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

Extrazelluläre Matrixsynthese glomerulärer Zellen *in vitro*

Dissertation

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

vorgelegt von
Ernest Kaufmann
2023

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. med. Rotem Lanzman

Zusammenfassung

Die Proteinurie ist neben einer Hypoproteinämie, peripheren Ödemen und Hyperlipoproteinämie eines der Kriterien für die Diagnose eines nephrotischen Syndroms. Meist besteht die Proteinurie überwiegend aus einer Albuminurie. Ein solcher Verlust von Albumin ist dabei der stärkste Prädiktor für das Auftreten von Erkrankungen wie Herzinfarkten und Schlaganfällen (1).

Bei Schädigung des glomerulären Filters, welcher aus fenestriertem Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten mit ihrer Schlitzmembran besteht, kommt es zu solch einer Albuminurie. Die Ursachen für eine derartige Schädigung sind vielfältig und reichen von erworbenen Schäden bis zu angeborenen Gendefekten für Proteine des glomerulären Filters. Eines dieser Proteine ist das Glomerular epithelial Protein 1 (GLEPP1). Patienten mit einer GLEPP1-Defizienz entwickeln schon im Kindesalter ein idiopathisches nephrotisches Syndrom.

GLEPP1 ist eine Rezeptortyrosinkinase in der Podozytenmembran, dessen genaue Funktion bisher nicht bekannt ist. Die eigene Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass alternde GLEPP1-KO-Mäuse morphologische Veränderungen im Sinne von subpodozytären Verbreiterungen der GBM aufweisen. Auch die Zusammensetzung der Hauptkomponente der GBM, des Kollagens-IV zeigt bei einem GLEPP1 *knockout* ein embryonales Muster (Kollagen Typ IV α1α2α1). (Die embryonalen Kollagen-Ketten werden dabei von Podozyten, wie auch von Endothelzellen produziert, während das adulte Kollagen-IV (α3,4,5) nur von Podozyten gebildet werden kann.)

In dieser Doktorarbeit wurde die extrazelluläre Matrixsynthese von glomerulären Zellen in primärer Zellkultur untersucht. Hierfür wurde ein homozygotes GLEPP1-KO-Mausmodell (mit genetischem 129P3/J-Hintergrund) verwendet und im Alter von 4 und 10 Monaten mit Wildtyp-Mäusen verglichen.

Für die Untersuchungen wurden Glomeruli mittels Dynabead-Methode isoliert und in primärer Zellkultur aufgenommen. Die aussprossenden glomerulären Zellen wurden anschließend mittels qPCR anhand von spezifischen Zellmarkern charakterisiert. Hierbei zeigte sich eine heterogene Mischkultur aus Podozyten, Endothelzellen und auch Mesangialzellen. Die Zellen wurden weiter kultiviert und es wurde mit eigens modifizierten Protokollen die sezernierte extra-

zelluläre Matrix isoliert. Der Fokus lag hierbei auf den Hauptkomponenten der GBM; den Kollagen Typ IV-Ketten (α 1,2,3,5) und dem Laminin (α1). Die Isolate wurden enzymatisch verdaut und auf Proteinebene im Westernblot untersucht. Es zeigten sich sehr geringe nachweisbare Proteinmengen, welche im Vergleich zwischen WT und KO keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die Kultivierung von 10 Monate alten Mausglomeruli zeigte unabhängig vom Genotyp keine adäquate extrazelluläre Matrix-Protein-Produktion und war dadurch weiteren Untersuchungen nicht zugänglich. Zur Kontrolle der Proteinuntersuchungen wurde aus den kultivierten Zellen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche anschließend qPCR-Untersuchungen zugeführt wurden. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen GLEPP1 WT und KO, und auch keiner zwischen den beiden Altersgruppen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass glomeruläre Zellen *in vitro* eine extrazelluläre Matrix sezernieren. Die extrazelluläre Matrix unterscheidet sich *in vitro* von den *in vivo* beobachteten Veränderungen. Dies zeigte sich sowohl auf Protein-Ebene als auch auf der Transkriptions-Ebene. Da sich bei einer Mischkultur die Sekretion einiger Proteine und der RNA nicht eindeutig einer Zellart zuordnen lässt, wären ggf. noch Untersuchungen mit primären Zellisolaten von Podozyten und Endothelzellen möglich.

Abstract

Proteinuria is one of the criteria for the diagnosis of the nephrotic syndrome, along with hypoproteinemia, peripheral edema, and hyperlipoproteinemia. In most cases, proteinuria consists predominantly of albuminuria. Such loss of albumin is the strongest predictor for the occurrence of diseases such as myocardial infarction and stroke (1).

Damage to the glomerular filter, which consists of the fenestrated endothelium, the glomerular basement membrane (GBM) and the podocytes with their slit membrane, results in albuminuria. The reasons for this structural damage are manifold and range from acquired damage to congenital genetic defects for glomerular filter proteins. One of these proteins is the glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1). Patients with GLEPP1 deficiency develop idiopathic nephrotic syndrome in childhood.

GLEPP1 is a receptor tyrosine kinase in the podocyte membrane, where the exact function is not yet known. Our own research group could show that aging GLEPP1-KO mice show morphological changes such as subpodocytic broadening of the GBM. Also, the composition of the major component of the GBM, collagen IV, shows an embryonic pattern (collagen type IV α1α2α1) in a GLEPP1 knockout. (The embryonic collagen chains are produced by podocytes, as well as by endothelial cells, whereas adult collagen IV (α3,4,5) can only be produced by podocytes).

In this doctoral thesis, the extracellular matrix synthesis of glomerular cells was studied in primary cell culture. For this purpose, a homozygous GLEPP1-KO mouse model (with genetic 129P3/J background) was used and compared with wild-type mice at 4 and 10 months of age.

For the studies, glomeruli were isolated by Dynabead method and transferred in primary cell culture. The sprouting glomerular cells were subsequently characterized by qPCR using specific cell markers. This revealed a heterogeneous mixed culture of podocytes, endothelial cells, and also mesangial cells. The cells were further cultured and the secreted extracellular matrix was isolated using specially modified protocols. The focus here was on the major components of the GBM; collagen type IV chains (α 1,2,3,5) and laminin (α1). The isolates were enzymatically digested and analyzed at protein level by Western

blot. Very low detectable protein levels were found, which showed no significant differences when comparing WT and KO. The cultivation of 10-month-old mouse glomeruli did not show adequate extracellular matrix protein production independent of the genotype and was therefore not accessible to further investigations. As a control for the protein assays, RNA was isolated from the cultured cells and transcribed into cDNA, which was subsequently subjected to qPCR assays. There was no significant difference between GLEPP1 WT and KO, nor between the two age groups. In conclusion, glomerular cells were shown to secrete an extracellular matrix in vitro. The extracellular matrix in vitro differs from the changes observed in vivo. This was evident at both the protein level and the transcriptional level. Since in a mixed culture the secretion of some proteins and the RNA cannot be clearly assigned to a cell type, studies with primary cell isolates of podocytes and endothelial cells might still be possible.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aq. bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aq. dest	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATRA	*All-trans retinoic acid*
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Kalzium-Ion
cDNA	Komplementäre DNA
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Col IV/4	Kollagen Typ 4
DNA	*desoxyribonucleic acid*
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EM	Elektronenmikroskopie
FCS	Fetales Kälberserum
FN1	Fibronektin 1
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
GLEPP1	*glomerular epithelial protein 1*
GTP	Guanosintriphosphat
ICAM1	*Intercellular adhesion molecule 1*
KO	*knockout*
mA	Milliampere
MCD	*minimal change disease*
Mg^{2+}	Magnesium-Ion
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

nm	Nanometer
PBS	*phosphate buffered saline*
PTPRO	*protein tyrosine phosphatase receptor type O*
qPCR	*real-time quantitative polymerase chain reaction*
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	*ribonucleic acid*
rpm	*rounds per minute*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	*Scanning electron microscope*
SRNS	Steroidresistentes nephrotisches Syndrom
UV-Licht	Ultra-Violettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
WT1	Wilms-Tumorsuppressorgen
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierversuche und Tierschutz
α	Alpha
β	Beta
µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Proteinurische Erkrankungen/Nephrotisches Syndrom 1

1.2 Der glomeruläre Filter 3

1.3 Aufbau der glomerulären Basalmembran 7

1.4 Podozyten und glomeruläre Endothelzellen 12

1.5 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase O (Ptpro/GLEPP1) 16

1.6 Relevanz der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran für proteinurische Erkrankungen 20

1.7 Ziele der Arbeit 25

2 Material und Methoden 26

2.1 Material 26

2.1.1 Geräte 26

2.1.2 Chemikalien 27

2.1.3 Antikörper 29

2.1.3.1 Primärantikörper: 29

2.1.3.2 Sekundärantikörper: 30

2.1.4 Gele, Puffer, Lösungen 30

2.1.5 Nährmedien und Chemikalien für die Zellkultur 32

2.1.6 Verbrauchsmaterialien 33

2.1.7 Primer 34

2.1.7.1 Primer für GAPDH-Kontroll-PCR: 34

2.1.7.2 Primer für Real-time-qPCR: 35

2.1.8 Verwendete Programme 38

2.2 Methoden 38

2.2.1 Verwendete Versuchstiere 38

2.2.2 Perfusion der Nieren und Organentnahme 38

2.2.3 Isolierung von Glomeruli mittels Dynabeadmethode 42

2.2.4 Kollagenisierung von Zellkulturflaschen und Schalen 43

2.2.5 Etablierung einer Primärzelllinie glomerulärer Zellen in der Zellkultur 44

2.2.6 Passagieren/Expansion der glomerulären Zellen 45

2.2.7 Aussaat der glomerulären Mischkultur zur Produktion von extrazellulärer Matrix (Basalmembran) 45

2.2.8 Isolation der extrazellulären Matrix zur Charakterisierung von Kollagen IV (NC1-Domänen) 46

2.2.9 Isolation der extrazellulären Matrix zur Charakterisierung der Laminin-alpha1-Untereinheiten 47
2.2.10 Westernblot-Analyse 48
2.2.11 Isolation von RNA aus Podozyten 50
2.2.12 Umschreibung der RNA in cDNA 51
2.2.13 GAPDH-Kontroll-PCR 53
2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese 54
2.2.15 Real-Time-PCR (qPCR) 55

3 Ergebnisse 57
3.1 Charakterisierung der glomerulären Primär-Zellkultur 57
3.1.1 Zell-Marker für Podozyten 58
3.1.1.1 qPCR von Synaptopodin 58
3.1.1.2 qPCR von WT1 58
3.1.2 Zell-Marker für Endothelzellen und Mesangialzellen 59
3.1.2.1 qPCR von Fibronektin 1 (FN1) 59
3.1.2.2 qPCR von *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1) 59
3.1.3 Zell-Marker für Fibroblasten 60
3.1.3.1 qPCR von Kollagen 1 60
3.2 Basalmembranproduktion in primärer glomerulärer Zellkultur bei 4 Monate alten Tieren 60
3.2.1 qPCR-Ergebnisse von Kollagen IV (4 Monate) 61
3.2.2 qPCR-Ergebnisse von Laminin α1, Nidogen und Agrin (4 Monate) 62
3.2.3 Westernblot von Kollagen IV und Laminin alpha 1 (4 Monate) 63
3.3 Basalmembranproduktion in primärer glomerulärer Zellkultur bei 10 Monate alten Tieren 65
3.3.1 qPCR-Ergebnisse von Collagen IV (10 Monate) 65
3.3.2 qPCR-Ergebnisse von Laminin alpha 1, Nidogen und Agrin (10 Monate) 66
3.3.3 Westernblot von Kollagen IV und Laminin alpha 1 (10 Monate) 67

4 Diskussion 69
4.1 Die primäre glomeruläre Kultur ist eine Mischkultur mit Hochregulation von FN1 69
4.2 Primäre Zellkulturen unterscheiden sich von *in vivo*-Verhältnissen 72
4.3 Die EZM-Produktion in primärer Zellkultur verändert sich bei alternden Tieren 74
4.4 Einfluss des GLEPP-KO auf die glomeruläre Zellkultur und EZM-Produktion 77
4.5 Technische Limitationen und Ausblick 78

4.6 Schlussfolgerungen 80

5 Literatur- und Quellenverzeichnis 82

6 Danksagungen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schema einer glomerulären Kapillare mit den Komponenten des glomerulären Filters 3
Abb. 2 Modell zur Funktion der glomerulären Schlitzmembran nach Fissel & Miner 5
Abb. 3 Interaktion von GBM-Komponenten untereinander und mit zellulären Oberflächenproteinen 8
Abb. 4 Formation des Kollagen IV-Netzwerkes 8
Abb. 5 Aufbau von Laminin und Interaktionen mit extrazellulären Matrixproteinen der GBM 9
Abb. 6 Schema der glomerulären Filtrationbarrierre 14
Abb. 7 REM-Aufnahme von GLEPP1-WT und KO Mäusen 17
Abb. 8 3D-EM-Untersuchung der Fußfortsätze und GBM bei Ptpro-KO Mäusen 18
Abb. 9 Organentnahme 41
Abb. 10 Waschen der Glomeruli 42
Abb. 11 Aussprossen von Zellen aus Glomeruli 44
Abb. 12 ΔCT-Werte der qPCR von cDNA aus Zellkultur auf verschiedene Zellmarker 57
Abb. 13 ΔΔCT-Werte der qPCR von cDNA für Podozytenmarker (SYNPO, WT1) bei 4 und 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Mäusen 58
Abb. 14 ΔΔCT-Werte der qPCR von cDNA für Endothelzell- und Mesangienzellmarker (FN1, ICAM1) bei 4 und 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Mäusen 59
Abb. 15 ΔΔCT-Werte der qPCR von cDNA für den Fibroblastenmarker Kollagen 1 (Col1) bei 4 und 10 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen 60
Abb. 16 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Col4 a1,2,3,5 bei 4 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen 61
Abb. 17 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Laminin a1 ,Nidogen und Agrin bei 4 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen 62

Abb. 18 Vergleich der Proteinexpression von Kollagen IV- und Laminin-a1-Untereinheiten bei glomerulären Mischkulturen von 4 Monate alten Tieren im Westernblot 64
Abb. 19 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Col4 a1,2,3,5 bei 10 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen 65
Abb. 20 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Laminin alpha1, Nidogen und Agrin bei 10 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen 66
Abb. 21 Vergleich der Proteinexpression von primären glomerulären Zellen im Westerblot von 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Tieren 67
Abb. 22 Expression von Nephrin auf Protein- und mRNA-Ebene im Nierenkortex von jungen (3 Monate) alten (20 Monate) Mäusen (modifiziert nach Zhang et.al 2019) 76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammensetzung des Zellkulturmediums für die primäre glomeruläre Zellkultur 43
Tabelle 2 Verdünnte Essigsäure für Ansetzen der Kollagenisierungslösung ... 43
Tabelle 3 Puffer zur Lyse der glomerulären Zellen 47
Tabelle 4 Collagenase-Lösung zur Abspaltung der NC1-Domänen von den Kollagen-IV-Fibrillen 47
Tabelle 5 Desoxyribonukleasepuffer zur Entfernung der DNA 48
Tabelle 6 Protokoll zur RNA-Isolierung von Zellen RNeasy-Mini Kit von Qiagen 51
Tabelle 8 Ansatz für Reverse Traskription der RNA in cDNA 52
Tabelle 9 Zusammensetzung des GAPDH-Kontroll-PCR-Ansatzes 53
Tabelle 10 Zusammensetzung der qPCR-Ansätze 56

1 Einleitung

1.1 Proteinurische Erkrankungen/Nephrotisches Syndrom

Das nephrotische Syndrom wird definiert als Symptomkomplex aus Proteinurie (>50 mg/kg/d oder >3,5 g/d), Hypalbuminämie, Hyperlipoproteinämie, peripheren Ödemen, sowie einer Hyperkoagulabilität (2).
Es tritt bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit Nierenbeteiligung auf, oftmals verursacht durch eine Störung der Blut-Harn-Schranke. Meistens wird diese durch eine primäre oder sekundäre Schädigung der glomerulären Basalmembran (GBM) ausgelöst (2).

Die häufigsten Glomerulonephritiden mit nephrotischem Syndrom sind auf histologischer Ebene die *minimal-change-disease* (MCD), die Fokal segmentale Glomerulonephritis (FSGS) und die Membranöse Glomerulonephritis (MGN).
Die MCD stellt die häufigste Ursache im Kindesalter dar und tritt meist idiopathisch oder durch medikamentöse Einflüsse auf (3). Sie äußert sich als nephrotisches Syndrom mit einer selektiven Proteinurie, also einer isolierten Albuminurie in der Urinelektrophorese. Die Prognose ist gut, in den meisten Fällen kommt es zu keiner terminalen Niereninsuffizienz (4).
Die membranöse Glomerulonephritis ist mit einem Anteil von ca. 30 % die häufigste Ursache im Erwachsenenalter und tritt auch zum Teil sekundär unter anderem nach Medikamenteneinnahme, bei Malignomen oder Infekten auf. Hier kommt es in ca. 25 % zur Progression in eine Niereninsuffizienz (4).
Die FSGS betrifft zum Großteil dunkelhäutige Menschen (Afroamerikaner, Afrikaner und Lateinamerikaner) und tritt idiopathisch, angeboren oder sekundär auf. Bei ausbleibender Remission werden 60 % der Patienten nach 10 Jahren terminal niereninsuffizient, bei Vollremission nur 10 % (4, 5).
Mögliche Ursachen für ein sekundäres nephrotisches Syndrom sind beispielsweise die diabetische Nephropathie, Amyloidosen, eine Sarkoidose oder Leichtkettenerkrankungen (6).

Eine klinisch und prognostisch weitaus relevantere Einteilung als die Histologie ist jedoch das Ansprechen der Erkrankung auf eine Therapie mit Kortikosteroi-

den. Hierbei wird das Krankheitsbild in das steroidsensitive (SSNS) und das steroidresistente nephrotische Syndrom (SRNS) eingeteilt.

Das steroidsensitive nephrotische Syndrom wird häufig sekundär durch andere Erkrankungen verursacht und zeigt sich eher als MCD und im Alter von <5 Jahren. Das SSNS hat meist einen milderen Verlauf und kann in 96 % der Fälle bis zur Adoleszenz im Sinne einer kompletten Remission austherapiert werden(7).

Den steroidresistenten Formen liegen als Ursache häufig angeborene Gendefekte zugrunde, und sie präsentieren sich histologisch häufiger als FSGS. Das SRNS hat auch eine deutlich schlechtere Prognose, als das SSNS und resultiert in ca. 15 % in einer chronischen Niereninsuffizienz, nur 46,6 % der Patienten zeigen nach leitliniengerechter Steroid-Therapie eine komplette Remission (7, 8).
Bei den steroidresistenten Formen wird die Therapie je nach Grunderkrankung um weitere Immunsuppressiva (Tacrolimus, Cyclosporin A, Mycophenolat-Mofetil u.a.) ergänzt.

1.2 Der glomeruläre Filter

Die Niere hat als paarig angelegtes Organ vielfältige Funktionen. Neben der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes, des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, wie auch der Bildung von Hormonen (Calcitriol, Erythropoetin) ist die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen eine der Hauptaufgaben der Nieren. Hierfür wird durch Filtration des Blutes innerhalb der Glomeruli Primär- und anschließend in den Tubuli der Endharn gebildet. Damit jedoch nicht auch jegliche essenzielle Blutbestandteile, wie Proteine den Körper mit dem Urin verlassen, bedarf es des spezialisierten glomerulären Filterapparates.

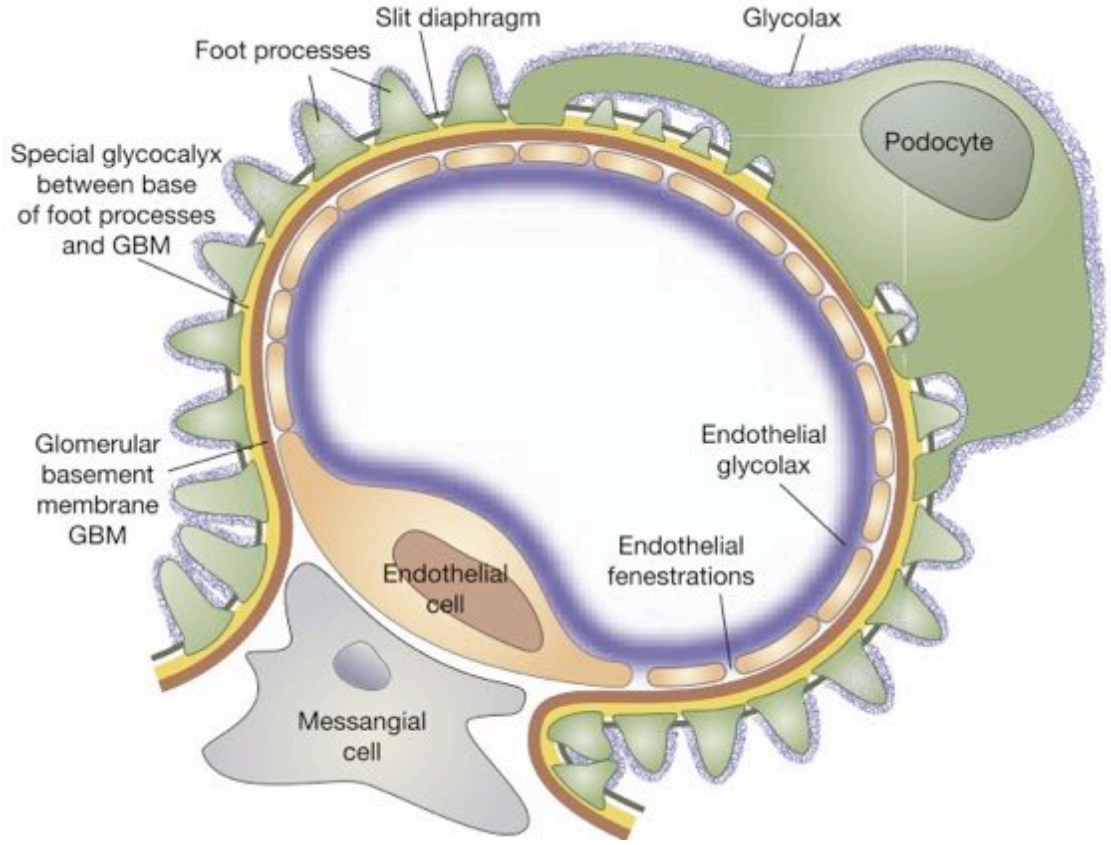


Abb. 1 Schema einer glomerulären Kapillare mit den Komponenten des glomerulären Filters
Darstellung der Kompartimente des glomerulären Filters: endotheliale Glykokalix, fenestriertes Endothel, glomeruläre Basalmembran, Glykokalyx zwischen Fußfortsätzen und GBM, Podozyten mit ihrer Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen. Weiterhin befinden sich Mesangialzellen als strukturstabilisierende Komponente im Glomerulus (9).

Dieser besteht aus mehreren verschiedenen Komponenten, die mehr oder weniger zur Filtrationsbarriere beitragen. Dazu gehören das Endothel mit seiner Glykokalyx, die glomeruläre Basalmembran, die Podozyten mit ihrer Schlitzmembran und spezifischen basalen Glykokalyx und weitere Kompartimente, wie Mesangialzellen und extrazelluläre Matrixkomponenten (siehe Abb. 1) (10).

Das fenestrierte Endothel des Glomerulus ist die erste Komponente des glomerulären Filters und wie jedes Endothel des menschlichen Körpers mit einer Glykokalyx ausgestattet. Diese ist anionisch und besteht aus Sialoproteinen und in den fenestrierten Abschnitten zusätzlich aus Hyaluronsäure und Heparansulfat (11). Wird diese Glykokalyx in irgendeiner Form geschädigt, wie z.B. bei der diabetischen Nephropathie, oder auch experimentell durch enzymatischen Verdau, kommt es zu einer stark erhöhten Ausscheidung von negativ geladenem Albumin, nicht jedoch von gleich großen neutral geladenen Molekülen. Dieser Sachverhalt verdeutlicht die ausgeprägte Ladungs-, jedoch nicht Größenselektivität der endothelialen Glykokalyx (11).

Die Lamina densa der GBM dient als Barriere für Moleküle in der Größe von IgGs und Albumin, diese dringen im Normalfall nicht weiter als bis zur Lamina rara interna ein. Kleinere Moleküle, wie Parvalbumin (12 kDa), oder Ovalbumin (42 kDa) passieren hingegen die Lamina densa und akkumulieren knapp oberhalb der podozytären Glykokalyx, welche die Basis der Fußfortsätze mit der GBM verbindet; diese Glykokalyx stellt also eine weitere Barriere für Moleküle kleiner als Albumin dar (12).

Noch kleinere Partikel passieren den Filter komplett und werden von proximalen Tubulus-Zellen resorbiert, was gegen eine reine Filterfunktion der Schlitzmembran spricht, da in dessen Nähe keine Partikel akkumulieren, bzw. die Schlitzmembran nie verstopft (12, 13).
Die GBM und die podozytäre basale Glykokalyx sind demnach im Gegensatz zur endothelialen Glykokalyx größenselektive Strukturen des glomerulären Filters (13).

Die Schlitzmembran und ihre genaue Funktion für den glomerulären Filter ist noch Gegenstand aktueller Forschung (14). Sie besteht aus verschiedenen Transmembran-Proteinen (Nephrin, Neph1/2, FAT1/2, Podocin), die durch ihre Verknüpfung mit dem Zytoskelett die Podozytenfußfortsätze mechanisch miteinander verbinden. Ihre intrazellulären Domänen zeigen allerdings auch vielzählige (De)-Phosphorylierungsstellen, die zu unterschiedlichen Signalkaskaden

innerhalb des Podozyten führen. So aktiviert beispielsweise die intrazelluläre Phosphorylierung der zytoplasmatischen Nephrin-Domäne durch eine Src-Kinase anti-apoptotische Signalkaskaden (12). Hierbei werden Adaptorproteine (Grb2, Nck) rekrutiert, welche podozytäre Schäden durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts reparieren (15).
Mutationen in vielen dieser Kinasen, wie z.B. der Fyn-Kinase führen zu Proteinurie und Podozytenverlust (16).

Neuere Modelle versuchen zu erklären, wieso jegliche Mutationen, welche die Schlitzmembran oder dessen Verankerung am Zytoskelett einschränken, zu einem nephrotischen Syndrom führen, die Schlitzmembran selber jedoch nie verstopft (17). So wurde von Fissel und Miner diskutiert, dass die GBM sich wie ein semipermeables Gel für Moleküle verhält (17, 18) und sich diese im Normalfall in einem komprimierten Zustand befindet. Dieser Zustand wird durch die an der GBM verankerten Podozyten gewährleistet, die ihrerseits durch die Schlitzmembran zusammengehalten werden (siehe Abb. 2). Ist nun die Schlitzmembran geschädigt, laufen die Podozytenfußfortsätze auseinander und können die GBM nicht mehr im komprimierten Zustand erhalten. Die Dichtigkeit nimmt, ab und Makromoleküle, wie Albumin können die GBM passieren (17).

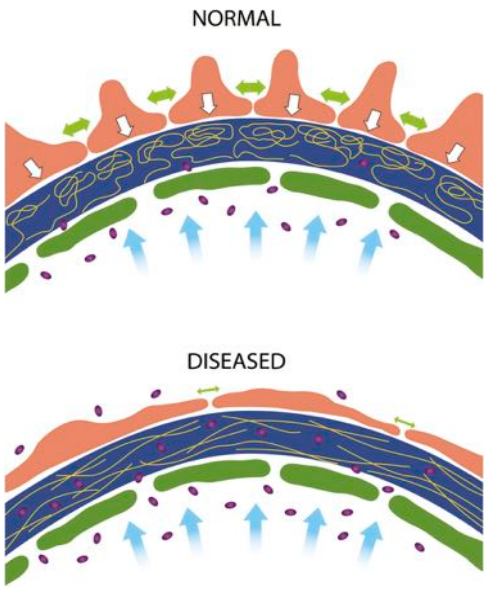


Abb. 2 Modell zur Funktion der glomerulären Schlitzmembran nach Fissel & Miner
Gesund (oben): Die GBM wird als semipermeables Gel durch die Verankerung mit den Podozytenfußfortsätzen (und diese untereinander durch die Schlitzmembran (grüne dicke Pfeile)) in einem komprimierten, „dichten“ Zustand gehalten. Lediglich Wasser (blaue Pfeile) kann passieren. Erkrankt (unten): Ist die Schlitzmembran gestört (grüne dünne Pfeile), weichen die Podozytenfußfortsätze auseinander und flachen ab. Die Kompression der GBM wird aufgehoben und sie wird durchlässiger für Moleküle, wie Albumin (17).

