

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

GLEPP1 moduliert die Zusammensetzung
der glomerulären Basalmembran

Dissertation

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

vorgelegt von
Laura Lennartz
(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. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Das glomeruläre epitheliale Protein 1 (GLEPP1) ist eine Rezeptortyrosinphosphatase, deren genaue Funktion bisher nicht geklärt ist. In einer Studie in der Türkei wurde beschrieben, dass Mutationen von GLEPP1 mit einem nephrotischen Syndrom im Kindesalter assoziiert sind. Um Näheres über die Funktion von GLEPP1 zu erfahren, wurde in dieser Arbeit eine GLEPP1-*knockout*-Mauslinie charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier, sechs und zehn Monate alte GLEPP1-*knockout*- sowie Wildtyp-Mäuse untersucht. Um zu schauen, ob die GLEPP1-*knockout*-Mäuse eine Albuminurie entwickeln, wurden die Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR) ermittelt und Coomassie-Gele angefertigt. Zur histologischen Untersuchung des glomerulären Filters wurden licht- sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Zusätzlich wurden mit glomerulärer RNA *real-time*-PCR durchgeführt, um die Zusammensetzung von Kollagen IV sowie Laminin in der glomerulären Basalmembran (GBM) zu untersuchen.

Im Alter von vier Monaten ergaben sich zwischen den GLEPP1-*knockout*- sowie Wildtyp-Mäusen keine wesentlichen Unterschiede im Hinblick auf die Albuminausscheidung im Urin oder etwaige morphologische Veränderungen des glomerulären Filters. Im Alter von zehn Monaten zeigten die GLEPP1-*knockout*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine signifikant höhere ACR im Sinne einer Albuminurie. Im Alter von sechs Monaten konnte semiquantitativ anhand eines Coomassie-Gels ebenfalls eine vermehrte Albuminausscheidung im Urin bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen nachgewiesen werden. Zusätzlich waren unter dem Lichtmikroskop bei den sechs und zehn Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäusen segmental subpodozytäre PAS-positive Areale feststellbar. Elektronenmikroskopisch äußerte sich dies in höckerigen Ausstülpungen der GBM, sog. *humps*. Über diesen *humps* waren die Fußfortsätze der Podozyten miteinander verschmolzen, sog. *podocyte foot process effacement*. Im Alter von zehn Monaten zeigten sich auch vereinzelt *humps* der GBM beim Wildtyp. Auf molekularer Ebene ergab sich zwischen dem vierten und zehnten Monat ein Wechsel vom reifen Kollagen IV-Subtyp $\alpha3\alpha4\alpha5$ zum unreifen Subtyp $\alpha1\alpha2\alpha1$ bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen. Zudem exprimierten die vier Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse signifikant weniger reife Laminin $\alpha5$ - und $\beta2$ -Ketten und die zehn Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse signifikant mehr unreife Laminin $\alpha1$ -Ketten.

Eine GLEPP1-Defizienz führt also bei alternden Mäusen zu einer Albuminurie, morphologischen Veränderungen des glomerulären Filters in Form von *humps* sowie *podocyte foot process effacement*, aber auch zu einer unreifen Zusammensetzung der GBM. Diesen Ergebnissen zufolge ist GLEPP1 erforderlich, um die Struktur und Funktion des glomerulären Filters aufrechtzuerhalten. Welche Mediatoren am Wechsel der Zusammensetzung der GBM beteiligt sind, sollte Bestandteil zukünftiger Forschung sein. Ein Eingriff in die am Wechsel beteiligte Kaskade könnte in Zukunft einen therapeutischen Ansatz bei der Behandlung proteinurischer Krankheitsbilder darstellen.

Abstract

The glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1) is a receptor-type tyrosine phosphatase. The exact function of GLEPP1 is still unknown. In a Turkish study, researchers have found that a mutation of GLEPP1 is associated with a nephrotic syndrome that manifests during childhood. We intend to deepen the knowledge on GLEPP1. Hence, we analyzed a GLEPP1-knockout mouse in this study.

In the present study, we examined GLEPP1-knockout mice and wild-type mice at the age of four, six and ten months. We determined the albumin-creatinin-ratio (ACR) and conducted Coomassie-gels to find out whether GLEPP1-knockout mice develop an albuminuria. We analyzed the glomerular filtration barrier with light and electron microscopy. In addition, we isolated the glomerular RNA and performed real-time-PCR to determine the composition of the glomerular basement membrane (GBM). Here, we focused on collagen type IV and laminin.

At the age of four months, we found no difference between the GLEPP1-knockout mice and the wild-type mice regarding albuminuria and the morphology of the glomerular filtration barrier. At higher ages, the GLEPP1-knockout mice developed an albuminuria. The ACR of the GLEPP1-knockout mice was significantly higher than the ACR of the wild-type mice at the age of ten months. At the age of six months we conducted a Coomassie-gel which also showed a higher albumin excretion in the urine of the GLEPP1-knockout mice. In addition to that, we detected PAS-positive areas in the glomerulus of the six and ten months GLEPP1-knockout-mice under the light microscope. They occurred segmentally and were located in the subpodocyte space. In the electron microscopy analysis, the GBM showed humps as a correlate to the PAS-positive areas in the light microscopy analysis. Above the humps, the podocyte foot processes seemed effaced. At the age of ten months, we saw also occasionally humps in the GBM of the wild-type mice, but no podocyte foot process effacement. Regarding the composition of the GBM, we revealed that GLEPP1-knockout mice experienced a switch from the mature collagen type IV $\alpha3\alpha4\alpha5$ to the immature type $\alpha1\alpha2\alpha1$ between the age of four and ten months. GLEPP1-knockout mice showed also significantly lower expression of the mature chains of laminin $\alpha5$ and $\beta2$ at the age of four months and significantly higher expression of the immature chain of laminin $\alpha1$ at the age of ten months.

A deficiency of GLEPP1 leads to an albuminuria with increasing age, such as morphological changes of the glomerular filtration barrier in form of GBM-humps and podocyte foot process effacement. Further, the composition of the GBM changed in GLEPP1-knockout mice. Therefore, GLEPP1 is necessary to maintain the structure and function of the glomerular filtration barrier. Future studies should consider the mediators, which cause the change of the GBM-composition. An intervention in the cascade, which causes the switch, could be an approach to treat proteinuric diseases.

Abkürzungsverzeichnis

°C. Grad Celsius	EDTA. Ethylendiamintetraacetat
A. Absorption	for. forward (vorwärts)
A _a . adjustierte Absorption	g. Erdbeschleunigung
A _c . korrigierte Absorption	g. Gramm
A _f . finale Absorption	G. Gauge
A _i . initiale Absorption	GAPDH. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ACR. albumin-creatinin-ratio (Albumin-Kreatinin-Ratio)	GBM. glomeruläre Basalmembran
APS. Ammoniumperoxodisulfat	gDNA. genomische DNA
bp. Basenpaare	GLEPP1. glomeruläres epitheliales Protein 1
BSA. bovine serum albumin (Rinderalbumin)	h. hora (Stunde)
c. Konzentration	HCl. Hydrogenchlorid
cDNA. complementary DNA (komplementäre DNA)	HPLC. high performance liquid chromatography (Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie)
cm. Zentimeter	Hz. Hertz
Ct. cycle threshold	ID. inner diameter (Innendurchmesser)
d. dies (Tage)	K. Verdünnungskoeffizient
DDR1. Discoidin Domain Receptor 1	kDa. Kilodalton
dL. Deziliter	KO. knockout
dNTPs. Desoxyribonukleosidtriphosphate	L. Liter
DTT. Dithiothreitol	m. Steigung
E. relative Expression	

Abkürzungsverzeichnis

M. Marker	
M. molar	rev. reverse (rückwärts)
mA. Milliampere	
MDCK. Madin Darby canine kidney	s. Sekunde
mg. Milligramm	SDS. sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
min. Minute	
mL. Milliliter	SDS-PAGE. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese)
mm. Millimeter	
mM. millimolar	
MW. Mittelwert	
	TAE-Puffer. Tris-Acetat-EDTA- Puffer
n. Stichprobenanzahl	
ns. nicht signifikant	Temed. Tetramethylethyldiamin
ng. Nanogramm	Tris. Trisaminomethan
nm. Nanometer	
	V. Volt
OD. outer diameter (Außendurchmesser)	VHL. von Hippel-Lindau
p. Irrtumswahrscheinlichkeit	WT. Wildtyp
PAN. Puromycin Aminonukleosid	
PAS. periodic-acid-Schiff-Reaktion	y. y-Achsenabschnitt
PBS. phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalz- lösung)	µg. Mikrogramm
	µL. Mikroliter
PCR. polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)	µm. Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS NEPHROTISCHE SYNDROM	1
1.2 GLEPP1	3
1.3 DIE PROTEINURIE	4
1.4 DAS GLOMERULUM	5
1.5 DER GLOMERULÄRE FILTER.....	7
1.6 KOLLAGEN IV.....	8
1.7 LAMININ	10
1.8 ZIELE DER ARBEIT.....	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG	13
2.2 VERSUCHSTIERE.....	13
2.3 MATERIAL	13
2.3.1 Geräte	13
2.3.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3.3 kits.....	17
2.3.4 Chemikalien	17
2.3.5 Lösungen	18
2.3.6 Puffer.....	19
2.3.7 Primer.....	19
2.3.8 Softwares	21
2.4 METHODEN	21
2.4.1 Organentnahme	21
2.4.2 Licht- und Elektronenmikroskopie	22
2.4.3 Isolation der Glomeruli	22
2.4.4 Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR)	23
2.4.5 Coomassie-Gel	25
2.4.6 Molekulargenetische Methoden	27
2.4.6.1 RNA-Isolation aus Glomeruli.....	27
2.4.6.2 RNA-Konzentrationsmessung.....	29
2.4.6.3 Reverse Transkription	29
2.4.6.4 PCR.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.4.6.5 Agarose-Gelelektrophorese	32
2.4.6.6 Quantitative PCR (real-time-PCR).....	32
2.4.6.6.1 Gradienten-PCR.....	32
2.4.6.6.2 Schmelzkurvenanalyse	33
2.4.6.6.3 Quantitative real-time-PCR	33
2.4.7 Statistische Auswertung.....	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 PROTEINAUSSCHIEDUNG IM URIN VON GLEPP1-KNOCKOUT-MÄUSEN	36
3.1.1 Zeitpunkt vier Monate.....	36
3.1.2 Zeitpunkt sechs Monate	37
3.1.3 Zeitpunkt zehn Monate	38
3.2 MORPHOLOGIE DES GLOMERULÄREN FILTERS BEI GLEPP1-KNOCKOUT-MÄUSEN ...	40
3.2.1 Zeitpunkt vier Monate.....	40
3.2.2 Zeitpunkt sechs Monate	43
3.2.3 Zeitpunkt zehn Monate	47
3.3 ZUSAMMENSETZUNG DER GBM IN GLEPP1-KNOCKOUT-MÄUSEN	50
3.3.1 Kollagen IV-Expression.....	51
3.3.1.1 Zeitpunkt vier Monate.....	51
3.3.1.2 Zeitpunkt zehn Monate.....	52
3.3.2 Laminin-Expression.....	53
3.3.2.1 Zeitpunkt vier Monate.....	53
3.3.2.2 Zeitpunkt zehn Monate.....	55
4 DISKUSSION.....	57
4.1 EINFLUSS VON GLEPP1 AUF DIE FUNKTION DES GLOMERULÄREN FILTERS	57
4.2 WIRKUNG VON GLEPP1 AUF DEN GLOMERULÄREN FILTER.....	59
4.2.1 Wirkung von GLEPP1 auf den Podozyten	59
4.2.2 Wirkung von GLEPP1 auf die GBM	62
4.3 ÄHNLICHKEIT ZWISCHEN GLEPP1- UND DDR1-DEFIZIENZ	64
4.4 GLEPP1 UND ALPORT-SYNDROM	65
4.5 LIMITATIONEN DER ARBEIT	67
5 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	69
6 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	71

1 Einleitung

Die Niere ist ein Organ mit einer Vielzahl von Funktionen. Die Nieren eliminieren harnpflichtige Substanzen. Daneben regulieren sie den Wasser-, Elektrolyt- sowie Säure-Base-Haushalt und produzieren verschiedene Hormone. Über die Ausschüttung von Renin sind die Nieren an der Blutdruckregulation beteiligt und über die Synthese von Erythropoetin an der Erythropoese. Weiterhin haben die Nieren über die Aktivierung von Vitamin D Einfluss auf den Kalzium-Phosphat-Haushalt und somit auf den Knochenstoffwechsel. Im Rahmen einer fortgeschrittenen chronischen Niereninsuffizienz kann es zu einer Einschränkung all dieser Funktionen kommen.

2013 stellten chronische Nierenerkrankungen Platz 19 der häufigsten Todesursachen weltweit dar (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015). Die häufigste Ursache einer terminalen chronischen Niereninsuffizienz ist die diabetische Nephropathie, gefolgt von der hypertensiven Nephropathie und den Glomerulonephritiden. Schreitet eine Nierenerkrankung voran, kann ein Nierenersatzverfahren wie eine dauerhafte Dialysetherapie erforderlich sein. In Deutschland waren 2015 ca. 85.000 Menschen chronisch dialysepflichtig bei einer Inzidenz von etwa 0,06 ‰ (Medical Netcare GmbH – MNC, 2016).

Klassifiziert wird die chronische Niereninsuffizienz anhand der glomerulären Filtrationsrate, welche ein Maß der exkretorischen Funktion der Niere ist. Weithin fließt in die Klassifikation die Albuminurie mit ein. Diese ist ein Parameter des chronischen Nierenschadens und ein wichtiger Prognosefaktor der chronischen Niereninsuffizienz (Ruggenti et al., 1998).

1.1 Das nephrotische Syndrom

Das nephrotische Syndrom bezeichnet einen Symptomenkomplex bestehend aus einer starken Proteinurie (> 3,5 g/d), einer Hypoalbuminämie, Ödemen sowie einer Hyperlipoproteinämie (Cogan, 1982). Dem nephrotischen Syndrom

1 Einleitung

zugrunde liegt eine Störung der glomerulären Filtrationsbarriere, sodass Proteine – insbesondere Albumin – über den Urin verloren gehen (Patrakka and Tryggvason, 2010). Demzufolge sinkt die Konzentration von Proteinen im Plasma und folglich auch der kolloidosmotische Druck, sodass Wasser die Gefäßwand passieren kann und Ödeme entstehen. Die Hyperlipoproteinämie entsteht dadurch, dass die Leber den Verlust der Proteine durch eine verstärkte Synthese versucht auszugleichen. Da Lipoproteine ein hohes Molekulargewicht haben, fallen sie jedoch im Gegensatz zu Albumin erst bei großen Schädigungen des glomerulären Filters im Urin aus, sodass im Plasma zunächst die Konzentration der Lipoproteine ansteigt.

Man unterscheidet das idiopathische (primäre) nephrotische Syndrom, das v. a. im Kindesalter auftritt, von dem sekundären nephrotischen Syndrom im Rahmen von Systemerkrankungen wie z. B. Diabetes mellitus. Daneben existieren hereditäre Formen des nephrotischen Syndroms. Bei den hereditären Formen liegen Genmutationen für Proteine vor, die an der Entwicklung und Funktion des glomerulären Filters beteiligt sind, wie z. B. Nephrin oder Podocin (Tryggvason et al., 2006).

In einer Studie in der Türkei wurde nach weiteren, bisher unbekanntem Mutationen als Ursache eines nephrotischen Syndroms im Kindesalter gesucht. Dabei konnten in zwei konsanguinen Familien Mutationen des kodierenden Gens für das glomeruläre epitheliale Protein 1 (GLEPP1) als Ursache eines nephrotischen Syndroms identifiziert werden (Ozaltin et al., 2011).

1.2 GLEPP1

GLEPP1 ist – wie in Abb. 1.1 zu sehen – ein transmembranäres Protein aus der Gruppe der Rezeptortyrosinphosphatasen vom Typ R3 (Thomas et al., 1994). Es besteht aus einem extrazellulären Teil, in welchem sieben bis acht Fibronectin Typ III-ähnliche Domänen aneinander gereiht sind, und einem intrazellulären Teil, der die katalytische Domäne beinhaltet (Matozaki et al., 2010, Tagawa et al., 1997, Thomas et al., 1994). (Abb. 1.1)

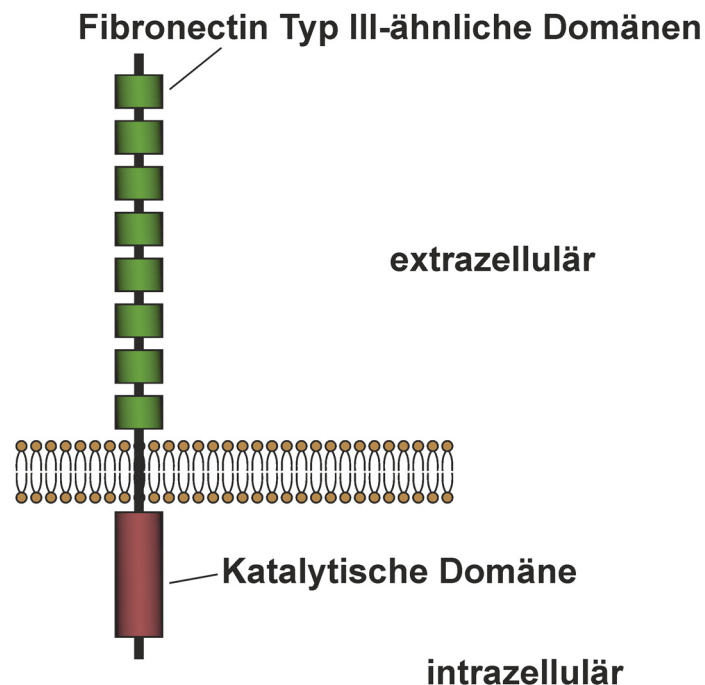


Abb. 1.1: Aufbau GLEPP1. (in Anlehnung an Matozaki et al., 2010)

GLEPP1 ist nachweisbar in den Nieren (Wharram et al., 2000), im Gehirn (Tagawa et al., 1997, Beltran et al., 2003) sowie in Makrophagen (Pixley et al., 1995), B-Zellen (Aguiar et al., 1999) und Osteoklasten (Wu et al., 1996). Weiterhin konnte GLEPP1 bei Krebserkrankungen wie dem hepatozellulären Karzinom, dem Bronchialzellkarzinom und dem Mammakarzinom nachgewiesen werden, in welchen es wahrscheinlich die Funktion eines Tumorsuppressors übernimmt (Motiwala et al., 2003, Jacob and Motiwala,

1 Einleitung

2005, Motiwala et al., 2004, Ramaswamy et al., 2009). In der Niere ist GLEPP1 in der apikalen Membran des Podozyten lokalisiert (Thomas et al., 1994).

Die genaue molekulare Funktion von GLEPP1 ist bisher unbekannt. Der Ligand für GLEPP1 konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Es wird vermutet, dass GLEPP1 maßgeblich zur Differenzierung der Podozyten beiträgt (Wang et al., 2000). Wharram et al. postulierten, dass GLEPP1 die Morphologie der Fußfortsätze sowie die glomeruläre Filtrationsrate und den Blutdruck beeinflusst (Wharram et al., 2000). Bei erworbenen Nierenerkrankungen wie z. B. der IgA-Nephropathie oder einer Präeklampsie konnte eine verminderte Expression von GLEPP1 im Glomerulum nachgewiesen werden (Zhao et al., 2009, Tian et al., 2007).

Warum eine Mutation des kodierenden Gens von GLEPP1 in der Studie von Ozaltin et al. mit der Ausbildung eines nephrotischen Syndroms einherging, ist bisher noch nicht geklärt. In der ersten Familie wurde durch die vorliegende Mutation ein unvollständiges Protein für GLEPP1 gebildet – in der zweiten Familie führte die hier vorliegende Mutation zu einem vorzeitigen Stoppcodon, sodass GLEPP1 nicht gebildet wurde (Ozaltin et al., 2011). In beiden Fällen manifestierte sich das nephrotische Syndrom bereits im Kindesalter.

1.3 Die Proteinurie

Dem nephrotischen Syndrom zugrunde liegt eine große Proteinurie. Von einer Proteinurie spricht man ab einer Ausscheidung von mehr als 150 mg Protein über 24 h im Urin (Barratt and Topham, 2007). Ursachen für eine Proteinurie können sowohl Schäden im Glomerulum als auch eine Störung im Tubulussystem sein. Daneben kann eine Proteinurie ebenfalls durch prä- oder postrenale Störungen entstehen. Beim nephrotischen Syndrom handelt es sich um eine glomeruläre Proteinurie.

Leitprotein der glomerulären Proteinurie ist Albumin. Mit ca. 60 % stellt Albumin den größten Anteil der Plasmaproteine dar. Aufgrund seines Molekulargewichts von 69 kDa kann Albumin – und dementsprechend auch größere Proteine –

1 Einleitung

den glomerulären Filter physiologisch nicht passieren (Miner, 2003, Chang et al., 1975). Proteine mit einem niedrigeren Molekulargewicht als Albumin können den glomerulären Filter passieren und werden später im Tubulussystem wieder zurückresorbiert. Bei einer glomerulären Schädigung können großmolekulare Proteine wie Albumin aufgrund einer erhöhten Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere eben diese passieren. Wegen seines Molekulargewichts und seines hohen Plasmaanteils fällt im Urin im Rahmen eines glomerulären Schadens zunächst Albumin an (Albuminurie). Man spricht auch von einer selektiv-glomerulären Proteinurie. Bei schweren Schädigungen des Glomerulums fallen neben Albumin auch größere Proteine im Urin an (unselektiv-glomeruläre Proteinurie).

Von einer Albuminurie spricht man, wenn im Urin mehr als 30 mg Albumin pro Tag ausgeschieden werden. Bei einer Mikroalbuminurie liegt die Albuminausscheidung zwischen 30 und 300 mg Albumin pro Tag, bei einer Makroalbuminurie entsprechend über 300 mg Albumin pro Tag (Mathieson, 2004). Schon eine Mikroalbuminurie wirkt sich prognostisch ungünstig im Hinblick auf renale sowie kardiovaskuläre Erkrankungen aus (Lane, 2004, Yudkin et al., 1988, Haffner et al., 1990). Die Albuminurie ist daher auch ein wichtiger diagnostischer Parameter z. B. beim Diabetes mellitus.

