

Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Stahl

Die Rolle der Ubiquitin- C- terminalen Hydrolase L1 in der membranösen Glomerulonephritis der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Silvia Münster
geb. in Hamburg
Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuß, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuß, 3. Gutachter/in:

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
I. Einleitung	6
1.1. Der Podozyt	6
1.2. Die membranöse Glomerulonephritis	10
1.3. Die Ubiquitin- C- terminale Hydrolase L1 (UCH- L1)	13
II. Arbeitshypothese und Fragestellung	16
III. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.2. Methoden	25
3.2.1. Die passive Heymann- Nephritis	25
3.2.1.1. Fx1A- Antigen- Isolation und Schafimmunisierung	25
3.2.1.2. Testen des Fx1A- Serums durch Westernblotanalyse	26
3.2.1.3. Induktion der pHN und Betreuung der Tierstaffel	26
3.2.1.4. Tötung der Versuchstiere und Organentnahme	27
3.2.1.5. Glomeruliisolation	28
3.2.2. Proteinbiochemie	28
3.2.2.1. Proteinextraktion aus Podozyten und Gewebe	28
3.2.2.2. Eindimensionale SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese	29
3.2.2.3. Färbung von Proteingelen	29
3.2.2.4. Westernblot	29
3.2.2.5. Immundetektion der geblotteten Proteine	30
3.2.2.6. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	30
3.2.3. Immunhistochemie (IHC)	31
3.2.3.1. Streptavidin- Biotin- Methode	31
3.2.3.2. TSA (Tyramide Signal Amplification)	32
3.2.3.3. Neufuchsin- Entwicklungslösung	32
3.2.3.4. Hämalaun- Kernfärbung nach Böhmer	32
3.2.3.5. Probenvorbereitung	32
3.2.3.6. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	33
3.2.3.7. UCH- L1- Immunhistochemie	33
3.2.3.8. Ubiquitin- Immunhistochemie	33
3.2.3.9. PAS- Färbung	34
3.2.4. Fluoreszenzfärbungen	34
3.2.4.1. Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten	35
3.2.4.2. Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten	35
3.2.4.3. Nephrin- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten	35
3.2.4.4. α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten	36
3.2.4.5. Phalloidin- Färbung an Kulturpodozyten	36
3.2.4.6. Immunfluoreszenzfärbungen an Kulturpodozyten	37

3.2.4.7. DAPI- Kernfärbung.....	37
3.2.4.8. Auswertung der Fluoreszenzfärbungen.....	37
3.2.5. Zellkultur.....	37
3.2.5.1. Kultivierung von immortalisierten Podozyten.....	38
3.2.5.2. Aussäen von Podozyten auf Deckgläschen.....	38
3.2.5.3. Fixierung von Podozyten auf Deckgläschen.....	39
3.2.5.4. Zellzahlbestimmung in der Neubauer- Kammer.....	39
3.2.5.5. Passagieren der Zellen.....	39
3.2.5.6. Auftauen gefrierkonservierter Podozyten.....	39
3.2.6. Zellkulturexperimente.....	40
3.2.6.1. Differenzierungsexperiment.....	40
3.2.6.2. ECM- Experiment.....	40
3.2.6.3. Inkubation von Podozyten mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444.....	40
3.2.7. Transfektion von Podozyten.....	41
3.2.7.1. GFP (green fluorescent protein).....	41
3.2.7.2. Transfektion von immortalisierten Podozyten mit EGFP und EGFP- UCH- L1.....	42
3.2.8. Molekularbiologie.....	42
3.2.8.1. Isolierung von RNA aus Zellen.....	42
3.2.8.2. Bestimmung der RNA- Konzentration durch Spektrophotometrie.....	43
3.2.8.3. RT- PCR (Reverse Transkriptase- PCR).....	44
3.2.8.3.1. cDNA- Herstellung durch reverse Transkription.....	44
3.2.8.3.2. Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR).....	44
3.2.8.4. Auftrennung der PCR- Amplifikationsprodukte im Agarose- Gel und Dokumentation.....	45
3.2.8.5. Quantitative PCR UCH- L1.....	46
3.2.8.6. Klonierung.....	46
3.2.8.6.1. Restriktionsverdau des EGFP- UCH- L1- Vektors.....	47
3.2.8.6.2. Elution des UCH- L1- Fragmentes.....	48
3.2.8.6.3. Restriktionsverdau des pMSCV- Vektors.....	48
3.2.8.6.4. Ligation von pMSCV und UCH- L1- Insert.....	48
3.2.8.6.5. Plasmidpräparation (Miniprep).....	49
3.2.8.6.6. Diagnostische Verdaus.....	50
3.2.8.6.7. Sequenzierung von pMSCV- UCH- L1.....	50
3.2.9. Bakterienkultur.....	
3.2.9.1. Transformation von chemisch kompetenten E.- coli- Bakterien.....	50
3.2.9.2. Bakterien- Übernachtkultur.....	51
3.2.9.3. Längerfristige Lagerung der Bakterien.....	51
3.2.9.4. Plasmidpräparation (Midiprep).....	51
3.2.9.5. Messung der DNA- Konzentration.....	52

3.2.10. Statistik	53
IV. Ergebnisse	53
4.1. Die passive Heymann Nephritis	53
4.1.1. Westernblotanalyse des Fx1A- Serums	53
4.1.2. Klinik der passiven Heymann- Nephritis	54
4.1.2.1. Körper- und Nierengewicht von pHN- und Kontrolltieren	54
4.1.2.2. Serum- Harnstoff und Serum- Kreatinin	55
4.1.2.3. Proteinurieverlauf in der passiven Heymann- Nephritis	55
4.1.3. Expression der UCH- L1 im Zeitverlauf	56
4.1.3.1. UCH- L1- Immunhistochemie	56
4.1.3.2. Quantitative PCR UCH- L1	57
4.1.3.3. UCH- L1- Westernblot	58
4.1.4. PAS- Färbung	59
4.1.5. Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung	60
4.1.6. Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung	61
4.1.7. Ubiquitin im Zeitverlauf	62
4.1.7.1. Ubiquitin- Immunhistochemie	62
4.1.7.2. Monoubiquitin- Westernblot	63
4.1.8. Expression und Lokalisation von Nephrin in der passiven Heymann- Nephritis	64
4.1.8.1. Nephrin- Immunfluoreszenzfärbung	64
4.1.8.2. Nephrin- Westernblot	65
4.1.9. Expression und Lokalisation von α - Aktinin- 4 in der passiven Heymann- Nephritis	66
4.1.9.1. α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung	66
4.1.9.2. α - Aktinin- 4- Westernblot	66
4.1.10. Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität in der passiven Heymann- Nephritis	67
4.1.10.1. Einfluß der UCH- L1- Hemmung auf die Proteinurie in der passiven Heymann- Nephritis	67
4.1.10.2. UCH- L1- Immunhistochemie nach UCH- L1- Hemmung	68
4.1.10.3. Nephrin- Immunfluoreszenzfärbung nach UCH- L1- Hemmung	69
4.1.10.4. α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung nach UCH- L1- Hemmung	70
4.1.11. Die Hemmung des Proteasoms in der passiven Heymann- Nephritis durch MG 132	71
4.1.11.1. UCH- L1- Immunhistochemie nach Proteasomhemmung	71
4.2. Zellkultur	72
4.2.1. Differenzierung immortalisierter Podozyten unter nicht- permissiven Bedingungen	72
4.2.1.1. Nachweis der Differenzierungsmarker Synaptopodin und Nephrin sowie des podozytenspezifischen α - Aktinin- 4	73

4.2.1.2. Inverse Korrelation von UCH- L1- Expression und Differenzierungsstatus	74
4.2.2. ECM- Experiment	76
4.2.2.1. Annahme eines arborisierten Phänotyps	76
4.2.2.2. Inverse Korrelation von UCH- L1- Expression und Zellfortsatzbildung	76
4.2.3. Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität durch LDN 57444 in vitro	78
4.2.3.1. Einfluß der UCH- L1- Hemmung auf die Zellfortsatzbildung	79
4.2.3.2. Auswirkungen der UCH- L1- Inhibition auf die Podozytenproteine β - Catenin, Podocin und α - Aktinin- 4	79
4.2.3.3. Immunfluoreszenzfärbung von β - Catenin und α - Aktinin- 4 nach UCH- L1- Hemmung in vitro	81
4.3. Klonierung und Transfektion	82
4.3.1. Restriktionsverdaus von EGFP- UCH- L1 und pMSCV	83
4.3.2. Transiente Transfektion von Kulturpodozyten mit EGFP- UCH- L1 durch Elektroporation	84
4.3.3. Sequenzierung des pMSCV- UCH- L1- Vektors	85
V. Diskussion	86
VI. Zusammenfassung	100
Literaturverzeichnis	102
Lebenslauf	110
Eidesstattliche Erklärung	113
Danksagung	114

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin- Biotin- Komplex
AP	Alkalische Phosphatase
β - ME	β - Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CKD	chronische Nierenerkrankung
CNF	Kongenitales nephrotisches Syndrom vom Finnischen Typ
CVF	Kobra Venom Faktor
D	Dalton

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DAPI	Diamidino- Phenylindoldihydrochlorid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EK	Endkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung, Ortsfaktor
GAD	Grazile axonale Dystrophie
GITC	Guanidinisothiocyanat
GBM	glomeruläre Basalmembran
Ig	Immunglobulin
k	kilo ($\times 10^3$)
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Ko	Kontrolle, Kontrolltier
l	Liter
LDS	Lithiumdodecylsulfat
m	milli ($\times 10^{-3}$)
M	Molarität
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MAC	Membrane attack complex
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MN	Membranöse Glomerulonephritis
MMP	Magermilchpulver
M- MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MSCV	Muriner Stammzellvirus
NEP	Neutrale Endopeptidase
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAS	Periodic Acid Schiff stain
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAP	Receptor associated antigen
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TMB	Tetramethylbenzidin
tRNA	transfer RNA
TSA	Tyramide Signal Amplification
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UBP	Ubiquitin- spezifische Protease
UCH	Ubiquitin- Carboxy- terminale Hydrolase
UNIX	Uninephrektomie
UPS	Ubiquitin- Proteasom- System

I. Einleitung

1.1. Der Podozyt

Eine der Hauptfunktionen der Niere ist die Ultrafiltration von Blutplasma und die Ausscheidung von niedermolekularen Stoffwechselprodukten über den Urin bei gleichzeitigem Rückhalt von Albumin und größeren Eiweißen. Der Glomerulus der Niere bildet die Funktionseinheit zur Ultrafiltration des Plasmas und zur Bildung des Primärharns. Er besteht aus einem von der Bowmannschen Kapsel umschlossenen Kapillarkonvolut, aus dem der Primärharn in den Bowmannschen Kapselraum abgepresst und weiter an das Tubulussystem geleitet wird. Jeden Tag werden von den etwa 2,5 Millionen renalen Glomeruli etwa 180 l Primärurin gebildet (29). Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus drei Schichten: aus dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillare, aus der Basalmembran (GBM), bestehend aus vernetzten Kollagenfibrillen, und aus den harnseitig der Kapillare aufliegenden glomerulären Epithelzellen, den Podozyten. Das glomeruläre Filtrat durchquert zunächst das fenestrierte Endothel, dann die GBM mit ihrer ladungsspezifischen Filterfunktion und anschließend die Schlitzmembran, deren Filtrationsqualität größenspezifisch ist. Podozyten sind hochspezialisierte, terminal differenzierte Epithelzellen (131). Sie besitzen einen voluminösen Zellleib, der in den Bowmannschen Kapselraum ragt und lange Primärfortsätze entsendet. Diese zweigen sich in zahlreiche Sekundärfortsätze (Fußfortsätze) auf, die den glomerulären Kapillaren harnseitig anhaften (100). Die Fußfortsätze benachbarter Podozyten bilden ein interdigitierendes Muster und belassen interzellulär 40 nm breite Filtrationsschlitze frei, die von der extrazellulären Schlitzmembran überspannt werden. Diese unterteilt den Podozyten in eine apikale, eine basale und eine Schlitzmembrandomäne (49). Die apikale Podozytenmembran und die

Schlitzmembran sind von einer dicken Glykokalix bedeckt, die reich ist an Sialoglykoproteinen wie Podocalyxin und Podoendin (98, 53). Die Glykokalix bewirkt die negative Oberflächenladung des Podozyten (5). Podozyten stabilisieren die glomeruläre Struktur, indem sie den extensiven hydrostatischen Kräften, die auf die glomeruläre Kapillarwand einwirken, entgegenwirken (69). Zudem synthetisieren Podozyten Bestandteile der GBM (92) und tragen durch Pinozytose zur Absorption filtrierter Proteine bei (40). Die einzigartige Morphologie des Podozyten beruht auf dessen komplizierter Organisation des Zytoskeletts. Im Zelleib und den Primärfortsätzen dominieren Mikrotubuli und Intermediärfilamente wie Vimentin und Desmin, während die Fußfortsätze über ein dichtes Netz von Aktinfilamenten verfügen (100). Sie sind Teil eines kontraktile Apparats aus Aktin, Myosin II, α -Aktinin-4, Talin und Vinculin und spielen eine zentrale Rolle in der Podozytenarchitektur (131). Die Aktinfilamente der Podozytenfußfortsätze sind an Fokalkontakten in der glomerulären Basalmembran (GBM) durch $\alpha_3\beta_1$ -Integrine (1, 66) und α - und β -Dystroglykane (109) verankert. Die GBM besteht aus einem Netzwerk von Kollagen IV, Laminin, Proteoglykanen und anderen Matrixkomponenten (85). Benachbarte Fußfortsätze sind durch die Schlitzmembran verbunden, welche eine besondere Form von Zell-Zell-Kontakt darstellt und als modifizierte Adherens junction verstanden wird (110). Sie bildet die Grundlage der Größenselektivität des glomerulären Filters (138, 148, 23).

Die Schlitzmembran wurde 1974 von Rodewald und Karnovsky auf der Grundlage von elektronenmikroskopischen Studien als Reißverschlußartige Struktur beschrieben (111). Sie wird durch einen extrazellulär gelegenen Komplex verschiedener Proteine gebildet, von denen einige unabdingbar für die Integrität der Filtrationsbarriere sind. In den letzten Jahren wurden die Kenntnisse der molekularen Struktur der Schlitzmembran deutlich verbessert. Verschiedene schlitzmembranassoziierte Proteine wie Nephrin, Podocin, ZO-1, CD2AP, FAT und P-Cadherin wurden bisher identifiziert. Ein Durchbruch im Verständnis der Podozytenbiologie gelang der Arbeitsgruppe um Tryggvason im Jahre 1998 mit der Identifikation des Nephrin-Gens NPHS1 durch Positionsklonierung (57). Damit wurde der genetische Defekt, der dem „Kongenitalen Nephrotischen Syndrom vom Finnischen Typ“ (CNF) zugrunde liegt, aufgedeckt. Bei dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung tritt bereits in utero eine massive Proteinurie des betroffenen Kindes auf. Nephrin ist ein transmembranäres 185 kD-Protein und gehört aufgrund seiner extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen zur Ig-Superfamilie (39, 38, 117). Als weitere Mitglieder der Ig-Superfamilie wurden die mit dem Nephrin strukturverwandten Nephrin

Transmembranproteine identifiziert: Neph 1, Neph 2 und Neph 3. Die Neph- Proteine besitzen eine kurze extrazelluläre Domäne mit 5 IgG- Domänen. Neph 1 und Neph 2 sind an der Schlitzmembran lokalisiert; Neph 1 bildet Heterodimere mit Nephrin oder Homodimere mit weiteren Neph 1- Proteinen (6). Neph 1- defiziente Mäuse leiden unter mit einem Verschmelzen der Fußfortsätze assoziierter Proteinurie und versterben perinatal. Alle Nephrin- ähnlichen Proteine können über ihre zytoplasmatische Komponente mit Podocin interagieren (81). Podocin ist ein Mitglied der Stomatin- Familie von haarnadelähnlichen Membranproteinen mit intrazellulären N- und C- Termini. Für Podocin codiert NPHS2, welches in dem autosomal- rezessiv vererbten, steroidresistenten nephrotischen Syndrom mutiert ist (9). Podocin ist an der Insertionsstelle der Schlitzmembran in Lipid Rafts lokalisiert und interagiert über seinen C- Terminus mit CD2AP und der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin (128), Neph 1 und Neph 2. Podocin- defiziente Mäuse entwickeln bereits in utero eine Proteinurie mit Fußfortsatzeffacement und verminderter Nephrin- Expression (116). An der intrazellulären Insertionsstelle der Schlitzmembran wurde das Adapterprotein CD2AP nachgewiesen. CD2AP interagiert über sein C- terminales Ende mit Nephrin und besitzt zudem die Fähigkeit, mit dem Aktinzytoskelett zu assoziieren (75, 133). CD2AP- defiziente Mäuse versterben 6 Wochen postnatal an massiver Proteinurie, was auf eine zentrale Rolle von CD2AP in der Funktion der Schlitzmembran hindeutet (134). Das Adhäsionsprotein P- Cadherin ist mit seiner extrazellulären Komponente grundlegend an der Formierung der Schlitzmembran beteiligt. Die intrazelluläre Domäne des P- Cadherin ist mit β - Catenin und μ - Catenin assoziiert. Die Verbindung dieses Komplexes mit dem Aktin- Zytoskelett erfolgt durch α - Catenin über α - Aktinin- 4 oder ZO- 1 (110). Diese Organisation entspricht der typischen Struktur einer Adherens Junction, so daß die Schlitzmembran als modifizierte Adherens Junction verstanden wird (110). P- Cadherin- defiziente Mäuse und Menschen mit einer Mutation im P- Cadherin- Gen zeigen keinen renalen Phänotyp, so daß von einer rein strukturellen Funktion des P- Cadherins ohne Beteiligung an der glomerulären Filtration ausgegangen wird (37). Ein weiteres Mitglied der Cadherin- Superfamilie von Adhäsionsproteinen ist FAT1, das Schlitzmembran- assoziiert mit Nephrin und ZO- 1 co- lokalisiert (42). FAT1- defiziente Mäuse werden ohne Schlitzmembran geboren und versterben innerhalb von 48 h postnatal (14). Es wird vermutet, daß FAT1 eine Rolle in der interzellulären Adhäsion spielt und die Filtrationsschlitze stabilisiert. Die Schlitzmembran ist über CD2AP und ZO- 1 mit dem Aktinzytoskelett der Fußfortsätze verbunden. In den Fußfortsätzen wurden die Aktin-

bindenden Proteine α -Aktinin-4 und Synaptopodin nachgewiesen. α -Aktinin-4 ist ein Aktinfilament-verknüpfendes Protein und kann mit den Komponenten des Integrinkomplexes an der GBM und dem α -Catenin des Schlitzmembrankomplexes interagieren (96). Eine Induktion von α -Aktinin-4 geht dem Fußfortsatzeffacement im experimentellen nephrotischen Syndrom voraus (139). Mutationen im α -Aktinin-4 codierenden ACTN4-Gen wurden in einer autosomal-dominanten Form von FSGS nachgewiesen (47). α -Aktinin-4 defiziente Mäuse entwickeln eine progressive Proteinurie und FSGS (63). Das von Mundel et al. entdeckte Synaptopodin stellt ein weiteres Aktin-bindendes Protein dar (89). Synaptopodin interagiert direkt mit α -Aktinin-4 und moduliert dessen Expression (131). Es wird eine zentrale Rolle von Synaptopodin und α -Aktinin-4 in der Aufrechterhaltung der Podozytenmorphologie über eine Regulation des Zytoskeletts vermutet.

Die Schlitzmembran besitzt nicht nur rein statische Filterfunktionen sondern trägt über zahlreiche Signaltransduktionsmechanismen maßgeblich zur Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse bei (40, 81). An den intrazellulären Domänen von Nephlin und Neph1 wurden Tyrosinreste nachgewiesen, die über Phosphorylierungen als Ausgangspunkt für viele Signaltransduktionswege dienen (8).

Aufgrund der zentralen Rolle des Podozyten in der Aufrechterhaltung einer funktionalen glomerulären Filtrationsbarriere ist eine podozytäre Schädigung häufig mit einer Proteinurie assoziiert. Es wurden vier Hauptursachen für eine schädigungsbedingte Reaktion des Podozyten mit Proteinurie und Fußfortsatzeffacement identifiziert: 1. Beeinträchtigungen der Schlitzmembran oder deren Liquid Rafts, 2. Beeinträchtigungen der GBM oder der Podozytenadhäsion, 3. Beeinträchtigungen des Aktin-Zytoskeletts oder assoziierter Proteine und 4. Beeinträchtigungen der apikalen Podozytenmembran mit Neutralisierung deren negativer Ladungseigenschaft (5, 88, 4). Viele genetisch bedingte und erworbene renale Erkrankungen führen zu einem Integritätsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere und gehen mit dem Verlust großer Plasmaproteine wie Albumin und Immunglobulinen über den Urin einher. Eine progrediente Proteinurie kann einer terminalen Niereninsuffizienz vorausgehen, deren einzige Behandlungsoption in der Nierenersatztherapie besteht.

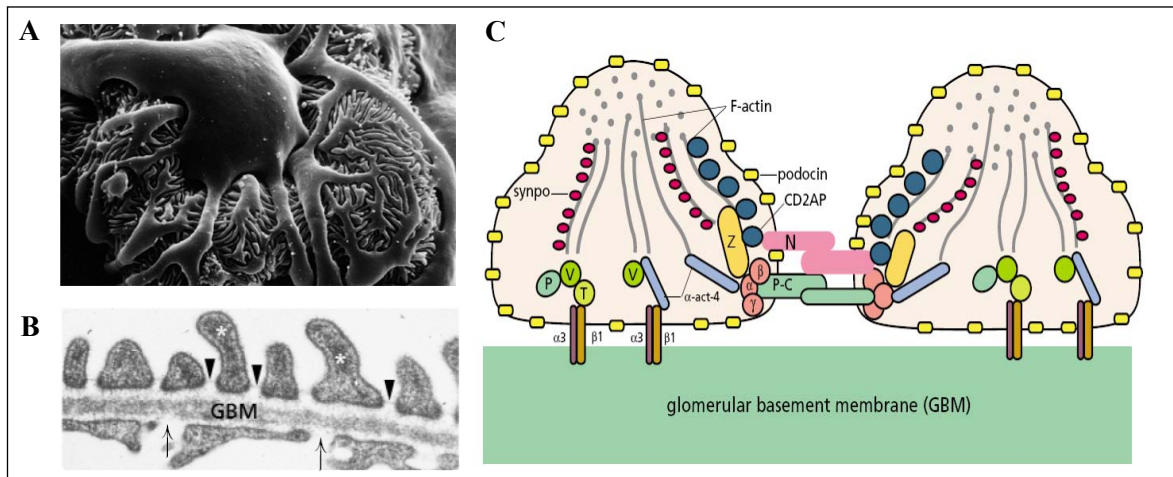


Abb. 1: Podozytenmorphologie und Schlitzmembranproteine. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozyten in situ; der Zellkörper wölbt sich in den Bowmanschen Kapselraum vor und entsendet Primärfortsätze, die mit ihren Fußfortsätzen an der Kapillarwand anhaften. (Vergrößerung: 5300x, Quelle: 62) (B) Ultrastruktur der glomerulären Kapillarwand; die Filtrationsbarriere besteht aus dem fenestrierten Endothel (Pfeile), der GBM und den Podozytenfußfortsätzen (Asteriske) mit der die Filtrationsschlitz überbrückenden Schlitzmembran (Pfeilköpfe) (Quelle: 138) (C) Schematische Darstellung der Schlitzmembran und ihrer Komponenten; der Podozytenfußfortsatz enthält einen kontraktilem Apparat aus Aktin, Myosin II, α -Aktinin-4, Talin, Vinculin und Synaptopodin. Das Zytoskelett ist in der glomerulären Basalmembran durch $\alpha_3\beta_1$ -Integrine verankert und mit den Schlitzmembranproteinen Nephrin und P-Cadherin über CD2AP, ZO-1 und Catenine verbunden. N, Nephrin; P-C, P-Cadherin; α , α -Catenin; β , β -Catenin; γ , γ -Catenin; Z, ZO-1; α_3 , α_3 -Integrin; β_1 , β_1 -Integrin; V, Vinculin; T, Talin; P, Paxilin; α -act-4, α -Aktinin-4; Synpo, Synaptopodin (Quelle: 138)

1.2. Die membranöse Glomerulonephritis

Die membranöse Glomerulonephritis (MN) ist mit einem Anteil von 20 % der Fälle eine der häufigsten Ursachen des nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter. Obwohl eine spontane Remission in bis zu einem Drittel der Fälle auftritt, endet die MN bei bis zu 40 % der Patienten innerhalb von 10 Jahren in einer terminalen Niereninsuffizienz (151). In den westlichen Industrieländern werden 80 % der Erkrankungen als idiopathisch angesehen (114). In 20 % der Fälle tritt die Erkrankung sekundär als Folge von Infektionskrankheiten wie Hepatitis B, einem Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen wie Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) und als Folge von Malignomen auf (151, 104). NSAR, Goldsalze, Penicillamine und Captopril sind die häufigsten Pharmaka, die mit dem Auftreten einer MN assoziiert sind (104). Die MN ist charakterisiert durch die Akkumulation von Immundepots in der Lamina rara externa der glomerulären Basalmembran (GBM), welche aufgrund dieser Ablagerungen verbreitert erscheint. Die

Immundepots beinhalten IgG (zumeist IgG4 (41, 94)), den Membrane Attack Complex (MAC) aus Komplementfaktoren C5b-9 und weitgehend unidentifizierte Antigene. Zusätzlich zu der Akkumulation von Immundepots in der GBM kommt es in der membranösen Glomerulonephritis zu einem Effacement der podozytären Fußfortsätze. Die Pathogenese der Immundepotentstehung in der MN ist weitestgehend ungeklärt. Ein theoretischer Ansatz geht von der subepithelialen Ablagerung systemisch zirkulierender Immunkomplexe aufgrund deren Ladungs- und Größeneigenschaften aus (113). In Formen sekundärer MN konnten zirkulierende Immunkomplexe nachgewiesen werden, während in der idiopathischen MN solche nur in geringem Maße beobachtet wurden. Der Nachweis, daß zirkulierende und subepithelial abgelagerte Immunkomplexe identisch sind, konnte bisher nicht erbracht werden (104). Ein zweiter theoretischer Ansatz geht davon aus, daß in der Pathogenese der MN zunächst eine subepitheliale Ablagerung zirkulierender Fremdantigene stattfindet. Die subepithelial akkumulierenden Antigene provozierten eine Immunreaktion mit resultierender Immunkomplexformierung in situ. Tatsächlich konnten bei einigen Formen der sekundären MN in den Immundepots exogene Antigene wie Hepatitis B- oder Tumorantigene nachgewiesen werden, ein Beweis für deren Beteiligung an der Pathogenese der MN konnte jedoch nicht erbracht werden (115). Nach einem dritten theoretischen Ansatz kommt es im Zuge einer Autoimmunreaktion zur Bildung von Antikörpern gegen endogene Bestandteile der Kapillarwand, insbesondere gegen Bestandteile der Podozytenmembran (113). In der Praxis konnte in mehreren Formen der MN eine solche In situ- Formierung von Immunkomplexen nachgewiesen werden. So wurde in einer Untergruppe von Kindern mit antenataler MN die Neutrale Endopeptidase (NEP) als das erste humane Zielprotein nephritogener Antikörper nachgewiesen. Während der Schwangerschaft kam es bei Müttern, die aufgrund einer trunkierenden Mutation eine NEP- Defizienz aufwiesen, zu einer Immunisierung gegen die NEP des Kindes, die vom Synzytiotrophoblasten exprimiert wurde (115). Die maternalen NEP- Antikörper durchquerten die Plazenta und verursachten beim Kind eine MN bereits in utero (18). Beck et al. gelang der Nachweis von Antikörpern gegen ein Epitop des Phospholipase A₂- Rezeptors (PLA₂R) in Seren an idiopathischer membranöser Glomerulonephritis erkrankter Patienten (7). PLA₂R wurde in humanen Podozyten sowie in glomerulär akkumulierten Immundepots in Patienten mit membranöser Glomerulonephritis nachgewiesen, so daß der PLA₂R als ein weiteres identifiziertes Antigen der idiopathischen membranösen Glomerulonephritis angesehen werden kann.

Ein Großteil des heutigen Wissens über die Pathogenese der humanen membranösen

Glomerulonephritis wurde aus den Heymann- Nephritis- Modellen der experimentellen Glomerulonephritis der Ratte gewonnen, welche große morphologische und funktionale Ähnlichkeiten mit der humanen MN aufweisen. Die Heymann- Nephritis wurde erstmals 1959 von Heymann et al. beschrieben (33). In dem aktiven Modell der Heymann- Nephritis wird die glomeruläre Schädigung durch Immunisierung der Ratte mit einer Suspension aus Freundschem Adjuvant und isoliertem Bürstensaum proximaler Tubulusepithelzellen induziert (120). In dem passiven Modell der Heymann- Nephritis erfolgt die Schädigung durch Applikation eines in einer anderen Spezies präformierten Antikörpers gegen Bestandteile des Bürstensaumes proximaler Tubuluszellen (120). Als Zielantigen der Immundepot- formierenden Antikörper wurde 1982 ein 550- kD- Protein identifiziert (gp330), das sowohl in Podozyten als auch in Epithelien des proximalen Tubulus exprimiert wird (56, 55). Heute ist das gp330 aufgrund seiner Größe als Megalin bekannt. Megalin ist ein Mitglied der LDL- Rezeptor- Genfamilie und fungiert als ein Multiligandenrezeptor für die Aufnahme verschiedenster Makromoleküle. In der Ratte wird Megalin in Clathrin- coated Pits exprimiert, die auf der basalen Seite der Podozytenfußfortsätze lokalisiert liegen. An diesen findet die initiale Bildung von Immunkomplexen statt (54, 52). In der Heymann- Nephritis durchqueren die zirkulierenden Anti- Megalin- Antikörper die GBM und binden an spezifischen Epitopen des Megalins. Die so in situ formierten Immunkomplexe lösen sich aus der Podozytenmembran und akkumulieren in der Lamina rara externa der GBM. Podozyten sind normalerweise in der Lage, Filtrationsrückstände, die in der GBM akkumulieren, per Endozytose aufzunehmen und lysosomal abzubauen (52). Die im Rahmen der Heymann- Nephritis akkumulierenden Immundepots sind jedoch so in der GBM vernetzt, daß der Podozyt nicht in der Lage ist, diese zu phagozytieren.

1990 konnte ein 44 kD großes, Megalin- gebundenes zweites Zielantigen identifiziert werden, das heute als RAP (receptor associated protein) bezeichnet wird. RAP assoziiert mit Megalin und fungiert als Chaperon, das die Faltung von Megalin im endoplasmatischen Retikulum und den Transport zur Zellmembran unterstützt (24, 32, 103).

Die Aktivierung von Komplementfaktoren mit Bildung von C5b-9 spielt eine direkte Rolle in der glomerulären Schädigung und der Entwicklung einer Proteinurie in der Heymann- Nephritis. Die Depletion von Komplementfaktoren durch Kobra Venom Faktor (CVF) führte im Tierexperiment zu einem Ausbleiben der Proteinurie bei unbeeinflusster Immundepotformierung (124). Die Bindung des heterologen Antikörpers am Megalin der

Podozytenmembran löst die Komplementkaskade aus und führt zur Bildung des Membranangriffskomplexes C5b-9, der auch in den Immundepots nachgewiesen werden konnte (51). Aufgrund des Nachweises von C5b-9 in zytoplasmatischen Vesikeln und im Kapselraum wird vermutet, daß C5b-9 kurzzeitig in die Podozytenmembran inseriert wird, intrazellulär vom Podozyten prozessiert und im Anschluß per Exozytose in den Bowmannschen Kapselraum abgestoßen wird (51). Die Insertion des sublytischen C5b-9-Komplexes in die Plasmamembran führt zu einem Verlust deren Integrität und bewirkt die Aktivierung spezifischer Signalwege im Podozyten. Es folgt die Aktivierung von Proteinkinasen, Phospholipasen, Cyclooxygenasen, Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, NADPH-Oxidase, Streßproteinen, Proteinase und weiteren zellulären Prozessen (17). Die Streßantwort des Podozyten führt über einen bisher unbekannten Mechanismus zum Effacement der Fußfortsätze, das durch eine mit Verkürzung und Verbreiterung einhergehende Fortsatzretraktion bis hin zur Aufhebung des interdigitierenden Musters gekennzeichnet ist (135), zu Podozytenverlust und Proteinurie.

1.3. Die Ubiquitin- C- terminale Hydrolase L1 (UCH- L1)

In eukaryoten Zellen findet die Regulation des Abbaus der meisten kurzlebigen Proteine über das Ubiquitin- Proteasom- System (UPS) statt. Die Kennzeichnung von Proteinen für die proteasomale Degradation erfolgt über die kovalente Ligation mit Ubiquitin. Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Polypeptid aus 76 Aminosäuren und wurde von A. Hershko, A. Ciechanover und Irwin Rose entdeckt, die für die Aufklärung der ubiquitinvermittelten Proteindegradation im Jahre 2004 den Nobelpreis für Chemie erhielten (31, 106). Der Abbau über das Ubiquitin- Proteasom- System betrifft einen Großteil regulatorischer Proteine, so daß zentrale zelluläre Prozesse wie Zellzyklus, Signaltransduktion, Transkription, Rezeptorlokalisierung und -aktivität, Antigenpräsentation und Endozytose über Ubiquitinierungsvorgänge reguliert werden. Durch das UPS ist die Zelle in der Lage, rasche Abpassungsvorgänge zu durchlaufen, indem Proteine schnell durch Degradation beseitigt werden und so enzymatische oder regulatorische Aktivitäten kurzfristig beendet oder aktiviert werden können. Zudem ist das UPS in der Lage, über den Abbau von Transkriptionsfaktoren oder regulatorischen Proteinen die Genexpression zu beeinflussen. Das UPS beseitigt darüber hinaus fehlgefaltete oder beschädigte Proteine und spielt eine große Rolle in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, die mit einer

Akkumulation abnormer Proteine assoziiert sind. Die Ubiquitinierung erfolgt über eine enzymatische Übertragung von Ubiquitin auf ein Lysin des Zielproteins, wobei eine Isopeptidbindung zwischen dem C- terminalen Glycin des Ubiquitins und der ϵ - Aminogruppe eines Lysins des Zielproteins entsteht (72, 79). Die Reaktion benötigt die Abfolge dreier enzymatischer Aktivitäten: ein aktivierendes Enzym (E1), das zur Aktivierung des Ubiquitins eine Thiolesterbindung mit dessen Carboxylgruppe am Glycin76 eingeht, ein konjugierendes Enzym (E2), das temporär über eine Thiolesterbindung mit dem aktivierten Ubiquitin verbunden ist, und eine Ligase (E3), die das aktivierte Ubiquitin von E2 auf die ϵ - Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins überträgt (31, 102). Proteine können an einem oder mehreren Lysinresten durch Mono- oder Polyubiquitinierung modifiziert werden, wobei Länge und Konfiguration der Ubiquitinketten über das Schicksal des Zielproteins entscheiden. Ketten von mehr als vier Ubiquitinen bei Konjugation über Lysin48 bewirken eine Bindung des Substrates am 26S-Proteasom mit anschließender Degradierung (153). Die Konjugation von Monoubiquitin mit einem oder mehreren Lysinen des Zielsubstrates stellt eine zentrale regulatorische Modifikation dar, die mit der Phosphorylierung zu vergleichen ist. Über Monoubiquitinierungen wird die Aktivität und Lokalisation vieler zellulärer Proteine reguliert. Sie gilt als wichtiges Signal für die Internalisierung von Oberflächenproteinen und membranständigen Rezeptoren über den Endozytoseweg und deren Degradation im Lysosom (35, 36). Monoubiquitinierungen sind darüber hinaus an der Regulation von Transkription und Histonaktivität beteiligt (127).

