts auf diese Parameter zu reagieren. Dabei waren die Effekte bei Blutzucker und Albuminurie bei den unbehandelten Tieren signifikant, ohne dass ein signifikanter Effekt im Verlauf der induzierten Hyperglykämie gefunden wurde. So scheinen Effekte des *beta-Arrestin-2* Knockouts vor allem bei unbehandelten Tieren eine Rolle zu spielen und weniger bei den sehr akuten Effekten der Streptozotocin-induzierten Hyperglykämie. Nichtsdestotrotz zeigten die *beta-Arrestin-2* Knockoutmäusen beider Linien eine tendenziell verringerte Albuminausscheidung nach 21 Tagen Hyperglykämie.

Die Familie der Arrestin Scaffoldproteine scheint im Mausmodell eine wichtige Rolle in der Regulation der β -Zellfunktion und den Pathomechanismen der Schlitzmembran zu spielen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung der Ergebnisse der quantitativen *real time* PCR:

Hier zeigten die unbehandelten C57/BL6 *beta-Arrestin-2* Knockouts, die sich bereits in den anderen Parametern vom Wildtyp unterschieden, eine verminderte *beta-Arrestin-1* Expression. Weitere Untersuchungen zur Rolle von β -Arrestin-1 in den bisher für β -Arrestin-2 untersuchten Zusammenhängen (z.B: der β -Zellfunktion) könnten interessante Erkenntnisse in diesem Kontext liefern.

IV.3 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte einer Hemmung von β -Arrestin-2 auf die kurzfristige hyperglykämieinduzierte Schädigung der glomerulären Schlitzmembran durch Endozytose des Grundgerüstproteins Nephrin und damit einhergehender Proteinurie untersucht.

Im Zellkulturmodell ließ sich der vermutete protektive Effekt einer verringerten Nephrinendozytose, durch siRNA vermitteltem Knockdown von β -Arrestin-2, signifikant nachweisen. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden die Untersuchungen im Mausmodell fortgesetzt. Dabei wählten wir STZ- Injektionen zur Induktion einer stabilen kurzfristigen Hyperglykämie um die vor allen kurzfristig auftretenden Endozytoseeffekte untersuchen zu können. Die Organentnahme erfolgte nach 21 Tagen um die insbesondere akut auftretenden STZ-Toxizität zu minimieren. Das folgende Endozytoseassay ermöglichte die Quantifizierung der oberflächenständiger Nephrinmoleküle *in vivo*. Zunächst wurden dabei *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse auf C57BL/6 Hintergrund untersucht. Hierbei zeigte sich eine klare Tendenz zu geringerer Proteinurie und mehr verbleibendem Oberflächennephrin bei den Knockouts ohne Signifikanz. Daher wurden die Versuche bei Tieren auf FVB Hintergrund wiederholt, da diese stammspezifisch vulnerabler für proteinurische Krankheitsbilder sind. Auch hier zeigte sich eine klare Tendenz zur verringerter Proteinurie bei divergierendem Ergebnis der Endozytose. Daher untersuchten wir eine mögliche Kompensation durch Regulation der *beta-Arrestin-1* Expression. Diese zeigte eine tendenziell erhöhte Expression bei den FVB *beta-Arrestin-2* Knockouttieren insbesondere unter Hyperglykämie mit umgekehrter Tendenz bei den entsprechenden C57BL/6 Tieren. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse jedoch keine eindeutige Signifikanz, sodass letztlich keine klare Aussage über die zugrundeliegenden Mechanismen getroffen werden kann. Zudem konnten die bekannten stammspezifischen Unterschiede von FVB und C57BL/6 Mäusen bestätigt und um die Beobachtung ergänzt werden, dass die für die C57BL/6 *beta-Arrestin-2* Knockoutmäuse bekannte Glucosestoffwechselstörung mit erhöhter Albuminurie einhergeht, die bei den Tieren auf FVB Hintergrund nicht besteht. Gerade diese deutlichen stammspezifischen Unterschiede erschweren die Wahl des richtigen Mausmodells für die diabetische Nephropathie.