1.4 Das Glomerulum

Eine Albuminurie oder Proteinurie basiert auf einer Störung der Filterfunktion der Niere. Die Filtration findet in der Niere innerhalb der Glomeruli statt. Täglich werden in den Glomeruli ca. 900 L Blut ultrafiltriert, aus denen ca. 180 L Ultrafiltrat entstehen (Miner, 2011).

Ein Glomerulum ist zusammen mit seinem dazugehörigen Tubulussystem (proximaler Tubulus, Henle-Schleife und distaler Tubulus) Bestandteil eines Nierenkörperchens, des sog. Nephrons. Die Niere setzt sich aus ca. 1 Million Nephrone zusammen (Tryggvason and Wartiovaara, 2001). In den Glomeruli wird das Blut ultrafiltriert. Das Ultrafiltrat wird als Primärharn bezeichnet. In den

1 Einleitung

Tubuli und Sammelrohren wird der Harn anschließend konzentriert, indem Wasser zurückresorbiert wird. So werden täglich ca. 1,5-2 L Urin ausgeschieden.

Bei einem Glomerulum selbst handelt es sich um ein Gefäßknäuel bestehend aus feinsten Kapillaren (Abb. 1.2). Über die afferente Arteriole wird das Blut dem Kapillarkonvolut zugeführt, über die efferente Arteriole fließt es wieder ab. Um das Gefäßknäuel herum befindet sich eine Kapsel, die sog. Bowman'sche Kapsel. Im Kapselraum, der zwischen dem viszeralen und parietalen Blatt der Bowman'schen Kapsel gelegen ist, wird der Primärharn aufgefangen. Die Ultrafiltration wird ermöglicht durch den glomerulären Filter, der sich zwischen dem Lumen der Kapillaren und dem Kapselraum befindet.

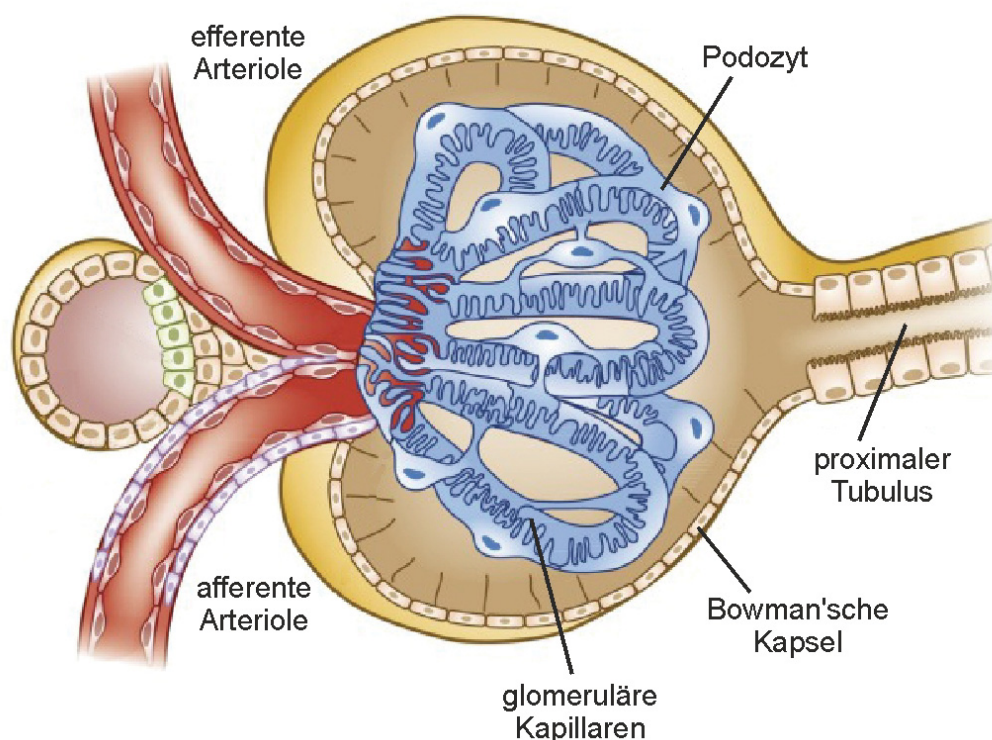


Abb. 1.2: Aufbau eines Glomerulums. Über die afferente Arteriole wird das Kapillarkonvolut versorgt. Innerhalb der Kapillaren findet über den glomerulären Filter die Ultrafiltration statt. Das Ultrafiltrat wird im Kapselraum aufgefangen und über den proximalen Tubulus weiter transportiert. (in Anlehnung an Pollak et al., 2014)

1.5 Der glomeruläre Filter

Der glomeruläre Filter ermöglicht die Ultrafiltration innerhalb des Glomerulums. Er setzt sich zusammen aus dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten (Abb. 1.3). Die Ultrafiltration erfolgt anhand der Größe der Moleküle sowie ihrer Ladung (Chang et al., 1975).

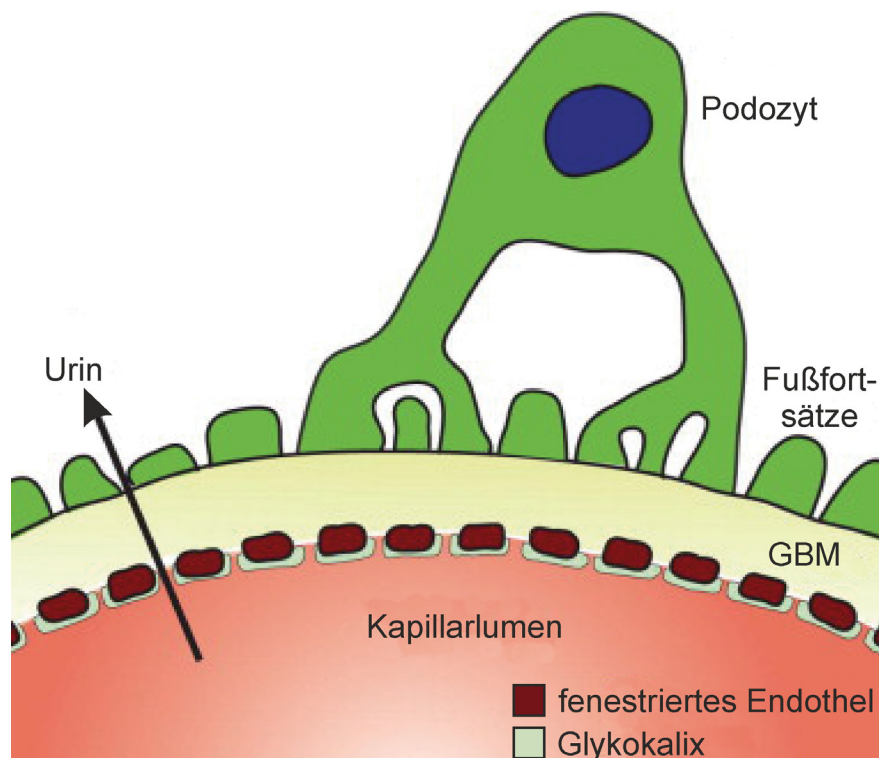


Abb. 1.3: Aufbau des glomerulären Filters. An das Lumen der Kapillaren schließt sich das fenestrierte Endothel an, gefolgt von der GBM und den Fußfortsätzen der Podozyten. Der Pfeil gibt die Richtung an, in welche das Ultrafiltrat den glomerulären Filter passiert. (in Anlehnung an Patrakka and Tryggvason, 2010)

Die Kapillaren der Glomeruli besitzen ein spezielles Endothel, das sog. fenestrierte Endothel. Die Besonderheit dieser Form des Endothels ist, dass es Poren hat, sog. *fenestrae*. Diese haben einen Durchmesser von etwa 70-100 nm (Tryggvason et al., 2006). Die Endothelzellen sind bedeckt durch eine Schicht bestehend aus Proteoglykanen, Glykoproteinen sowie

1 Einleitung

Glykosaminoglykanen (Patrakka and Tryggvason, 2010). Sie bilden die Glykokalix. Es wird postuliert, dass die Glykokalix durch ihre negative Ladung Einfluss auf die glomeruläre Filtration habe (Chang et al., 1975, Bohrer et al., 1978).

Die GBM entsteht durch die Verschmelzung der endothelialen und podozytären Basalmembranen (Abrahamson, 1985). Daher besteht die GBM aus drei Schichten. Die mittlere Schicht wird als Lamina densa bezeichnet und entsteht durch die Verschmelzung der Laminae densae der endothelialen und podozytären Basalmembranen. Zu beiden Seiten, zum Endothel und zu den Podozyten hin, schließt sich an die Lamina densa eine Lamina rara an. Insgesamt ist die GBM 300-350 nm dick (Tryggvason et al., 2006). Die Hauptbestandteile der GBM sind Kollagen IV, Laminin, Proteoglykane und Nidogen (Miner, 2011).

Die Podozyten bilden die äußere Schicht des glomerulären Filters. Sie besitzen primäre und sekundäre Fußfortsätze, die der GBM aufsitzen. Die Fußfortsätze sind fingerartig miteinander verzahnt. Zwischen ihnen liegen Spalträume, die einen Durchmesser von etwa 40 nm haben (Wartiovaara et al., 2004). Diese Spalträume werden von der Schlitzmembran überdeckt, deren Moleküle reißverschlussartig angeordnet sind (Rodewald and Karnovsky, 1974). Morphologisch entspricht die Schlitzmembran einer modifizierten Zell-Zell-Verbindung mit großer Ähnlichkeit zur *adherens junction* (Reiser, 2000).

1.6 Kollagen IV

Ein intakter glomerulärer Filter ist essenziell zur Vermeidung einer Albuminurie oder gar eines nephrotischen Syndroms. Da die GBM eine wichtige Komponente des glomerulären Filters ist, soll auf deren Bestandteile nun genauer eingegangen werden.

Hauptbestandteil der GBM ist u. a. Kollagen IV (Miner, 2011). Kollagen IV ist ein Protein, das in der Lamina densa von Basalmembranen zu finden ist. Es zählt zu den Kollagenen, die sich netzartig zusammenlagern. Durch seine

1 Einleitung

netzartige Formation fördert Kollagen IV die Stabilität und Zugfestigkeit der Basalmembranen (Tryggvason et al., 2006).

Kollagen IV ist ein Heterotrimer. Drei α -Ketten lagern sich zusammen und bilden eine Tripelhelix, das sog. Protomer. Insgesamt gibt es sechs verschiedene α -Ketten ($\alpha 1-6$). Diese Ketten können sich nur auf bestimmte Arten zusammenlagern, sodass sich drei Isoformen des Kollagens IV ergeben: $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, $\alpha 5\alpha 6\alpha 5$ (Khoshnoodi et al., 2006) (Abb.1.4). Diese Protomere lagern sich weiter zu einem Netzwerk zusammen.

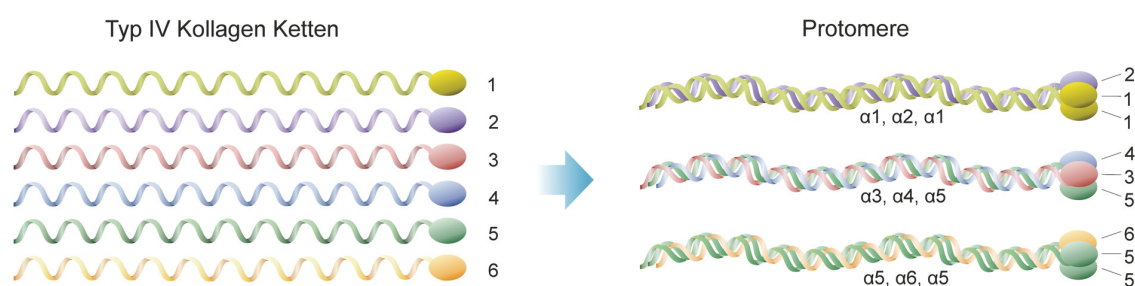


Abb. 1.4: Aufbau Kollagen IV. Links im Bild sind die einzelnen Ketten von Kollagen IV $\alpha 1-6$ dargestellt. Rechts sind die Tripelhelices, zu denen sich die Ketten zusammen lagern, dargestellt. (in Anlehnung an Hudson et al., 2003)

In der GBM kommen die Formen $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$ und $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ vor. Im unreifen Glomerulum findet sich ein Kollagen IV-Netzwerk aus $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$ -Protomeren (Miner, 1998). Im reifen Glomerulum wird dieses Netzwerk durch ein $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ -Netzwerk ersetzt (Abrahamson, 2012).

Das Kollagen IV der GBM wird von den es umgebenden Zellen synthetisiert. Im unreifen Glomerulum produzieren sowohl Podozyten als auch Endothelzellen die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten (Abrahamson et al., 2009). Im reifen Glomerulum sind lediglich die Podozyten an der Synthese der $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Ketten beteiligt (Abrahamson et al., 2009).

Kollagen IV steht über Integrine mit den umliegenden Zellen in Kontakt (Abrahamson, 2012). Ein weiterer Kollagen IV-Rezeptor ist der Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), eine Rezeptortyrosinkinase (Gross et al., 2004).

1.7 Laminin

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der GBM ist Laminin (Miner, 2011). Laminin ist ein Protein, das in allen Basalmembranen vorkommt. Ähnlich wie Kollagen IV ist Laminin als Heterotrimer aufgebaut. Je eine α -, β - und γ -Kette bilden das Heterotrimer (Abrahamson, 2012) (Abb. 1.5). Bisher sind mindestens 15 Isoformen des Laminins bekannt (Abrahamson, 2012). Die einzelnen Heterotrimere lagern sich weiter zu einer Art Netzwerk zusammen. Dieses Laminin-Netzwerk ist eng verknüpft mit dem Netzwerk, das Kollagen IV in der Basalmembran bildet (Patrakka and Tryggvason, 2010).

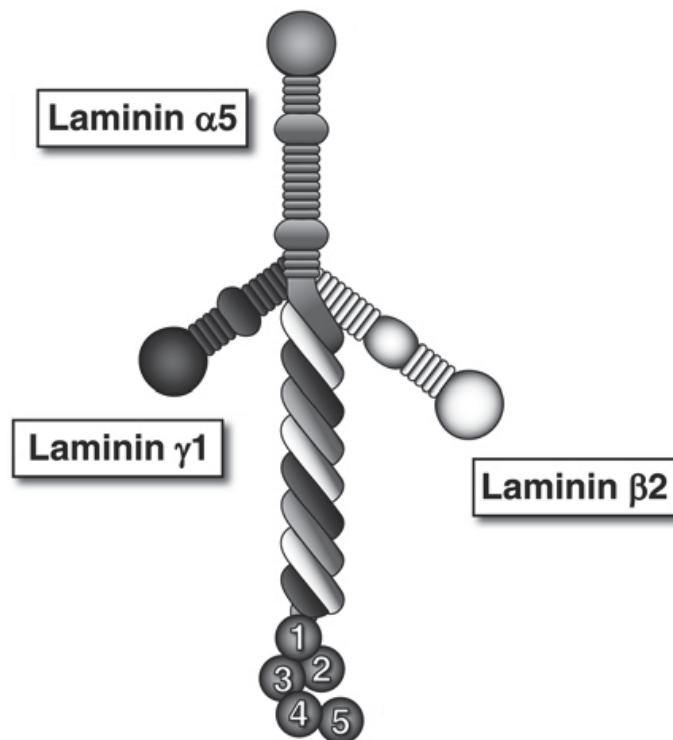


Abb. 1.5: Aufbau Laminin-521. Je eine α -, β - und γ -Kette lagern sich zusammen und bilden ein Heterotrimer. (in Anlehnung an Miner, 2011)

In der GBM treten v. a. Laminin-111 sowie Laminin-521 auf. Laminin-111 ist Bestandteil der unreifen GBM (Abrahamson, 2012). Im reifen Glomerulum findet sich Laminin-521 in der GBM (Miner et al., 1997).

1 Einleitung

Das Laminin der GBM wird sowohl von Podozyten als auch von Endothelzellen synthetisiert (John and Abrahamson, 2001). Im Gegensatz zum Kollagen IV sind die Endothelzellen auch für die Synthese des reifen Laminin-521 mitverantwortlich.

Neben seiner strukturellen Aufgabe ist Laminin maßgeblich an der Zelladhäsion und -differenzierung beteiligt (Tryggvason et al., 2006). Dies geschieht hauptsächlich über Integrine (Kramer et al., 1990, Goodman et al., 1991, Pfaff et al., 1994, Jarad et al., 2011). Neben Integrinen bindet Laminin an weitere zelluläre Rezeptoren wie Dystroglykan, aber auch an extrazelluläre Proteine wie Nidogen und Perlecan (Paulsson et al., 1987, Battaglia et al., 1992, Timpl et al., 2000).

1.8 Ziele der Arbeit

Die genaue Funktion von GLEPP1 konnte bisher nicht geklärt werden. Es wurde beschrieben, dass ein Defekt oder Fehlen von GLEPP1 mit der Entstehung eines nephrotischen Syndroms beim Menschen assoziiert ist (Ozaltin et al., 2011). Um Rückschlüsse auf die Funktion von GLEPP1 sowie den Zusammenhang zur Entstehung des nephrotischen Syndroms ziehen zu können, war das Ziel dieser Arbeit eine GLEPP1-*knockout*-Mauslinie zu charakterisieren.

In diesem Rahmen sollte zunächst untersucht werden, ob GLEPP1-*knockout*-Mäuse eine Albuminurie entwickeln, da diese ein früher Indikator des glomerulären Schadens ist. Anschließend sollte geprüft werden, ob sich ein Korrelat des glomerulären Schadens bzw. der glomerulären Veränderungen auf histologischer sowie molekularer Ebene ergibt.

Unter anderem sollten also folgende Fragen in dieser Arbeit beantwortet werden:

Führt eine GLEPP1-Defizienz zu einer Albuminurie?

1 Einleitung

Führt eine GLEPP1-Defizienz zu morphologischen Veränderungen des glomerulären Filters?

Führt eine GLEPP1-Defizienz zu molekularen Veränderungen des glomerulären Filters?

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Versuche an den Tieren wurden nach den gesetzlichen Richtlinien beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Bundeslandes Nordrhein-Westfalen angezeigt. Die Versuche wurden unter dem von der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vergebenen Aktenzeichen ZETT O 68/08 durchgeführt. Die für die Versuche zuständige Person wies einen Fachkundenachweis gemäß § 9 des Tierschutzgesetzes vor.

2.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden an Mäusen auf dem Hintergrund 129P3J durchgeführt. Die Mäuse wiesen einen *knockout* für die Rezeptortyrosinphosphatase GLEPP1 auf. Die Mauslinie wurde von Roger Wiggins von der University of Michigan etabliert und in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als Inzuchtlinie importiert und weiter verpaart. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in einem Alter von vier, sechs oder zehn Monaten operiert. Als Kontrollgruppe dienten männliche Mäuse eines Wildtyp-Stammes auf dem Hintergrund 129P3J.

2.3 Material

2.3.1 Geräte

In der Tabelle 2.1 sind die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Thermocycler	Mastercycler® gradient	Eppendorf AG, Hamburg, D
Elektrophoresegerät	SDS-PAGE Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, München, D

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresegerät	Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems	Bio-Rad Laboratories, München, D
Federschere	Strabismus-Federschere, gebogen, 11,5 cm	Martin, Tuttlingen, D
Heizblock	Analog Headblock	VWR International, Darmstadt, D
Heizblock	Dry Block Thermostat Bio TDB-100	Biosan, Riga, LV
<i>imager</i>	FluorChem FC2	Alpha Innotech, Kasendorf, D
Magnet	DynaMag™	Invitrogen, Oslo, N
Mikroskop	Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Köln, D
Mikrowelle	Mikrowelle NN-E-202	Panasonic, Hamburg, D
Mosquitoklemme	Mosquitoklemme, gebogen, 12,5 cm	Martin, Tuttlingen, D
PCR-Gerät	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Perfusor	Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Pinzette	Anatomische Pinzette, fein, gebogen, 11,5 cm	Martin, Tuttlingen, D
Pipette	PIPETMAN® P: P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipette	Eppendorf Reference®: 0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL; 500-2500 µL	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipette	Eppendorf Research 500-5000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipette	Multipipette® stream	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe	Easypet 4420	Eppendorf AG, Hamburg, D
Plattenreader	DTX 880 Multimode Detector	Beckman Coulter®, Indianapolis
Reagenzglasschüttler	REAX control	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Schere	Irisschere 11,5 cm, gerade	Allgaier Instrumente GmbH, Tuttlingen, D
Schüttler	HS/KS 260 basic	IKA®-Werke, Staufen, D

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply-EPS 300	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Spannungsquelle	SDS-PAGE PowerPac™ Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories, München, D
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Stereomikroskop	Olympus SD 30 Mikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Tissue Ruptor	TissueRuptor (230 V, 50/60 Hz)	Qiagen, Valencia, USA
Tissue Ruptor-Aufsätze	Tissue Ruptor Disposable Probes	Qiagen, Valencia, USA
Waage	RET basic	IKA, Staufen, D
Waage	HL-400	A&D, Griesheim, D
Wasserbad	WNB 14	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 4 KR Centrifuge	ThermoScientific, Schwerte, D
Zentrifuge	Heraeus Pico 21 Centrifuge	ThermoScientific, Schwerte, D
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg D

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen der Experimente benötigten Verbrauchsmaterialien wurden in der Tabelle 2.2 zusammengestellt.