Auch die Mesangialzellen als spezialisierte Fibroblasten innerhalb und außerhalb des Glomerulus spielen eine gewisse Rolle für den Filtrationsmechanismus. So produzieren sie Komponenten der mesangialen Matrix, welche die

Struktur des Glomerulus aufrechterhalten. Außerdem erhöhen ihre kontraktilen Eigenschaften die glomeruläre Dehnbarkeit in Abhängigkeit von hydrostatischen Kräften (10).

1.3 Aufbau der glomerulären Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist ein integraler Bestandteil des glomerulären Filters. Sie ist durchlässig für Wasser und kleine Moleküle, hält Albumin und andere Makromoleküle jedoch im Blut zurück (19, 20).

Mit circa 300-350 nm ist sie im Vergleich zu anderen Basalmembranen relativ dick (21). Diese messen im Durchschnitt nur 50-100 nm (22). Sie besteht aus 3 Schichten, der Lamina rara interna, der Lamina densa und der Lamina rara externa (23).

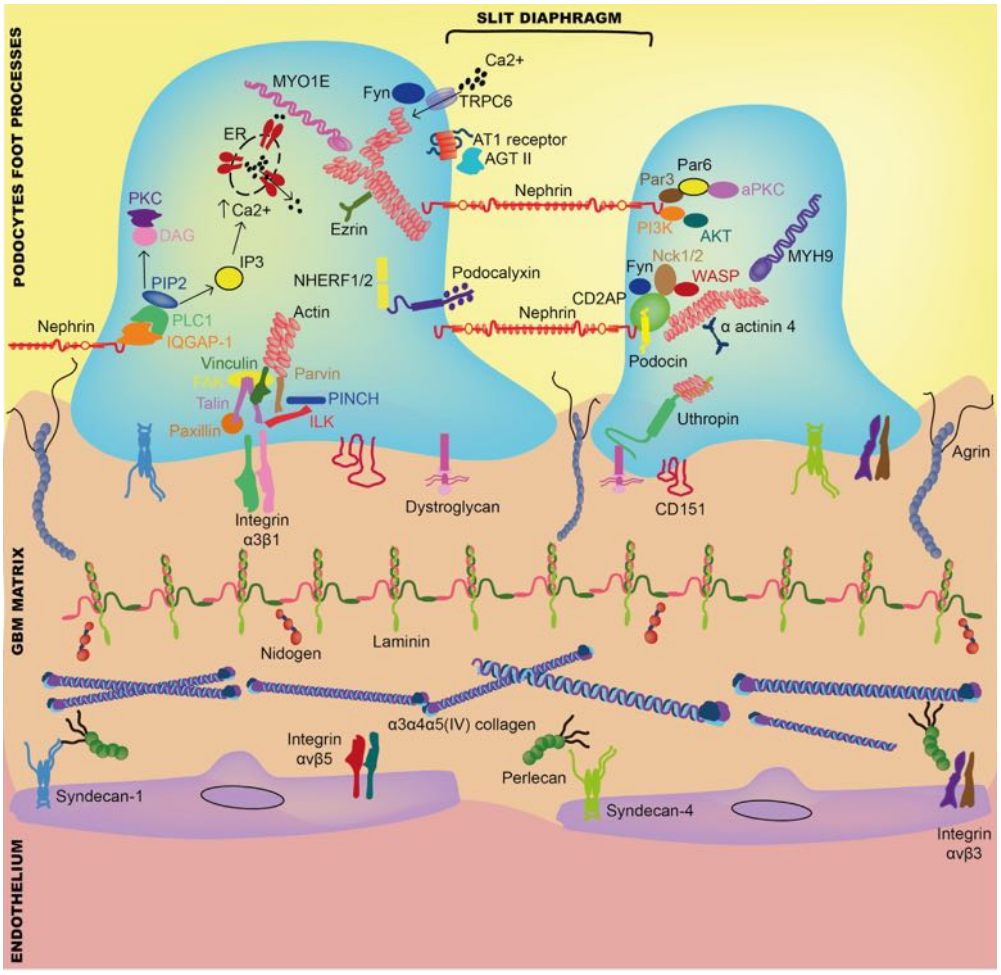


Abb. 3 Interaktion von GBM-Komponenten untereinander und mit zellulären Oberflächenproteinen

Der glomeruläre Filter besteht aus Podozyten (blau) auf der Primärharnseite (gelb), den Endothelzellen (violett) auf der Blutseite (rot) und dazwischen der glomerulären Basalmembran (orange). Innerhalb der GBM selbst und an den Kontaktstellen von Podozyten/Endothelzellen und der GBM zeigen sich komplexe Maschenwerke unzähliger Proteine, welche für die Stabilität und Funktion der GBM unabdingbar sind (21).

Im Laufe der Glomerulogenese produzieren Podozyten und Endothelzellen jeweils eigene Basalmembranschichten, die miteinander verschmelzen und so die reife GBM bilden (24, 25). Hierbei entsteht ein komplexes Maschenwerk aus vielzähligen Proteinen (siehe). Die glomeruläre extrazelluläre Matrix, zu der auch die GBM gehört, besteht aus mehr als 144 verschiedenen Proteinen(26). Die Hauptbestandteile sind hierbei Kollagen IV, Laminine, Nidogen und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) (27). Diese werden nun näher beschrieben.

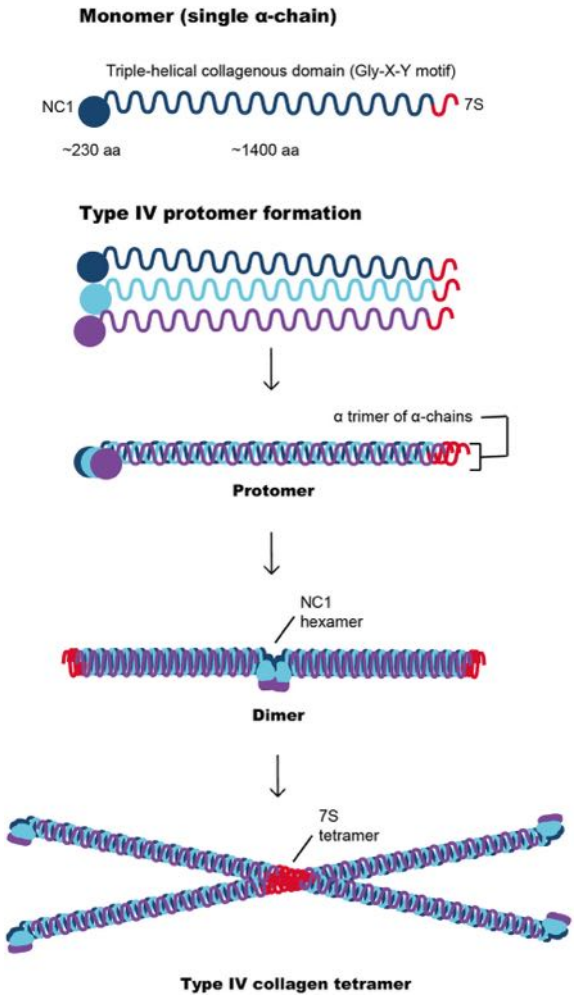


Abb. 4 Formation des Kollagen IV-Netzwerkes
Schematische Darstellung der Formation des Kollagen IV-Netzwerkes. Drei einzelne α-Ketten (Monomere) formieren sich zu einem Trimer (Protomer). Diese dimerisieren über die NC1-Domänen und formieren sich anschließend über die 7S-Domäne zu Kollagen IV-Tetrameren. Für die Funktion innerhalb der GBM ist eine solch komplexe Netzwerkbildung essentiell (21).

Kollagen IV wird (wie jedes Kollagen) als Heterotrimer (Protomer) bestehend aus drei α-Ketten sekretiert. Die Kollagen-Domäne besteht im zentralen Bereich aus zahlreichen Gly-X-Y Aminosäure-Triplets, welche die Grundlage für die Bildung dieser Trimere sind. Am amino-terminalen Ende findet sich eine 7S-Domäne und am carboxy-terminalen Ende eine NC1-Domäne. Beide sind am Zusammenbau der Trimere zu einem Kollagen-Netzwerk beteiligt (siehe). Die NC1-Domäne der jeweiligen Ketten führen zusätzlich dazu, dass sich nur die Kombinationen α1α2α1, α3α4α5 und α5α6α5 zusammensetzen können (28, 29).

Kollagen IV(α1α2α1) ist dabei vor allem in der sich entwickelnden Basalmembran zu finden, während in der adulten GBM hauptsächlich Kollagen IV(α3α4α5) vorliegt. Es wird postuliert, dass dieser Wechsel der Isoformen wichtig für die

Reifung und Erhaltung der adulten Filtrationsbarriere ist (30). Er soll zu einer erhöhten Stabilität führen und vor proteolytischen Einflüssen schützen (31).
Immunelektronenmikroskopische und weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Endothelzellen und Podozyten Kollagen IV(α1α2α1) sekretieren, das adulte Kollagen IV(α3α4α5) jedoch nur von Podozyten produziert wird (25).
Eine bestens erforschte Erkrankung der glomerulären Basalmembran ist das Alport Syndrom. Hierbei führt eine Mutation in einem der Gene des adulten Kollagen IV (COL4A3/4/5) zu einem fehlerhaften Switch von embryonaler zu adulter Form und folglich zur Desintegration der GBM mit Podozytenschädigung, Glomerulosklerose und extrarenalen Manifestationen an Augen und Innenohr. Patienten zeigen bereits nach der Geburt eine Proteinurie und Mikrohämaturie. Unbehandelt erleiden Patienten im Durchschnitt mit 22 Jahren ein terminales Nierenversagen (32).
Hier zeigt sich die außerordentliche Rolle des Kollagen IV für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion der GBM.

Laminine sind große Glykoproteine, bestehend aus α- β- und γ-Ketten, welche durch ihre Struktur ein Gerüst für die Anknüpfung unzähliger extrazellulärer Matrixkomponenten bieten (siehe Abb. 5).
Die amino-terminalen LN-Domänen an den kurzen Armen des Laminins bedingen die Polymerisation zu Heterotrimeren, was eine essenzielle Voraussetzung für die Bildung der Basalmembran ist (33). Die LG-Domänen am langen Arm interagieren mit zellulären Oberflächenrezeptoren, wie z.B. Integrinen oder Dystroglykan. Fehlen diese

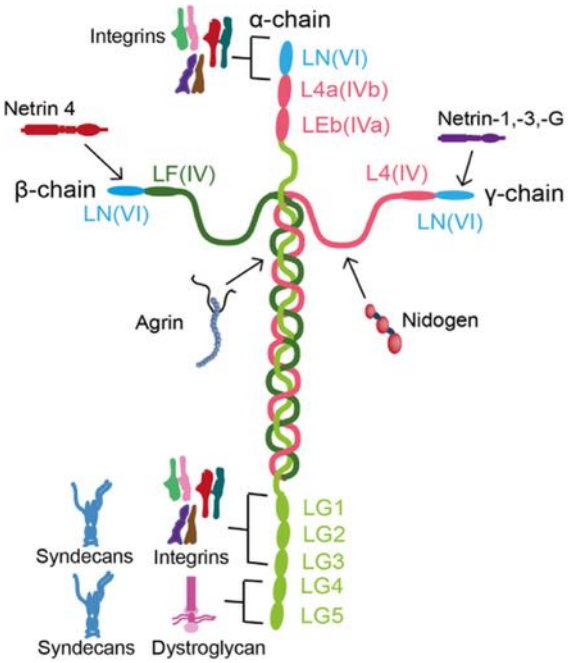


Abb. 5 Aufbau von Laminin und Interaktionen mit extrazellulären Matrixproteinen der GBM
Schematische Darstellung des Aufbaus von Laminin als Heterotrimer, bestehend aus einer α- β- und γ-Kette. Laminin interagiert über verschiedene Domänen mit unzähligen extrazellulären Matrixkomponenten innerhalb der GBM (21). GBM: glomeruläre Basalmembran, LF: globuläre F-terminale Domäne, LG: globuläre C-terminale Domäne, LN: globuläre N-terminale Domäne

Interaktionen, kommt es zu glomerulären Schäden (21).
Genau wie beim Kollagen IV gibt es auch beim Laminin einen *Switch* von embryonaler (α1β1γ1, LM-111) zur adulten Form (α5β2γ1, LM-521), die für die Reifung und Stabilität der Filtrationsbarriere von Bedeutung zu sein scheint (30).
Die adulte Form von Laminin wird sowohl von Podozyten, als auch von Endothelzellen produziert (34).
Mutationen im Laminin-β2, kodiert durch das Gen LAMB2 führen zum Pierson-Syndrom. Dieses ist charakterisiert durch ein kongenitales nephrotisches Syndrom, Mikroorie, respiratorische Insuffizienz und frühes Nierenversagen mit Notwendigkeit von Ersatzverfahren (21, 35). Hier zeigt sich auch die außerordentliche Relevanz der Laminine für den Erhalt der Funktionalität der GBM; diese haben nach dem Kollagen IV auch den zweitgrößten Anteil an der Basalmembran (22).

Nidogene, auch Entactine genannt, sind hantelförmige Proteine der glomerulären Basalmembran, die sowohl an Laminin γ1, als auch an Kollagen IV binden, und damit beide Proteinnetzwerke miteinander verbinden (28). Trotz dieser Tatsache ist scheinbar keine der Isoformen (Nidogen-1, 2) für die Aufrechterhaltung einer funktionellen GBM nötig, da diese sich bei KO-Mäusen auch bei kompletter Abwesenheit von Nidogen bildet. Bei *knockouts* von Nidogen-2 zeigten Mäuse bei normalem Phänotyp einen erhöhten Blutdruck, und eine erhöhte Albuminausscheidung. Daher wird diskutiert, ob Nidogen eine reparative Rolle in der GBM haben könnte. Die genaue Funktion für die GBM ist allerdings noch nicht bekannt (21).

Einen weiteren Bestandteil der GBM bilden die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG). Dazu gehört neben Perlecan und Kollagen XVIII auch das Agrin (36). Während die übrigen HSPGs zum Großteil in der sich entwickelnden Niere zu finden sind, ist Agrin hauptsächlich in der reifen GBM in allen Schichten zu finden (21, 36). HSPGs werden an ihren Seitenketten regelmäßig sulfatiert, was zu einer negativen Ladung der Proteoglykane führt. Dies wurde als mögliche Komponente der Ladungsselektivität der GBM des glomerulären Filters diskutiert (21). Agrin als Haupt-Proteoglykan der reifen GBM scheint jedoch für die Permselektivität des glomerulären Filters nicht von großer Bedeutung zu sein;

das Fehlen dieses Moleküls, und damit die weitestgehende Aufhebung der anionischen Ladung der lamina rara externa der GBM führt zu keiner Änderung der glomerulären Permeabilität, auch nicht bei experimenteller Albumin-Überladung (37). Die Heparansulfat-Ketten spielen jedoch wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Komplementsystems innerhalb des Glomerulus, es bedarf jedoch noch weiterer Forschung auf diesem Gebiet (38).

1.4 Podozyten und glomeruläre Endothelzellen

Podozyten als eine der Hauptkomponenten des glomerulären Filters sind postmitotische und enddifferenzierte Zellen mit primären Zellausläufern und sekundären Fußfortsätzen. Diese „interdigitieren“ untereinander und sind durch die dazwischenliegende Schlitzmembran miteinander verbunden (39, 40).
Die Podozyten befinden sich auf der Harnseite des Glomerulus und bilden das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel. Hierbei werden die glomerulären Kapillarschlingen nach außen von den Podozytenfußfortsätzen umgriffen (40).
Die Fußfortsätze enthalten ein Netzwerk aus kurzen, verzweigten Aktinfilamenten und parallel angeordneten kontraktilen Aktinfilamentbündeln. Änderungen dieser Strukturen werden als Ursache für Alterationen der Permeabilität der Filtrationsbarriere diskutiert (39).

Die embryonale Entwicklung der Podozyten und der Fußfortsätze sowie der Schlitzmembran erfordert ein komplexes Zusammenspiel von membranassoziierten Proteinen, bzw. dessen Transkriptionsfaktoren. So führen Disruptionen von beispielsweise α3-Integrin, Protocadherin FAT1 oder Adaptorproteinen wie Nck1/2, welche mit Nephrin und Podocin verknüpft sind zum Versagen der Bildung funktionstüchtiger Fußfortsätze und der Schlitzmembran (39). Auch die Verknüpfung der Podozyten mit der GBM ist essentiell für die Funktion der Zellen. Das Integrin-α3β1 ist hierbei eine Hauptverbindungskomponente zwischen der ECM (Laminin) und den Podozyten (siehe). Eine homozygote Mutation in diesem Protein führt daher zu Veränderungen der GBM- und Podozytenstruktur und einem nephrotischen Syndrom (41).

Podozyten besitzen eine Vielzahl von struktur- und funktionsrelevanten Proteinen. Da eine ausführlichere Beschreibung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wird hier nur auf die wichtigsten Proteine eingegangen, die in dieser Arbeit auch untersucht wurden.
Das WT1-Gen, welches für das Wilms-Tumor-Protein kodiert, kann bei einer Mutation zur Entwicklung eines Wilms-Tumors (auch Nephroblastom) führen.

Dieser wurde erstmals 1899 von Max Wilms bei einer malignen Neoplasie der Niere beschrieben (42).
Das Wilms-Tumor-Protein ist ein Zink-Finger-Transkriptionsfaktor und hat in differenzierten Podozyten durch die Regulation einer Vielzahl von Genen eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Zelle. Es unterstützt allerdings schon in der Embryogenese die MET (mesenchymale epitheliale Transition) über die Aktivierung des Wnt4-Gens und ist auch danach an der Tubulo- und Glomerulogenese beteiligt (43). Weitere Zielgene des WT1 sind unter anderem diejenigen für Wachstumsfaktoren wie IGF-II, TGF-β, PDGFA und Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR, IGFR) (44-48). In der entwickelten Niere ist WT1 ausschließlich in den Podozyten nachzuweisen und eignet sich daher optimal als Podozyten-Marker (43).
Synaptopodin (*podocyte protein 44/pp44*) ist ein Aktin-assoziiertes Protein, welches essentiell für die Integrität des podozytären Zytoskeletts ist und einen wichtigen Mediator für die Zellmigration darstellt. Dies wird über die Regulation von Rho-GTPasen i.S. einer kompetitiven Hemmung von Smurf1 bewerkstelligt. Smurf1 wiederum ubiquitiniert RhoA (49, 50). Fehlt nun Synaptopodin in der Niere, zeigt sich eine reduzierte RhoA-Aktivität, jedoch bestehen klinisch keine Auffälligkeiten in sonst gesunden Mäusen. Werden Synaptopodin-defiziente Mäuse jedoch schädlichen Substanzen wie Adriamycin ausgesetzt, zeigt sich eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit für das Auftreten einer Nephropathie. Synaptopodin hat daher eher eine protektive Rolle im Rahmen von podozytären Schäden, am ehesten durch dessen Beteiligung an der Aktin-Reorganisation (51).
Synaptopodin ist in hochdynamischen Zellkompartimenten, wie z.B. in dendritischen *spines* zu finden. Innerhalb der Niere ist es spezifisch in Podozyten(-Fußfortsätzen) exprimiert (49, 52).

Beim nephrotischen Syndrom im Rahmen von glomerulären Schäden sind die primär affektierten Zellen häufig die Podozyten, wobei neben direkten Schädigungen auch die zelluläre Interaktion mit anderen glomerulären Zellen beeinträchtigt sein kann (53).

Solche angeborenen oder erworbenen Schäden an Podozyten äußern sich nahezu immer als sogenanntes *podocyte (foot process) effacement*, also einer Verplumpung der Strukturen mit Abnahme der Interdigitationen und Verschmelzung der Fußfortsätze. Auch die GBM zeigt sich verdickt (siehe Abb. 6) (54).

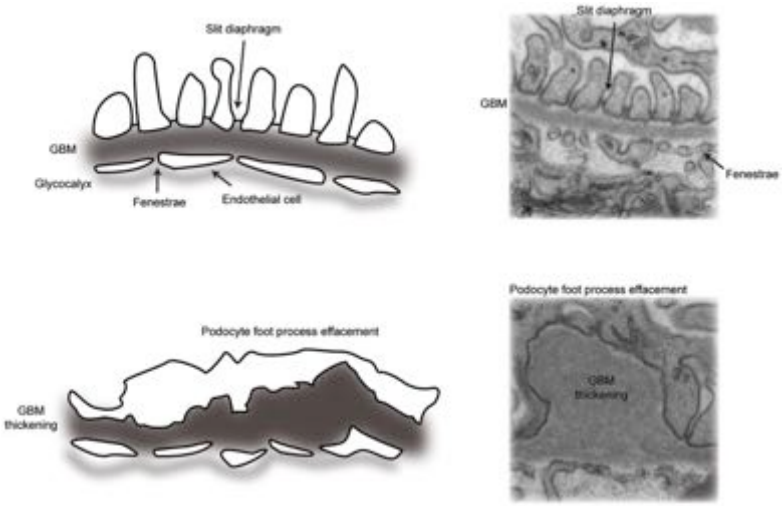


Abb. 6 Schema der glomerulären Filtrationbarrierre
(Oben) Elektronenmikroskopische Aufnahme und Schema der normalen Architektur der glomerulären Filtrationsbarriere. (Unten) EM-Aufnahme und Schema von Defekten der glomerulären Filtrationsbarriere, mit Verlust der Schlitzmembran, *podocyte foot process effacement* und GBM-Verdickung (41).

Diese morphologischen Veränderungen werden als Schutzmechanismen der Podozyten vor Ablösung und Zellverlust diskutiert (54, 55).

Da reife Podozyten *in vivo* unfähig zur Zellteilung und daher besonders vulnerabel gegenüber glomerulären Schäden sind, ist ein signifikanter Podozyten-Verlust ein entscheidender Faktor für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz (39).

Die andere Hauptkomponente der Filtrationsbarriere sind die Endothelzellen. Diese bilden die zelluläre Filterkomponente auf der Blutseite des Glomerulus. Wie alle Endothelzellen besitzen sie eine anionische Glykokalyx bestehend aus Proteoglykanen, Sialoproteinen und vielen weiteren Komponenten (56, 57). Die Kapillaroberfläche des glomerulären Endothels ist zu 20-50% fenestriert (58).
Die außerordentliche Rolle der Endothelzellen für die Aufrechterhaltung der Filterfunktion zeigt sich beispielsweise bei der diabetischen Nephropathie. Hier führt neben anderen Mechanismen eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx zu einem Verlust der Ladungsselektivität mit konsekutiver Albuminurie (59-61).

Zusätzlich sind die Endothelzellen auch maßgeblich an der Bildung der GBM beteiligt. Sie sekretieren im sich entwickelnden Glomerulus die unreifen Laminin- und Kollagen-IV-Ketten, aber auch das reife Laminin (LM-521) zusammen mit den Podozyten (25).

Das in dieser Arbeit als Endothelzellmarker verwendete ICAM-1 reguliert die Interaktion zwischen Leukozyten und renalen Zellen und ist vor allem auf Endothelzellen, aber auch auf Mesangialzellen lokalisiert (62).

Auch das Fibronektin 1 (FN1) kann in beiden Zellen nachgewiesen werden (63). Daher kann man diese auch als Marker für nicht-podozytäre glomeruläre Zellen ansehen.

1.5 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase O (Ptpro/GLEPP1)

In einem *Report* aus dem Jahr 2011 wurde von zwei türkischen Familien berichtet, bei deren Nachkommen im Alter von 5-14 Jahren ein autosomal-rezessives steroidresistentes nephrotisches Syndrom (SRNS) diagnostiziert wurde. Histologisch zeigte sich bei einem Patienten eine fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und bei einem anderen eine *minimal change disease (MCD)*. Anhand von genetischen Untersuchungen konnten bei den betroffenen Kindern homozygote Mutationen im Ptpro-Gen identifiziert werden, welche das Protein *protein tyrosine phosphatase, receptor type O/ glomerular epithelial protein 1 (*GLEPP1) kodieren. Ptpro/GLEPP1 sind Synonyme, in dieser Arbeit wird der Einheitlichkeit halber die Terminologie GLEPP1 verwendet. Bei einem der sechs betroffenen Kindern entwickelte sich sogar eine Transplantationspflichtigkeit (64). Die GLEPP1-Defizienz ist eine von vielen Störungen, bei denen sich durch fehlerhafte podozytäre Proteine das klinische Bild eines nephrotischen Syndroms zeigt (65-67).

Diese heterogene Gruppe podozytärer Proteinstörungen weist einen Anteil von ca.15-20 % aller Patienten mit SRNS auf (64).
GLEPP1 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, welche in der apikalen Membran der podozytären Fußfortsätze lokalisiert ist. Strukturell zeigt das Protein eine große extrazelluläre Domäne (bestehend aus acht Fibronektin Typ-III ähnlichen Schleifen), einen hydrophoben membranständigen Teil und eine einzelne intrazytoplasmatische katalytische Domäne mit Phosphatase-Aktivität (64, 68). Die große extrazelluläre Domäne scheint eine Funktion bei der Zell-Zell-Interaktion zu vermitteln. So wurde in Versuchen, bei denen Zellen mit der Phosphatase transfiziert wurden, eine verstärkte Adhäsion mit konsekutiver Verklumpung der Zellen festgestellt (68).

GLEPP1-mRNA wird neben den Glomeruli auch im zentralen Nervensystem exprimiert (68). In der pränatalen Entwicklung zeigt sich eine starke Protein-Expression unter anderem in den Interneuronen des bulbus olfactorius (69, 70). Solche strukturhomologen Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen, wie das GLEPP1 sind essenziell für das Wachstum und die Entwicklung von Axonen im

Rückenmark, so führt der Verlust des im Rückenmark exprimierten Ptpro zu Faszikulationen von bestimmten Motoneuronen, aber auch zur Unterentwicklung bzw. zur kompletten Agenesie der Neurone (71).
Das Verhalten der Tiere wird dabei durch einen GLEPP1-KO allerdings nicht beeinflusst (72).

Die GLEPP1-Defizienz ist keine letale Mutation und führt bei Mäusen weder zu einer Einschränkung der Fertilität noch zu Komplikationen während der Gravidität. Auch die Nachkommen von Ptpro -/- Mäusen sind äußerlich unauffällig (72).
In der Nierenstruktur ist lichtmikroskopisch ebenfalls kein Unterschied zwischen Wildtyp und KO-Tieren zu erkennen. In rasterelektronenmikroskopischen (REM)-Untersuchungen konnten jedoch deutliche Unterschiede in der podozytären Struktur nachgewiesen werden. Es zeigt sich bei Ptpro -/- Mäusen anstatt einer oktopoiden eine eher amöboide Struktur mit verbreiterten und verkürzten Fußfortsätzen (siehe Abb. 7) (72).