Wie andere posttranslationale Modifikationen sind Ubiquitinierungen reversibel. Die Abspaltung des Ubiquitins wird über die Aktivität von deubiquitinierenden Enzymen (DUBs) reguliert (48). Den deubiquitinierenden Enzymen werden fünf Unterfamilien zugeordnet. Die größten Unterfamilien stellen die Ubiquitin- spezifischen Proteasen (UBPs) und die Ubiquitin- Carboxy- terminalen Hydrolasen (UCHs) mit drei bekannten Isoformen dar (153). Es handelt sich um Thiolproteasen, die spezifisch Ester, Thiolester und Amidbindungen am C- Terminus des G76 des Ubiquitins schneiden (154). Unter anderem prozessieren DUBs inaktive Ubiquitin- Genprodukte und freie Ubiquitinketten, die den proteasomalen Abbau durch die Blockade von Ubiquitinbindungsstellen am Proteasom hemmen können (2).

Die UCH- L1 gehört zur Gruppe der UCHs und ist ein Protein mit 223 Aminosäuren (155). Sie weist im Körper eine streng gewebsspezifische Verteilung auf. Die UCH- L1 wird vor allem in neuronalem (155, 112) und neuroendokrinem Gewebe exprimiert, wurde aber

auch in Testis (74, 65), Ovarien (129), Tumoren (144, 156, 34) und synovialen Membranen (59) nachgewiesen. In der Niere wird UCH- L1 in Tubulusepithel- und Sammelrohrzellen sowie in Parietalzellen exprimiert (20, 136). Die UCH- L1 ist mit 1- 2 % des gesamten löslichen Proteins eines der am stärksten exprimierten Proteine im Gehirn. Herabregulation oder extensive oxidative Modifikation von UCH- L1 wurden in Gehirnen von Alzheimer- und Parkinson- Patienten beobachtet (12). Ein mutativ bedingter Isoleucin93 zu Methionin- Aminosäurenaustausch (I93M) in der UCH- L1 bedingt eine verminderte Hydrolaseaktivität und wurde als Ursache autosomal- dominanter Parkinson- Erkrankungen identifiziert (74). Ein Polymorphismus, der zu einem Austausch von Serin18 zu Tyrosin in der UCH- L1 führt, scheint diesbezüglich protektiv zu wirken (126). Eine partielle Deletion des UCH- L1- Gens führt zu einem Phänotyp der grazen axonalen Dystrophie (Gad) in der Maus. Diese Erkrankung ist durch sensorische und motorische Ataxie gekennzeichnet und führt zu einer axonalen Degeneration vom Dying- Back- Typus sowie zur Formierung von Spheroidekörperchen in Nervenendigungen (118).

Die UCH- L1 wurde ursprünglich als DUB charakterisiert (155), wobei alle in vitro detektierten Hydrolase- Aktivitäten signifikant geringer sind als die anderer Hydrolasen (130). In vitro- Analysen zeigten auf, daß die UCH- L1 in der Lage ist, Bindungen zwischen Ubiquitin und kleineren Addukten oder ungefalteten Polypeptiden zu hydrolysieren (71). Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine Beteiligung der UCH- L1 am Recycling von freiem Ubiquitin aus ubiquitinierten Oligopeptiden vermutet, die aus der proteasomalen Degradation von polyubiquitinierten Proteinen stammen (78). Eine Rolle der UCH- L1 bei der Deubiquitinierung von polyubiquitinierten Proteinen oder der Hydrolyse von Polyubiquitinketten erscheint dagegen unwahrscheinlich (71). Zudem wird eine Beteiligung der UCH- L1 an der Prozessierung von Ubiquitin- Genprodukten vermutet, die entweder als tandemartig konjugierte Ubiquitinpolymere oder als Fusionsproteine von Ubiquitin mit kleinen ribosomalen Proteinen translatiert werden (71, 73). Liu et al. entdeckten 2002 die Fähigkeit der UCH- L1, in vitro Homodimere zu bilden, und wiesen eine mit der Dimerisierung verbundene Ubiquitin- Ligase- Aktivität nach (78). Die Verkettung von Ubiquitinmonomeren durch die Ligaseaktivität der UCH- L1 erfolgt am Lysin63 und dient nicht als Targeting- Signal für das Proteasom (78). K63- verlinkte Polyubiquitinierungen spielen eine Rolle in der DNA- Reparatur, in der Regulation von Translationsvorgängen und der Endozytose und könnten zudem über einen proteinstabilisierenden Effekt verfügen, durch den Proteine vor der proteasomalen Degradation bewahrt werden (76).

Die UCH- L1 verfügt darüber hinaus in vivo über eine monoubiquitinstabilisierende Wirkung, die unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität besteht. Im Gehirn assoziiert die UCH- L1 mit Monoubiquitinen und verhindert deren Degradation (99).

Der Arbeitsgruppe Meray und Lansbury gelang der Nachweis einer monoubiquitinierten Form der UCH- L1, in der die Monoubiquitinierung zur Inhibition der Bindung von Ubiquitin führte. Die UCH- L1 ist durch ihre autohydrolytische Aktivität in der Lage, die Monoubiquitinierungen abzuspalten, und kann somit Einfluß auf die Regulation ihrer eigenen enzymatischen Aktivität nehmen (83).

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Neuexpression von UCH- L1 im Podozyten in der humanen membranösen Glomerulonephritis nachgewiesen (84). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Expression und Regulation der UCH- L1 in der passiven Heymann- Nephritis, einem Tiermodell der humanen membranösen Glomerulonephritis.

II. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die membranöse Glomerulonephritis besitzt als eine der häufigsten Ursachen eines nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter erhebliche klinische Relevanz. Trotz spontaner Remission der Symptomatik in bis zu einem Drittel der Fälle führt die Erkrankung bei etwa 40 % der Patienten innerhalb von 10 Jahren zu einer terminalen Niereninsuffizienz. Die heute existierenden Therapiemöglichkeiten der membranösen Glomerulonephritis beruhen auf empirischen Untersuchungen und verfügen über keinen kausalen Ansatz. Trotz einer immunsuppressiven Therapie können viele Patienten nicht vor einer terminalen Niereninsuffizienz bewahrt werden, welche zur Dialysepflichtigkeit führt. Um eine kausale Therapie der membranösen Glomerulonephritis zu entwickeln, sind Kenntnisse über die Podozytenbiologie sowie den Pathomechanismus der Erkrankung von überragender Wichtigkeit. Ziel der Arbeit war es, die Regulation und Funktion der UCH- L1 in der passiven Heymann- Nephritis, einem Tiermodell der idiopathischen membranösen Glomerulonephritis des Menschen, zu untersuchen. Begleitend wurde anhand einer Zellkulturlinie immortalisierter humaner Podozyten die Regulation der UCH- L1 im podozytären Differenzierungsprozess sowie deren Einfluß auf die Podozytenmorphologie in vitro analysiert.

III. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien

Agarose	Invitrogen
Aluminiumkaliumsulfat (Alaun) x 12 H ₂ O	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
1,4- Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
EDTA	Sigma
Eosin	Merck
Ethanol 100%	J.T. Baker
Ethidiumbromid (EtBr) 10 mg/ml	Sigma
Formalin	Merck
Gel Code Blue Stain Reagent	Pierce
Glycin	Roth
Hämatoxylin	Serva
HCl 1N	Merck
H ₂ O ₂	Sigma- Aldrich
Isofluran	Abbot
Isopropanol	Fluka
Kanamycin	Roche
Magermilchpulver	Spinnrad
Methanol	Roth
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Serva
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Fluka
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck
Naphtol- AS- Bisphosphat	Fluka
Natriumacid	Serva
Natriumchlorid	Serva
Natriumcitrat x 2 H ₂ O	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumjodat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck
Neufuchsin	Serva
NN- Dimethylformamid	Sigma
Paraformaldehyd (16%)	Electron Microscopy Sciences
Perjodsäure	Merck
Schiffssches Reagenz	Sigma
Tris	Sigma
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma
Xylol	Th. Geyer GmbH & CoKG
Zitronensäure- Monohydrat	Merck

Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren

BamH1	New England Biolabs
BamH1- Puffer	New England Biolabs

Bgl2	New England Biolabs
BSA (Rinderserumalbumin) für Klonierung	New England Biolabs
BSA für Glomeruliisolation	Sigma
Complete Proteasehemmstoff	Roche
dNTP- Mix, 10 mM	Invitrogen
Hind3	New England Biolabs
Hot Star Taq Mastermix	Invitrogen
1kb DNA- Ladder	Invitrogen
LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
MMulV Reverse Transkriptase	New England Biolabs
Neb2- Puffer	New England Biolabs
Neb3- Puffer	New England Biolabs
Oligo(dT)- Primer ₁₂₋₁₈	Invitrogen
PCR- Marker	New England Biolabs
Pferdeserum	Vector
RNase- Inhibitor (RNasin Protector)	Roche
RT- Puffer (NEBuffer)	New England Biolabs
Seebblue Plus2 Prestained	Invitrogen
T4- DNA- Ligase	New England Biolabs
T4- DNA- Ligase- Puffer	New England Biolabs
Xho1	New England Biolabs

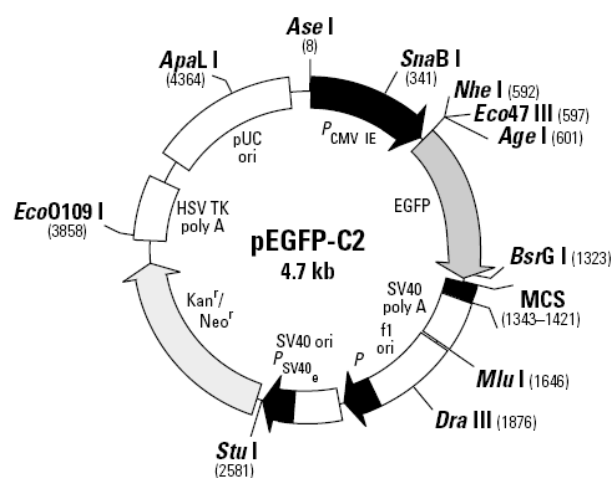
Oligonukleotide

Primer	Quelle	Sequenz	Amplikon
pMSCVpuro _{forward}	C. Meyer-Schwesinger	ccc ttg aac ctc ctc gtt cga cc	ca. 349 bp
pMSCVpuro _{reverse}	C. Meyer-Schwesinger	gag acg tgc tac ttc cat ttg tc	

Plasmide

pEGFP- C₂

Biosciences Clontech

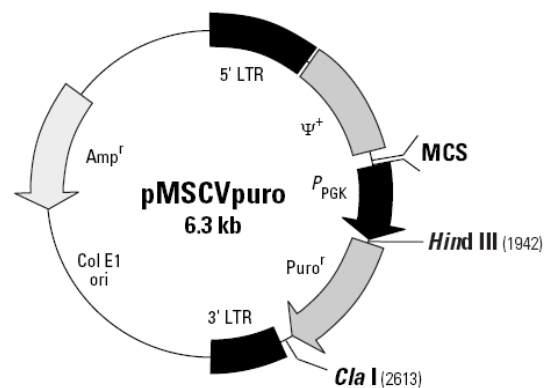


pEGFP- UCH- L1

Stefan Balabanov,
Universitätsklinikum
Hamburg- Eppendorf

pMSCVpuro

Biosciences Clontech



Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti- α- Aktinin- 4	Kaninchen	Westernblot	1: 1000	Immunoglobe
		Immunfluoreszenz	1: 200 (Gewebe)	
Anti- β- Aktin	Maus	Westernblot	1: 3000	Sigma
Anti- β- Catenin	Maus	Westernblot	1: 40 000	Becton Dickinson
		Immunfluoreszenz	1: 100 (Zellen)	
Anti- Nephtrin	Meerschweinchen	Westernblot	1: 20 000	Progen
		Immunfluoreszenz	1: 100 (Gewebe)	
			1: 20 (Zellen)	
Anti- Podocin	Ziege	Westernblot	1: 20 000	Santa Cruz
Anti- Synaptopodin	Maus	Immunfluoreszenz	1: 20 (Zellen)	Progen
Anti- Ubiquitin	Maus	Westernblot	1: 40 000	Chemicon
		Histologie	1: 200	
Anti- UCH- L1	Kaninchen	Westernblot	1: 2000	Chemicon
Anti- UCH- L1	Maus	Histologie	1: 40	Abcam

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konjugation	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti- Meerschweinchen	Esel	HRP	Westernblot	1: 20 000	Jackson
Anti- Maus	Esel	Biotin	Immunfluoreszenz	1: 200	Jackson
Anti- Maus	Esel	HRP	Westernblot	1: 40 000	Jackson
Anti- Kaninchen	Ziege	Biotin	Immunfluoreszenz	1: 100	Vector

Anti- Kaninchen	Esel	HRP	Westernblot	1: 10 000	Jackson
Anti- Schaf	Esel	Biotin	Immunfluoreszenz	1: 100	Jackson
Anti- Ratte	Esel	Biotin	Westernblot	1: 100	Jackson

Inhibitoren

LDN 57444
MG 132

Calbiochem
Calbiochem

Lösungen und Materialien

Blotkammer (Novex Mini Cell)
Complete Protease- Inhibitor- Cocktail
Dreitagespumpen
ECL- Chemilumineszenz- Lösung
Gel Code Blue Stain Reagent
Gelkammer
H₂O, DNase- frei
H₂O, RNase- frei
NuPage 4-12% Bis- Tris- Gel
PCR- Reaktionsgefäße
Petrischalen
PVDF- Membran (Immobilon)
Rattenurin- Albumin- ELISA (Nephrot)
Röntgenfilm (Super RX)
Schwämme
Siebe (53 µm)
Siebe (90 µm)
Skalpelle
Superblock blocking reagent
Tissue freezing medium
T- Per Tissue Protein Extraction Reagent
Urin- Stix (Multistix 10S6)
Whatman- Filterpapier

Invitrogen
Roche
Alzet
Pierce
Pierce
Peqlab Biotechnology GmbH
Braun
Invitrogen
Invitrogen
Sarstedt
Sarstedt
Millipore
Exocell Inc.
Fuji
Invitrogen
Retsch
Retsch
Braun
Pierce
Jung
Pierce
Bayer
Schleicher & Schuell

Nukleinsäure- Isolations- Kits

Qiafilter Plasmid Midi Kit
Qiagen Plasmid Mini Kit
QiaShredder Mini Spin Column
RNeasy Plus Mini Kit

Qiagen
Qiagen
Qiagen
Qiagen

Immortalisierte Podozyten

Konditional immortalisierte Podozyten AB 8/13

Moin Saleem, Childrens Renal
Unit, Bristol Royal Hospital for
Children, Bristol, UK

ZellkulturmediumRPMI- 1540 + 10% FCS + 1% ITS

500 ml	RPMI- 1640 (mit 300 mg/l L- Glutamin)	Gibco
50 ml	FCS	Gibco
5 ml	ITS (Insulin, Transferrin, Selenium)	Pan Biotech GmbH

Zellkultursubstanzen und Materialien

Deckgläschen (13 mm)	Roth
Gene Pulser Küvetten	Biorad
Kollagenlösung	Gibco
Kollagen I- beschichtete Kulturflaschen (75 cm ²)	Becton Dickinson
Kollagen I- beschichtete 24- Lochplatten	Becton Dickinson
Kollagen IV- beschichtete Kulturflaschen (75 cm ²)	Becton Dickinson
Kollagen IV- beschichtete 24- Lochplatten	Becton Dickinson
Kulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Laminin- beschichtete Kulturflaschen (75 cm ²)	Becton Dickinson
Laminin- beschichtete 24- Lochplatten	Becton Dickinson
Neubauer- Zählkammer	Optik Labor
Opti- MEM	Gibco
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Lonza
Pipetten	Sarstedt/ Gilson
RPMI- 1640 mit L- Glutamin	Gibco
Trypsin- EDTA (0,5%)	Gibco
Zellschaber	Sarstedt

Bakterienkultursubstanzen und Materialien

E. coli DH5α	Invitrogen
Drigalski- Spatel	Roth
Petrischalen	Sarstedt

SOB- Medium

20 g/l	Pepton
5 g/l	Hefe- Extrakt
0,5 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
2 g/l	MgCl
pH 7,0	

SOC- Medium

4 g/l	Glukose
in SOB- Medium	

LB- Medium (Luria- Bertani- Medium)

20 g/l	LB Broth Base	Invitrogen
1 l	H ₂ O	

LB- Agar

32 g/l	LB Agar	Invitrogen
1 l	H ₂ O	

Lösungen und Materialien Histologie

ABC- AP- Kit	Vector
Alexa Fluor 568 Phalloidin	Invitrogen
Avidin- Biotin- Blocking Kit	Vector
Vectashield DAPI Hard Set Mount	Vector
FITC- Avidin	Vector
Gummisirup	WTW
Normalserum Pferd/ Ziege	Vector
Protease XXIV	Sigma
TSA- Kit	NEN life science

Versuchstiere

Sprague- Dawley- Ratten	Charles River
-------------------------	---------------

Mikroskope

Lichtmikroskop (Axiovert 200 M)	Zeiss
Lichtmikroskop (Axioskop 40)	Zeiss
Lichtmikroskop (Axiovert 25)	Zeiss
Lichtmikroskop (IM 35)	Zeiss
Lichtmikroskop (R15)	Zeiss
Lichtmikroskop (LSM 510 beta)	Zeiss

Software

Adobe Illustrator	Adobe
Adobe Photoshop	Adobe
Excel	Microsoft
Image J	NIH
Windows XP	Microsoft

Geräte

Autoklav (KSG 114)	KSG Sterilisatoren GmbH
Blotapparatur (Novex Mini Cell)	Invitrogen
Brutschrank (Hera Cell)	Heraeus
DNA- Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnology
Elektroporator (Gene Pulser XCell)	BioRad
ELISA- Reader	Dynatech Laboratories
Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnology
Heizblock (Neoblock 1)	Neolab
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Kühlschrank -20°C	Privileg
Kühlschrank -80°C	Privileg
Magnetrührer (Variomag Maxi)	Komet
Mikrowelle (Microwave 800)	Severin
Nanodrop Spektrophotometer (ND 1000)	Nanodrop Technologies
Netzgerät	Pharmacia Biotech
PC	LG
pH- Meter (Inolab)	WTW

Pipettierhilfe (Accu- jet)	Brand
Röntgenfilmentwickler (CP 1000)	Agfa
Schüttelinkubator (Thermomixer comfort)	Eppendorf
Schüttler (Rocky)	Fröbel Labortechnik
Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge (Typ 5415 R)	Eppendorf
Tischzentrifuge (Mini Spin)	Eppendorf
UV- Tisch und Dokumentationssystem	Intas
Vortexgerät	Janke & Kunkel
Waage (SBA 41)	Scaltec
Wärmebad	Köttermann
Werkbank (Hera Safe)	Heraeus
Zentrifuge (Biofuge primo R)	Heraeus
Zentrifuge (Megafuge 1.0 R)	Heraeus

Pufferlösungen

Block- Puffer

192 mM	Glycin
50 mM	Tris
ad 1 l	H ₂ O

Citratpuffer (10mM)

2,35 g	Natriumcitrat x 2 H ₂ O
0,31 g	Zitronensäure- Monohydrat
1 l	H ₂ O
pH 6,0- 6,1	

Ladepuffer Western Blot (LDS 4x)

	Nu Page Loading buffer 4x LDS
0,4 M	DTT

Lysis- Puffer für Westernblot

	T- Per Tissue Protein Extraction Reagent
4 %	Complete Protease- Inhibitor- Cocktail (25x)
10 µM	MG 132

Morpholinoethansulfonsäure- Puffer (MES) 20x

50 mM	MES
50 mM	Tris Base
0,1 %	SDS
1 mM	EDTA
ad 1 l	H ₂ O

Morpholinopropansulfonsäure- Puffer (MOPS) 20x

50 mM	MOPS
50 mM	Tris Base
0,1 %	SDS
1 mM	EDTA
ad 1 l	H ₂ O

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
1,4 mM	KH ₂ PO ₄
4,3 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
ad 1 l	H ₂ O

Sörensen- Puffer

3,03 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
14,14 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
ad 1 l	H ₂ O
pH 7,2- 7,4	

TAE- Puffer

90 mM	Tris- Acetat
2 mM	EDTA
ad 1 l	H ₂ O

TNT- Puffer

6,35 g	Tris
9 g	NaCl
25 ml	1 M HCl
1 g	Tween 20
1025 ml	H ₂ O

TBS- Puffer

10 mM	Tris (pH 7,4)
100 mM	NaCl
ad 1 l	H ₂ O

TBST- Puffer

0,05 % in TBS	Tween 20
------------------	----------

Waschpuffer für ELISA

0,1 % in PBS	Tween 20
-----------------	----------

Waschpuffer für Glomeruliisolation

0,5 % in PBS	BSA
-----------------	-----

Agarosegele1% (2%) Agarose- Gel (30 ml) mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid

1 g (2 g)	Agarose
30 ml	TAE
0,6 µl	EtBr (10 mg/ml)

Lösungen

Fixierlösung für Zellen

4%	Paraformaldehyd (16%)
2%	Succrose
in PBS	

Formalin- Lösung (4%)

4 %	Formalin
0,4 %	Eosin
in Sörensen- Puffer	

Hämalaunlösung nach Böhmer

200 ml	H ₂ O
10 g	Aluminiumkaliumsulfat x 12 H ₂ O
0,1 g	Natriumjodat
0,5- 1 g	Hämatoxylin
10 g	NN- Dimethylformamid

Naphtol- AS- Bisphosphat- Lösung

250 mg	Naphtol- AS- Bisphosphat
9375 mg	DMF

Neufuchsin- Lösung

0,3 g	Natriumnitrit
7,5 ml	H ₂ O
300 µl	Neufuchsin- Stammlösung
800 µl	Naphtol- AS- Bisphosphat- Lösung
150 ml	TNT- Puffer

Neufuchsin- Stammlösung

2,5 g	Neufuchsin
50 ml	2 N HCl

3.2. Methoden

3.2.1. Die Passive Heymann Nephritis

3.2.1.1. Fx1A- Antigen- Isolation und Schafimmunisierung

Nach Protokoll von Salant und Cybulsky (120) wurde aus Nieren von Sprague- Dawley- Ratten durch ein Siebverfahren und Ultrazentrifugation der epitheliale Bürstensaum proximaler Tubuli isoliert und angereichert. Mit der büstensaumreichen Fraktion (Fx1A) wurde ein Schaf nach gleichem Protokoll immunisiert und entsprechend aus dem zu einem späteren Zeitpunkt entnommenen Schafblut Fx1A- Serum gewonnen.

3.2.1.2. Testen des Fx1A- Serums durch Westernblotanalyse

Zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der im Fx1A- Serum enthaltenen Antikörper wurde Fx1A- Antigen 1: 30 verdünnt und 10 µl der Probe auf ein Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Blotting erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Als Primärantikörper fungierte das Serum eines mit Fx1A- Antigen immunisierten Schafes in einer Konzentration von 1: 10 000 in 3 % MMP.

3.2.1.3. Induktion der pHN und Betreuung der Tierstaffel

Als Versuchstiere dienten 18 männliche, 200 g schwere Sprague- Dawley- Ratten (positives Votum der Ethikkommission Nr. 82/06). An Tag -1 und Tag 0 der Staffel erfolgte bei 9 Tieren die Injektion von 500 und 650 µl Fx1A- Serum in die Schwanzvene (Abb. 2 A). 9 Kontrollratten wurden mit vor der Immunisierung gewonnenem Schafserum in gleicher Dosierung behandelt (Präimmunserum). An den Tagen 2, 4 und 6 wurden jeweils 3 Tiere aus beiden Gruppen unilateral nephrektomiert. Die Uninephrektomie (UNX) wurde durchgeführt, um aus einem Tier Nierengewebsproben zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zu gewinnen und damit den Zeitpunkt der UCH- L1- Induktion engmaschiger kontrollieren zu können. Zu den Zeitpunkten der Uninephrektomien sowie der Tötung der Tiere an Tagen 21 und 35 wurde jeweils Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Es erfolgte zudem eine engmaschige Gewinnung von Urinen über Stoffwechselkäfige, in denen die Tiere freien Zugang zu Wasser hatten, aber keine Nahrung erhielten. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen. An Tag 32 erfolgte die subkutane Implantation osmotischer Dreitagespumpen in die Nackenfalte der Versuchstiere (Abb. 2 B). Jeweils zwei Tiere pro Gruppe erhielten eine Pumpe mit dem spezifischen UCH- L1- Hemmer LDN 57444 in DMSO in einer Dosierung von 0,4 mg/kgKG, und zwei Tiere pro Gruppe erhielten eine Pumpe mit dem Proteasomhemmer MG 132 in EtOH in einer Dosierung von 60 µl/kgKG. Jeweils ein Kontrolltier erhielt eine Pumpe mit dem entsprechenden Lösungsmittel Ethanol bzw. DMSO. Ein Kontrolltier und drei pHN- Tiere blieben unbehandelt.

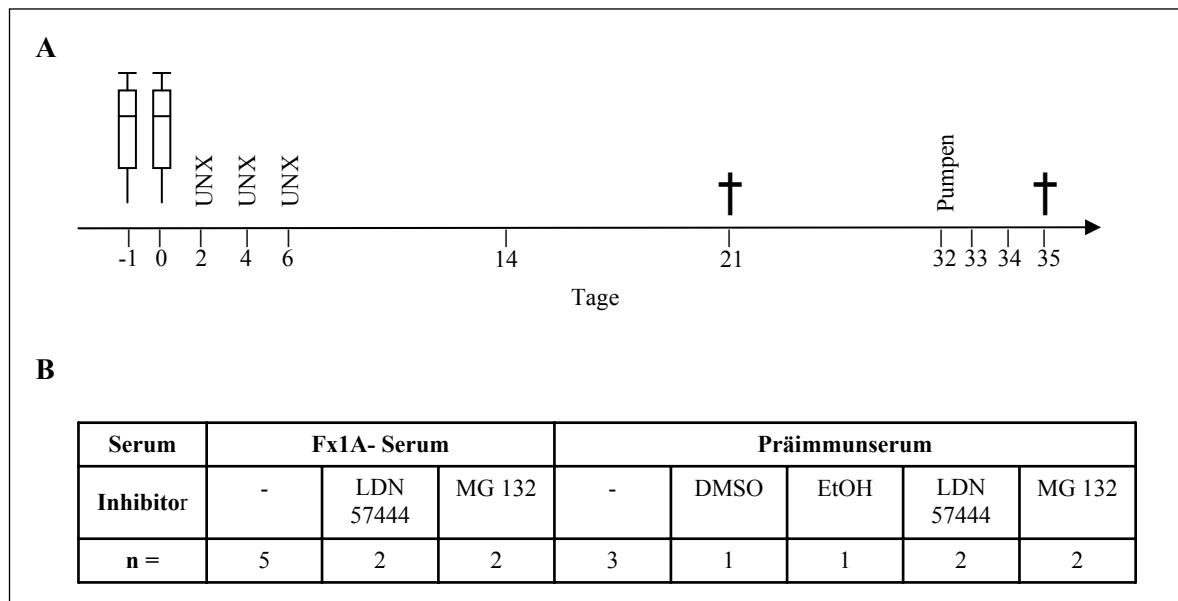


Abb. 2: Durchführung der passiven Heymann- Nephritis (A) Schematischer Ablauf der pHN- Staffel; die Injektion von Fx1A- und PI- Serum erfolgte an Tagen -1 und 0. An Tagen 2, 4 und 6 wurden je 6 Tiere beider Gruppen uninephrektomiert (UNX). An Tag 32 erfolgte die Implantation osmotischer Minipumpen. Die Tötung (†) der Ratten erfolgte an Tagen 21 (n= 4) und 35 (n= 14). (B) Schema der an Tag 32 erfolgten Inhibitorbehandlung durch Implantation osmotischer Minipumpen.

Bei der Vorbereitung der Pumpen fiel die flockige Konsistenz des in DMSO gelösten LDN 57444 auf, die wohl auf eine Überschreitung des Löslichkeitsproduktes zurückzuführen war. Aufgrund der Beschaffenheit der Lösung besteht die Möglichkeit, daß die Abgabe des Wirkstoffes durch die Pumpe nicht optimal erfolgte. Zudem konnte nicht sichergestellt werden, daß die Haltbarkeit von LDN 57444 die drei Tage des Inhibitionsexperimentes überdauerte.

3.2.1.4. Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Am Tag der Organgewinnung wurden die Ratten zunächst per Inhalationsnarkose mit Isofluran narkotisiert und im Anschluß mit 150 ml PBS intraaortal perfundiert, um das Blut aus den glomerulären Kapillarschlingen zu entfernen. Die entnommenen Nieren wurden sofort aufgeteilt. Aus zwei Nierendritteln wurden unmittelbar im Anschluß an die Organentnahme die Glomeruli isoliert. Eine Nierenscheibe für die histologische Untersuchung wurde in 4 % Formalinlösung eingelegt und nach 24 h in PBS umgebettet. Eine weitere Nierenscheibe wurde für Gefrierschnitte und Mikrodisektion mit Tissue freezing medium bedeckt und bei -80°C gelagert. Eine weitere Nierenscheibe wurde für die Bestimmung von Gesamtprotein und Gesamt- RNA nochmals geteilt und beide Stücke in Flüssigstickstoff schockgefroren. Ein Stückchen Kortex von 1 mm³ Größe wurde für

spätere elektronenmikroskopische Studien in 4 % Formalinlösung konserviert.

3.2.1.5. Glomeruliisolation

Zur Isolation von Glomeruli aus den Rattennieren wurden zunächst innere und äußere Medulla vom Kortex getrennt und verworfen. Der Kortex wurde anschließend mit einem Skalpell unter Zugabe von 100 µl Waschpuffer (PBS + 0,5 % BSA) in feine Stückchen gehackt und mithilfe eines Glaskolbens und unter Zugabe von Waschpuffer durch ein 90 µm- Sieb gerieben, so daß Glomeruli und andere kleinere Nierenbestandteile die Maschen passieren konnten. Fett- und Bindegewebsreste wurden von dem Sieb zurückgehalten. Anschließend wurde die Glomerulisuspension auf ein 53 µm- Sieb gegeben, wodurch Glomeruli retiniert wurden und kleinere Bestandteile ausgewaschen werden konnten. Die Glomerulisuspension wurde 10 min bei 1200 rpm bei 4°C zentrifugiert und im Anschluß 3 x mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Das BSA verhinderte hierbei ein Verkleben der Glomeruli mit den Wänden des Probengefäßes. Abschließend erfolgte ein Waschschrift mit reinem PBS, um das BSA aus den Proben zu entfernen. Die Glomeruli wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Durch Siebtechnik isolierte Glomeruli umfassen gewöhnlich das glomeruläre Kapillarkonvolut und die Bowmannsche Kapsel. Sie beinhalten demnach Podozyten, Mesangialzellen, glomeruläres Endothel sowie Parietalzellen und können auch Reste von Tubulusgewebe enthalten. Problematisch war in diesem Zusammenhang eine starke Zunahme des glomerulären Durchmessers in pHN- und Kontrolltieren. Es ist möglich, daß durch die Siebtechnik die Kapsel großer Glomeruli abgetrennt wurde und so verlorenes Zellmaterial bei Westernblotanalysen unberücksichtigt blieb.

3.2.2. Proteinbiochemie

3.2.2.1. Proteinextraktion aus Podozyten und Gewebe

Aus Zellen, Glomeruli und Gesamtniere wurden für den Nachweis spezifischer Proteine zunächst Lysate hergestellt. Hierzu wurden die Proben mit einem Gemisch aus Tissue Protein Extraction Reagent (T- PER), Complete Proteasehemmstoff und dem Proteasomhemmer MG 132 (Endkonzentration 10 µM) lysiert. Jeweils 1 mg Zellen, Glomeruli bzw. Gewebe wurde mit 10 µl Lysisbuffer versetzt. Gewebe wurde anschließend mit einem Pestel verkleinert. Nach 15- minütiger Inkubation bei 4°C wurden ungelöste Zell- und Gewebsbestandteile bei 16,1 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Probengefäß überführt. Die Lysate wurden anschließend mit

LDS + 0,1 M DTT versetzt und bei 72°C für 10 min erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu bewirken.

3.2.2.2. Eindimensionale SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Zur Probenauftrennung wurden vorgefertigte Nu- Page 4- 12 %- Gradientengele benutzt. Vor der Probenapplikation wurden die Taschen zweifach mit dem entsprechenden Laufpuffer gespült. Zur Auftrennung größerer Proteine wurde ein MOPS- Puffer verwendet, für die Darstellung von Monoubiquitinen wurde als Laufpuffer ein MES- Puffer eingesetzt. In Abhängigkeit von dem nachzuweisenden Protein wurden pro Tasche 5- 15 µl des Lysats auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei RT bei 60 mA pro Gel für 1 h in einer Peqlab- Gelkammer.

3.2.2.3. Färbung von Proteingelen

Zur semiquantitativen Bestimmung des Urin- Albumingehaltes wurden Urinproben mit LDS versehen und für 10 min auf 72°C erhitzt. Anschließend wurden 4 µl Probe pro Tasche auf ein Nu- Page 4- 12 %- Gradientengel geladen. Als Laufpuffer wurde MOPS- Puffer verwendet. Nach vollständiger Auftrennung der Proteine wurde das Gel aus dem Gehäuse getrennt und 3 x 10 min in H₂O gewaschen. Im Anschluß wurde das Gel für 30 min bei RT in Gel Code Blue Stain Reagent gefärbt. Abschließend erfolgte eine Entfärbung des Gels über Nacht bei RT in H₂O, so daß die unspezifisch angefärbten Proteinbanden sichtbar wurden und ein Überblick über die Schwere der Albuminurie ermöglicht wurde.

3.2.2.4. Westernblot

Die in der SDS- Page aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF- Trägermembran übertragen, indem senkrecht zu Polyacrylamid- Gel und PVDF- Membran ein elektrisches Feld angeschlossen wurde. Durch den Blotvorgang wurden die negativ geladenen Proteine auf der Trägermembran durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Zum Proteintransfer wurde eine Novex Mini Cell verwendet. Zunächst wurde die PVDF- Membran für zwei Minuten in Methanol aktiviert und luftblasenfrei in Richtung der Anode auf das Gel aufgebracht. Gel und Trägermembran wurden beidseits mit je drei in Blotpuffer getränkten Whatman- Papieren bedeckt und mithilfe mehrerer Schwämme in der Blotkammer fixiert. Die Blotkammer wurde anschließend mit Blotpuffer aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgte bei 4°C für 30- 90 min bei einer Spannung von 30 V.

3.2.2.5. Immundetektion der geblotteten Proteine

Der Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter und auf eine Trägermembran geblotteter Proteine erfolgte durch Detektion mit spezifischen Antikörpern. Zunächst wurden durch halbstündige Inkubation in 3 % bzw. 5 % Magermilchpulver in TBST unspezifische Bindungsstellen geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Antikörperlösung (Primärantikörper in Superblock) auf einem Taumler geschwenkt. Nach Entfernen des Primärantikörpers wurde die Membran für 4 x 10 min in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Magermilch in TBST für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Durch Waschen mit TBST im Anschluß für 4 x 10 min wurde ungebundener Antikörper entfernt. Die Detektion des Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mithilfe von ECL Super Signal auf der Grundlage der Oxidation eines luminol- basierten Substrates durch die antikörpergekoppelte Peroxidase mit resultierender Chemilumineszenz. Das Lichtsignal wurde mit einem Röntgenfilm detektiert, und der Film nach der Entwicklung mit Adobe Photoshop eingescannt. Die Densitometrie der Banden und die abschließende Auswertung des Westernblots erfolgten mit Image J und Excel.

3.2.2.6. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren verschiedener Substanzen, das auf einer enzymatisch vermittelten Farbreaktion basiert. Bei dem vorliegend angewandten Rattenurin- Albumin- Elisa handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay, bei dem Rattenurin- Albumin und stationäres Albumin der beschichteten 96- Loch- Platte um einen Antikörperbindungsplatz kompetitieren. Hierzu werden Urinprobe und Meerrettichperoxidase- gekoppelter Anti- Rattenalbumin- Antikörper auf eine Albumin- beschichtete Platte gegeben. Der Antikörper bindet an das stationäre Albumin oder das Albumin der flüssigen Phase. Nach dem Waschschrift bleibt nur der an das stationäre Albumin gebundene Antikörper zurück, dessen Konzentration durch photometrische Messung einer anschließenden Farbreaktion bestimmt werden kann. Die Farbintensität ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Albuminkonzentration der flüssigen Phase.