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
96-well-Platte	Mikrotestplatte 96-Well, Flachboden, ohne Deckel	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-well-Platte	96-Well-PCR-Platte, Semi-Skirted	Starlab, Hamburg, D
Combitips	Combitips advanced®: 0,1 mL; 0,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, D
Einmalspritze	Injekt®: 2 mL, 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einmalspritze	Omnifix®-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Folie	Opti-Seal Optical Disposable Adhesive	BIOplastics, Landgraaf, NL
Kanüle	Sterican® Ø 0,40x 12 mm 27 G x ½"	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Kanüle	Sterican® Ø 0,60x 25 mm 23 G x 1"	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Ligaturfaden	Seraflex® Seide, USP 5/0, EP1, nicht resorbierbar	Serag-Wiessner, Naila, D
Mullkompressen	Telacomp®, nicht-steril, 5x 5 cm	Hartmann, Heidenheim, D
Petrischale	Petrischale 92x 16 mm ohne Nocken	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen mit Dualfilter	ep Dualfilter T.I.P.S. ®	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen mit Filter	Biosphere® Filter Tips: 0,5-20 µL, 2-20 µL, 2-100 µL, 2-200 µL, 100-1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen ohne Filter	Pipettenspitzen: 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Polyethylenschlauch	Fine Bore Polythene Tubing 0,58 mm ID, 0,96 mm OD	Portex, Kent, UK
Polyethylenschlauch	Fine Bore Polythene Tubing 0,28 mm ID, 0,61 mm OD	Portex, Kent, UK
Probengefäß	Schutzgefäß, Schraubverschluss	Engelbrecht, Edermünde, A
Rasierklingen	Ever-Sharp-Blades	Apollo Herkenrath, Solingen, D
Reaktionsgefäß	Safe Lock Tubes: 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Reaktionsgefäße Multiply®-Pro Gefäß 0,5 mL, PP	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen	Cellstar®-Tubes 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Röhren	Röhre 5 mL, 75x 12 mm, Polystyrol, mit montiertem Belüftungsstopfen, steril	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipette	Serologische Pipette 5 mL, 10 mL, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpell	Sterile Disposable Scalpel No. 10 20x	Feather®, Osaka, Japan
Versandgefäß	Schutzgefäß zum Transport	Engelbrecht, Edermünde, A

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Zellsieb	Falcon® Cell Strainer 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg, D

2.3.3 kits

Zur Durchführung der Experimente wurden verschiedene *kits* verwendet (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: kits

kit	Hersteller
Creatinin urinary Colorimetric Assay Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, D

2.3.4 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden im Rahmen der Experimente verwendet (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Agarose	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biomol, Hamburg, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
<i>bovine serum albumin</i> (BSA)	VWR International, Darmstadt, D
Collagenase A	Roche Applied Science, Mannheim, D
Coomassie Brilliant Blue R-250	ICN Biomedicals, Irvine, USA
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ficoll	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	Fresenius, Bad Homburg, D

Chemikalie	Hersteller
Ketavet® 100 mg/mL (Ketaminhydrochlorid)	Pfizer, Berlin, D
Methanol	AppliChem, Darmstadt, D
Orange G	Fluka, Buchs, Ch
Power SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
RNase Away	Molecular Bio Products, San Diego, CA
Rompun® 2 % (20 mg Xylazin/mL)	Bayer, Leverkusen, D
Rotiphorese	Roth, Karlsruhe, D
<i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Biomol, Hamburg, D
Tetramethylethyldiamin (Temed)	Roth, Karlsruhe, D
Trisaminomethan (Tris) Base	Biomol, Hamburg, D
Tris Hydrogenchlorid (HCl)	Biomol, Hamburg, D

2.3.5 Lösungen

Die benötigten Lösungen wurden in der Tabelle 2.5 zusammengefasst.

Tabelle 2.5: Lösungen

Lösung	Hersteller/Zusammensetzung
4 % gepuffertes Formalin	Nephropathologie, Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf, D
Mouse Depletion Dynabeads	Invitrogen, Oslo, N
Coomassie Färbelösung	0,303 mM Coomassie Brilliant Blue R-250 2,47 M Methanol 0,437 M Essigsäure durch Faltenfilter filtrieren
Coomassie-Fixierlösung	12,35 M Methanol 1,75 M Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	9,89 M Methanol 1,75 M Essigsäure
Orange G 5x	0,25 % Orange G 15 % Ficoll 400 15 % Glycerin

2.3.6 Puffer

Im Rahmen der Experimente wurden verschiedene Puffer verwendet (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Puffer

Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS) (Dulbecco)	Biochrom, Berlin, D
Laemmli 2x	0,1 M Tris HCl 0,15 M SDS 2,74 M Glycerol 2,99 mM Bromphenolblau verwendet als: 100 µL 1M DTT + 900 µL Laemmli 2x
Laufpuffer 10x	239 M Tris Base 1,92 M Glycin 34,7 mM SDS
Sammelgel-Puffer pH 8,8	0,484 M Tris HCl 16,0 mM Tris Base 15,3 mM SDS
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) 50x	2,00 M Tris Base 1,00 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8
Trenngel-Puffer pH 6,9	0,360 M Tris HCl 1,14 M Tris Base 15,3 mM SDS

2.3.7 Primer

Es wurden verschiedene Primer verwendet, die in den Tabellen 2.7 und 2.8 aufgeführt sind.

Tabelle 2.7: QuantiTect Primer Assays

Primer	Bezeichnung	Hersteller
18s	Mm_Rps18_1_SG	Quiagen, Hilden, D

Tabelle 2.8: Eigene Primer

Primer	Sequenz vorwärts (for) und rückwärts (rev)	Produktgröße/bp
Col4a1	for: CTG GCA CAA AAG GGA CGA G rev: ACG TGG CCG AGA ATT TCA CC	238
Col4a2	for: TGC TAC CCG GAG AAA GGA G rev: CTT TGC GGC CCT GTA GTC C	106
Col4a3	for: GGG ACA TGT AAC TAC TAC TCA AAC TCC rev: TCA CAG TTG ATG GAA TAG GTT TTC T	88
Col4a4	for: CTG GCT TGA AGG GAG ACC T rev: CTC CTG CAT CAC CAG GAA GT	69
Col4a5	for: GGA GAA CGG GGG TTT CCA G rev: CTC CCT TGG TTC CAT TGC ATC	245
Lama1	for: ACT GTC ACC CTG GAC TTA CGG rev: GCG GGT CAA ACA CTC TGT ATC	154
Lama5	for: ATG AGG TCA ACG TCA CAC TGG rev: CTT GGA GGA GGC AAA GAA CTG	158
Lamb1	for: GGT TCG AGG GAA CTG CTC CT rev: GGC AAA TCG TGG TAG AAA TCC	61
Lamb2	for: ATG TGC CTA AGG ATG ACC rev: CCC TGT TCC GAT CAG TTT CA	131

2.3.8 Softwares

Folgende Softwares wurden verwendet (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Softwares

Software	Entwickler
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, USA
7300 Real Time PCR System AlphaView	Applied Biosystems, Darmstadt, D Alpha Innotech, Kasendorf, D
Multimode Analysis Software	Beckman Coulter, Fullerton, USA

2.4 Methoden

2.4.1 Organentnahme

Aufgrund der nachfolgenden Untersuchungen wurde die Operation unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Zunächst erfolgte eine zervikale Dislokation mit Durchtrennung des Rückenmarks. Anschließend konnten die Maus präpariert und die Organe entnommen werden.

Der Bauchraum wurde median eröffnet durch einen Schnitt auf Höhe der Blase. Der Schnitt wurde kranial bis unmittelbar unterhalb des Processus xiphoideus fortgesetzt. Seitliche Entlastungsschnitte ermöglichten, dass die Muskulatur nach außen geklappt und mit Klemmen befestigt werden konnte.

Die Blase wurde an dieser Stelle punktiert, um den Urin später auf eine Proteinurie zu untersuchen. Unmittelbar danach wurde der Urin bei 111 x g zentrifugiert, um potenzielle Verunreinigungen durch Blutbestandteile zu entfernen. Der Urin wurde bei -80 °C aufbewahrt.

Um die Nieren, die Aorta und die zu- und abführenden Gefäße freizulegen, wurde das Mesenterium zur rechten Seite verlagert. Die Aorta wurde freipräpariert und folgende Ligaturen wurden vorbereitet: suprarenal um die Aorta, um die dazwischenliegenden hepatischen und mesenterialen Abgänge,

um die rechten Nierengefäße und um die infrarenale Aorta. Die kraniale Ligatur um die Aorta wurde nun zugezogen, um den Blutfluss zu unterbinden. Danach wurde die Aorta infrarenal inzidiert und ein Polyethylenschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,28 mm eingeführt. Der Polyethylenschlauch wurde unmittelbar vorher entlüftet, um Luftembolien in der Niere zu vermeiden. Über den Schlauch wurden die Nieren nun über einen Perfusor mit 5 mL 4 °C kaltem PBS perfundiert bei einer Laufrate von 1,5 mL/min. Bei richtiger Lage des Schlauches entfärbten sich die Nieren und der Schlauch konnte nun mit der vorbereiteten Ligatur fixiert werden. Die Ligatur um die hepatischen und mesenterialen Gefäße wurde ebenfalls zugezogen. Um den Abfluss aus dem perfundierten Gebiet zu ermöglichen, wurde die Vena renalis sinistra punktiert.

Nach der Perfusion wurde die Ligatur um die rechten Nierengefäße zugezogen. So konnte die linke Niere separat mit einer Dynabead-Lösung perfundiert werden, um anschließend die Glomeruli zu isolieren. Nach der zweiten Perfusion wurden die Kapseln der Nieren entfernt und die Gefäße sowie Ureteren am Nierenhilus abgetrennt. Die Nieren konnten nun entnommen werden. Die rechte Niere wurde in einer Fixierlösung mit 4 % gepuffertem Formalin bei 4 °C gelagert. Aus der linken Niere wurden die Glomeruli isoliert.

2.4.2 Licht- und Elektronenmikroskopie

Die rechte Niere wurde an die Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung verschickt.

2.4.3 Isolation der Glomeruli

Um später die glomeruläre RNA zu untersuchen, wurden die Glomeruli aus der jeweils linken Niere der Mäuse isoliert. Aufgrund der nachfolgenden Untersuchungen wurden alle Schritte unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Die linke Niere wurde vor der Organentnahme mit 5 mL einer 4 °C kalten Dynabead-Lösung (150 µL Dynabeads in 5 mL PBS) perfundiert. Dynabeads sind ferromagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 4-5 µm

und bleiben aufgrund ihrer Größe bei der Perfusion in den Kapillaren der Glomeruli hängen.

Nach der Organentnahme wurde die Niere in einer Petrischale mit einer Rasierklinge zerhackt. Die daraus entstehenden Stücke sollten möglichst klein sein, um optimale Bedingungen für den anschließenden Verdau zu schaffen. Die Nierenstücke wurden in ein 2-mL-Eppendorf-Gefäß mit 1 mL Collagenase A (1,5 mg/mL) überführt und für 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad verdaut.

Danach wurden die Proben auf ein 100-µm-Zellsieb gegeben, unter welchem sich ein Auffanggefäß befand. Mit einem RNase-freien Spritzenstempel wurden die Proben durch das Zellsieb gedrückt. Das Zellsieb wurde mehrfach mit 5-10 mL 4 °C kaltem PBS gewaschen. Danach wurde die aufgefangene Lösung auf ein neues 100-µm-Zellsieb gegeben und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben bei einer Temperatur von 4 °C und einer Beschleunigung von 541 x g für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt. Zu dem Pellet wurden 1,5 mL PBS gegeben und beides wurde miteinander vermischt. Mit einem Magneten konnten die Glomeruli an einer Seite gesammelt werden und der Überstand erneut entfernt werden. Dieser Waschschrift wurde mehrfach wiederholt, bis unter dem Mikroskop über 90 % des Gewebes als Glomeruli erkennbar waren. Die Glomeruli wurden dann in 300 µL RLT-Puffer bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR)

Mit der ACR lässt sich eine Albuminurie quantifizieren. Sie wird berechnet anhand der Konzentrationen von Albumin und Kreatinin im Urin. Da Kreatinin mit einer verhältnismäßig konstanten Rate über den Urin ausgeschieden wird, ist die Kreatininkonzentration im Urin ein Indikator für die Verdünnung des Urins.

Die Urinproben wurden zur Bestimmung der Albuminkonzentration zu CellTrend nach Luckenwalde versandt.

Die Kreatininkonzentration im Urin wurde mit dem Creatinin urinary Colorimetric Assay Kit von Cayman Chemicals bestimmt. Es wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Das Verfahren basiert auf der Jaffé-Reaktion. Bei der Reaktion von Kreatinin und Pikrinsäure im alkalischen Milieu entsteht eine gelb- bis orangefarbene Lösung. Im sauren Milieu entfärbt sich die Lösung wieder. Die Differenz der Farbintensität korreliert mit der Kreatininkonzentration.

Zu Beginn wurde eine Kreatininstandardreihe hergestellt. Die Kreatininstammlösung (Creatinin Standard) mit einer Konzentration von 20 mg/dL wurde dafür mit *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Wasser verdünnt, sodass man Standards mit den folgenden Konzentrationen erhielt: 0 mg/dL (Standard A), 2 mg/dl, 4 mg/dL, 6 mg/dL, 8 mg/dL, 10 mg/dL, 12 mg/dL und 15 mg/dL (Standard B-H). Anhand dieser Standards konnte später eine Ausgleichsgerade ermittelt werden. Urinproben mit einer Konzentration über 15 mg/dL wurden mit HPLC-Wasser verdünnt. Danach wurde eine alkalische Pikrinsäurelösung (Alkaline Picrate Solution) hergestellt. Dafür wurden je Probe 13,89 μ L Natriumborat (Creatinine Sodium Borate) mit 41,67 μ L Surfactant (Creatinine Surfactant), 69,44 μ L des Indikators (Creatinine Color Reagent) und 25 μ L Natriumhydroxid (Creatinine Sodium Hydroxide) vermischt. Der Indikator enthält Pikrinsäure. Das alkalische Milieu, das für die Farbreaktion essenziell ist, wird durch Natriumhydroxid hergestellt. Surfactant und Natriumborat reduzieren Interferenzen mit Proteinen und Kohlenhydraten bei der Absorptionsmessung.

15 μ L der Urinproben bzw. Standards wurden in jeweils doppeltem Ansatz auf eine 96-well-Platte pipettiert. Dann wurden jeweils 150 μ L der alkalischen Pikrinsäurelösung zu den Urinproben bzw. Standards hinzugefügt. Die Platte wurde abgedeckt und für 10 min auf einen Schüttler gestellt. Dann wurde zum ersten Mal die initiale Absorption (A_i) bei einer Wellenlänge von 490-500 nm bestimmt. Die Absorption wurde mit einem Plattenreader gemessen. Anschließend wurden 5 μ L der Säurelösung (Creatinine Acid Solution) hinzugefügt. Dadurch entstand nun ein saures Milieu. Die Proben wurden

wieder abgedeckt und für 20 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die finale Absorption (A_f) bei einer Wellenlänge von 490-500 nm gemessen.

Die Kreatininkonzentration konnte dann wie folgt berechnet werden:

$$c (\text{Kreatinin}) = \frac{A_a - y}{m} \cdot K$$

A_a : adjustierte Absorption $A_a = A_c - A_c(\text{Standard A})$

A_c : korrigierte Absorption $A_c = A_i - A_f$

c : Konzentration

m : Steigung

K : Verdünnungskoeffizient

y : y-Achsenabschnitt

Aus der adjustierten Absorption der Standards wurde mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade ermittelt. Die Steigung und der y-Achsenabschnitt konnten aus der Ausgleichsgeraden bestimmt werden.

Aus den Albumin- und Kreatininkonzentrationen konnte dann die ACR wie folgt bestimmt werden:

$$ACR \left[\frac{mg}{g \text{ Kreatinin}} \right] = \frac{c (\text{Albumin})}{c (\text{Kreatinin})}$$

2.4.5 Coomassie-Gel

Die Coomassie-Färbung stellt ein weiteres Verfahren dar, den Proteingehalt im Urin von den GLEPP1-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen zu vergleichen. Der Urin wurde hierfür mit Laemmli 2x + DTT im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend bei 95 °C für 5 min gekocht. Bei 95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und durch das DTT im Laemmli werden die Disulfidbrücken reduziert, sodass die Proteine in denaturierter Form vorliegen.

Mit der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zunächst wurde ein 10%iges SDS-Gel für die Elektrophorese hergestellt. Die Herstellung des Gels basiert auf radikalischer Polymerisation. Acrylamid polymerisiert nach Zugabe des Radikalstarters APS und des Katalysators Temed. Bisacrylamid führt zur Quervernetzung der Acrylamid-Polymere, sodass eine Art dreidimensionales Gitter entsteht, durch welches die Proteine während der Gelelektrophorese wandern. Das SDS innerhalb des Gels gleicht die Eigenladung der Proteine aus. Somit werden die Proteine während der Gelelektrophorese lediglich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

In einer Elektrophoresevorrichtung wurde zuerst ein Trenngel gegossen und mit Isopropanol beschichtet, damit keine Luftblasen entstanden. Für das Trenngel wurden 3 mL Rotiphorese, 1,5 mL Wasser, 4,5 mL Trenngel-Puffer, 90 μ L 10%iges APS und 15 μ L Temed verwendet. Die Rotiphorese enthält Acrylamid und Bisacrylamid. Sobald das Trenngel fest war, wurde das Isopropanol entfernt. Danach wurde das Sammelgel gegossen. Für das Sammelgel wurden 0,535 mL Rotiphorese, 1,135 mL Wasser, 1,665 mL Sammelgel-Puffer, 40 μ L 10%iges APS und 5 μ L Temed verwendet. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm eingeführt für die späteren Taschen des Gels.

Für die Elektrophorese wurden die Taschen des Gels mit jeweils 15 μ L der zuvor mit Laemmli 2x + DTT versetzten Urinprobe beladen. Als Größenmarker wurde der Prestained Protein Marker von New England Biolabs verwendet. Als Standards wurden 0,1 mg, 0,5 mg und 1 mg BSA eingesetzt. Der Laufpuffer 10x wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt eingesetzt. Nun wurde erst eine Spannung von 70 V für 30 min angelegt. In dieser Zeit wanderten die Proben bei einem pH-Wert von 6,9 durch das Sammelgel und wurden so konzentriert. Danach wanderten die Proben bei einer Stromstärke von 20 mA für 120 min durch das Trenngel bei einem pH-Wert von 8,8. In dieser Phase wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, sodass die kleinsten Proteine am schnellsten durch das Gel wanderten.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit einer Coomassie-Lösung angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Dazu wurde das Gel für 10 min in einer Fixierlösung auf einem Schüttler inkubiert. Die Fixierlösung enthielt methanolische Essigsäure, welche die Proteine im Gel fixierte. Danach wurde das Gel für 5-10 min ebenfalls auf einem Schüttler in eine Färbelösung gelegt. Die Färbelösung enthielt u. a. Coomassie Brilliant Blue R-250, welches sich an die basischen und aromatischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert und so Proteine anfärben kann. Da der Farbstoff jedoch das gesamte Gel blau färbt, wurde das Gel fünf Mal für 20 min in Wasser gewaschen und über Nacht in eine Entfärbelösung auf einem Schüttler gelegt. So blieben lediglich die Proteinbanden blau gefärbt. Zum Schluss wurde bei weißem Licht mit einem *imager* ein Foto aufgenommen. Je mehr von einem Protein mit dem Urin ausgeschieden wird, desto ausgeprägter ist die jeweilige Proteinbande. Die Lauffront stellt hierbei ein Maß für die Konzentrierung des Urins dar.

2.4.6 Molekulargenetische Methoden

2.4.6.1 RNA-Isolation aus Glomeruli

Die RNA wurde aus den Glomeruli mit dem RNeasy Mini-Kit von Quiagen isoliert. Nach der Isolierung der Glomeruli wurden diese in 300 µL RLT-Puffer bei -20 °C gelagert. Dem RLT-Puffer wurde zuvor β-Mercaptoethanol (10 µL pro 1 mL RLT) zugefügt. In dem RLT-Puffer lysierte das Gewebe. Guanidinisothiozyanat ist Bestandteil des RLT-Puffers und denaturiert zusammen mit β-Mercaptoethanol Proteine. Dadurch werden die äußerst stabilen RNasen, die bei der Lyse der Zellen freigesetzt werden, inaktiviert.

Die RNA wurde bei Raumtemperatur an einem speziell gereinigten RNA-Arbeitsplatz isoliert, um Kontaminationen zu vermeiden. Zunächst wurde jeweils das Lysat der Glomeruli einer Niere in eine sterile Röhre überführt und mit einem Tissue Ruptor bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Danach wurde das Lysat wieder in ein 2-mL-Eppendorf-Gefäß überführt und für 3 min bei maximaler Beschleunigung von 21.100 x g zentrifugiert. Der Überstand

wurde dann auf eine genomische DNA (gDNA)-Säule gegeben und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die gDNA-Säule bindet die gDNA und eliminiert sie so aus der Flüssigkeit. Die gDNA-Säule wurde verworfen. Zur aufgefangenen Flüssigkeit wurde nun die gleiche Menge an 70%igem Ethanol dazugegeben und beides wurde miteinander vermischt.

Das Gemisch wurde nun auf eine RNA-Säule gegeben. Die RNA-Säule hat eine Silika-Membran, welche bis zu 100 µg RNA bindet. Ethanol bewirkt, dass sich zwischen den Hydroxid-Molekülen der Silika-Membran und den RNA-Molekülen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, und verstärkt somit die Bindung der RNA an die Membran. Das Gemisch wurde nun in der RNA-Säule für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen. Auf die RNA-Säule wurden nun 350 µL RW1-Puffer gegeben. RW1-Puffer ist ein Waschpuffer, der hauptsächlich Proteine, Kohlenhydrate und Fettsäuren entfernt. Die RNA-Säule wurde erneut für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert und die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen.

Danach wurde die RNA mit DNase behandelt. Hierzu wurden je Probe 10 µL DNase I mit 70 µL RDD-Puffer vermischt und 75 µL des Gemisches auf die RNA-Säule gegeben. Durch die DNase kann potentiell vorhandene DNA verdaut werden. Der DNA-Verdau dauerte 15 min.

Danach wurde die RNA erneut mit 350 µL RW1-Puffer gewaschen, bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert und die aufgefangene Flüssigkeit verworfen. Nun wurden 500 µL RPE-Puffer auf die RNA-Säule gegeben. RPE-Puffer ist ebenfalls ein Waschpuffer, der insbesondere Salzreste entfernt, die durch die Behandlung mit vorherigen Waschpuffern unspezifisch an die Membran gebunden sind. Die RNA-Säule wurde für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert und die aufgefangene Flüssigkeit verworfen. Danach wurde die RNA ein weiteres Mal mit 500 µL RPE-Puffer gewaschen und bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert. Es wurde ein weiteres Mal bei maximaler Beschleunigung für 2 min zentrifugiert.