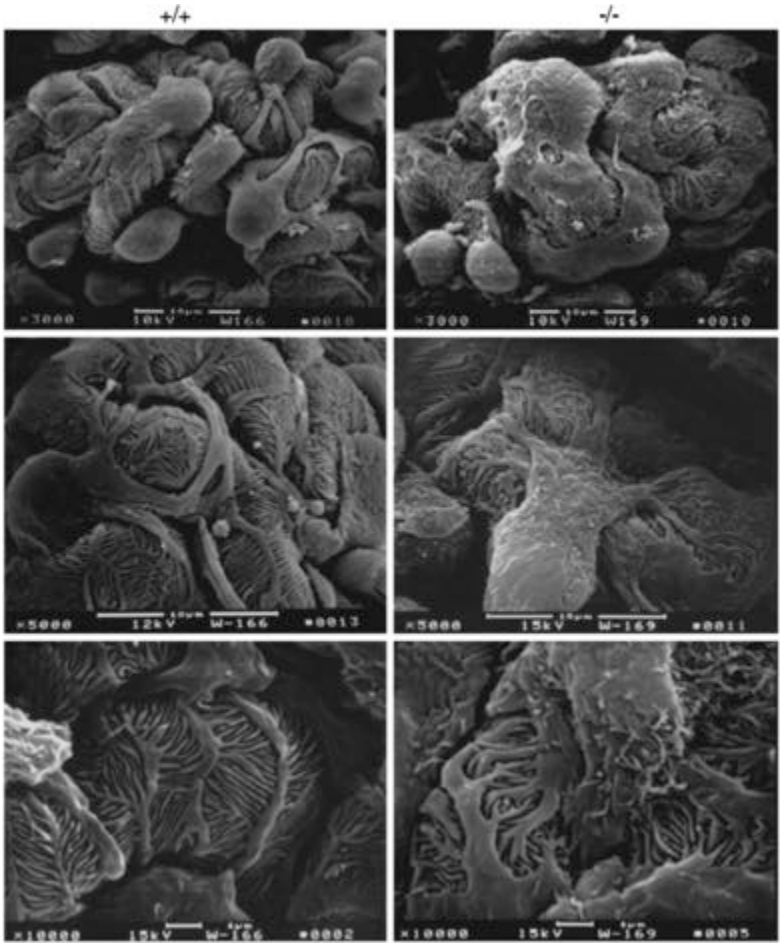


Abb. 7 REM-Aufnahme von GLEPP1-WT und KO Mäusen
Wildtyp- (Ptpro+/+, links) und knockout-Mäuse (Ptpro -/-, rechts). In der geringsten Vergrößerung (3000x, oben) ist bei den Ptpro -/- Glomeruli eine Verbreiterung der podozytären Ausläufer zu erkennen. Diese sind weitaus weniger definiert und abgrenzbar, als bei den Ptpro +/+ Mäusen. Es zeigt sich bei Ptpro -/- anstatt der normalen oktopoiden eine eher amöboide Struktur. Bei stärkster Vergrößerung (10000x, unten) erkennt man bei Ptpro -/- die verbreiterten und verkürzten Fußfortsätze mit eher zehenartiger Erscheinung. Im Gegensatz dazu zeigen sich diese beim Wildtyp als lange, dünne, fingerartige Fortsätze (Vergrößerung oben: 3000x, mittig: 5000x, unten 10000x) (72).

Die Breite der Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen ist jedoch nicht verändert (72).

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass alternde GLEPP1-KO Tiere (6 und 10 Monate) eine erhöhte Proteinurie und eine eher

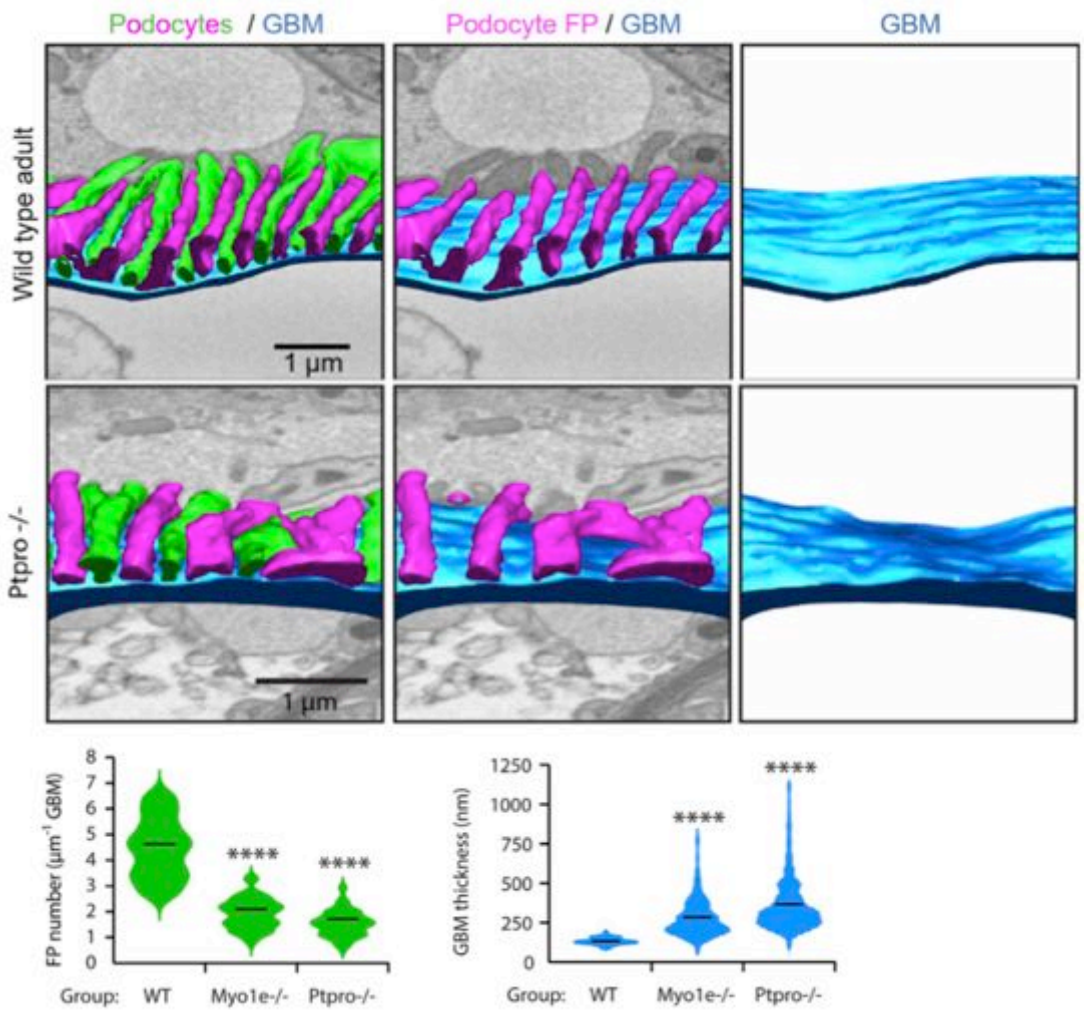


Abb. 8 3D-EM-Untersuchung der Fußfortsätze und GBM bei Ptpro-KO Mäusen
Querer Blick auf die Podozytenfußfortsätze (grün, magenta) und die GBM (blau). Es zeigen sich bei Ptpro -/- Tieren verbreiterte und abgeflachte Fußfortsätze. Rechts erkennt man die starke Verdickung der GBM im Vergleich zum Wildtyp. Die Plots zeigen die starke Verringerung der Fußfortsätze (links unten) und das Ausmaß der GBM-Verdickung (rechts unten) durch einen knockout für Ptpro. ****P < 0.0001 (55).

unreife Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran aufweisen (Kollagen IV α1α2α1) (Doktorarbeiten L. Lennartz, C. Weigel, P. Schüppler) (73). Bei jungen Tieren konnte keine erhöhte Durchlässigkeit der Basalmembran für Proteine gezeigt werden (Doktorarbeit Christian Weigel). Interessanterweise ist die glomeruläre Basalmembran aber verdickt (siehe Abb. 8). und zeigt in 3-dimensionalen Strukturanalysen sogar podozytäre Zellinvasionen (55). Solche morphologischen Veränderungen konnten auch im Alport-Mausmodell nachge-

wiesen werden. Die genaue Ursache dafür ist noch nicht geklärt, es wird jedoch spekuliert, dass durch die verstärkte Auflösung der GBM-Matrix die Podozyteninvasion als Verankerung dient, um die Ablösung der Zellen zu verhindern. Eine andere Vermutung lautet, dass die einwandernden podozytären Ausläufer dem Wiederaufbau im Sinne eines „*remodelling*“ der GBM dienen (55).
Interessanterweise zeigen sich beim GLEPP1 KO trotz ähnlichen affektierten EZM-Proteinen elektronenmikroskopisch neben den oben genannten nur Gemeinsamkeiten auch viele Unterschiede zu anderen GBM-Erkrankungen. So zeigt sich beim Alport-Syndrom neben einer Verdickung auch eine Aufspaltung von Basalmembranabschnitten und je nach Ausprägung auch eine Ausdünnung der Basalmembran, welche beim GLEPP1 KO nicht nachgewiesen werden konnte (74).

GLEPP1 als essenzielles podozytäres Protein wird auch als Marker für verschiedene Erkrankungen der Niere mit podozytärem Schaden verwendet (75). So korreliert beispielsweise eine verringerte Expression von GLEPP1 mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Steroidtherapie bei FSGS (76).

1.6 Relevanz der Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran für proteinurische Erkrankungen

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Dissertationen von Phillip Schüppler, Christian Weigel und Laura Lennartz) wie auch weitere Literatur konnten zeigen, dass eine GLEPP1-Defizienz *in vivo* zu einer Veränderung der GBM führt. Ähnliche relevante Veränderungen der GBM zeigen sich auch beim Alport-Syndrom mit Veränderungen des Kollagen IV und beim Pierson Syndrom mit Veränderungen des Laminins.

Alport-Syndrom:

Das Alport-Syndrom präsentiert sich als Symptomkomplex aus persistierender Mirkohämaturie in frühem Lebensalter und zeigt im Verlauf eine progressive Proteinurie und Verschlechterung der Nierenfunktion. Häufig wird dieses Erkrankungsbild von Hörverlust und okulären Komplikationen begleitet (77).

Die Ursache hierfür ist eine Mutation in den Genen COL4A3, COL4A4 oder COL4A5. Diese kodieren für die jeweiligen Kollagen IV-Monomere; COL4A3 (Kollagen IV alpha 3), COL4A4 (Kollagen IV alpha 4), und COL4A5 (Kollagen IV alpha 5. Der Erbgang erfolgt in ca. 80-85 % der Fälle X-chromosomal und affektiert dann das COL4A5-Gen. Mutationen in den Genen für die α3 und α4-Ketten verursachen die selteneren autosomal-rezessiven (10-15 %) oder die autosomal dominanten (5 %) Formen des Alport-Syndroms (78, 79).

Die verschiedenen Mutationen führen zu einer veränderten Komposition der GBM mit zunehmender Funktionsabnahme. Zu Beginn zeigt sich eine ausgedünnte Basalmembran, welche jedoch im Verlauf partiell verdickt und sich aufspaltet (55).

Während der Glomerulogenese kommt es zu einer unzureichenden Sekretion bzw. Aufnahme des Kollagen IV α3α4α5 in die GBM, was zu einem Verbleiben von Kollagen IV α1α1α2 in der GBM führt. Das Kollagen IV α1α1α2 hält die Architektur der GBM allerdings wahrscheinlich temporär intakt, was das zeitversetzte Auftreten der Symptome erklärt (Symptome nicht schon bei Geburt) (80).

Eine ähnliche Zusammensetzung der GBM mit Fokus auf unreifen α1α1α2-Trimeren zeigt sich auch bei GLEPP1-defizienten Mäusen im Laufe der Alterung. (Vorarbeiten der Arbeitsgruppe)

Im Rahmen der glomerulären Filtration sind hohe hydrostatische Drücke für die Primärharnbildung notwendig. Das veränderte Kollagen-Netzwerk scheint jedoch eine geringere mechanische Stabilität aufzuweisen. Es wird diskutiert, dass dies an der geringeren Anzahl an Cysteinresten der α1α1α2-Trimere liegen könnte. Diese besitzen deshalb weniger Disulfidbrücken und können daher weniger verzweigte Quervernetzungen (*cross-links*) ausbilden, als dies bei den α3α4α5-Trimeren der Fall ist. Diese Quervernetzungen kann man sowohl auf Ebene der Monomere untereinander, als auch auf der Ebene der Trimere untereinander beobachten (81).

Zusätzlich scheint dieses „unreife“ Kollagen auch anfälliger für den proteolytischen Abbau durch Enzyme zu sein. Im Regelfall würde während der Glomerulogenese im Rahmen des Isotypen-*switch* das Kollagen IV α3α4α5 den physiologischen proteolytischen Einflüssen widerstehen, während Kollagen IV α1α1α2 mit der Zeit durch Proteolyse „herausgelöst“ wird (31, 81).

Als weitere pathologische Zeichen, welche auch beim GLEPP1-KO zu sehen sind, zeigt sich eine podozytäre Invasion der GBM, welche wahrscheinlich durch stärkere Verankerung einen Podozytenverlust verhindern soll. Zusätzlich ist das Kollagen IV α1α1α2 beim Alport-Syndrom in der Nähe der Podozyten lokalisiert und es wird diskutiert, dass dieses die Zell-EZM-Interaktion bzw. die GBM-Formierung stören könnte (55).

Eine kausale Therapie des Alport-Syndroms existiert bisher nicht, die verwendeten Medikamente verlangsamen lediglich die Symptomatik. Hierzu gehören vor allem RAAS-Inhibitoren (82, 83). Die einzige effektive Therapie stellt bisher die Nierentransplantation dar (84). Hierbei darf allerdings nicht vergessen werden, dass extrarenale Symptome an Augen und Innenohr dadurch verständlicherweise nicht therapiert werden können.

<u>Pierson-Syndrom:</u>

Das selten auftretende Pierson-Syndrom ist charakterisiert durch ein kongenitales nephrotisches Syndrom mit Nierenversagen innerhalb des ersten Lebens-

jahrs und gelegentlich auch durch eine beidseitige Mikrokorie oder auch neurologische Symptome mit möglicher Entwicklungsverzögerung (85).
Die Ursache dieser Erkrankung ist eine Mutation im LAMB2-Gen, welches für die Laminin-β2-Kette des adulten LM-521 kodiert. Der Vererbungsmodus verläuft autosomal-rezessiv (86).
Untersuchungen mit dem Tracer-Protein Ferritin haben gezeigt, dass Mutationen im Laminin beta2 mit dessen Mangel zu einer „porösen“ GBM-Struktur und dadurch zu einer verstärkten Penetration von größeren Molekülen durch diese führen. Ursächlich hierfür könnten unphysiologische anionische Ketten in der GBM sein, welche eine weniger stabile Struktur bedingen (87).
Da Laminin jedoch auch als Ligand für zelluläre Rezeptoren, wie Integrine fungiert, könnte eine Mutation des Laminins neben einer reinen Störung der Architektur der GBM auch eine gestörte Zell-ECM-Interaktion hervorrufen. Als Konsequenz würden auch die Zellen des glomerulären Filters (v.a. Podozyten) und deren Homöostase negativ beeinflusst werden (88, 89). Dieser Sachverhalt könnte auch erklären, wieso im Gegensatz zum Alport-Syndrom beim Pierson–Syndrom die klinischen Symptome an der Niere bereits früh nach der Geburt auftreten.
Ähnlich wie beim Alport-Syndrom kann als therapeutische Maßnahme neben RAAS-Inhibitoren eine Nierentransplantation durchgeführt werden. Guler et. al. haben 2017 über einen 2-jährigen Patienten berichtet, welcher durch diese Therapie eine dramatische Verbesserung seiner Symptomatik zeigte (neben einer verbesserten Nierenfunktion auch einen Entwicklungsschub mit Anschluss an gleichaltrige gesunde Kinder) (90). Ob die Verbesserung der neurologischen Situation lediglich mit der Verbesserung des Allgemeinzustandes nach wiederhergestellter Nierenfunktion zu erklären ist, oder noch andere Mechanismen hierbei eine Rolle spielten, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Integrität der glomerulären Basalmembran scheint also für Gesundheit und Erkrankung eine hohe Relevanz zu haben. Der GBM Aufbau ist extrem komplex und unterliegt im Laufe der Glomerulogenese bedeutenden Veränderungen. Kommt es an irgendeiner Stelle im Rahmen der Assemblierung der GBM zu Störungen (hereditär oder sekundär erworben), führt dies neben morpholo-

gischen Auffälligkeiten wie oben beschrieben häufig auch zu relevanten klinischen Symptomen.
Relevant ist dies vor allem, weil im Rahmen von Erkrankungen mit Beteiligung der GBM aktuell keine kurative Therapie besteht (91). Es existieren bisher nur Therapien, welche die Progression der GBM-Schädigung und die Entwicklung eines Nierenversagens inklusive Dialysepflichtigkeit hinauszögern. Ein Beispiel hierfür stellen RAAS-Inhibitoren beim Alport-Syndrom (82, 83) oder Plasmapheresen und Immunsuppressiva im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, wie dem *Goodpasture*-Syndrom (Anti-GBM-Krankheit) dar (92).

Neuere therapeutische Ansätze werden aktuell in Studien untersucht und könnten die heute verfügbaren symptomatischen Therapieformen in Zukunft ergänzen oder sogar ersetzen.
So zeigten in Versuchen von Gomez et. al. subkutane Injektionen von Anti-microRNA-Oligonukleotiden einen positiven Einfluss auf die Fibrose im Rahmen von Mutationen des Kollagens IV (93).
Auch Therapien im Rahmen des *gene-editing* zeigen vielversprechende Ergebnisse. Mithilfe der *CRISPR-Cas9*-Methode konnten Ende 2019 Daga et. al. verschiedene Genmutationen, die bei Patienten zum Alport-Syndrom führten, korrigieren. Hierfür wurden im Urin ausgeschiedene Podozyten isoliert und *in vitro* konnten mit der „Genschere“ die mutierten Genabschnitte in 44-58% entfernt und die DNA modifiziert werden. In naher Zukunft könnten damit auch *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt werden (94).
Eine weitere potenzielle Ansatzstelle bieten Hybrid-Proteine, welche als „*linker*“-Proteine in der GBM fungieren könnten. So konnten McKee et. al. bei murinen Zellen mit Mutationen im Laminin durch Hinzugabe von Hybrid-Proteinen (aus Nidogen und der fehlenden Laminin-Domäne) eine Polymerisation des Laminins erzeugen. Ohne diese Proteine war keine Polymerisation des Laminins möglich, wie sie sonst bei einer intakten GBM notwendig und physiologisch wäre (95).
Solche „Protein-Ersatztherapien“ bei GBM-Erkrankungen stellen sehr vielversprechende Ansätze dar, da die GBM theoretisch über den Blutstrom und das fenestrierte Endothel im Glomerulus für Proteine relativ direkt erreichbar wäre.

Allerdings darf man auch nicht vergessen, dass *in vivo* beispielsweise das Laminin (und Kollagen IV) als assembliertes Trimer sezerniert wird, und (außer der alpha-Kette) nicht in Einzelketten sezerniert werden kann, welche sich in der GBM formieren (96). Daher wäre ein einfache Substitution der mutierten Ketten beim Pierson-Syndrom nicht so einfach, und müsste auch bei Konjugation i.S. von *linker*-Proteinen zunächst in die sezernierenden Zellen erfolgen. Um dieses Problem zu umgehen, haben Miner et. al 2018 bei Lamb2-mutierten Mäusen direkt das komplette LM-521-Trimer intravenös injiziert (80, 97). Trotz Verlangsamung der Entstehung einer Proteinurie konnte die Therapie den Progress zum nephrotischen klinischen Bild nicht verhindern. Mittels hochauflösender Bildgebung zeigte sich, dass das injizierte Laminin zwar in die GBM integriert wurde, allerdings nur auf der endothelialen Seite. Aufgrund seiner Größe konnte das LM-521 die mittlere Kollagen-IV-haltige Lamina densa der GBM nicht penetrieren und bis zur podozytären Seite eingebaut werden (80). Diese Ergebnisse zeigen auch die bereits beschriebene Barrierefunktion der GBM für Makromoleküle.

1.7 Ziele der Arbeit

Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass GLEPP1-defiziente Glomeruli von alternden Mäusen *in vivo* eine unreife Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran aufweisen und zu Proteinurie führen (Doktorarbeiten L.Lennartz, C.Weigel, P.Schüppler).

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob diese veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) *in vitro* in einer primären glomerulären Zellkultur reproduziert werden kann.

Hierfür sollen die Glomeruli nicht direkt für molekulare Untersuchungen weiterverarbeitet werden, sondern in Zellkultur aufgenommen und zur Aussprossung der glomerulären Zellen angeregt werden.

Da noch nicht untersucht wurde, wie primäre glomeruläre Zellen mit GLEPP-KO in primärer Zellkultur proliferieren, sollen die Zellkulturen von WT und KO zuerst mittels qPCR-Analysen auf ihren Anteil an Podozyten, Endothelzellen und Mesangienzellen untersucht und verglichen werden.

Anschließend soll untersucht werden, wie die GLEPP1 WT und KO Zellen sich in der Zusammensetzung der ECM unterscheiden. Auch der beobachtete Altersunterschied der GLEPP1 WT und KO Tiere in den *in vivo* Untersuchungen soll *in vitro* nachvollzogen werden.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, zu untersuchen, ob auch in Zellkultur bei alternden Tieren die ECM der KO-Zellen ein unreifes Muster zeigt. Als Vergleichsgruppe dienen die Jungtiere, bei denen noch kein Unterschied zwischen WT und KO erwartet wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Elektrophorese-Kammer	Biometra (D)
FluorChem FC2 Imaging System	Alpha Innotech (D)
Multimage™ Light Cabinet	Alpha Innotech (D)
Mikrowelle NN-E202CB	Panasonic (J)
Pharmacia™ Electrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech (SWE)
Wärmeschrank Modell 200 D06058	Memmert, Schwabach (D)
Mini Protean Tetra Cell	Bio Rad, München (D)
Reagenzglasschüttler REAX control	Heidolph, Schwabach (D)
Mini-Zentrifuge	Sprout
Zentrifuge Modell 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge Modell 5427R	Eppendorf, Hamburg (D)
Pippetierhilfe Easypet/ Easypet 2/ Easypet 3	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischabzug	Wesemann, Syke (D)
Zentrifuge Rotixa/RP Modell 4200 für Zellkultur	Hettich, Tuttlingen (D)
Heraeus™ Hera Safe KS18 Sicher-heitswerkbank	Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Heraeus™ Hera Safe HS12 Sicher-heitswerkbank	Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Schüttelwasserbad mit Digitalanzeige	Selecta J.P. (ESP)
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CF	Zeiss, Oberkochen (D)

Programmable Syringe Pump 11 Pico Plus Perfusionspumpe für Operationstisch	Harvard Apparatus, Holliston (US)
Heraeus™ Brutschrank Hera cell 240 für Zellen	Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Heraeus™ Brutschrank Hera cell 150 für Zellen	Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City (US)

2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	**Hersteller**
APS (Aluminiumperoxysulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Serva, Heidelberg (D)
Collagen I Rat Tail	Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Methanol	AppliChem, Darmstadt (D)
dNTPs	Peqlab, VWR Life Science Competence Center, Erlangen (D)
Hot Star Taq-Polymerase	Quiagen (NL)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung	Carl Roth, Karlsruhe (D)

TEMED ≥98,5 %, p.a. N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin $C_6H_{16}N_2$	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Isopropanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Collagenase CLSPA	Worthington Biochemical Corporation (US)
Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate	Roche (CHE)
Ammoniumhydroxid-Lösung 5M	Fluka Analytical (US)
Agarose NEEO Ultra-Qualität Roti®garose niedrige Elektroendoosmose EEO (0,05-0,13)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primärantikörper:

Bezeichnung	Verwendete Konzentration	Hersteller, Cat.-Nr.
Rat Anti-Human Alpha 1 (IV) NC1 Monoclonal Antibody	1:200	Chondrex, Inc., 7070
Rat Anti-Human Alpha 2 (IV) NC1 Monoclonal Antibody	1:200	Chondrex, Inc., 7071
Rat Anti-Human Alpha 3 (IV) NC1 Monoclonal Antibody	1:200	Chondrex, Inc., 7076
Anti-Human Alpha 5 (IV) NC1 Monoclonal Antibody	1:200	Chondrex, Inc., 7078
Rabbit Anti-Laminin-Alpha1	1:500	Takako Sasaki (Oita University, JPN)
Agrin (D-2): sc-374117 mouse monoclonal antibody IgM	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-374117
Nidogen (C-7): sc-133175 mouse monoclonal antibody IgG_1	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-133175
WT1 (C-19): sc-192 rabbit polyclonal antibody IgG	1:800	Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-192

2.1.3.2 Sekundärantikörper:

Bezeichnung	Verwendete Konzentration	Hersteller, Cat.-Nr.
ECL Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	1:20.000	GE Healthcare UK Limited, LNA934V/AG
ECL Anti-rat IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from goat)	1:7.500	GE Healthcare UK Limited, LNA935V/AF
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulin HRP	1:10.000	Dako, P0447
Texas Red dye-conjugates AffiniPure Donkey AntiRabbit IgG (gelöst in 0,4 ml H_2O + 0,4 ml Glycerol (c = 1,5 mg/ml))	1:500	Jackson Immuno Research, 711-075-152

2.1.4 Gele, Puffer, Lösungen

Bezeichnung	Komponenten
2 Trenngele á 3,9 ml (pH 8,8) 10 %	3 ml Rotiphorese 1,5 ml Wasser 4,5 ml Puffer A <u>kurz vor dem Gießen:</u> 90 µl 10 % APS 15 µl Temed

2 Trenngele á 3,9 ml (pH 8,8) 8 %	2,4 ml Rotiphorese 2,1 ml Wasser 4,5 ml Puffer A kurz vor dem Gießen: 90 µl 10 % APS 15 µl Temed
2 Sammelgele á 3,9 ml (pH 6,9) 10 %, 8 %	0,535 ml Rotiphorese 1.135 ml Wasser 1,665 ml Puffer A kurz vor dem Gießen: 40 µl 10% APS 5 µl Temed
Ketamin-Xylazin-Narkose für Mäuse	10 % Ketamin 10 % Xylazin 80 % NaCl-Lösung
Puffer A (pH 8,8)	90 ml Tris HCl 2 M 285 ml Tris Base 2 M 10 ml SDS 20 % auf 500 ml auffüllen mit Aqua dest.
Puffer B (pH 6,9)	121 ml Tris HCl 2 M 4 ml Tris Base 2M 10 ml SDS 20 % auf 500 ml auffüllen mit Aqua dest.
Laufpuffer (10x)	24 g Tris 144 g Glyzin 10 g SDS auf 1 l auffüllen mit Aqua dest.
Laufpuffer (1x)	100 ml Laufpuffer (10x) auf 1 l auffüllen mit Aqua dest.