Zur Vorbereitung der ELISA- Durchführung wurden zunächst alle Urine bei 16,1 g für 10 min zentrifugiert, um den Urin von Schwebeteilchen zu befreien. Bei einem hohen vorab semiquantitativ bestimmten Albumingehalt wurden die Proben mit dem mitgelieferten EIA Diluent 1: 10 verdünnt, um den Meßbereich des ELISAs nicht zu überschreiten. Zudem

wurde eine Verdünnungsreihe aus dem mitgelieferten Standardserumalbumin für den Konzentrationsbereich von 10,0 bis 0,0 mg/dl erstellt. Es fanden sowohl für die Standardreihe als auch für die Urinproben jeweils Doppelbestimmungen der Albuminkonzentration statt. In die Vertiefungen für die Urinprobenmessung wurden jeweils 90 µl EIA Diluent vorgelegt und anschließend 10 µl Probe hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden 100 µl Meerrettichperoxidase- konjugierter Anti- Albumin- Antikörper in sämtliche Wells pipettiert und wiederum 30- 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Wells 6 x mit Waschpuffer unter Zuhilfenahme einer 8- Kanal- Pipette gewaschen. Zur Einleitung der Farbreaktion wurden 100 µl TMB- Color- Developer in sämtliche Wells pipettiert, nach fünfminütiger Inkubationszeit 100 µl saure Stopplösung hinzugefügt und die Farbreaktion im ELISA- Reader ausgelesen. TMB (Tetramethylbenzidin) fungierte hier als Substrat für die antikörpergekoppelte Meerrettichperoxidase.

3.2.3. Immunhistochemie (IHC)

Als Immunhistochemie wird eine Methode bezeichnet, mit der Zellproteine auf Gewebsschnitten mithilfe von Antikörpern detektiert und sichtbar gemacht werden. Der Primärantikörper bindet spezifisch an ein Epitop des zu visualisierenden Antigens und wird über einen gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper detektiert. Der Sekundärantikörper ist dabei mit einem Detektionssystem gekoppelt, mit dem schon geringe Mengen des Antigens visualisiert werden können. Als Detektionssystem können eine Farbreaktion katalysierende Enzyme, deren Substrate oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers auf die Streptavidin- Biotin- Methode zurückgegriffen, bei welcher der Sekundärantikörper mit Biotin gekoppelt ist und die Bindung des die Farbreaktion auslösenden Enzyms erst über einen Zwischenschritt erfolgt.

3.2.3.1. Streptavidin- Biotin- Methode

Bei der Streptavidin- Biotin- Methode handelt es sich um eine indirekte Nachweismethode von spezifischen Antigenen. Der Sekundärantikörper ist hier über kovalente Bindung mit Biotin markiert, zu welchem das bakterielle Protein Streptavidin mit vier Biotin-Bindungsstellen eine hohe Affinität ausweist. In dem in dieser Arbeit benutzten Avidin- Biotin- Complex (ABC)- Kit ist das Streptavidin an alkalische Phosphatase gekoppelt,

welche das gebundene Antigen in einer nachfolgenden Neufuchsin- Reaktion sichtbar machte.

3.2.3.2. TSA (Tyramide Signal Amplification)

Die TSA- Methode dient der Signalverstärkung in der Immunhistochemie. Grundlage für diese Methode ist ein biotinyliertes Tyramid- Derivat, das von Meerrettichperoxidase in ein kurzlebiges und extrem reaktives Zwischenprodukt umgewandelt wird. Das aktivierte Substrat bindet an Bereiche in unmittelbarer Nähe der Meerrettichperoxidase und reichert dort das konjugierte Biotin an, welches anschließend detektiert werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis des Biotins durch AP- gekoppeltes Streptavidin (ABC- Kit), welches die anschließende Neufuchsin- Reaktion katalysierte.

3.2.3.3. Neufuchsin- Entwicklungslösung

Die Farbentwicklung erfolgte durch Neufuchsin. Zum Ansetzen der Färbelösung wurden zunächst 0,3 g NaNO_2 in 7,5 ml H_2O gelöst. Anschließend wurden 300 μl Neufuchsin-Stammlösung in 150 ml TNT- Puffer überführt und 800 μl Naphtol- AS- Bisphosphat-Lösung hinzugefügt. Die Farbentwicklung erfolgte im Dunkeln. Die an das Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase spaltete dabei Phosphat vom Naphtol- AS- Bisphosphat ab, das dann mit dem Neufuchsin einen unlöslichen Farbkomplex bildete.

3.2.3.4. Hämalun- Kernfärbung nach Böhmer

Zum Abschluß der Immunhistochemie wurde eine Kernfärbung nach Böhmer durchgeführt. Zur Herstellung der Färbelösung wurden jeweils 10 g 12x Aluminiumkaliumsulfat (Alaun) in H_2O mit 0,1 g Natriumjodat über Nacht in 200 μl H_2O und 1 g Hämatoxylin mit 10 g NN- Dimethylformamid gelöst. Beide Lösungen wurden im Anschluß zusammengefügt und vermengt.

3.2.3.5. Probenvorbereitung

Um die Paraffinschnitte fest auf dem Objektträger anzuhaften, wurden diese über Nacht bei 40°C gebacken. Anschließend erfolgte eine Deparaffinierung der Schnitte durch Xylolbäder für 3 x 5 min. Im Anschluß wurden die Schnitte durch Ethanolbäder mit abfallender Konzentration rehydriert. Hierzu wurden die Schnitte jeweils 2 x 5 min in 100 %, 95 % und 75 % Ethanol inkubiert und anschließend für 2 x 5 min mit H_2O gespült.

3.2.3.6. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Begutachtung der Färbungen erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Axioskop 40).

3.2.3.7. UCH- L1- Immunhistochemie

Die immunhistologische Färbung der UCH- L1 diente der Darstellung von UCH- L1 im Zellkern und Zytoplasma. Zunächst wurden die Schnitte zur Proteindemaskierung in Citratpuffer (pH 6,0- 6,1) in der Mikrowelle für 35 min bei 680 W erhitzt und danach für 15 min auf Eiswasser im Citratpuffer abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min in H₂O gespült. Um die endogene Peroxidase zu blocken, folgte eine Inkubation in 3 % H₂O₂ in H₂O für 10 min bei RT. Anschließend wurden die Proben wieder für 3 x 5 min mit Wasser gespült. Unspezifische Bindungen wurden durch 30- minütige Inkubation bei RT mit 5 % Pferdeserum in PBS geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper 1: 40 in 5 % Pferdeserum in PBS bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in 5 % Pferdeserum inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Inkubation der Proben mit Streptavidin- HRP (TSA- Kit) 1: 100 in TNB für 30 min bei RT. Nach einem Waschschrift von 3 x 5 min mit PBS erfolgte eine 8- minütige Inkubation mit TSA in Amplifier diluent (TSA- Kit). Erneut wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend eine Inkubation für 30 min bei RT mit Streptavidin- AP (ABC- Kit) durchgeführt. Nach erneutem Waschen erfolgte die Farbentwicklung mit Neufuchsin im Dunkeln. Die Farbentwicklung wurde dabei engmaschig kontrolliert. Die Schnitte wurden nach Abschluß der Farbreaktion für 3 x 5 min mit H₂O gespült und im Anschluß für 20 min in HCl- H₂O inkubiert. Nach erneutem Spülen mit H₂O für 2 x 5 min erfolgte die Hämalaun- Kernfärbung nach Böhmer für 30- 60 s. Nach wiederholtem Spülen mit H₂O für 2 x 5 min wurde abhängig von der Qualität der Kernfärbung mit HCl- Ethanol differenziert. Nach abschließenden Spülen mit H₂O für 2 x 5 min wurden die Schnitte mit Gummisirup eingedeckt.

3.2.3.8. Ubiquitin- Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung von Ubiquitin diente der Darstellung von Mono- und Polyubiquitinen in der Zelle. Zunächst erfolgte ein Andau der Schnitte zur Proteindemaskierung durch Inkubation mit Protease XXIV für 15 min bei 37°C. Die Proteasereaktion wurde anschließend kurz mit 100 % Ethanol gestoppt und die Schnitte 3 x 5 min mit H₂O gespült. Um unspezifische Bindungen zu blocken, erfolgte eine Inkubation

mit 5 % Pferdeserum in PBS bei RT für 30 min. Über Nacht wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper 1: 200 in 5 % Pferdeserum in PBS bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift von 3 x 5 min mit PBS wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit dem biotinylierten donkey anti- mouse- Sekundärantikörper in 1: 200 Verdünnung in 5 % Pferdeserum in PBS für 30 min bei RT inkubiert und die Schnitte erneut für 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Streptavidin- AP 1: 100 in PBS für 30 min bei RT mit einem anschließenden Waschschrift von 3 x 5 min mit PBS. Nun erfolgten Neufuchsin- Farbentwicklung und Hämalaun- Kernfärbung nach Böhmer wie beschrieben.

3.2.3.9. PAS- Färbung

Die PAS- Färbung (Periodic Acid Schiff stain) ist eine histologische Färbung, bei der insbesondere kohlenhydratreiche Komponenten wie Glykoproteine, Muzine oder Glykogen mithilfe von Perjodsäure und Schiff- Reagenz nachgewiesen werden. Durch Perjodsäure werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert, die dann mit dem im Schiff- Reagenz vorhandenen schwefelsauren Fuchsin rot- violette Komplexe bilden. Zur Durchführung der PAS- Färbung wurden die entparaffinierten Gewebsschnitte zunächst für 1 min in 1 % Perjodsäure inkubiert und anschließend für 2- 3 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden danach für 40 min mit Schiffchem Reagenz inkubiert und im Anschluß wiederum für 5- 10 min mit warmem fließendem Leitungswasser gespült. Eine Hämalaun- Kernfärbung folgte wie beschrieben. Die PAS- Färbung wurde freundlicherweise von Frau Mariola Reszka (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

3.2.4. Fluoreszenzfärbungen

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um eine Form der Lumineszenz, bei der durch Absorption von kurzwelligem Licht angeregte Atome unter Emission von längerwelligem Licht in den Grundzustand zurückkehren. Es wird unterschieden zwischen Primärfluoreszenz (Autofluoreszenz), sekundärer Fluoreszenz, in der Substrate mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) direkt markiert werden, und Immunfluoreszenz. In der Immunfluoreszenztechnik bindet ein spezifischer Primärantikörper an ein Epitop des Antigens und kann über einen Sekundärantikörper detektiert werden, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der bei Anregung mit kurzwelligem UV- Licht längerwelliges sichtbares Licht emittiert und damit das zelluläre Antigen sichtbar macht.

Die Immunfluoreszenzfärbungen an Gewebsschnitten und fixierten Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Catherine Meyer- Schwesinger (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

3.2.4.1. Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten

Die Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung diente dem Nachweis des heterologen Schafantikörpers, der den Ratten mit dem Fx1A- Serum injiziert wurde. Zunächst wurden die Schnitte zur Proteindemaskierung für 15 min mit 5 mg/ml Proteinase XXIV in H₂O bei 37°C angedaut. Anschließend wurde die Proteasereaktion in 100 % Ethanol kurz gestoppt und die Schnitte für 3 x 5 min in H₂O gespült. Um eine hohe Hintergrundfärbung der Schnitte zu verhindern, erfolgte für 30 min ein Block des endogenen Biotins mit 1: 25 Avidin- Block in PBS (Avidin- Biotin- Blocking- Kit). Anschließend wurden die Schnitte 2 x 2 min mit PBS gewaschen. Um die Biotin- Bindungsstellen des gebundenen Avidins zu belegen, erfolgte ein 1: 25 Biotin- Block in 5 % Pferdeserum in PBS. Anschließend wurden die Schnitte wieder 2 x 2 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Anti- Schaf- Antikörper 1: 100 in 5 % Pferdeserum für 30 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschriff von 3 x 5 min mit PBS wurden die Schnitte mit FITC- konjugiertem Streptavidin 1: 100 in PBS für 30 min bei RT inkubiert. Das Streptavidin assoziierte dabei mit dem Biotin des Sekundärantikörpers, so daß die Antikörperbindungsstellen über die Fluoreszenz des FITC detektierbar wurden. Abschließend wurde nochmals für 3 x 5 min mit PBS gewaschen und die Schnitte mit DAPI Hard Set Mount eingedeckt.

3.2.4.2. Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten

Die Ratten- IgG- Färbung diente dem Nachweis von autologem gebundenen Ratten- IgG in den Nierenglomeruli der Versuchstiere. Methodisch entspricht die Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung mit Ausnahme des Sekundärantikörpers der Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung. In der Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung wurde als Sekundärantikörper ein biotinylierter Anti- Ratten- Antikörper eingesetzt.

3.2.4.3. Neph rin- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten

Zum Nachweis der Neph rin- Expression im Podozyten sowie zur Untersuchung dessen glomerulärer und podozytärer Distribution wurde eine Neph rin- Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zunächst wurden die Gewebsschnitte zur Proteindemaskierung in 1 l

Citratpuffer (pH 6,1) für 35 min in der Mikrowelle bei 680 W erhitzt und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Nach einem Waschschrift von 3 x 5 min in H₂O erfolgte der Block unspezifischer Bindungen durch 5 % Pferdeserum mit Avidin- Block 1: 25 in PBS für 30 min bei RT. Anschließend wurde 2 x 2 min mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper 1: 100 in 5 % Pferdeserum mit Biotin- Block 1: 25 in PBS über Nacht bei 4°C. Nach einem Waschschrift von 3 x 5 min mit PBS wurden die Schnitte mit Streptavidin- FITC 1: 100 in PBS für 30 min inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift von 3 x 5 min wurden die Schnitte mit DAPI Hard Set Mount eingedeckt.

3.2.4.4. α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten

Die α - Aktinin 4- Immunfluoreszenzfärbung diente der Darstellung des Aktin- bindenden Proteins α - Aktinin- 4 im Podozyten. Zur Proteindemaskierung erfolgte zunächst eine Erhitzung der Schnitte in Citratpuffer (pH 6,1) für 35 min in der Mikrowelle bei 680 W. Anschließend wurden die Schnitte auf Eiswasser für 15 min abgekühlt. Nach Waschen in H₂O für 3 x 5 min wurden durch Inkubation mit 5 % Ziegeserum in PBS mit 1: 25 Avidin- Block für 30 min bei RT unspezifische Bindungen blockiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift von 2 x 2 min mit PBS. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper 1: 200 in 5 % Ziegeserum in PBS mit Biotinblock 1: 25 über Nacht bei 4°C. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min mit PBS wurde mit Avidin- FITC 1: 100 in PBS für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift von 3 x 5 min mit PBS erfolgte das Eindecken mit DAPI Hard Set Mount.

3.2.4.5. Phalloidin- Färbung an Kulturpodozyten

Das bizyklische Peptid Phalloidin ist ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und dient der Visualisierung von filamentärem Aktin durch direkte Immunfluoreszenz. Das Phalloidin bindet spezifisch an F- Aktin und kann aufgrund eines gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs mithilfe von UV- Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Zur Durchführung der Phalloidin- Färbung wurden fixierte Zellen 3 x 5 min mit PBS gewaschen und für 10 min mit Alexa Fluor 568 Phalloidin 1: 1000 in PBS bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 x 5 min mit PBS gewaschen und mit DAPI Hard Set Mount eingedeckt.

3.2.4.6. Immunfluoreszenzfärbungen an Kulturpodozyten

Zur Darstellung von Nephrin, α -Aktinin-4 und β -Catenin in Kulturpodozyten wurden Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung der entsprechenden Primärantikörper durchgeführt. Zunächst wurden unspezifische Bindungen durch 30-minütige Inkubation der Zellen mit 2,5 % Pferdeserum in PBS geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 h bei RT. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte über einen biotinylierten Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:200 in 2,5 % Pferdeserum bei 30-minütiger Inkubation bei RT. Der Sekundärantikörper wurde durch Inkubation mit FITC-Avidin 1:100 in PBS für 30 min bei RT visualisiert. Im Anschluß an die spezifische Immunfluoreszenzfärbung wurde einer Phalloidin-färbung des F-Aktins durchgeführt und die Zellen mit DAPI Hard Set Mount eingedeckt.

3.2.4.7. DAPI- Kernfärbung

Die Kernfärbungen erfolgten durch das im Eindeckmedium enthaltende Diamidino-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI), einem blauen Fluoreszenzfarbstoff, der sich an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der kernständigen DNA anlagert.

3.2.4.8. Auswertung der Fluoreszenzfärbungen

Die Begutachtung und Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgte mit dem Axioskop 40 und dem LSM 510 beta. Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Tobias Meyer (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) erstellt.

3.2.5. Zellkultur

Die Zellkulturexperimente erfolgten mit einer Zelllinie konditional immortalisierter humaner Podozyten (AB 8/13), die freundlicherweise von Herrn Dr. Moin Saleem (Childrens Renal Unit, Bristol Royal Hospital for Children, Bristol, UK) zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden durch Transfektion mit einem temperatursensitiven SV40-T-Gen und einem Telomerase-Gen immortalisiert. Das große SV40-T-Antigen stammt aus dem Simianen Virus 40 (SV 40) aus der Gattung der Polyomaviren und besitzt die Fähigkeit, Zellen in Kultur zu transformieren, indem es die Funktion von Tumorsuppressorgen wie pRB und p53 stört. Die Zellen verlassen die G₁-Phase des Zellzyklus und treten in die S-Phase über, in der eine Replikation der DNA stattfindet. Durch Transfektion mit dem SV40-T-Gen wurde eine dauerhafte Zellproliferation

bewirkt und der Übertritt in einen postmitotischen Zustand verhindert. Das SV40- T- Gen verfügt über eine Temperatursensitivität, d.h. bei Temperaturen um 33°C ist es aktiv und bewirkt eine Proliferation der Zellen. Bei 37°C wird es hingegen inaktiviert, so daß die Proliferation sistiert.

Die Transfektion mit einem Telomerase- Gen ermöglicht zudem eine nahezu unbegrenzte Zahl an mitotischen Zellteilungen. Telomere sind kurze repetitive DNA- Sequenzen, die an den Chromosomenenden lokalisiert sind. In humanen Zellen bewirkt jede mitotische Zellteilung einen Verlust von etwa 50- 100 bp dieser Telomerregionen. Der fortschreitende Verlust von DNA stellt einen entscheidenden die Lebenszeit der Zelle begrenzenden Faktor dar. Die Telomerase ist ein Enzym, das verlorene Telomere wiederherstellt und damit die mögliche Anzahl mitotischer Teilungen erhöht. Dies ist möglich, da die Telomerase neben einem Enzymanteil, der als reverse Transkriptase fungiert, über einen RNA- Anteil verfügt, der als Matritze der fehlenden Fragmente dient.

Generierung und Charakterisierung der Zelllinie wurden von Saleem et al. beschrieben (122). Bei der permissiven Temperatur von 33°C proliferieren die Zellen und weisen einen typischen Phänotyp auf. Bei der nicht- permissiven Temperatur von 37°C stellen die Zellen die Proliferation ein, durchlaufen charakteristische morphologische Veränderungen und exprimieren Marker differenzierter Podozyten.

3.2.5.1. Kultivierung von immortalisierten Podozyten

Die humanen immortalisierten Podozyten wurden in 75 cm²- Kulturflaschen in 15 ml Kulturmedium kultiviert. Alle 2- 3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Zur Proliferation wurden die Zellen unter permissiven Bedingungen (33°C, 5 % CO₂) kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 75 % unter permissiven Bedingungen wurden die Zellen zur Differenzierung in nicht- permissive Bedingungen (37°C, 5 % CO₂) überführt. Für Versuche mit differenzierten Podozyten wurden Zellen nach einer Kultivierung unter nicht- permissiven Bedingungen für 14- 21 Tagen herangezogen.

3.2.5.2. Aussäen von Podozyten auf Deckgläschen

Zur Aussaat von Kulturpodozyten auf Deckgläschen wurde eine 24- Loch- Platte mit autoklavierten Deckgläschen (13 mm) bestückt und diese mit Kollagenlösung bedeckt. Nach 60- minütiger Inkubation bei RT wurde das Kollagen abgesaugt und die Gläschen mit PBS gespült. Anschließend wurden undifferenzierte Podozyten passagiert und in einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ pro Vertiefung ausgesät.

3.2.5.3. Fixierung von Podozyten auf Deckgläschen

Zur Fixierung von Podozyten auf Deckgläschen wurden diese mit 400 µl Fixierlösung bedeckt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Deckgläschen 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Bei längerfristiger Lagerung der Deckgläschen bei 4°C wurde dem auf den Deckgläschen verbleibenden PBS 0,09 % Natriumacid zum Schutz vor Kontaminationen zugefügt.

3.2.5.4. Zellzahlbestimmung in der Neubauer- Kammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer- Kammer. Es wurden jeweils 4 große Quadranten ausgezählt und das arithmetische Mittel $\bar{X}$ der Zählung gebildet.

Die Zellzahl pro ml der Suspension errechnete sich dann durch: $\bar{X} \times 10^4$

3.2.5.5. Passagieren der Zellen

Erreichten die unter permissiven Bedingungen kultivierten Podozyten eine Konfluenz von 75 %, wurden sie entweder zur Differenzierung in nicht- permissive Bedingungen überführt oder zur Erhaltung der Zellkultur auf neue Kulturgefäße überführt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach Absaugen des alten Mediums mit PBS gewaschen, um Serumreste, die die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen können, zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit 3 ml Trypsin- EDTA- Lösung gleichmäßig bedeckt und für 3 min bei 33°C inkubiert. In dieser Zeit löste das Trypsin die adhären Podozyten durch seine proteolytische Aktivität von der Unterlage ab. Zu der Zellsuspension wurden 12 ml vorgewärmten Kulturmediums gegeben, um den Trypsinverdau zu stoppen. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 4- 5 Kulturflaschen verteilt, in die bereits erwärmtes Medium vorgelegt war, so daß ein Medium- Endvolumen von 15 ml vorlag. Die Kulturflaschen wurden nun bei permissiven Bedingungen bis zum erneuten Erreichen einer Konfluenz von 75 % inkubiert.

3.2.5.6. Auftauen gefrierkonservierter Podozyten

Zur langfristigen Konservierung wurden Podozyten aliquotiert und in Flüssigstickstoff gelagert. Das Auftauen der Podozyten erfolgte im Wasserbad bei 37°C für 1- 2 min. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Medium vorsichtig resuspendiert und in eine 25 cm²- Kulturflasche mit 9 ml Kulturmedium überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Kulturmedium.

3.2.6. Zellkulturexperimente

3.2.6.1. Differenzierungsexperiment

Um den Einfluß des Differenzierungsprozesses des Podozyten auf die UCH- L1- Expression zu untersuchen, wurden Zellkulturflaschen, deren Podozyten eine Konfluenz von etwa 75 % aufwiesen, von permissiven zu nicht- permissiven Bedingungen überführt und dort für bis zu 21 Tagen zur Differenzierung belassen. An den Tagen 0, 4, 7, 14 und 21 wurden jeweils die Zellen einiger Flaschen geerntet, pelletiert und unter Zugabe des Proteasomhemmers MG 132 (Endkonzentration 10 μ M) bei -80°C eingefroren. Ein Teil der Kulturflaschen wurde nach 14 Tagen unter nicht- permissiven Bedingungen für 7 Tage wiederum permissiven Bedingungen ausgesetzt, um eine Entdifferenzierung der Zellen auszulösen. Die Zellen wurden gesammelt und bei -80°C gelagert.

3.2.6.2. ECM- Experiment

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Extrazellulärmatrizes auf das Wachstumsverhalten und auf die UCH- L1- Expression von Podozyten wurden Kulturpodozyten auf 75 cm²- Kulturflaschen bzw. 24- Loch- Platten ausgesät, die eine Beschichtung mit Kollagen I, Kollagen IV oder Laminin aufwiesen. Nach ausreichender Proliferation unter permissiven Bedingungen wurden die Kulturgefäße unter nicht- permissiven Konditionen für 14 Tage kultiviert bzw. unter dem Lichtmikroskop begutachtet.

3.2.6.3. Inkubation von Podozyten mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444

Um Informationen über die Funktion der UCH- L1 im Kulturpodozyten zu erhalten, wurden die Zellen mit einem reversiblen spezifischen Hemmstoff der UCH- L1- Hydrolaseaktivität (LDN 57444) inkubiert. LDN 57444 ist ein kompetitiver Inhibitor der UCH- L1- Hydrolaseaktivität mit einer 28- fach größeren Selektivität gegenüber der UCH- L3 (77, 143). Die Zellen wurden für diese Experimente auf Kollagen I- beschichteten 24- Loch- Platten und 75 cm²- Kulturflaschen unter nicht- permissiven Bedingungen für 14 Tage kultiviert, um eine Differenzierung zu erlauben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit LDN 57444 in DMSO mit einer Konzentration von 5 μ M, 10 μ M und 50 μ M bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO über einen Zeitraum von 30 bzw. 60 min. Im Anschluß wurden die Zellen gesammelt oder für spätere Immunfluoreszenzfärbungen fixiert.

3.2.7. Transfektion von Podozyten

Zur Analyse von Auswirkungen der UCH- L1 auf die Morphologie und Proteinexpression im Podozyten wurde eine Transfektion von Kulturpodozyten mit einem UCH- L1-exprimierenden Vektor durchgeführt. Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd- DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Man unterscheidet bei der Transfektion zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektion handelt es sich um eine transiente Transfektion, bei der es zu einer vorübergehenden Expression des Fremdproteins kommt, bevor die transfizierte Zelle zugrunde geht oder der Transfektionsvektor von der Zelle abgestoßen wird. Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion erfolgte visuell über die Detektion von GFP, dem grünen fluoreszierenden Protein, das als Fusionsprotein mit der UCH- L1 von der Zelle synthetisiert wurde. Je nach Zellart sind verschiedene Verfahren zur Transfektion geeignet. Neben chemischen und biologischen Verfahren existieren verschiedene physikalische Verfahren zum Einbringen der Fremd- DNA, von denen hier die Elektroporation herangezogen wurde. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch Spannungsimpulse für DNA permeabel gemacht. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zur Polarisierung der Membran. Erreicht die transmembranäre Spannung einen kritischen Wert, so kommt es durch eine lokale Zerstörung der Membranintegrität spontan zu einer erheblichen Leitfähigkeitserhöhung, die die Aufnahme der Vektor- DNA in die Zelle zur Folge hat.

3.2.7.1. GFP (green fluorescent protein)

Die Transfektion der Podozyten erfolgte mit einem Vektor, der einen für das grüne fluoreszierende Protein (GFP) kodierenden Abschnitt enthielt. Das GFP ist ein 1962 erstmalig von Osamu Shimamura beschriebenes Protein einer nordpazifischen Quallenart (*Aequorea victoria*). Das kleine Protein mit einer Masse von 27 kD emittiert bei Bestrahlung mit ultraviolettem oder blauem Licht leuchtend grünes Licht und konnte bereits in zahlreichen Eu- und Prokaryoten erfolgreich als Rezeptorgen exprimiert werden. Über die Fluoreszenz läßt sich nachweisen, ob beispielsweise ein bestimmter Promotor aktiv ist, ob ein mit dem GFP gekoppeltes Protein synthetisiert wird und wie es sich im Organismus verteilt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Transfektion mit einem EGFP- UCH- L1- Vektor, der nach erfolgter Transfektion von der Zelle als GFP- UCH- L1- Fusionsprotein

exprimiert wurde. Das GFP diente als Markerprotein, mit dem eine Aufnahme der Plasmid- DNA in die Zelle nachgewiesen wurde und erfolgreich transfizierte Zellen detektiert werden konnten. Neben der Kontrolle des Transfektionserfolges diente die Kopplung der UCH- L1 mit GFP der Visualisierung der intrazellulären Lokalisation des Fusionsproteins. Als Kontrolle wurde eine Transfektion mit einem EGFP- Leervektor durchgeführt.

3.2.7.2. Transfektion von immortalisierten Podozyten mit EGFP und EGFP- UCH- L1

Zur Durchführung der Elektroporation wurden vier Kulturflaschen mit unter permissiven Bedingungen gehaltenen Podozyten bei einer Konfluenz von etwa 75 % trypsiniert. Nach Zufügen von 7 ml Kulturmedium pro Flasche wurden die Zellsuspensionen in ein 50 ml- Falcon- Tube überführt und vermischt. Anschließend wurde eine Zellzählung mit der Neubauer- Kammer durchgeführt, und jeweils eine Zellsuspension mit 10^6 Zellen in ein neues Falcon- Tube überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm bei 4°C und Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 400 µl Opti- MEM resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 20 µg Plasmid- DNA (EGFP- UCH- L1 bzw. EGFP) pipettiert und die Suspension in eine Genepulser- Küvette überführt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Nach Protokoll von Kretzler et al. (67) erfolgte die Elektroporation bei 250 V/cm und 690 µF in einem XCell Genepulser Elektroporator. Im Anschluß wurden 600 µl Opti- MEM in die Küvetten pipettiert und mit der Zellsuspension vermischt. Die Zellsuspension sowie 9 ml Zellmedium wurden in 25 cm²- Kulturflaschen überführt und für 24 h bei permissiven Bedingungen inkubiert, um eine Expression der Plasmid- DNA vor dem weiteren Experimentieren zu erlauben. Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 25 konnten die transfizierten Zellen visualisiert werden.

3.2.8. Molekularbiologie

3.2.8.1. Isolierung von RNA aus Zellen

Um die Genexpression in Kulturpodozyten zu analysieren, wurde zunächst eine RNA- Isolation mithilfe eines „RNeasy Plus- Kit“ durchgeführt. Diese Methode basiert auf den besonderen Bindungseigenschaften einer Silikagel- Membran, die RNA sehr spezifisch bindet, während übrige Substanzen sowie genomische DNA entfernt werden. Kleine RNA mit < 200 Nukleotiden wie rRNA und tRNA werden ebenfalls abgetrennt. Es findet eine Isolation von RNA- Molekülen mit einer Länge von > 200 Nukleotiden und damit eine Anreicherung von mRNA statt, die dann mit RNase- freiem Wasser eluiert wird. Zunächst

wurden die Zellen trypsinisiert, gesammelt und pelletiert. Dabei wurde sichergestellt, daß die Zellzahl nicht über 10^7 Zellen pro Ansatz lag. Anschließend wurden 350 µl Lysispuffer (RLT + β -ME) zum Zellpellet gegeben und die Suspension mithilfe des Vortexgerätes vermischt. Der Lysepuffer enthielt Guanidinisothiocyanat (GITC) und β -Mercaptoethanol, die eine Denaturierung und Inaktivierung von RNasen bewirkten. Anschließend wurde das Lysat auf eine QIAshredder- Spinsäule übertragen und für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Homogenisierung des Lysats und ermöglichte eine höhere RNA-Ausbeute. Zur Optimierung der Bindungseigenschaften der RNA wurden anschließend 350 µl 70 % Ethanol zum Lysat pipettiert und vorsichtig vermischt. Das Lysat wurde auf eine RNeasy Mini- Säule aufgetragen, für 15 s zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Anschließend wurden 700 µl Waschpuffer (RW1) auf die Säule aufgetragen, 5 min inkubiert, die Säule für 15 s zentrifugiert und der Durchfluß wiederum verworfen. Im nachfolgenden Schritt wurden 500 µl des zweiten Waschpuffers (RPE) auf die Säule aufgetragen und für 15 s abzentrifugiert. Anschließend wurden nochmals 500 µl Waschpuffer aufgetragen und die Säule für 2 min zentrifugiert, um ein Trocknen der Säule zu erreichen und Kontaminationen mit Ethanol zu verhindern. Zum Eluieren der RNA wurden 30 µl RNase- freies Wasser auf die Säule aufgetragen und diese für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluß nochmals auf die Säule pipettiert und diese wiederum für 1 min zentrifugiert, um eine höchstmögliche Ausbeute an RNA zu erreichen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13400 rpm und RT in einer Mini Spin Tischzentrifuge.

3.2.8.2. Bestimmung der RNA- Konzentration durch Spektrophotometrie

Zur Quantifizierung des RNA- oder DNA- Gehaltes einer Probe sowie zur Überprüfung deren Reinheitsgrades wurde eine photometrische Messung bei Wellenlängen von 260 und 280 nm durchgeführt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, während das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt. Durch die Bildung der 260 nm/ 280 nm- Ratio können Rückschlüsse auf den Reinheitsgrad einer Probe gezogen werden. Liegt der Wert einer DNA- Probe bei 1,8, so ist von einem hohen Reinheitsgrad auszugehen, bei RNA- Proben sollte der Wert bei 2,0 liegen. Liegt die 260 nm/ 280 nm- Ratio unter diesem Wert, ist von einer Kontamination durch Proteine, Phenol o.ä. auszugehen. Für die Messung der Nukleinsäurekonzentration wurde ein NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer verwendet. Zunächst erfolgte die Eichung des Gerätes auf die Extinktion $E_{\lambda}=0$ durch Auftragen von 2 µl H_2O auf das untere Meßpedal und Messung der

Extinktion bei Wellenlänge $\lambda_1 = 260$ nm und $\lambda_2 = 280$ nm (E_{260} und E_{280}). Anschließend wurden 2 μ l Probe auf das Meßpedal aufgetragen und deren E_{260} und E_{280} bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration der Proben wurde durch das Spektrophotometer auf Grundlage des Lambert- Beerschen Gesetzes abhängig von der gemessenen Extinktion E_λ , der optischen Wellenlänge d und dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_λ berechnet.

3.2.8.3. RT- PCR (Reverse Transkriptase- PCR)

Durch die RT- PCR ist es möglich, das Expressionsmuster zellulärer Proteine zu untersuchen, indem die spezifische mRNA semiquantitativ nachgewiesen wird. Da viele Polymerasen nicht in der Lage sind, RNA als Template zu verwenden, wird diese in einem ersten Schritt mithilfe einer reversen Transkriptase in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann in der anschließenden PCR als Matrize dient. Die reverse Transkriptase stammte aus dem Moloney- Murine- Leukemia- Virus (MMLV) und weist eine RNA- abhängige Polymeraseaktivität auf.

3.2.8.3.1. cDNA- Herstellung durch reverse Transkription

Zur Herstellung der cDNA wurden 1 μ g RNA und 0,5 μ l Oligo(dT)₁₂₋₁₈- Primer in ein PCR- Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC- H₂O auf ein Endvolumen von 10 μ l ergänzt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min im Thermocycler auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Hierbei kam es zu einer Hybridisierung der Oligo(dT)- Primer mit dem komplementären Poly- A- Schwanz der RNA bei gleichzeitigem Verhindern der Renaturierung der RNA. Nach Abkühlen auf Eiswasser wurden dem Ansatz 9 μ l DEPC- H₂O, 2,5 μ l 10x RT- Puffer, 0,5 μ l Ribonukleaseinhibitor RNasin (40 U/ μ l), 2 μ l 10 mM dNTP- Mix und 1 μ l M- MuLV reverse Transkriptase zugefügt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Während der Inkubationszeit kam es zu einem komplementären Anlagern der Nukleotide an die RNA. Die RNA- DNA- Hybride wurden anschließend durch 5-minütiges Erhitzen auf 94°C denaturiert. Abschließend wurden dem Ansatz 75 μ l steriles H₂O zugefügt, so daß ein Endvolumen von 100 μ l erreicht wurde. Es wurde für jeden Ansatz eine Kontroll- PCR ohne reverse Transkriptase durchgeführt, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

3.2.8.3.2. Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht es, ein DNA- Segment, welches von zwei bekannten

Nukleotidsequenzen umrahmt ist, beliebig zu vervielfältigen. Zwei Oligonukleotide dienen als Primer für eine DNA- Polymerase, die ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) isoliert wurde und eine große Hitzebeständigkeit aufweist. Für die PCR wird die DNA zunächst durch Erhitzen auf 94°C denaturiert. Anschließend erfolgt bei geringer Temperatur die Hybridisierung der Einzelstränge mit den Oligonukleotidprimern (Annealing). Die Primer lagern sich jeweils komplementär an die Einzelstrang- DNA an und flankieren das zu amplifizierende Segment gegenläufig. Die optimale Hybridisierungstemperatur hängt aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen von der Zahl der möglichen GC- und AT- Basenpaarungen zwischen Primer und Einzelstrang- DNA ab. Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde annäherungsweise nach folgender Formel bestimmt:

$$T_{\text{Hyb}} = (\text{Anzahl von A-T}) \times 2 + (\text{Anzahl von G-C}) \times 4$$

Im folgenden Polymerisationsschritt verlängert die DNA- Polymerase ausgehend von den Primern in Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) den jeweils komplementären DNA- Strang (Elongation). Durch wiederholte Denaturierung, Annealing und Elongation wird der gewählte DNA- Abschnitt exponentiell vermehrt.