Die Säule wurde in ein 1,5-mL-Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden 50 µL RNase-freies Wasser auf die RNA-Säule gegeben. Dann wurde für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren und im Eppendorf-Gefäß aufzufangen.

2.4.6.2 RNA-Konzentrationsmessung

Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 2000c Spectrophotometer von Thermo Scientific bestimmt. Hierbei wird die Absorption (A) von Licht durch eine absorbierende Substanz gemessen, die nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz ist. Das Absorptionsmaximum für RNA liegt bei 260 nm. Somit kann bei Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm die RNA-Konzentration bestimmt werden. Das NanoDrop Spectrophotometer misst weiterhin die Absorption von Licht in einem Bereich von 220 bis 350 nm. Dadurch kann zusätzlich die Reinheit der RNA überprüft werden. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf und Kohlenhydrate bei 230 nm. Ein Verhältnis von A_{260}/A_{280} und von A_{260}/A_{230} über jeweils 2,0 spricht gegen eine Kontamination durch Proteine oder Kohlenhydrate.

2.4.6.3 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die gewonnene RNA in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Für diesen Prozess wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet.

Zunächst wurde die RNA mit einem gDNA Wipeout Buffer (7x) behandelt, um potenziell vorhandene gDNA zu eliminieren. Dafür wurden 10 µL RNA mit 2 µL gDNA Wipeout Buffer (7x) und 2 µL RNase-freiem Wasser versetzt und für 3 min bei 42 °C inkubiert. Da die Konzentration der RNA 750 ng/µL nicht überschritt, konnte die RNA unverdünnt eingesetzt werden. Nach der Inkubationszeit von 3 min wurde das Gemisch sofort auf Eis gestellt, um eine RNA-Degradierung zu verhindern. Von dem Gemisch wurden nun 0,5 µL

entnommen, um später den gDNA-Verdau mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu überprüfen.

Anschließend erfolgte die eigentliche Reverse Transkription. Der Rest des Gemischs wurde mit 0,5 µL RNase-freiem Wasser, 1 µL Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µL Quantiscript RT Buffer (5x) und 1 µL RT Primer Mix versetzt. Quantiscript Reverse Transcriptase enthält sowohl das Enzym Reverse Transkriptase als auch einen RNase-Inhibitor. In dem Quantiscript RT Buffer sind Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) enthalten. Das Gemisch wurde für 25 min bei 42 °C inkubiert. Die Primer aus dem RT Primer Mix lagern sich nun an die RNA an und die Reverse Transkriptase kann die cDNA synthetisieren.

Die Reverse Transkriptase hat drei Funktionen. Zum einen fungiert sie als eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie nutzt die RNA als Matrix und synthetisiert einen dazu komplementären DNA-Strang unter Verwendung der dNTPs. Dadurch entsteht ein RNA-DNA-Hybrid. Zum anderen verfügt die Reverse Transkriptase über eine Exoribonukleaseaktivität. Dadurch kann sie das RNA-DNA-Hybrid hydrolysieren, sodass der RNA- und DNA-Strang einzeln vorliegen. Zum Schluss verfügt die Reverse Transkriptase noch über die Aktivität einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Diese nutzt nun den DNA-Einzelstrang als Matrix und synthetisiert einen dazu komplementären DNA-Strang. Die daraus entstandene doppelsträngige DNA ist die cDNA, die nun für die PCR verwendet werden kann.

Nach einer Inkubationszeit von 25 min wurde das Gemisch für 3 min bei 95 °C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Um eine Kontamination mit gDNA auszuschließen, wurde mithilfe eines Primers für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eine Kontroll-PCR mit 40 Zyklen durchgeführt. GAPDH ist ein *housekeeping*-Gen, wird also ubiquitär exprimiert. Als Proben wurden die RNA aus der RNA-Isolation, die

RNA nach Behandlung mit dem gDNA Wipeout Buffer und die cDNA verwendet.

2.4.6.4 PCR

Bei der PCR wird eine spezifische Zielsequenz der DNA amplifiziert. Zuerst wurde bei 4 °C eine Gesamtmischung für alle Proben hergestellt. Diese beinhaltete je Probe 16,78 µL HPLC-Wasser, 2 µL PCR Buffer (10x), 0,4 µL dNTPs, je 0,1 µL Primer (vor- und rückwärts) und 0,12 µL HotStarTaq DNA-Polymerase (Quiagen). 19,5 µL der Gesamtmischung wurden jeweils mit 0,5 µL Probe in einem 0,5 mL PCR-Röhrchen gemischt. Diese durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

- | | | |
|----|-------|--------|
| 1. | 95 °C | 15 min |
| 2. | 95 °C | 30 s |
| | 58 °C | 30 s |
| | 72 °C | 30 s |
| 3. | 72 °C | 5 min |

Im ersten Schritt wurden die Proben bei 95 °C für 15 min inkubiert. Dieser Schritt war erforderlich, um die DNA-Polymerase zu aktivieren.

Der zweite Schritt bestand aus drei Zwischenschritten: Denaturierung, *annealing* und Elongation. Bei 95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen aufgebrochen, die DNA wird also denaturiert. Bei 58 °C kommt es zur Primer-Hybridisierung, d. h. die Primer binden spezifisch an die komplementären Nukleotidsequenzen der DNA. Dieser Vorgang wird auch als *annealing* bezeichnet. Bei 72 °C wird dann die optimale Temperatur für die DNA-Polymerase erreicht. Die DNA-Polymerase nutzt den DNA-Strang als Matrix und synthetisiert einen dazu komplementären DNA-Strang unter Verbrauch der dNTPs. Der gesamte zweite Schritt wurde 39-mal wiederholt.

Im dritten Schritt folgte dann eine verlängerte Synthesephase von 5 min bei 72 °C. Danach wurden die Proben automatisch auf 4 °C heruntergekühlt.

Im Anschluss wurden die Produkte elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht es, die DNA-Produkte nach ihrer Größe aufzutrennen. Hierfür wurden Agarose-Gele mit einer Konzentration von 1,5-2 % gewählt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer 1x aufgekocht, bis sich das Pulver gelöst hatte, und Ethidiumbromid (4 Tropfen auf 100 mL) wurde hinzugefügt. Anschließend wurde die Agarose-Lösung auf einen Gelträger gegossen.

Die PCR-Produkte wurden mit 4 µL Orange G 20x, einem Farbstoff, versetzt. Als Größenmarker wurde der Basenpaarmarker 100 bp DNA Ladder von New England Biolabs verwendet.

Für die Elektrophorese wurde TAE-Puffer 1x als Laufpuffer verwendet. Bei einer Spannung von 90 V wurden die PCR-Produkte nun der Größe nach aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Produkte unter UV-Licht in einem *imager* sichtbar gemacht. Unter UV-Beleuchtung wird Ethidiumbromid angeregt und emittiert Lichtstrahlen. Da es zwischen den Basen der DNA interkaliert, verändert sich das Absorptionsspektrum. Die fluoreszierende Wirkung wird verstärkt. Somit können die DNA-Produkte visuell dargestellt werden.

2.4.6.6 Quantitative PCR (*real-time-PCR*)

2.4.6.6.1 Gradienten-PCR

Mit der Gradienten-PCR wird die optimale Temperatur für das *annealing* der Primer ermittelt. Dadurch wird verhindert, dass die Primer unspezifisch durch eine zu niedrige Temperatur oder gar nicht durch eine zu hohe Temperatur binden. Die PCR lief wie in Kapitel 2.4.6.4 beschrieben ab. Zusätzlich wurde ein Gradient von $58\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ für die *annealing*-Phase eingestellt, sodass die Proben unterschiedliche *annealing*-Temperaturen durchliefen. Anschließend

wurden die Proben auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand dessen die optimale *annealing*-Temperatur ausgewählt.

2.4.6.6.2 Schmelzkurvenanalyse

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die optimale Temperatur für die Fluoreszenzmessung bei der *real-time*-PCR ermittelt, um eine Fluoreszenzverstärkung durch unspezifische Produkte wie z. B. Primer-Dimere zu verhindern. Dazu wurde nach der PCR die Temperatur kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C erhöht und gleichzeitig die Fluoreszenz gemessen. Wenn die spezifische Schmelztemperatur einer DNA-Sequenz erreicht wird, dissoziieren die DNA-Stränge in Einzelstränge. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff wieder abgegeben. In der Messung nimmt dann das Fluoreszenzsignal ab. Da die Zielsequenz wesentlich länger ist als die Sequenz der Primer-Dimere und somit eine höhere Schmelztemperatur aufweist, können die PCR-Produkte so voneinander unterschieden werden. Somit kann die Temperatur der Fluoreszenzmessung an die Schmelztemperatur der Zielsequenz angepasst werden.

2.4.6.6.3 Quantitative *real-time*-PCR

Bei der quantitativen *real-time*-PCR wird wie bei der ursprünglichen PCR eine spezifische Zielsequenz der DNA (Zielgen) amplifiziert und anschließend quantifiziert. Für die *real-time*-PCR wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix verwendet. Dieser enthält u. a. einen Fluoreszenzfarbstoff, eine Taq-Polymerase und dNTPs. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen den Basen der DNA, wodurch das Fluoreszenzsignal verstärkt wird. Dies ermöglicht eine Quantifizierung der amplifizierten DNA, da es durch die Zunahme der DNA zur Fluoreszenzverstärkung kommt.

Zu Beginn wurde bei 4 °C eine Gesamtmischung hergestellt aus 8,5 µL HPLC-Wasser, 10 µL des Power SYBR® Green PCR Master Mixes und je 0,25 µL der Primer (vor- und rückwärts). Für die *real-time*-PCR wurden 96-*well*-Platten verwendet. 19 µL der Gesamtmischung wurden mit jeweils 1 µL der Probe

gemischt. Die Proben wurden doppelt angesetzt. Danach wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt und kurz anzentrifugiert. Mit dem 7300 System von Applied Biosystems konnte dann die *real-time*-PCR durchgeführt werden.

Die Proben durchliefen das gleiche Protokoll wie bei der PCR, allerdings wurde für die *annealing*-Phase die vorher bestimmte Temperatur eingestellt. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz bei der für die Zielsequenz spezifischen Temperatur gemessen. Aus den Fluoreszenzsignalen wurde ein Graph erstellt. Aus diesem Graphen konnte dann der Zyklus ermittelt werden, in welchem das Fluoreszenzsignal am stärksten zunahm. Dieser Zyklus wird als *cycle threshold* (Ct) bezeichnet.

Als *housekeeping*-Gen wurde 18s verwendet. Da dieses Gen in allen Zellen exprimiert wird, dient es als Referenzwert.

Die relative Expression (E) für ein bestimmtes Zielgen bei einem Versuchstier wurde dann wie folgt ermittelt:

$$E_{\text{Zielgen}} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{max,Zielgen}} - (Ct_{\text{Zielgen}} + \Delta Ct_{\text{housekeeping-Gen}})$$

$$\Delta Ct_{\text{housekeeping-Gen}} = Ct_{\text{max,housekeeping-Gen}} - Ct_{\text{housekeeping-Gen}}$$

Ct_{max}: höchster Ct-Wert für ein Gen unter allen Versuchstieren

Für die statistische Auswertung wurde die relative Expression des Zielgens eines Versuchstieres jeweils auf den Mittelwert der relativen Expression des Zielgens innerhalb der Kontrollgruppe bezogen. Die Kontrollgruppe setzte sich aus den Wildtyp-Mäusen zusammen. Aus der relativen Expression des Zielgens für ein Versuchstier und dem Mittelwert aus der Kontrollgruppe konnte dann ein Quotient (Ratio) gebildet werden, anhand dessen die Daten ausgewertet wurden:

$$Ratio = \frac{E_{Zielgen}}{MW(E_{Zielgen, Kontrolle})}$$

MW: Mittelwert

2.4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Eva Königshausen. Zur statistischen Auswertung wurde die GraphPad Prism Software verwendet. Die Stichprobenanzahl je Gruppe wurde unter n angegeben. Es wurden Mittelwert, Standardfehler und Median bestimmt. Die Verteilung des Stichprobenumfangs wurde mit dem D'Agostino-Pearson-Test überprüft. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde je nach Verteilung mithilfe des Mann-Whitney-U- oder t-Tests ermittelt. Als statistisch signifikant wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinausscheidung im Urin von GLEPP1-knockout-Mäusen

Um zu untersuchen, ob eine Defizienz von GLEPP1 zu einer Albuminurie führt, wurde die Albuminausscheidung von GLEPP1-knockout-Mäusen näher betrachtet. Albumin ist das Leitprotein der glomerulären Proteinurie. Aus diesem Grund wurde die ACR im Urin von vier und zehn Monate alten, männlichen GLEPP1-knockout-Mäusen bestimmt. Zur Kontrollgruppe zählten männliche Wildtyp-Mäuse im gleichen Alter.

Zusätzlich wurden aus jeder Altersgruppe der GLEPP1-knockout- und Wildtyp-Mäuse exemplarisch Mäurine ausgewählt und anhand dieser Coomassie-Gele angefertigt. Hierbei wurden auch sechs Monate alte GLEPP1-knockout- und Wildtyp-Mäuse untersucht. Das Coomassie-Gel der Altersgruppe sechs Monate wurde in Kooperation mit Frau Dr. med. Eva Königshausen erstellt. Mithilfe der Coomassie-Gele konnte die Albuminurie in einem semiquantitativen Verfahren bestätigt werden.

Nachfolgend sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3.1.1 Zeitpunkt vier Monate

Innerhalb der Altersgruppe von vier Monaten wurde die ACR aus dem Urin von elf Wildtyp- und neun GLEPP1-knockout-Mäusen bestimmt (Abb. 3.1). Die Wildtyp-Mäuse schieden $61,42 \pm 14,40$ mg Albumin pro Gramm Kreatinin aus. Die GLEPP1-knockout-Mäuse schieden $81,73 \pm 16,10$ mg Albumin pro Gramm Kreatinin aus. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ACR der GLEPP1-knockout- und Wildtyp-Mäuse ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Im Coomassie-Gel wurde der Urin von jeweils vier Wildtyp- und GLEPP1-knockout-Mäusen miteinander verglichen (Abb. 3.2). Auch hier unterschied sich die Albuminausscheidung beider Gruppen nicht.

Die Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht (Weigel, 2018).

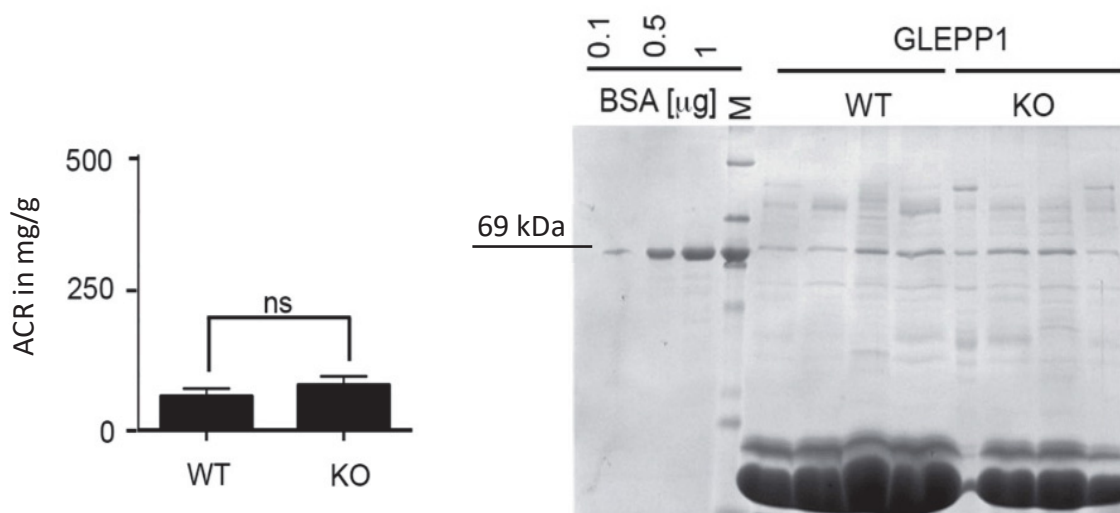


Abb. 3.1: ACR zum Zeitpunkt von vier Monaten. Die ACR wurde in mg/g Kreatinin angegeben. Links dargestellt ist die Wildtyp-Gruppe (WT) mit $n=11$. Rechts dargestellt ist die GLEPP1-*knockout*-Gruppe (KO) mit $n=9$. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor (ns: $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt. Die Abbildung wurde bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht (Weigel, 2018).

Abb. 3.2: Coomassie-Gel zum Zeitpunkt von vier Monaten. Links dargestellt ist der BSA-Standard in den Mengen 0,1 μg, 0,5 μg und 1 μg und darauffolgend unter M der Proteinmarker. Unter WT ist die Wildtyp-Gruppe ($n=4$) und unter KO die GLEPP1-*knockout*-Gruppe ($n=4$) dargestellt. Bei 69 kDa findet sich die Albuminbande. Unten erkennbar ist die Lauffront. Die Lauffront ist ein Maß für die Konzentrierung des Urins.

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt. Die Abbildung wurde bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht (Weigel, 2018).

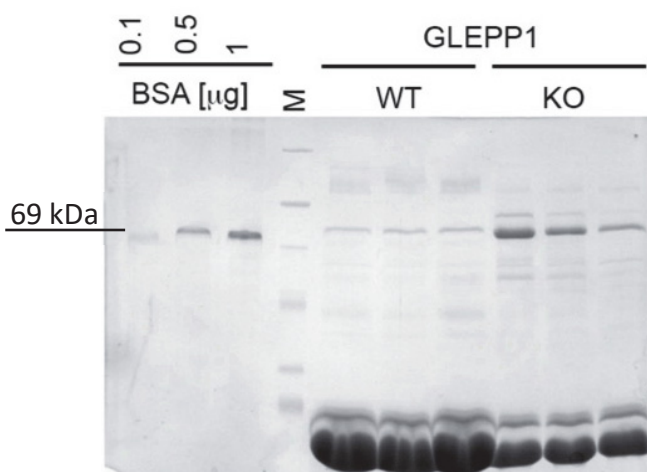
3.1.2 Zeitpunkt sechs Monate

Im folgenden Coomassie-Gel ist der Urin von jeweils drei sechs Monate alten Wildtyp- und GLEPP1-*knockout*-Mäusen dargestellt (Abb. 3.3). Die Lauffront legt dar, dass keine relevanten Unterschiede bezüglich der Konzentrierung des

Urins vorlagen. Die Albuminbande bei 69 kDa hingegen ist sichtbar stärker bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen ausgeprägt, was eine Albuminurie vermuten lässt.

Der Versuch wurde in Kooperation mit Frau Dr. med. Eva Königshausen durchgeführt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht (Weigel, 2018).

Abb. 3.3: Coomassie-Gel zum Zeitpunkt von sechs Monaten. Links dargestellt ist der BSA-Standard in den Mengen 0,1 µg, 0,5 µg und 1 µg und darauffolgend unter M der Proteinmarker. Unter WT ist die Wildtyp-Gruppe (n=3) und unter KO die GLEPP1-*knockout*-Gruppe (n=3) dargestellt. Bei 69 kDa findet sich die Albuminbande. Unten erkennbar ist die Lauffront. Die Lauffront ist ein Maß für die Konzentrierung des Urins.



Der Versuch wurde von mir in Kooperation mit Frau Dr. med. Eva Königshausen durchgeführt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert (Weigel, 2018).

3.1.3 Zeitpunkt zehn Monate

Innerhalb der Altersgruppe von zehn Monaten wurde die ACR aus dem Urin von 18 Wildtyp- und 13 GLEPP1-*knockout*-Mäusen bestimmt (Abb. 3.4). Die ACR der Wildtyp-Mäuse lag bei $59,83 \pm 12,73$ mg/g Kreatinin. Die ACR der GLEPP1-*knockout*-Mäuse lag bei $95,01 \pm 24,71$ mg/g Kreatinin. Die GLEPP1-*knockout*-Mäuse schieden signifikant mehr Albumin pro Gramm Kreatinin aus als die Wildtyp-Mäuse ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die ACR der GLEPP1-*knockout*-Mäuse entsprach einer Mikroalbuminurie.

Für das Coomassie-Gel wurde der Urin von fünf Wildtyp- und sechs GLEPP1-*knockout*-Mäusen ausgewählt (Abb. 3.5). Auch hier war die Albuminmenge im Urin der GLEPP1-*knockout*-Mäuse nachweislich größer als im Urin der Wildtyp-Mäuse.

Die Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt. Die Ergebnisse sind bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert worden (Weigel, 2018).

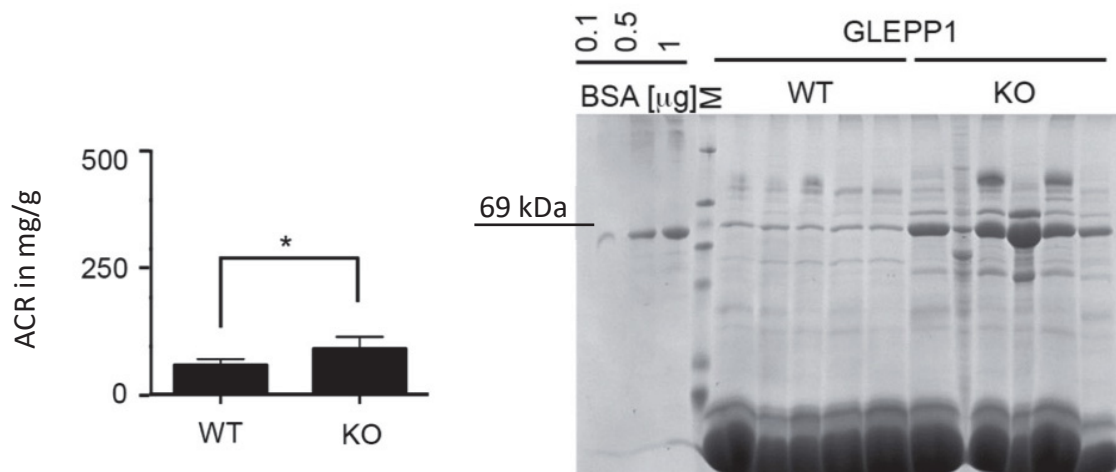


Abb. 3.4: ACR zum Zeitpunkt von zehn Monaten. Die ACR wurde in mg/g Kreatinin angegeben. Links dargestellt ist die Wildtyp-Gruppe (WT) mit $n=18$. Rechts dargestellt ist die GLEPP1-*knockout*-Gruppe (KO) mit $n=13$. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. Die GLEPP1-*knockout*-Gruppe weist signifikant höhere ACR-Werte auf (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt und ist bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert worden (Weigel, 2018).