Transferpuffer (10x)	75 g Tris Base 360 g Glyzin auf 2 l auffüllen mit Aqua dest
Transferpuffer (1x)	100 ml Transferpuffer (10x) 200 ml Methanol auf 1 l auffüllen mit Aqua dest.
Proteinwaschpuffer (25x)	340 ml Tris 680 ml 5M NaCl 20 ml Tween 20 %
Proteinwaschpuffer (1x)	40 ml Proteinwaschpuffer (25x) auf 1 l auffüllen mit Aqua dest.
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 % 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) auf 1 l auffüllen mit Aqua dest.
1,5 % TAE-Agarose Gel	1,5 g Agarose 100 ml TAE-Puffer (1x) vor dem Gießen 4 Tropfen Ethidiumbromid hinzugeben

2.1.5 Nährmedien und Chemikalien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
3T3L1-Überstand	ATCC (D)
VLE Dubecco´s MEM mit 3,7 g/l $NaHCO_3$, stabilem Glutamin, 4,5 g/l Glukose	Biochrom, Berlin (D)
Dubecco´s MEM mit 3,7 g/l $NaHCO_3$, stabilem Glutamin, 1 g/l Glukose	Biochrom, Berlin (D)

Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin (D)
HAMS F-12 mit L-Glutamin	Biochrom, Berlin (D)
(Interferon-gamma (IFN- γ))	Roche
ITS (Insulin, Selen, Transferrin) Liquid Media Supplement (100x) von gibco	Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Collagen Type I, Rat Tail	Millipore, nachbestellt über Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Phosphate buffered saline (PBS) w/o Ca^{2+}, w/o Mg^{2+}, low endotoxin	Biochrom, Berlin (D)
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Biochrom, Berlin (D)
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Biochrom, Berlin (D)
L-Ascorbinsäure >98 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen (D)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	**Hersteller**
Aspirationspipette steril 2 ml	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Chirurgische Instrumente	Braun
Costar® Stripette-Pipetten steril (5, 10, 25 ml)	Corning Life Science. Corning (US)
Fine Bore Polyethylene Tubing Katheter 0,28 mm ID (0,61 mm OD), 0,58 mm ID (0,96 mm OD)	Smiths medical, Grasbrunn (D)
Gel Blot Paper	VWR, Darmstadt (D)
Kulturflaschen T75/T25 (Wachstums-Oberfläche in cm^2)	Nunc, Thermo Fischer Scientific, Waltham (US)
Mini Cell Buffer Dams	Bio-Rad, München (D)
Mini Trans-Blot® Bio-Ice Cooling Unit	Bio-Rad, München (D)
Mini Trans-Blot® Central Core	Bio-Rad, München (D)

Mini Trans-Blot® Foam Pads	Bio-Rad, München (D)
Mini Trans-Blot® Gel Holder Cassette	Bio-Rad, München (D)
Mini-PROTEAN® Casting Frame	Bio-Rad, München (D)
Mini-PROTEAN® Gel Releasers	Bio-Rad, München (D)
Mini-PROTEAN® Casting Stand	Bio-Rad, München (D)
Mini-PROTEAN® Casting Stand Gaskets	Bio-Rad, München (D)
Mini-PROTEAN® Combs 0,75 mm	Bio-Rad, München (D)
Mini-PROTEAN® Tetra Electrode Assembly	Bio-Rad, München (D)
Pierce™ BCA Protein Kit	Thermo Fisher Scientific, Walthman (US)
Rasierklingen	Apollo, Herkenrath Solingen (D)
RNAse Away®-Lösung zur Beseitigung von RNAsen	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht(D)
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nürnbrecht(D
Zellzählkammer nach Neubauer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm^2)	LO – Laboroptik, Lancing (UK)
96-Well PCR Plate, Semi Skirted	Star Lab, Hamburg (D)

2.1.7 Primer

2.1.7.1 Primer für GAPDH-Kontroll-PCR:

Spezifität	Gen	Richtung	Produkt	Annealing	Sequenz	Hersteller
human, mouse	GAPDH	for.	384 bp	58 °C	5'-GGT-CAT-CCA-TGA-CAA-CTT-TGG- TAT-CG-3'	Eurofins Genomics

human, mouse	GAPDH	rev.	384 bp	58 °C	5’-GTC-GCT-GTT-GAA-GTC-AGA-GGA- GAC-3’	Eurofins Genomics

2.1.7.2 Primer für Real-time-qPCR:

Spezifität	Gen	Richtung	Produkt	Annealing	Foto	Sequenz	Hersteller
mouse	NPHS1	for.	152 bp	58 °C	79 °C /82 °C	5´-TCT-TCA-AAT-GCA-CAG-CCA-CCA-3´	MWG
mouse	NPHS1	rev.	152 bp	58 °C	78 °C (GAP)	5´-AAA-GCC-AGG-TTT-CCA-CTC-CAG-TC-3´	MWG
mouse	SYNPO	for.	105 bp	58 °C	81 °C	5´-TGA-AGC-CCA-CAT-CTC-CAT-CAA-3´	MWG
mouse	SYNPO	rev.	105 bp	58 °C	81 °C	5´-CTT-CCT-CTG-AGT-ACC-CCT-CCA-3´	MWG
mouse	WT1	for.	128 bp	58 °C	81 °C	5´-GAG-AGC-CAG-CCT-ACC-ATC-C-3´	MWG
mouse	WT1	rev.	128 bp	58 °C	81 °C	5´-GGG-TCC-TCG-TGT-TTG-AAG-GAA-3´	MWG
mouse	COL1A	for.	118 bp	58 °C	78 °C	5´-CTG-GTC-CAC-AAG-GTT-TCC-AAG-3´	MWG

mouse	COL1A	rev.	118 bp	58 °C	78 °C	5´-AGC-TTC-CCC-ATC-ATC-TCC-ATT-3´	MWG
mouse	FN1	for.	149 bp	58 °C	79 °C	5´-CGA-GGT-GAC-AGA-GAC-CAC-AA-3´	MWG
mouse	FN1	rev.	149 bp	58 °C	79 °C	5´-CTG-GAG-TCA-AGC-CAG-ACA-CA-3´	MWG
mouse	ICAM1	for.	99 bp	56,5 °C	80 °C	5´-TTC-TCA-TGC-CGC-ACA-GAA-CT-3´	MWG
mouse	ICAM1	rev.	99 bp	56,5 °C	80 °C	5´-AGC-TGG-AAG-ATC-GAA-AGT-CCG-3´	MWG
mouse	Col4a1 S1	for.	238 bp	58 °C	78 °C	5´-CTG-GCA-CAA-AAG-GGA-CGA-G-3	MWG
mouse	Col4a1 S1	rev.	238 bp	58 °C	78 °C	5´-ACG-TGG-CCG-AGA-ATT-TCA-CC-3	MWG
mouse	Col4a2 S2	for.	106 bp	58 °C	79 °C	5´-TGC-TAC-CCG-GAG-AAA-GGA-G-3	MWG
mouse	Col4a2 S2	rev.	106 bp	58 °C	79 °C	5´-CTT-TGC-GGC-CCT-GTA-GTC-C-3	MWG
mouse	Col4a3 S7	for.	94 bp	58 °C	74,5 °C	5´-GGG-ACA-TGT-AAC-TAC-TAC-TCA-AAC-TCC-3	MWG

mouse	Col4a3 S7	rev.	94 bp	58 °C	74,5 °C	5´-TCA-CAG-TTG-ATG-GAA-TAG-GTT-TTC-T-3	MWG
mouse	Col4a5	for.	247 bp	63 °C	78 °C	5´-GGA-GAA-CGG-GGG-TTT-CCA-G-3	MWG
mouse	Col4a5	rev.	247 bp	63 °C	78 °C	5´-CTC-CCT-TGG-TTC-CAT-TGC-ATC-3	MWG
mouse	Lama1	for.	165 bp	58 °C	78 °C	5´-ACT-GTC-ACC-CTG-GAC-TTA-CGG-3´	MWG
mouse	Lama1	rev.	165 bp	58 °C	78 °C	5´-GCG-GGT-CAA-ACA-CTC-TGT-ATC-3´	MWG
mouse	Agrin	for.	137 bp	58 °C	78 °C	5´-AGC-CCA-CAA-GAA-TGA-GTT-GAT-G-3	MWG
mouse	Agrin	rev.	137 bp	58 °C	78 °C	5´-ACA-CAT-CAG-GAG-GCA-TAG-AAG-G-3	MWG
mouse	Nid1	for.	126 bp	58 °C	78 °C	5´-GAG-AGG-TTC-CCT-CAG-CAT-CAC-3	MWG
mouse	Nid1	rev.	126 bp	58 °C	78 °C	5´-CAC-GGA-GCA-CTG-GTG-TCT-ATT-3	MWG

2.1.8 Verwendete Programme

Bezeichnung	Verwendet für:
AlphaView	Zur Bearbeitung und densitometrischen Auswertung der Westernblots
FluorChem FC2	Für Darstellung der Westernblots und Agarose-Gelelektrophorese
Endnote X9	Für professionelle Literaturverwaltung
Microsoft Office 2011 für Mac	Für die Auswertung der Rohdaten und Niederschrift der Dissertation
7300 System SDS Software	für qPCR: Messung der cDNA-Menge
GraphPad Prism 8	Für statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Versuchstiere

Es wurden Wildtyp- (WT) und GLEPP1-Knockout (KO)-Mäuse im Alter von 4 und 10 Monaten miteinander verglichen. Die Zucht dieser Tiere erfolgte durch het/het-Verpaarungen auf den ursprünglichen 129P3/J Hintergrund. Die Versuchstiere wurden gemäß des Tierschutzgesetzes in der Zentralen Einrichtung für Tierversuche und Tierschutz Düsseldorf (ZETT Düsseldorf) gezüchtet und gehalten. Das Projekt ist mit der Projektnummer O68/08 im Landesamt für Natur-/Umwelt- und Verbraucherschutz angemeldet und durch die Behörde genehmigt. Die versuchstierkundlichen Fachkenntnisse nach *FELASA* B-Richtlinien wurden vom 26.04.17-02.02.18 (Theorie: 26.04.17 - 31.05.17, Praxis: 31.01.18 - 02.02.18) in der ZETT erworben.

2.2.2 Perfusion der Nieren und Organentnahme

Die Organentnahme (siehe Abb. 9) und Isolation der Glomeruli (siehe Abb. 10) erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Protokolls von S. Potthoff et. al. (98).

Die Tötung des Tieres erfolgte mittels zervikaler Dislokation nach Ketamin-Xylazin-Narkose.

Die ventrale und laterale Bauchwand wurde mit 70 %-Isopropanol desinfiziert. Nach Fixierung des Tieres mit Pflasterstreifen erfolgte eine mediane Inzision der Haut auf Höhe des Beckens und eine stumpfe Präparation der Haut von der darunterliegenden Muskelschicht bis zum Xiphoid. Die Bauchhaut wurde vom Becken bis zum Xiphoid aufgeschnitten und zur Entlastung und besseren Übersicht wurden auch laterale Hautschnitte durchgeführt. Dasselbe Vorgehen wurde auch bei der abdominellen Muskulatur gewählt.

Die oberen beiden Muskel-/ und Hautlappen wurden mittels Klemmen fixiert und zur verbesserten Einsicht ins Abdomen nach kranial verlagert.

Die abdominellen Organe wurden mit einer sterilen Mullkompresse so weit zur rechten Seite des Tieres verlagert, bis die linke Niere komplett sichtbar war. Eine Durchtrennung des Ligamentum Hepatophrenicum war in den meisten Fällen für eine bessere Verlagerung der Organe notwendig.

Eine Ligatur mit einem 5/0-Seidenfaden wurde um die mesenterialen und hepatischen Arterien vorbereitet. Es erfolgte eine Präparation der abdominellen Aorta (AO) und Vena Cava inferior (VCI) mit Entfernung von Faszien, Fett und weiterem retroperitonealem Gewebe.

Die retroperitonealen Gefäße wurden mithilfe des umliegenden Gewebes leicht hochgezogen und eine Ligatur der infrarenalen AO und VCI unterhalb der Bifurkation vorbereitet. Die infrarenale AO und VCI wurden mit einer Klemme nach ventral verlagert und damit hervorgehoben.

Kranial der linken Nebenniere wurde eine Ligatur der suprarenalen AO vorbereitet und direkt festgezogen. Auch die Ligatur um die mesenterialen und hepatischen Arterien wurde festgezogen.

Direkt im Anschluss wurde die infrarenale AO mit einer Rundschere links lateral inzidiert. Diese wurde luftblasenfrei mit einem Spülkatheter kanüliert und der Katheter ca. 1-2mm innerhalb des Gefäßes vorgeschoben.

Der Katheter wurde aus einer 23-G Kanüle und Polyethylenschläuchen zusammengebaut (20 cm eines 0,96 mm breiten Schlauches zur Verbindung mit der Kanüle und 10 cm eines 0,61 mm breiten Schlauches an der Spitze schräg angeschnitten zur Kanülierung der Aorta).

Der einliegende Katheter wurde mit der kaudalen Ligatur in seiner Position fixiert.

Die Perfusion mit eiskaltem, sterilem PBS wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min gestartet. Nach 5 sec. wurde die linke Nierenvene zur Druckentlastung inzidiert. Die unbehandelte Niere stellte sich aufgrund des darin enthaltenden Blutes rot dar. Nach Perfusion mit 5 ml PBS entfärbten sich die Nieren komplett. Die PBS-Lösung wurde anschließend sofort durch eine Dynabeads-Lösung (200 µl Dynabeads auf 5 ml PBS-Lösung) ausgetauscht und die entfärbten Nieren damit bei einer Flussrate von 1,5 ml/min perfundiert. Da die Dynabeads aufgrund ihres Durchmessers in den Kapillarschlingen der Glomeruli stecken bleiben, konnte man nach Perfusion mit 5 ml der Lösung schon makroskopisch eine fleckige Braunfärbung der Nieren erkennen. Durch die magnetischen Eigenschaften der Dynabeads-Partikel konnten die Glomeruli im späteren Isolationsprozess von den Tubuli getrennt werden.

Anschließend wurde die Nierenkapsel entfernt, die Nieren ohne Harnleiter aus dem Tier entnommen und in eine 10 cm-Petrischale mit Primär-Podozyten-

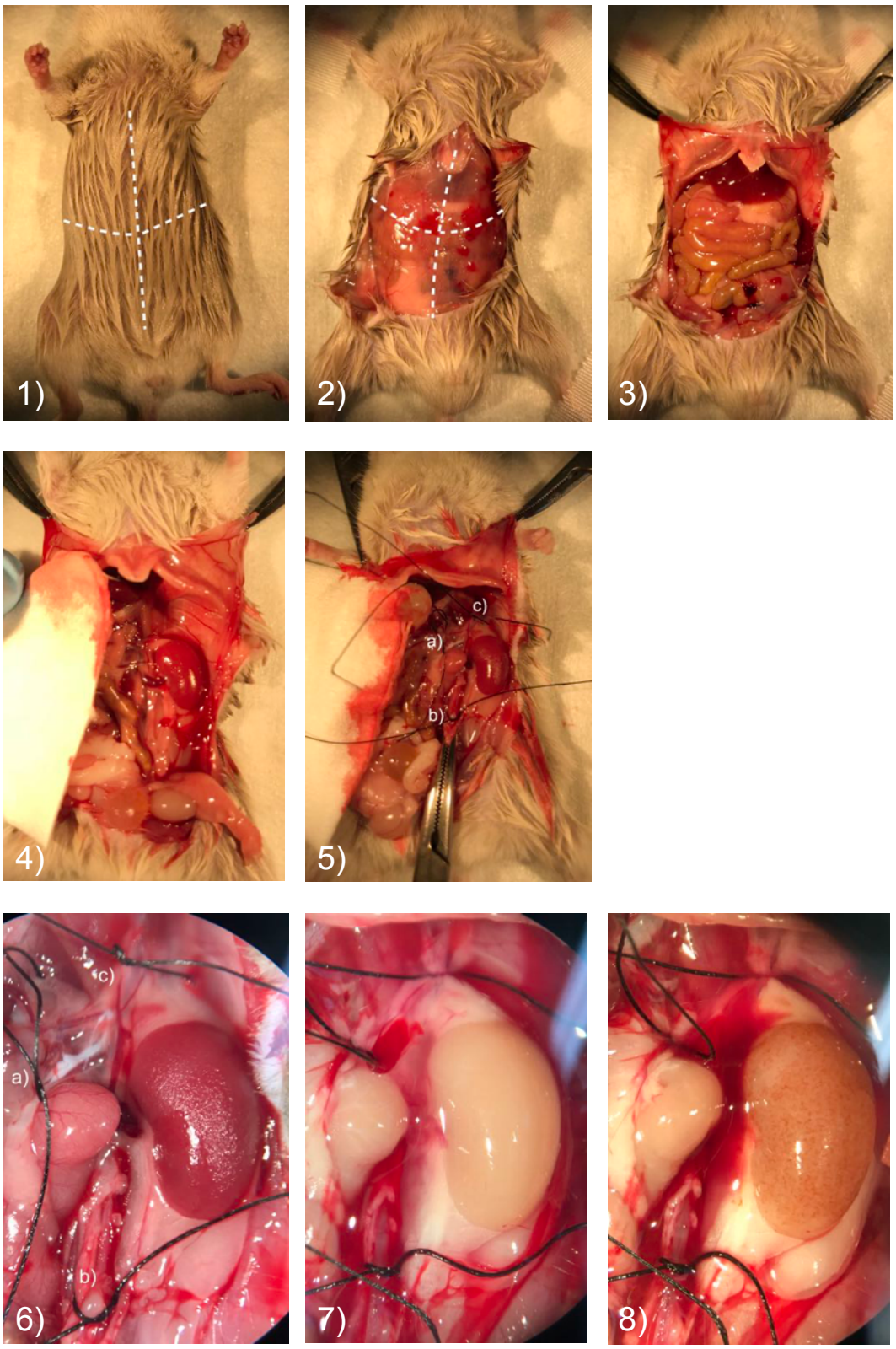


Abb. 9 Organentnahme
1) Desinfektion und Rückenlagerung des Tieres mit angedeuteten Hautschnittlinien 2) Muskelschnittlinien 3) eröffneter Situs 4) Einsicht ins Retroperitoneum, linke Niere gut sichtbar 5) Hervorhebung der Aorta mittels Klemme und Ligaturen um a) mesenteriale/hepatische Arterien, b) infrarenale AO und VCI (hier ist der Perfusionskatheter in der Aorta mit der Ligatur fixiert) und c) suprarenale AO 6) Nahaufnahme unbehandelte Niere 7) komplett entfärbte Nieren nach Perfusion mit PBS, vorher wird die V. renalis zur Druckentlastung angeritzt 8) Punktförmige Braunfärbung der Nieren nach Perfusion mit magnetischer Dynabeads-Lösung (99).

Medium (siehe Tabelle 1) auf Eis überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten unter der Sterilbank.

2.2.3 Isolierung von Glomeruli mittels Dynabeadmethode

Die Nieren wurden in eine neue 10 cm-Schale überführt und mit einem sterilen Skalpell so lange zerhackt, bis eine homogene Masse daraus entstand. 2-4 zerhackte Nieren wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, in dem 1 ml einer Collagenase A-Lösung (1,5 mg/ml in sterilem PBS, steril filtriert mit 0,22 µm Porengröße) vorgelegt wurde. Die Suspension wurde durch eine angeschnittene Pipettenspitze mit einer 1 ml-Pipette mehrfach „geschert“ und für 30 min im Wasserbad bei 37 °C angedaut. Das angedaute Gewebe wurde wieder mit der Pipette geschert und auf ein 100 µm Zellsieb gegeben. Die Glomeruli und Tubuli wurden mit insgesamt 25-50 ml Primär-Podozyten-Medium (je nachdem, wie viele Nieren verwendet wurden) durch das Sieb gewaschen und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Während des Waschvorgangs wurde verbliebenes Gewebe vorsichtig mit einem sterilen Spritzenstempel durch das Sieb gedrückt. Die Suspension wurde bei 4 °C für 5 min bei 436 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Medium resuspendiert und in ein frisches 2 ml-Röhrchen überführt. Die Suspension bestand zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich aus Tubuli.

Das Röhrchen wurde in einen Magnetcatcher gesteckt und die Glomeruli für 1 min auf die magnetische Seite verlagert. Der Überstand wurde mit einer 1000 µl Pipette entfernt, während das 2 ml-Röhrchen im Magnetcatcher verblieb (1.

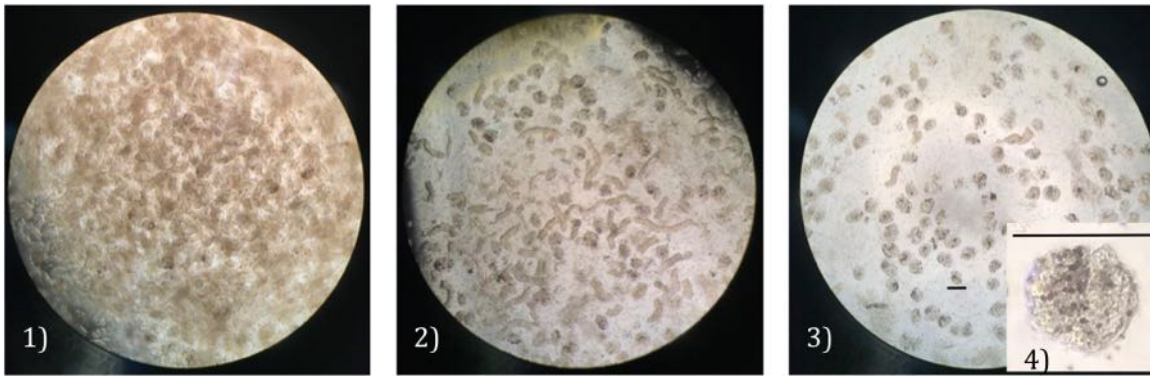


Abb. 10 Waschen der Glomeruli
Zunehmende Reinheit der Glomeruli durch wiederholte Waschschritte: 1) Vor dem Waschen überwiegt der Anteil der Tubuli. 2) Nach 4-5 Waschritten sind zunehmend Glomeruli sichtbar. 3) Nach 8-9 Waschschritten liegt die Reinheit der Gomeruli bei > 90 %. 4) Einzelner Glomerulus mit sichtbaren Dynabeads-Partikeln im Gefäßkonvolut (99). (1-3: Vergrößerung 100x, 4: aus 3 digital 8-fach vergrößert) Maßstabsbalken: 100 µm

Und 2. Waschgang: 250 µl Waschmedium sollten im Röhrchen verbleiben, um möglicherweise den Überstand auf verbleibende Tubuli zu untersuchen). Das Röhrchen wurde aus dem Magnetcatcher entfernt, circa 1 ml Medium ins Röhrchen gegeben, hoch- und runter pipettiert und die Suspension mit dem Vortexmischer vorsichtig homogenisiert. Das Röhrchen wurde wieder in den Magnetcatcher gesteckt und die Waschschritte wiederholt, bis die Reinheit der Glomeruli bei > 90 % lag. (siehe Abb. 10) Die Glomeruli wurden für 4-5 Tage auf selbst kollagenisierten T75 Flaschen (ggf. T25 Flaschen, je nach Ausbeute) kultiviert. Es wurde kein Mediumwechsel durchgeführt und die Flaschen wurden ruhig stehen gelassen.

Primär-Podozyten-Medium (648 ml)	
3T3L1-Überstand	300 ml
DMEM-Medium (1 g/l Glucose)	204 ml
Ham´s F-12 mit L-Glutamin	102 ml
Fetales Kälberserum (FCS)	30 ml
Penicillin/Streptomycin	6 ml
ITS Liquid Media Supplement (100x)	6 ml

Tabelle 1 Zusammensetzung des Zellkulturmediums für die primäre glomeruläre Zellkultur

2.2.4 Kollagenisierung von Zellkulturflaschen und Schalen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf mit Kollagen-I beschichteten T75 (oder T25) Zellkulturflaschen. Die Kollagenisierung (*Coating*) soll ein besseres Wachstum der Podozyten gewährleisten. Hierzu wurde zuerst eine Kollagenisierungslösung angesetzt. Diese wurde aus einer 0,02 N-Essigsäure (siehe Tabelle 2) hergestellt, welche mit Kollagen-I versetzt wurde; kollagenisiert wurde mit einer Kollagenkonzentration von 0,1 mg/ml.

0,02N-Essigsäure	
Aqua bidest	500ml
Essigsäure (100 %)	570µl

Tabelle 2 Verdünnte Essigsäure für Ansetzen der Kollagenisierungslösung

Die Kollagenisierungslösung wurde in die Flaschen/Schalen gegeben, so dass die Wachstumsoberfläche komplett mit der Lösung bedeckt war (bei T75/25-Flaschen 6/2,5 ml, bei 15 cm-Schalen 12,5 ml) und für eine Stunde bei 37 °C 5 % CO_2 inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Flaschen mit sterilem PBS gewaschen, um ungebundenes Kollagen zu entfernen. Die Flaschen/Schalen wurden anschließend für eine Stunde bei 37 °C 5 % CO_2 getrocknet und anschließend bei 33 °C 5 % CO_2 gelagert.

2.2.5 Etablierung einer Primärzelllinie glomerulärer Zellen in der Zellkultur

Nach ca. 4 Tagen sprossten aus den kultivierten Glomeruli Zellen aus. (siehe Abb. 11) Bei geringer Aussprossung wurde gegebenenfalls noch 1-2 Tage länger gewartet. Das Medium wurde abgesaugt und die restlichen Glomeruli mit 10 ml PBS gründlich abgewaschen und abgesaugt.

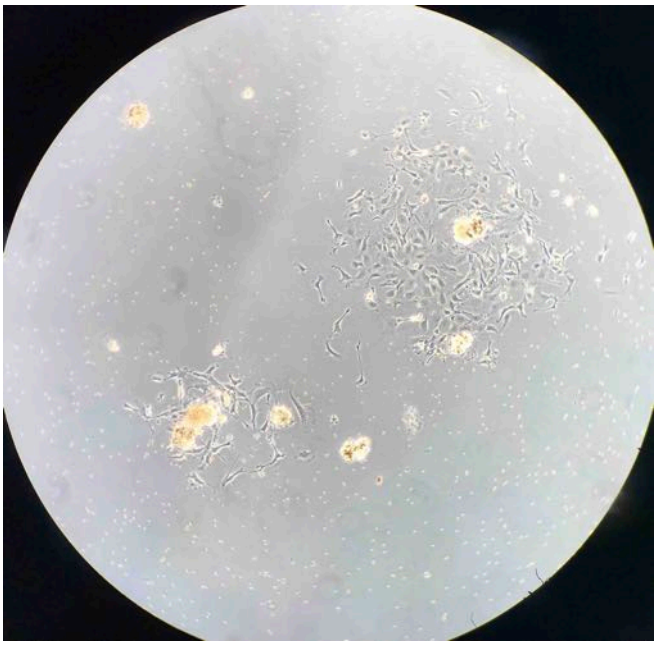


Abb. 11 Aussprossen von Zellen aus Glomeruli
Mikroskopische Darstellung der Aussprossung von Zellen aus isolierten Glomeruli nach ca. 4 Tagen. Nicht aus allen Glomeruli wachsen erfolgreich Zellen heraus (links oben) (Vergrößerung 100x)

3,5 ml frisches, bei 37°C vorgewärmtes Trypsin/EDTA wurde auf die Zellen gegeben und für 5-7 min bei 37 °C inkubiert. Weiterhin adhärente Zellen wurden durch Beklopfen der Flasche oder mit einem Zellschaber abgelöst. Es wurden 10 ml Primär-Podozyten-Medium hinzugegeben, um die Trypsinwirkung zu stoppen und die Suspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde in einen Magnetcatcher gesteckt und für 1 min dort belassen. Die Dynabeads und ggf. restliche Glomeruli hafteten nun an der Wand des Röhrchens. Die Suspension wurde vorsichtig aufgenommen, in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen umgefüllt und für 5 min bei 234 × g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt,

das Pellet homogenisiert und im Podozytenmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C 5 % CO_2 kultiviert.

2.2.6 Passagieren/Expansion der glomerulären Zellen

Alle 2-3 Tage wurden die Zellen bei einer Konfluenz von circa 70-80 % zur Expansion in neue Kulturflaschen passagiert. Bei langsamem Wachstum wurde lediglich das Medium gewechselt.

Zum Passagieren wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Flasche mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 3,5 ml warmes Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und für 5-7 Minuten bei 37 °C 5 % CO_2 inkubiert. Die Zellen kugelten sich ab und lösten sich vom Zellkulturboden. Die Ablösung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und bei schlechter Ablösung im Anschluss ein Zellschaber verwendet.

Es wurde 10 ml Kulturmedium zur Zell-Suspension gegeben, und die restlichen Zellen mit der Pipettierhilfe vom Boden gespült. Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und bei 234 × g für 5 Minuten bei Raumtemperatur herunterzentrifugiert.

Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet durch Schlagen des Röhrchens auf die Hand gelöst. Zu diesem wurde nun je nach Splitting-Verhältnis Medium hinzugegeben und die Zellen mechanisch mit der Pippetierhilfe vereinzelt. Die Zellsuspension wurde auf neue kollagenisierte Zellkulturflaschen verteilt. Für eine gleichmäßige Zellverteilung innerhalb der Flaschen wurden diese im Brutschrank leicht geschwenkt.