Zur Durchführung der PCR wurden je 1 µl 100 µM Primer, 12,5 µl 2x Hot Star Taq Mastermix, 0,5 µl H₂O und 10 µl cDNA in ein PCR- Reaktionsgefäß pipettiert. Der Hot Star Taq Mastermix enthielt eine Taq- Polymerase, Reaktionspuffer, MgCl₂ und dNTPs. Zunächst wurde die Taq- Polymerase durch 15- minütiges Erhitzen auf 95°C aktiviert. Es folgte die Denaturierung der DNA bei 94°C für 40 s. Anschließend erfolgte das Annealing für 40 s, wobei die Temperatur sich nach dem eingesetzten Primerpaar richtete. Im Anschluß erfolgte für 40 s bei 72°C die Elongation der DNA. Die Zyklenanzahl von Denaturierung, Annealing und Elongation richtete sich ebenfalls nach dem Primerpaar. Zum Abschluß erfolgte nochmals eine Inkubation bei 72°C für 7 min, um die vollständige DNA- Elongation zu ermöglichen. Die PCR wurde durch Abkühlen auf 4°C beendet. Sämtliche Pipettierschritte erfolgten in der Sterilbank, um eine Kontamination der Proben mit DNA oder RNasen zu vermeiden.

3.2.8.4. Auftrennung der PCR- Amplifikationsprodukte und Dokumentation

Die amplifizierten DNA- Abschnitte wurden in einem 2%- TAE- Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wanderten die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA- Fragmente durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode und wurden durch Ethidiumbromid (EtBr) unter UV- Licht

visualisiert. Agarose ist ein langkettiges Polysaccharid aus D- und L- Galaktose und bildet im Gel ein dreidimensionales Netzwerk mit Porendurchmessern von 50- 200 nm. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA in dem Gel hängt von der Größe und Konformation der DNA- Fragmente, der Agarosekonzentration und der angelegten Spannung ab. Ethidiumbromid (EtBr) ist ein roter Phenanthridin- Farbstoff, der in der Molekularbiologie zum Nachweis von Nukleinsäuren verwendet wird. Einzelne Ethidiumbromid- Moleküle interkalieren sequenzspezifisch zwischen die Basen der DNA, wodurch sich die Fluoreszenz des Ethidiumbromids bei Anregung mit UV- Licht im Vergleich zum ungebundenen Molekül 20- 30- fach erhöht. Dieser Mechanismus ermöglicht die Detektion von Nukleinsäurebanden im Agarosegel, indem das Ethidiumbromid nukleinsäurehaltige Bereiche im UV- Licht hell aufleuchten läßt.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde ein 2%- iges Agarosegel mit 0,2 µg/ml EtBr angesetzt und in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gefüllt. Nach Abschluß der Polymerisation wurde der Kamm entnommen und der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Das Gel wurde mit TAE- Laufpuffer bedeckt. Je 10 µl DNA- Probe wurden mit Probenpuffer vermenget und neben 4 µl PCR- Größenmarker in die in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Laufzeit von 1 h. Nach Abschluß der Auftrennung der DNA- Fragmente wurde das Gel der Kammer entnommen, die EtBr- DNA- Komplexe mithilfe eines UV- Transilluminators visualisiert und fotografisch dokumentiert.

3.2.8.5. Quantitative PCR UCH- L1

Die Durchführung einer Real Time PCR zur Quantifizierung der UCH- L1- mRNA erfolgte freundlicherweise durch Herrn Stefan Gatzemeyer (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung des SYBR Green Jump Start Kits (Sigma) nach den Angaben des Herstellers.

3.2.8.6. Klonierung

Als Klonierung bezeichnet man eine molekularbiologische Methode, bei der ein Gen oder DNA- Fragment in einen Vektor integriert wird und die rekombinante DNA nachfolgend in einem geeigneten Wirtssystem vermehrt und exprimiert wird. Bei der Klonierung werden Vektor- und Fremd- DNA zur Erzeugung kompatibler Enden zunächst mit Restriktionsenzymen behandelt. Dies sind aus Bakterien isolierte Endonukleasen, die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Dabei können Fragmente mit

einzelsträngigen Überhängen („sticky ends“) oder überhangslose Fragmente („blunt ends“) entstehen. Die zueinander komplementären Enden von Vektor- und Ziel- DNA hybridisieren miteinander und werden in der nachfolgenden Ligation, die durch eine T4- DNA- Ligase katalysiert wird, kovalent miteinander verbunden. Zur Erleichterung von Klonierungsexperimenten tragen Vektoren meist eine künstlich eingefügte Region (Polylinker oder Multiple Cloning Site (MCS)), die eine Reihe singulärer Restriktionsschnittstellen enthält. Das Plasmid wird von Restriktionsenzymen, die eine Erkennungssequenz in der MCS besitzen, ausschließlich an dieser Stelle geschnitten. Mit dem Vektor- Insert- Konstrukt können kompetente Bakterienzellen transformiert werden. Die Selektion der Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden, erfolgt durch ein im Plasmidvektor enthaltenes Antibiotikumresistenzgen und Wachstum auf entsprechend antibiotikumhaltigen Agarplatten.

Die Klonierung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit dem Ziel, durch eine transiente bzw. stabile Transfektion von Kulturpodozyten mit dem UCH- L1- Gen eine zelluläre Überexpression der UCH- L1 zu erreichen. Durch die Überexpression sollten Erkenntnisse über deren Funktion im Podozyten gewonnen werden. Die transiente Transfektion erfolgte durch Elektroporation, bei der der EGFP- UCH- L1- Vektor vorübergehend in die Zellen eingebracht werden konnte. Die stabile Transfektion, bei der das UCH- L1- Gen dauerhaft in das Genom der Wirtszelle integriert wird, sollte mithilfe des retroviralen murinen Stammzellvektors pMSCVpuro erfolgen.

3.2.8.6.1. Restriktionsverdau des EGFP- UCH- L1- Vektors

Aus transformierten Bakterienzellen isolierte EGFP- UCH- L1- Plasmid- DNA wurde mithilfe von Restriktionsenzymen insertnah aufgeschnitten und das UCH- L1- Fragment auf diese Weise herausgetrennt. Ziel dieses Vorgehens war die Generierung eines geeigneten EGFP- Kontrollvektors sowie die Isolierung des UCH- L1- Genfragmentes, das anschließend in den pMSCV- Vektor kloniert werden sollte.

Um das UCH- L1- Genfragment aus dem EGFP- UCH- L1- Vektor zu entfernen und damit einen geeigneten Kontrollvektor zu erhalten, erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BamH1 und Bgl2, für die der Vektor beiderseits der Klonierungsstelle Erkennungssequenzen aufwies. Im Reaktionsansatz wurden 1 µg Plasmid- DNA, 1 µl BamH1, 1 µl Bgl2, 3 µl BamH1- Puffer (10x), 3 µl BSA (10x) und 21 µl H₂O vermengt und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Durch diesen Restriktionsverdau wurde das Insert aus dem Vektor entfernt und dieser gleichzeitig mit kompatiblen Enden versehen, die

nachfolgend direkt miteinander ligiert werden konnten.

Als Restriktionsenzyme für die Isolierung des UCH- L1- Fragmentes wurden XhoI und BamHI gewählt, die ebenfalls über Erkennungssequenzen beiderseits des Inserts verfügten. Pro Reaktionsansatz wurden 1 µg Plasmid- DNA, 1 µl BamHI, 1 µl XhoI, 3 µl BamHI- Puffer (10x), 3 µl BSA (10x) und 21 µl H₂O vermischt und für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

3.2.8.6.2. Elution des UCH- L1- Fragmentes

Der Restriktionsansatz des EGFP- UCH- L1- Vektors mit XhoI und BamHI wurde nach dem Verdau mit Ladepuffer versetzt und neben einem Längenmarker in einem ethidiumbromidhaltigen 1%- TAE- Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA- Bande auf Höhe von 670 bp wurde unter UV- Licht mit einem Skalpell aus dem Gel getrennt. Die anschließende Isolation der DNA- Fragmente aus dem Gel erfolgte durch Zentrifugation. Hierzu wurde in den Boden eines 1,5 ml- Probengefäßes mit einer Kanüle ein Loch gestochen und mit etwas Glaswolle abgedichtet. In dieses Probengefäß wurde das Gelstück gegeben und das so vorbereitete Gefäß in einem weiteren Probengefäß bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluß wurde das Volumen des Eluates bestimmt und eine Ethanolfällung der DNA durchgeführt. Zu dem Eluat wurde das 2- fache Volumen an 100 % Ethanol pipettiert und der Ansatz für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden zu dem Pellet 300 µl 70 % Ethanol pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand entfernt und das DNA- Pellet für 10 min luftgetrocknet.

3.2.8.6.3. Restriktionsverdau des pMSCV- Vektors

Der murine Stammzellvektor pMSCV wurde mithilfe der Restriktionsenzyme BglII und XhoI an ihren Erkennungssequenzen innerhalb der MCS aufgeschnitten und linearisiert. In einem Reaktionsgefäß wurden hierzu 1 µg pMSCV- DNA, 1 µl BglII, 1µl XhoI, 3 µl Neb3- Puffer (10x), 3 µl BSA (10x) und 21 µl H₂O vermischt und für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

3.2.8.6.4. Ligation von pMSCV und UCH- L1- Insert

In der Ligation wurden die komplementären Enden von Vektor und Insert kovalent miteinander verknüpft. Die Bindung erfolgte durch Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einer 3'- Hydroxygruppe und einer 5'- Phosphatgruppe und wurde ATP-

abhängig durch das Enzym T4- DNA- Ligase katalysiert. Sowohl pMSCV als auch das UCH- L1- Insert wurden durch Xho1 geschnitten und wiesen entsprechend identische klebrige Enden auf, die sich komplementär aneinanderlagerten und in der Ligase- Reaktion kovalent verbunden wurden. Die Restriktionsenzyme BamH1 und Bgl2 produzierten beim DNA- Verdau einen identischen 5'- Überhang (GATC) an pMSCV- DNA und UCH- L1- Fragment und schafften damit miteinander kompatible Enden. Diese lagerten sich komplementär aneinander und wurden enzymatisch ligiert. In einem Ligationsansatz wurden zur Generierung eines pMSCV- UCH- L1- Vektors 20 µl UCH- L1- DNA- Fragment, 2 µl pMSCV- DNA, 1 µl T4- Ligase, 3 µl Ligase- Puffer (10x) und 4 µl H₂O vermischt und für 2 h bei 27°C inkubiert. In einem zweiten Ligationsansatz wurden 20 µl EGFP- Restriktionsansatz, 1 µl T4- Ligase, 3 µl Ligase- Puffer (10x) und 6 µl H₂O vermengt und für 2 h bei 27 °C inkubiert, um den kovalenten Schluß des Plasmids nach Entfernung des UCH- L1- Fragmentes zu erreichen. Jeweils 1 µl des Ligationsansatzes wurde anschließend in kompetente E. coli (DH5α) transformiert.

3.2.8.6.5. Plasmidpräparation (Miniprep)

Die Plasmidpräparation zur Gewinnung von Plasmid- DNA aus den transformierten Bakterien zur Überprüfung des Klonierungserfolges erfolgte mithilfe des „Qiagen Plasmid Mini Kit“ nach den Angaben des Herstellers. Sie erlaubt Ausbeuten von bis zu 20 µg Plasmid- DNA. Das Prinzip der DNA- Isolation entspricht dem des „Qiafilter Plasmid Midi Kit“. Zunächst wurden jeweils 3 µl ampicillinhaltiges LB- Medium mit einer Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 300 µl Puffer (P1) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl des Lysepuffers (P2) wurde der Ansatz vermischt und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Puffer (P3) hinzugefügt und der Ansatz auf Eis für 5 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm bei 4°C für 10 min. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein zuvor mit 1 ml Puffer (QBT) äquilibriertes QIAGEN- Tip 20 überführt. Nach Durchlauf durch die Säule wurde diese mit 2 x 2 ml Puffer (QC) gewaschen und die DNA mit 800 µl Puffer (QF) eluiert. Anschließend erfolgte die Präzipitation der DNA durch Zugabe von 560 µl Isopropanol zum Eluat. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min mit anschließendem Verwerfen des Überstandes. Das DNA- Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Anschließend wurde das DNA- Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und in 30 µl

DNase- freiem H₂O gelöst.

3.2.8.6.6. Diagnostische Verdaus

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden diagnostische Verdaus mit den Enzymen Hind3, Xho1 und Nco1 am klonierten Vektor pMSCV- UCH- L1 und am Ausgangsvektor pMSCV durchgeführt. Xho1 besaß in beiden Vektoren eine Erkennungssequenz innerhalb der MCS. Die Erkennungssequenz von Hind3 lag auf dem pMSCV- Plasmid außerhalb der MCS und war ebenfalls in beiden Plasmiden vorhanden. Die Schnittstelle von Nco1 befand sich innerhalb des UCH- L1- Genabschnittes und schnitt somit nur Plasmide, die erfolgreich kloniert wurden und ein UCH- L1- Insert aufwiesen. Insgesamt wurden sechs Restriktionsansätze hergestellt. In einem ersten Ansatz wurden 1 µl DNA, 1 µl Hind3, 1 µl Xho1, 3 µl BSA (10x), 3 µl Neb2- Puffer (10x) und 21 µl H₂O vermischt. Der zweite Ansatz enthielt 1 µl DNA, 1 µl Hind3, 1 µl Nco1, 3 µl Neb2- Puffer (10x) und 24 µl H₂O. In einem Single- Digest- Ansatz wurden 1 µl DNA, 1 µl Nco1, 3 µl Neb2- Puffer (10x) und 25 µl H₂O vermischt. Es wurde jeweils ein Ansatz mit dem klonierten Plasmid pMSCV- UCH- L1 und dem Ausgangsplasmid pMSCV hergestellt. Nach Inkubation der Restriktionsansätze für 1,5 h bei 37°C wurden jeweils 3 µl der Ansätze auf ein 0,8 %- Agarosegel aufgetragen und bei 50 V über 2 h elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.8.6.7. Sequenzierung von pMSCV- UCH- L1

Um Punktmutationen oder sonstige Fehler in der Basenabfolge der klonierten DNA zu erkennen, wurde eine Sequenzanalyse des pMSCV- UCH- L1- Plasmids durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Als Sequenzierungsprimer wurden pMSCV- Primer benutzt.

3.2.9. Bakterienkultur

3.2.9.1. Transformation von chemisch kompetenten E.- coli- Bakterien

Als Transformation wird die Übertragung genetischen Materials in Form freier DNA in die Zelle bezeichnet. Einige Bakterienstämme, insbesondere grampositive wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, verfügen über eine natürliche Kompetenz, d.h. sie sind unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder in bestimmten Wachstumsphasen zur Aufnahme von freier DNA befähigt. Dahingegen sind viele gramnegative Bakterienarten unter normalen Kulturbedingungen nicht in der Lage, DNA zu binden und aufzunehmen.

Sie müssen vor der Transformation erst artifiziell kompetent gemacht werden. Durch Techniken wie Ca^{2+} - Schock, Protoplastierung und Elektroporation kann bei einem Großteil der Bakterien eine Transformation erreicht werden. Dabei können die transformierten Bakterien mittels eines auf dem verwendeten Plasmid vorhandenen Antibiotikums Resistenzgens von den nicht transformierten Zellen selektiert werden. Bei den für die Transformation verwendeten Bakterien handelte es sich um bereits chemisch mit einer Kompetenz versehene E. coli- Bakterien (DH5 α).

Für die Transformation wurden zunächst 2 ng Plasmid- DNA mit 25 μl Bakteriensuspension vorsichtig vermischt und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 45 s auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und dann wieder für 2 min auf Eis gestellt (Kälteschock). Zusätzlich wurden 100 μl gekühltes SOC-Medium (4°C) zu den Bakterien pipettiert. Im Anschluß wurde die Bakteriensuspension mit einem Drigalski- Spatel auf einer antibiotikumhaltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten konnten dann mit Parafilm verschlossen für etwa einen Monat bei 4°C gelagert werden. Zur längerfristigen Lagerung von transformierten E. coli- Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt.

3.2.9.2. Bakterien- Übernachtkultur

Zur Plasmidpräparation wurden je 25 ml LB- Medium mit einer Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator belassen. Das LB- Medium wurde dabei mit einem Antibiotikum versehen, das dem Resistenzgen des Transfektionsplasmids entsprach.

3.2.9.3. Längerfristige Lagerung der Bakterien

Zur Anfertigung einer Bakterien- Langzeitkultur wurden 850 μl einer frischen Bakterienübernachtkultur mit 150 μl Glycerin vermischt und in einem 2 ml- Gefrier-Röhrchen bei -80°C gelagert.

3.2.9.4. Plasmidpräparation (Midiprep)

Die Plasmidpräparation erfolgte zur Gewinnung von Plasmid- DNA aus transformierten Bakterien. Sie wurde mithilfe des „Qiafilter Plasmid Midi Kit“ entsprechend dem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt. Diese Methode basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse, auf welche unter geeigneten Salz- und pH- Bedingungen die Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher- Matrix folgt. Die negativ geladenen Phosphate am Rückgrat des Plasmids interagieren dabei mit den positiven Ladungen auf der Oberfläche

der Matrix. In einem Waschschrift bei mittlerer Salzkonzentration werden RNA, Proteine, Farbstoffe und niedermolekulare Verunreinigungen entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt durch einen Hochsalz- Puffer. Im Anschluß an die Elution wird eine Isopropanol- Fällung der Plasmid- DNA durchgeführt, die dem gleichzeitigen Konzentrieren und Entsalzen dient.

Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 *g* für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml des Puffers P1 resuspendiert, welcher im Vorfeld mit einer RNase versehen und bei 4°C vorgekühlt wurde. Anschließend wurden 4 ml des NaOH- SDS- Lysepuffers (P2) hinzugefügt, durch Invertieren mit der Suspension vermenget und 5 min inkubiert. Das SDS löste aus den Zellmembranen Phospholipide und Proteine heraus, wodurch die Zelllyse eingeleitet wurde, während die Natronlauge Proteine sowie Plasmid- DNA denaturierte. Durch Zugabe von 4 ml sauren Kaliumacetats (P3) wurde die Lyse beendet. Die hohe Salzkonzentration führte zur Präzipitation des SDS, wobei denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer in Salz- Detergenz- Komplexen eingeschlossen wurden. Die Plasmid- DNA blieb aufgrund ihrer geringen Größe und Konfiguration in dem klaren Überstand gelöst. Das Lysat wurde in den Spritzenkörper der QIAfilter Filtrationseinheit überführt und für 10 min inkubiert. In dieser Zeit sammelt sich das Präzipitat aus Proteinen, genomischer DNA und Detergenz an der Oberfläche der Lösung. Anschließend wurde der Spritzenkolben in den Spritzenkörper eingesetzt und das Zelllysats in eine zuvor mit 4 ml Puffer (QBT) äquilibrierte QIAGEN- Tip überführt. Durch die Passage des Filters wurde das Lysat vollständig von Präzipitatresten befreit. Beim Durchfließen der Säule durch das Lysat wurde die Plasmid- DNA am Ionenaustauscherharz gebunden, während degradierte RNA und Zellproteine die Säule in der Durchflussfraktion passierten. Im anschließenden Waschschrift mit 2 x 10 ml des Waschpuffers (QC) wurden Rückstände an RNA oder Proteinen ausgewaschen, ohne das Bindungsverhalten der Plasmid- DNA zu beeinflussen. Anschließend erfolgte die Elution der Plasmid- DNA durch 5 ml eines Hochsalzpuffers (QF). Durch eine Isopropanolfällung mit 3,5 ml Isopropanol wurde die eluierte Plasmid- DNA anschließend präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 15000 *g* für 30 min bei 4°C wurde das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 15000 *g* für 10 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet für 10 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl DNase- freiem H₂O gelöst.

3.2.9.5. Messung der DNA- Konzentration

Die Messung der DNA- Konzentration erfolgte wie unter 3.2.8.2. beschrieben mithilfe des NanoDrop ND- 1000 Spektrophotometers.

3.2.10. Statistik

Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (MW $\pm$ SEM) angegeben. Der paarige Student- T- Test wurde zum Vergleich von Mittelwerten innerhalb einer experimentellen Gruppe verwendet. Daten aus zwei Gruppen wurden durch den unpaarigen Student- T- Test verglichen. Werte für $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Statistische Berechnungen wurden mit dem Programm Excel durchgeführt.

IV. Ergebnisse

4.1. Die passive Heymann Nephritis

Um die Regulation und Funktion der UCH- L1 in glomerulären Epithelzellen zu untersuchen, wurde in Ratten eine passive Heymann- Nephritis induziert, die ein etabliertes Tiermodell der humanen idiopathischen membranösen Glomerulonephritis darstellt. Zum Nachweis der erfolgreichen Induktion einer membranösen Glomerulonephritis in den Versuchstieren wurden klinische Parameter untersucht und an Nierengewebe histologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Analysen durchgeführt.

4.1.1. Westernblotanalyse des Fx1A- Serums

Zur Überprüfung des Bindungsverhaltens der im Fx1A- Serum enthaltenen Antikörper wurde das aus dem Bürstensaum proximaler Tubuli isolierte Fx1A- Antigen elektrophoretisch aufgetrennt und eine Westernblotanalyse unter Verwendung von Fx1A- Serum als Primärantikörper durchgeführt (Abb. 3 A). In der Kontrolle wurde Schafserum, das vor der Immunisierung des Tieres gewonnen wurde, als Primärantikörper eingesetzt (Abb. 3 B). In dem mit Fx1A- Serum durchgeführten Westernblot zeigte sich eine Proteinbande auf einer Laufhöhe von ~ 550 kD. Wurde Präimmunserum als Primärantikörper eingesetzt, fand keine Antikörperbindung auf dieser Höhe statt. Die molekulare Masse der Proteinbande entsprach der des Megalin, welches als zentrales Antigen der Heymann- Nephritis bekannt ist. Die Westernblotanalyse des Fx1A- Antigens

belegte die Existenz eines im Fx1A- Serum enthaltenen Antikörpers gegen ein im Bürstensaum proximaler Tubuluszellen exprimiertes Antigen, bei dem es sich vermutlich um das Megalin der Ratte handelte.

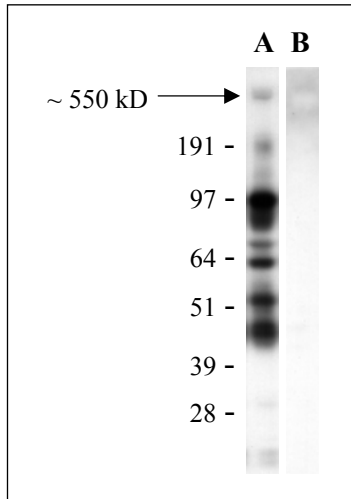


Abb. 3: Westernblot aus isoliertem Fx1A- Antigen

Als Primärantikörper wurden Fx1A- Serum (A) und Präimmunserum (B) eingesetzt. Auf Höhe von ~ 550 kD zeigte sich eine Proteinbande in Blot A (Pfeil), bei der es sich vermutlich um Megalin handelte.

4.1.2. Klinik der passiven Heymann- Nephritis

4.1.2.1. Körper- und Nierengewicht von pHN- und Kontrolltieren

Klinisch zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Entwicklung des Körpergewichtes von pHN- Tieren und Kontrolltieren im Zeitverlauf von 35 Tagen. Die uninephrektomierten pHN- Tiere zeigen eine signifikant geringere Gewichtszunahme als die uninephrektomierten Kontrolltiere (Abb. 4 A). Zum Zeitpunkt der Beendigung der Staffel an Tag 35 lag das Körpergewicht der pHN- Tiere mit einem Mittelwert von 328 ($\pm 6,21$) g deutlich unter dem Mittelwert der Kontrolltiere mit einem Körpergewicht von 403 ($\pm 9,13$) g. Gänzlich unbehandelte Kontrolltiere ohne Nephrektomie oder Injektion von Schafserum zeigten sowohl gegenüber den uninephrektomierten pHN- Tieren als auch gegenüber den uninephrektomierten Kontrolltieren eine vermehrte Gewichtszunahme. Ihr durchschnittliches Körpergewicht lag bei Beendigung der Tierstaffel an Tag 35 bei 470 ($\pm 12,94$) g.

Darüber hinaus zeigte sich zwischen den uninephrektomierten pHN- und den uninephrektomierten Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied im Nierengewicht an Tag 35 (Abb. 4 B). Die Nieren der pHN- Tiere waren mit einem durchschnittlichen Gewicht von 3,11 ($\pm 0,16$) g signifikant schwerer als die Nieren der Kontrolltiere mit 2,64 ($\pm 0,14$) g.

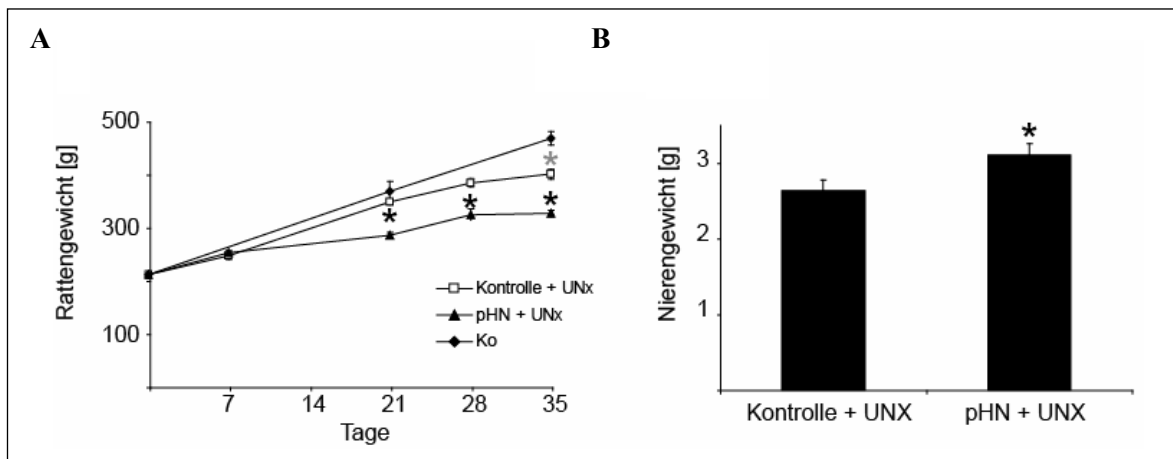


Abb. 4: Körper- und Nierengewicht von pHN- und Kontrolltieren. Die uninephrektomierten (UNX) pHN- Tiere zeigten eine verminderte Entwicklung des Körpergewichtes gegenüber uninephrektomierten und unbehandelten Kontrolltieren über den Zeitverlauf von 35 Tagen (A) und ein erhöhtes Nierengewicht gegenüber uninephrektomierten Kontrolltieren an Tag 35 (B). Die Werte wurden angegeben als Rattengewicht [g] bzw. Nierengewicht [g] $\pm$ SEM, * $p < 0,05$

4.1.2.2. Serum- Harnstoff und Serum- Kreatinin

Sowohl Kreatinin- als auch Harnstoffwerte aus dem Blutserum der pHN- Tiere entsprachen weitgehend den Werten der Kontrolltiere (Abb. 5). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die glomeruläre Filtrationsrate in der passiven Heymann- Nephritis nicht stark genug reduziert war, um einen Anstieg dieser Parameter zu verursachen.

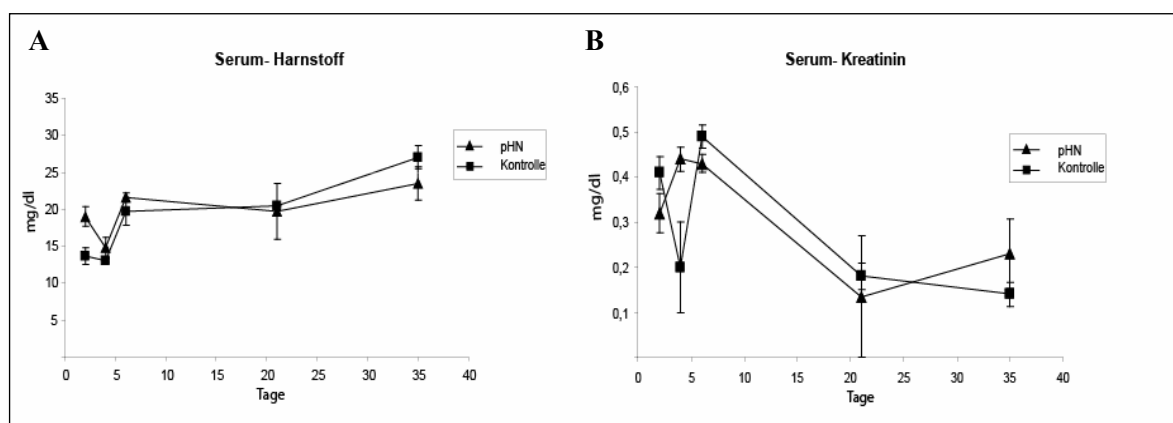


Abb. 5: Einfluß der passiven Heymann- Nephritis auf Serum- Harnstoff (A) und Serum- Kreatinin (B) im Zeitverlauf von 35 Tagen. Die Serumwerte von Harnstoff und Kreatinin entsprachen sich in pHN- und Kontrolltieren weitgehend. Die Werte wurden angegeben als Serum- Harnstoff [mg/dl] bzw. Serum- Kreatinin [mg/dl] $\pm$ SEM, * $p < 0,05$

4.1.2.3. Proteinurieverlauf in der passiven Heymann- Nephritis

In der Auswertung der Albumin- ELISA- Daten mit Normalisierung gegen das Urin-

Kreatinin zeigte sich in den pHN- Tieren eine einsetzende Proteinurie bereits ab Tag 3 nach der Antikörperapplikation (Abb. 6). Der Anstieg der Proteinurie fand seinen Gipfel um Tag 14, um dann wieder leicht abzusinken. Ab Tag 28 kam es zu einem erneuten Anstieg der Proteinurie, der bis zur Beendigung der Staffel an Tag 35 anhielt. Die Proteinurie der pHN- Tiere erreichte Werte von 150- 300 mg/24 h. Sämtliche pHN- Tiere entwickelten innerhalb der ersten Woche nach Applikation des Fx1A- Serums eine Proteinurie. In den Kontrolltieren wurde zu keinem Zeitpunkt eine Proteinurie beobachtet. Keines der Tiere entwickelte einen Aszites oder Ödeme.

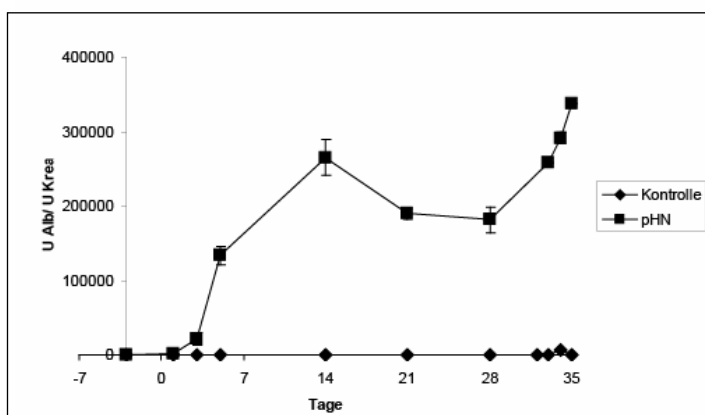


Abb. 6: Proteinurie in pHN- und Kontrolltieren im Zeitverlauf von 35 Tagen. Zweigipfliger Proteinurieverlauf in den pHN- Tieren. In Kontrolltieren wurde keine Proteinurie beobachtet. Die Werte wurden aufgetragen als Ratio von Urin- Albumingehalt und Urin- Kreatiningehalt $\pm$ SEM.

4.1.3. Expression von UCH- L1 im Zeitverlauf

Um die podozytäre UCH- L1- Expression in der Heymann- Nephritis im Zeitverlauf zu untersuchen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Nierengewebe gewonnen. An den Tagen 2, 4 und 6 nach der Injektion des Schafserums wurden jeweils 3 Tiere aus der pHN- und Kontrollgruppe uninephrektomiert. An Tag 21 erfolgte die Sakrifizierung von jeweils 2 Tieren beider Gruppen und an Tag 35 die der restlichen Tiere, so daß insgesamt Proben 5 verschiedener Zeitpunkte zur Untersuchung zur Verfügung standen. Aus den entnommenen Nieren wurden Glomeruli isoliert, die zum einen der Herstellung von Lysaten für eine Westernblotanalyse dienten, zum anderen wurde aus den Glomeruli mRNA zur Durchführung einer QPCR extrahiert. Zusätzlich wurden aus den Nieren Gewebeproben für die histologische Untersuchung gewonnen.

4.1.3.1. UCH- L1- Immunhistochemie

In der immunhistochemischen UCH- L1- Färbung an Gewebsschnitten aus pHN- Tieren wiesen die Podozyten bis Tag 4 nach der Injektion von Fx1A- Serum keine nachweisbare

UCH- L1- Expression auf. An Tag 6 war in den Podozyten der pHN- Tiere erstmals eine dezente UCH- L1- Positivität zu beobachten. Die UCH- L1- Expression nahm immunhistochemisch bis zum Tag 21 weiter zu und blieb bis zur Beendigung der Staffel an Tag 35 in gleichem Maße erhalten. Die intrazelluläre Lokalisation der UCH- L1 war zytoplasmatisch und nukleär betont und erstreckte sich bis in die Primärfortsätze der Podozyten. In den Podozyten der Kontrolltiere war immunhistochemisch zu keinem Zeitpunkt eine UCH- L1- Expression nachweisbar. Die glomerulären Parietalzellen der pHN- und Kontrolltiere wiesen erwartungsgemäß zu allen Zeitpunkten eine UCH- L1- Expression auf. An Tag 6 war die UCH- L1 in Parietalzellen der pHN- Tiere leicht erniedrigt und stieg anschließend bis Tag 21 auf ein Maximum an. Zum Zeitpunkt der Beendigung der Staffel an Tag 35 entsprach die UCH- L1- Expression in Parietalzellen der pHN- Tiere wieder dem Maß der Kontrolltiere, in denen die UCH- L1- Expression zu allen Zeitpunkten unverändert blieb.

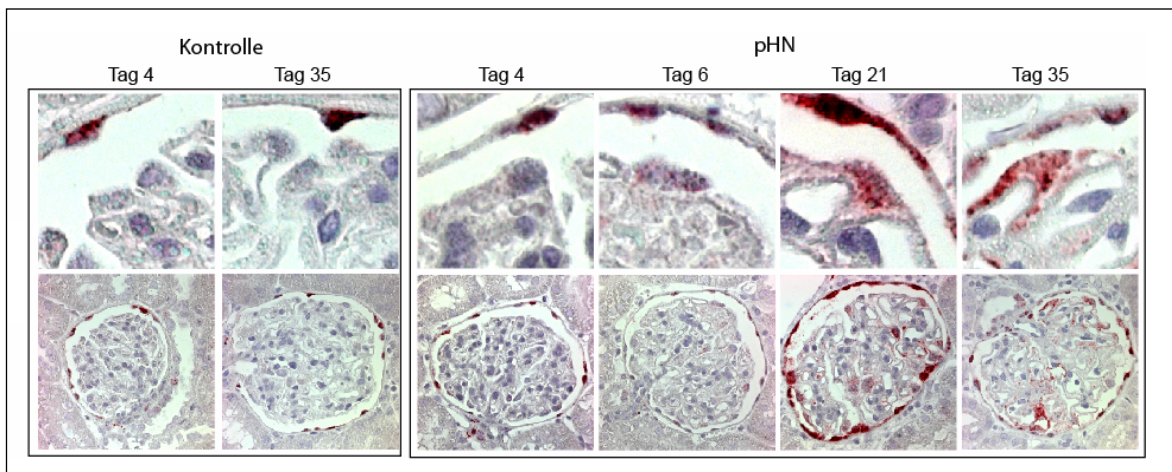


Abb. 7: UCH- L1- Immunhistochemie an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren im Zeitverlauf von 35 Tagen. Es zeigte sich in den pHN- Tieren an Tag 6 eine podozytäre Induktion der UCH- L1- Expression und ein Maximum der UCH- L1- Expression an Tag 21 und Tag 35. In den Podozyten der Kontrolltiere war zu keinem Zeitpunkt eine UCH- L1- Expression nachweisbar. (Vergrößerung: 1000x und 400x)

4.1.3.2. Quantitative PCR UCH- L1

Um den glomerulären Gehalt an UCH- L1- mRNA zu analysieren, wurde aus isolierten Glomeruli von pHN- und Kontrolltieren mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit der cDNA wurde eine quantitative PCR gegen UCH- L1 durchgeführt. Die Messwerte wurden gegen 18S- mRNA als Ladungskontrolle genormt. Die UCH- L1- Expression in den pHN- Tieren wurde zu der UCH- L1- Expression der Kontrolltiere in Relation gesetzt.