Abb. 3.5: Coomassie-Gel zum Zeitpunkt von zehn Monaten. Links dargestellt ist der BSA-Standard in den Mengen 0,1 μg , 0,5 μg und 1 μg und darauffolgend unter M der Proteinmarker. Unter WT ist die Wildtyp-Gruppe ($n=5$) und unter KO die GLEPP1-*knockout*-Gruppe ($n=6$) dargestellt. Bei 69 kDa findet sich die Albuminbande. Unten erkennbar ist die Lauffront. Die Lauffront ist ein Maß für die Konzentrierung des Urins.

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt und ist bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert worden (Weigel, 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Mausmodell der glomeruläre Filter bei einer Defizienz von GLEPP1 seine Selektivität für Albumin verliert und eine Albuminurie entsteht. Bei GLEPP1-*knockout*-Mäusen manifestierte sich dieses Bild zwischen dem vierten und zehnten Monat.

3.2 Morphologie des glomerulären Filters bei GLEPP1-*knockout*-Mäusen

Um festzustellen, ob mit einer Defizienz von GLEPP1 neben der Albuminurie auch morphologische Veränderungen des glomerulären Filters einhergehen, wurden die Nieren der GLEPP1-*knockout*-Mäuse unter dem Licht- und dem Elektronenmikroskop untersucht. Verglichen wurden sie mit den Nieren der gleichaltrigen Wildtyp-Mäuse. Die Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech fertigte die Aufnahmen an. Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde das Gewebe mittels der *periodic-acid*-Schiff-Reaktion (PAS) angefärbt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop angefertigt.

3.2.1 Zeitpunkt vier Monate

Die vier Monate alten GLEPP1-*knockout*- und Wildtyp-Mäuse wurden von mir eigenständig operiert. Die entnommenen Organe wurden von mir eigenständig präpariert und an die Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech versandt. Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden dort angefertigt. Die Daten sind bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht worden (Weigel, 2018).

Die Nieren der vier Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse wiesen unter dem Lichtmikroskop keine Auffälligkeiten auf. Die Glomeruli unterschieden sich nicht von den Glomeruli der Wildtyp-Mäuse. In Abb. 3.6 ist beispielhaft ein Glomerulum einer vier Monate alten GLEPP1-*knockout*-Maus dargestellt. Zu sehen ist das Kapillarknäuel mit seiner dazugehörigen Bowman'schen Kapsel. Um das Glomerulum herum befinden sich Tubuli. Zum Vergleich ist ebenfalls

ein Glomerulum einer vier Monate alten Wildtyp-Maus abgebildet. In beiden Fällen liegt ein physiologischer Befund vor.

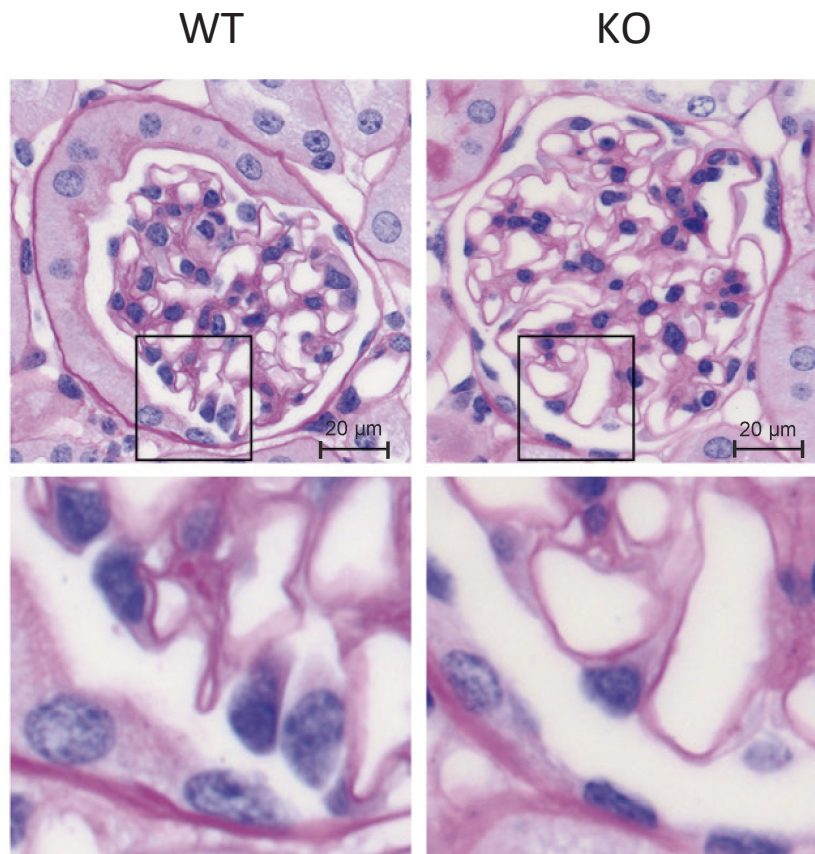


Abb. 3.6: Lichtmikroskopische Aufnahme eines PAS-gefärbten Glomerulums einer vier Monate alten Wildtyp- und GLEPP1-*knockout*-Maus. Links dargestellt ist das Glomerulum der Wildtyp-Maus (WT). Rechts dargestellt ist das Glomerulum der GLEPP1-*knockout*-Maus (KO). Beide Glomeruli sind physiologisch konfiguriert. Vergrößerung 450x.

Die Organentnahme und die Präparation der Organe erfolgten eigenständig durch mich. Die Schnitte sowie die Aufnahmen wurden von der Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech angefertigt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert (Weigel, 2018).

Elektronenmikroskopisch zeigten sich für die Glomeruli der vier Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse verglichen mit den Glomeruli der vier Monate alten Wildtyp-Mäuse ebenfalls keine Auffälligkeiten. Der glomeruläre Filter bestehend

aus fenestriertem Endothel, GBM und den Fußfortsätzen der Podozyten war jeweils physiologisch konfiguriert (Abb. 3.7).

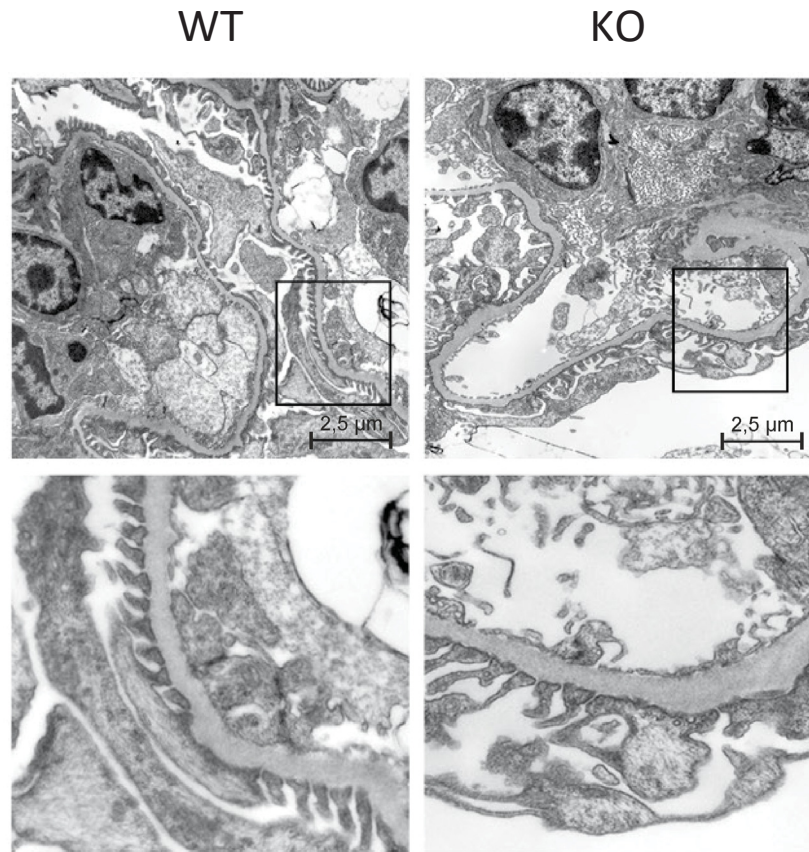


Abb. 3.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums einer vier Monate alten Wildtyp- und GLEPP1-*knockout*-Maus. Links dargestellt ist das Glomerulum der Wildtyp-Maus (WT). Rechts dargestellt ist das Glomerulum der GLEPP1-*knockout*-Maus (KO). Es handelt sich jeweils um einen physiologischen Befund. Vergrößerung 4200x.

3.2.2 Zeitpunkt sechs Monate

Die Organentnahme der sechs Monate alten GLEPP1-*knockout*- und Wildtyp-Mäuse erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Christian Weigel. Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch die Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech erstellt. Die Daten sind bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht worden (Weigel, 2018).

Die sechs Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse wiesen lichtmikroskopisch innerhalb der Glomeruli PAS-positive Areale auf (Abb. 3.8). Die PAS-positiven Areale waren subpodozytär lokalisiert. Die genaue Lokalisation ließ sich allerdings lichtmikroskopisch nicht feststellen. Die PAS-positiven Areale traten nur segmental auf. Innerhalb der Glomeruli der sechs Monate alten Wildtyp-Mäuse waren solche PAS-positiven Areale nicht festzustellen.

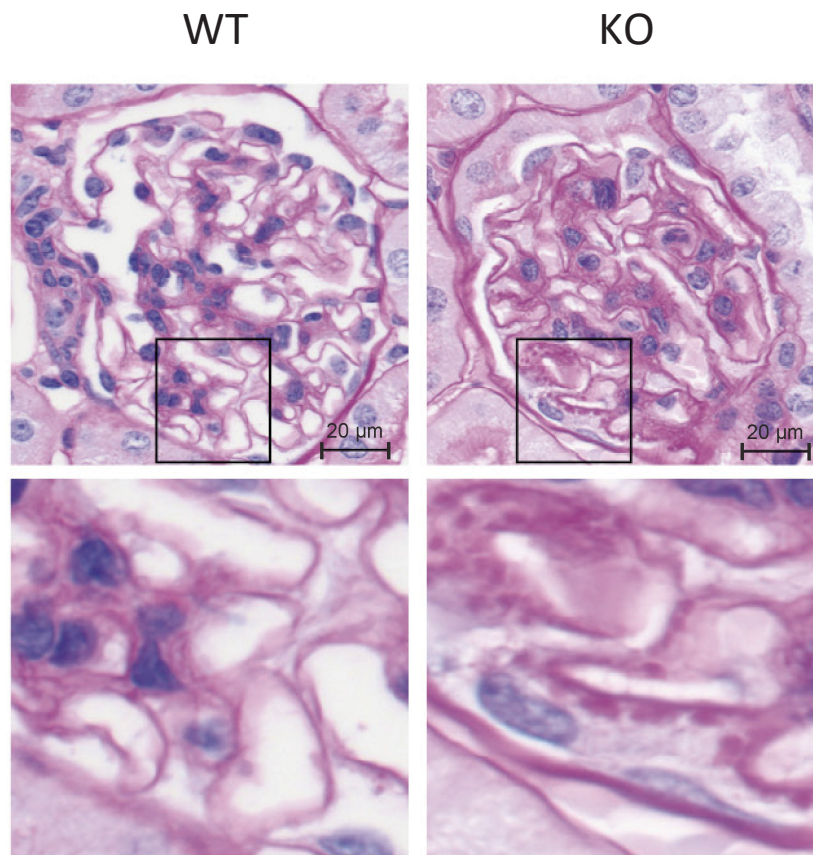


Abb. 3.8: Lichtmikroskopische Aufnahme eines PAS-gefärbten Glomerulums einer sechs Monate alten Wildtyp- und GLEPP1-*knockout*-Maus. Links dargestellt ist das Glomerulum der Wildtyp-Maus (WT). Rechts dargestellt ist das Glomerulum der GLEPP1-*knockout*-Maus (KO). Es fallen subpodozytär gelegene, PAS-positive Areale in dem Glomerulum der GLEPP1-*knockout*-Maus auf. Vergrößerung 450x.

Die Organentnahme und die Präparation der Organe erfolgten durch mich in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Christian Weigel. Die Schnitte sowie die Aufnahmen wurden von der Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech angefertigt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert (Weigel, 2018).

Elektronenmikroskopisch war innerhalb der Glomeruli der sechs Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse ein abnorm konfigurierter glomerulärer Filter erkennbar (Abb. 3.9). Zum einen war die GBM an multiplen Stellen verdickt und stülpte sich dort in Richtung der Podozyten vor. Diese Ausstülpungen, sog. *humps*, waren höckerartig geformt. Zum anderen verloren die Podozyten über diesen *humps* ihre Kontur. Die Fußfortsätze der Podozyten verschmolzen miteinander und ließen sich nicht mehr klar voneinander differenzieren, sog. beginnendes *foot process effacement*. In den Glomeruli der sechs Monate alten Wildtyp-Mäuse hingegen waren elektronenmikroskopisch keine Abnormitäten nachweisbar. Die GBM sowie die Podozyten zeigten jeweils ihre physiologische Form.

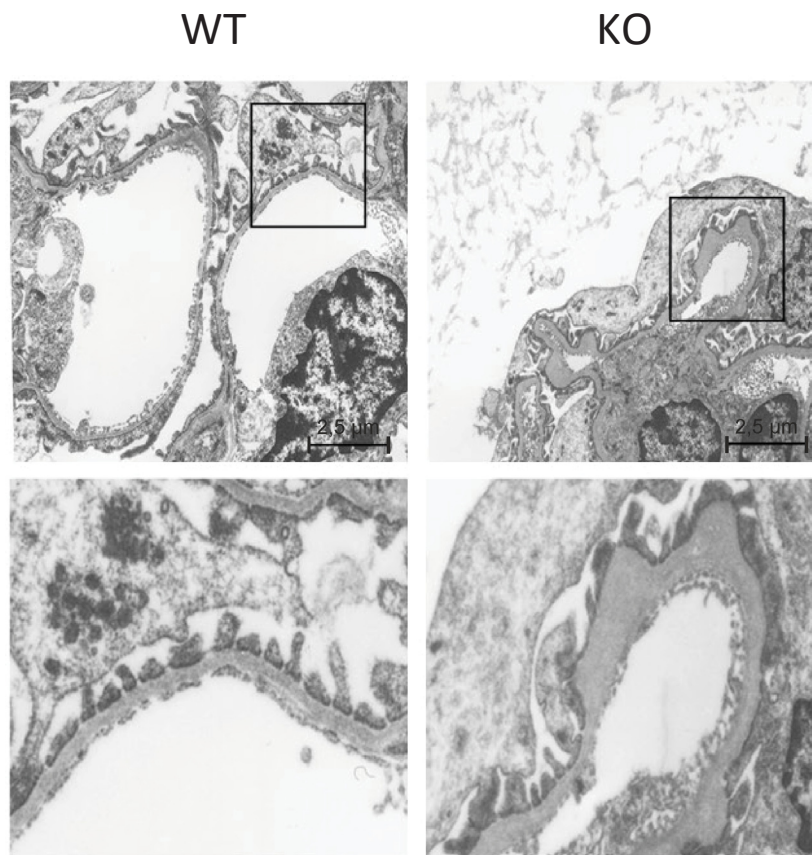


Abb. 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums einer sechs Monate alten Wildtyp- und GLEPP1-*knockout*-Maus. Links dargestellt ist das Glomerulum der Wildtyp-Maus (WT). Rechts dargestellt ist das Glomerulum der GLEPP1-*knockout*-Maus (KO). Es fallen lokalisierte höckerartige Verdickungen der GBM, sog. *humps*, der GLEPP1-*knockout*-Maus auf. Über diesen *humps* ist eine Verschmelzung der Fußfortsätze erkennbar. Vergrößerung 4200x.

Die Organentnahme und die Präparation der Organe erfolgten durch mich in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Christian Weigel. Die Schnitte sowie die Aufnahmen wurden von der Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech angefertigt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert (Weigel, 2018).

Für die statistische Auswertung wurde die Anzahl der *humps* pro Glomerulum in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von den Wildtyp- sowie GLEPP1-*knockout*-Mäusen bestimmt (Abb. 3.10). Die Auszählung erfolgte manuell. Es

sind jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Beim Wildtyp konnten keine *humps* festgestellt werden (n=4). Im Vergleich dazu ergab sich innerhalb der Glomeruli der GLEPP1-*knockout*-Mäuse eine *hump*-Frequenz von $3,27 \pm 0,59$ *humps*/Glomerulum (n=11). Insgesamt fielen somit signifikant mehr *humps* pro Glomerulum beim GLEPP1-*knockout* auf ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test).

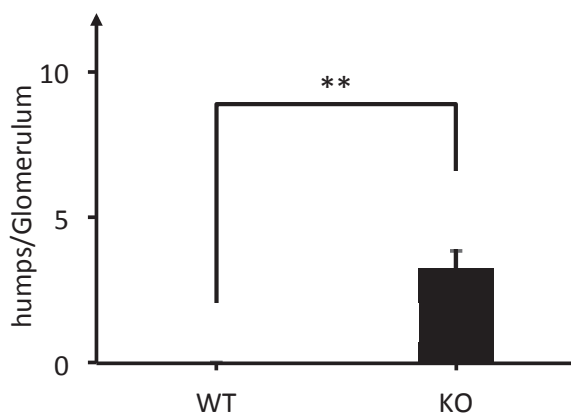


Abb. 3.10: *hump*-Frequenz zum Zeitpunkt von 6 Monaten. Die *hump*-Frequenz ist angegeben in *humps*/Glomerulum. Links ist die *hump*-Frequenz innerhalb der Glomeruli der Wildtyp-Mäuse (WT) dargestellt mit n=4, rechts ist die *hump*-Frequenz der GLEPP1-*knockout*-Mäuse (KO) dargestellt mit n=11. Abgebildet sind der Mittelwerte + Standardfehler. Bei den Wildtyp-Mäusen konnten keine *humps* festgestellt werden. Innerhalb der Glomeruli der GLEPP1-*knockout*-Mäuse ist die *hump*-Frequenz signifikant höher (** $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test).

3.2.3 Zeitpunkt zehn Monate

Die Operation und die Organentnahme der zehn Monate alten GLEPP1-*knockout*- und Wildtyp-Mäuse erfolgten eigenständig durch mich. Die Aufnahmen wurden wie zuvor durch die Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech erstellt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht (Weigel, 2018).

Die Glomeruli der zehn Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse wiesen lichtmikroskopisch ähnlich wie die Glomeruli der sechs Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse vereinzelt PAS-positive Areale auf (Abb. 3.11). In den Glomeruli der Wildtyp-Mäuse waren ebenfalls PAS-positive Areale zu erkennen.

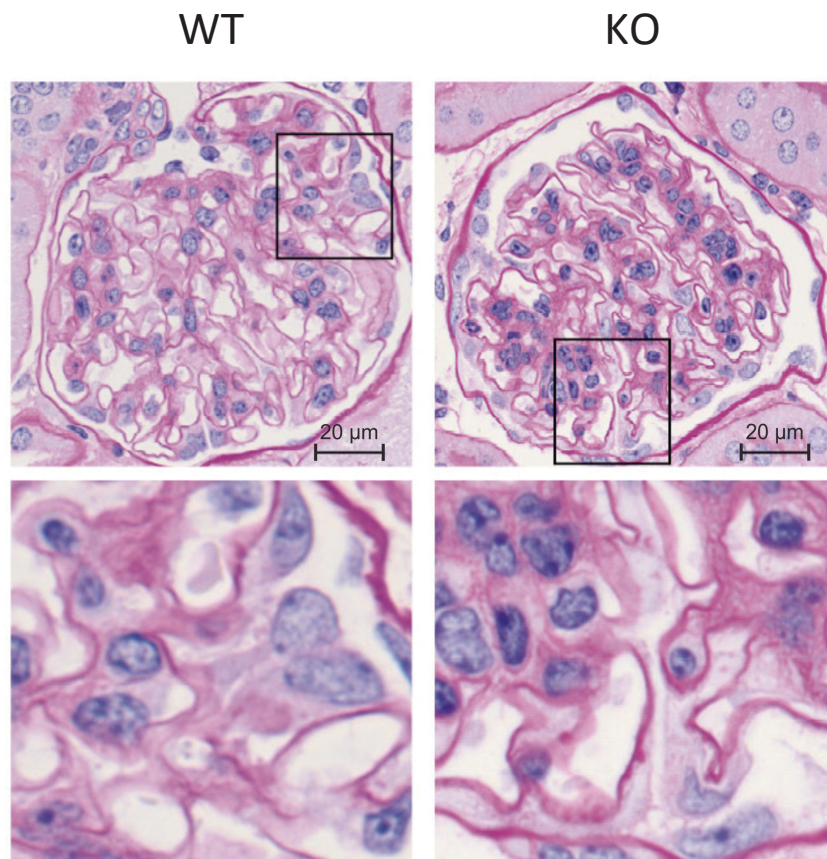


Abb. 3.11: Lichtmikroskopische Aufnahme eines PAS-gefärbten Glomerulums einer zehn Monate alten Wildtyp- und GLEPP1-knockout-Maus. Links dargestellt ist das Glomerulum der Wildtyp-Maus (WT). Rechts dargestellt ist das Glomerulum der GLEPP1-knockout-Maus (KO). In beiden Glomeruli sind PAS-positive Areale erkennbar. Vergrößerung 450x.

Die Organentnahme und die Präparation der Organe erfolgten eigenständig durch mich. Die Schnitte sowie die Aufnahmen wurden von der Nephropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech angefertigt. Die Daten wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert (Weigel, 2018).

Auch elektronenmikroskopisch zeigte sich bei den zehn Monate alten GLEPP1-knockout-Mäusen ein ähnliches Bild wie zum Zeitpunkt von sechs Monaten (Abb. 3.12). Die GBM wies multiple *humps* auf, die sich auf die Seite der Podozyten vorstülpten. Die Fußfortsätze der Podozyten waren miteinander verschmolzen und ließen sich nicht mehr klar voneinander trennen. Es waren

aber auch vereinzelt *humps* innerhalb der GBM der Wildtyp-Mäuse erkennbar. Ein *podocyte foot process effacement* war beim Wildtyp nicht festzustellen.