2.2.7 Aussaat der glomerulären Mischkultur zur Produktion von extrazellulärer Matrix (Basalmembran)

Zur Untersuchung der extrazellulären Matrix wurden die glomerulären Zellen in Passage 3 in kollagenisierte 15 cm-Schalen (für Kollagen IV) und 6-Well-Schalen (für Laminin α1) ausgesäet. Die Zellen wurden für 5 Tage kultiviert, damit die Zellen ausreichend ECM sekretieren und ablagern können. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt und mit Ascorbinsäure (50 mg/ml) versetzt, um die Kollagenfibrillen zu stabilisieren. Die Ascorbinsäure wurde in Aqua bidest. gelöst und steril filtriert (Filter Porengröße: 0,22 µm).

Da die Zellen in dieser frühen Passage noch stark proliferieren, wurde für die Aussaat eine Zellzahl gewählt, bei der die Zellen erst am 4. Tag zu 90 % konfluieren. Dies sollte verhindern, dass sich die Zusammensetzung der ECM verändert.

Für die 15 cm-Schalen wurden nach Austestung mehrerer verschiedener Aussaaten daher 250.000 Zellen (für Kollagen IV) ausgesäet und für die 6-Well-Schalen 18.000 Zellen (für Laminin α1). Nach weiteren Versuchen wurden anstatt 15 cm-Schalen jeweils 4 10cm-Schalen (je 102.500 Zellen) für die Kollagen-IV-Untersuchung verwendet, da die Zellen in diesen Schalen einfacher zu verteilen sind und bei 4 Schalen eine größere Menge an Zellen kultiviert werden kann (410.000 Zellen anstatt 250.000).

2.2.8 Isolation der extrazellulären Matrix zur Charakterisierung von Kollagen IV (NC1-Domänen)

Zur Isolation der extrazellulären Matrix aus murinen glomerulären Zellen wurde zur Untersuchung der NC1-Domänen des Kollagen IV ein Protokoll von Rachel Lennon et al. 2014 modifiziert (100).

Am 4./5. Tag nach der Aussaat wurden die 10 cm-Schalen zweimal in eiskaltem PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen.

Anschließend wurde die erste Schale in 3,5 ml *Alkaline Detergent Buffer* (siehe Tabelle 3) gekratzt, um die Zellen zu lysieren und die extrazelluläre Matrix freizulegen. Die Suspension wurde in die nächste Schale pipettiert und wieder gekratzt, um mit jeder Schale die Konzentration der extrazellulären Matrix in der Probe zu erhöhen. Die Suspension wurde in ein 5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 30 min bei 4 °C inkubiert, um die restlichen Zellen zu lysieren. Aus früheren Untersuchungen mit Fluoreszenzfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass die ECM durch den *Alkaline Detergent Buffer* nicht beeinflusst wird.

Um die ECM vom Zellinhalt zu trennen, wurde die Probe bei 3750 × g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis ca. 0,5 ml abgesaugt. Das Pellet wurde in dieser Restflüssigkeit resuspendiert und in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 5 min bei 4 °C wurde die Probe bei 20817 × g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet mit der extrazellulären Matrix (und Zellmembranresten) wur-

de nun in 80 µl Collagenase-Lösung (siehe Tabelle 4) aufgenommen und für 2 h bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. In diesem Verdauschritt spaltet die Collagenase die gesuchten NC1-Domänen vom Kollagen IV ab.

Im Anschuss an den Verdau wurde mit 20817 × g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellmembranreste und die Collagenase zu pelletieren. 75 µl des Überstandes, der nun die NC1-Domänen enthielt, wurde in ein frisches 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 25 µl 4x-Laemmli ohne DTT versetzt und für 20 min bei 70 °C inkubiert. Die generierten Proben konnten entweder direkt mittels SDS-Gel-Elektrophorese weiterverarbeitet, oder bei -28° C zwischengelagert werden.

Alkaline Detergent Buffer (extraction buffer)	
10 %-Triton-X-100	2,5 ml
Ammoniumhydroxid-Lösung	2 ml
PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	Auf 50 ml auffüllen

Tabelle 3 Puffer zur Lyse der glomerulären Zellen

Collagenase-Ansatz	
Collagenase Worthington CLSPA *(> 500 units / mg dry weight)*	16 µl
CaCl 0,5 M (in Aqua dest)	0,8 µl
PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	63,2 µl

Tabelle 4 Collagenase-Lösung zur Abspaltung der NC1-Domänen von den Kollagen-IV-Fibrillen

2.2.9 Isolation der extrazellulären Matrix zur Charakterisierung der Laminin-alpha1-Untereinheiten

Auch für die Untersuchung der Laminin-α1-Untereinheiten wurde ein modifiziertes Protokoll von Rachel Lennon et al. JASN 2014 verwendet (100).

Wie auch bei 2.1.10 wurde die ECM am 4. Tag nach Aussaat der Zellen isoliert. Die 6-Well-Platten wurden mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend die ECM durch Lyse mit 1 ml *Alkaline Detergent Buffer* (siehe Tabelle 3) für 30 min auf Eis freigelegt. Der Überstand mit den Zellresten wurde abge-

saugt und die Platte mit Desoxyribonukleasepuffer (DNAse-Puffer) (siehe Tabelle 5) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und die freigelegte ECM wurde in 50 µl 2xLaemmli + DTT gekratzt. Dieses musste bei 70°C vorgeheizt werden. Anschließend wurde die Probe in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Proteine für 20 min bei 70 °C denaturiert.

Die generierten Proben konnten ebenfalls entweder direkt mittels SDS-Gel-Elektrophorese weiterverarbeitet, oder bei -28 °C zwischengelagert werden.

DNAse-Puffer	
DNAse I	10 µl
CaCl 1 M (in Aqua dest)	10 µl
MgCl 0,5 M 1 (in Aqua dest)	10 µl
PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	Auf 10 ml auffüllen

Tabelle 5 Desoxyribonukleasepuffer zur Entfernung von DNA

2.2.10 Westernblot-Analyse

Einen Tag vor der Elektrophorese wurden die nötigen Gele hergestellt, damit diese ausreichend auspolymerisieren. Dazu wurden die gereinigten Glasplatten in die entsprechende Haltevorrichtung eingespannt, und die Gele (0,75 mm Dicke) nach Protokoll gegossen (siehe 2.1.4). Zuerst wurde das Trenngel angesetzt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Sofort danach wurde dieses mit Isopropanol (100 %) überschichtet, um mögliche Luftblasen im Gel zu entfernen. Dieses wurde kurz vor dem Gießen des Sammelgels abgegossen und getrocknet.

Nun konnte das nach dem Trenngel angesetzte Sammelgel zwischen die Platten pipettiert werden. Ein Kamm zur Herstellung der Ladetaschen wurde in das Sammelgel geschoben, bis die Zähnchen komplett darin verschwanden. Die Flüssigkeit wurde verdrängt und sollte bis zur Kante des niedrigeren Glases reichen. Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, konnten diese innerhalb der Glasplatten wieder aus den Haltevorrichtungen herausgenommen werden und für die Elektrophorese mit Proben beladen werden.

Die Glasplatten mit dem Gel wurden in die Elektrophoresekammer gesetzt, und der Raum zwischen den Gelen bis zum Rand mit Laufpuffer aufgefüllt. Dieser Schritt erfolgte zunächst zur Prüfung der Dichtigkeit; anschließend wurde die Kammer luftblasenfrei bis zur Markierung mit Laufpuffer aufgefüllt.
Die Ladetaschen wurden mit den Proben beladen (7 µl Proteinstandard und 20 µl Proben) und die Elektrophorese gestartet.
Die Elektrophorese wird in zwei Phasen eigeteilt; in der Sammelphase wurden die Proteinproben in den Sammeltaschen für 30 min bei einer Spannung von 70 V ankonzentriert. In der anschließenden Trennphase wurden die Proteine für ca. 1 h 30 min (Laminin α1) bzw. für 1 h 15 min (Kollagen IV) bei einer Stromstärke von 20 mA/Trenngel nach Größe aufgetrennt.
Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel entsorgt, und das Trenngel in eine Schale mit Transferpuffer überführt.
Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei in die Haltekassette eingelegt. Alle Komponenten sollten dabei mit Transferpuffer benetzt sein und in folgender Reihenfolge zusammengesetzt und anschließend verschlossen werden:
Kassette (schwarz, als Orientierung für die Kathode) → Schwamm → Filterpapier → Gel mit darin enthaltenem Protein → Nitrozellulosemembran → Filterpapier → Schwamm → Kassette (weiß, als Orientierung für die Anode). Die Proteine wurden entsprechend ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung Kathode vom Gel auf die Membran übertragen.
Nach dem *Blotten* bei 200 mA wurde die Nitrozellulosemembranen in eine Glasschale mit einer 5 %-BSA-Lösung gegeben. Diese wurde für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert (oder bei 4 °C über Nacht). Der Zweck dieser „Blockierung“ lag darin, unspezifische Bindungen von Antikörpern an der Membran einzuschränken.
Die Membranen wurden danach für einige Sekunden in Proteinwaschpuffer überführt und anschließend in eine Schale mit verdünnter Primär-Antikörper-Lösung gegeben. Diese wurden bei 4 °C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.
Für die Kollagen-IV-Untersuchung wurden *Rat Anti-Human (IV)* NC1-Antikörper (α1,2,3,5) verwendet. Als *loading-control* wurde Agrin verwendet. Die Membranen wurden zerschnitten, um die *loading-control* bei der Bildentwicklung parallel

untersuchen zu können. Für Laminin wurde *Rabbit Anti-Laminin-Alpha1*-Antikörper verwendet. Dieser wurde freundlicherweise von Takako Sasaki aus der Oita University, Japan zur Verfügung gestellt. Hier wurde Nidogen als *loading-control* verwendet.

Es folgten 3 Waschschritte von jeweils 5 min in Proteinwaschpuffer auf dem Schüttler (V=60).

Danach wurden die Membranen in eine Glasschale mit der verdünnten Sekundär-AK-Lösung gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (V=50). Anschließend folgten wieder 3 Waschschritte.

Die Entwicklung erfolgte mit dem *Lumi-Light Western Blotting Substrate*. Die angesetzte Lösung wurde auf eine Schale gegeben und die Membran mit der Proteinseite zur Lösung platziert. Diese wurde lichtgeschützt auf dem Schüttler für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran luftblasenfrei auf einer Schale platziert und die Entwicklungslösung gleichmäßig auf der Membran verteilt.

Die Aufnahmen wurden mit dem *FluorChem FC2 Imaging System Multimage Light Cabinet* durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug durch die geringen Proteinmengen bis zu 7 min.

2.2.11 Isolation von RNA aus Podozyten

Für die RNA-Isolation wurden in der 3. Passage jeweils 25.000 Podozyten in kollagenisierte 6-Well-Schalen ausgesäet und am 2.-3. Tag unter RNAse-freien Bedingungen unter der Sterilbank in RLT-Plus-Puffer (aus RNeasy-Mini Kit von Qiagen) mit einem Zellschaber geerntet und bei -28 °C eingefroren. Der RLT-Plus-Puffer lysiert die Zellen, sodass die RNA freiliegt und für die folgende RNA-Isolation zugänglich ist. Um möglichst RNAse-freie Bedingungen zu schaffen, wurden alle Oberflächen mit „RNAse-Away“ behandelt und RNAse-freie, steril verpackte Verbrauchsmaterialien verwendet. Es wurden Filter-Spitzen für die Pipetten verwendet.

Zur RNA-Isolation der Proben wurde folgendes Protokoll von Quiagen verwendet:

RNA-Isolation aus Zellen mit RNeasy-Mini Kit von Qiagen
1. 2 min zentrifugieren bei max. Geschwindigkeit RT
2. Überstand auf gDNA-Säule pipettieren
3. 15 sec zentrifugieren bei 8.000 × g, RT, gDNA-Säule verwerfen
4. Eluat + 350 µl 70 %-Ethanol mit der Pipette mischen (Ethanol und RLT-Puffer im gleichen Verhältnis!)
5. Mischung auf RNA-Säule geben (bei mehr Volumen in 2 Steps beladen)
6. 15 sec zentrifugieren bei 8.000 × g, RT, Flüssigkeit verwerfen
7. 700 µl RW1-Puffer hinzugeben
8. 15 sec zentrifugieren bei 8.000 × g, RT, Flüssigkeit verwerfen
9. 500 µl RPE-Puffer hinzugeben
10. 15 sec zentrifugieren bei 8.000 × g, RT, Flüssigkeit verwerfen
11. 500 µl RPE-Puffer hinzugeben
12. 15sec zentrifugieren bei 8.000 × g, RT, Flüssigkeit verwerfen, RNA-Säule in frisches Auffanggefäß
13. 1 min zentrifugieren bei max. Geschwindigkeit RT, Flüssigkeit verwerfen, RNA-Säule in steriles 1,5 ml Eppi
14. Eluat mit 40 µl RNAse-freiem Wasser versetzen
15. 1 min zentrifugieren bei 8.000 × g, RT
16. RNA-Säule verwerfen und Eppis mit RNA-Lösung gut beschriften
→ 0,5 µl in 0,5 ml-*PCR-Tube* für GAPDH-Kontroll-PCR überführen, einfrieren
Proben können bei -28 °C eingefroren werden

Tabelle 6 Protokoll zur RNA-Isolierung von Zellen RNeasy-Mini Kit von Qiagen

2.2.12 Umschreibung der RNA in cDNA

Für die geplante qPCR wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Für die Reverse Transkription wurde *das Quanti Tect Reverse Transcription Kit* von Quiagen verwendet. Die Umschreibung in cDNA ist nötig, da RNA durch die überall vorkommenden RNAsen sehr instabil ist und komplett RNAse-freie Bedingungen kaum einzuhalten sind.

Bevor die RNA umgeschrieben wurde, musste sie von potentieller Verunreinigung mit gDNA (genomischer DNA) befreit werden. Dafür wurde die RNA mit

einem gDNA-Wipeout buffer behandelt. Der gDNA-Verdau-Mix (Tabelle 7) wurde für 3 min bei 42 °C in einem Thermoblock inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelegt.

gDNA-Verdau-Mix	
RNA (maximal 750 ng)	12 µl
gDNA-Wipeout Puffer	2 µl
H_2O (RNAse-frei) nur, falls <12 µl RNA	X µl
Summe	14 µl

Tabelle 7 Ansatz für den Verdau von gDNA in der isolierten RNA

Von diesen 14 µl wurden 0,5 µl für die GAPDH-Kontroll-PCR als Negativkontrolle entnommen, und in 0,5 ml-*PCR-Tubes* überführt. Anhand dieser Proben wurde der Erfolg des g-DNA-Verdaus beurteilt.
Zu den übrigen 13,5 µl wurde für die Reverse Transkription ein RT-Mix (siehe Tabelle 8) hinzugegeben.

RT-Mix	
H_2O (RNAse-frei), da 0,5 µl für GAPDH-Kontroll-PCR entnommen wurden	0,5 µl
Quantiscript RT-Puffer	4 µl
RT-Primer Mix	1 µl
Quantiscript Reverse Transkriptase	1 µl
Summe	6,5 µl

Tabelle 8 Ansatz für Reverse Traskription der RNA in cDNA

Die RNA-Proben mit dem RT-Mix wurden anschließend in einen vorgeheizten Thermocycler gesteckt und die Transkription gestartet. Die cDNA wurde für 25 min bei 42 °C synthetisiert und anschießend die Reaktion durch Inkubation bei 95 °C für 3,5 min gestoppt. Von den nun generierten cDNA-Proben wurden wieder 0,5 µl als Positivkontrolle in 0,5 ml-*PCR-Tubes* überführt. Die Proben wurden alle bei -28 °C gelagert.

2.2.13 GAPDH-Kontroll-PCR

Zum Ausschluss einer Verunreinigung der Proben (RNA, umgeschriebene cDNA) mit genomischer DNA (gDNA), wurde eine GAPDH-Kontroll-PCR durchgeführt.

Bei der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Enzym der Glykolyse, welches Phosphat auf ADP überträgt. Es handelt sich um ein sogenanntes *housekeeping*-Protein.

Für die PCR wurde der *HotStarTaq Master Mix* von Quiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Um Verunreinigungen mit gDNA nachzuweisen, wurde zuerst der folgende Ansatz für die PCR auf Kühlakkus angesetzt (Tabelle 9):

Ansatz für GAPDH-Kontroll-PCR	
H_2O HPLC	16,78 µl
10 x Puffer	2 µl
dNTP´s	0,4 µl
Primer sense GAPDH h+m	0,1 µl
Primer antisense GAPDH h+m	0,1 µl
Hot Star Taq-Polymerase Quiagen	0,12 µl
Summe	19,5 µl

Tabelle 9 Zusammensetzung des GAPDH-Kontroll-PCR-Ansatzes

Dieses Gemisch von 19,5 µl/Probe wurde jeweils den zu untersuchenden Proben (immer 0,5 µl) hinzugegeben (RNA, RNA nach gDNA-Verdau (Negativ-Kontrolle), cDNA (Positiv-Kontrolle), H_2O-Kontrolle).

Die Proben wurden im Anschluss in einem Thermocycler vervielfältigt.

Die PCR läuft in folgenden Schritten ab:

Zuerst wird die TaqMan-Polymerase für 15 min bei 95 °C aktiviert. Anschließend folgen 40 Zyklen aus Denaturierung der cDNA-Doppelstränge (95 °C 30 sec), Anlagerung/*Annealing* der Primer an die DNA-Stränge (58 °C 30 sec) und anschließend die Elongation des Stranges bei einer optimalen Temperatur für die Polymerase (72 °C 30 sec). Nach diesen Zyklen wird die Temperatur für 5

min beibehalten und anschließend auf 4 °C gesenkt, um die Amplifikation zu beenden.

2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Die in der GAPDH-Kontroll-PCR amplifizierte cDNA wurde mit einer Agarose-Gelelektrophorese weiter untersucht. Hier werden Nukleinsäurestränge (DNA oder RNA) nach ihrer Größe getrennt und mittels Standard-Proben bekannter Größe charakterisiert.

Zuerst wurde ein 1x-TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) mit 1,5 % Agarosepulver versetzt und bis zur Auflösung der Agarosekristalle aufgekocht. Anschließend wurde noch Ethidiumbromid (4 Tropfen/100 ml) zum Nachweis der DNA-Banden unter UV-Licht hinzugegeben werden. Ethidiumbromid interkaliert in der cDNA und in anderen Nukleinsäuresträngen und führt zu einer Veränderung des eigenen Anregungsspektrums. Dies führt zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht.

Die Gel-Lösung wurde in die entsprechenden Gestelle gegossen und ein Kamm in die noch heiße Agarose gesetzt, um bei Aushärten die Ladetaschen für die Proben zu bilden. Das polymerisierte Gel wurde in der mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer platziert und der Kamm vorsichtig entfernt.

Vor dem Beladen der Taschen wurden die PCR-Proben mit 2 µl des anionischen Farbstoffes Orange G versetzt, um anhand der Farbfront den Elektrophoreseprozess verfolgen zu können.

In die äußeren Taschen wurden 7 µl DNA-Längenstandards (100 bp *DNA-ladder*) pipettiert und in die restlichen jeweils 9 µl der Proben.

Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die DNA-Moleküle im elektrischen Feld in Richtung der Kathode und trennen sich nach ihrer Größe auf.

Die kleineren Moleküle können dabei leichter durch die Struktur der Gel-Matrix wandern und kommen daher am Ende der Elektrophorese weiter von den Ladetaschen entfernt zu liegen. Die größeren Moleküle bleiben in dieser Matrix verstärkt hängen und erscheinen weiter vorne in der Nähe der Ladetaschen.

Nach Auftrennung der DNA-Moleküle für 35 min bei 85 V und 350 mA wurden die Banden mit dem Imager aufgenommen. Das Gel wurde dafür für 30 sec mit UV-Licht belichtet.

Banden mit einer Größe von 382 bp wurden als Zielbande gewertet. Diese sollten nur bei der Positivkontrolle (cDNA) erscheinen. Banden bei den RNA-Proben oder bei der Negativkontrolle (RNA-Proben nach gDNA-Verdau) wurden als Kontamination angesehen.

2.2.15 Real-Time-PCR (qPCR)

Die Real-Time-PCR (auch qPCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Sie basiert auf der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion, mit dem Vorteil, dass die gewonnene DNA auch quantifiziert werden kann. Es wurde eine farbstoffbasierte Methode verwendet, bei der die Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR® Green gemessen wurde. SYBR® Green zeigt eine schwache Hintergrundfluoreszenz, die bei Bindung an doppelsträngige DNA stark zunimmt. So kann anhand der Fluoreszenz die Menge an DNA bestimmt werden.
Zur Charakterisierung der glomerulären Zellkultur wurden spezifische Marker verwendet. Für die murinen Podozyten wurden Synaptopodin und WT1 verwendet. Die Endothelzellen (und Mesangialzellen) wurden mit Fibronektin 1 (FN1) und intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) charakterisiert (und für die Fibroblasten wurde Collagen1 verwendet.)
Zum Vergleich mit den Western-Blot-Ergebnissen wurden die Proben auch auf Kollagen IV (α1,2,3,5), Laminin α1, Agrin und Nidogen untersucht.
Die qPCRs wurden mit dem *Power Sybr. Green PCR Master Mix Nr.4367659* von *Life Technologies* durchgeführt. Zu Beginn wurden die qPCR-Ansätze (siehe Tabelle 10) für die jeweilige Anzahl an Proben (ohne cDNA) hergestellt. Für die Primer von QuantiTect (in diesem Fall nur das GAPDH als Referenzkontrolle) wurde der Ansatz aus dem Kit verwendet. Für die sehr spezifisch bindenden eigenen Primer, die von MWG hergestellt wurden, wurde ein anderer Ansatz verwendet. Zu beachten beim Ansetzen der richtigen Menge der Primer-Mixe war hier, dass jede Probe zur Kontrolle als Doppelwert untersucht wurde. Aufgrund der spezifischen Bindung der Primer wurden die cDNA-Proben vorher mit RNAse-freiem Wasser im Verhältnis 1:2 verdünnt.

qPCR-Ansatz	QuantiTect Primer	Eigene Primer
H_2O (RNAse frei)	7 µl	8,8 µl
Sybr. Green 2x	10 µl	10 µl
QuantiTect Pr 10x	2 µl	jeweils 0,1 µl for./rev.
cDNA	1 µl	1 µl
Summe	20 µl	20 µl

Tabelle 10 Zusammensetzung der qPCR-Ansätze

Die 19 µl des Ansatzes wurden mit einer elektronischen Pipette in die 96-Well-Platten verteilt und anschließend die 1 µl cDNA eingespült.
Neben den Proben wurden auch NTCs (*No Template Control*/Wasserkontrolle) als Doppelwerte gemessen, um Verunreinigungen des qPCR-Ansatzes oder unspezifische Bindungen der Primer miteinander auszuschließen.
Die 96-Well-Platten wurden anschließend mit einer Verschlussfolie abgedichtet und anschließend im 7300 Real Time PCR System platziert.
Der qPCR-Zyklus wurde daraufhin mit der „7300 System SDS Software“ vorprogrammiert und anschließend die qPCR gestartet. Die Rohdaten der qPCR wurden exportiert und mit Microsoft Excel weiterbearbeitet. Die ΔCT-Werte der GAPDH-Kontrolle wurden von den ΔCT-Werten der Proben subtrahiert und die entstandenen Werte wurden anschließend mit dem Programm „GraphPad Prism“ statistisch ausgewertet und dargestellt. Zusätzlich wurde für die Auswertung der Ergebnisse die ΔΔCT-Methode verwendet, um neben den absoluten Werten auch relative Veränderungen zwischen WT und KO darstellen zu können (101). Diese Methode zur Auswertung ist für die Charakterisierung von primären Zellkulturen auf Transkriptom-Ebene bereits etabliert (102, 103). Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden aufgrund des geringen Stichprobenumfangs (n<=5) nichtparametrische Tests (Mann-Whitney-U-Test) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der glomerulären Primär-Zellkultur

Da die primären Zellen mikroskopisch trotz bekannter morphologischer Eigenschaften nicht eindeutig voneinander zu unterscheiden sind, wurden zur detaillierteren Charakterisierung der primären Zellkultur qPCR-Untersuchungen auf unterschiedliche Zellmarker durchgeführt. Hierfür wurde die isolierte RNA wie im Methodenteil beschrieben in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR mit den Primern der entsprechenden Zellmarker amplifiziert.

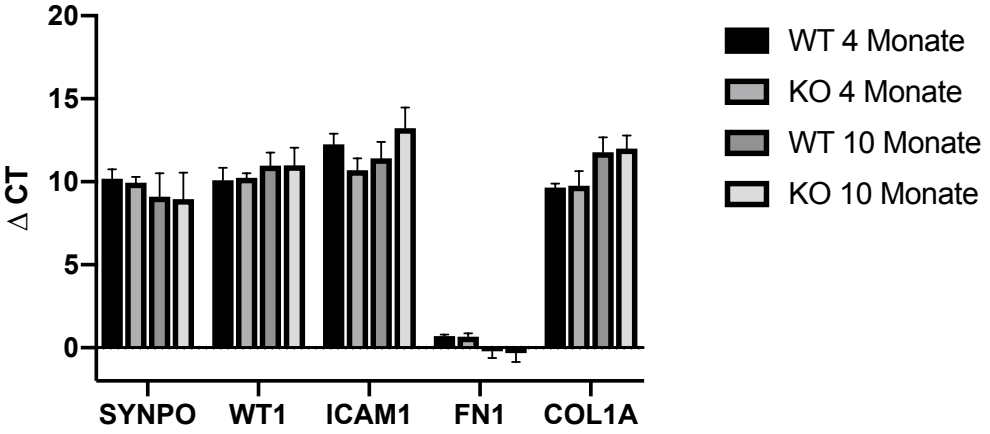


Abb. 12 ΔCT-Werte der qPCR von cDNA aus Zellkultur auf verschiedene Zellmarker
Darstellung der ΔCT-Werte für die absolute Expression von Synaptopodin (SYNPO), Wilms-Tumor-Protein1 (WT1), ICAM1. Fibronektin1 (FN1) und Kollagen 1a (Col1a). Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Da die ΔCT-Werte für PCR-Zyklen stehen, bei denen ein Signal aufgetreten ist, bedeuten hohe Werte geringe nachgewiesene RNA-Mengen und umgekehrt. Betrachtet man die einzelnen Zellmarker für sich alleine und vergleicht die Altersgruppen miteinander, bzw. auch GLEPP1 WT und KO miteinander, so zeigten sich bei keinem der Zellmarker signifikante Unterschiede. Bei Betrachtung der Zellmarker untereinander erkennt man bei FN1 deutlich geringere Werte, als bei den anderen Markern, also eine deutlich größere Menge an nachgewiesener RNA. GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, WT: Wildtyp, KO: *Knockout* (n=4 (4 Monate), n=5 (10 Monate),

Bei den mit der GAPDH-Kontrolle verrechneten ΔCT-Werten (siehe Abb. 12) zeigten sich bei nahezu allen Primern ähnliche hohe Werte. Da diese Werte indirekt anzeigen, in welchem PCR-Zyklus ein Signal für den jeweiligen Primer aufgetreten ist, bedeutet dies für die Werte von SYNPO, WT1, ICAM1 und COL1A, dass dort geringe RNA-Mengen nachgewiesen wurden. Lediglich beim FN1 zeigten sich um ein vielfaches geringere Werte, also bei früheren PCR-Zyklen bereits nachweisbare Signale und damit höhere RNA-Mengen. Dieses Ergebnis wurde sowohl bei den WT als auch den KO-Zellen in beiden Alters-

gruppen (4 und 10 Monate) nachgewiesen. Es zeigten sich zwischen den Altersgruppen, wie auch zwischen GLEPP1 WT und KO keine signifikanten Unterschiede.