Die quantitative PCR zeigte in den pHN- Tieren einen Anstieg glomerulärer UCH- L1- mRNA ab Tag 4 (Abb. 8). Bis Tag 35 stieg der Wert in den pHN- Tieren auf mehr als das Dreifache des Ausgangswertes an, während dieser Wert in den Kontrolltieren bis zur Beendigung der Staffel konstant blieb. Der Nachweis einer vermehrten Transkription stellte den Beleg einer Regulation der UCH- L1- Expression auf mRNA- Ebene dar.

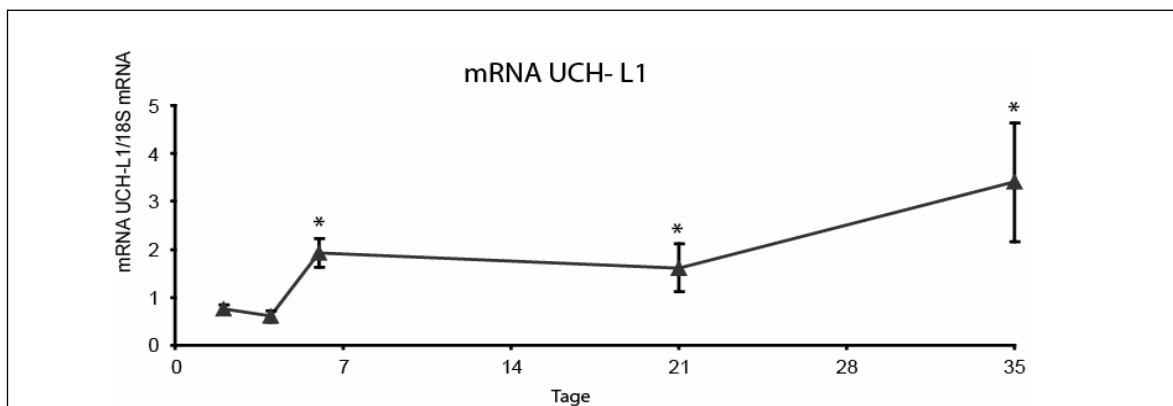


Abb. 8: QPCR gegen UCH- L1 aus glomerulärem Lysat im Zeitverlauf von 35 Tagen. In den pHN- Tieren zeigte sich ein Anstieg der UCH- L1- mRNA auf den dreifachen Wert innerhalb von 35 Tagen. Die Werte wurden gegen 18S mRNA normalisiert und als x- fachen Wert der Kontrolle $\pm$ SEM aufgetragen, * $p < 0,05$.

4.1.3.3. UCH- L1- Westernblot

Zur Untersuchung der UCH- L1- Expression im Verlauf der Heymann- Nephritis wurden sowohl aus Glomeruli als auch aus Gesamtnierengewebe Lysate hergestellt und eine Westernblotanalyse durchgeführt. Der UCH- L1- Westernblot aus Gesamtnierenlysat des Tages 35 zeigte einen erhöhten UCH- L1- Proteingehalt in den Nieren der pHN- Tiere gegenüber dem UCH- L1- Gehalt des Kontrolltieres. Die analysierte UCH- L1 umfaßte dabei sowohl die tubuläre als auch die glomeruläre UCH- L1.

Auch im glomerulären Lysat des Tages 35 zeigte sich in den pHN- Tieren eine verstärkte UCH- L1- Expression. Die durch Siebtechnik isolierten Glomeruli umfaßten neben Podozyten auch glomeruläres Endothel, Mesangium und Parietalzellen. Da glomeruläre Endothel- und Mesangialzellen keine UCH- L1 exprimieren, ist davon auszugehen, daß die Westernblotanalyse aus glomerulären Lysaten die UCH- L1 Expression von Podozyten und Parietalzellen erfaßte.

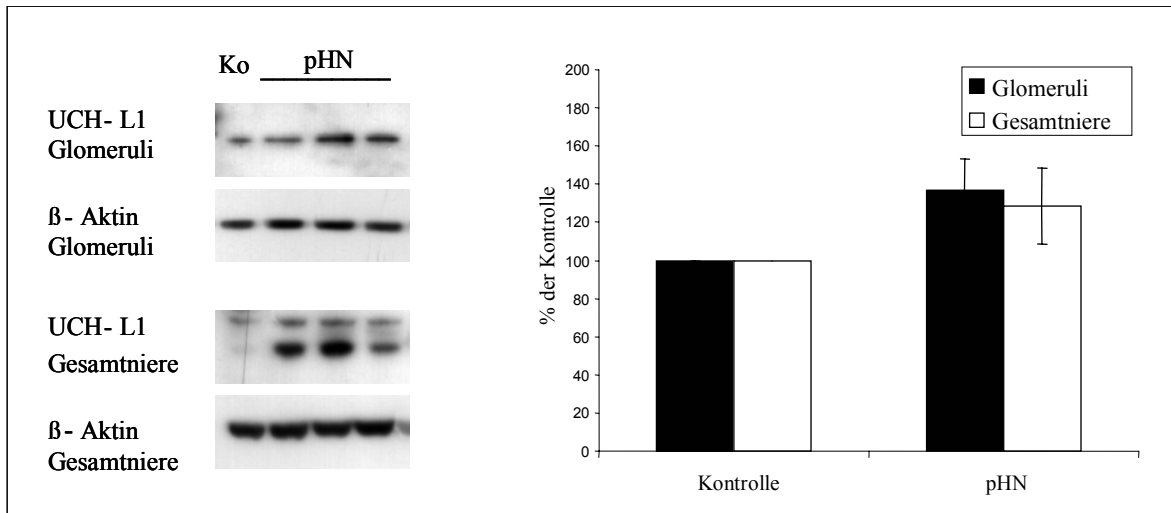


Abb. 9: Westernblotanalyse der UCH- L1- Expression aus glomerulärem und Gesamtnierenlysat in pHN- und Kontrolltieren an Tag 35. In der Densitometrie zeigte sich nach Normierung gegen β - Aktin als Ladungskontrolle ein Anstieg der UCH- L1- Expression in den pHN- Tieren sowohl glomerulär als auch in der Gesamtniere. Die Werte wurden angegeben als % der Kontrolle $\pm$ SEM.

4.1.4. PAS- Färbung

Zur Darstellung glomerulärer Strukturen unter besonderer Berücksichtigung kohlenhydratreicher Komponenten wurde an Gewebsschnitten von pHN- Tieren und Kontrolltieren aller Zeitpunkte eine PAS- Färbung durchgeführt. Sowohl in den pHN- Tieren als auch in den Kontrolltieren zeigte sich eine Größenzunahme der Glomeruli ab Tag 21 mit einer Erweiterung der Kapillarschlingen. In den pHN- Tieren war die glomeruläre Größenzunahme stärker ausgeprägt als in den Kontrolltieren. In den pHN- Tieren war darüber hinaus ab Tag 6 eine zunehmende Prominenz der Podozyten zu beobachten. Die Podozyten der pHN- Tiere zeigten sich im Vergleich zu Podozyten der Kontrolltiere deutlich vergrößert und wiesen eine starke Vakuolisierung des Zytoplasmas auf. Die beginnende Größenzunahme der Podozyten in den pHN- Tieren korrelierte dabei zeitlich mit dem Einsetzen der immunhistochemisch nachweisbaren UCH- L1- Expression. Zudem erschien die Basalmembran in den glomerulären Kapillarschlingen der pHN- Tiere diffus verdickt und wies in der harnseitigen Oberfläche zahlreiche Depots aus PAS- positivem Material auf. Bei diesen Einschlüssen handelte es sich um das morphologische Korrelat von Immundepots, die im Rahmen der Heymann- Nephritis in der Lamina rara externa der GBM akkumulieren und ein zentrales Charakteristikum der Erkrankung darstellen. Zwischen den Immundepots zeigten sich in der PAS- Färbung zarte membranöse Ausziehungen der GBM (Spikes), bei denen es sich um ein weiteres Kennzeichen der membranösen Glomerulonephritis handelt. In den Kontrolltieren waren in

der PAS- Färbung weder sichtbare Veränderungen der Podozytenmorphologie noch der Struktur der GBM festzustellen.

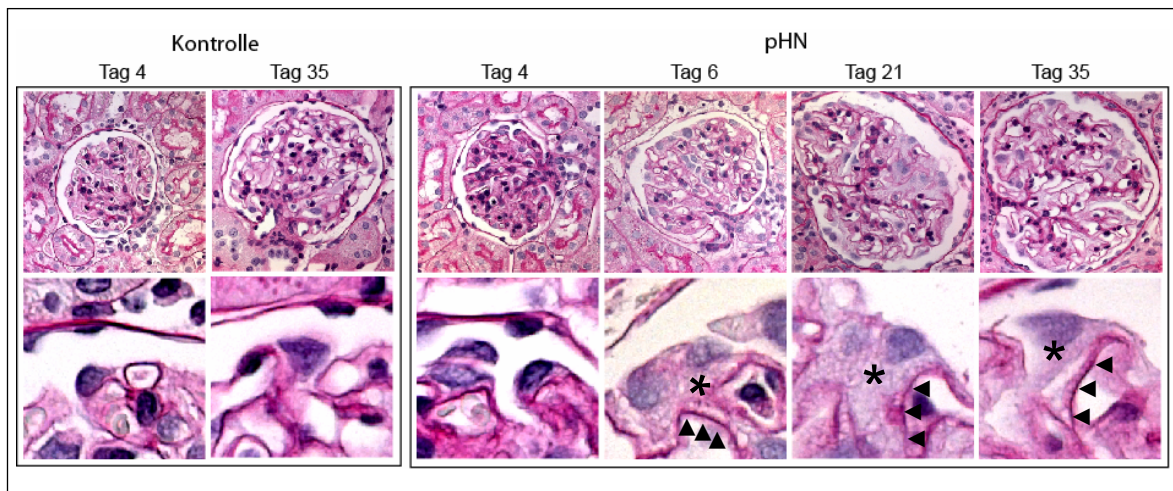


Abb. 10: PAS- Färbung an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren im Zeitverlauf von 35 Tagen. Es zeigte sich in pHN- und Kontrolltieren eine Zunahme des glomerulären Durchmessers ab Tag 21. In den pHN- Tieren war ab Tag 6 zudem eine Vergrößerung des podozytären Zellleibes (Asteriske) mit einer starken Vakuolisierung des Zytoplasmas zu beobachten. Die GMB erschien deutlich verdickt und wies Einschlüsse von PAS- positivem Material und Spike- Formierungen auf (Pfeilköpfe). (Vergrößerung: 400x und 1000x)

4.1.5. Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung

Um das Bindungsverhalten des im Fx1A- Serum enthaltenen Schafantikörpers im Rattenglomerulus zu untersuchen, wurde eine Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten beider Gruppen durchgeführt. Die Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung zeigte in den Gewebsschnitten der pHN- Tiere eine lineare Ablagerung des im Fx1A- Serum enthaltenen Schafantikörpers entlang der GMB bereits ab Tag 2 nach dessen Injektion. Dieses Färbemuster stellte das morphologische Korrelat der Bindung des Fx1A- Antikörpers am Megalin der basalen Podozytenmembran und der beginnenden Immundepotformierung dar. Das anfänglich lineare Färbemuster des Schafantikörpers lockerte sich mit der Zeit zunehmend auf und nahm bis Tag 35 eine grobe granuläre Struktur an. Bei den antikörperhaltigen Granula handelte es sich um die Immundepots in der Lamina rara externa der GBM, die über den Zeitverlauf von 35 Tagen an Größe zunahmen. Die spitzen Ausziehungen der GMB (Spikes), die sich zwischen den Immundepots formierten, bedingten die dunklen Aussparungen zwischen den einzelnen Granula. In den Kontrolltieren war zu keinem Zeitpunkt eine Ablagerung von Schaf- IgG in den Glomeruli nachweisbar.

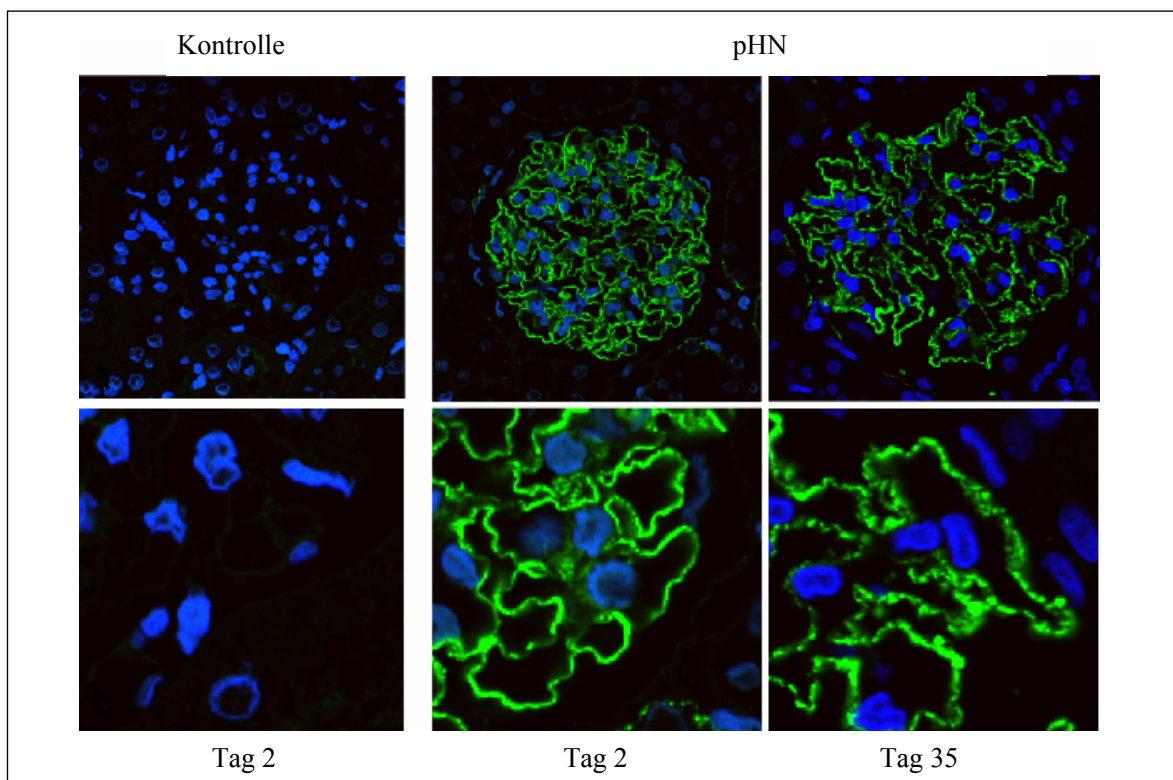


Abb. 11: Konfokale Aufnahmen der Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren an Tag 2 und 35. Es zeigten sich bereits am Tag 2 lineare Ablagerungen von Schaf- IgG in den pHN- Tieren, die bis Tag 35 ein grobkörniges Muster annahmen. In den Kontrolltieren wurde kein Schaf- IgG nachgewiesen. (Vergrößerung: 400x und 1000x) [grün (FITC): Schaf- IgG, blau (DAPI): Zellkerne]

4.1.6. Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung

Zur Analyse des Bindungsverhaltens des im Rahmen der autologen Immunantwort gebildeten Ratten- IgG in pHN- und Kontrolltieren wurde an Gewebsschnitten beider Gruppen eine Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, in der das am heterologen Schafantikörper gebundene Ratten- IgG dargestellt wurde.

In den pHN- Tieren zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine verstärkte Anfärbbarkeit der glomerulären Strukturen mit Betonung der Basalmembran. Eine maximale Anfärbbarkeit entlang der GBM wurde an Tag 6 beobachtet und korrelierte damit zeitlich mit dem Beginn der UCH- L1- Expression im Podozyten. Analog zum Bindungsmuster des Schaf- IgG zeigte sich in der Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an den Tagen 2, 4 und 6 eine bandförmige Ablagerung des Ratten- IgG entlang der GBM, welche durch die Bindung von Ratten- IgG am Schaf- IgG bedingt war. Das lineare Bindungsmuster lockerte sich zunehmend auf und formierte sich bis Tag 35 in ein grobes granuläres Muster um. Die Ratten- IgG- positiven Granula entsprachen den auch in der PAS- Färbung und Schaf-

IgG- Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesenen Immundepots in der Lamina rara externa der GBM. Die Immundepots wurden von zarten Spikes umschlossen, die sich in der Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung als dunkle zwischen den Spikes gelegene Aussparungen manifestierten. In den Kontrolltieren erfolgte der Nachweis von Ratten- IgG diffus mesangial, ein lineares Bindungsmuster entlang der GBM zeigte sich hier nicht.

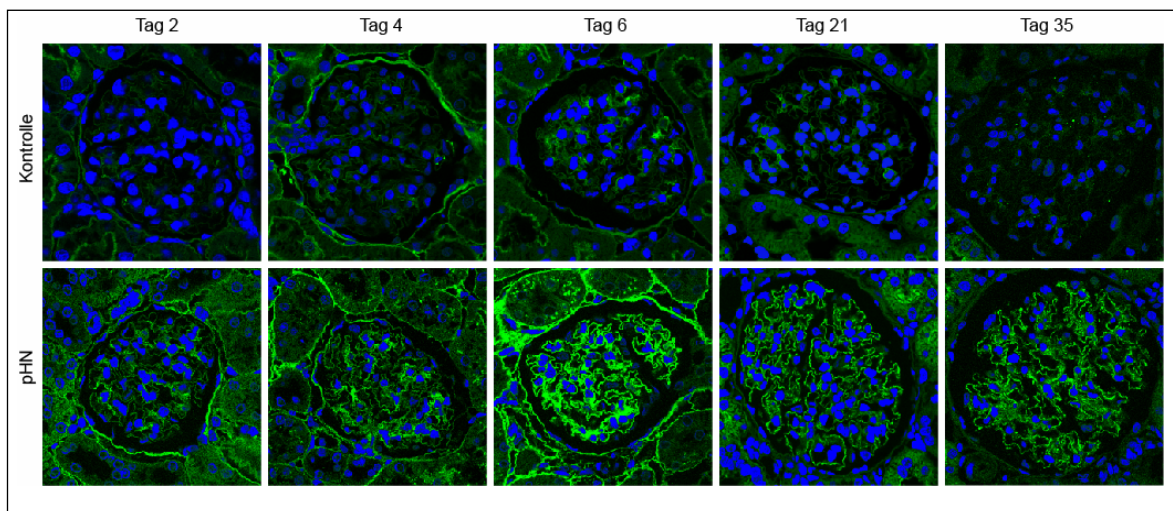


Abb. 12: Konfokale Aufnahmen der Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren im Zeitverlauf von 35 Tagen. In den pHN- Tieren zeigte sich bereits ab Tag 2 eine verstärkte Immunfluoreszenz mit Nachweis von Ratten- IgG entlang der GBM. An Tag 6 erreichte die Immunfluoreszenz in den pHN- Tieren ein Maximum. In den Kontrolltieren zeigte sich lediglich ein diffuses mesangiales Färbemuster. (Vergrößerung: 400x) [grün (FITC): Ratten- IgG, blau (DAPI): Zellkerne]

4.1.7. Ubiquitin im Zeitverlauf

Die UCH- L1 ist in der Lage, über gegenläufige enzymatische Aktivitäten den Monoubiquitinpool einer Zelle zu beeinflussen. Über eine Hydrolaseaktivität und monoubiquitinstabilisierende Wirkung generiert die UCH- L1 freies Monoubiquitin, das als aktive Komponente in der Zelle für Ubiquitinierungsprozesse zur Verfügung steht. Zudem verfügt die UCH- L1 über eine Ligase- Aktivität, mit der der Monoubiquitinpool in der Zelle verkleinert werden kann. Aufgrund des regulatorischen Einflusses der UCH- L1 auf den Ubiquitinhaushalt der Zelle wurde der podozytäre Gehalt an Ubiquitin und Monoubiquitin anhand von immunhistochemischen Ubiquitin- Färbungen sowie Westernblotanalysen untersucht.

4.1.7.1. Ubiquitin- Immunhistochemie

Zur Analyse der podozytären Ubiquitin- Expression wurde eine immunhistochemische Ubiquitin- Färbung an Gewebsschnitten von pHN- Tieren sowie Kontrolltieren

durchgeführt. Der für die Färbung benutzte Antikörper erkannte gleichermaßen Mono- und Polyubiquitine, so daß eine diesbezügliche Differenzierung histologisch nicht möglich war und lediglich Aussagen über den Gesamubiquitingehalt einer Zelle getroffen werden konnten. Die Ubiquitin- Immunhistochemie zeigte einen erhöhten podozytären Gesamubiquitingehalt in den pHN- Tieren an Tag 21 und Tag 35 im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 13). Das Ubiquitin war insbesondere zytoplasmatisch lokalisiert und erstreckte sich bis in die Primärfortsätze der Podozyten. Der Anstieg des Ubiquitingehaltes in den Podozyten der pHN- Tiere korrelierte zeitlich mit dem Maximum der podozytären Expression von UCH- L1. In den Kontrolltieren blieb der podozytäre Ubiquitingehalt über den gesamten Zeitverlauf von 35 Tagen durchgehend auf gleichbleibend niedrigem Niveau.

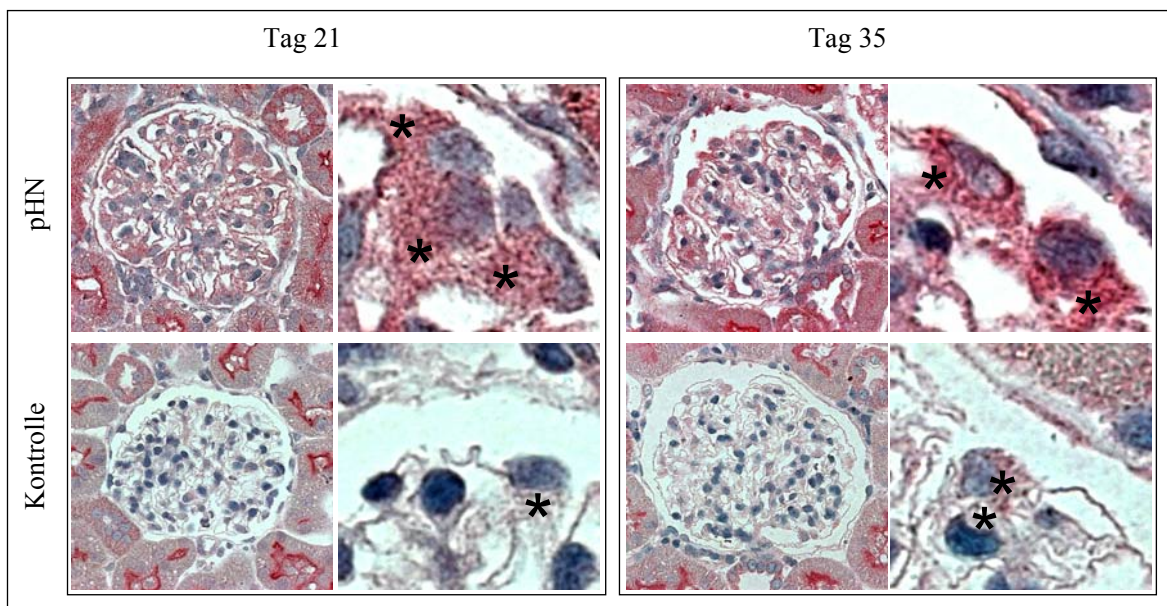


Abb. 13: Ubiquitin- Immunhistochemie an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren an Tag 21 und Tag 35. In den pHN- Tieren zeigte sich in den Podozyten (Asteriske) ab Tag 21 ein deutlich erhöhter Gehalt an Gesamubiquitin im Vergleich zu den nur schwach angefärbten Podozyten der Kontrolltiere. (Vergrößerung: 400x und 1000x)

4.1.7.2. Monoubiquitin- Westernblot

Zur Quantifizierung des Monoubiquitin- Gehaltes wurden aus isolierten Glomeruli sowie aus Gesamtnierengewebe der verschiedenen Zeitpunkte Lysate gewonnen und eine Ubiquitin- Westernblotanalyse durchgeführt. Die Westernblotanalyse aus glomerulären Lysaten des Tages 35 zeigte einen leicht erhöhten Monoubiquitingehalt in den Podozyten der pHN- Tiere im Vergleich zu dem Kontrolltier. Die Westernblotanalyse aus Gesamtnieren- Lysat, die sowohl das glomeruläre als auch das tubuläre Ubiquitin erfasste,

zeigte dahingegen einen geringeren Gehalt an Monoubiquitinen in den pHN- Tieren im Vergleich zu dem Kontrolltier an Tag 35 (Abb. 14).

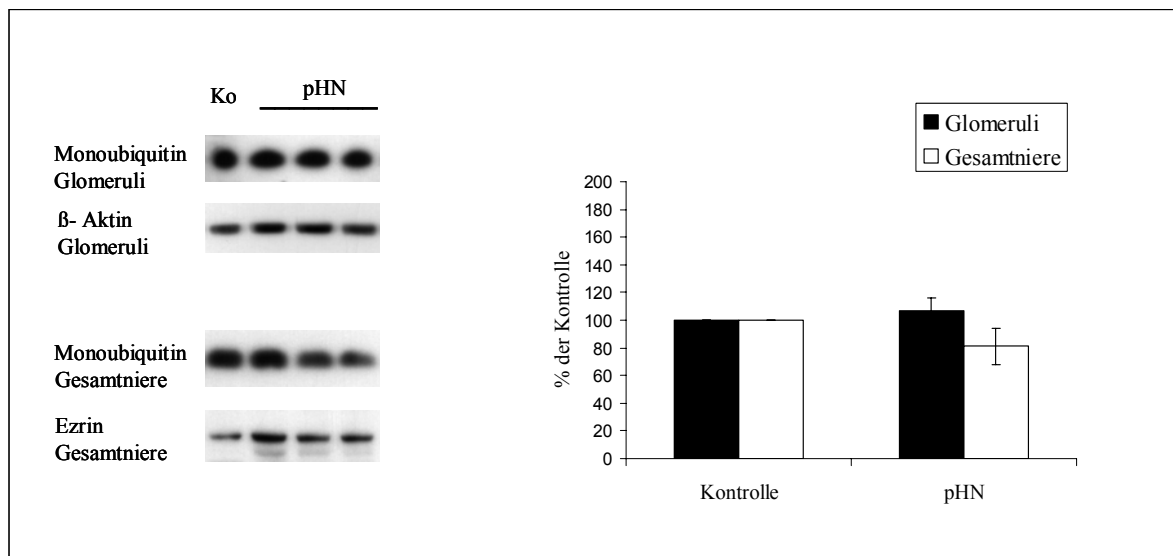


Abb. 14: Westernblotanalyse des Monoubiquitiningehaltes aus glomerulärem Lysat und Gesamtnierenlysate in pHN- und Kontrolltieren an Tag 35. In der Westernblotanalyse des glomerulären Lysates zeigte sich in der Densitometrie bei Normierung gegen β - Aktin eine Vergrößerung des Monoubiquitinpools in den pHN- Tieren (n=3) im Vergleich zur Kontrolle (n=1). Im Westernblot des Gesamtnierenlysates ergab die Densitometrie bei Normierung gegen Ezrin eine Abnahme des Monoubiquitiningehaltes in den pHN- Tieren im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte wurden als % der Kontrolle $\pm$ SEM angegeben.

4.1.8. Expression und Lokalisation von Nephtrin in der passiven Heymann- Nephritis

Zur Analyse der Auswirkungen der passiven Heymann- Nephritis auf die Expression sowie Lokalisation des Schlitzmembranproteins Nephtrin wurde an Gewebsschnitten des Tages 35 aus pHN- und Kontrolltieren eine Nephtrin- Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zudem erfolgte anhand von glomerulären Lysaten eine Analyse der Nephtrin- Expression im Westernblot, um den glomerulären Gehalt an Nephtrin quantifizieren zu können.

4.1.8.1. Nephtrin- Immunfluoreszenzfärbung

In der Nephtrin- Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich in den Kontrolltieren ein bandförmiges Bindungsmuster des Nephtrin- Antikörpers entlang der Filtrationsschlitz (Abb. 15 a). Dieses Immunfluoreszenzmuster stellte das morphologische Korrelat der Antikörperbindung am Nephtrin dar, das als zentraler Bestandteil der Schlitzmembran die Filtrationsschlitz mit seiner extrazellulären Komponente überbrückt. In den pHN- Tieren war der bandförmige Charakter des Immunfluoreszenzmusters weitgehend verloren und

einem diffusen zytoplasmatisch lokalisierten Muster gewichen. Der Nachweis des ursprünglich membranständigen Nephrin im Zytoplasma ließ auf eine Redistribution des Nephrins in das Zytoplasma durch die Schädigung des Podozyten in der Heymann-Nephritis schließen.

4.1.8.2. Nephrin- Westernblot

Zur Quantifizierung der Nephrin- Expression wurde mit glomerulären Lysaten des Tages 35 aus pHN- und Kontrolltieren eine Nephrin- Westerblotanalyse durchgeführt (Abb. 15 b). Die Expression von Nephrin in pHN- und Kontrolltieren zeigte sich dabei nahezu identisch. Die passive Heymann- Nephritis wirkte sich demnach nicht auf den Gesamtproteingehalt an Nephrin im Podozyten aus sondern führte lediglich zu einer Redistribution des Nephrins von der Membran in das Zytoplasma.

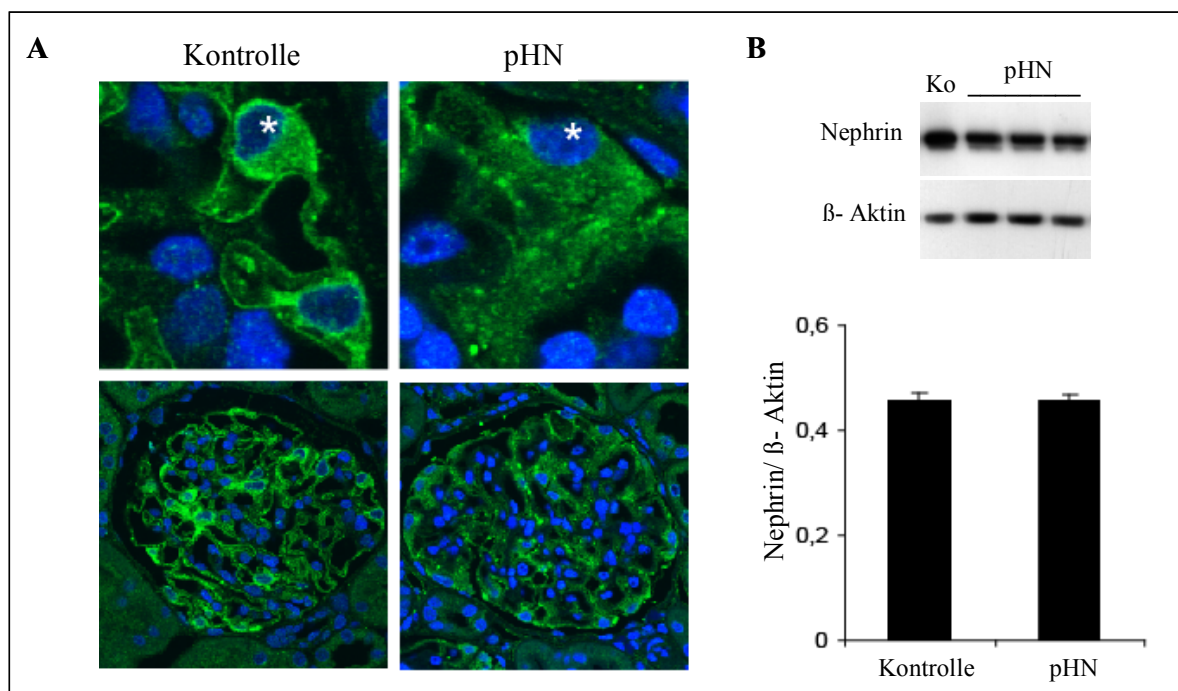


Abb. 15: Lokalisation und Expression von Nephrin in der passiven Heymann- Nephritis.

(A) Konfokale Aufnahmen der Nephrin- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren an Tag 35; in den Podozyten (Asteriske) der pHN- Tiere wies das Nephrin ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf, während es in den Kontrolltieren insbesondere entlang der Filtrationsschlitzte nachzuweisen war. (Vergrößerung: 1000x und 400x) (B) Westernblotanalyse der Nephrin- Expression aus Glomerulumlysaten in pHN- und Kontrolltieren an Tag 35; im Westernblot zeigte sich in der Densitometrie nach Normierung gegen β - Aktin kein Unterschied in der Gesamtexpression von Nephrin in den pHN- und Kontrolltieren an Tag 35. Werte wurden als Nephrin/ β - Aktin $\pm$ SEM angegeben. [grün (FITC): Nephrin, blau (DAPI): Zellkerne]

4.1.9. Expression und Lokalisation von α -Aktinin-4 in der passiven Heymann-Nephritis

Die der GBM anhaftenden Podozytenfußfortsätze verfügen über ein Zytoskelett aus Aktinfilamenten, die durch Aktin-bindende Proteine wie α -Aktinin-4 gebündelt werden. Zur Analyse des Expressionsmusters und zur Quantifizierung des Proteingehaltes von α -Aktinin-4 wurde an Gewebsschnitten eine α -Aktinin-4-Immunfluoreszenzfärbung sowie mit glomerulären Lysaten des Tages 35 eine Westernblotanalyse durchgeführt.

4.1.9.1. α -Aktinin-4-Immunfluoreszenzfärbung

Um die intrazelluläre Lokalisation des podozytenspezifischen Aktin-bindenden Proteins α -Aktinin-4 im Rahmen der passiven Heymann-Nephritis zu untersuchen, wurde an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren eine α -Aktinin-4-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (Abb. 16). Es zeigte sich in den Kontrolltieren ein bandförmiges Bindungsmuster des α -Aktinin-4 entlang der glomerulären Basalmembran. Bei diesem bandförmigen Muster der α -Aktinin-4-Immunfluoreszenz handelt es sich um das morphologische Korrelat der Lokalisation von α -Aktinin-4 in den der GBM anhaftenden aktinreichen Podozytenfußfortsätzen. In den pHN-Tieren zeigte sich demgegenüber eine zytoplasmatisch betonte Immunfluoreszenz mit einem Verlust des ursprünglich bandförmigen Musters. Das α -Aktinin-4 war in den pHN-Tieren in einer diffusen Verteilung im gesamten Zellleib nachzuweisen. Der Verlust des bandförmigen Musters ließ auf eine zytoskelettale Reorganisation des Podozyten in der Heymann-Nephritis schließen, bei der es zu einem Verlust der Lokalisation von α -Aktinin-4 in den Fußfortsätzen kam.

4.1.9.2. α -Aktinin-4-Westernblot

Für die Bestimmung des α -Aktinin-4-Proteingehalts in den Glomeruli von pHN- und Kontrolltieren wurde eine Westernblotanalyse mit glomerulären Lysaten beider Gruppen durchgeführt. Im α -Aktinin-4-Westernblot wurde eine erhöhte α -Aktinin-4-Expression in den pHN-Tieren im Vergleich zu dem Kontrolltier an Tag 35 nachgewiesen.