Die Ergebnisse der Zellversuche bestätigen, dass die β -Arrestin-2 vermittelte Nephrin-Endozytose in Effekten der akuten Nierenschädigung eine wichtige Rolle spielt. In den *in vivo* Untersuchungen legen die divergierenden Endozytose-tendenzen aber nahe, dass sie zum untersuchten Zeitpunkt eine

untergeordnete Rolle für das Gesamtgeschehen am komplexen Nierenfilter zu spielen scheint. In Versuchen mit ähnlichem Aufbau sollten daher eher frühere Zeitpunkte untersucht werden, in denen die gesamt hyperglykämieinduzierte Schädigung des Organismus und die damit einhergehende zunehmende Einfluss verschiedener Pathomechanismen weniger fortgeschritten ist. Zudem ist die Hyperglykämie eine Systemerkrankung, sodass die Nierenschädigung mit einhergehender Proteinurie gleichermaßen an allen drei Schichten des glomerulären Filters stattfindet und so die reinen Endozytoseeffekte überlagert sein könnten. β -Arrestin-2 ist ebenfalls ein ubiquitär vorhandenes systemwirksames Protein, dessen kompletter Knockout sich so auch außerhalb des hier untersuchten Mechanismus auf die Proteinurie auswirken könnte. Nichtsdestotrotz ist die Forschung zur Beteiligung der Familie der Arrestin Scaffoldproteine im Rahmen der hyperglykämieinduzierten Nierenschädigung aktuell, da sie sowohl eine wichtige Rolle in der Regulation der β -Zellfunktion als auch bei den Pathomechanismen der Schlitzmembran zu spielen scheinen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Rossing, P., *Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(6): p. 479-83.
2. Löffler, G.P., P.E.; Heinrich, P.C., *Biochemie & Pathobiochemie*. Vol. 8. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag
3. Herold, G., ed. *Innere Medizin*. 2012, Dr. med. G. Herold: Köln.
4. Lehtovirta, M., et al., *Evidence that BMI and type 2 diabetes share only a minor fraction of genetic variance: a follow-up study of 23,585 monozygotic and dizygotic twins from the Finnish Twin Cohort Study*. Diabetologia, 2010. **53**(7): p. 1314-21.
5. Solomon, T.P., et al., *Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults*. J Appl Physiol (1985), 2008. **104**(5): p. 1313-9.
6. Krentz, A.J., M.B. Patel, and C.J. Bailey, *New drugs for type 2 diabetes mellitus: what is their place in therapy?* Drugs, 2008. **68**(15): p. 2131-62.
7. Bertoni, A.G., et al., *Diabetes-related morbidity and mortality in a national sample of U.S. elders*. Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 471-5.
8. Lachin, J.M., et al., *Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited*. Diabetes, 2008. **57**(4): p. 995-1001.
9. Frei, U.S.-H., H.J., *Nierenersatztherapie in Deutschland*, in *QuaSi- Niere Jahresbericht 2006/2007* 2008: Berlin.
10. Writing Team for the Diabetes, C., I. Complications Trial/Epidemiology of Diabetes, and G. Complications Research, *Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study*. JAMA, 2003. **290**(16): p. 2159-67.
11. Group, D.E.R., et al., *Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes*. N Engl J Med, 2011. **365**(25): p. 2366-76.
12. Molitch, M.E., et al., *Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study*. Diabetes Care, 2010. **33**(7): p. 1536-43.
13. Adler, A.I., et al., *Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64)*. Kidney Int, 2003. **63**(1): p. 225-32.
14. Retnakaran, R., et al., *Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1832-9.
15. American Diabetes, A., *Standards of medical care in diabetes--2011*. Diabetes Care, 2011. **34** **Suppl 1**: p. S11-61.
16. Fisher, E.B., et al., *Healthy coping, negative emotions, and diabetes management: a systematic review and appraisal*. Diabetes Educ, 2007. **33**(6): p. 1080-103; discussion 1104-6.
17. Mogensen, C.E. and C.K. Christensen, *Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients*. N Engl J Med, 1984. **311**(2): p. 89-93.
18. Schmidt, R.F.L., F.; Heckmann, M., *Physiologie des Menschen*. Vol. 29. 2005: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
19. Hudson, B.G., S.T. Reeders, and K. Tryggvason, *Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26033-6.
20. Pavenstadt, H., *The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes*. Exp Nephrol, 1998. **6**(2): p. 98-103.
21. Rodewald, R. and M.J. Karnovsky, *Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse*. J Cell Biol, 1974. **60**(2): p. 423-33.