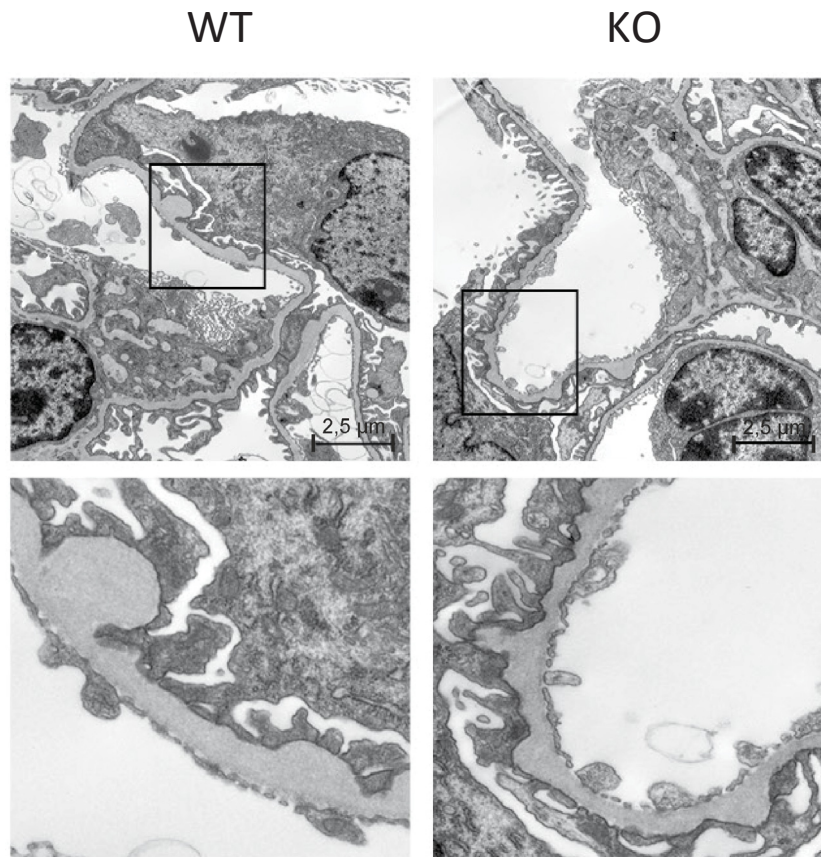


Abb. 3.12: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums einer zehn Monate alten Wildtyp- und GLEPP1-*knockout*-Maus. Links dargestellt ist das Glomerulum der Wildtyp-Maus (WT). Rechts dargestellt ist das Glomerulum der GLEPP1-*knockout*-Maus (KO). In beiden Aufnahmen sind lokalisierte höckerartige Verdickungen der GBM erkennbar, rechts zusätzlich verschmolzene Fußfortsätze über den Ausstülpungen. Vergrößerung 4200x.

In Abb. 3.13 ist die *hump*-Frequenz innerhalb der Glomeruli der Wildtyp- sowie der GLEPP1-*knockout*-Mäuse zum Zeitpunkt von zehn Monaten abgebildet. Die Auszählung erfolgte manuell. Im Folgenden sind wieder die Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Für die Wildtyp-Mäuse ergab sich eine *hump*-Frequenz von $0,33 \pm 0,33$ *humps*/Glomerulum ($n=3$). Für die GLEPP1-*knockout*-Mäuse ergab sich eine *hump*-Frequenz von $1,50 \pm 0,50$

humps/Glomerulum (n=10). Die *hump*-Frequenz innerhalb der Glomeruli der GLEPP1-*knockout*-Mäuse war tendenziell höher als in den Glomeruli der Wildtyp-Mäuse. Der Unterschied erwies sich nicht als signifikant ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test), was am ehesten auf die kleine Stichprobenzahl zurückzuführen ist.

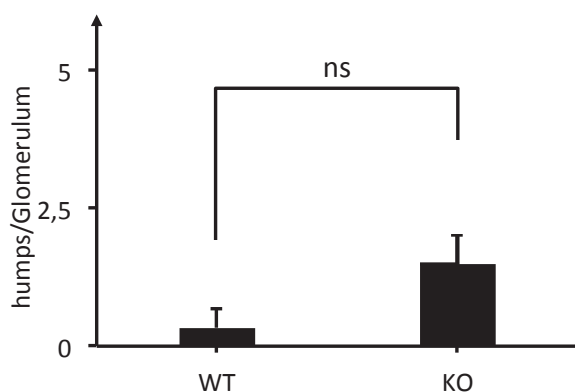


Abb. 3.13: *hump*-Frequenz zum Zeitpunkt von 10 Monaten. Die *hump*-Frequenz ist angegeben in *humps*/Glomerulum. Links ist die *hump*-Frequenz innerhalb der Glomeruli der Wildtyp-Mäuse (WT) dargestellt mit n=3, rechts ist die *hump*-Frequenz der GLEPP1-*knockout*-Mäuse (KO) dargestellt mit n=10. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. Innerhalb der Glomeruli der GLEPP1-*knockout*-Mäuse ist die *hump*-Frequenz tendenziell höher (ns: $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Demzufolge führt im Mausmodell eine Defizienz von GLEPP1 neben einer Albuminurie auch zu morphologischen Veränderungen des glomerulären Filters in Form von lokalisierten Verdickungen der GBM und verschmolzenen Fußfortsätzen der Podozyten. Bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen manifestierten sich diese morphologischen Veränderungen zwischen dem vierten und sechsten Monat. Mit zunehmendem Alter zeigten sich vereinzelt auch Veränderungen bei den Wildtyp-Mäusen, jedoch erst nach einem Alter von sechs Monaten.

3.3 Zusammensetzung der GBM in GLEPP1-*knockout*-Mäusen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Defizienz von GLEPP1 neben einer Albuminurie und morphologischen Veränderungen des glomerulären Filters auch eine veränderte Zusammensetzung der GBM zur Folge hat.

Kollagen IV und Laminin sind wichtige Bestandteile der GBM. Diese beiden Proteine wurden näher betrachtet.

Sowohl Kollagen IV als auch Laminin setzen sich aus je drei Ketten zusammen. Die Zusammensetzung variiert physiologisch je nach Reife des Glomerulums. Im unreifen Glomerulum lassen sich in der GBM Kollagen IV $\alpha1\alpha2\alpha1$ und Laminin $\alpha1\beta1\gamma1$ finden. Im reifen Glomerulum ersetzen Kollagen IV $\alpha3\alpha4\alpha5$ und Laminin $\alpha5\beta2\gamma1$ die unreifen Formen von Kollagen IV und Laminin.

Die Expression der einzelnen Ketten von Kollagen IV ($\alpha1-5$) und Laminin ($\alpha1$, $\alpha5$, $\beta1$ und $\beta2$) wurde im folgenden Versuch mittels *real-time*-PCR ermittelt. Als Probenmaterial wurde glomeruläre cDNA der vier und zehn Monate alten GLEPP1-*knockout*- und Wildtyp-Mäuse verwendet.

Es sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3.3.1 Kollagen IV-Expression

3.3.1.1 Zeitpunkt vier Monate

Innerhalb der Altersgruppe von vier Monaten wurden 13 Wildtyp- und 16 GLEPP1-*knockout*-Mäuse untersucht (Abb. 3.14). Die unreifen Ketten von Kollagen IV $\alpha1$ und $\alpha2$ zeigten bezüglich ihrer Expression in der GBM keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Für $\alpha4$ betrug die relative Expression bei den Wildtyp-Mäusen $1,00 \pm 0,06$ (Tabelle 3.1). Bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen lag die relative Expression für $\alpha4$ bei $0,75 \pm 0,08$. Die GLEPP1-*knockout*-Mäuse exprimierten somit signifikant weniger $\alpha4$ in der GBM ($p < 0,05$; ungepaarter t-Test). Für $\alpha3$ und $\alpha5$ ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; ungepaarter t-Test).

Die Daten wurden eigenständig von mir erhoben und sind bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert worden (Weigel, 2018).

Tabelle 3.1: Mittelwerte und Standardfehler der relativen Expression von Kollagen IV α 1-5 bei Wildtyp- (WT) und GLEPP1-*knockout*-Mäusen (KO) im Alter von vier Monaten

	α 1		α 2		α 3		α 4		α 5	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Mittelwert	1,00	1,17	1,00	1,20	1,00	0,83	1,00	0,75	1,00	0,88
Standardfehler	0,11	0,15	0,14	0,13	0,05	0,09	0,06	0,08	0,07	0,13

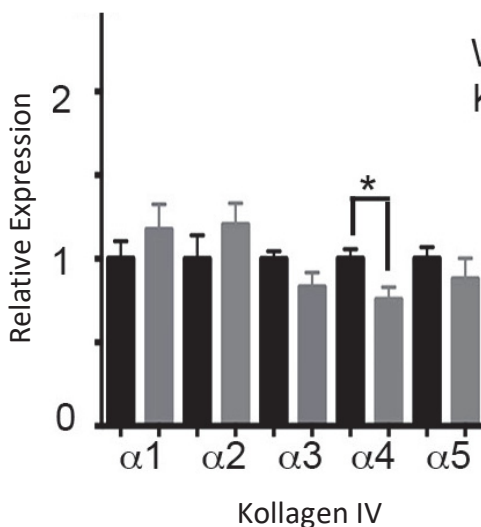


Abb. 3.14: Relative Expression von Kollagen IV α 1-5 zum Zeitpunkt von vier Monaten. Unter WT dargestellt sind die Wildtyp-Mäuse mit n=13. Unter KO dargestellt sind die GLEPP1-*knockout*-Mäuse mit n=16. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede lagen für α 4 vor (*p < 0,05; ungepaarter t-Test).

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt und ist bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert worden (Weigel, 2018).

3.3.1.2 Zeitpunkt zehn Monate

Innerhalb der Altersgruppen von zehn Monaten wurde bei 19 Wildtyp- und 20 GLEPP1-*knockout*-Mäusen die Expression der verschiedenen Kollagen IV-Ketten analysiert (Abb. 3.15). Für α 1 lag die relative Expression bei $1,00 \pm 0,08$ (Wildtyp) und $1,41 \pm 0,16$ (GLEPP1-*knockout*), für α 2 bei $1,00 \pm 0,09$ (Wildtyp) und $1,64 \pm 0,27$ (GLEPP1-*knockout*) (Tabelle 3.2). Folglich wurden die unreifen Ketten des Kollagen IV α 1 und α 2 signifikant mehr in der GBM der GLEPP1-*knockout*-Mäuse exprimiert ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Für α 3 betrug die relative Expression bei den Wildtyp-Mäusen $1,00 \pm 0,11$ und bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen $0,57 \pm 0,08$ (Tabelle 3.2). In der GBM der GLEPP1-*knockout*-Mäuse war die Expression von α 3 also signifikant niedriger als in der GBM der Wildtyp-Mäuse ($p < 0,01$; ungepaarter t-Test). Für α 4 und α 5 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, ungepaarter t-Test).

Der Versuch wurde von mir eigenständig durchgeführt. Die Ergebnisse sind bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht worden (Weigel, 2018).

Tabelle 3.2: Mittelwerte und Standardfehler der relativen Expression von Kollagen IV α 1-5 bei Wildtyp- (WT) und GLEPP1-*knockout*-Mäusen (KO) im Alter von zehn Monaten

	α 1		α 2		α 3		α 4		α 5	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Mittelwert	1,00	1,41	1,00	1,64	1,00	0,57	1,00	0,91	1,00	0,72
Standardfehler	0,08	0,16	0,09	0,27	0,11	0,08	0,09	0,10	0,12	0,08

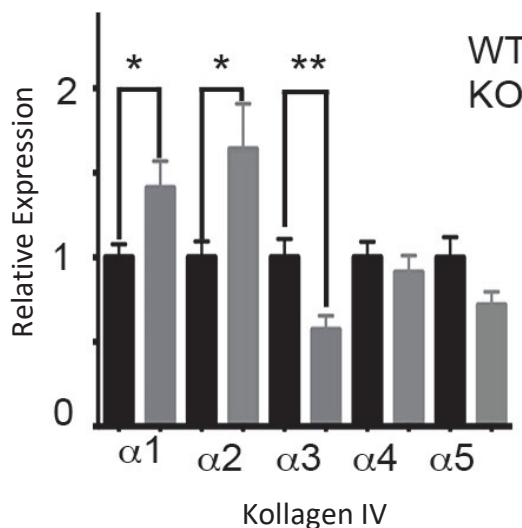


Abb. 3.15: Relative Expression von Kollagen IV α 1-5 zum Zeitpunkt von zehn Monaten. Unter WT dargestellt sind die Wildtyp-Mäuse mit n=19. Unter KO dargestellt sind die GLEPP1-*knockout*-Mäuse mit n=20. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede lagen für α 1 und α 2 (*p < 0,05; Mann-Whitney-U-Test) sowie α 3 vor (**p < 0,01; ungepaarter t-Test).

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt und ist bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert worden (Weigel, 2018).

Die oben aufgeführten Untersuchungen zeigten, dass eine Defizienz von GLEPP1 im Mausmodell zu einer veränderten Zusammensetzung von Kollagen IV in der GBM führt. Einhergehend mit der Albuminurie und den morphologischen Veränderungen der GBM exprimierten GLEPP1-*knockout*-Mäuse mehr unreife Ketten von Kollagen IV und weniger reife Ketten.

3.3.2 Laminin-Expression

3.3.2.1 Zeitpunkt vier Monate

Im Alter von vier Monaten wurde die Expression der Laminin-Ketten bei 13 Wildtyp- und 16 GLEPP1-*knockout*-Mäusen untersucht (Abb. 3.16). Die relative

Expression für $\alpha 1$ lag bei $1,00 \pm 0,12$ für den Wildtyp und bei $0,63 \pm 0,09$ für den *GLEPP1-knockout* (Tabelle 3.3). *GLEPP1-knockout*-Mäuse exprimierten demzufolge signifikant weniger $\alpha 1$ in der GBM ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test). Bezüglich der Expression von $\beta 1$ gab es keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; ungepaarter t-Test).

Die relative Expression von $\alpha 5$ lag bei $1,00 \pm 0,05$ (Wildtyp) und $0,72 \pm 0,08$ (*GLEPP1-knockout*) (Tabelle 3.3). Für $\beta 2$ lag die relative Expression bei $1,00 \pm 0,05$ (Wildtyp) und $0,76 \pm 0,09$ (*GLEPP1-knockout*). Die reifen Ketten $\alpha 5$ und $\beta 2$ wurden also signifikant weniger in der GBM der *GLEPP1-knockout*-Mäuse exprimiert ($p < 0,05$; ungepaarter t-Test).

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt. Die Ergebnisse sind bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel veröffentlicht worden (Weigel, 2018).

Tabelle 3.3: Mittelwerte und Standardfehler der relativen Expression von Laminin $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 2$ bei Wildtyp- (WT) und *GLEPP1-knockout*-Mäusen (KO) im Alter von vier Monaten

	$\alpha 1$		$\beta 1$		$\alpha 5$		$\beta 2$	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Mittelwert	1,00	0,63	1,00	0,95	1,00	0,72	1,00	0,76
Standardfehler	0,12	0,09	0,04	0,08	0,05	0,08	0,05	0,09

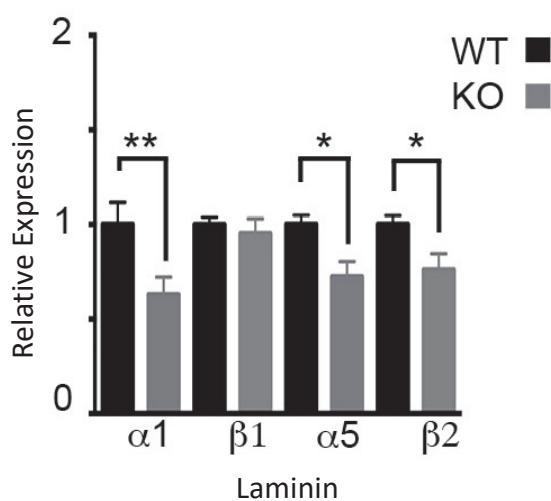


Abb. 3.16: Relative Expression von Laminin $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 2$ zum Zeitpunkt von vier Monaten. Unter WT dargestellt sind die Wildtyp-Mäuse mit $n=13$. Unter KO dargestellt sind die *GLEPP1-knockout*-Mäuse mit $n=16$. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede lagen für $\alpha 1$ (** $p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test), $\alpha 5$ und $\beta 2$ vor (* $p < 0,05$; ungepaarter t-Test).

Der Versuch wurde eigenständig von mir durchgeführt und ist bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert worden (Weigel, 2018).

3.3.2.2 Zeitpunkt zehn Monate

Innerhalb der Altersgruppe von zehn Monaten wurden 19 Wildtyp- und 20 GLEPP1-*knockout*-Mäuse untersucht (Abb. 3.17). Die relative Expression von $\alpha 1$ lag innerhalb der Gruppe der Wildtyp-Mäuse bei $1,00 \pm 0,11$ und innerhalb der Gruppe der GLEPP1-*knockout*-Mäuse bei $1,53 \pm 0,17$ (Tabelle 3.4). Die relative Expression von $\beta 1$ betrug für die Wildtyp-Mäuse $1,00 \pm 0,04$ und für die GLEPP1-*knockout*-Mäuse $0,78 \pm 0,04$. Die GLEPP1-*knockout*-Mäuse exprimierten signifikant mehr unreife $\alpha 1$ -Ketten, jedoch auch signifikant weniger $\beta 1$ -Ketten ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test).

Die relative Expression der reifen Ketten $\alpha 5$ und $\beta 2$ zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p > 0,05$; ungepaarter t-Test).

Der Versuch wurde von mir in Zusammenarbeit mit Frau Blanka Duvnjak durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert (Weigel, 2018).

Tabelle 3.4: Mittelwerte und Standardfehler der relativen Expression von Laminin $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 2$ bei Wildtyp- (WT) und GLEPP1-*knockout*-Mäusen (KO) im Alter von zehn Monaten

	$\alpha 1$		$\beta 1$		$\alpha 5$		$\beta 2$	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
Mittelwert	1,00	1,53	1,00	0,78	1,00	0,83	1,00	0,97
Standardfehler	0,11	0,17	0,04	0,04	0,10	0,06	0,06	0,05

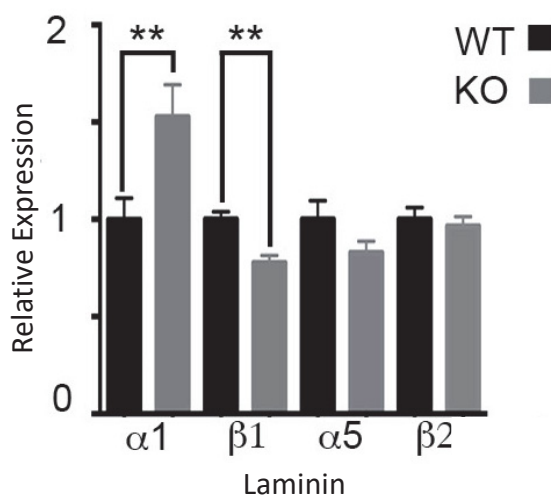


Abb. 3.17: Relative Expression von Laminin $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 2$ zum Zeitpunkt von zehn Monaten. Unter WT dargestellt sind die Wildtyp-Mäuse mit n=19. Unter KO dargestellt sind die GLEPP1-*knockout*-Mäuse mit n=20. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede lagen für $\alpha 1$ und $\beta 1$ vor (**p < 0,01; Mann-Whitney-U-Test).

Der Versuch wurde von mir in Zusammenarbeit mit Frau Blanka Duvnjak durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bereits in der Dissertation von Herrn Dr. med. Christian Weigel publiziert (Weigel, 2018).

Diesen Ergebnissen entsprechend hat eine Defizienz von GLEPP1 im Mausmodell ebenfalls eine veränderte Konfiguration von Laminin zur Folge. Eine GLEPP1-Defizienz führt also zu einer Albuminurie, morphologischen Veränderungen des glomerulären Filters sowie einer veränderten Zusammensetzung von Kollagen IV und Laminin.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von GLEPP1 auf die Funktion des glomerulären Filters

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von GLEPP1 auf die Funktion des glomerulären Filters bei Mäusen untersucht. GLEPP1 ist eine Rezeptortyrosinphosphatase, deren genaue Funktion bisher unbekannt ist (Thomas et al., 1994). Ozaltin et al. untersuchten in einer Studie das Genom von Personen mit einem steroidresistenten nephrotischen Syndrom und fanden heraus, dass eine homozygote Mutation in GLEPP1 ursächlich war für die Entwicklung eines nephrotischen Syndroms im Kindesalter (Ozaltin et al., 2011). Diese Untersuchungen legen nahe, dass GLEPP1 eine entscheidende Rolle für den glomerulären Filter spielt. Dies veranlasste uns anhand eines Mausmodells zu untersuchen, ob eine GLEPP1-Defizienz zu einer Proteinurie führt.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass bei sechs und zehn Monate alten Mäusen eine GLEPP1-Defizienz zur Albuminurie führt. Die Albuminurie der sechs Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse konnte in dieser Arbeit nur semiquantitativ mittels Coomassie-Gel festgestellt werden. Im Rahmen der Fortführung dieses Projekts konnte mein Nachfolger Herr Dr. med. Christian Weigel das Ergebnis durch Ermittlung der ACR im Urin der sechs Monate alten GLEPP1-*knockout*-Mäuse bestätigen (Weigel, 2018). Daher lässt sich vermuten, dass GLEPP1 die Funktionsfähigkeit des glomerulären Filters erhält. Wharram et al. konnten dagegen bei GLEPP1-*knockout*-Mäusen keine Albuminurie nachweisen (Wharram et al., 2000). Die Mäuse in dieser Studie waren mit einem Alter von vier bis sechs Wochen jedoch wesentlich jünger als die Mäuse in unseren Versuchen. Da sich die Albuminurie in unserer Arbeit erst zwischen dem vierten und sechsten Monat manifestierte, ist es naheliegend, dass sich die Albuminurie erst ab einem bestimmten Alter ausprägt. Darüberhinaus handelte es sich in der Studie von Wharram et al. um Mäuse auf dem C57/Bl6 genetischen Hintergrund. In unserer Arbeit hingegen untersuchten wir Mäuse auf dem genetischen Hintergrund 129P3J. Seit Jahren ist bekannt,

dass Mäuse auf dem C57/Bl6 Hintergrund gegenüber der Entwicklung einer Albuminurie resistent sind (Ishola et al., 2006).