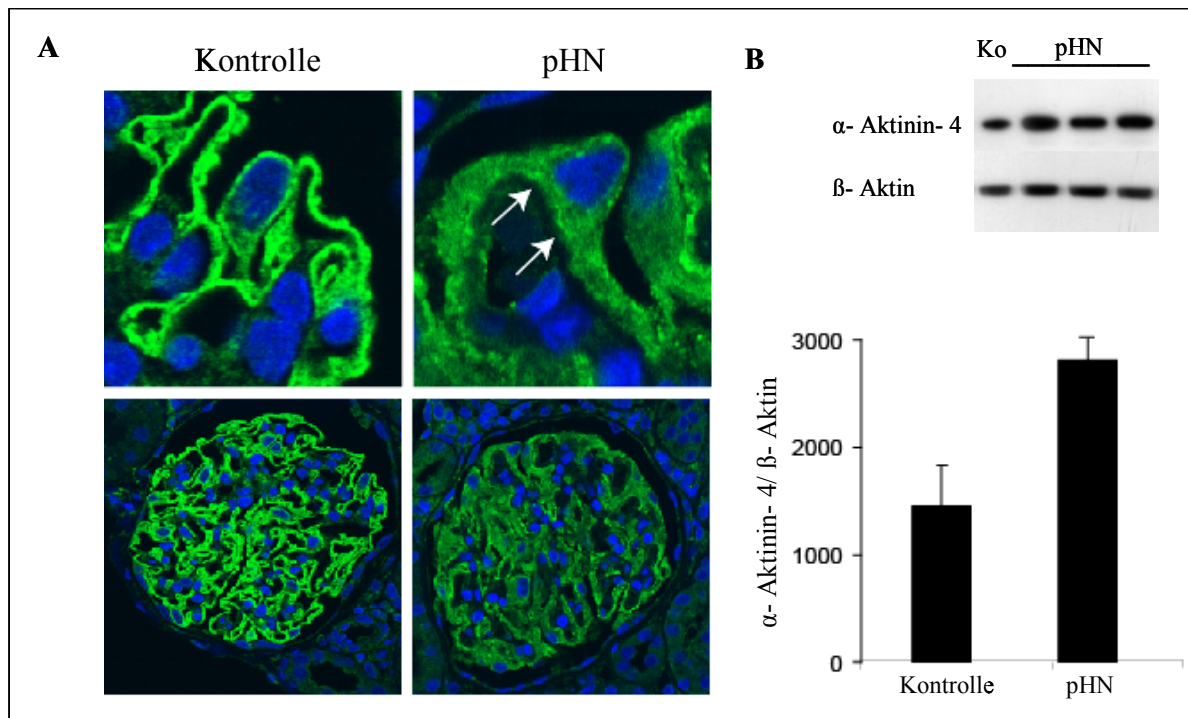


Abb. 16: Lokalisation und Expression von α -Aktinin-4 in der passiven Heymann- Nephritis

(A) Konfokale Aufnahmen der α -Aktinin-4-Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren an Tag 35; in den Podozyten des Kontrolltieres zeigte sich ein lineares Bindungsmuster entlang der GBM, während das α -Aktinin-4 in den Podozyten der pHN-Tiere eine diffuse zytoplasmatische Verteilung aufwies (Pfeile). (Vergrößerung: 1000x und 400x) (B) Westernblotanalyse der α -Aktinin-4-Expression aus Glomerulumlysaten in pHN- und Kontrolltieren an Tag 35; im Westernblot zeigte sich in der Densitometrie nach Normierung gegen β -Aktin eine vermehrte Expression von α -Aktinin-4 in den pHN-Tieren an Tag 35. Werte wurden als α -Aktinin-4/ β -Aktin $\pm$ SEM angegeben. [grün (FITC): α -Aktinin-4, blau (DAPI): Zellkerne]

4.1.10. Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität in der passiven Heymann- Nephritis

Um Informationen über die Funktion und Aktivität der UCH- L1 im geschädigten Podozyten in der passiven Heymann- Nephritis zu gewinnen, wurde deren enzymatische Hydrolaseaktivität durch einen UCH- L1- spezifischen Hemmstoff (LDN 57444) gehemmt. Der Hemmstoff wurde in osmotischen Dreitagespumpen (0,4 mg/kgKG LDN 57444 in DMSO) appliziert. Einem Kontrolltier wurde zum Ausschluß eines Einflusses des DMSO auf die Erkrankung eine Pumpe mit DMSO implantiert. Die Pumpen wurden an Tag 32 in die Nackenfalte der Ratten implantiert und verblieben für drei Tage in den Tieren, bevor diese an Tag 35 getötet wurden.

4.1.10.1. Einfluß der UCH- L1- Hemmung auf die Proteinurie der pHN- Tiere

Zur Analyse der Auswirkungen einer UCH- L1- Hemmung auf die Proteinurie der pHN-

Tiere wurde an drei Tagen nach Pumpeneinbau jeweils Rattenurin über Stoffwechselkäfige gesammelt und mit einem Albumin- ELISA auf dessen Albumingehalt kontrolliert. Die Albuminwerte wurden gegen die Kreatininkonzentration des Urins genormt. In der Urinanalyse wurde ein signifikanter Unterschied in der Stärke der Proteinurie zwischen Hemmstoff- behandelten pHN- Tieren und unbehandelten pHN- Tieren festgestellt (Abb. 17). Die Tiere, die mit dem UCH- L1- Hemmstoff behandelt wurden, zeigten an Tag 1 nach Pumpenimplantation eine signifikant geringere Proteinurie als die Tiere, die keine Behandlung erhalten hatten. An Tag 2 nach Pumpenimplantation fiel der Unterschied in der Stärke der Proteinurie etwas geringer aus und glich sich bis Tag 3 annähernd wieder an das Maß der unbehandelten Tiere an. Die UCH- L1- Hemmung bewirkte damit in den pHN- Tieren einen um etwa 48 h verzögerten Eintritt in die zweite Phase der Proteinurie der passiven Heymann- Nephritis. Durch die UCH- L1- Hemmung wurde initial nach Pumpeneinbau das Ausmaß der Proteinurie signifikant reduziert.

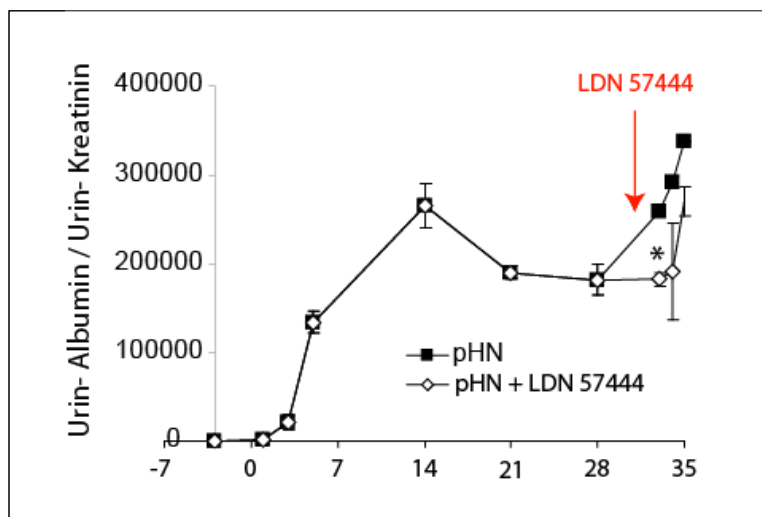


Abb. 17: Proteinurieverlauf von pHN- Tieren im Zeitverlauf von 35 Tagen bei Pumpenimplantation mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444 (0,4 mg/kgKG) an Tag 32 und ohne UCH- L1- Inhibition. Der zweite Anstieg der Proteinurie in den unbehandelten pHN- Tieren ab Tag 28 trat in den inhibitorbehandelten pHN- Tieren mit einer zeitlichen Verzögerung von 48 h auf. Initial nach Pumpenimplantation zeigte sich in den inhibitorbehandelten pHN- Tieren eine signifikant geringere Proteinurie als in unbehandelten pHN- Tieren. Werte wurden angegeben als Urin- Albumin/ Urin- Kreatinin $\pm$ SEM, *p < 0,05

4.1.10.2. UCH- L1- Immunhistochemie nach UCH- L1- Hemmung

Um zu untersuchen, ob die UCH- L1- Hemmung eine kompensatorisch verstärkte UCH- L1- Expression in den Podozyten bewirkte, wurden an Tag 3 nach Pumpenimplantation Gewebeproben von pHN- und Kontrolltieren gewonnen und histologisch untersucht. In

Gewebsschnitten des DMSO- behandelten Kontrolltieres zeigte sich, daß die alleinige Applikation von DMSO, dem Lösungsmittel des UCH- L1- Inhibitors, in den Podozyten keine UCH- L1- Expression induzierte (Abb. 18). Die pHN- Tiere, denen der UCH- L1- Inhibitor LDN 57444 verabreicht wurde, wiesen histologisch podozytär eine verstärkte UCH- L1- Expression auf, die die podozytäre UCH- L1- Expression un behandelter pHN- Tiere überstieg.

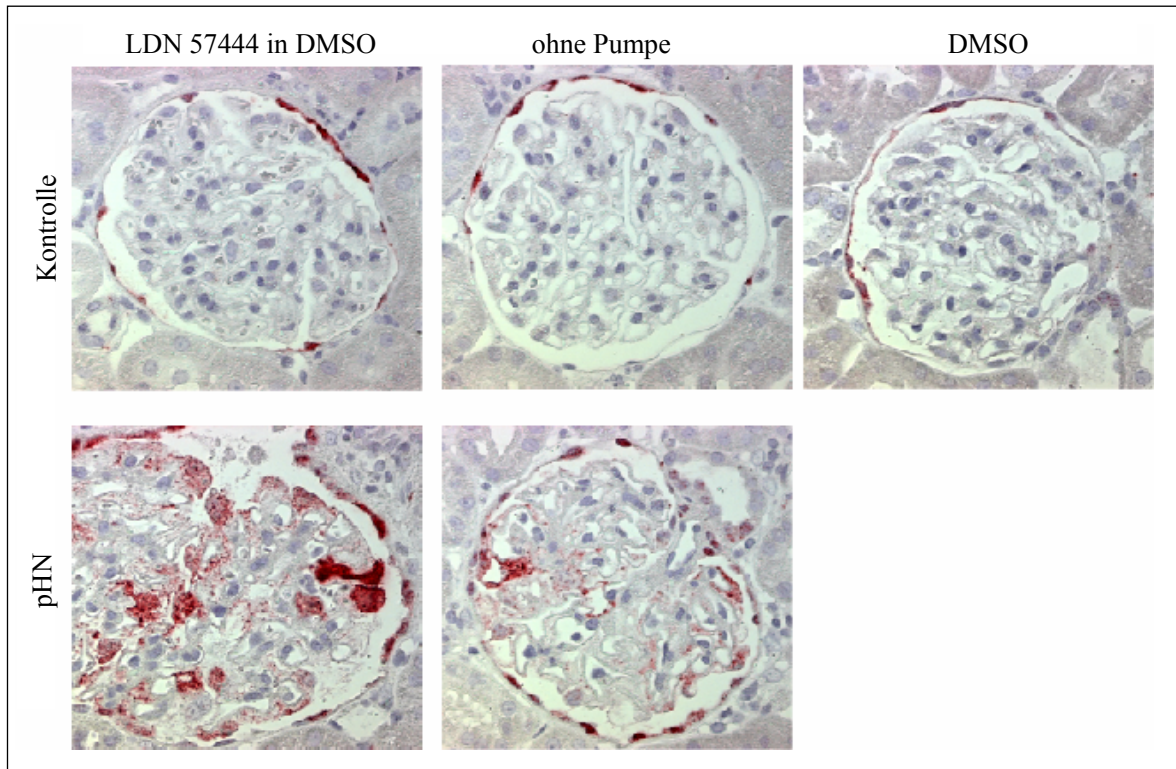


Abb. 18: UCH- L1- Immunhistochemie an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren an Tag 35 nach Behandlung mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444. In inhibitorbehandelten pHN- Tieren zeigte sich podozytär eine verstärkte UCH- L1- Expression im Vergleich zu un behandelten pHN- Tieren. Eine Behandlung mit DMSO zeigte im Kontrolltier keinen Effekt auf die UCH- L1- Expression. (Vergrößerung: 400x)

4.1.10.3. Nephtrin- Immunfluoreszenzfärbung nach UCH- L1- Hemmung

Zur Analyse des Effekts einer UCH- L1- Hemmung auf die Lokalisation von Nephtrin wurde eine Nephtrin- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten von pHN- Tieren durchgeführt, die drei Tage mit LDN 57444 behandelt worden waren. Als Kontrolle dienten un behandelte pHN- Tiere. In den mit dem UCH- L1- Inhibitor behandelten pHN- Tieren zeigte sich ein diffuses zytoplasmatisches Verteilungsmuster des Nephtrins, das weitgehend dem Verteilungsmuster un behandelter pHN- Tiere entsprach. Dies deutete darauf hin, daß die UCH- L1- Hemmung keinen Effekt auf die Lokalisation des

Schlitzmembranproteins Nephrin in der Heymann- Nephritis hatte.

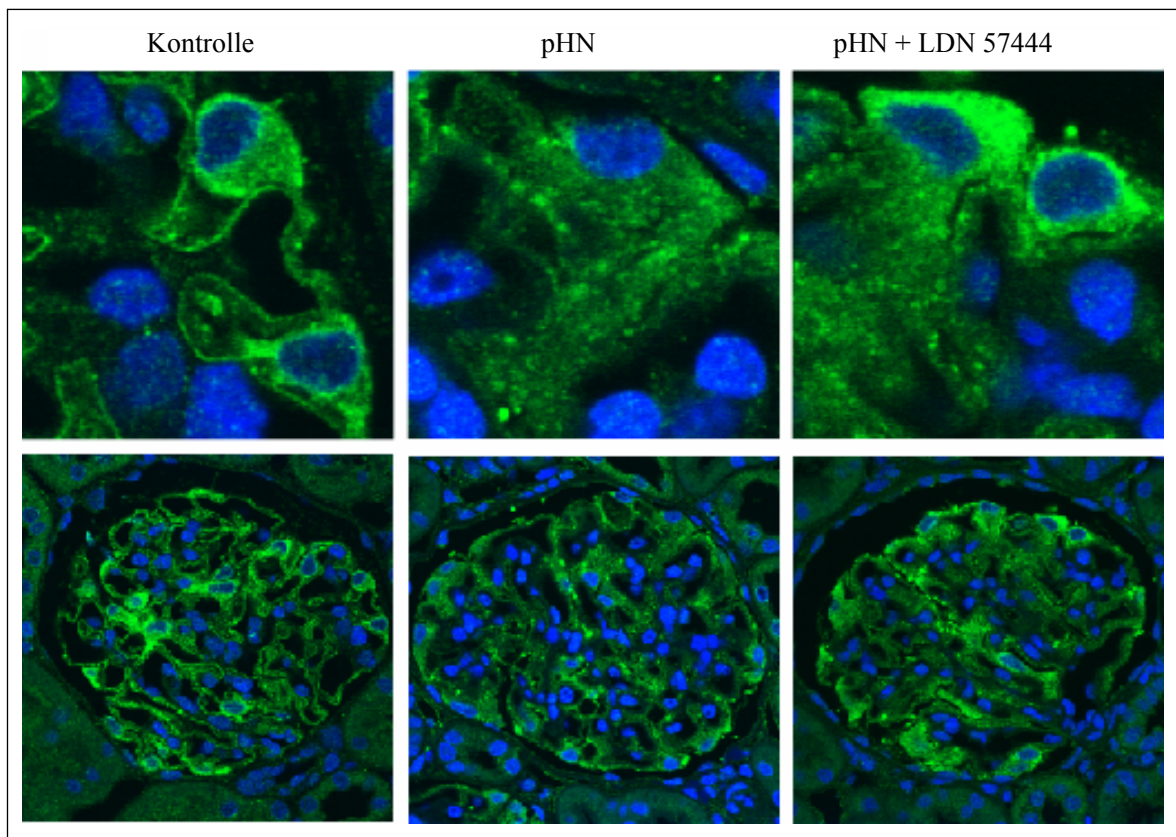


Abb. 19: Konfokale Aufnahmen der Nephrin- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren nach Behandlung mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444 an Tag 35. In den inhibitorbehandelten pHN- Tieren (n=2) zeigte sich immunhistochemisch kein Unterschied in der Distribution von Nephrin im Vergleich zu den unbehandelten pHN- Tieren (n=3). (Vergrößerung: 1000x und 400x) [grün (FITC): Nephrin, blau (DAPI): Zellkerne]

4.1.10.4. α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung nach UCH- L1- Hemmung

Um den Effekt einer UCH- L1- Hemmung auf die podozytäre Distribution von α - Aktinin- 4 zu untersuchen, wurde an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren, die drei Tage nach Pumpenimplantation gewonnen wurden, eine α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten Inhibitor- behandelter pHN- Tieren zeigte ein diffuses zytoplasmatisches Bindungsmuster mit teilweiser breiter Relokalisation von α - Aktinin- 4 an die Zellmembran (Abb. 20). In unbehandelten pHN- Tieren wurde das α - Aktinin- 4 insbesondere zytoplasmatisch und nur dezent membranär nachgewiesen.

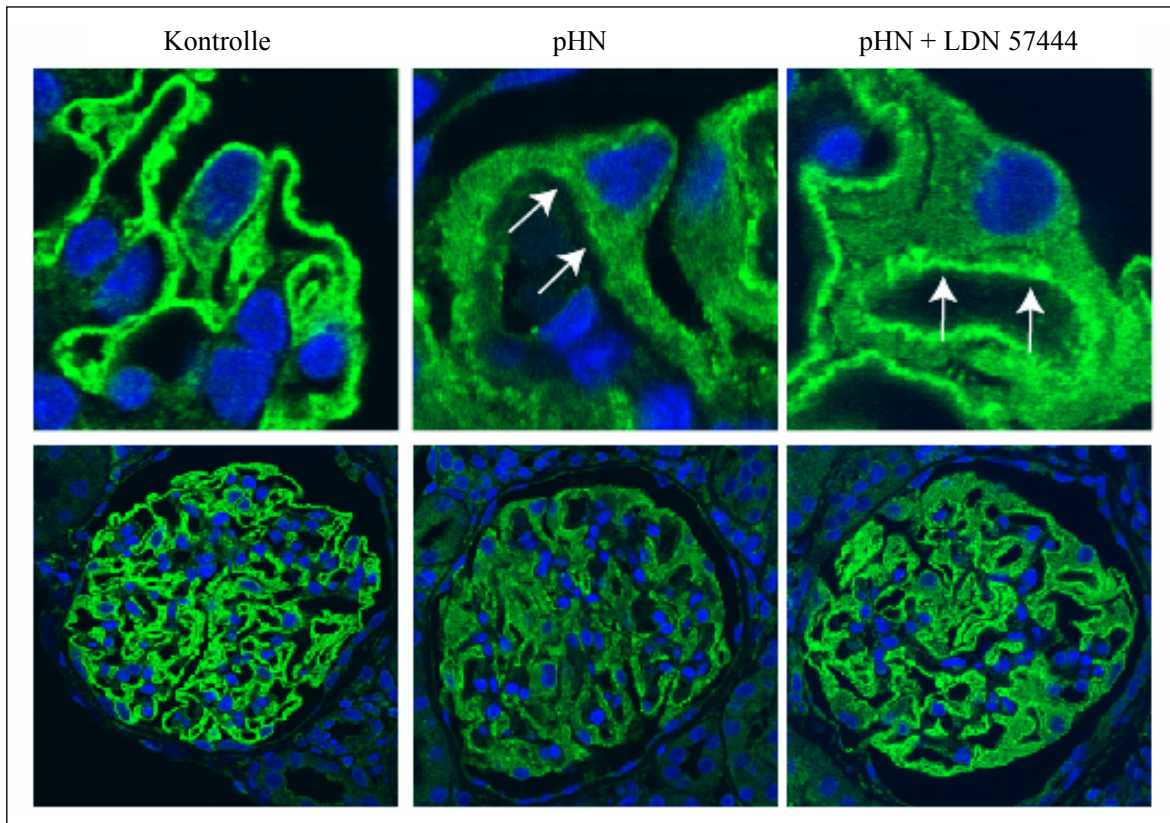


Abb. 20: Konfokale Aufnahmen der α -Aktinin-4-Immunfluoreszenzfärbung an Gewebsschnitten von pHN- und Kontrolltieren nach Behandlung mit dem UCH-L1-Inhibitor LDN 57444 an Tag 35. In den inhibitorbehandelten pHN-Tieren (n=2) war eine vermehrte Lokalisation von α -Aktinin-4 im Bereich der Podozytenmembran zu beobachten (Pfeile). Gleichzeitig blieb das diffuse zytoplasmatische Bindungsmuster erhalten. (Vergrößerung: 400x und 1000x) [grün (FITC): α -Aktinin-4, blau (DAPI): Zellkerne]

4.1.11. Die Hemmung des Proteasoms in der Heymann- Nephritis durch MG 132

Um die Auswirkungen einer Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus auf den Krankheitsverlauf der passiven Heymann- Nephritis zu untersuchen, wurde in Tieren der pHN- sowie der Kontrollgruppe eine Hemmung des Proteasoms mit dem Proteasom-Inhibitor MG 132 durchgeführt. Dieser Teilversuch erfolgte, um neben einer spezifischen Hemmung des Proteasoms durch den UCH-L1-Inhibitor LDN 57444 eine unspezifische Hemmung des gesamten Proteasoms herbeizuführen.

Den Tieren wurden an Tag 32 osmotische Dreitagespumpen mit dem spezifischen Proteasomhemmer MG 132 (60 μ l/kgKG) implantiert und dort bis zur Beendigung der Staffel an Tag 35 belassen. Einem Kontrolltier wurde eine Pumpe mit dem Lösungsmittel Ethanol implantiert, um dessen Einfluß auf den Krankheitsverlauf auszuschließen.

4.1.11.1. UCH-L1- Immunhistochemie nach Proteasomhemmung

Zur Untersuchung des Einflusses einer Hemmung des Proteasoms im Podozyten auf

dessen UCH- L1- Expression wurde an Gewebeproben des dritten Tages nach Pumpenimplantation eine immunhistochemische Färbung der UCH- L1 durchgeführt. Die Podozyten der Kontrolltiere, die mit dem Proteasomhemmer MG 132 behandelt worden waren, zeigen histologisch eine vermehrte Anfärbbarkeit für UCH- L1 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Dies deutet auf einen vermehrten Proteingehalt von UCH- L1 in den Podozyten inhibitorbehandelter Kontrolltiere hin. Das Lösungsmittel Ethanol zeigte in dem Kontrolltier keinen Effekt auf die podozytäre UCH- L1- Expression (Abb. 21).

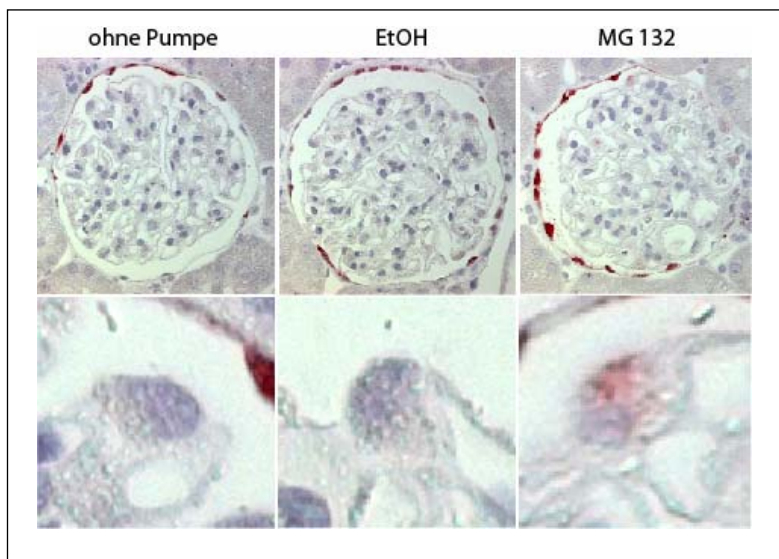


Abb. 21: UCH- L1- Immunhistochemie an Gewebsschnitten von Kontrolltieren an Tag 35 nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG 132 (60 ul/kgKG) und dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH). In den inhibitorbehandelten Kontrolltieren (n=2) war eine verstärkte podozytäre UCH- L1- Expression zu beobachten. Im EtOH- behandelten Tier (n=1) war keine vermehrte UCH- L1- Expression festzustellen. (Vergrößerung: 400x und 1000x)

4.2. Zellkultur

Um die enzymatischen Funktionen der UCH- L1 zu analysieren und Informationen über deren Effekte auf Podozytenmorphologie und das podozytäre Proteinmuster zu gewinnen, wurden Versuche an konditionell immortalisierten Podozyten durchgeführt. Aufgrund der Transfektion der Zellen mit einem temperatursensitiven SV40- T- Gen zeigten diese ein unterschiedliches Wachstums- und Proliferationsverhalten unter permissiven (33°C, 5 % CO₂) und nicht- permissiven (37°C, 5 % CO₂) Kulturbedingungen.

4.2.1. Differenzierung immortalisierter Podozyten unter nicht- permissiven Bedingungen

Bei Kultivierung unter permissiven Bedingungen zeigten die Podozyten das typische Zellbild proliferierender Zellen mit zahlreichen Zellteilungen und Mitosefiguren. Die Zellen waren pflastersteinartig gelagert und besaßen einen langgestreckten dreieckigen Zellleib. Wurden die Kulturbedingungen zu nicht- permissiven Bedingungen verändert, sistierte die Proliferation aufgrund der Inaktivierung des temperatursensitiven SV40- T- Gens, und die Podozyten nahmen einen neuen Phänotyp an. Morphologisch entwickelten sich die Podozyten über einen Zeitraum von 14 Tagen zu großen, vereinzelt liegenden Zellen mit rundem Zellleib, die flach ihrer Unterlage anhafteten (Abb. 23 A). Zudem begannen sie, podozytäre Marker differenzierter Podozyten in vivo zu exprimieren. Wurden die Zellen nach abgeschlossener Differenzierung wieder permissiven Bedingungen ausgesetzt, begann erneut eine Proliferation, und die Zellen kehrten phänotypisch zu der Gestalt proliferierender Podozyten unter permissiven Bedingungen zurück.

4.2.1.1. Nachweis der Differenzierungsmarker Synaptopodin und Nephrin sowie des podozytenspezifischen α - Aktinin- 4

Zum Nachweis des Differenzierungsprozesses, den die Kulturpodozyten unter nicht- permissiven Bedingungen durchlaufen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Differenzierungsmarker Nephrin und Synaptopodin an Kulturpodozyten durchgeführt. Zellen, die für 14 Tage unter nicht- permissiven Bedingungen kultiviert wurden, wurden dabei mit proliferierenden, unter permissiven Bedingungen wachsenden Podozyten verglichen. Es zeigte sich ein Anstieg der Immunfluoreszenz beider Differenzierungsmarker in den unter nicht- permissiven Bedingungen kultivierten Podozyten im Vergleich zu Podozyten, die unter permissiven Bedingungen kultiviert wurden (Abb. 22). Die erhöhte Nephrin- und Synaptopodin- Immunfluoreszenz wies auf eine verstärkte Expression dieser Podozytenmarker in den unter nicht- permissiven Bedingungen kultivierten Podozyten hin und belegte deren erhöhten Differenzierungsstatus.

Darüber hinaus wurde zur Überprüfung des Differenzierungsstatus die Expression des podozytenspezifischen Aktin- bindenden Proteins α - Aktinin- 4 in der Westernblotanalyse untersucht. Kulturpodozyten wurden für 21 Tage unter nicht- permissiven Bedingungen kultiviert, die Zellen nach 2, 4, 7, 14 und 21 Tagen gesammelt und mit deren Lysaten eine Westernblotanalyse durchgeführt. Als Kontrolle dienten unter permissiven Bedingungen

gewachsene Zellen. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen nach 14 Tagen unter nicht-permissiven Bedingungen erneut für 7 Tage permissiven Bedingungen ausgesetzt und das Lysat ebenfalls auf die α -Aktinin-4-Expression untersucht.

Es zeigte sich in der Westernblotanalyse des α -Aktinin-4 ein Anstieg des Proteins über den Zeitraum von 21 Tagen unter nicht-permissiven Bedingungen (Abb. 23 B). Der Anstieg der α -Aktinin-4-Expression sistierte bei erneuter Kultivierung unter permissiven Bedingungen ab Tag 14. Auch der Anstieg des podozytenspezifischen Proteins α -Aktinin-4 wies auf einen erhöhten Differenzierungsstatus der für 14 Tage unter nicht-permissiven Bedingungen kultivierten Podozyten gegenüber unter permissiven Bedingungen kultivierten Zellen hin.

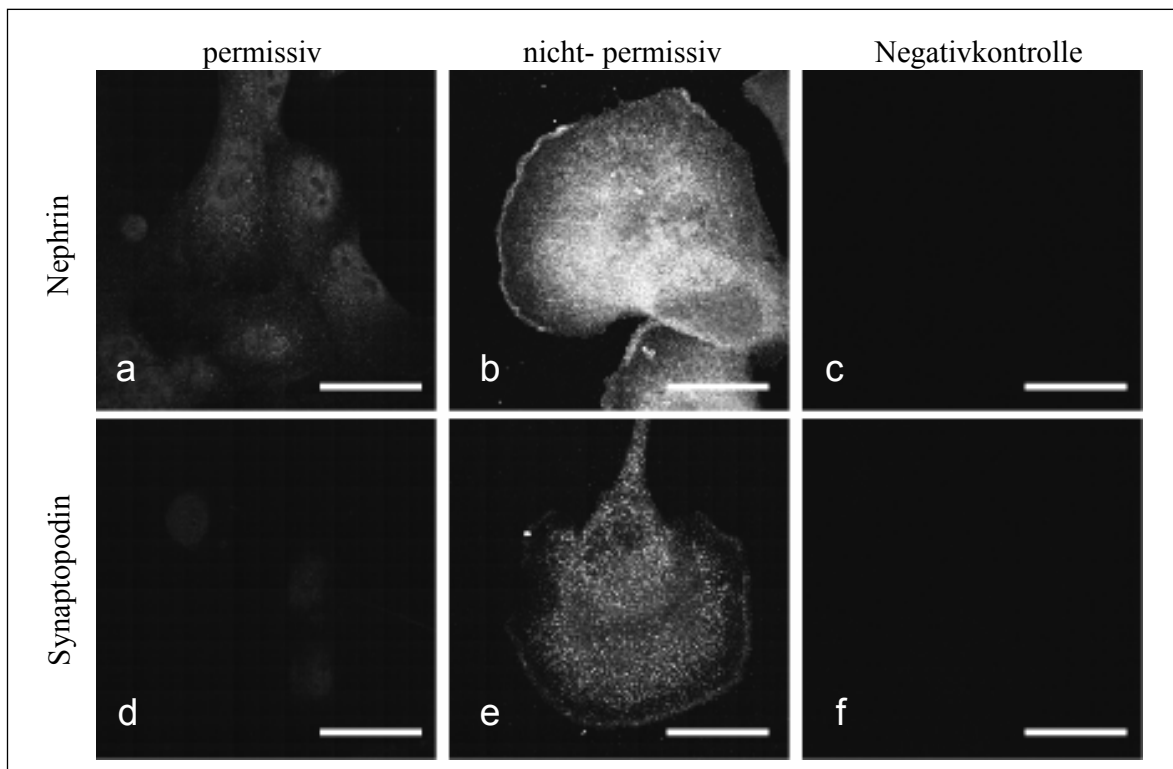


Abb. 22: Konfokale Aufnahmen der Nephtrin (a, b)- und Synaptopodin (d, e)- Immunhistochemie an unter permissiven und nicht-permissiven Bedingungen kultivierten Podozyten. Unter nicht-permissiven Kulturbedingungen zeigten die Podozyten eine verstärkte Expression der Differenzierungsmarker Nephtrin und Synaptopodin (b, e) gegenüber deren Expression von Podozyten unter permissiven Bedingungen (a, d). Mit der Durchführung einer Negativkontrolle (c, f) unter Auslassung des Primärantikörpers wurde eine Autofluoreszenz der Zellen ausgeschlossen. (Vergrößerung: 400x)

4.2.1.2. Inverse Korrelation von UCH-L1- Expression und Differenzierungsstatus

Immortalisierte humane Kulturpodozyten exprimieren UCH-L1. Die Expression von UCH-L1 wurde sowohl auf Proteinebene im Westernblot als auch auf mRNA-Ebene unter

Durchführung einer RT-PCR nachgewiesen. Um eine Korrelation der UCH-L1-Expression mit dem Differenzierungsstatus des Podozyten zu untersuchen, wurden Kulturpodozyten über 21 Tage unter nicht-permissiven Bedingungen kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten des Differenzierungsprozesses wurden Zellen gesammelt und die Zellysate im Westernblot auf die UCH-L1-Expression analysiert. Als Kontrollen dienten unter permissiven Bedingungen kultivierte Podozyten. Es zeigte sich, daß die podozytäre UCH-L1-Expression in unter nicht-permissiven Bedingungen kultivierten Podozyten nach einem initialen dezenten Anstieg an Tag 4 in Korrelation zum Differenzierungsprozess stetig abnahm. An Tag 21 war ein Nachweis der UCH-L1-Expression im Westernblot nur noch schwach möglich. Wurden nach 14 Tagen unter nicht-permissiven Bedingungen die differenzierten Podozyten erneut permissiven Bedingungen ausgesetzt, was zu einer erneuten Proliferation führte, zeigte sich ein erneuter Anstieg der UCH-L1-Expression. Der Differenzierungsstatus des Kulturpodozyten korrelierte damit eng auf inverse Weise mit der UCH-L1-Expression. Ein undifferenzierter Phänotyp des Podozyten ging mit einer hohen UCH-L1-Expression einher, während in ausdifferenzierten Podozyten kaum noch eine UCH-L1-Expression nachweisbar war.

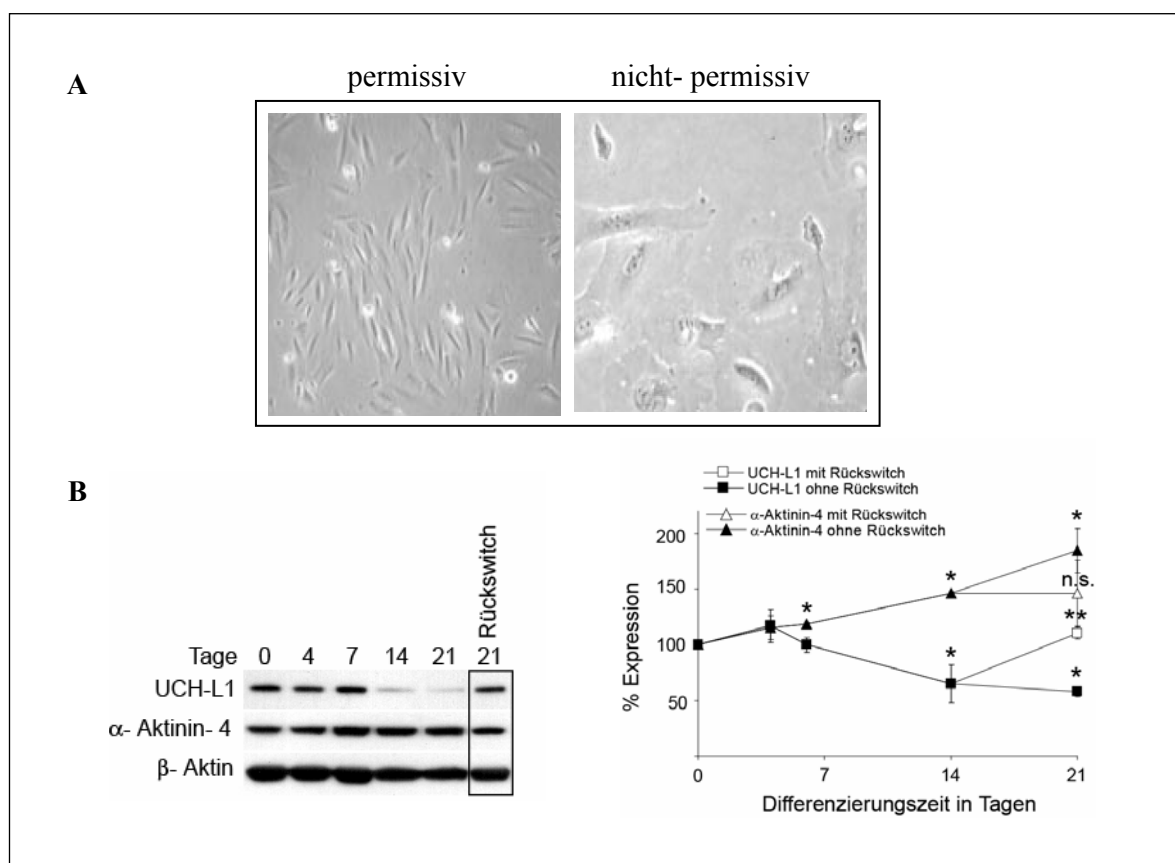


Abb. 23: Immortalisierte humane Podozyten unter permissiven und nicht- permissiven Kulturbedingungen. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen immortalisierter humaner Podozyten unter permissiven und nicht- permissiven Kulturbedingungen (Vergrößerung: 40x, Quelle: 122) (B) Westernblotanalyse der UCH- L1- und α - Aktinin- 4- Expression im Differenzierungsprozeß über 21 Tage unter nicht- permissiven Bedingungen und bei Rückswitch zu permissiven Bedingungen an Tag 14; nach Densitometrie und Normierung gegen β - Aktin zeigte sich eine inverse Korrelation von UCH- L1- Expression und Differenzierungsprozeß mit einer erneuten Zunahme der UCH- L1- Expression bei Durchführung des Rückswitches; die α - Aktinin- 4- Expression nahm in Korrelation zum Differenzierungsprozeß zu und sistierte unter Rückswitchbedingungen (n=2). Die Werte wurden als % der Kontrolle angegeben (Podozyten Tag 0) $\pm$ SEM, * p < 0,05, ** p < 0,01

4.2.2. ECM- Experiment

Die glomeruläre Basalmembran, der die Podozyten mit ihren zahlreichen Fußfortsätzen anhaften, besteht hauptsächlich aus Kollagen IV, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen. Um den Einfluß von extrazellulärer Matrix (ECM) auf den podozytären Phänotyp und dessen Proteinexpression zu untersuchen, wurden Kulturpodozyten auf Kulturgefäßen ausgesät, die alternativ mit Kollagen I, Kollagen IV und Laminin beschichtet waren. Nach Proliferation zu einer Konfluenz von 75 % wurden die Zellen für 14 Tage nicht- permissiven Bedingungen ausgesetzt, um das Ausdifferenzieren der Podozyten zu erlauben. Als Kontrollen dienten auf unbeschichteten Flaschen für 14 Tage unter nicht- permissiven Bedingungen kultivierte Podozyten.