22. Caulfield, J.P. and M.G. Farquhar, *Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes: their possible role in filtration and attachment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(5): p. 1646-50.
23. Drumond, M.C. and W.M. Deen, *Stokes flow through a row of cylinders between parallel walls: model for the glomerular slit diaphragm*. J Biomech Eng, 1994. **116**(2): p. 184-9.
24. Tryggvason, K., J. Patrakka, and J. Wartiovaara, *Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria*. N Engl J Med, 2006. **354**(13): p. 1387-401.
25. Peterson, J.C., et al., *Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study*. Ann Intern Med, 1995. **123**(10): p. 754-62.
26. Ruotsalainen, V., et al., *Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7962-7.
27. Tryggvason, K., V. Ruotsalainen, and J. Wartiovaara, *Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(5): p. 445-51.
28. Lenkkeri, U., et al., *Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(1): p. 51-61.
29. Kestila, M., et al., *Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 575-82.
30. Putaala, H., et al., *The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(1): p. 1-8.
31. Tryggvason, K., *Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(11): p. 2440-5.
32. Gerke, P., et al., *Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(4): p. 918-26.
33. Khoshnoodi, J., et al., *Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions*. Am J Pathol, 2003. **163**(6): p. 2337-46.
34. Holthofer, H., et al., *Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney*. Am J Pathol, 1999. **155**(5): p. 1681-7.
35. Boute, N., et al., *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 349-54.
36. Schwarz, K., et al., *Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin*. J Clin Invest, 2001. **108**(11): p. 1621-9.
37. Huber, T.B., et al., *Interaction with podocin facilitates nephrin signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41543-6.
38. Huber, T.B., et al., *Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(24): p. 3397-405.
39. Hall, R.A., et al., *G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24328-34.
40. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14498-506.
41. Hall, R.A. and R.J. Lefkowitz, *Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins*. Circ Res, 2002. **91**(8): p. 672-80.
42. Tohgo, A., et al., *beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9429-36.
43. Lefkowitz, R.J., et al., *G-protein-coupled receptors: regulatory role of receptor kinases and arrestin proteins*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1992. **57**: p. 127-33.