Um für den Vergleich zwischen GLEPP1 WT und KO die Darstellung eines Unterschieds in der relativen Expression der RNA zu ermöglichen, wurden im Folgenden bei den qPCRs die ΔΔCT-Werte berechnet und verwendet.

3.1.1 Zell-Marker für Podozyten

Zum Nachweis der murinen Podozyten wurden die Marker WT1 und Synaptopodin (SYNPO) verwendet.

3.1.1.1 qPCR von Synaptopodin

In Abb. 13 (oben) sieht man die relative Expression des Podozytenmarkers Synaptopodin bei GLEPP1 WT und KO-Zellen. Es zeigt sich in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO. Dies konnte in beiden Altersgruppen reproduziert werden (p>0,05).

3.1.1.2 qPCR von WT1

In Abb. 13 (unten) sieht man, ähnlich wie bei Synaptopodin, dass beim WT1 ebenfalls in beiden Altersgruppen zwischen GLEPP1 WT und KO kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist (p>0,05). Jedoch zeigt sich eine minimal verringerte, statistisch nicht signifikante Expression des WT1 bei den 4 Monate alten KO-Tieren.

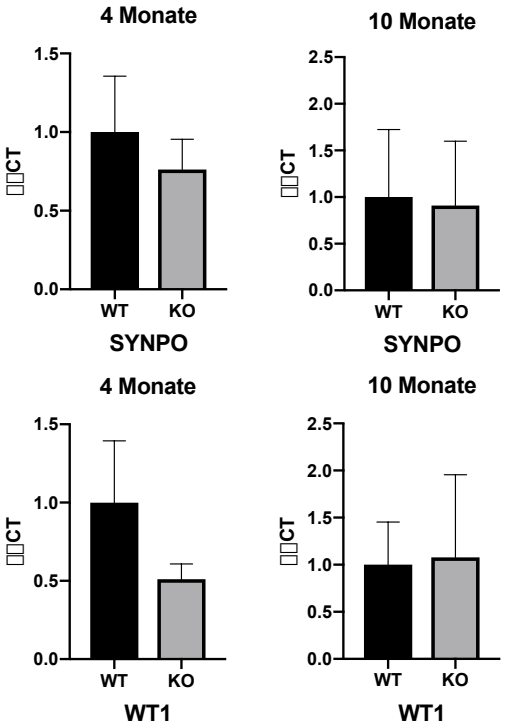


Abb. 13 ΔΔCT-Werte der qPCR von cDNA für Podozytenmarker (SYNPO, WT1) bei 4 und 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Mäusen
Darstellung der ΔΔCT-Werte für die relative Expression von Synaptopodin (SYNPO) Wilms-Tumor-Protein1 (WT1). Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Dargestellt sind sowohl 4 Monate alte Tiere als auch 10 Monate alte Mäuse. Es zeigt sich bei beiden Markern sowohl zwischen GLEPP1 WT und KO in beiden Altersgruppen kein signifikanter Unterschied. (n=4 (4 Monate), n=5 (10 Monate), p>0,05, GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, SYNPO: Synaptopodin, WT1: Wilms-Tumor-Protein 1, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

3.1.2 Zell-Marker für Endothelzellen und Mesangialzellen

Zum Nachweis der murinen Endothelzellen und Mesangialzellen wurden die Marker *Intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM1) und Fibronektin 1 (FN1) verwendet.

3.1.2.1 qPCR von Fibronektin 1 (FN1)

In Abb. 14 (oben) wird die relative RNA-Expression des Zellmarkers FN1 bei GLEPP1 WT und KO-Zellen dargestellt. Es zeigt sich zwischen Wildtyp und *knockout* kein signifikanter Unterschied. Dies gilt sowohl für die 4 Monate alte Tiere als auch für die 10 Monate alten Mäuse (p>0,05).

3.1.2.2 qPCR von *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1)

Die Ergebnisse für die relative Expression von *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1) zeigen ähnliche Ergebnisse, wie für das FN1 (siehe Abb. 14 unten). Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Wildtyp- zur *knockout*-Gruppe; und dies unabhängig von der Altersgruppe (p>0,05).

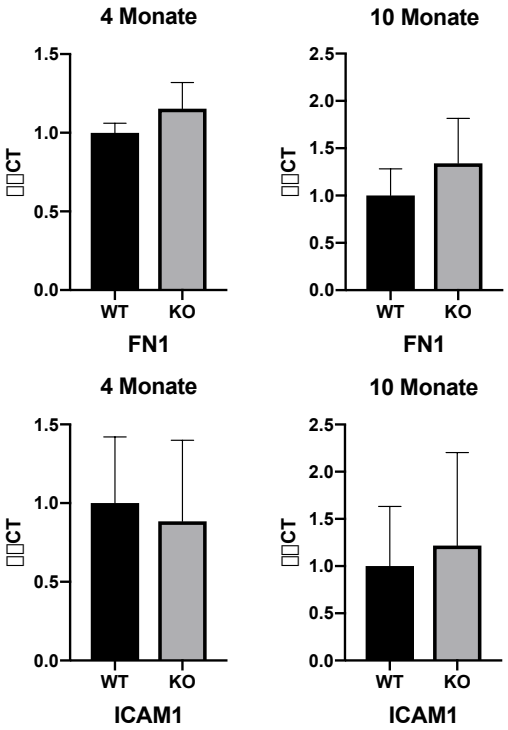


Abb. 14 ΔΔCT-Werte der qPCR von cDNA für Endothelzell- und Mesangienzellmarker (FN1, ICAM1) bei 4 und 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Mäusen

Darstellung der ΔΔCT-Werte für die relative Expression von ICAM1 und FN1 bei Wildtyp und knockout-Tieren. Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Dargestellt sind sowohl 4 Monate alte Tiere als auch 10 Monate alte Mäuse. Es zeigt sich bei beiden Markern sowohl zwischen WT und KO in beiden Altersgruppen kein signifikanter Unterschied. (n=4 (4 Monate), n=5 (10 Monate), p>0,05, GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, ICAM1: *intercellular adhesion molecule 1,* FN1: Fibronektin 1, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

3.1.3 Zell-Marker für Fibroblasten

Zur Charakterisierung der murinen Fibroblasten wurde der Marker Kollagen 1 (Col1) verwendet

3.1.3.1 qPCR von Kollagen 1

Dargestellt in Abb. 15 wird die relative RNA-Expression des Zellmarkers Kollagen 1 (Col1) bei GLEPP1 WT und KO-Zellen. Es zeigt sich in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied. Dies gilt sowohl für die 4 Monate alten Tiere als auch für die 10 Monate alten Mäuse ($p<0,05$). Bei den 4 Monate alten Tieren zeigte sich beim GLEPP1-KO jedoch eine leichte Hochregulation des Kollagen 1 auf RNA-Ebene.

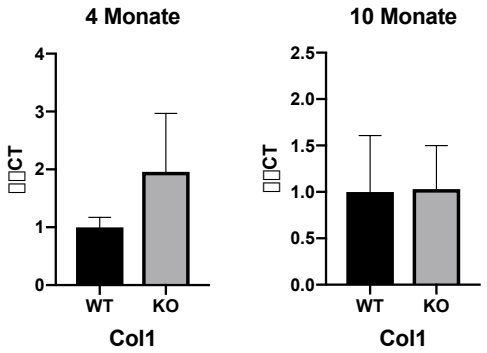


Abb. 15 ΔΔCT-Werte der qPCR von cDNA für den Fibroblastenmarker Kollagen 1 (Col1) bei 4 und 10 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen
Darstellung der ΔΔCT-Werte für die relative Expression des Fibroblastenmarkers Collagen1 bei Wildtyp und knockout-Tieren. Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Dargestellt sind sowohl 4 Monate alte Tiere als auch 10 Monate alte Mäuse. Es zeigt sich bei beiden Markern sowohl zwischen WT und KO, als auch zwischen den verschiedenen Altersgruppen kein signifikanter Unterschied. (n=4 (4 Monate), n=5 (10 Monate), $p<0,05$, GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, Col1: Kollagen 1, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

3.2 Basalmembranproduktion in primärer glomerulärer Zellkultur bei 4 Monate alten Tieren

Nach Charakterisierung der glomerulären Zellkultur mittels qPCR-Untersuchung von Zellmarkern wurde die Basalmembranproduktion und -Sekretion dieser Mischkultur untersucht. Das Ziel hierbei war eine Bestimmung der unterschiedlichen Expressionsmuster von Wildtyp- und GLEPP1-defizienten Mäusen auf RNA- und Proteinebene. Auch hier wurden zwei Altersgruppen (4 vs. 10 Monate) untersucht. Für die RNA-Untersuchungen wurde erneut die qPCR aus umgeschriebener RNA in cDNA verwendet. Für die Untersuchung der Proteinproduktion wurden Kollagen IV (NC1) und Laminin α1 mittels Westernblot untersucht.

3.2.1 qPCR-Ergebnisse von Kollagen IV (4 Monate)

In Abb. 16 ist die relative Expression von Kollagen-IV-Ketten (NC1) auf RNA-Ebene bei 4 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Tieren dargestellt. Hierfür wurde die RNA aus den ausgesäeten primären glomerulären Zellen isoliert, in die stabilere cDNA umgeschrieben und mittels qPCR weiterverarbeitet. Für die Darstellung der relativen anstatt der absoluten Unterschiede wurde die ΔΔCT-Methode verwendet.

Es zeigt sich bei den unreifen Kollagen IV α1- und α2-Ketten kein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO. Die α1-und α2-Ketten sind bei den KO-Zellen nur minimal verringert.

Bei den α3- und α5-Ketten, welche das reife Kollagen IV bilden zeigte sich bei den 4 Monate aten Tieren ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Auch hier ist die Expression beim KO tendenziell geringer ausgeprägt.

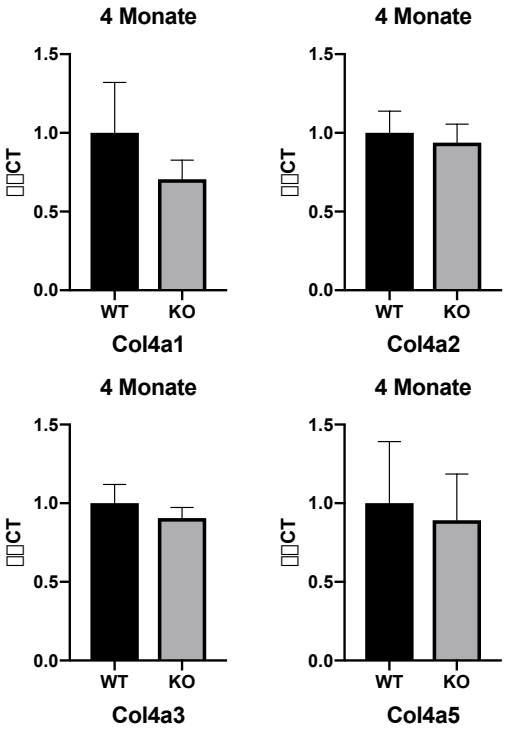


Abb. 16 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Col4 α1,2,3,5 bei 4 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen
Darstellung der ΔΔCT-Werte für die relative Expression von Kollagen IV-Ketten bei 4 Monate alten GLEPP1 Wildtyp und knockout-Tieren. Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Bei den unreifen Kollagen IV-Ketten α1 und α2 (oben) zeigte sich in beiden Altersgruppen kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen WT und KO. Ebenfalls konnten bei den reifen Ketten a3 und a5 (unten) keine Unterschiede zwischen WT und KO nachgewiesen werden. (n=4, p>0,05, GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, Col4: Kollagen IV, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

3.2.2 qPCR-Ergebnisse von Laminin α1, Nidogen und Agrin (4 Monate)

In Abb. 17 wurden die relativen RNA-Expressionen der 4 Monate alten Gruppe für die restlichen struktur- und funktionsgebenden Komponenten der GBM dargestellt: Laminin, Nidogen und Agrin.

Hierbei zeigte sich beim Laminin α1 durch den GLEPP1-KO kein signifikanter Unterschied zu den WT-Tieren.

Beim Agrin und Nidogen, welche beide in den folgenden Proteinuntersuchungen als Ladekontrolle verwendet wurden zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zwischen WT und KO.

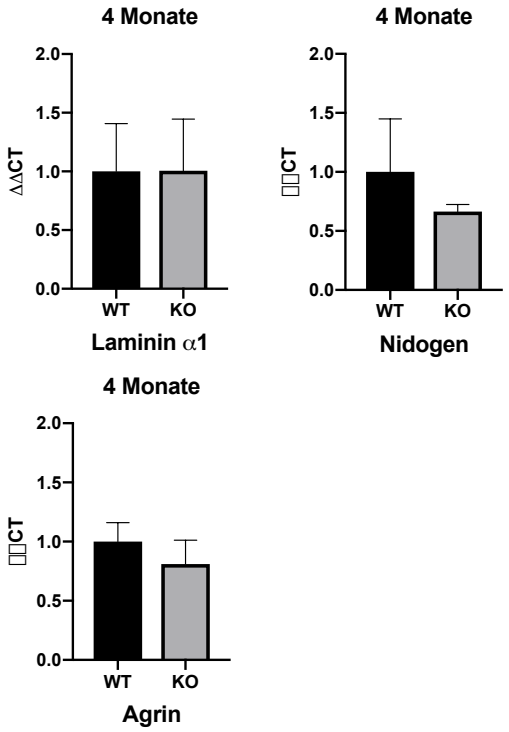


Abb. 17 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Laminin α1 ,Nidogen und Agrin bei 4 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen

Darstellung der ΔΔCT-Werte für die relative Expression von Laminin α1, Agrin und Nidogen bei 4 Monate alten GLEPP1 Wildtyp und knockout-Tieren. Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Bei keiner der dargestellten extrazellulären Matrixproteine zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen WT und KO. (n=4, p>0,05, GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

3.2.3 Westernblot von Kollagen IV und Laminin alpha 1 (4 Monate)

In diesem Experiment wurde die Expression der Kollagen-IV-Untereinheiten und von Laminin α1 bei 4 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Mäusen untersucht. Hierfür wurde die ECM aus den kultivierten glomerulären Zellen wie oben beschrieben isoliert und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Menge an Protein wurde mithilfe von densitometrischer Dichtemessung der Banden gemessen und bei der Darstellung die KO-Werte auf die WT-Werte bezogen; diese wurden jeweils auf 1 normiert.

Für die densitometrische Auswertung der Kollagen IV-Untereinheiten wurden ausschließlich die Dimere (ca. 46 kDa) verwendet, da lediglich bei der α2-Untereinheit auch Monomere (ca. 25 kDa) nachgewiesen werden konnten. Diese Werte wurden jeweils mit denen von dem auch nachgewiesenen ECM-Protein Agrin als *loading control* in einen Quotienten gesetzt. Beim Laminin α1 (ca. 300 kDa) wurde hierfür Nidogen verwendet. Beide Proteine bleiben in ihrer Expression vom GLEPP1-KO unbeeinflusst.

Bei der densitometrischen Auswertung zeigten sich sowohl beim Kollagen IV (Abb. 18 A-D), als auch beim Laminin α1 (Abb. 18 E) keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp-Mäusen und Glepp1-defizienten Tieren ($p>0,05$).

Auch zeigte sich bei beiden Gruppen eine insgesamt sehr geringe Proteinausbeute, was unter anderem daran zu erkennen ist, dass die hier erkennbaren schwachen Banden erst bei einer Belichtungsdauer von 7 min aufgenommen wurden. Am schwächsten sind die Banden bei den Kollagen IV-Untereinheiten α3 & α5 ausgeprägt. Dies zeigt sich im starken Hintergrundrauschen der Fotografien. Die *loading-control* Agrin zeigt im Gegensatz dazu in allen Experimenten ein ähnlich ausgeprägtes Signal.

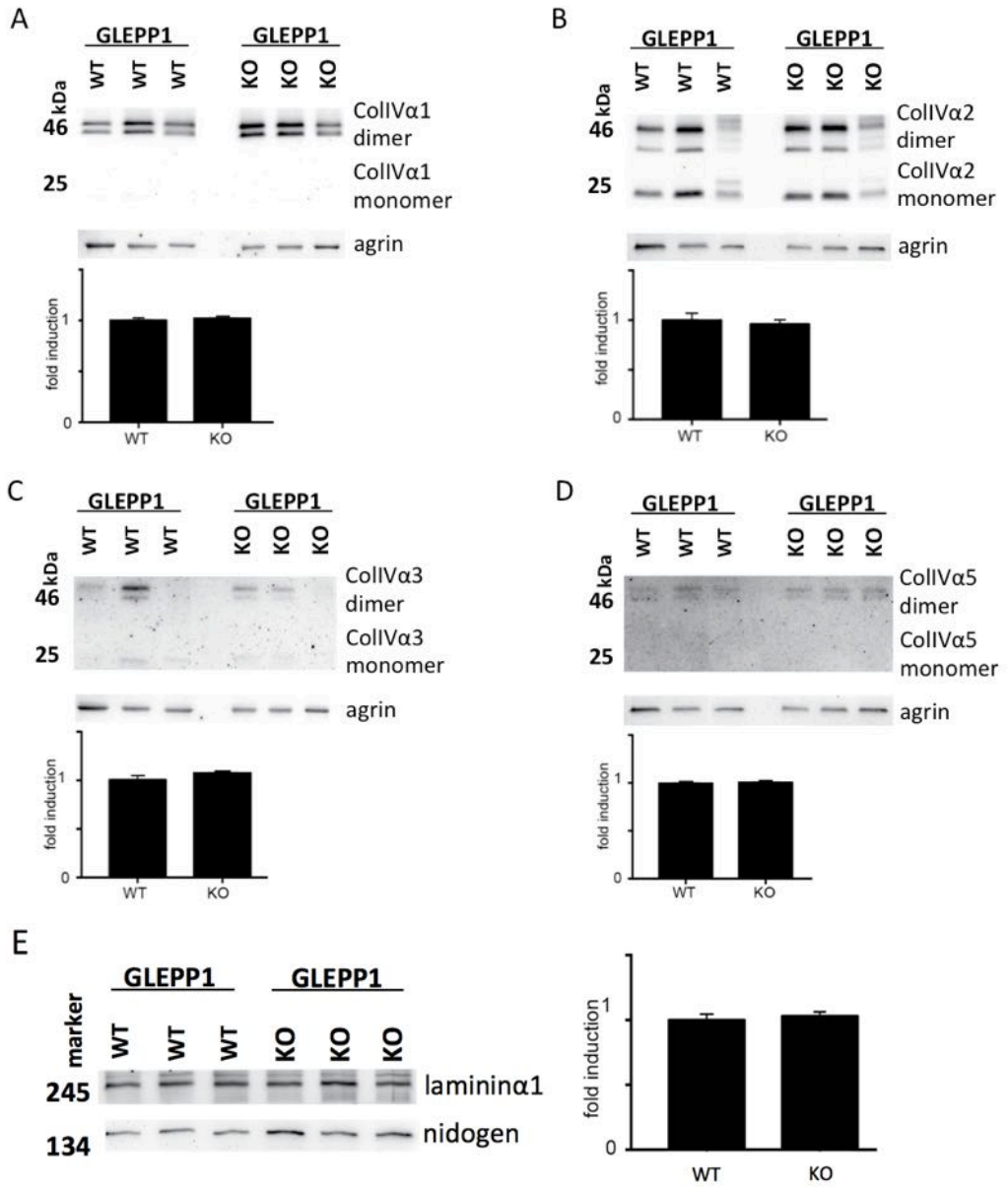


Abb. 18 Vergleich der Proteinexpression von Kollagen IV- und Laminin α1-Untereinheiten bei glomerulären Mischkulturen von 4 Monate alten Tieren im Westernblot

Glomeruli aus 4 Monate alten Mäusen wurden isoliert und 5 Tage in Zellkultur gehalten, bis Podozyten und andere glomeruläre Zellen aus diesen herausgesprosst sind. Diese Zellen wurden weiter kultiviert und aus diesen das Kollagen IV (NC1) und Laminin α1 isoliert. Die Proteine wurden im Westernblot gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern markiert. A-D zeigen die Ergebnisse der Kollagen IV-Expression. In der densitometrisch durchgeführten Auswertung der Dimere zeigte sich bei keiner Untereinheit ein Unterschied zwischen GLEPP1 WT und KO-Mäusen. E zeigt die Ergebnisse der Laminin-α1-Expression. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen WT und KO. (n=3, p>0,05, GLEPP1: Glomerular Epithelial Protein 1, ColIV: Kollagen IV, kDa: *kilo Dalton*, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei 4 Monate alten Tieren die von den glomerulären Zellen sezernierte ECM hauptsächlich aus Kollagen α1 und α2 besteht, die Zusammensetzung jedoch nicht durch den GLEPP-KO beeinflusst wurde.

3.3 Basalmembranproduktion in primärer glomerulärer Zellkultur bei 10 Monate alten Tieren

3.3.1 qPCR-Ergebnisse von Collagen IV (10 Monate)

In Abb. 19 ist die relative Expression von Kollagen-IV-Ketten auf RNA-Ebene bei 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Tieren dargestellt.

Die Gewinnung und Aufbereitung des Materials wurde bereits bei der 4-Monatskohorte beschrieben.

Es zeigt sich bei den unreifen Kollagen-IV α1 und α2-Domänen kein signifikanter Unterschied zwischen GLEPP1 WT und KO. Jedoch erkennt man im Vergleich zu den 4 Monate alten Tieren (siehe Abb. 16) bei den alten Tieren tendenziell eine minimal stärkere Expression der unreifen Ketten beim GLEPP-KO.

Bei den reifen α3- und α5-Domänen ist ebenfalls keine Signifikanz zwischen WT und KO errechnet worden. Das Kollagen IV α5 ist hier jedoch trotz fehlender Signifikanz beim knockout leicht vermindert und das Kollagen IV α3 leicht vermehrt exprimiert.

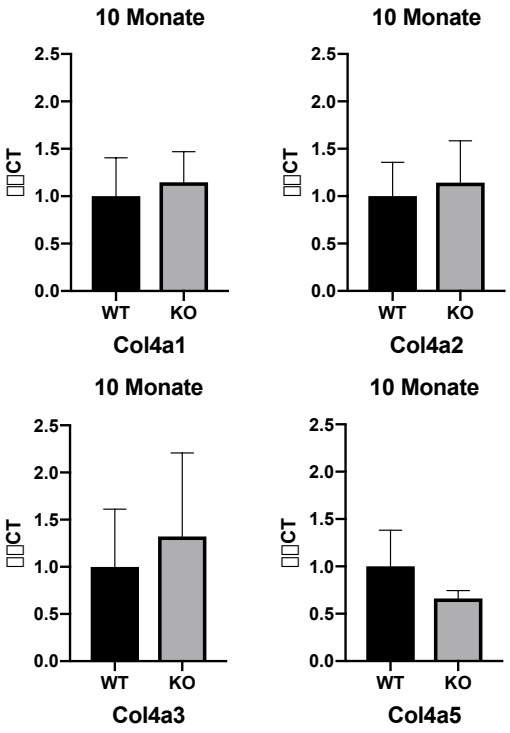


Abb. 19 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Col4 α1,2,3,5 bei 10 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen

Darstellung der ΔΔCT-Werte für die relative Expression von Kollagen IV-Ketten bei 10 Monate alten GLEPP1 Wildtyp und knockout-Tieren. Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Bei den unreifen Kollagen IV-Ketten α1 und α2 (oben) zeigte sich in beiden Altersgruppen kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen WT und KO. Ebenfalls konnten bei den reifen Ketten α3 und α5 (unten) keine Unterschiede zwischen WT und KO nachgewiesen werden. (n=5, p>0,05, GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, Col4: Kollagen IV, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

3.3.2 qPCR-Ergebnisse von Laminin alpha 1, Nidogen und Agrin (10 Monate)

In Abb. 20 sind die qPCR-Ergebnisse der relativen RNA-Expression von Laminin α1, Nidogen und Agrin bei 10 Monate alten Tieren zu sehen.

Keiner der untersuchten Primer für die ECM-Proteine wies einen signifikanten Unterschied zwischen GLEPP1 WT und KO auf.

Beim knockout scheint die Expression bei allen drei Primern leicht vermindert zu sein.

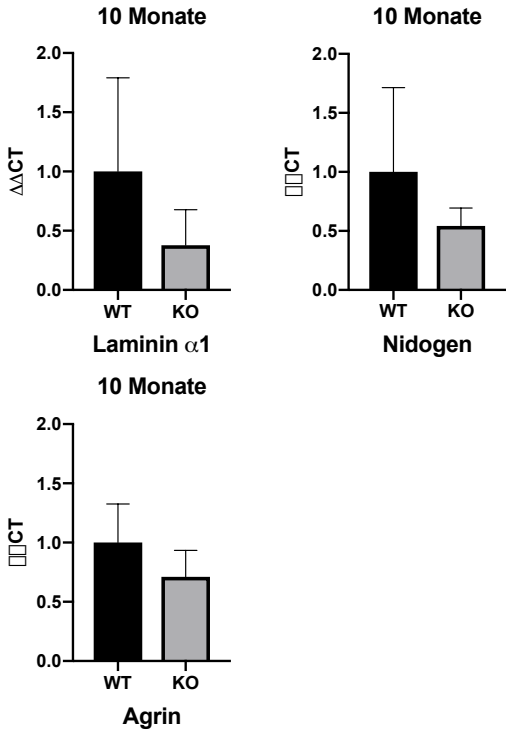


Abb. 20 qPCR-Ergebnisse (ΔΔCT) aus umgeschriebener cDNA von primären glomerulären Zellen für Laminin α1, Nidogen und Agrin bei 10 Monate alten GLEPP1 WT und KO-Mäusen

Darstellung der ΔΔCT-Werte für die relative Expression von Laminin α1, Agrin und Nidogen bei 10 Monate alten GLEPP1 Wildtyp und knockout-Tieren. Die RNA wurde hierbei aus GLEPP1 WT- und KO-Zellen aus primärer Zellkultur isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR amplifiziert und ausgewertet. Bei keiner der dargestellten extrazellulären Matrixproteine zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen WT und KO. (n=5 p<0,05, GLEPP1: *Glomerular Epithelial Protein 1*, WT: Wildtyp, KO: *Knockout*

3.3.3 Westernblot von Kollagen IV und Laminin alpha 1 (10 Monate)

Für die Untersuchung der extrazellulären Matrixproteine Kollagen IV und Laminin α1 wurde nach demselben Prinzip vorgegangen, wie bei den 4 Monate alten Tieren (siehe 3.2.3).

In Abb. 21 sind die Westernblot-Ergebnisse für die Proteinexpression von Kollagen IV und Laminin α1 bei 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Mäusen dargestellt.