4.2.2.1. Annahme eines arborisierten Phänotyps

Die auf beschichteten Kulturgefäßen kultivierten Podozyten nahmen im Laufe ihrer Differenzierung einen arborisierten Phänotyp mit auffälliger Zellfortsatzbildung an. Die Zellen bildeten lange verzweigte Ausläufer, die zwischen benachbarten Zellen kommunizierten. Der charakteristische Phänotyp bildete sich bei Wachstum sowohl auf Kollagen IV- und Laminin- beschichteten Kulturflaschen als auch auf Kollagen I- beschichteten Flaschen aus (Abb. 24 A).

4.2.2.2. Inverse Korrelation von UCH- L1- Expression und Zellfortsatzbildung

Um das Proteinmuster der arborisierten Zellen zu untersuchen, wurden Podozyten für 14 Tage auf Kollagen I, Kollagen IV und Laminin unter nicht- permissiven Bedingungen kultiviert. Als Kontrollen wurden Zellen auf herkömmlichen unbeschichteten Kulturflaschen ausdifferenziert. Aus den Zelllysaten wurden Westernblotanalysen der podozytären UCH- L1- Expression, des Gehaltes an Monoubiquitinen sowie der

Expression von β - Catenin durchgeführt. Das Adherens- junction- Protein β - Catenin, das im Podozyten im Bereich der Fußfortsätze exprimiert wird, diente hier als Marker für die Anzahl der Zell- Zell- Kontakte und wies damit indirekt auf den Arborisierungsgrad der Zellen hin. Die auf beschichteten Flaschen kultivierten Podozyten zeigten eine signifikant geringere UCH- L1- Expression als die auf Plastik kultivierten Kontrollen (Abb. 24). Die auf Kollagen I gewachsenen Podozyten wiesen dabei die geringste UCH- L1- Expression auf. Nach Wachstum auf Kollagen IV war die UCH- L1- Expression höher als nach Wachstum auf Kollagen I oder Laminin, lag aber signifikant unter dem Wert der auf Plastik kultivierten Podozyten.

Der podozytäre Gehalt an Monoubiquitinen lag in den auf beschichteten Flaschen gewachsenen Podozyten ebenfalls signifikant unter dem der auf Plastik kultivierten Kontrollen. Die auf Laminin gewachsenen Podozyten verfügten über den geringsten Monoubiquitingehalt, auf Kollagen IV kultivierte Podozyten wiesen von den auf beschichteten Flaschen gewachsenen Podozyten den höchsten Wert auf. Der Monoubiquitin- Gehalt der auf Kollagen IV- gewachsenen Podozyten lag dabei signifikant unter dem der auf Plastik kultivierten Podozyten. Es zeigte sich demnach eine positive Korrelation der UCH- L1- Expression mit dem zellulären Gehalt an Monoubiquitinen.

Die Westernblotanalyse der β - Catenin- Expression zeigte eine signifikant erhöhte β - Catenin- Expression der auf beschichteten Flaschen kultivierten Podozyten im Vergleich zu den auf Plastik gewachsenen Zellen. Die stärkste Expression von β - Catenin wurde in auf Kollagen IV- und Kollagen I beschichteten Flaschen festgestellt, während die Expression in auf Laminin gewachsenen Zellen leicht darunter lag. Auch die β - Catenin- Expression von auf Laminin kultivierten Podozyten lag signifikant über der β - Catenin- Expression der Kontrollpodozyten.

Zusammenfassend wurde in Podozyten, die einen arborisierten Phänotyp aufwiesen, eine im Vergleich zur Kontrolle stark verminderte UCH- L1- Expression nachgewiesen. Diese verringerte Expression von UCH- L1 korrelierte mit einem verminderten Gehalt an Monoubiquitinen im Vergleich zur Kontrolle. Die β - Catenin- Expression lag in den arborisierten Zellen über dem Wert der Kontrollen, die nur wenige Zellausläufer und Zell- Zell- Kontakte aufwiesen.

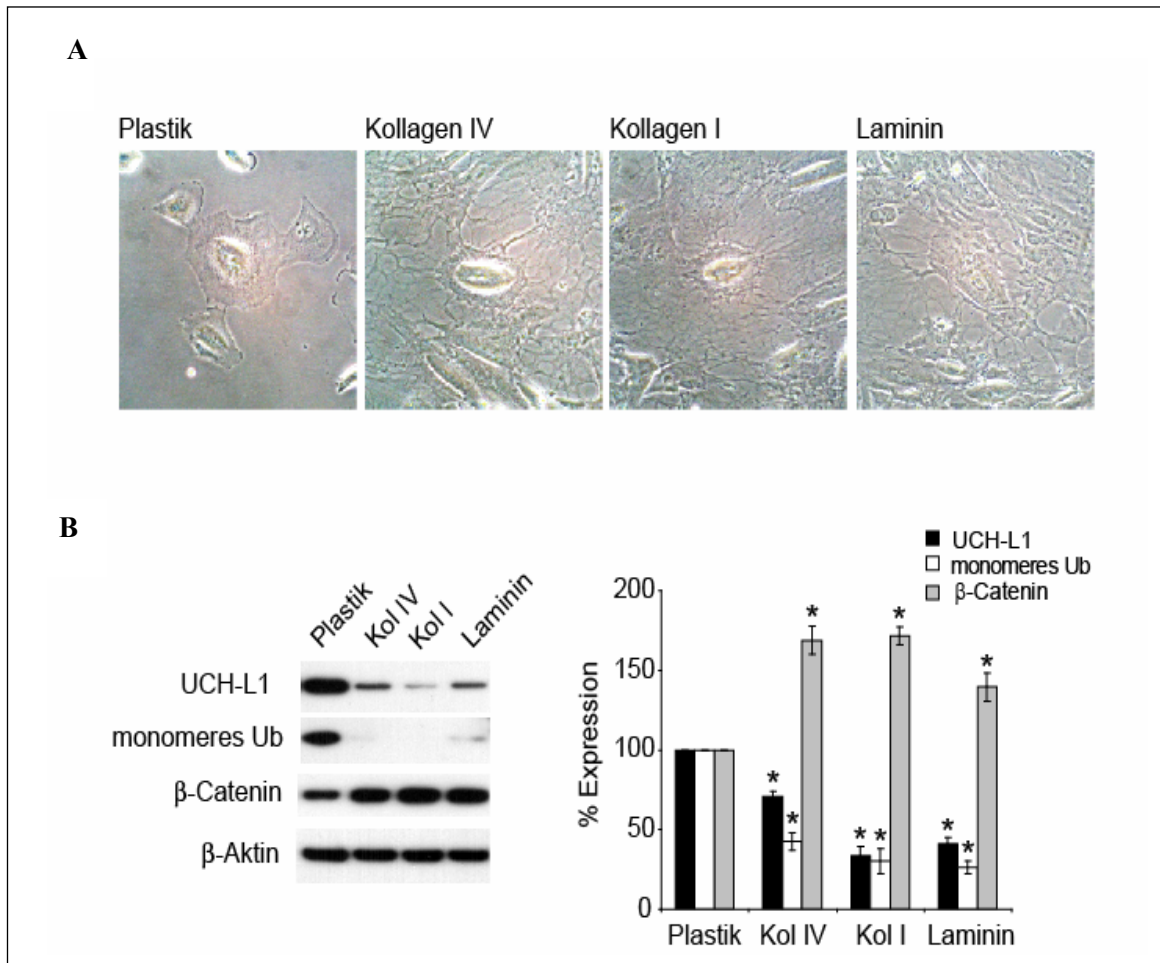


Abb. 24: Einfluß von Extrazellulärmatrix auf Podozytenmorphologie und Expression von UCH- L1, Monoubiquitinen und β- Catenin im Podozyten. (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kulturpodozyten nach Kultivierung unter nicht- permissiven Bedingungen für 14 Tage auf Plastik, Kollagen IV, Kollagen I und Laminin; auf ECM kultivierte Podozyten nahmen einen arborisierten Phänotyp an. (Vergrößerung: 400x) (B) Westernblotanalyse von UCH- L1- Expression, Monoubiquitinpool und β- Catenin- Expression aus Podozytenlysaten nach 14- tägiger Differenzierung auf ECM- beschichteten und unbeschichteten Kulturflaschen; die Densitometrie zeigte nach Normalisierung gegen β- Aktin eine verminderte UCH- L1- Expression mit verringertem Monoubiquitingehalt und eine vermehrte β- Catenin- Expression bei Kultivierung auf ECM (n=3). Die Werte wurden als % der Kontrolle angegeben (auf unbeschichteten Flaschen kultivierte Podozyten) ± SEM, * p < 0,05.

4.2.3. Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität durch LDN 57444 in vitro

Um Informationen über die Funktionen der UCH- L1 im Podozyten zu gewinnen, wurde eine Hemmung der enzymatischen UCH- L1- Hydrolaseaktivität in differenzierten Kulturpodozyten durch den spezifischen Hemmstoff LDN 57444 durchgeführt. Untersucht wurde der Einfluß einer UCH- L1- Hemmung auf die Podozytenmorphologie und das podozytäre Proteinmuster in Hinblick auf die Expression von β- Catenin, Podocin und α- Aktinin- 4.

4.2.3.1. Einfluß der UCH- L1- Hemmung auf die Zellfortsatzbildung

Auf Kollagen I- beschichteten 24- Loch- Platten wurden Podozyten für 14 Tage unter nicht- permissiven Bedingungen kultiviert. Es erfolgte ein Mediumwechsel mit Inhibitor- haltigem Medium mit LDN 57444- Konzentrationen von 5 μ M und 50 μ M in DMSO. Als Kontrolle erfolgte eine Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine Phalloidin- Färbung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit DAPI Hardset Mount eingedeckt und unter UV- Licht betrachtet. In den DMSO- Kontrollen erschienen die Podozyten polygonal und wiesen eine glatte ebenmäßige Zellmembran auf. Nach Inkubation mit 5 μ M LDN 57444 zeigten die Zellen morphologisch keine von den Kontrollen abweichenden Veränderungen. Erfolgte eine Inkubation mit 50 μ M LDN 57444, entwickelten die Podozyten zahlreiche zellfortsatzähnliche Protrusionen der Zellmembran (Abb. 25 A). Die Anzahl der Zellfortsätze pro Zelle wurden ausgezählt und mit der eingesetzten Inhibitor- Konzentration eine Dosis- Wirkungskurve erstellt (Abb. 25 C). Es zeigte sich eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit der Zellfortsatzformierung. Zudem wurde zur Überprüfung der Zeitabhängigkeit der durch UCH- L1- Inhibition bedingten Zellfortsatzformierung eine Zellfortsatzzählung nach Inkubationsdauer von 10, 20, 30, 45, 60, 120 und 180 min mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 50 μ M durchgeführt. Es zeigte sich eine Zeitabhängigkeit der Zellfortsatzbildung mit einem Maximum nach 1 h (Abb. 25 C). Die Zeitabhängigkeit der Inhibitorwirkung lag in der Reversibilität der UCH- L1- Hemmung durch LDN 57444 begründet. Um eine Apoptose der Kulturpodozyten durch den Hemmstoff LDN 57444 auszuschließen, wurde ein Tunel Assay durchgeführt. Dieser belegte, daß die Zellen unter UCH- L1- Inhibition keine Apoptose durchliefen, so daß die Zellfortsatzformierung nicht in der Induktion von Apoptose begründet sein konnte.

4.2.3.2. Auswirkungen der UCH- L1- Inhibition auf die Podozytenproteine β - Catenin, Podocin und α - Aktinin- 4

Um Auswirkungen der UCH- L1- Hemmung auf das Proteinmuster des Podozyten zu untersuchen, wurden Podozyten nach einstündiger Inkubation mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444 in einer Konzentration von 50 μ M lysiert und die Lysate einer Westernblotanalyse unterzogen (Abb. 25 B). Im β - Catenin- Westernblot zeigte sich ein signifikanter Anstieg der β - Catenin- Expression unter UCH- L1- Hemmung bereits ab einer LDN 57444- Konzentration von 5 μ M. Im Podocin- Westerblot zeigte sich in Podozyten nach UCH- L1- Hemmung auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen kein signifikanter Unterschied in der Podocin- Expression im Vergleich zu den DMSO-

behandelten Kontrollen. Im α -Aktinin-4-Westernblot wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied der α -Aktinin-4-Expression nach UCH-L1-Hemmung im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen beobachtet.

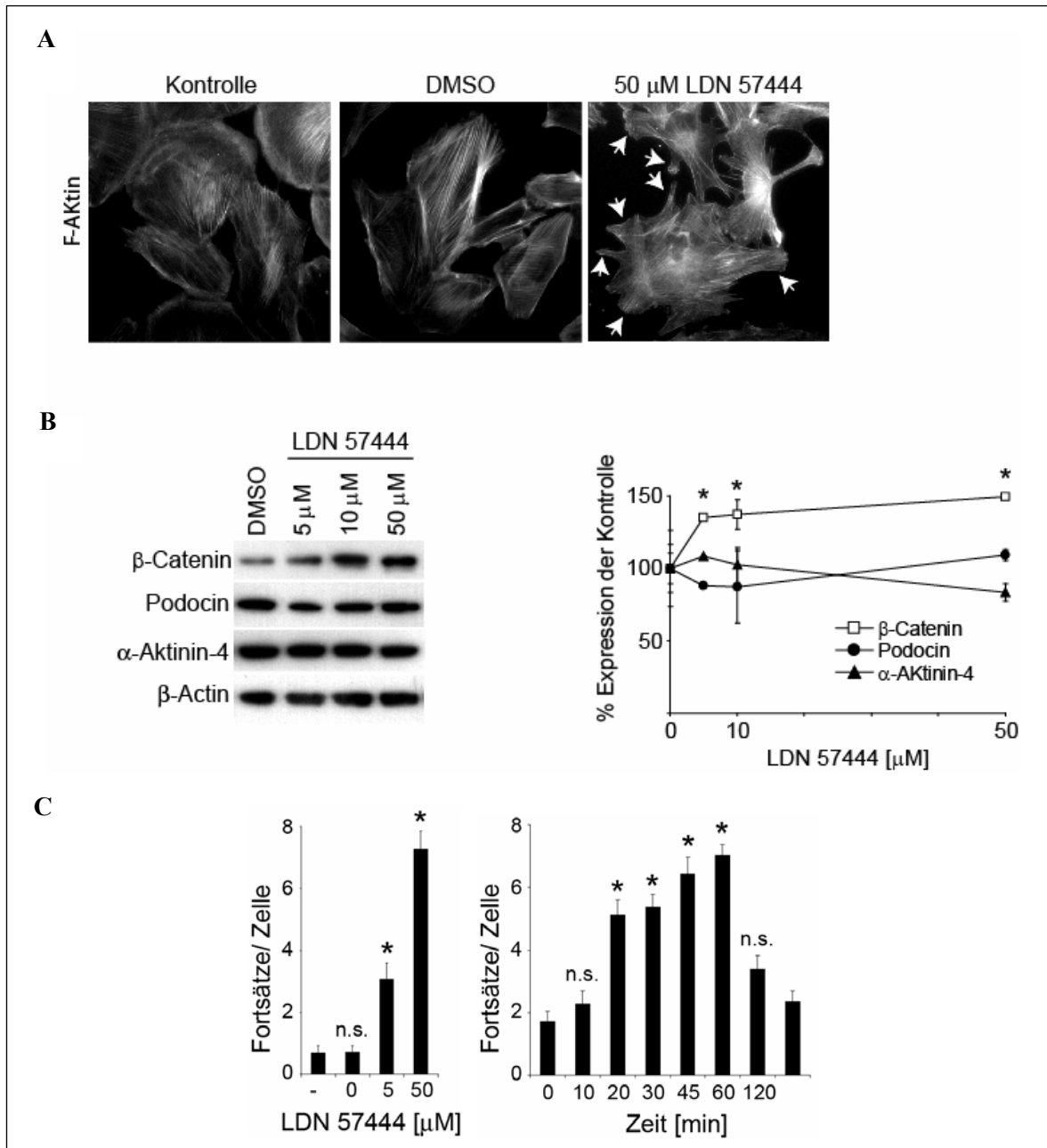


Abb. 25: Einfluß der Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität auf Podozytenmorphologie und podozytäre Expression von β - Catenin, Podocin und α - Aktinin- 4. (A) Phalloidininfärbung von F- Aktin an differenzierten Kulturpodozyten nach Behandlung mit DMSO und LDN 57444 (50 μ M) für 1 h; die Podozyten bildeten bei Behandlung mit LDN 57444 Zellfortsätze aus (Pfeilköpfe). (Vergrößerung: 400x) (B) Westernblotanalyse der β - Catenin-, Podocin- und α - Aktinin- 4 - Expression aus Lysaten differenzierter Podozyten nach Behandlung mit DMSO und LDN 57444 (5, 10, 50 μ M) für 1 h; die Densitometrie zeigte nach Normalisierung gegen β - Aktin einen signifikanten Anstieg von β - Catenin unter zunehmender UCH-L1- Inhibition bei annähernd identischer Expression von Podocin und α - Aktinin- 4 (n=3). Die Werte wurden

als % der Kontrolle angegeben (DMSO- behandelte Podozyten) $\pm$ SEM, * $p < 0,05$. (C) Dosis- Wirkungskurve und Zeit- Wirkungskurve von LDN 57444; die Entwicklung von Zellfortsätzen unter Inhibitorbehandlung erfolgte sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Die Werte wurden als Fortsätze/ Zelle angegeben $\pm$ SEM, * $p < 0,05$, n.s. nicht signifikant

4.2.3.3. Immunfluoreszenzfärbung von β - Catenin und α - Aktinin- 4 nach UCH- L1- Hemmung in vitro

Zur Analyse des intrazellulären Verteilungsmusters von β - Catenin und α - Aktinin- 4 nach UCH- L1- Hemmung wurden Immunfluoreszenzfärbungen von β - Catenin und α - Aktinin- 4 an auf Kollagen I differenzierten Kulturpodozyten durchgeführt, nachdem diese für 1 h mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444 (5 und 50 μ M) inkubiert wurden. Es zeigte sich bereits nach 20 min unter UCH- L1- Hemmung in der β - Catenin- Immunfluoreszenzfärbung eine Zunahme der Immunfluoreszenz im Bereich der Zell- Zell- Kontakte benachbarter Podozyten und in Membranprotrusionen (Abb. 26 A). Die Zunahme der Immunfluoreszenz ließ auf eine Akkumulation des Proteins in diesem Bereich schließen. Sie ging mit einer im Westernblot belegten verstärkten β - Catenin- Expression einher. In der α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich unter der Inhibitorbehandlung bereits ab einer Konzentration von 5 μ M eine Akkumulation von α - Aktinin- 4 an der Zellmembran mit einer Betonung der Membranprotrusionen und Zellfortsätzen (Abb. 26 B). Aufgrund eines im Westernblot nicht nachweisbaren Anstiegs der α - Aktinin- 4- Expression war von einer Redistribution des Proteins ohne Einfluß auf die Expression unter UCH- L1- Inhibition auszugehen.

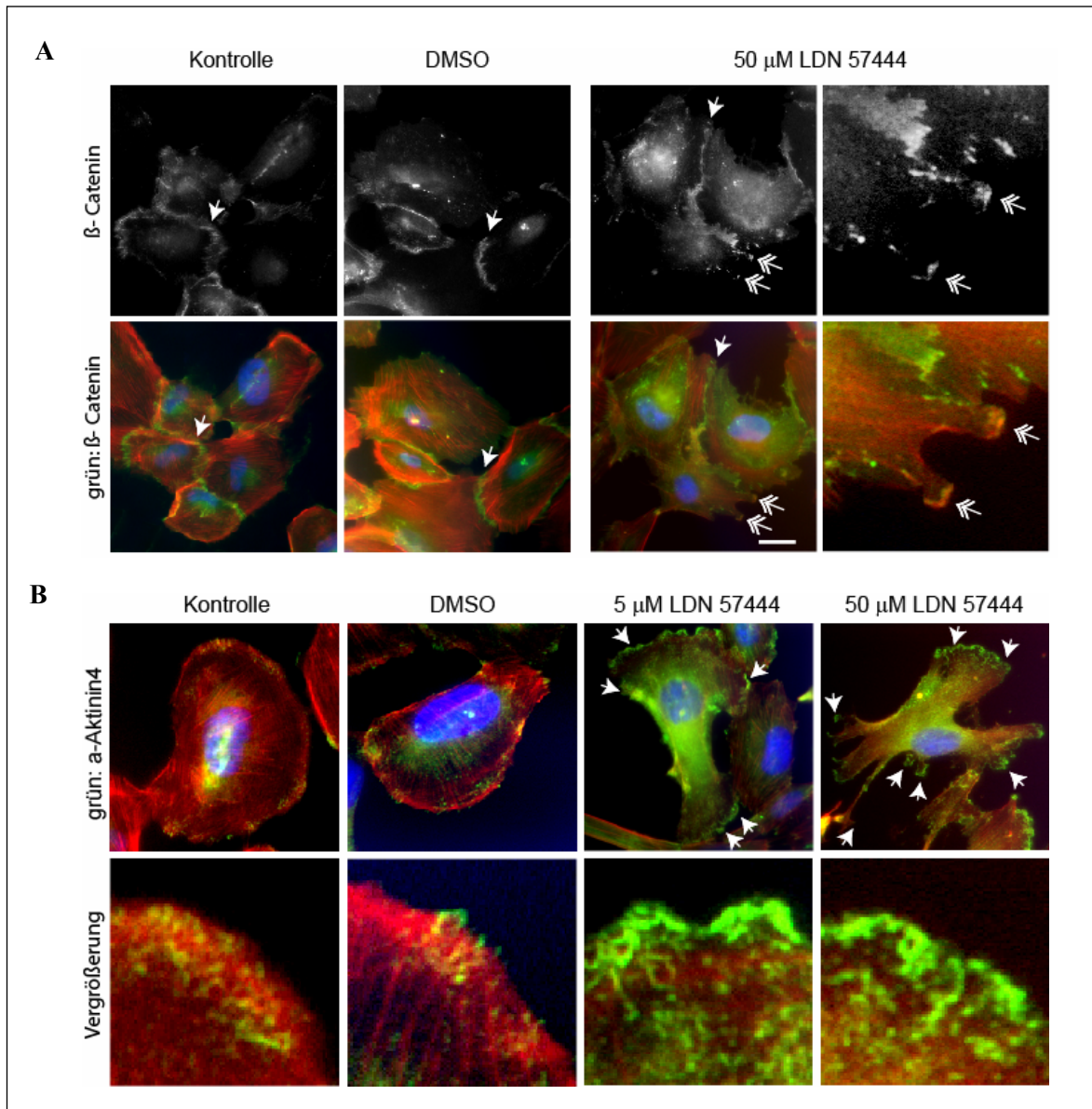


Abb. 26: Immunfluoreszenzfärbung von β - Catenin und α - Aktinin- 4 nach Behandlung von Kulturpodozyten mit LDN 57444 für 20 min. (A) β - Catenin- Immunfluoreszenzfärbung nach Behandlung mit DMSO und 50 μ M LDN 57444; es zeigte sich nach UCH- L1- Inhibition eine Zunahme der Immunfluoreszenz im Bereich der Zell- Zell- Kontakte (Pfeile) und in Membranprotrusionen (Doppelpfeile). (B) α - Aktinin- 4- Immunfluoreszenzfärbung nach Behandlung mit DMSO, 5 μ M und 50 μ M LDN 57444; UCH- L1- Inhibition führte zu einer Akkumulation von α - Aktinin- 4 in Membranprotrusionen und Zellfortsätzen (Pfeilköpfe). (Vergrößerung: 400x und 1000x) [rot (Phalloidin): Aktinzytoskelett, blau (DAPI): Zellkerne]

4.3. Klonierung und Transfektion

Um den Effekt einer UCH- L1- Überexpression im Podozyten auf dessen Morphologie sowie dessen Proteinmuster zu analysieren, wurden humane Kulturpodozyten mit einem UCH- L1- exprimierenden Vektor transient transfiziert. Aufgrund der geringen Effizienz

einer transienten Transfektion wurde zudem eine stabile Transfektion mit dauerhafter Integration des UCH- L1- Gens in das Genom der Wirtszelle angestrebt.

4.3.1. Restriktionsverdaus von EGFP- UCH- L1 und pMSCV

Zunächst wurde aus dem EGFP- UCH- L1- Vektor das UCH- L1- Insert durch Restriktionsverdaus herausgeschnitten und isoliert. Dieser Schritt erfolgte zum einen zur Herstellung eines geeigneten Kontrollvektors EGFP für die transiente Transfektion durch Elektroporation, zum anderen zur Isolierung des UCH- L1- Genfragmentes, das anschließend in den pMSCV- Vektor kloniert werden sollte, um damit eine stabile Transfektion der Kulturpodozyten durchzuführen.

Mithilfe der Restriktionsenzyme BamH1 und Xho1 wurde aus dem Vektor EGFP- UCH- L1 das UCH- L1- Insert herausgeschnitten und die Schnittstücke elektrophoretisch aufgetrennt. Auf Laufhöhe von ~ 670 bp zeigte sich im Agarosegel eine Bande, von der anzunehmen war, daß es sich hierbei um das UCH- L1 Insert (671 bp) handelte (Abb. 27 A). Dieses wurde aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Um die Insertion des UCH- L1- Genfragmentes in den murinen Stammzellvektor pMSCV zu ermöglichen, wurde dieser mithilfe der Restriktionsenzyme Bgl2 und Xho1 innerhalb der MCS aufgeschnitten. Durch die Restriktionsverdaus wurden pMSCV und das UCH- L1- Fragment mit kompatiblen Enden versehen, so daß eine direkte Ligation möglich war. Zur Ligation des UCH- L1- Inserts mit dem linearisierten pMSCV- Plasmids wurde die Fragmente in äquimolarem Verhältnis vermischt und mithilfe einer T4- Ligase ligiert. Nach Transformation von kompetenten Bakterien mit dem pMSCV- UCH- L1- Plasmid erfolgte eine Vermehrung und Isolation der Plasmid- DNA, mit der im Anschluß diagnostische Verdaus mit den Enzymen Hind3, Xho1 und Nco1 zur Überprüfung des Klonierungserfolges durchgeführt wurden (Abb. 27 B).

Erwartungsgemäß zeigten sich in dem Doppelverdaus von pMSCV- UCH- L1 mit Hind3 und Xho1 zwei Banden, da sowohl innerhalb als auch außerhalb der MCS Schnittstellen dieser Enzyme vorhanden waren. Der Doppelverdaus von pMSCV- UCH- L1 mit Hind3 und Nco1 führte ebenfalls zur Abbildung von zwei Fragmenten. Dies deutete auf eine erfolgreiche Insertion des UCH- L1- Fragmentes hin, da nur dieses eine Schnittstelle für Nco1 besaß. Zudem zeigte der pMSCV- UCH- L1- Vektor eine Linearisierung nach Einzelverdaus mit Nco 1, was ebenfalls ein Hinweis auf eine erfolgreiche Klonierung war. Das pMSCV- Plasmid zeigte nach dem Doppelverdaus mit Hind3 und Xho1 erwartungsgemäß ebenfalls zwei Banden. Nach Doppelverdaus mit Hind3 und Nco1 zeigte

sich eine Linearisierung des Vektors, was auf ein Fehlen der NcoI- Schnittstelle hindeutete. Nach Einzelverdau des pMSCV mit NcoI blieb eine Linearisierung des Vektors mangels einer NcoI- Schnittstelle des pMSCV- Plasmids aus. Im direkten Vergleich von pMSCV- UCH- L1 und pMSCV zeigte sich eine verminderte Laufgeschwindigkeit von pMSCV- UCH- L1, die auf der Insertion von zusätzlichen 671 bp durch erfolgreiche Klonierung mit dem UCH- L1- Insert beruhen könnte. Der Nachweis einer Erkennungssequenz von NcoI im pMSCV- UCH- L1- Vektor, die ausschließlich innerhalb des UCH- L1- Genfragments existiert, sowie die Laufhöhe des Vektors ließen eine erfolgreiche Klonierung vermuten.

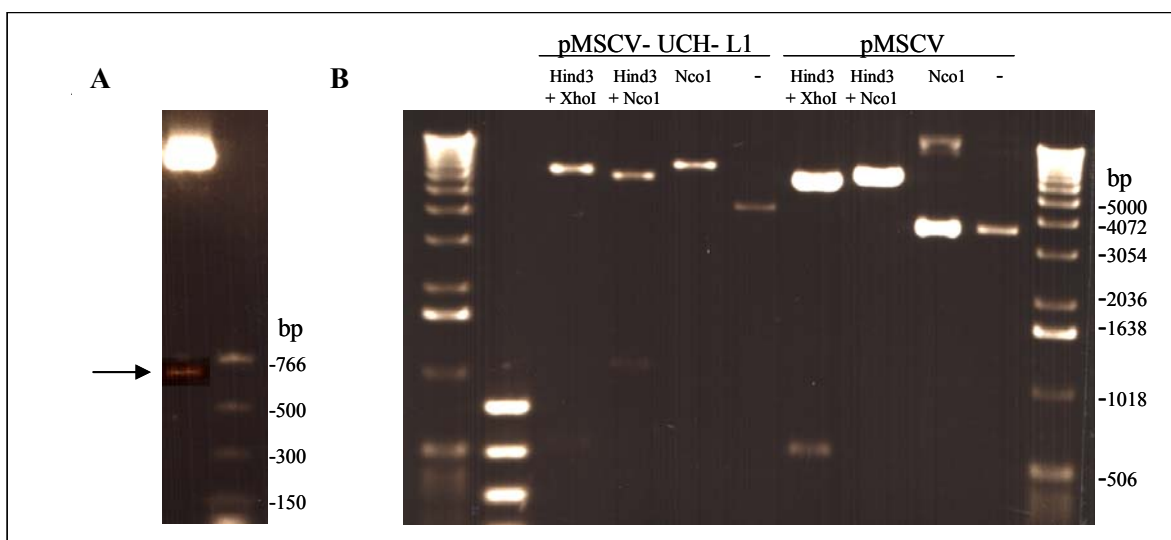


Abb. 27: Restriktionsverdaus von EGFP- UCH- L1, pMSCV- UCH- L1 und pMSCV. (A) Restriktionsverdau von EGFP- UCH- L1 mit BamHI und XhoI; auf Laufhöhe von ~670 bp war die DNA-Bande des UCH- L1- Inserts nachzuweisen (Pfeil). (B) Diagnostischer Verdau von pMSCV- UCH- L1 und pMSCV; der Nachweis einer NcoI- Schnittstelle sowie die Laufhöhe von pMSCV- UCH- L1 ließen auf eine erfolgreiche Klonierung des UCH- L1- Inserts in den pMSCV- Vektor schließen.

4.3.2. Transiente Transfektion von Kulturpodozyten mit EGFP- UCH- L1 durch Elektroporation

Um eine transiente Überexpression von UCH- L1 im Kulturpodozyten zu erreichen, wurden undifferenzierte Podozyten mit dem EGFP- UCH- L1- Vektor durch Elektroporation transfiziert. Erfolgreich transfizierte Podozyten konnten 24 h nach erfolgter Transfektion durch die Autofluoreszenz des GFP unter UV- Licht nachgewiesen werden (Abb. 28 A). Aus transfizierten Podozyten wurden Lysate hergestellt und im Westernblot auf deren Expression von UCH- L1, GFP und Ubiquitin analysiert. Auf Laufhöhe von 55 kD konnte sowohl im UCH- L1- Westernblot als auch im GFP-

Westernblot in den EGFP- UCH- L1 transfizierten Zellen das Fusionsprotein GFP- UCH- L1 nachgewiesen werden (Abb. 28 B). Sowohl EGFP- UCH- L1- transfizierte Zellen als auch Kontrollen zeigten im UCH- L1- Westernblot auf einer Laufhöhe von 27 kD eine intrinsische UCH- L1- Expression. In den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen wurde auf einer Laufhöhe von 28 kD eine GFP- Expression nachgewiesen. Im Ubiquitin- Westernblot zeigte sich ein erhöhter Monoubiquitingehalt in den mit EGFP- UCH- L1 transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollen. Dieser korrelierte positiv mit der UCH- L1- Expression der transfizierten Zellen, die sowohl die intrinsische als auch die extrinsische UCH- L1- Expression umfasste.