44. Claing, A., et al., *beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42509-13.
45. Chen, W., et al., *Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1394-7.
46. Li, H., et al., *SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3006-15.
47. Verma, R., et al., *Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20716-23.
48. Lahdenpera, J., et al., *Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases*. Kidney Int, 2003. **64**(2): p. 404-13.
49. Cen, B., et al., *Direct and differential interaction of beta-arrestins with the intracellular domains of different opioid receptors*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(4): p. 758-64.
50. Quack, I., et al., *beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14110-5.
51. Ziyadeh, F.N. and G. Wolf, *Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy*. Curr Diabetes Rev, 2008. **4**(1): p. 39-45.
52. Doublier, S., et al., *Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II*. Diabetes, 2003. **52**(4): p. 1023-30.
53. Kim, J.J., et al., *Differential expression of nephrin according to glomerular size in early diabetic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(8): p. 2303-10.
54. Koop, K., et al., *Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8): p. 2063-71.
55. Menne, J., et al., *Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in-vivo*. Kidney Int, 2006. **70**(8): p. 1456-62.
56. Meier, M., J. Menne, and H. Haller, *Targeting the protein kinase C family in the diabetic kidney: lessons from analysis of mutant mice*. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 765-75.
57. Axelsson, J., A. Rippe, and B. Rippe, *Transient and sustained increases in glomerular permeability following ANP infusion in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(1): p. F24-30.
58. Quack, I., et al., *PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 12959-70.
59. Wolfe, B.L. and J. Trejo, *Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis*. Traffic, 2007. **8**(5): p. 462-70.
60. Haase, R., et al., *A novel in vivo method to quantify slit diaphragm protein abundance in murine proteinuric kidney disease*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179217.
61. Bohn, L.M., et al., *Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2495-8.
62. Veitch, N.C., *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. Phytochemistry, 2004. **65**(3): p. 249-59.
63. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
64. Robinson, R., *RNAi therapeutics: how likely, how soon?* PLoS Biol, 2004. **2**(1): p. E28.
65. Mülhardt, C., *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. Der Experimentator. Vol. 7. 2013: Springer Spektrum.
66. Like, A.A. and A.A. Rossini, *Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus*. Science, 1976. **193**(4251): p. 415-7.
67. Deeds, M.C., et al., *Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models*. Lab Anim, 2011. **45**(3): p. 131-40.
68. Rakieten, N., M.L. Rakieten, and M.V. Nadkarni, *Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)*. Cancer Chemother Rep, 1963. **29**: p. 91-8.
69. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.

70. Srinivasan, K. and P. Ramarao, *Animal models in type 2 diabetes research: an overview*. Indian J Med Res, 2007. **125**(3): p. 451-72.
71. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
72. Imaeda, A., et al., *Antioxidative effects of fluvastatin and its metabolites against DNA damage in streptozotocin-treated mice*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(10): p. 1415-22.
73. Wang, Z. and H. Gleichmann, *GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice*. Diabetes, 1998. **47**(1): p. 50-6.
74. Gurley, S.B., et al., *Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(1): p. F214-22.
75. Potthoff, S.A., et al., *The glomerular proteome in a model of chronic kidney disease*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(7-8): p. 1127-39.
76. Liu, X., et al., *Isolating glomeruli from mice: A practical approach for beginners*. Exp Ther Med, 2013. **5**(5): p. 1322-1326.
77. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
78. Rossini, A.A., et al., *Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia*. Diabetes, 1977. **26**(10): p. 916-20.
79. Ma, L.J. and A.B. Fogo, *Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 350-5.
80. Maier, S.M., et al., *Proteinuria of nonautoimmune origin in wild-type FVB/NJ mice*. Comp Med, 2007. **57**(3): p. 255-66.
81. Ahn, S., et al., *Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7807-11.
82. Rees, D.A. and J.C. Alcolado, *Animal models of diabetes mellitus*. Diabet Med, 2005. **22**(4): p. 359-70.
83. Breyer, M.D., et al., *Mouse models of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(1): p. 27-45.
84. Lubec, B., et al., *Aromatic hydroxylation in animal models of diabetes mellitus*. FASEB J, 1998. **12**(14): p. 1581-7.
85. Palm, F., et al., *Differentiating between effects of streptozotocin per se and subsequent hyperglycemia on renal function and metabolism in the streptozotocin-diabetic rat model*. Diabetes Metab Res Rev, 2004. **20**(6): p. 452-9.
86. Ravier, M.A., et al., *beta-Arrestin2 plays a key role in the modulation of the pancreatic beta cell mass in mice*. Diabetologia, 2014. **57**(3): p. 532-41.
87. Tesch, G.H. and D.J. Nikolic-Paterson, *Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy*. Nephron Exp Nephrol, 2006. **104**(2): p. e57-62.
88. Brosius, F.C., 3rd, et al., *Mouse models of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(12): p. 2503-12.
89. Hayashi, K., R. Kojima, and M. Ito, *Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(6): p. 1110-9.
90. Iyengar, S.K., et al., *Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations: the family investigation of nephropathy and diabetes (FIND)*. Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1577-85.
91. Seaquist, E.R., et al., *Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy*. N Engl J Med, 1989. **320**(18): p. 1161-5.
92. Zheng, F., et al., *Strain differences rather than hyperglycemia determine the severity of glomerulosclerosis in mice*. Kidney Int, 1998. **54**(6): p. 1999-2007.
93. Zhu, L., et al., *beta-arrestin-2 is an essential regulator of pancreatic beta-cell function under physiological and pathophysiological conditions*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14295.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. I. Quack für die freundliche Überlassung dieser Dissertation und die kundige und warmherzige Betreuung bedanken. Seine ansteckende Begeisterung für seine Lieblingszelle - den Podozyten - hat mein Interesse für die Forschung am glomerulären Filter geweckt.