Unsere Ergebnisse werden von einer Publikation aus der Savin-Gruppe unterstützt. Sie konnte zeigen, dass GLEPP1 mit der vermehrten Durchlässigkeit des glomerulären Filters in Zusammenhang steht (Charba et al., 2009). Sie untersuchte die glomeruläre Permeabilität anhand eines in vitro Modells, bei dem sie isolierte Ratten- und Kaninchenglomeruli verwendeten. Durch die Behandlung der Glomeruli mit einem extrazellulären Antikörper wurde die Phosphataseaktivität von GLEPP1 vermindert und eine erhöhte glomeruläre Permeabilität entstand. Für die Kaninchenglomeruli wurde der Antikörper 4C3 verwendet, dessen Epitop im Fibronectin Repeat 3 liegt, und für die Rattenglomeruli die Antikörper 1B4 und 1D1, deren Epitope nicht bekannt sind. Trotz der technischen Unterschiede zwischen unserer Arbeit und der o. g. Publikation stimmen diese Resultate mit dem Ergebnis unserer Arbeit überein, in der die GLEPP1-Defizienz bei den Mäusen zur Albuminurie führte. Sowohl in der Arbeit von Charba et al. als auch in unserer Arbeit wird der glomeruläre Filter durchlässiger für Albumin aufgrund einer herabgesetzten Funktion von GLEPP1 wie bei Charba et al. oder einer sogar fehlenden Funktion wie in unserer Arbeit. GLEPP1 scheint also erforderlich zu sein, um die glomeruläre Filtrationsbarriere aufrechtzuerhalten. Durch seine Phosphataseaktivität beeinflusst GLEPP1 wahrscheinlich über eine noch unbekannt Signalkaskade den glomerulären Filter. Bei Abwesenheit von GLEPP1 werden bestimmte Elemente dieser Signalkaskade nicht dephosphoryliert, wodurch der glomeruläre Filter permeabel wird für Proteine. Diese erhöhte Permeabilität konnte in unserer Arbeit sowie in der Arbeit von Charba et al. auf zwei unterschiedliche Methoden nachgewiesen werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass die Mäuse in unserer Arbeit erst im Alter erkrankten und eine Proteinurie entwickelten. In der Studie von Ozaltin et al. zeigten die betroffenen Personen bereits im Kindesalter ein nephrotisches Syndrom (Ozaltin et al., 2011). Daher wäre es möglich, dass Mäuse im

Gegensatz zum Menschen gewisse Kompensationsmechanismen besitzen, die den Ausbruch der Erkrankung verzögern bzw. mildern.

4.2 Wirkung von GLEPP1 auf den glomerulären Filter

4.2.1 Wirkung von GLEPP1 auf den Podozyten

Da einer Albuminurie eine erhöhte Permeabilität des glomerulären Filters zugrunde liegt, wurde dieser im Rahmen dieser Arbeit genauer betrachtet. In früheren Studien wurde bereits angenommen, dass GLEPP1 eine wichtige regulatorische Aufgabe bezüglich der Struktur und Funktion des Podozyten haben könnte (Thomas et al., 1994). In unserer Arbeit haben wir daher den glomerulären Filter licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

Die licht- und elektronenmikroskopischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich das Aussehen der Podozyten bei Mäusen mit GLEPP1-Defizienz zwischen dem vierten und sechsten Monat verändert. Die Fußfortsätze der Podozyten der GLEPP1-*knockout*-Mäuse verloren ihre Kontur und verschmolzen mit den benachbarten Fußfortsätzen (*foot process effacement*). GLEPP1 scheint folglich die Form und damit einhergehend die Funktion des Podozyten zu regulieren. Ob es sich hier um ein primäres Phänomen durch die GLEPP1-Defizienz oder um ein sekundäres Phänomen durch die Schädigung des Podozyten handelt, kann nicht abschließend geklärt werden.

Unsere Ergebnisse stimmen überein mit den Ergebnissen von Wharram et al., die in ihrer Studie feststellten, dass eine GLEPP1-Defizienz bei Mäusen die Form der Podozyten ändert (Wharram et al., 2000). Sie konnten bei den vier bis sechs Wochen alten GLEPP1-*knockout*-Mäusen in ihrer Studie eine abnorme Form der Podozyten nachweisen. Die Zellkörper der Podozyten zeigten unter dem Rasterelektronenmikroskop eine amöboide und nicht die physiologische oktupoide Form. Zudem waren die Fußfortsätze verkürzt und verbreitert. Im Transmissionselektronenmikroskop erschienen die Fußfortsätze der Podozyten der GLEPP1-*knockout*-Mäuse in der Studie von Wharram et al. ebenfalls verbreitert. Dies stimmt überein mit unseren Ergebnissen, denn wir konnten

unter dem Transmissionselektronenmikroskop ebenfalls verbreiterte bzw. verschmolzene Fußfortsätze nachweisen. Wir untersuchten die Podozyten allerdings nur mit dem Transmissionselektronen- und nicht mit dem Rasterelektronenmikroskop.

Im Gegensatz zu Wharram et al. zeigten sich die verbreiterten Fußfortsätze der Podozyten in unserer Arbeit erst zwischen dem vierten und sechsten Monat. Auch dies ist möglicherweise wieder auf den unterschiedlichen Hintergrund der Mäuse (C57Bl/6 gegenüber 129P3J) zurückzuführen. Anders als bei Wharram et al. wiesen die GLEPP1-*knockout*-Mäuse in unserer Arbeit zum Zeitpunkt der Veränderungen der Podozyten eine Albuminurie auf. Es wäre möglich, dass die Albuminurie bei den C57Bl/6-Mäusen aus der Studie von Wharram et al. durch die abnorme Form der Podozyten verhindert wird und die C57Bl/6 Mäuse gegenüber einer GLEPP1-Defizienz resistenter sind als die 129P3J-Mäuse aus unserer Arbeit. Dann würden die Veränderungen des Podozyten eine Art Schutzmechanismus darstellen. Alternativ wäre es möglich, dass die Veränderungen der Podozyten die Proteinurie der GLEPP1-*knockout*-Mäuse in unserer Arbeit verursachen. Trotz dieser Unterschiede lässt sich sowohl aus der Studie von Wharram et al. als auch aus unserer Arbeit vermuten, dass GLEPP1 die Form und Funktion des Podozyten beeinflusst.

In mehreren Studien wird GLEPP1 als Marker des glomerulären Schadens beschrieben (Kim et al., 2002, Tian et al., 2007). Im Gegensatz zu unserer Studie führten Kim et al. ihre Studie an Ratten durch und injizierten diesen Puromycin Aminonukleosid (PAN), um eine Glomerulosklerose mit Proteinurie zu induzieren (Kim et al., 2002). Tian et al. untersuchten Biopsien von Patienten mit einer IgA-Nephropathie (Tian et al., 2007). In beiden Studien lag also im Gegensatz zu unserer Arbeit schon ein glomerulärer Schaden vor. In ihren Studien stellten Kim et al. sowie Tian et al. fest, dass es zu einem *foot process effacement* sowie zu einer Ablösung der Podozyten von der GBM kam (Kim et al., 2002, Whiteside et al., 1993, Messina et al., 1987, Tian et al., 2007). Diese Veränderungen gingen jeweils mit einer verminderten Expression von GLEPP1

im Glomerulum einher, weshalb beide Arbeitsgruppen annahmen, dass ein GLEPP1-Verlust ein Marker des glomerulären Schadens sei. Es könnte daher sein, dass ein glomerulärer Schaden über einen Verlust an Podozyten oder durch eine Ablösung dieser von der GBM zu einer verminderten Expression von GLEPP1 führt. Vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse wäre es ebenfalls denkbar, dass PAN oder eine IgA-Nephropathie die Konzentration von GLEPP1 reduzieren und ein Mangel an GLEPP1 analog zur GLEPP1-Defizienz in unserer Arbeit zur Albuminurie sowie zu strukturellen Veränderungen des Podozyten führt. Wahrscheinlich findet die Verbindung zwischen GLEPP1 und dem Podozyten aber auch in beide Richtungen statt, d. h. eine Schädigung des Podozyten führt zur Reduktion der Expression von GLEPP1, was wiederum umgekehrt auch die Struktur des Podozyten verändert.

In einer weiteren Studie untersuchten Collares-Buzato et al. den Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf die parazelluläre Permeabilität von *Madin Darby canine kidney* (MDCK)-II-Zellen (Collares-Buzato et al., 1998). MDCK-II-Zellen sind Tubuluszellen. Collares-Buzato et al. verwendeten diese Tubuluszellen und behandelten sie mit Peroxovanadat, einem Phosphataseinhibitor (Hecht and Zick, 1992). In unserer Arbeit hingegen war die GLEPP1-Phosphatase in den Podozyten unserer Mauslinie nicht nachweisbar. Collares-Buzato et al. fanden heraus, dass unter Behandlung mit Peroxovanadat die Proteine der interzellulären Verbindungen (*tight* und *adherens junctions*) zwischen den MDCK-II-Zellen vermehrt phosphoryliert wurden und es zu einer Umverteilung eben dieser Proteine der Zellverbindungen kam (Collares-Buzato et al., 1998). Damit einhergehend registrierten Collares-Buzato et al. eine vermehrte parazelluläre Permeabilität sowie eine Abrundung der MDCK-II-Zellen. Folglich zeigte sich, dass Phosphatasen in den MDCK-II-Zellen die Struktur der Zellkontakte sowie der Zellen selbst stabilisieren und somit die parazelluläre Permeabilität regulieren. Es wäre möglich, dass GLEPP1 im Podozyten eine ähnliche Funktion hat. Die Abwesenheit der GLEPP1-Phosphatase könnte so über eine gesteigerte Phosphorylierung von Proteinen der Zellkontakte, also der Schlitzmembran, zu deren Umstrukturierung mit erhöhter Permeabilität

führen. Möglicherweise ist das Target von GLEPP1 jedoch auch eine Tyrosinphosphatase, die durch eine Dephosphorylierung aktiviert wird. Dies konnte nämlich für andere Mitglieder der R3-Phosphatasen gezeigt werden (Matozaki et al., 2010). Somit könnte GLEPP1 über Tyrosinphosphatasen regulierend auf die Zellkontakte wirken.

Daraus lässt sich schließen, dass GLEPP1 über eine noch unbekannte Kaskade an der Regulation der Struktur und Form der Podozyten beteiligt ist. Wie diese Kaskade im Detail aussieht, sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Da der Podozyt Bestandteil des glomerulären Filters ist, kann eine veränderte Form, wie sie bei einer Funktionsminderung bzw. einem Funktionsverlust von GLEPP1 zu beobachten war, möglicherweise auch zur erhöhten Permeabilität des glomerulären Filters beisteuern.

4.2.2 Wirkung von GLEPP1 auf die GBM

In unserer Arbeit konnten wir nachweisen, dass eine GLEPP1-Defizienz bei Mäusen die Struktur und das Aussehen der GBM verändert. Zunächst konnten wir unter dem Lichtmikroskop subpodozytäre, PAS-positive Areale feststellen, die segmental auftraten. Elektronenmikroskopisch stellte sich dieses Phänomen als lokalisierte Verdickungen der GBM dar (*humps*). In den GLEPP1-*knockout*-Mäusen zeigten sich diese *humps* schon zwischen dem vierten und sechsten Monat. Auch in den Wildtyp-Mäusen ließen sich vereinzelt *humps* feststellen, jedoch erst zwischen dem sechsten und zehnten Monat. Daher lässt sich vermuten, dass es sich hierbei möglicherweise um eine Alterserscheinung handelt, welche bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen deutlich früher und häufiger auftritt.

Weiterhin unterschied sich die molekulare Zusammensetzung des Kollagens IV und Laminins innerhalb der GBM der Mäuse mit einer GLEPP1-Defizienz von der typischen Zusammensetzung, wie sie bei gesunden Mäusen anzutreffen ist. Die Zusammensetzung von Kollagen IV und Laminin wurde in diesem Zusammenhang erstmalig untersucht. Bezüglich des Kollagens IV kam es zu

einem Wechsel vom reifen Typ $\alpha3\alpha4\alpha5$ zum unreifen Typ $\alpha1\alpha2\alpha1$. Dieser Wechsel fand zwischen dem vierten und zehnten Monat statt. Bezüglich des Laminins kam es ebenfalls zu Veränderungen der Zusammensetzung.

In unserer Arbeit zeigten sich die ersten Veränderungen bezüglich der Expression der Ketten des Kollagens IV und Laminins schon im Alter von vier Monaten. Die Expression der einzelnen Ketten könnte sich auch schon früher geändert haben, zu einem früheren Zeitpunkt wurde diese jedoch nicht untersucht. Die Albuminurie sowie die mikroskopischen Veränderungen manifestierten sich erst zwischen dem vierten und sechsten Monat. Somit könnte die veränderte Zusammensetzung der GBM den veränderten Phänotyp des glomerulären Filters ebenso wie die Albuminurie bedingen. Alternativ könnte die Verdickung der GBM ein Kompensationsphänomen der Podozyten sein, um eine drohende Ablösung von der GBM zu verhindern.

Nach einer Studie von Abrahamson produzieren die Podozyten die reifen Ketten des Kollagens IV, während die unreifen Ketten des Kollagens IV von Podozyten und Endothelzellen produziert werden (Abrahamson, 2009). Die unreifen und reifen Lamininketten werden ebenfalls von Podozyten und Endothelzellen produziert (John and Abrahamson, 2001). In unserer Arbeit kam es bei den GLEPP1-defizienten Mäusen zwischen dem vierten und zehnten Monat erneut zur Synthese des unreifen Kollagens IV sowie zu einer veränderten Synthese der einzelnen Lamininketten. Vor diesem Hintergrund könnten sowohl die Podozyten als auch die Endothelzellen bei den GLEPP1-defizienten Mäusen in unserer Arbeit an der Synthese des unreifen Kollagens IV und Laminins wie im unreifen Glomerulum beteiligt sein.

Steenhard et al. konnten in einer anderen Studie mit von Hippel-Lindau (VHL)-defizienten Mäusen ähnliche Veränderungen beobachten wie bei unseren GLEPP1-defizienten Mäusen (Steenhard et al., 2010). Sie stellten subendotheliale Verdickungen sowie subpodozytäre *humps* in der GBM der Mäuse fest, in welchen wiederum Kollagen IV $\alpha1\alpha2\alpha1$ nachgewiesen werden konnte. Zudem konnten sie nachweisen, dass sowohl die Podozyten als auch

die Endothelzellen das unreife Kollagen IV synthetisieren. Womöglich sind auch in unserer Studie die Podozyten und Endothelzellen für die Synthese des unreifen Kollagens IV verantwortlich, was auch im Einklang mit der Studie von Abrahamson stünde. Andererseits zeigten die GLEPP1-defizienten Mäuse in unserer Arbeit nur auf podozytärer Seite Verdickungen in Form von *humps*. Dies deutet darauf hin, dass die Podozyten alleine in den GLEPP1-defizienten Mäusen das unreife Kollagen IV produzieren und den Wechsel von reif nach unreif initiieren.

Abrahamson formulierte in einer anderen Arbeit die These, dass die unreifen Varianten des Kollagens IV und Laminins eine elastischere Konsistenz haben könnten, um so die Ausbreitung der Podozyten und Endothelzellen entlang des glomerulären Filters während der Entwicklung zu ermöglichen (Abrahamson, 2012). Die reifen Varianten seien jedoch erforderlich für die Differenzierung der Podozyten und Endothelzellen sowie die Selektivität des glomerulären Filters. Wie die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, ist GLEPP1 wichtig für die Funktion des Podozyten und dessen Aufrechterhaltung. Es scheint, dass durch eine Defizienz von GLEPP1 die Funktion des reifen Podozyten nicht beibehalten werden kann und der Podozyt daher wie die nicht ausdifferenzierten Podozyten unreifes Kollagen IV synthetisiert. Der Podozyt könnte auch auf ein bestimmtes Signal hin mit der Synthese von unreifen Ketten des Kollagens IV beginnen, z. B. durch eine Ablösung des Podozyten von der GBM, wie sie in der Studie von Kim et al. sowie Tian et al. beobachtet wurde (Tian et al., 2007, Kim et al., 2002). Das unreife Kollagen IV könnte in diesem Fall eine bessere Verankerung des Podozyten gewährleisten. Möglicherweise sind jedoch auch weitere Rezeptoren an dem Wechsel vom reifen zum unreifen Kollagen IV beteiligt.

4.3 Ähnlichkeit zwischen GLEPP1- und DDR1-Defizienz

Gross et al. führten eine Studie zur DDR1-Defizienz durch, wobei die DDR1-*knockout*-Mäuse einen ähnlichen Phänotyp aufwiesen wie die GLEPP1-*knockout*-Mäuse in unserer Arbeit (Gross et al., 2004). Daher stellt sich die Frage, ob DDR1 und GLEPP1 sich gegenseitig beeinflussen.

Die DDR1-*knockout*-Mäuse entwickelten ähnlich wie die GLEPP1-*knockout*-Mäuse in unserer Arbeit eine Proteinurie, wobei im Urin insbesondere großmolekulare Proteine nachgewiesen werden konnten (Gross et al., 2004). Zudem waren unter dem Elektronenmikroskop lokalisierte subpodozytäre Verdickungen der GBM ähnlich den *humps* der GLEPP1-*knockout*-Mäuse aus unserer Arbeit sichtbar.

Aufgrund des ähnlichen Phänotyps von GLEPP1- und DDR1-*knockout*-Mäusen lässt sich eine Verbindung zwischen GLEPP1 und DDR1 annehmen. DDR1 gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen und wird durch Kollagene, u. a. auch Kollagen IV, aktiviert (Vogel et al., 1997, Shrivastava et al., 1997). Gross et al. konnten DDR1 insbesondere im Podozyten nachweisen (Gross et al., 2004). Es wäre denkbar, dass GLEPP1 und DDR1 über einen gemeinsamen Weg den Aufbau der GBM regulieren. Der Wechsel vom reifen zum unreifen Kollagen IV in den GLEPP1-*knockout*-Mäusen aus unserer Arbeit könnte jedoch auch über DDR1 ablaufen. Die Kollagen-DDR1-Interaktion könnte die Zelladhäsion, -migration und -differenzierung sowie die Synthese der extrazellulären Matrix beeinflussen (Shrivastava et al., 1997). Aufgrund einer GLEPP1-Defizienz ist womöglich diese Interaktion zwischen Kollagen IV und DDR1 gestört, sodass DDR1 dann die Synthese von unreifem Kollagen IV im Podozyten initiiert.

4.4 GLEPP1 und Alport-Syndrom

Beim Alport-Syndrom handelt es sich um eine erblich bedingte Erkrankung, die in über 80 % der Fälle X-chromosomal vererbt wird (Kashtan, 1998). Klinisch manifestiert sich das Alport-Syndrom durch eine Hämaturie und Proteinurie (Alport, 1927, Gubler et al., 1981). In der Jugend oder im frühen Erwachsenenalter entwickelt sich häufig ein chronisches Nierenversagen (Flinter et al., 1988). Neben der renalen Symptomatik ist für das Alport-Syndrom eine Innenohrschwerhörigkeit typisch (Alport, 1927). Zusätzlich kann das Alport-Syndrom sich auch an den Augen manifestieren, meist in Form eines Lentikonus (Flinter et al., 1988).

Dem Alport-Syndrom zugrunde liegt eine Mutation in COL4A3, COL4A4 oder COL4A5 (Barker et al., 1990, Mochizuki et al., 1994). Diese Gene kodieren die jeweilige Kette des Kollagens IV. Aufgrund einer dieser Mutationen wird das unreife Kollagen IV-Netzwerk bestehend aus $\alpha1\alpha2\alpha1$ -Monomeren nicht durch das reife Kollagen IV $\alpha3\alpha4\alpha5$ ersetzt (Abrahamson, 2012). Kollagen IV $\alpha3\alpha4\alpha5$ findet sich nicht nur in der GBM, sondern auch in der Cochlea und im Auge (Kalluri et al., 1998, Cosgrove et al., 1998, Hudson et al., 2003). Daher kann beim Alport-Syndrom neben einer renalen Symptomatik auch eine Beeinträchtigung der Hör- und Augenleistung vorliegen.

Ähnlich zum Alport-Syndrom wurde auch in unserer Arbeit mit GLEPP1-defizienten Mäusen vermehrt unreifes Kollagen IV anstelle des reifen Kollagens IV in der GBM synthetisiert. Die veränderte Zusammensetzung der GBM geht sowohl beim Alport-Syndrom als auch bei der GLEPP1-Defizienz mit einer Proteinurie einher. Wie bei den GLEPP1-defizienten Mäusen sind auch beim Alport-Syndrom unter dem Elektronenmikroskop Abnormitäten des glomerulären Filters zu beobachten, wobei diese sich beim Alport-Syndrom auf verschiedene Arten präsentieren können (Cosgrove, 2012). Die GBM kann sich beim Alport-Syndrom sowohl verdickt als auch verdünnt darstellen. Häufig werden auch Aufsplitterungen der GBM beobachtet. Zusätzlich kann es zu einer Retraktion der Fußfortsätze kommen. Ein interessanter Ansatz für zukünftige Forschung wäre es daher zu betrachten, welche Funktion GLEPP1 beim Alport-Syndrom einnimmt: Wird GLEPP1 beim Alport-Syndrom aufgrund eines Mangels an reifem Kollagen IV hochreguliert, da es für die Synthese von reifem Kollagen IV notwendig ist? Oder kommt es durch eine verminderte Aktivierung von GLEPP1 zur vermehrten Bildung des unreifen Kollagen IV- $\alpha1\alpha2\alpha1$ -Netzwerkes? Möglicherweise kann eine verminderte Aktivierung von GLEPP1 auch Einfluss auf die Form des Podozyten haben und so zur Retraktion der Fußfortsätze führen, wie sie sowohl beim Alport-Syndrom als auch bei den GLEPP1-*knockout*-Mäusen beobachtet werden konnte.