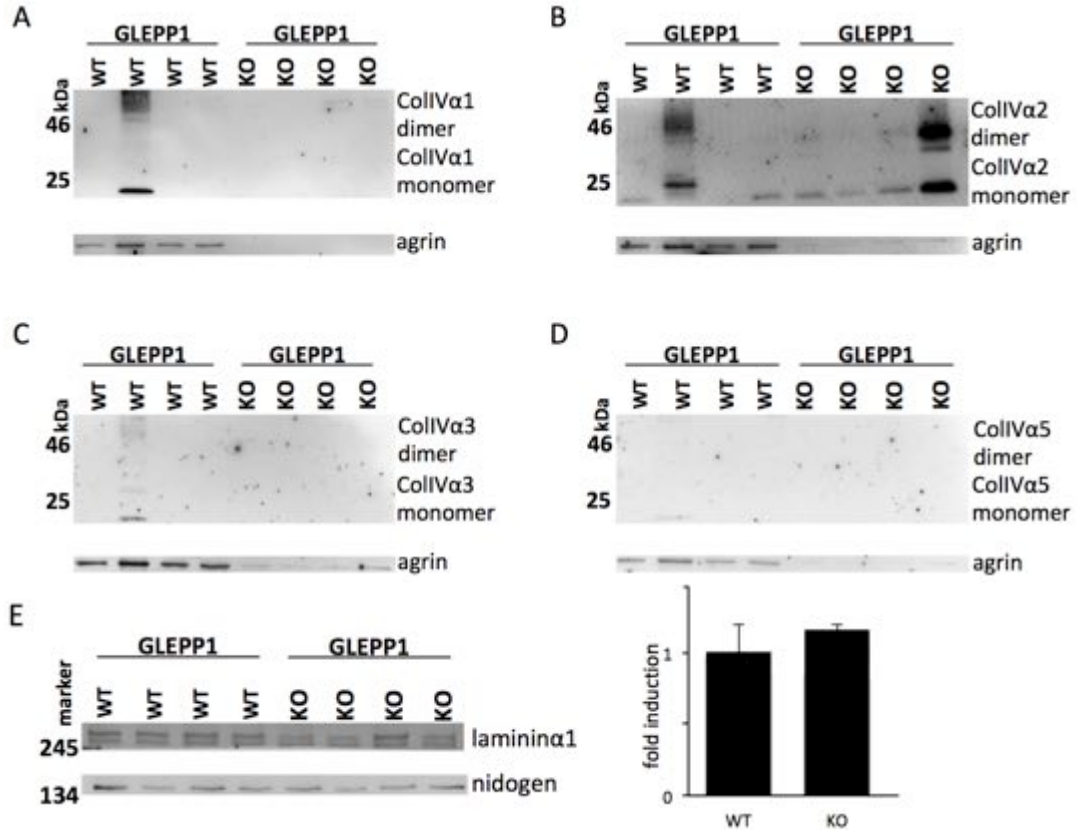


Abb. 21 Vergleich der Proteinexpression von primären glomerulären Zellen im Westerblot von 10 Monate alten GLEPP1 WT- und KO-Tieren

Glomeruli aus 10 Monate alten Mäusen wurden isoliert und 5 Tage in Zellkultur gehalten, bis Podozyten und andere glomeruläre Zellen aus diesen herausgesprosst sind. Diese Zellen wurden weiter kultiviert und aus diesen das Kollagen IV (NC1) und Laminin α1 isoliert. Die Proteine wurden im Westernblot gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern markiert. A-D zeigen die Ergebnisse der Kollagen IV-Expression. Da in nahezu keinem Versuch Banden nachweisbar sind, erfolgte auch keine densitometrische Auswertung. E zeigt die Ergebnisse der Laminin-α1-Expression. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen GLEPP1 WT und KO. (n=4, p>0,05, WT=1) GLEPP1: Glomerular Epithelial Protein 1, CollV: Kollagen IV, kDa: *kilo Dalton*, WT: Wildtyp, KO: Knockout

In A-D zeigten sich mehrere Auffälligkeiten bei der Untersuchung der NC1-Kollagendomänen. Zum einen sind lediglich beim α2-Segment in der KO-Gruppe (B) NC1-Monomere nachweisbar. Für alle anderen Proteine konnte keine durchgehende Expression i.S. von Banden nachgewiesen werden. Zusätzlich ist in A-D bei den GLEPP1-KO-Zellen das als Ladungskontrolle ver-

wendete Agrin kaum nachweisbar. Diese Ergebnisse im Westernblot wurden durch 2-fache Wiederholung bestätigt.
Daher ist hier auch keine densitometrische und statistische Auswertung inklusive graphischer Darstellung möglich gewesen.
Beim Laminin α1 konnte bei GLEPP1 WT- als auch bei KO-Zellen Protein für eine Auswertung nachgewiesen werden.
Hier zeigte sich bei den KO-Tieren in der Proteinexpression eine leichte Hochregulation des unreifen Laminin α1 ohne statistische Signifikanz.
Im Vergleich zu den Aufnahmen der 4 Monate alten Tiere zeigt sich hier bei den auswertbaren Banden insgesamt eine stark verminderte Proteinexpression. Dies erkennt man am verminderten Kontrast der Banden im Vergleich zum Hintergrund, vor allem bei Kollagen IV α1 und α2.

4 Diskussion

Eine GLEPP1-Defizienz führt beim Menschen zu einem steroidresistenten nephrotischen Syndrom im Kindesalter (64). Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Doktorarbeiten von Laura Lennartz, Christian Weigel und Phillip Schüppler) konnten im Mausmodell bei einer GLEPP1-Defizienz bereits das Auftreten einer Proteinurie im Alter, sowie histologische, wie molekulare Veränderungen der GBM in vivo zeigen. So wies die GBM bei einem Verlust von GLEPP1 eine verdickte Struktur mit einem Verlust von podozytären Fortsätzen auf. Ebenfalls zeigte sich bei der Zusammensetzung auf Protein- und RNA-Ebene eine Herabregulation der reifen und unreifen Kollagen IV-Ketten bei 4 Monate alten Tieren und bei den älteren Tieren eine teilweise verminderte Expression der reifen Ketten mit insgesamt eher unreifem Muster.

In dieser Dissertation konnte die Sekretion von primären glomerulären Zellen aus GLEPP1-defizienten Mäusen im Alter von 4 und 10 Monaten auf RNA- und Proteinebene in vitro nachgewiesen und in ihrer molekularen Zusammensetzung bestimmt werden.
Die untersuchten primären Zellen haben RNA von Zellmarkern aller glomerulären Zellpopulationen mit Fokus auf Fibronektin 1 (FN1) exprimiert.
Sowohl auf RNA-, als auch Proteinebene zeigten sich in beiden Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und GLEPP1-defizienten Mäusen. Bei den 10 Monate alten Tieren zeigte sich eine kaum nachweisbare Proteinexpression, wobei unreifen Kollagen-IV-Ketten (α2) bei den KO-Tieren stärker ausgeprägt schienen. Auf RNA-Ebene konnten allerdings sowohl reife, als auch unreife Kollagen-IV-Ketten nachgewiesen werden.

4.1 Die primäre glomeruläre Kultur ist eine Mischkultur mit Hochregulation von FN1

Bei den Zellpopulationen, welche von uns mittels qPCR auf zelluläre Markerproteine untersucht wurden, zeigte sich eine glomeruläre Mischkultur aus Podozyten (WT1 (=Wilms-Tumor-Protein 1), SYNPO (=Synaptopodin)), Endothelzellen (ICAM1 (=*intercellular ahesion molecule 1*), FN1 (=Fibronektin 1)) und

Mesangialzellen (FN1). Die hohen Werte (frühes Signal bei qPCR) für den Marker Fibronektin 1 (FN1) könnten auf ein Übergewicht an Mesangialzellen (und Endothelzellen) schließen lassen.
Es könnte sich jedoch auch um eine Hochregulation des FN1 ohne ein solch starkes Überwiegen dieser Zellen handeln. FN1 ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches Integrine, Kollagen und weitere ECM-Komponenten bindet und auch als Adhäsionsmolekül zwischen verschiedenen Zellen fungiert (104). Die Interaktion von FN1 und Kollagen wird hierbei durch mechanische Kräfte reguliert (105). In einer Studie aus 2019 konnte gezeigt werden, dass FN1 bei andauerndem mechanischem Stress in immortalisierten Podozytenkulturen auf mRNA- und Protein-Ebene signifikant hochreguliert ist, obwohl Podozyten eigentlich nur sehr wenig FN1 exprimieren (106). Hierbei zeigten die Untersuchungen bei kontinuierlichem Scherstress bereits nach 3 Tagen eine auf das doppelte hochregulierte FN1-Expression im Vergleich zur Kontrolle (106). Unsere primären glomerulären Zellen wurden bis zur RNA-Analyse zwar nicht so kontinuierlich unter mechanischen Stress gesetzt, jedoch wurden diese im Zeitraum von über 2 Wochen immer wieder von der Isolation der Glomeruli bis zum regelmäßigen Passagieren der Zellen punktuell einer hohen mechanischen (und chemischen) Belastung ausgesetzt. Dies könnte die Podozyten und die anderen Zellen zu einer kompensatorischen Hochregulation des FN1 veranlasst haben. Die vermehrte Expression von FN1 bei mechanischem Stress dient wahrscheinlich dem Schutz der Zellen vor Ablösung und Verlust. Um dies zu prüfen, müssten dieselben Versuche bei nicht-passagierten Zellen und auch in Einzelkulturen wiederholt werden.

Zur Identifikation und Isolation einzelner Zellpopulationen werden in der Literatur häufig die Wachstumsmuster und morphologischen Unterschiede glomerulärer Zellen (epitheliale Zellen wie Podozyten polygonal und „pflastersteinartig“ sowie einschichtig wachsend, Mesangialzellen länglich mit Ausläufern und mehrschichtig verdrängend wachsend) zur Hilfe genommen. Anschliessend werden diese mittels immunhistochemischen und/oder RNA-Untersuchungen charakterisiert. Podozyten sprossen früher als Mesangialzellen aus den Glomeruli heraus, jedoch zeigen Mesangialzellen ein deutlich höheres Proliferationspotential (107). In unserem Protokoll wurden die Zellen daher bereits früh

ausgesät, um ein übermäßiges Aussprossen mesangialer Zellen mit Verdrängung anderer Zellpopulationen im Laufe der Experimente zur verhindern. Aufgrund des sehr unterschiedlichen Wachstumsverhaltens gibt es in der Literatur fast nur Protokolle zur Isolation und Kultivierung von Einzelkulturen.
Dylewski et. al. haben 2020 ein Protokoll zur Isolation primärer glomerulärer muriner Endothelzellen publiziert. Hier wurden (ohne Dynabeads) isolierte Glomeruli nicht direkt ins Kulturmedium aufgenommen, sondern für 60 min chemisch und mechanisch weiter verdaut und anschliessend mit Dynabeads vermengt, welche mit vWF (von Willebrand Faktor) beschichtet wurden. Diese bindeten die Endothelzellen und wurden nach mehreren Waschschritten mittels Trypsin von den Zellen gelöst. Anschließend wurden die so isolierten Endothelzellen in die Zellkultur aufgenommen (108). Mit dem Protokoll konnten glomeruläre endotheliale Zellen mit einer Reinheit von >90% isoliert werden. Solche Methoden könnten für zukünftige Versuche an Einzelkulturen diskutiert werden.
Für möglichst reine Kulturen (z.B. aus Podozyten oder Endothelzellen) sind meist spezielle Zellkulturmethoden, wie Klonierung notwendig. Mit dieser können jedoch keine so großen Zellzahlen generiert werden, wie für unsere Versuche notwendig waren. Daher werden die Zellen meistens immortalisiert. Hier kommt es jedoch verständlicherweise zu einer veränderten Zellphysiologie mit geringer differenzierten Zellen, weshalb Ergebnisse mit diesen Zellen nur bedingt auf in vivo-Verhältnisse übertragbar sind.

Um die Mesangialzelen besser von den anderen Zellpopulationen differenzieren zu können, wäre auch ein alternativer Zellmarker hierfür zu diskutieren. So wird PDGFβ-R *(platelet-derived growth factor β receptor)* in humanen Zellkulturen ausschließlich von ebendiesen Mesangialzellen produziert (109). Ob PDGFβ-R auch in murinen Zellkulturen nur von Mesangialzellen exprimiert wird, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.
Dass die Zellkultur neben Mesangialzellen auch die anderen Zellarten enthält, zeigen auch die nachgewiesenen Transkripte für die Podozytenmarker (WT1 und Synaptopodin) und die Endothelzellmarker (ICAM1, FN1).
Auch auf Proteinebene zeigte sich in den Westernblot-Untersuchungen, dass Podozyten und Endothelzellen vorhanden waren. So konnten in den Zellkulturen der 4 Monate alten Jungtiere Kollagen IV α3 und α5-Untereinheiten (NC1)

nachgewiesen werden. Da diese ausschließlich von Podozyten sezerniert werden, lässt sich anhand dieser Ergebnisse auf deren Vorhandensein schließen (25). Bei den 10 Monate alten Tieren konnte zwar nur wenig Protein nachgewiesen werden, aber auch dort zeigten sich in den RNA-Untersuchungen Transkripte für podozytäre ECM-Proteine. Zwischen den beiden untersuchten Altersgruppen (4 vs. 10 Monate) zeigten sich quantitativ in der Zellverteilung keine signifikanten Unterschiede.

4.2 Primäre Zellkulturen unterscheiden sich von *in vivo*-Verhältnissen

In unseren Versuchen zeigten die primären Zellen in Zellkultur klassische morphologische Eigenschaften von glomerulären Zellen, welche den Zellen eines Glomerulus *in vivo* nur bedingt entsprechen. *In vivo* zeigen Podozyten beispielsweise eine komplexe Interaktion aus Fußfortsätzen, welche die Schlitzmembran bilden (110). Primäre (wie hier verwendet), aber auch immortalisierte Zellkulturen aus Podozyten oder glomerulären Mischkulturen präsentieren jedoch eine einfachere Morphologie ohne diese charakteristischen Fußfortsätze. Auch die Genexpression der *in vitro*-Zellen unterscheidet sich häufig stark von den *in vivo*-Verhältnissen (111). Für Ergebnisse, die zumindest ähnliche Resultate zwischen beiden Formen (sowohl morphologisch als auch auf Expressionsebene) liefern, waren beispielsweise in Versuchen von Yaoita et al. spezifische Kulturvoraussetzungen (Heparin, ATRA (=*all-trans-retinoic acid*), geringe FCS-Konzentration) notwendig (112). Unter diesen Voraussetzungen konnten in Zellkultur Proteine wie Nephrin nachgewiesen werden, welche sonst nicht exprimiert werden. Man muss jedoch auch anmerken, dass auch dort quantitativ nicht die Expressionsmuster aus Glomeruli-Isolaten reproduziert werden konnten (112).

Da Podozyten als hochdynamische Zellen eine komplexe Interaktion untereinander, aber auch zur GBM aufweisen (beispielsweise über Integrine) muss dies bei 2-dimensionalen *in vitro*-Versuchen in der Zellkultur ebenfalls bedacht werden. Dieser Sachverhalt gilt auch für alle anderen Zellarten des Glomerulus (Endothelzellen, Mesangialzellen), welche eine ausgeprägte Zell-Zell- bzw.-

GBM-Interaktion aufweisen (113). Wenn sich in der 2-dimensionalen Zellkultur die mikroskopische Morphologie bereits entscheidend von den *in vivo*-Verhältnissen unterscheidet und auch einige podozytäre Proteine (wie Nephrin) nicht oder nur nach Stimulation (z.B. Heparin, ATRA und niedrige FCS-Konzentrationen) exprimiert werden, könnte dies auch für die Expression/Sekretion der in dieser Arbeit untersuchten extrazellulären Matrixbestandteilen gelten.

In Versuchen von Rachel Lennon et. al. aus 2014 zeigten sich in immortalisierten Zelllinien bei Ko-Kulturen aus Podozyten und Endothelzellen Proteinsekretionen, welche eher der GBM *in vivo* ähneln, als bei Monokulturen aus Podozyten oder Endothelzellen alleine. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für die Notwendigkeit einer Zell-Zell-Interaktion/Cross-talk nicht nur von Podozyten untereinander, sondern vor allem zwischen verschiedenen glomerulären Zellen für die Produktion der GBM-Bestandteile. Trotzdem konnten in den immortalisierten Zellkulturen nicht die gleichen Ergebnisse wie aus Glomerulus-Isolaten *in vivo* (in Bezug auf die nachgewiesenen Proteinmuster und –mengen) erreicht werden (100).
Daher wurde in unseren Versuchen eine primäre glomeruläre Mischkultur verwendet. Die Charakterisierung anhand von Zellmarkern mittels qPCR-Untersuchungen zeigte das Vorhandensein von Podozyten, Endothelzellen, wie auch Mesangialzellen, also allen Zellen des Glomerulus bzw. des glomerulären Filterapparates.

Für die Kultur wurde ein Medium verwendet, welches auf Podozyten konzipiert ist, und nicht optimiert für andere Zellarten ist. Der Grund hierfür war, eine ausreichend große Anzahl an Podozyten in Mischkultur zu generieren, um auch einen möglichen Einfluss des unten diskutierten podozytären GLEPP-KO auf die EZM-Sekretion beurteilen zu können. Allerdings ist zu erwähnen, dass Mesangialzellen von allen glomerulären Zellen die niedrigsten Kulturanforderungen und eine hohe proliferative Kapazität aufweisen (107).

Dass möglicherweise mehr Mesangialzellen vorhanden waren, könnte aber vor allem auch an der relativ langen Kultivierungsdauer liegen. Im Rattenmodell tritt

der Wachstumspeak von Mesangialzellen im Gegensatz zu beispielsweise Podozyten (6d) erst nach ca. 22d auf (114). Von der Aussaat der Glomeruli bis zur Isolation der ECM sind in unseren Versuchen bis zu 18 Tage vergangen. Daher wäre es durchaus möglich, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Mesangialzellen in der Proliferationsphase befanden und mittlerweile „seneszente“ Zellen wie Podozyten zum Teil verdrängt haben. Diese haben von Natur aus eine auch in Zellkultur nachweisbare minimale Proliferationsfähigkeit.
Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte man in künftigen Versuchen bei jeder Passage einen Teil der Zellen auf die oben genannten Zellmarker untersuchen.

4.3 Die EZM-Produktion in primärer Zellkultur verändert sich bei alternden Tieren

Bei den beiden untersuchten EZM-Proteinen Kollagen IV und Laminin zeigten sich in der glomerulären Mischkultur erstaunliche Ergebnisse. Zum einen wiesen die Untersuchungen mittels Westernblot eine sehr geringe Proteinmenge auf. Bei Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe aus Glomerulus-Isolaten waren die nachgewiesenen Proteinmengen größer.
Diese Beobachtungen decken sich zunächst auch mit den Ergebnissen von Lennon und Yaoita, bei denen ebenfalls die nachgewiesenen Proteinmengen in Zellkultur quantitativ geringer ausfielen, als in Glomerulus-Isolaten (100, 112). Dies könnte daran liegen, dass die Zellen im Glomerulum bereits eine „etablierte“ GBM besitzen, während diese in Zellkultur in kürzester Zeit komplett neu sezerniert werden muss.
Ein weiterer Punkt sind die unterschiedlichen Zellzahlen. Während in der Zellkultur für das Kollagen IV/Laminin 250000/18000 Zellen ausgesät wurden, enthält ein einzelner Glomerulus bereits ca. 211-235 Zellen (115). Die Anzahl der mit aktuellen Protokollen isolierbaren Glomeruli pro Maus liegt bei 20131 (+-4699) (116). Hiermit wären in vivo Zellzahlen von ca. 4-4,5 Millionen glomerulären Zellen pro Maus weiteren Untersuchungen zuführbar. Dieses deutliche Übergewicht an Zellen in vivo könnte die Ergebnisse ebenfalls erklären.
Da in den qPCR-Untersuchungen jedoch alle glomerulären Zellarten nachgewiesen wurden und all diese Zellen zumindest in Teilen Proteineinheiten produzieren, welche untersucht wurden, würde man erwarten, dass etwas mehr Pro-

tein nachgewiesen werden kann. Dieses Ergebnis könnte dafür sprechen, dass Zellen in primären Mischkulturen eine andere und weniger extrazelluläre Proteinmatrix sezernieren als Zellen *in vivo*.

Bei den Kollagen-IV-Untereinheiten (NC1) zeigten sich bei den aus Jungtieren (4 Monate) isolierten Zellen hauptsächlich die α1- und auch α2-Untereinheiten (unreife GBM), jedoch kaum α3 und α5. Der Grund hierfür könnte in dem bereits beschriebenen Übergewicht an Mesangialzellen liegen. Während Kollagen IV α1 und α2 von Podozyten, Endothelzellen, und auch Mesangialzellen gebildet wird, wird Kollagen IV α3 (α4) und α5 ausschließlich von Podozyten gebildet (25, 117). Das bedeutet, dass in unserer Kultur vielleicht der Großteil der Kollagen-IV-Einheiten von ebendiesen Mesangialzellen (wie auch Endothelzellen) sezerniert wurde. Ein ähnliches Protein-Verhältnis konnte jedoch bereits in den Vorversuchen von Lennon et. al. aus immortalisierten humanen Zelllinien in glomerulärer Co-Kultur aus Podozyten und Endothelzellen reproduziert werden (100). Möglicherweise führen daher die Bedingungen in Zellkultur zu einem Sekretionsverhalten, welches eher einem embryonalen Muster entspricht.

Dies kann die Ergebnisse allein jedoch nicht erklären, da auch die Unterschiede zwischen den Altersgruppen (4 vs. 10 Monate) im Westernblot eindeutig sind. So zeigten die Kulturen der Zellen aus jungen Tieren in allen Kollagen NC1-Untereinheiten (mit Fokus auf α1 und α2) nachweisbare Monomere und Dimere. Bei den alternden Tieren zeigten sich jedoch nahezu keine nachweisbaren Kollagen IV NC1-Domänen. Die anderen untersuchten Proteine, wie Laminin α1, Nidogen und Agrin konnten zwar auch in den Zellkulturen aus alternden Tieren nachgewiesen werden, jedoch ebenfalls in einem deutlich reduzierten Ausmaß verglichen mit denen aus Jungtieren.

Erstaunlich dabei ist, dass die qPCR-Ergebnisse der mRNA für die extrazellulären Matrixproteine (Koll. IV, Laminin ...) sowohl bei den jungen als auch bei den alten Tieren ähnlich ausfielen. Daher würde man zunächst vermuten, dass auch auf Proteinebene ähnliche Ergebnisse auftreten.
Da in dieser Zellkultur mit den alternden Tieren wie bereits oben beschrieben auch ähnliche zelluläre Gewichtungen vorgeherrscht haben, könnte dies bedeu-

ten, dass möglicherweise primäre glomeruläre Zellen von alternden Mäusen im Laufe der Zeit die Fähigkeit einer EZM-Sekretion verlieren. Trotz vorhandenen Transkripten für Basalmembranproteine könnten diese bei „seneszenten“ Zellen durch herunterregulierte Signalkaskaden vielleicht in geringerem Maß in Proteine umgeschrieben werden.

Zhang et. al. haben in Versuchen im Mausmodell beispielsweise zeigen können, dass bei 3 und 20 Monate alten Tieren die mRNA-Expression des podozytären Schlitzmembranproteins Nephrin keinen signifikanten Unterschied aufweist. In den Westernblot-Untersuchungen zeigte sich jedoch eine signifikant verminderte Menge des Nephrins bei den alten Mäusen (Abb. 22) (118).

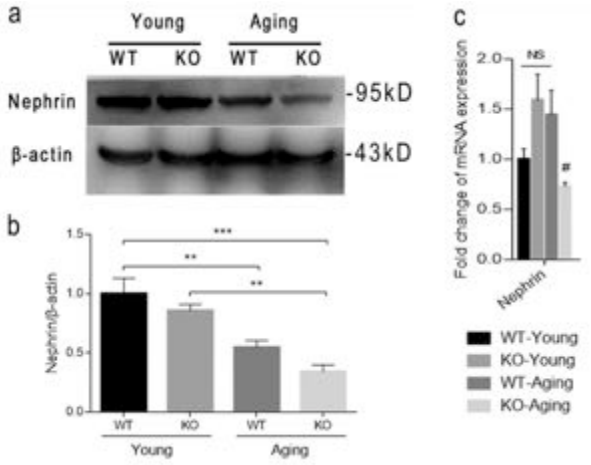


Abb. 22 Expression von Nephrin auf Protein- und mRNA-Ebene im Nierenkortex von jungen (3 Monate) alten (20 Monate) Mäusen (modifiziert nach Zhang et.al 2019)
Betrachtung nur von WT, KO hier ohne Relevanz, Vergleich von jungen (3 Monate) und alten (20 Monate) alten Tieren; a: Relative Expression von Nephrin und b-Actin (als Ladekontrolle) dargestellt mittels Westernblot-Analyse, b: Densitometrische Auswertung des Westernblot, c: Relative mRNA-Expression des Nephrins (118). **:p<0.01, NS: *no significance*

In einer anderen Studie aus 2015 wurden glomeruläre Proteine aus Glomerulusisolaten von 8 und 20 Wochen alten Mäusen untersucht. Hier wurden 22 Proteine identifiziert, welche in den beiden Altersgruppen eine signifikant unterschiedliche Expression aufwiesen. Von diesen waren 19 Proteine in der älteren Gruppe herabreguliert (119).

Solche Ergebnisse konnten auch für andere Gewebe/Organe reproduziert werden. So untersuchte Nagata 2007 u.a. die Proteinsynthese in Mitochondrien von zweikernigen Hepatozyten alternder Mäuse. Hier zeigte das ^{3}H-Leucin, welches als Indikator der Proteinsynthese verwendet wurde eine signifikante Reduktion ab 12 Monaten, und sank bei 24 Monaten noch weiter ab. Bis zum Alter von 6 Monaten stieg die Proteinsynthese des ^{3}H-Leucins ab Geburt zunächst kontinuierlich an (120).

Diese Ergebnisse könnten möglicherweise auch in primären Zellkulturen für andere Proteine wie die hier untersuchten EZM-Komponenten gelten. Um dies

zu überprüfen, müssten in zukünftigen Versuchen weitere Proteine und möglicherweise auch weitere Altersgruppen (6, 8, 12 Monate) mit dem verwendeten neuen Protokoll untersucht werden.

4.4 Einfluss des GLEPP-KO auf die glomeruläre Zellkultur und EZM-Produktion

Ein *knockout* im GLEPP1-Gen führt neben den klinischen Symptomen morphologisch zu einer GBM-Verdickung und einer veränderten Podozytenstruktur mit Abnahme der Fußfortsätze und Veränderung der Form. Anstatt einer oktopoiden Form weisen diese eine eher amöboide Form auf (55, 72). Die Zusammensetzung der GBM zeigte in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Doktorarbeiten von Christian Weigel, Laura Lennartz und Phillip Schüppler) am Mausmodell bei alternden Tieren eine Verschiebung zur embryonalen Zusammensetzung aus Kollagen IV α1α2α1. Der Grund hierfür könnte möglicherweise darin liegen, dass es neben der Strukturveränderung der Podozyten im Laufe der Alterung auch zu einem Podozytenschaden kommt, welcher die Sekretionsleistung vermindert.

Im Folgenden werden die qPCR- und Westerblot-Ergebnisse trotz fehlender Signifikanz noch einmal auf Ihre Tendenzen diskutiert. Hierbei zeigten sich einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.

So zeigte sich auf RNA-Ebene das Kollagen IV bei Kulturen aus den jungen Tieren beim GLEPP1-KO leicht reduziert, auf Proteineben zeigte sich kein Unterschied. Da jedoch wie bereits erwähnt keine signifikanten Unterschiede vorlagen, decken sich diese Ergebnisse mit den Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Doktorarbeit Christian Weigel).

Bei den Kulturen aus den 10 Monate alten GLEPP1 KO-Tieren schienen die Kollagen IV α1- und α2-Ketten in der qPCR leicht hochreguliert. Im Westernblot zeigte sich ebenfalls nur beim Kollagen IV α2 der GLEPP1 *knockout* Zellen eine nachweisbare Proteinproduktion. Dies könnte durch den GLEPP1-KO begründet sein, welcher bei den alternden Tieren zu einer unreifen Zusammensetzung der GBM führt (siehe Vorarbeiten von Christian Weigel und Phillip Schüppler).