Ich danke Frau Dr. med. Magdalena Woznowski für die engagierte Mitbetreuung dieses Projekts, insbesondere bei der Planung und Betreuung der Experimente und der Diskussion schwieriger Ergebnisse. Ihr scheinbar nie endender Optimismus war mir eine große Motivation.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Raphael Haase für seine Unterstützung, Beratung und Anleitung. Seine ausführlichen Erläuterungen und seine Bereitschaft jedes Detail mit mir zu diskutieren haben meinen Blick für wissenschaftliche Fragen geschult und mich für das experimentelle Arbeiten nachhaltig begeistert. Unser Team hat mir gezeigt, wie sehr interdisziplinäre Zusammenarbeit eine Arbeitsgruppe bereichern kann.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Christina Schwandt, Frau Nicola Kuhr und insbesondere bei Frau Blanka Duvnjak bedanken, dass sie in all dem Trubel stets ein offenes Ohr und eine helfende Hand hatten, um mich bei den großen und kleinen Problemen des Laboralltags zu unterstützen. Und natürlich gilt mein Dank auch meinen Mitdoktoranden, für die großartige Stimmung im Labor und dass wir uns auch außerhalb nicht aus den Augen verloren haben.

Um dieses langwierige Projekt durchzuhalten, bin ich auch von vielen Menschen außerhalb meiner eigentlichen Arbeitsgruppe unterstützt worden. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle danken. Dies gilt besonders für meine große, wundervolle Familie und meine lieben, langjährigen Freunde fürs Zuhören, Motivieren, Ablenken und an mich Glauben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, für ihr unendliches Vertrauen in meine Fähigkeiten und Entscheidungen, sowie ihre bedingungslose Unterstützung in allen Bereichen.

Anhang

Bildrechte für reproduzierte Abbildungen

Abb. I.1.:

Reproduced with permission from Trygvasson, Copyright Massachusetts Medical Society.
Laut. nejm.org, 28.06.2017 ist die Reproduktion der Bilder im Rahmen einer Dissertation auch ohne formale Erlaubnis unter Angabe der hinzugefügten *credit line* zulässig.

Abb. I.2.:

Reproduced with permission from Trygvasson, Copyright Massachusetts Medical Society.
Laut. nejm.org, 28.06.2017 ist die Reproduktion der Bilder im Rahmen einer Dissertation auch ohne formale Erlaubnis unter Angabe der hinzugefügten *credit line* zulässig.

Abb. I.3.:

Reproduktion mit freundlicher Genehmigung von Quack et al und PNAS. Laut PNAS.org, 29.06.2017 liegt für diese Auflage das Copyright des Artikels beim Autor selbst, eine schriftliche Erlaubnis zur Reproduktion des Autors liegt vor.

Abb. I.4.:

Reproduktion mit freundlicher Genehmigung des *Journal of Biological Chemistry*, dass laut seiner Homepage jbc.org, 29.06.2017 eine Nutzung für nichtkommerzielle Zwecke erlaubt.

Abb. II.3.:

Eine schriftliche Genehmigung von *Spandidos Publications* vom 04.07.2017 zur Reproduktion im Rahmen dieser nichtkommerziellen Dissertation liegt vor.