Für die Aufrechterhaltung der Struktur und der Funktion des glomerulären Filters scheint also das Vorhandensein von Kollagen IV $\alpha3\alpha4\alpha5$ unabdingbar zu sein. Auch GLEPP1 scheint in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle zu spielen. Während beim Alport-Syndrom aufgrund einer Genmutation für eine der reifen Ketten des Kollagens IV unreifes Kollagen IV synthetisiert wird, liegt die Ursache in unserem Modell in der GLEPP1-Defizienz. GLEPP1 beeinflusst die Synthese von Kollagen IV im Podozyten. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Während beim Alport-Syndrom die Synthese des unreifen Kollagens IV unvermeidbar ist, könnte in unserem Modell durch einen Eingriff in den bisher noch unbekanntem Mechanismus möglicherweise der Wechsel zum unreifen Kollagen IV vermieden werden. So könnte GLEPP1 in Zukunft als therapeutischer Ansatz für andere proteinurische Krankheitsbilder dienen, bei denen eine Expression von unreifem Kollagen IV beschrieben wird.

4.5 Limitationen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine GLEPP1-*knockout*-Mauslinie zu charakterisieren, um daraus Rückschlüsse auf die bisher unbekannte Funktion von GLEPP1 herzuleiten. Aus ethischen Gründen wurde eine eher kleine Stichprobe gewählt. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl ergaben sich teilweise höhere Standardfehler. Eine größere Stichprobe könnte in zukünftigen Studien zu eindeutigeren Ergebnissen führen. Weitere Forschung aufbauend auf den Ergebnissen der Studie scheint daher sinnvoll.

Weiterhin konnten wir im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen Veränderungen des glomerulären Filters in Form von *podocyte foot process effacement* und *humps* zeigen. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den PCR-Untersuchungen nehmen wir an, dass in den beschriebenen *humps* die unreifen Subtypen des Kollagens IV sowie Laminins lokalisiert sind. Um dies jedoch elektronenmikroskopisch nachzuweisen, sind weitere immunhistochemische Färbungen der Schnitte erforderlich.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit liegt darin, dass die Untersuchungen der Subtypen des Kollagens IV sowie des Laminins bisher nur auf RNA-Ebene durchgeführt wurden. Ob die unreifen Subtypen des Kollagens IV und Laminins tatsächlich in der GBM exprimiert werden, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Wir konnten bisher nachweisen, dass die RNA der unreifen Ketten von Kollagen IV und Laminin in den *GLEPP1-knockout*-Mäusen hochreguliert wird, was darauf hinweist, dass die unreifen Subtypen in der GBM exprimiert werden. Um dies zu verifizieren, sind weitere Versuche auf Proteinebene geplant.

5 Schlussfolgerungen

GLEPP1 ist eine Rezeptortyrosinphosphatase, deren genaue Funktion bisher ungeklärt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden GLEPP1-*knockout*-Mäuse untersucht, um eben Rückschlüsse auf die Funktion von GLEPP1 zu ziehen. Anhand unserer Ergebnisse konnten wir zeigen, dass GLEPP1 entscheidend zum Aufbau sowie zur Funktion des glomerulären Filters beiträgt.

In unserer ersten Versuchsreihe zeigte sich, dass der GLEPP1-*knockout* mit einer Albuminurie einhergeht. Diese Albuminurie trat bei den Mäusen zwischen dem vierten und zehnten Monat auf. Da die Albuminurie Zeichen einer erhöhten Durchlässigkeit des glomerulären Filters ist, lässt sich also schlussfolgern, dass ein Defekt oder ein Mangel an GLEPP1 mit einer Funktionseinschränkung des glomerulären Filters einhergeht.

In einer zweiten Versuchsreihe konnten wir nachweisen, dass der GLEPP1-*knockout* zwischen dem vierten und sechsten Monat zu einem *podocyte foot process effacement* sowie zu *humps* innerhalb der GBM führt. Die Podozyten sowie die GBM sind wiederum Bestandteil des glomerulären Filters. Somit beeinflusst GLEPP1 also die Morphologie des glomerulären Filters.

Auf molekularbiologischer Ebene ergab sich in unseren Versuchen, dass der GLEPP1-*knockout* mit einer veränderten Zusammensetzung des Kollagens IV und des Laminins in der GBM einhergeht. In einem Alter von vier bis zehn Monaten zeigte sich ein Wechsel bezüglich der Expression von reifen und unreifen Subtypen des Kollagens IV und Laminins zugunsten der unreifen Varianten. Somit moduliert GLEPP1 sowohl die strukturelle Zusammensetzung der GBM als auch die Morphologie des glomerulären Filters und dessen Funktion.

Im Rahmen zukünftiger Forschung sollten zunächst die Ergebnisse bezüglich der Expression von reifem und unreifem Kollagen IV sowie Laminin auf Proteinebene durch Western Blots belegt werden. Ein weiteres Ziel zukünftiger Forschung ist es, diese Subtypen in den beschriebenen *humps* nachzuweisen

z. B. mittels Immunhistochemie oder Immunogoldfärbung. Zudem ist ein zentraler Aspekt unserer zukünftigen Forschung, den Ablauf des Wechsels von reifem zu unreifem Kollagen IV bzw. Laminin sowie die daran beteiligten Mediatoren zu verstehen. Eine Beeinflussung dieses Signalwegs z. B. durch Aktivatoren von GLEPP1, die eine Modulation der GBM sowie des Podozyten und damit einhergehend der Funktion des glomerulären Filters ermöglicht, könnte somit ein interessanter Therapieansatz für proteinurische Krankheitsbilder sein.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ABRAHAMSON, D. R. 1985. Origin of the Glomerular Basement Membrane Visualized after In Vivo Labeling of Laminin in Newborn Rat Kidneys. *The Journal of Cell Biology*, 100, 1988-2000.
- ABRAHAMSON, D. R. 2009. Development of kidney glomerular endothelial cells and their role in basement membrane assembly. *Organogenesis*, 5, 275-287.
- ABRAHAMSON, D. R. 2012. Role of the Podocyte (and Glomerular Endothelium) in Building the GBM. *Seminars in Nephrology*, 32, 342-9.
- ABRAHAMSON, D. R., HUDSON, B. G., STROGANOVA, L., BORZA, D. B. & ST JOHN, P. L. 2009. Cellular Origins of Type IV Collagen Networks in Developing Glomeruli. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20, 1471-9.
- AGUIAR, R. C., YAKUSHIJIN, Y., KHARBANDA, S., TIWARI, S., FREEMAN, G. J. & SHIPP, M. A. 1999. PTPROT: An Alternatively Spliced and Developmentally Regulated B-Lymphoid Phosphatase That Promotes G0/G1 Arrest. *Blood*, 94, 2403-13.
- ALPORT, A. C. 1927. Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. *The British Medical Journal*, 1, 504-6.
- BARKER, D. F., HOSTIKKA, S. L., ZHOU, J., CHOW, L. T., OLIPHANT, A. R., GERKEN, S. C., GREGORY, M. C., SKOLNICK, M. H., ATKIN, C. L. & TRYGGVASON, K. 1990. Identification of Mutations in the COL4A5 Collagen Gene in Alport Syndrome. *Science*, 248, 1224-7.
- BARRATT, J. & TOPHAM, P. 2007. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *Canadian Medical Association Journal*, 177, 361-8.
- BATTAGLIA, C., MAYER, U., AUMAILLEY, M. & TIMPL, R. 1992. Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *European Journal of Biochemistry*, 208, 359-366.
- BELTRAN, P. J., BIXBY, J. L. & MASTERS, B. A. 2003. Expression of PTPRO during Mouse Development Suggests Involvement in Axonogenesis and Differentiation of NT-3 and NGF-Dependent Neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 456, 384-95.
- BOHRER, M. P., BAYLIS, C., HUMES, H. D., GLASSOCK, R. J., ROBERTSON, C. R. & BRENNER, B. M. 1978. Permselectivity of the Glomerular Capillary Wall: FACILITATED FILTRATION OF CIRCULATING POLYCATIONS. *Journal of Clinical Investigation*, 61, 72-78.
- CHANG, R. L. S., DEEN, W. M., ROBERTSON, C. R. & BRENNER, B. M. 1975. Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney International*, 8, 212-218.
- CHARBA, D. S., WIGGINS, R. C., GOYAL, M., WHARRAM, B. L., WIGGINS, J. E., MCCARTHY, E. T., SHARMA, R., SHARMA, M. & SAVIN, V. J. 2009. Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb)). *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 297, F138-44.

- COGAN, M. G. 1982. Nephrotic Syndrome. *Western Journal of Medicine*, 136, 411-417.
- COLLARES-BUZATO, C. B., JEPSON, M. A., SIMMONS, N. L. & HIRST, B. H. 1998. Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. *European Journal of Cell Biology*, 76, 85-92.
- COSGROVE, D. 2012. Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective. *Pediatric Nephrology*, 27, 885-90.
- COSGROVE, D., SAMUELSON, G., MEEHAN, D. T., MILLER, C., MCGEE, J., WALSH, E. J. & SIEGEL, M. 1998. Ultrastructural, physiological, and molecular defects in the inner ear of a gene-knockout mouse model for autosomal Alport syndrome. *Hearing Research*, 121, 84-89.
- FLINTER, F. A., CAMERON, J. S., CHANTLER, C., HOUSTON, I. & BOBROW, M. 1988. Genetics of classic Alport's syndrome. *The Lancet*, 2, 1005-7.
- GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 385, 117-171.
- GOODMAN, S. L., AUMAILLEY, M. & VON DER MARK, H. 1991. Multiple Cell Surface Receptors for the Short Arms of Laminin: $\alpha 1\beta 1$ Integrin and RGD-dependent Proteins Mediate Cell Attachment only to Domains III in Murine Tumor Laminin. *The Journal of Cell Biology*, 113, 931-941.
- GROSS, O., BEIROWSKI, B., HARVEY, S. J., MCFADDEN, C., CHEN, D., TAM, S., THORNER, P. S., SMYTH, N., ADDICKS, K., BLOCH, W., NINOMIYA, Y., SADO, Y., WEBER, M. & VOGEL, W. F. 2004. DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney International*, 66, 102-111.
- GUBLER, M., LEVY, M., BROYER, M., NAIZOT, C., GONZALES, G., PERRIN, D. & R., H. 1981. Alport's Syndrome: A report of 58 Cases and a Review of the Literature. *American Journal of Medicine*, 70, 493-505.
- HAFFNER, S. M., STERN, M. P., GRUBER, M. K., HAZUDA, H. P., MITCHELL, B. D. & PATTERSON, J. K. 1990. Microalbuminuria Potential Marker for Increased Cardiovascular Risk Factors in Nondiabetic Subjects? *Arteriosclerosis*, 10, 727-31.
- HECHT, D. & ZICK, Y. 1992. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188, 773-779.
- HUDSON, B. G., TRYGGVASON, K., SUNDARAMOORTHY, M. & NEILSON, E. G. 2003. Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen. *New England Journal of Medicine*, 348, 2543-2556.
- ISHOLA, D. A., JR., VAN DER GIEZEN, D. M., HAHNEL, B., GOLDSCHMEDING, R., KRIZ, W., KOOMANS, H. A. & JOLLES, J. A. 2006. In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21, 591-7.

- JACOB, S. T. & MOTIWALA, T. 2005. Epigenetic regulation of protein tyrosine phosphatases: potential molecular targets for cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*, 12, 665-72.
- JARAD, G., PIPPIN, J. W., SHANKLAND, S. J., KREIDBERG, J. A. & MINER, J. H. 2011. Dystroglycan does not contribute significantly to kidney development or function, in health or after injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 300, F811-20.
- JOHN, P. L. S. & ABRAHAMSON, D. R. 2001. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney International*, 60, 1037-46.
- KALLURI, R., GATTONE, V. H. N. & HUDSON, B. G. 1998. Identification and localization of type IV collagen chains in the inner ear cochlea. *Connect Tissue Res*, 31, 143-50.
- KASHTAN, C. E. 1998. Alport Syndrome and Thin Glomerular Basement Membrane Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9, 1736-50.
- KHOSHNOODI, J., CARTAILLER, J. P., ALVARES, K., VEIS, A. & HUDSON, B. G. 2006. Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 38117-21.
- KIM, Y. H., GOYAL, M., WHARRAM, B., WIGGINS, J., KERSHAW, D. & WIGGINS, R. 2002. GLEPP1 Receptor Tyrosine Phosphatase (Ptpro) in Rat PAN Nephrosis. *Nephron*, 90, 471-476.
- KRAMER, R. H., CHENG, Y.-F. & CLYMAN, R. 1990. Human Microvascular Endothelial Cells Use β 1 and β 3 Integrin Receptor Complexes to Attach to Laminin. *The Journal of Cell Biology*, 111, 1233-1243.
- LANE, J. T. 2004. Microalbuminuria as a marker of cardiovascular and renal risk in type 2 diabetes mellitus: a temporal perspective. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 286, F442-50.
- MATHIESON, P. W. 2004. The cellular basis of albuminuria. *Clinical Science*, 107, 533-538.
- MATUZAKI, T., MURATA, Y., MORI, M., KOTANI, T., OKAZAWA, H. & OHNISHI, H. 2010. Expression, localization, and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases in mammals. *Cellular Signalling*, 22, 1811-7.
- MESSINA, A., DAVIES, D. J., DILLANE, P. C. & RYAN, G. B. 1987. Glomerular Epithelial Abnormalities Associated With the Onset of Proteinuria in Aminonucleoside Nephrosis. *The American Journal of Pathology*, 126, 220-229.
- MINER, J. H. 1998. Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*, 7, 13-9.
- MINER, J. H. 2003. A Molecular Look at the Glomerular Barrier. *Nephron Experimental Nephrology*, 94, 119-122.
- MINER, J. H. 2011. Organogenesis of the kidney glomerulus: Focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis*, 7, 75-82.
- MINER, J. H., PATTON, B. L., LENTZ, S. I., GILBERT, D. J., SNIDER, W. D., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G. & SANES, J. R. 1997. The Laminin α Chains: Expression,

- Developmental Transitions, and Chromosomal Locations of $\alpha 1$ -5, Identification of Heterotrimeric Laminins 8–11, and Cloning of a Novel $\alpha 3$ Isoform. *The Journal of Cell Biology*, 137, 685-701.
- MNC, MEDICAL NETCARE GMBH. 2016. Jahresbericht 2015 zur Qualität in der Dialyse.
- MOCHIZUKI, T., LEMMINK, H. H., MARIYAMA, M., ANTIGNAC, C., GUBLER, M. C., PIRSON, Y., VERELLEN-DUMOULIN, C., CHAN, B., SCHRÖDER, C. H. & SMEETS, H. J. 1994. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nature Genetics*, 8, 77-81.
- MOTIWALA, T., GHOSHAL, K., DAS, A., MAJUMDER, S., WEICHENHAN, D., WU, Y. Z., HOLMAN, K., JAMES, S. J., JACOB, S. T. & PLASS, C. 2003. Suppression of the protein tyrosine phosphatase receptor type O gene (PTPRO) by methylation in hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 22, 6319-31.
- MOTIWALA, T., KUTAY, H., GHOSHAL, K., BAI, S., SEIMIYA, H., TSURUO, T., SUSTER, S., MORRISON, C. & JACOB, S. T. 2004. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13844-13849.
- OZALTIN, F., IBSIRLIOGLU, T., TASKIRAN, E. Z., BAYDAR, D. E., KAYMAZ, F., BUYUKCELİK, M., KILIC, B. D., BALAT, A., IATROPOULOS, P., ASAN, E., AKARSU, N. A., SCHAEFER, F., YILMAZ, E., BAKKALOGLU, A. & PODONET, C. 2011. Disruption of PTPRO Causes Childhood-Onset Nephrotic Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 89, 139-47.
- PATRAKKA, J. & TRYGGVASON, K. 2010. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 164-9.
- PAULSSON, M., AUMAILLEY, M., DEUTZMANN, R., TIMPL, R., BECK, K. & ENGEL, J. 1987. Laminin-nidogen complex. *European Journal of Biochemistry*, 166, 11-19.
- PFAFF, M., GÖHRING, W., BROWN, J. C. & TIMPL, R. 1994. Binding of purified collagen receptors ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$) and RGD-dependent Integrins to laminins and laminin fragments. *European Journal of Biochemistry*, 225, 975-984.
- PIXLEY, F. J., LEE, P. S., DOMINGUEZ, M. G., EINSTEIN, D. B. & STANLEY, E. R. 1995. A Heteromeric Protein-tyrosine Phosphatase, PTPf, Is Regulated by CSF-1 in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 27339-47.
- POLLAK, M. R., QUAGGIN, S. E., HOENIG, M. P. & DWORKIN, L. D. 2014. The Glomerulus: The Sphere of Influence. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9, 1461-1469.
- RAMASWAMY, B., MAJUMDER, S., ROY, S., GHOSHAL, K., KUTAY, H., DATTA, J., YOUNES, M., SHAPIRO, C. L., MOTIWALA, T. & JACOB, S. T. 2009. Estrogen-Mediated Suppression of the Gene Encoding Protein Tyrosine Phosphatase PTPRO in Human Breast Cancer: Mechanism and Role in Tamoxifen Sensitivity. *Molecular Endocrinology*, 23, 176-87.

- REISER, J. K., W.; KRETZLER, M.; MUNDEL, P. 2000. The Glomerular Slit Diaphragm Is a Modified Adherens Junction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11, 1-8.
- RODEWALD, R. & KARNOVSKY, M. J. 1974. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *The Journal of Cell Biology*, 60, 423-33.
- RUGGENENTI, P., PERNA, A., MOSCONI, L., PISONI, R. & REMUZZI, G. 1998. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). *Kidney International*, 53, 1209-16.
- SHRIVASTAVA, A., RADZIEJEWSKI, C., CAMPBELL, E. K., L., MCGLYNN, M., RYAN, T. E., DAVIS, S., GOLDFARB, M. P., GLASS, D. J., LEMKE, G. & YANCOPOULOS, G. D. 1997. An Orphan Receptor Tyrosine Kinase Family Whose Members Serve as Nonintegrin Collagen Receptors. *Molecular Cell*, 1, 25-34.
- STEENHARD, B. M., ISOM, K., STROGANOVA, L., ST JOHN, P. L., ZELENCHUK, A., FREEBURG, P. B., HOLZMAN, L. B. & ABRAHAMSON, D. R. 2010. Deletion of von Hippel-Lindau in Glomerular Podocytes Results in Glomerular Basement Membrane Thickening, Ectopic Subepithelial Deposition of Collagen $\alpha1\alpha2\alpha1(IV)$, Expression of Neuroglobin, and Proteinuria. *The American Journal of Pathology*, 177, 84-96.
- TAGAWA, M., SHIRASAWA, T., YAHAGI, Y., TOMODA, T., KUROYANAGI, H., FUJIMURA, S., SAKIYAMA, S. & MARUYAMA, N. 1997. Identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in postmitotic maturing neurons: its structure and expression in the central nervous system. *Biochemical Journal*, 321, 865-871.
- THOMAS, P. E., WHARRAM, B. L., GOYAL, M., WIGGINS, J. E., HOLZMAN, L. B. & WIGGINS, R. C. 1994. GLEPP1, a Renal Glomerular Epithelial Cell (Podocyte) Membrane Protein-tyrosine Phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 19953-62.
- TIAN, J., WANG, H. P., MAO, Y. Y., JIN, J. & CHEN, J. H. 2007. Reduced Glomerular Epithelial Protein 1 Expression and Podocyte Injury in Immunoglobulin A Nephropathy. *The Journal of International Medical Research*, 35, 338-45.
- TIMPL, R., TISI, D., TALTS, J. F., ANDAC, Z., SASAKI, T. & HOHENESTER, E. 2000. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biology*, 19, 309-17.
- TRYGGVASON, K., PATRAKKA, J. & WARTIOVAARA, J. 2006. Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *New England Journal of Medicine*, 354, 1387-1401.
- TRYGGVASON, K. & WARTIOVAARA, J. 2001. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10, 543-9.
- VOGEL, W., GISH, G. D., ALVES, F. & PAWSON, T. 1997. The Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases Are Activated by Collagen. *Molecular Cell*, 1, 13-23.
- WANG, R., JOHN, P. L. S., KRETZLER, M., WIGGINS, R. C. & ABRAHAMSON, D. R. 2000. Molecular cloning, expression, and distribution of glomerular epithelial protein 1 in developing mouse kidney. *Kidney International*, 57, 1847-1859.

- WARTIOVAARA, J., ÖFVERSTEDT, L.-G., KHOSHNOODI, J., ZHANG, J., MÄKELÄ, E., SANDIN, S., RUOTSALAINEN, V., CHENG, R. H., JALANKO, H., SKOGLUND, U. & TRYGGVASON, K. 2004. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1475-1483.
- WEIGEL, C. 2018. GLEPP1 modifiziert die Kollagen Typ IV-Isoform-Expression der glomerulären Basalmembran.
- WHARRAM, B. L., GOYAL, M., GILLESPIE, P. J., WIGGINS, J. E., KERSHAW, D. B., HOLZMAN, L. B., DYSKO, R. C., SAUNDERS, T. L., SAMUELSON, L. C. & WIGGINS, R. C. 2000. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptp^{ro})-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 1281-1290.
- WHITESIDE, C. I., CAMERON, R., MUNK, S. & LEVY, J. 1993. Podocytic Cytoskeletal Disaggregation and Basement-Membrane Detachment in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis. *The American Journal of Pathology*, 142, 1641-1653.
- WU, L. W., BAYLINK, D. J. & LAU, K. H. 1996. Molecular cloning and expression of a unique rabbit osteoclastic phosphotyrosyl phosphatase. *Biochemical Journal*, 316, 515-523.
- YUDKIN, J. S., FORREST, R. D. & JACKSON, C. A. 1988. Microalbuminuria as predictor of vascular disease in non-diabetic subjects. Islington Diabetes Survey. *The Lancet*, 2, 530-3.
- ZHAO, S., GU, X., GROOME, L. J. & WANG, Y. 2009. Decreased Nephrin and GLEPP-1, But Increased VEGF, Flt-1, and Nitrotyrosine, Expressions in Kidney Tissue Sections From Women with Preeclampsia. *Reproductive Science*, 16, 970-9.

Danksagung

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern sowie meinen Geschwistern Björn, Eric und Jan für die stetige Unterstützung und Motivation, die mir mein Studium und die Dissertation möglich machten.