Es könnte sich hierbei jedoch auch um eine endotheliale oder mesangiale Proteinproduktion handeln, da auch diese Zellen Kollagen IV α2 (& α1) bilden (117). Auch die leicht erhöhte Laminin α1-Produktion der alternden Zellkultur könnte auf diese Zellpopulationen zurückzuführen sein (34). Ob die jeweiligen Zellen jeweils alleine die Syntheseleistung der durch den GLEPP1-KO funktionell beeinträchtigten Podozyten übernehmen könnten, ist fraglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

Agrin zeigte sich in der Zellkultur aus 10 Monate alten GLEPP1-KO Mäusen erstaunlicherweise auf Proteinebene stark reduziert. Ein Einfluss von GLEPP1 auf die Agrinproduktion ist bisher nicht bekannt, so dass es als Ladekontrolle verwendet wurde. Jedoch befindet sich Agrin hauptsächlich in der adulten GBM(36), und möglicherweise führte die Kombination aus GLEPP1-KO und den primären „seneszenten“ Zellkulturbedingungen dazu, dass die sezernierte unreife GBM kein Agrin mehr binden konnte. Eine weitere mögliche Erklärung für den geringeren Nachweis von Agrin in der 10 Monate alten Kultur könnte in vermehrtem oxidativem Stress bzw. reaktiven Sauerstoffspezies liegen. Diese treten im Rahmen des Alterungsprozesses auf und könnten demnach auch in der Zellkultur der alternden Mäuse vermehrt vorhanden sein (121). Viele Studien konnten bereits nachweisen, dass reaktive Sauerstoffspezies Heparansulfate, zu denen das Agrin gehört depolymerisieren (122). Wieso Agrin jedoch in der WT-Gruppe nachweisbar war wird durch diese Hypothese nicht erklärt.

Nidogen, das zweite Protein, welches als Ladekontrolle verwendet wurde zeigte sich wie erwartet durch den GLEPP1-KO auf RNA- und Proteinebene nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in unseren Versuchen kein systematischer Proteinmangel in der 10 Monate alten GLEPP1-KO-Kohorte herrschte. Ebenfalls kann man dies am nachweisbaren Kollagen IV α2 in dieser Gruppe erkennen.

4.5 Technische Limitationen und Ausblick

In den Versuchen zeigten sich Resultate die sich zum Teil mit den Vorarbeiten zu dem Thema GLEPP1 decken. Diese waren jedoch minimal, und wiesen kei-

ne Signifikanz auf. Der Grund hierfür lag möglicherweise an der geringen n-Zahl, welche in zukünftigen Versuchen erhöht werden könnte. In unseren Versuchen lag die n-Zahl bei maximal 5 Tieren pro Versuch, da eine größere Anzahl von der Tierversuchsanstalt aus Kapazitätsgründen nicht gewährleistet werden konnte. Auch aus Gründen des Tierschutzes konnten nicht unverhältnismäßig viele Tiere den Versuchen zugeführt werden.

Die in der Ko-Kultur beobachtete Zellverteilung mit einer vermuteten Überrepräsentation von endothelialen und/oder mesangialen Zellen sollten für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit bedacht werden. In zukünftigen Versuchen wäre eine weitere Charakterisierung der Zellkultur beispielsweise mit Immunfluoreszenz möglich. Eine primäre glomeruläre Zellkultur ist schwer zu standardisieren. Ein kleines Ungleichgewicht einzelner Zellarten zu Beginn führt nach der Expansion der Zellen zu einem großen Unterschied zwischen den Versuchen und Schwankungen bei den Ergebnissen. Proteine, welche von mehreren Zellarten sezerniert werden, können in der Mischkultur nicht eindeutig den Zellen zugeordnet werden.
Daher wäre es durchaus sinnvoll Reinkulturen von primären Podozyten (und Endothelzellen) herzustellen, um deren ECM-Produktion genauer zu untersuchen. Zusätzlich könnte man Ko-Kulturen aus Podozyten und Endothelzellen herstellen, um den Einfluss der Zell-Zell-Interaktion zu untersuchen.

Die Herstellung reiner Podozytenkulturen aus Glomeruli ist technisch höchst aufwendig und zeigt eine sehr geringe Ausbeute. Um genug Zellen und Protein für Westernblot-Untersuchungen zu generieren, müssten hierfür ggf. für einen Versuch die Zellen von mehreren Mäusen *gepoolt* werden.

Man darf auch nicht vergessen, dass Zellkulturen einige Limitationen für Rückschlüsse auf in-vivo Verhältnisse aufweisen.
Zum einen zeigt die Zellteilung in vivo und in vitro massive Unterschiede. Während in vivo bestimmte Zelltypen wie Endothelzellen eine Halbwertszeit von teilweise Jahren haben, teilen sich die meisten Zelltypen in Zellkultur durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie z.B. Fetalem Kälberserum u.a. innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen. Dies bedeutet, dass in Zellkultur der Fokus der

Zelle eher auf Teilung, als auf Differenzierung und Funktion (i.S. von spezifischer Proteinproduktion) liegt.

Ein weiterer Punkt sind die instabilen homöostatischen Bedingungen in jeder Zellkultur. Im Körper wird für die meisten Zellen eine sehr stabile Umgebung durch genau regulierte Zusammensetzung von Blut und extrazellulären Flüssigkeiten aufrechterhalten. In der Zellkultur ist dies nur bedingt möglich. So werden bei jedem Öffnen des Wärmeschrankes die Zellen starken O2 und CO2-Schwankungen ausgesetzt. Auch der pH-Wert in Zellkulturen zeigt unphysiologische Extrema. Bei jedem Wechsel des Kulturmediums ist dessen Pufferkapazität bereits sichtlich erschöpft (orangenes anstatt rotem Medium, Phenolrot als Indikator). Es herrschen saure Verhältnisse mit Akkumulation von Abfallstoffen und erschöpften Nährstoffreserven. Im Anschluss werden die Zellen plötzlich mit neuem Medium in Kontakt gebracht, was wiederum einen extremen pH- und Nähstoffwechsel für die Zellen bedeutet. Im Körper sind solche Schwankungen viel geringer ausgeprägt.

Auch wurden in unseren Versuchen murine Zellen zur Interpretation von Erkrankungen am Menschen verwendet. Zwar sind murine Zellkulturen in der Grundlagenforschung eine etablierte Methode, allerdings spiegeln sie die Verhältnisse nie 1:1 wider. Diese Speziesunterschiede können allerdings bei deren Kenntnis durch neue Analysemodelle minimiert werden. Beispielsweise konnten 2003 Pessina et. al zeigen, dass die Sensibilitätsunterschiede von murinen und humanen Zellen auf myelotoxische Substanzen in vitro für die Vorhersage der Verhältnisse in vivo genutzt werden konnten. Zusammen mit den maximal tolerierten Dosen (MTD) dieser Substanzen in Mausversuchen in vivo konnte so auf die entsprechenden MTD bei Menschen zurückgeschlossen werden (123). Daher sind Ergebnisse auch aus murinen Zellkulturen unter bestimmten Voraussetzungen auf den Menschen übertragbar.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass primäre glomeruläre Zellen eine extrazelluläre Matrix sezernieren, welche der glomerulären Basal-

membran ähnelt. Diese konnte mit unseren entwickelten Protokollen erfolgreich isoliert werden. Die genaue Zusammensetzung in primärer Zellkultur unterschied sich jedoch zu *in vivo*-Verhältnissen. So zeigten sich in beiden untersuchten Altersgruppen (4 Monate, 10 Monate) unreife ECM-Proteine.

Es konnte kein Unterschied zwischen GLEPP1 WT und KO Zellen bezüglich der Zusammensetzung der ECM gezeigt werden. Dies widerspricht den in der eigenen Arbeitsgruppe erhobenen in vivo Daten. Ob die Unterschiede durch ein Überwiegen einer Zellart hervorgerufen wurden, oder die Zellen in primärer Zellkultur eine andere Proteinexpression aufweisen als *in vivo*, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Es zeigte sich in den Versuchen an Zellen aus alternden Tieren unabhängig vom GLEPP1-KO eine deutlich verminderte Proteinexpression verglichen mit Zellen aus jungen Tieren. Die Expression auf RNA Ebene zeigte jedoch im Alter keine Abnahme. Solche Erkenntnisse konnten bereits für andere Proteine von anderen Forschern *in vivo* an murinen Nieren gewonnen werden.
Sollte es Mechanismen geben, die bei älteren Tieren *in vitro* zu einer frühzeitigen „sekretorischen Seneszenz“ führen, ist die primäre glomeruläre Zellkultur für die Untersuchung des GLEPP1-KO Einflusses nicht optimal geeignet. Hier zeigten sich die meisten pathologischen Veränderungen *in vivo* erst im Alter.

Um dies zu überprüfen und ein genaueres Verständnis der ECM-Sektion in primärer Zellkultur zu erlangen, sollten weitere Untersuchungen auch an Zell-Isolaten erfolgen. So könnten möglicherweise Erkenntnisse über die genauen Mechanismen und relevante Signalkaskaden gewonnen werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. Lancet (London, England). 2010;375(9731):2073-81.
2. Outcomes KDIG. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. In: 2 KIsv, editor. 2012.
3. Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. Lancet (London, England). 2016;387(10032):2036-48.
4. Herold G. Innere Medizin: Walter de Gruyter GmbH & Co KG; 2021.
5. O'Shaughnessy MM, Hogan SL, Thompson BD, Coppo R, Fogo AB, Jennette JC. Glomerular disease frequencies by race, sex and region: results from the International Kidney Biopsy Survey. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2018;33(4):661-9.
6. Kodner C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. American family physician. 2009;80(10):1129-34.
7. Ozlu SG, Demircin G, Tokmeci N, Caltik Yilmaz A, Aydog O, Bulbul M, et al. Long-term prognosis of idiopathic nephrotic syndrome in children. Renal failure. 2015;37(4):672-7.
8. Aydin M, Franke I, Kurylowicz L, Ganschow R, Lentze M, Born M, et al. The long-term outcome of childhood nephrotic syndrome in Germany: a cross-sectional study. Clin Exp Nephrol. 2019.
9. Schlondorff D, Wyatt CM, Campbell KN. Revisiting the determinants of the glomerular filtration barrier: what goes round must come round. Kidney Int. 2017;92(3):533-6.
10. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. Physiological reviews. 2008;88(2):451-87.
11. Salmon AH, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. The Journal of pathology. 2012;226(4):562-74.
12. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. N Engl J Med. 2006;354(13):1387-401.
13. Lawrence MG, Altenburg MK, Sanford R, Willett JD, Bleasdale B, Ballou B, et al. Permeation of macromolecules into the renal glomerular basement membrane and capture by the tubules. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017;114(11):2958-63.
14. Conti S, Perico L, Grahammer F, Huber TB. The long journey through renal filtration: new pieces in the puzzle of slit diaphragm architecture. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2017;26(3):148-53.
15. Arif E, Rathore YS, Kumari B, Ashish F, Wong HN, Holzman LB, et al. Slit diaphragm protein Neph1 and its signaling: a novel therapeutic target for protection of podocytes against glomerular injury. J Biol Chem. 2014;289(14):9502-18.
16. Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, et al. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. J Biol Chem. 2003;278(23):20716-23.
17. Fissell WH, Miner JH. What Is the Glomerular Ultrafiltration Barrier? J Am Soc Nephrol. 2018;29(9):2262-4.

18. Smithies O. Why the kidney glomerulus does not clog: A gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(7):4108.
19. Russo LM, Bakris GL, Comper WD. Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective. Am J Kidney Dis. 2002;39(5):899-919.
20. Suh JH, Miner JH. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. Nature reviews Nephrology. 2013;9(8):470-7.
21. Chew C, Lennon R. Basement Membrane Defects in Genetic Kidney Diseases. Front Pediatr. 2018;6:11.
22. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. Experimental biology and medicine (Maywood, NJ). 2007;232(9):1121-9.
23. Abrahamson DR. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. The American journal of physiology. 1987;253(5 Pt 2):F783-94.
24. Abrahamson DR. Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidneys. The Journal of cell biology. 1985;100(6):1988-2000.
25. Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL. Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. J Am Soc Nephrol. 2009;20(7):1471-9.
26. Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, et al. Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. J Am Soc Nephrol. 2014;25(5):939-51.
27. Miner JH. Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. Organogenesis. 2011;7(2):75-82.
28. Miner JH. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. Pediatric nephrology (Berlin, Germany). 2011;26(9):1413-7.
29. Casino P, Gozalbo-Rovira R, Rodriguez-Diaz J, Banerjee S, Boutaud A, Rubio V, et al. Structures of collagen IV globular domains: insight into associated pathologies, folding and network assembly. IUCrJ. 2018;5(Pt 6):765-79.
30. Abrahamson DR, St John PL, Stroganova L, Zelenchuk A, Steenhard BM. Laminin and type IV collagen isoform substitutions occur in temporally and spatially distinct patterns in developing kidney glomerular basement membranes. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2013;61(10):706-18.
31. Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. The Journal of clinical investigation. 1997;99(10):2470-8.
32. Kruegel J, Rubel D, Gross O. Alport syndrome--insights from basic and clinical research. Nature reviews Nephrology. 2013;9(3):170-8.
33. Chen YM, Miner JH. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine. 2012;160(4):291-7.
34. St John PL, Abrahamson DR. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. Kidney Int. 2001;60(3):1037-46.
35. Zenker M, Tralau T, Lennert T, Pitz S, Mark K, Madlon H, et al. Congenital nephrosis, mesangial sclerosis, and distinct eye abnormalities with microcoria: an

autosomal recessive syndrome. American journal of medical genetics Part A. 2004;130a(2):138-45.
36. Groffen AJ, Ruegg MA, Dijkman H, van de Velden TJ, Buskens CA, van den Born J, et al. Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 1998;46(1):19-27.
37. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Rops AL, van der Vlag J, Berden JH, et al. Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. The American journal of pathology. 2007;171(1):139-52.
38. Borza DB. Glomerular basement membrane heparan sulfate in health and disease: A regulator of local complement activation. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2017;57-58:299-310.
39. Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. Annual review of physiology. 2012;74:299-323.
40. Reiser J, Altintas MM. Podocytes. F1000Research. 2016;5.
41. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. Frontiers in endocrinology. 2014;5:160.
42. Raffensperger J. Max Wilms and his tumor. Journal of pediatric surgery. 2015;50(2):356-9.
43. Ozdemir DD, Hohenstein P. Wt1 in the kidney—a tale in mouse models. Pediatric Nephrology. 2014;29(4):687-93.
44. Nichols KE, Re GG, Yan YX, Garvin AJ, Haber DA. WT1 induces expression of insulin-like growth factor 2 in Wilms' tumor cells. Cancer research. 1995;55(20):4540-3.
45. Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJ, 3rd, Kim SJ. Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 1994;8(5):595-602.
46. Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, Rauscher FJ, 3rd. The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. J Biol Chem. 1992;267(31):21999-2002.
47. Karnieli E, Werner H, Rauscher FJ, 3rd, Benjamin LE, LeRoith D. The IGF-I receptor gene promoter is a molecular target for the Ewing's sarcoma-Wilms' tumor 1 fusion protein. J Biol Chem. 1996;271(32):19304-9.
48. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, et al. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. The EMBO journal. 1995;14(19):4662-75.
49. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. Nature cell biology. 2006;8(5):485-91.
50. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. Annual review of cell and developmental biology. 2005;21:247-69.
51. Ning L, Suleiman HY, Miner JH. Synaptopodin Is Dispensable for Normal Podocyte Homeostasis but Is Protective in the Context of Acute Podocyte Injury. J Am Soc Nephrol. 2020;31(12):2815-32.
52. Yang Y, Gubler MC, Beaufils H. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. Nephron. 2002;91(3):416-23.

53. Veissi S, Smeets B, van den Heuvel LP, Schreuder MF, Jansen J. Nephrotic syndrome in a dish: recent developments in modeling in vitro. Pediatric nephrology (Berlin, Germany). 2019.
54. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;304(4):F333-47.
55. Randles MJ, Collinson S, Starborg T, Mironov A, Krendel M, Konigshausen E, et al. Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury. Sci Rep. 2016;6:35068.
56. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. Annual review of biomedical engineering. 2007;9:121-67.
57. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. Pflugers Arch. 2007;454(3):345-59.
58. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. Am J Physiol Renal Physiol. 2001;281(4):F579-96.
59. Lemley KV, Blouch K, Abdullah I, Boothroyd DB, Bennett PH, Myers BD, et al. Glomerular permselectivity at the onset of nephropathy in type 2 diabetes mellitus. J Am Soc Nephrol. 2000;11(11):2095-105.
60. Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Vidal P, Nørgaard K, Andreasen HB, Feldt-Rasmussen B. Size- and charge selectivity of glomerular filtration in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without albuminuria. Diabetologia. 1993;36(3):244-51.
61. Jeansson M, Granqvist AB, Nyström JS, Haraldsson B. Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice. Diabetologia. 2006;49(9):2200-9.
62. Pall AA, Howie AJ, Adu D, Richards GM, Inward CD, Milford DV, et al. Glomerular vascular cell adhesion molecule-1 expression in renal vasculitis. Journal of clinical pathology. 1996;49(3):238-42.
63. Lu Y, Ye Y, Yang Q, Shi S. Single-cell RNA-sequence analysis of mouse glomerular mesangial cells uncovers mesangial cell essential genes. Kidney Int. 2017;92(2):504-13.
64. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, Baydar DE, Kaymaz F, Buyukcelik M, et al. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. Am J Hum Genet. 2011;89(1):139-47.
65. Brown EJ, Schlondorff JS, Becker DJ, Tsukaguchi H, Tonna SJ, Uscinski AL, et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. Nature genetics. 2010;42(1):72-6.
66. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nurnberg G, et al. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. Nature genetics. 2006;38(12):1397-405.
67. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nature genetics. 2000;24(3):251-6.
68. Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. J Biol Chem. 1994;269(31):19953-62.

69. Kotani T, Murata Y, Ohnishi H, Mori M, Kusakari S, Saito Y, et al. Expression of PTPRO in the interneurons of adult mouse olfactory bulb. The Journal of comparative neurology. 2010;518(2):119-36.
70. Tagawa M, Shirasawa T, Yahagi Y, Tomoda T, Kuroyanagi H, Fujimura S, et al. Identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in postmitotic maturing neurons: its structure and expression in the central nervous system. The Biochemical journal. 1997;321 (Pt 3):865-71.
71. Stepanek L, Stoker AW, Stoeckli E, Bixby JL. Receptor tyrosine phosphatases guide vertebrate motor axons during development. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2005;25(15):3813-23.
72. Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, Wiggins JE, Kershaw DB, Holzman LB, et al. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. The Journal of clinical investigation. 2000;106(10):1281-90.
73. Eva Königshausen EK, Christian Weigel, Philip Schüppler, Catherine Meyer-Schwesinger, Magdalena Woznowski, L. Christian Rump, Lorenz Sellin GLEPP1 deficiency alters GBM composition and extracellular matrix (ECM) deposition in aging mice. . ASN; San Diego2018.
74. Heidet L, Gubler MC. The renal lesions of Alport syndrome. J Am Soc Nephrol. 2009;20(6):1210-5.
75. Kim YH, Goyal M, Wharram B, Wiggins J, Kershaw D, Wiggins R. GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptpro) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. Nephron. 2002;90(4):471-6.
76. Hirakawa M, Tsuruya K, Yotsueda H, Tokumoto M, Ikeda H, Katafuchi R, et al. Expression of synaptopodin and GLEPP1 as markers of steroid responsiveness in primary focal segmental glomerulosclerosis. Life sciences. 2006;79(8):757-63.
77. Williamson DA. Alport's syndrome of hereditary nephritis with deafness. Lancet (London, England). 1961;2(7216):1321-3.
78. Nozu K, Nakanishi K, Abe Y, Udagawa T, Okada S, Okamoto T, et al. A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome. Clin Exp Nephrol. 2019;23(2):158-68.
79. Hertz JM. Alport syndrome. Molecular genetic aspects. Danish medical bulletin. 2009;56(3):105-52.
80. Funk SD, Lin MH, Miner JH. Alport syndrome and Pierson syndrome: Diseases of the glomerular basement membrane. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2018;71-72:250-61.
81. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. Microscopy research and technique. 2008;71(5):357-70.
82. Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2013;24(3):364-75.
83. Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tönshoff B, et al. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. Kidney Int. 2012;81(5):494-501.
84. Kashtan CE. Renal transplantation in patients with Alport syndrome: patient selection, outcomes, and donor evaluation. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2018;11:267-70.
85. Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Müntefering H, Fenski R, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial

sclerosis and distinct eye abnormalities. Human molecular genetics. 2004;13(21):2625-32.
86. Matejas V, Hinkes B, Alkandari F, Al-Gazali L, Annexstad E, Aytac MB, et al. Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. Hum Mutat. 2010;31(9):992-1002.
87. Jarad G, Cunningham J, Shaw AS, Miner JH. Proteinuria precedes podocyte abnormalities inLamb2-/- mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. The Journal of clinical investigation. 2006;116(8):2272-9.
88. Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, et al. Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. Developmental biology. 2008;316(2):288-301.
89. Chen YM, Zhou Y, Go G, Marmerstein JT, Kikkawa Y, Miner JH. Laminin β2 gene missense mutation produces endoplasmic reticulum stress in podocytes. J Am Soc Nephrol. 2013;24(8):1223-33.
90. Guler S, Cimen S, Acott P, Whelan K, Molinari M. Kidney transplantation in a child with Pierson syndrome. Pediatric transplantation. 2017;21(8).
91. Naylor RW, Morais M, Lennon R. Complexities of the glomerular basement membrane. Nature reviews Nephrology. 2020.
92. McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2017;12(7):1162-72.
93. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. The Journal of clinical investigation. 2015;125(1):141-56.
94. Daga S, Donati F, Capitani K, Croci S, Tita R, Giliberti A, et al. New frontiers to cure Alport syndrome: COL4A3 and COL4A5 gene editing in podocyte-lineage cells. European journal of human genetics : EJHG. 2020;28(4):480-90.
95. McKee KK, Aleksandrova M, Yurchenco PD. Chimeric protein identification of dystrophic, Pierson and other laminin polymerization residues. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2018;67:32-46.
96. Yurchenco PD, Quan Y, Colognato H, Mathus T, Harrison D, Yamada Y, et al. The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(19):10189-94.
97. Lin MH, Miller JB, Kikkawa Y, Suleiman HY, Tryggvason K, Hodges BL, et al. Laminin-521 Protein Therapy for Glomerular Basement Membrane and Podocyte Abnormalities in a Model of Pierson Syndrome. J Am Soc Nephrol. 2018;29(5):1426-36.
98. Potthoff SA, Sitek B, Stegbauer J, Schulenborg T, Marcus K, Quack I, et al. The glomerular proteome in a model of chronic kidney disease. Proteomics Clinical applications. 2008;2(7-8):1127-39.
99. Konigshausen E, Potthoff SA, Haase R, Meyer-Schwesinger C, Kaufmann E, Rump LC, et al. Isolation of Glomeruli and In Vivo Labeling of Glomerular Cell Surface Proteins. J Vis Exp. 2019(143).
100. Byron A, Randles MJ, Humphries JD, Mironov A, Hamidi H, Harris S, et al. Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. J Am Soc Nephrol. 2014;25(5):953-66.

101. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif). 2001;25(4):402-8.
102. Varamo C, Peraldo-Neia C, Ostano P, Basiricò M, Raggi C, Bernabei P, et al. Establishment and Characterization of a New Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cell Line Resistant to Gemcitabine. Cancers. 2019;11(4).
103. Sanders K, de Wit WL, Mol JA, Kurlbaum M, Kendl S, Kroiss M, et al. Abiraterone Acetate for Cushing Syndrome: Study in a Canine Primary Adrenocortical Cell Culture Model. Endocrinology. 2018;159(11):3689-98.
104. Schwarzbauer JE, DeSimone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(7).
105. Kubow KE, Vukmirovic R, Zhe L, Klotzsch E, Smith ML, Gourdon D, et al. Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. Nature communications. 2015;6:8026.
106. Kliewe F, Kaling S, Lötzsch H, Artelt N, Schindler M, Rogge H, et al. Fibronectin is up-regulated in podocytes by mechanical stress. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2019;33(12):14450-60.
107. Wilson HM, Stewart KN. Glomerular epithelial and mesangial cell culture and characterization. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2012;806:187-201.
108. Dylewski JF, Wilson N, Lu S, Jat P, Weiser-Evans M, Panzer SE, et al. Isolation, purification, and conditional immortalization of murine glomerular endothelial cells of microvascular phenotype. MethodsX. 2020;7:101048.
109. Sarrab RM, Lennon R, Ni L, Wherlock MD, Welsh GI, Saleem MA. Establishment of conditionally immortalized human glomerular mesangial cells in culture, with unique migratory properties. Am J Physiol Renal Physiol. 2011;301(5):F1131-8.
110. Schell C, Huber TB. The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. J Am Soc Nephrol. 2017;28(11):3166-74.
111. Chittiprol S, Chen P, Petrovic-Djergovic D, Eichler T, Ransom RF. Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes. Am J Physiol Renal Physiol. 2011;301(3):F660-71.
112. Yaoita E, Yoshida Y, Nameta M, Takimoto H, Fujinaka H. Induction of interdigitating cell processes in podocyte culture. Kidney Int. 2018;93(2):519-24.
113. Schlöndorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. J Am Soc Nephrol. 2009;20(6):1179-87.
114. Foidart JB, Dechenne CA, Mahieu P, Creutz CE, de Mey J. Tissue culture of normal rat glomeruli. Isolation and morphological characterization of two homogeneous cell lines. Investigative & cell pathology. 1979;2(1):15-26.
115. Basgen JM, Nicholas SB, Mauer M, Rozen S, Nyengaard JR. Comparison of methods for counting cells in the mouse glomerulus. Nephron Experimental nephrology. 2006;103(4):e139-48.
116. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. The American journal of pathology. 2002;161(3):799-805.
117. Heidet L, Cai Y, Guicharnaud L, Antignac C, Gubler MC. Glomerular expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport syndrome kidneys. The American journal of pathology. 2000;156(6):1901-10.

118. Zhang L, Zhou F, Yu X, Zhu Y, Zhou Y, Liu J, et al. C/EBPα deficiency in podocytes aggravates podocyte senescence and kidney injury in aging mice. Cell death & disease. 2019;10(10):684.
119. Liu X, Fan Q, Yang G, Wang L. Proteomic profiling of aging in glomeruli of mice by using two-dimensional differential gel electrophoresis. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research. 2015;21:419-25.
120. Nagata T. Electron microscopic radioautographic study on protein synthesis in mitochondria of binucleate hepatocytes of aging mice. TheScientificWorldJournal. 2007;7:1008-23.
121. Bouzid MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. Sports medicine (Auckland, NZ). 2015;45(9):1245-61.
122. Raats CJ, Van Den Born J, Berden JH. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. Kidney Int. 2000;57(2):385-400.
123. Pessina A, Albella B, Bayo M, Bueren J, Brantom P, Casati S, et al. Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2003;75(2):355-67.

6 Danksagungen

Die folgende Arbeit hätte ohne die Unterstützung zahlreicher Personen nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lorenz Sellin für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit unter seiner freundlichen Leitung anfertigen zu dürfen. Dank dieser Möglichkeit wurde mein Interesse an der weiteren Arbeit in der Forschung erst geweckt.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau Dr. med. Eva Königshausen. Ohne Ihre außerordentliche Geduld und Ihre ständige Hilfsbereitschaft trotz maximaler Auslastung hätte ich diese Arbeit nicht fertiggestellt. Ihr Engagement und ihre fachlichen Hinweise und Korrekturen haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinem Co-Betreuer PD Dr. med. Rüdiger Sorg für die Betreuung.

Für die exzellente Einarbeitung und Geduld während dieser möchte ich besonders Frau Blanka Duvnjak danken. Auch Frau Nicola Kuhr und Frau Christina Schwandt gilt für die Hilfe bei komplizierten Versuchen und der sonstigen Unterstützung mein Dank.

Dem gesamten Laborteam möchte ich für das stets freundliche Arbeitsklima und die gute Stimmung im Labor danken.

Meiner Laborpartnerin Frau Susanne Grote möchte ich für das immer freundschaftliche Miteinander im Labor danken. Ohne ihren motivierenden Charakter wäre mir die Labor-Zeit deutlich schwerer gefallen.

Für die umfassende Unterstützung im privaten Bereich möchte ich auch meinen Freunden, allen voran Alexander Zorin danken.

Der größte Dank gilt schließlich meiner Familie. Ohne die Hilfe meiner Eltern und meines Bruders wären mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihre grenzenlose Unterstützung hat mich auch in schweren Zeiten stets motiviert, weiterzumachen und den richtigen Weg einzuschlagen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.