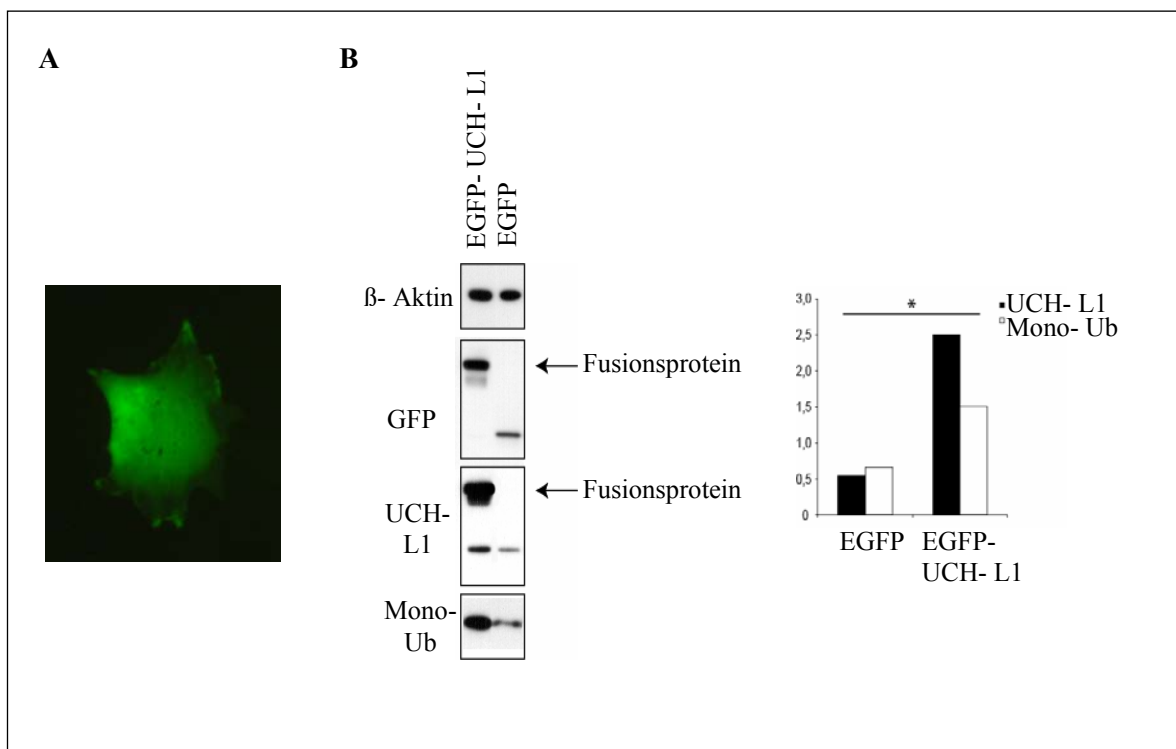


Abb. 28: Transfektion undifferenzierter Podozyten mit EGFP- UCH- L1 und EGFP. (A) EGFP- UCH- L1- transfizierter Podozyt 24 h nach Elektroporation. (Vergrößerung: 400x) (B) Westernblotanalyse der GFP- und UCH- L1- Expression sowie des Monoubiquitinpools aus Podozytenlysat 24 h nach Transfektion mit EGFP- UCH- L1 und EGFP; in EGFP- UCH- L1- transfizierten Podozyten konnte das Fusionsprotein im GFP- und UCH- L1- Westernblot nachgewiesen werden. In der Densitometrie zeigte sich nach Normalisierung gegen β - Aktin neben einer vermehrten UCH- L1- Expression ein Anstieg des Monoubiquitinpools nach Transfektion mit EGFP- UCH- L1 (n=3). Die Werte wurden als UCH- L1/ β - Aktin und Mono- Ubiquitin/ β - Aktin angegeben. * $p < 0,05$

4.3.3. Sequenzierung des pMSCV- UCH- L1- Vektors

In der Sequenzierung des pMSCV- UCH- L1- Vektors zeigte sich eine Punktmutation innerhalb des UCH- L1- Inserts an Position 40, die zu einem Aminosäureaustausch von

Tyrosin gegen Serin führte. Aufgrund dieser Missense- Mutation wurde auf weiterführende Experimente mit dem EGFP- UCH- L1- Vektor sowie die stabile Transfektion von Kulturpodozyten mit pMSCV- UCH- L1 verzichtet.

V. Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Regulation und Funktion der UCH- L1 in der membranösen Glomerulonephritis der Ratte. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Regulationsmechanismen und die Funktion der UCH- L1 im Podozyten weiter aufklären. Im ersten Teil der Arbeit wurde anhand eines Rattenmodells der humanen membranösen Glomerulonephritis, der passiven Heymann- Nephritis, die Regulation der UCH- L1 im Podozyten im Laufe der Erkrankung untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Experimente an einer Zellkulturlinie humaner Podozyten durchgeführt, um die Funktion der UCH- L1 im Podozyten näher zu untersuchen.

Die passive Heymann- Nephritis stellt ein etabliertes Modell der humanen idiopathischen membranösen Glomerulonephritis dar und ist charakterisiert durch die Akkumulation von Immundepots in der Lamina rara externa der GBM (120). Für die Induktion der passiven Heymann- Nephritis wurde aus Rattennieren der Büstensaum proximaler Tubuluszellen isoliert und in aufbereiteter Form (Fx1A) Schafen zur Immunisierung injiziert. Das zu einem späteren Zeitpunkt aus dem Schafblut gewonnene Fx1A- Serum wurde kontrolliert, indem das Bindungsverhalten der im Serum enthaltenen Antikörper im Westernblot untersucht wurde. Das aus dem Büstensaum proximaler Tubuli isolierte Fx1A- Antigen wurde hierzu mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot auf vorhandene Bindungsstellen der im Fx1A- Schafserum enthaltenen Antikörper analysiert. Neben nicht näher spezifizierbaren Banden zeigte sich eine Bande auf einer Laufhöhe von 550 kD, welche vermutlich dem pathogenen Antigen der Heymann- Nephritis gp330/ Megalin entsprach. Megalin ist in Clathrin- coated Pits an der Basis der Fußfortsätze glomerulärer Epithelzellen und in Epithelien proximaler Tubuluszellen an der Basis der Mikrovilli lokalisiert (55). Nach der Injektion des Fx1A- Serums entwickelten die Versuchstiere eine passive Heymann- Nephritis, wie von anderen beschrieben (120, 49, 121). Versuchstiere, denen Schafserum nicht- immunisierter Schafe appliziert wurde, erkrankten nicht.

In der Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung wurde gezeigt, daß bereits ab Tag 2 nach Applikation des Fx1A- Schafserums eine Antikörperbindung entlang der glomerulären Basalmembran stattfand. In der Literatur ist beschrieben, daß diese glomeruläre Bindung

des Schafantikörpers bereits einige Minuten nach Serumapplikation zu beobachten ist (120). Das an Tag 2 bandförmig erscheinende feingranuläre Färbemuster ist durch die Bindung des Schafantikörpers am Megalin zu erklären, das in Coated Pits an der basalen Seite der Podozytenfußfortsätze lokalisiert ist (55). Die an den Coated Pits formierten Immunkomplexe werden vom Podozyten in die Lamina rara externa der GBM abgestoßen, wo sie quervernetzt werden und die Grundlage der Formierung von Immundepots bilden (52). Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (120, 52) wurde im Zeitverlauf von 35 Tagen in der Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung eine stetige Vergrößerung des Färbemusters mit Vergrößerung der Granula beobachtet. Dieses Phänomen ließ sich durch das Größenwachstum der Immundepots in der Lamina rara externa der GBM erklären. Zudem kam es zur Formierung von zarten Spikes durch die GBM, die sich in der Schaf- IgG- Immunfluoreszenzfärbung morphologisch durch dunkle Aussparungen der Immunfluoreszenz zwischen den Immundepots darstellten.

In der Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung ließ sich die autologe Immunantwort der Ratte auf das heterologe Schaf- IgG nachvollziehen. Es zeigte sich bereits an Tag 2 glomerulär eine leicht erhöhte Immunfluoreszenz in den pHN- Tieren, mit der sich der Beginn der autologen Reaktion der Ratte manifestierte (120). Eine maximale Immunfluoreszenz im Vergleich der untersuchten Zeitpunkte zeigte sich an Tag 6. Dies deutet auf eine initiale Zunahme der Immunantwort der Ratte bis mindestens Tag 6 hin. Bis Tag 21 nahm die Intensität der Immunfluoreszenz wieder ab, was auf eine Abschwächung der Immunreaktion der Ratte im Zeitverlauf hinweist.

Sämtliche pHN- Tiere entwickelten innerhalb der ersten Woche nach Applikation des Fx1A- Serums eine signifikante Proteinurie. Diese nahm an Intensität bis zum Erreichen eines Maximums um Tag 14 stetig zu und sank dann wieder leicht ab. Das Einsetzen der Proteinurie um Tag 4- 5 mit maximaler Proteinausscheidung um Tag 14 von bis zu 200- 300 mg/ 24 h stimmte mit früheren Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (120, 13). Untersuchungen zeigten, daß das Einsetzen der Proteinurie durch die Bindung des heterologen Schafantikörpers am membranständigen Megalin des Podozyten der Ratte verursacht wird. Die frühe Phase der Proteinurie wird daher als „heterologe Phase“ bezeichnet. Der Pathomechanismus dieser Proteinurie konnte bislang nicht abschließend aufgeklärt werden. Die Aktivierung von Komplement führt zur Bildung von C5b-9, dem Membrane attack complex (MAC), und dessen Integration in die Podozytenmembran. Neben dem Verlust der Membranintegrität bewirkt der sublytische MAC die Aktivierung zellulärer Signalwege und ist zentral für das Einsetzen der Proteinurie in der Heymann-

Nephritis (17). Podozyten bilden als Antwort auf die Schädigung durch sublytisches C5b-9 reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (131, 17, 50). Diese bewirkt im Podozyten die Induktion von Apoptose, eine Schädigung der DNA, Lipidperoxidation und eine Schädigung der glomerulären Kapillarwand. Salant et al. zeigten, daß die heterologe Phase der Heymann-Nephritis etwa 4- 5 Tage andauert und die heterologen Antikörper anschließend aus der Zirkulation verschwunden sind (121).

Glomeruläre Ablagerungen von Ratten- IgG signalisieren den Beginn der autologen Phase der Erkrankung (120). Die autologe Phase basiert auf der Immunantwort der Ratte gegen die fixierten Schafantikörper mit erneuter glomerulärer Bildung von Immunkomplexen (13). Glomeruläre Depots von Ratten- IgG konnten in der vorliegenden Arbeit in der Immunfluoreszenzfärbung bereits ab Tag 2 nachgewiesen werden und zeigten eine maximale Intensität um Tag 6. Ab Tag 28 fand in den pHN- Tieren nach einer kurzzeitigen Abnahme der Proteinausscheidung ein erneuter Anstieg der Proteinurie mit einem Maximum an Tag 35 statt. Von Salant und Cybulsky wurde eine zeitliche Diskrepanz von 7- 10 Tagen zwischen erstmaliger Nachweisbarkeit von Ratten- IgG und der sich als Proteinurie manifestierenden podozytären Schädigung im Rahmen der autologen Reaktion beschrieben (120). Der Arbeitsgruppe Spicer et al. gelang es analog zu diesem Ergebnis, eine Korrelation der Größe der Immundepots mit dem Grad der Proteinurie nachzuweisen (140). Es erscheint demnach wahrscheinlich, daß bei der Induktion der autologen Phase der Heymann- Nephritis die Podozyten erst nach Erreichen einer bestimmten Größe der Immundepots derart geschädigt werden, daß ein erneuter Anstieg der Proteinurie stattfindet. Dieser Mechanismus könnte die zeitliche Diskrepanz zwischen erstmaligem Nachweis von Ratten- IgG und dem erneuten Anstieg der Proteinurie erklären.

In den pHN- Tieren lagen die Serumwerte von Harnstoff und Kreatinin trotz der renalen Schädigung im Normbereich. Die Retentionsparameter steigen erst bei starker Verminderung der glomerulären Filtrationsleistung an, so daß von einer nicht signifikanten Beeinträchtigung der GFR der pHN- Tiere ausgegangen werden kann (38, 121). In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (120) bildeten die pHN- Tiere trotz Proteinurie keine Ödeme oder Aszites aus.

Die pHN- Tiere zeigten im Zeitverlauf von 35 Tagen eine signifikant geringere Gewichtszunahme als die mit Präimmunserum behandelten Kontrolltiere. Der Verlust von Nierenfunktion ist assoziiert mit verschiedenen Anpassungsmechanismen des Stoffwechsels, die eine vermehrte Degradation von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom- System bewirken können (107). So wurde in chronischen Nierenerkrankungen

ein Verlust an Muskelmasse aufgrund von Azidose, Insulinresistenz, Entzündungsvorgängen und Angiotensin II- Induktion nachgewiesen (107, 106). Studien haben gezeigt, daß Kinder mit einer chronischen Nierenerkrankung eine Wachstumsstörung mit reduzierter Muskelmasse aufwiesen. Zudem wurde in In- vivo- Studien an Ratten ein erhöhter Muskelproteinkatabolismus bei eingeschränkter Nierenfunktion nachgewiesen. Es liegt damit die Vermutung nahe, daß die Wachstumsretardierung der pHN- Tiere auf deren eingeschränkte Nierenfunktion mit begleitendem Proteinverlust zurückzuführen ist.

Die pHN- Tiere zeigten an Tag 35 im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren ein signifikant erhöhtes Nierengewicht, das auf einer Vergrößerung des Organs in den pHN- Tieren beruhte. Ein solcher als renale Hypertrophie bezeichneter Anpassungsmechanismus wird durch die Schädigung der Niere im Rahmen einer Heymann- Nephritis verursacht und basiert insbesondere auf Zellvergrößerungen (25). Eine zelluläre Hypertrophie ist biochemisch definiert als ein Anstieg des zellulären Proteingehaltes im Verhältnis zum zellulären DNA- Gehalt bei Vergrößerung des Zellvolumens (131). Im Rahmen dieser Arbeit konnten histologisch Zellvergrößerungen der Podozyten in den pHN- Tieren nachgewiesen werden. In der PAS- Färbung zeigte sich eine starke Prominenz der Podozyten in den pHN- Tieren ab Tag 6. Die podozytäre Größenzunahme war vermutlich durch eine Hypertrophie als Reaktion auf die Schädigung im Rahmen der Heymann- Nephritis bedingt. Terminal differenzierte Podozyten reifer Nieren ruhen unter physiologischen Bedingungen in der G₀- Phase des Zellzyklus. Es wird vermutet, daß bei Schädigung des Podozyten ein Wiedereintritt des Podozyten in die G₁- Phase des Zellzyklus erfolgt, in der die Synthese von RNA und Proteinen stattfindet (82). Der Anstieg des Proteingehaltes bei gleichzeitig nur geringer DNA- Synthese bewirkt in der Heymann- Nephritis die podozytäre Hypertrophie (132, 131). Eine Hochregulation der Cyklin- Kinase- Inhibitoren p21 und p27 verhindert den weiteren Ablauf der Mitose und die Zellteilung (82). Die podozytäre Hypertrophie wird als Kompensationsmechanismus gedeutet, durch den nackte Stellen der GBM, die durch Detachment oder Apoptose benachbarter Podozyten entstanden sind, überdeckt werden, um die Integrität der Filtrationsbarriere zu bewahren.

Neben einer podozytären Zellhypertrophie wurde sowohl in den Kontrolltieren als auch in den pHN- Tieren an Tag 21 und Tag 35 eine deutliche Größenzunahme des glomerulären Durchmessers beobachtet. Dieser Effekt ist zum einen auf die in beiden Gruppen durchgeführte unilaterale Nephrektomie zurückzuführen, die sowohl in den Kontrolltieren

als auch in den pHN- Tieren eine renale Hypertrophie bewirkte. Eine Nephrektomie führt zu einer kompensatorischen Größenzunahme der kontralateralen Niere (19, 152) und umfaßt sowohl Glomeruli als auch das Tubulussystem (25). Es zeigte sich damit in beiden Gruppen eine Uninephrektomie- bedingte renale Hypertrophie, die sich erstmals an Tag 21 histologisch manifestierte. Zudem verursachte die additive glomeruläre Schädigung durch die Heymann- Nephritis in den pHN- Tieren eine zusätzliche Größenzunahme des Glomerulumdurchmessers im Rahmen der schädigungsbedingten renalen Hypertrophie.

In der PAS- Färbung konnte in den pHN- Tieren zudem eine starke Vakuolisierung des podozytären Zytoplasmas beobachtet werden. Es wird vermutet, daß Podozyten in der Lage sind, lokal filtrierte Proteine per Endozytose zu resorbieren (40). In der Heymann- Nephritis ist aufgrund des Integritätsverlustes der Filtrationsbarriere der Verlust von Proteinen über die Blut- Harn- Schranke stark erhöht. Durch die resultierende massive Resorption von Proteinen durch den Podozyten kommt es zu einer Überladung dessen lysosomalen Systems, was zur Akkumulation von Resorptionstropfen in der Zelle führt, so daß diese vakuolisiert erscheint (68). Eine Vakuolisierung im Podozyten wurde auch in der idiopathischen MN des Menschen beobachtet (147).

Auch in den Epithelzellen proximaler Tubuli wurde in den pHN- Tieren eine Vakuolisierung des Zytoplasmas beobachtet. Im proximalen Tubulussystem werden filtrierte Proteine in hohem Maße durch Endozytose reabsorbiert und lysosomal degradiert. Aufgrund des hohen Eiweißgehaltes des Primärharns in den pHN- Tiere fand eine vermehrte Reabsorption von Proteinen in den Tubuluszellen statt, und durch Akkumulation von Resorptionstropfen erschien deren Zytoplasma vakuolisiert (159). Die Vakuolisierung des Zytoplasmas von Tubulusepithelzellen war demzufolge ebenfalls als Zeichen der Proteinurie in den pHN- Tieren zu werten.

Sowohl Hypertrophie als auch Vakuolisierung sind Teil einer stereotypischen Reaktion des Podozyten auf Schädigungen unterschiedlichster Ursache mit einer Änderung des podozytären Phänotyps. Sie umfaßt neben einer zellulären Hypertrophie und der zytoplasmatischen Überladung mit Resorptionstropfen ein Fußfortsatzeffacement, Abflachung des Zellleibes und letztendlich ein Ablösen des Podozyten von der GBM (131, 93). Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wiesen demnach auf eine starke glomeruläre Schädigung mit einer konsekutiven podozytären Anpassungsreaktion im Rahmen der Heymann- Nephritis hin.

In der PAS- Färbung wurde in den pHN- Tieren darüber hinaus eine diffuse Verdickung der GBM beobachtet. Die GBM wies harnseitig irreguläre Einschlüsse von PAS- positivem

Material auf. Bei diesen hyalinen Einschlüssen handelte es sich um Immundepots (11), die auch in den Schaf- und Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen wurden. Mit dem histologischen Nachweis von Immundepots in der Lamina rara externa der GBM wurde ein zentrales Charakteristikum der membranösen Glomerulonephritis nachgewiesen. Zusammenfassend konnte durch die bisher diskutierten Resultate der Immunfluoreszenzfärbungen sowie der Histologie im Zusammenhang mit der Klinik der pHN- Tiere der Nachweis erbracht werden, daß durch die Applikation des Fx1A- Serums mit Erfolg eine Heymann- Nephritis in den Versuchstieren induziert wurde, die den in der Literatur angeführten Kriterien entsprach.

Immunhistochemisch wurde in den pHN- Tieren eine podozytäre De- novo- Expression von UCH- L1 ab Tag 6 nachgewiesen. Die UCH- L1- Expression nahm histologisch bis Tag 21 zu und blieb bis Tag 35 in gleichem Maße erhalten. Interessanterweise fiel die initiale De- novo- UCH- L1- Expression zeitlich mit dem Einsetzen der Proteinurie in den pHN- Tieren zusammen. Es erscheint möglich, daß die UCH- L1- Expression einen die Proteinurie begünstigenden Faktor darstellte oder ihre Expression durch die Proteinurie induziert wurde. Ebenso zeigte sich zu diesem Zeitpunkt die stärkste nachweisbare Intensität der Ratten- IgG- Immunfluoreszenzfärbung, was darauf hinweisen könnte, daß die Induktion der UCH- L1- Expression durch die Immunantwort der Ratte und deren Antikörperbindung verursacht wurde. Der Beginn der podozytären UCH- L1- Expression korrelierte des weiteren zeitlich und quantitativ mit der Akkumulation von Immundepots in der Lamina rara externa der GBM, der Zunahme der podozytären Prominenz sowie der Vakuolisierung des podozytären Zytoplasmas. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Induktion der UCH- L1 und diesen Veränderungen erscheint daher ebenfalls möglich. Mithilfe einer Real time- PCR aus glomerulärer mRNA konnte ein Anstieg der UCH- L1- mRNA auf den mehr als dreifachen Wert der Kontrolltiere bis Tag 35 nachgewiesen werden. Hiermit wurde belegt, daß die Regulation der UCH- L1- Expression zumindest teilweise auf mRNA- Ebene erfolgte. Zudem konnte in der UCH- L1- Immunhistochemie in den MG 132- behandelten Kontrolltieren eine vermehrte podozytäre UCH- L1- Expression gegenüber unbehandelten Kontrolltieren nachgewiesen werden.

Die Hemmung des Proteasoms könnte demnach einen verminderten proteasomalen Abbau der UCH- L1 geführt haben, was zu deren Akkumulation im Podozyten geführt haben könnte. Dieses Phänomen könnte ein Hinweis darauf sein, daß die UCH- L1- Expression neben der Regulation auf mRNA- Ebene über den proteasomalen Abbau reguliert wird. In unserer Arbeitsgruppe wurde in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis mehrfach ein

Anstieg der UCH- L1- Expression bei Hemmung des Proteasoms nachgewiesen. Der Anstieg der UCH- L1 im Rahmen der Heymann- Nephritis könnte damit durch vermehrte Transkription bei vermindertem proteasomalen Abbau der UCH- L1 bedingt gewesen sein. In der immunhistochemischen Färbung der UCH- L1 an Gewebsschnitten, die am dritten Tag nach Pumpenimplantation gewonnen wurden, zeigte sich in den Podozyten der pHN- Tiere nach Inhibitorbehandlung eine deutlich erhöhte UCH- L1- Expression gegenüber den Kontrollen. Bei diesem Phänomen handelte es sich vermutlich um einen Kompensationsmechanismus infolge der UCH- L1- Hemmung. Nach Hemmung der Hydrolasefunktion könnte es durch Rückkopplungsmechanismen in der Zelle zu einer überschießenden UCH- L1- Expression gekommen sein. So könnte beispielsweise ein durch die Inhibition verursachter Mangel an freien Monoubiquitinen in der Zelle eine vermehrte Expression der UCH- L1 bewirkt haben.

Neben einer De- novo Expression von UCH- L1 zeigte sich immunhistochemisch in den Podozyten der pHN- Tiere ein Anstieg des Gesamtubiquitins an Tag 21 und Tag 35. Aufgrund der Eigenschaften des verwendeten Ubiquitin- Antikörpers konnten Mono- und Polyubiquitine histologisch nicht differenziert werden, so daß immunhistochemisch nur Aussagen über das podozytäre Gesamtubiquitin ermöglicht wurden. Der Anstieg des Gesamtubiquitins korrelierte zeitlich mit der stärksten UCH- L1- Expression im Podozyten. Eine solche Korrelation der podozytären UCH- L1- Expression mit dem Gesamtubiquitingehalt wurde von unserer Arbeitsgruppe auch in der membranösen Glomerulonephritis des Menschen nachgewiesen (84). Der vermehrte Gesamtubiquitin- Gehalt, war vermutlich durch die monoubiquitinstabilisierende Wirkung der UCH- L1 bedingt, mit der Monoubiquitine vor der Degradation geschützt werden und deren Halbwertszeit verlängert wird (99).

Durch Westernblotanalysen konnte in glomerulären Lysaten ein Anstieg des Monoubiquitingehaltes nachgewiesen werden, der ebenso wie der Gesamtubiquitingehalt zeitlich und quantitativ mit der UCH- L1- Expression korrelierte. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die UCH- L1 den Monoubiquitinpool im Podozyten positiv beeinflusste. Dies könnte zum einen unabhängig von der enzymatischen Aktivität durch ihre monoubiquitinstabilisierende Wirkung geschehen, zum anderen könnte der Anstieg des Monoubiquitinpools durch die Hydrolaseaktivität der UCH- L1 bedingt sein. Durch die Hydrolaseaktivität ist die UCH- L1 in der Lage, Ubiquitine von kleineren Proteinaddukten abzuspalten sowie Ubiquitin- Genprodukte postranslational zu freien Monoubiquitinen zu prozessieren und auf diese Weise den Monoubiquitinpool zu vergrößern (95). Die

Ubiquitinierung von Zielproteinen spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von verschiedenen zentralen zellulären Prozessen wie Genexpression, Zellzyklus und Zellteilung, zellulärer Streßantwort, Lokalisation von Zelloberflächenrezeptoren und der DNA- Reparatur (31, 15). Es ist daher möglich, daß die UCH- L1 aufgrund ihres Einflusses auf den Ubiquitinhaushalt an der Regulierung von wichtigen zellulären Prozessen beteiligt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen insbesondere auf einen Einfluß der UCH- L1 auf die Podozytenmorphologie und den Differenzierungsprozeß hin.

Eines der wichtigsten Charakteristika des Podozyten ist seine hoch organisierte zelluläre Architektur. Die arborisierte Morphologie des Podozyten ist für eine effektive glomeruläre Filtration von zentraler Bedeutung, und bei Veränderungen der Zellarchitektur ist die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere stark beeinträchtigt. Trotz der großen Relevanz sind die zellulären Mechanismen der Formierung und Aufrechterhaltung der Podozytenfortsätze weitgehend unbekannt (60).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Beteiligung der UCH- L1 an der Regulation der Podozytenmorphologie in vitro nachgewiesen. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, daß die Ausbildung eines arborisierten Phänotyps des Podozyten mit einer verminderten Expression der UCH- L1 einhergeht.

Die Arborisierung des Podozyten wurde durch Kultivierung auf verschiedenen Extrazellulärmatrizes induziert. Podozyten haften in vivo der glomerulären Basalmembran an, die aus Laminin, Kollagen IV und Proteoglykanen besteht. Aufgrund vorhergehender Untersuchungen wird die extrazelluläre Matrix nicht mehr als rein mechanisch wirkende Struktur verstanden (60). Vielmehr gilt sie als ein molekularer Komplex, der mittels Integrinen und Dystroglykanen auf Signalwege und Morphologie des Podozyten Einfluß nimmt. In Zellkultursystemen wurde belegt, daß Laminin und andere Extrazellulärmatrizes die Fortsatzbildung von Podozyten fördert (61). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in vitro in Podozyten, die auf mit Laminin, Kollagen IV oder Kollagen I beschichteten Flaschen kultiviert wurden, ein arborisierter Phänotyp mit zahlreichen Zellfortsätzen. In Westernblotanalysen wurde bei zunehmender Arborisierung eine vermehrte Expression des schlitzmembranassoziierten β - Catenin nachgewiesen, was auf eine zunehmende Bildung von Zell- Zell- Kontakten hindeutet. Die arborisierte Morphologie ging mit einer verminderten Expression von UCH- L1 einher. In Korrelation mit der UCH- L1- Expression verminderte sich bei einer Arborisierung der zelluläre Monoubiquitinpool. Es erscheint daher möglich, daß eine Verminderung der podozytären

UCH- L1- Expression mit konsekutiver Verringerung des podozytären Ubiquitinpools die Arborisierung der Podozyten in vitro bewirkte.

Untermuert wird diese Hypothese durch die Effekte einer UCH- L1- Inhibition in vitro auf die Podozytenmorphologie. Durch Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität in Kulturpodozyten wurde ein Umbau des Aktin- Zytoskeletts mit Aussprossung von Zellfortsätzen bewirkt. Zudem führte eine UCH- L1- Inhibition in vitro zu einer Redistribution von β - Catenin und α - Aktinin- 4. α - Aktinin- 4 ist ein Aktin- bindendes Protein, das eine wichtige Rolle in der Quervernetzung von Aktinfilamenten in kontraktile Bündel und im Verankerungskomplex von Aktin- Streßfasern an der Plasmamembran spielt und fast ausschließlich im Podozyten exprimiert wird (139, 135). Sowohl β - Catenin als auch α - Aktinin- 4 akkumulierten unter UCH- L1- Inhibition an den Zell- Zell- Kontakten benachbarter Podozyten sowie in Membranprotrusionen. Dies deutet auf einen direkten oder indirekten Effekt der UCH- L1 und des Ubiquitinsystems auf die intrazelluläre Lokalisation von β - Catenin und α - Aktinin- 4 hin. Yao et al. gelang der Nachweis, daß fehlgefaltetes α - Aktinin- 4 teilweise über das Ubiquitin- Proteasom degradiert wird (157). Diese Erkenntnis wurde von der Arbeitsgruppe Cybulsky et al. in einer aktuellen Arbeit bestätigt (16). Es ist ebenfalls bekannt, daß Expression und Lokalisation von β - Catenin über das Ubiquitin- Proteasom- System reguliert werden (26, 45, 90, 123). Die Regulation der Redistribution von α - Aktinin- 4 und β - Catenin an die Podozytenmembran unter UCH- L1- Inhibition in vitro könnte demnach über das Ubiquitinsystem erfolgt sein. Es läßt sich weiterhin mutmaßen, daß der Einfluß der UCH- L1 auf die Podozytenmorphologie über eine Regulation des Aktin- bindenden α - Aktinin- 4 erfolgt sein könnte.

Zusammengefaßt führen sowohl die Abnahme der UCH- L1- Expression im Differenzierungsprozess bei Kultivierung auf extrazellulärer Matrix als auch die Inhibition der UCH- L1- Hydrolaseaktivität zu verstärkter Zellfortsatzbildung und Annahme eines arborisierten Phänotyps. Dies deutet darauf hin, daß die UCH- L1 über eine Regulation des Monoubiquitinpools auf die Podozytenmorphologie Einfluß nimmt.

Auch in vivo fanden sich Hinweise auf einen Einfluß der UCH- L1 auf die Podozytenmorphologie. Analog zu vielen proteinurischen Nierenerkrankungen kommt es in der Heymann- Nephritis zu einem Effacement der Podozytenfortsätze, das mit einer verminderten Anzahl an Fußfortsätzen bei gleichzeitiger Zunahme der Fortsatzgröße einhergeht (52). Das Effacement der Podozytenfortsätze wird von einer Reorganisation des Aktin- Zytoskeletts begleitet (137, 87). In der Literatur finden sich Hinweise auf eine

Regulation des Aktin- Zytoskeletts durch das Ubiquitinsystem (141, 44). Es erscheint möglich, daß die Reorganisation des Aktin- Zytoskeletts im Rahmen des Fußfortsatz-Effacements ebenfalls über das Ubiquitinsystem erfolgt. Die im Rahmen der Reorganisation des Aktin- Zytoskeletts stattfindenden Ubiquitinierungsvorgänge könnten über die UCH- L1 reguliert werden.

Westernblotanalysen zeigten einen signifikanten Anstieg der α - Aktinin- 4- Expression in der passiven Heymann- Nephritis. Eine vermehrte podozytäre α - Aktinin- 4- Expression wurde in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis bereits in der PAN- Nephritis (139) und in der Masugi- Nephritis (137) nachgewiesen. In der Immunfluoreszenzfärbung wurde eine vermehrte Lokalisation des α - Aktinin- 4 im Zytoplasma beobachtet. Die Redistribution des α - Aktinin- 4 könnte auf einem schädigungsbedingten Umbau des Aktin- Zytoskeletts beruhen. Nach UCH- L1- Hemmung in vivo zeigte sich analog zu den In- vitro- Studien eine teilweise Relokalisation von α - Aktinin- 4 an die Membran. Es erscheint möglich, daß die Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität zu einer verminderten Redistribution des Proteins führte, indem der Monoubiquitinpool vermindert und so Mono- oder Polyubiquitinierungsvorgänge behindert wurden. Der Mangel an freien Monoubiquitinen könnte durch den Substratmangel das gesamte Proteasom- Ubiquitinsystem gehemmt und damit die proteasomale Degradation von Proteinen blockiert haben. α - Aktinin- 4 könnte damit durch die UCH- L1- Hemmung nicht oder nur in vermindertem Maße degradiert worden sein.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, daß sich die Neuexpression der UCH- L1 in der Heymann- Nephritis auf die Podozytenmorphologie auswirkt.

Es erscheint daher möglich, daß die UCH- L1 in der Heymann- Nephritis an der Reorganisation des Zytoskeletts der Podozytenfußfortsätze im Rahmen der podozytären Schädigung maßgeblich beteiligt ist und eine Rolle im Effacement der Podozytenfußfortsätze spielt. Als weiteres Argument für diese Hypothese könnte die Beobachtung gewertet werden, daß eine Inhibition der UCH- L1- Hydrolasefunktion in vivo zu einer Verminderung der Proteinurie in den pHN- Tieren führte. Nach Implantation von osmotischen Pumpen mit dem UCH- L1- Inhibitor LDN 57444 zeigten die pHN- Tiere nach 24 h einen signifikanten Rückgang der Proteinurie. Danach näherte sich die Proteinurie dem Maß der unbehandelten pHN- Tiere wieder an. In der Zeit-Wirkungskurve konnte eine maximale Hemmung der UCH- L1 nach 1 h nachgewiesen werden, so daß davon auszugehen ist, daß die Wirkung des Inhibitors nach 48 bzw. 72 h

deutlich vermindert war. Durch die Inhibition der UCH- L1 in vivo könnte das Fußfortsatz-Effacement vermindert worden sein, so daß der Proteinverlust über die Blut- Harn-Schranke initial verringert wurde.

Darüber hinaus erscheint es möglich, daß die UCH- L1 über die Regulation des Monoubiquitinpools oder durch Monoubiquitinierungsvorgänge an der Zelldifferenzierung von Podozyten beteiligt ist. Im Zellkultorexperiment konnte gezeigt werden, daß immortalisierte Podozyten unter nicht- permissiven Bedingungen einen Differenzierungsprozess durchlaufen, der mit einer verstärkten Expression podozytenpezifischer Marker wie Nephrin und Synaptopodin einhergeht (122). Dieser Differenzierungsprozess geht mit einer verminderten UCH- L1- Expression einher. Die UCH- L1- Expression in Podozyten in vitro korreliert damit negativ mit der Expression von Podozytenmarkern wie Nephrin und Synaptopodin sowie der Zellfortsatzbildung und demnach mit der Annahme eines differenzierten Phänotyps. Analog hierzu zeigten von Shirato et al. durchgeführte In- vivo- Studien an Rattenembryonen im Podozyten eine negative Korrelation von Differenzierungsstatus und UCH- L1- Expression in der Glomerulogenese (136).

Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte die UCH- L1 im Podozyten als ein Differenzierungsmarker betrachtet werden. Eine Neuexpression der UCH- L1 in den pHN- Tieren könnte demnach eine podozytäre Dedifferenzierung im Zuge der Erkrankung belegen. Ein solcher Dedifferenzierungsvorgang des Podozyten wird in verschiedenen mit Proteinurie einhergehenden Nephropathien vermutet (131). Es ist möglich, daß die UCH- L1 an dem Dedifferenzierungsprozeß durch über das Ubiquitinsystem vermittelte regulatorische Aktivitäten beteiligt ist.

In den pHN- Tieren wurde immunfluoreszenztechnisch eine Internalisierung des Schlitzmembranproteins Nephrin nachgewiesen. Die Internalisierung von Nephrin in der Heymann- Nephritis korrelierte mit der podozytären Expression von UCH- L1. Eine Internalisierung von Nephrin wurde von unserer Arbeitsgruppe ebenfalls in verschiedenen humanen Glomerulopathien wie insbesondere der membranösen Glomerulonephritis nachgewiesen (84) und stimmte in diesem Punkt mit früheren Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (21, 124, 158). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Verminderung der Nephrin- Expression in der Heymann- Nephritis sondern eine alleinige Redistribution des Proteins bei gleichem Gesamtgehalt an Nephrin beobachtet. Dieses Ergebnis widerspricht früheren Arbeiten, in denen sowohl eine Verminderung des Proteingehaltes als auch eine Verminderung der Nephrin- mRNA in der membranösen

Glomerulonephritis beobachtet wurde (21, 27, 124, 150, 158). Eine Hemmung der UCH-L1 in vivo zeigte keinen Effekt auf die Distribution von Nephrin am dritten Tag nach der Pumpenimplantation. Insgesamt ließ sich feststellen, daß die Internalisierung der podozytenspezifischen Proteine α -Aktinin-4 und Nephrin in der Heymann-Nephritis als Zeichen der podozytären Schädigung mit dem Monoubiquitiningehalt des Podozyten und der UCH-L1-Expression korrelierten.

Die Regulation der Distribution von α -Aktinin-4 und Nephrin in der Heymann-Nephritis könnte über Monoubiquitinierungsvorgänge erfolgt sein. Die Monoubiquitinierung ist ein Regulationsmechanismus verschiedener zellulärer Mechanismen wie Endozytose von Membranproteinen, DNA-Reparatur, Histonaktivität und Transkription (28). Vergleichbar mit Phosphorylierungsvorgängen werden durch Monoubiquitinierungen Lokalisation und Aktivität verschiedener an der Plasmamembran lokalisierter Proteine reguliert. Sie bewirkten eine Internalisierung der Membranproteine durch Endozytose (35, 22). Die internalisierten Proteine werden anschließend im Lysosom degradiert (36). Die UCH-L1 ist in der Lage, Monoubiquitinierungen zu lysieren und damit Einfluß auf Lokalisation und Aktivität der Zielproteine zu nehmen (83). Zudem kann die Regulation von Monoubiquitinierungen über eine Regulation des Monoubiquitinpools erfolgen, der das Substrat von Ubiquitinierungsvorgängen darstellt. Es erscheint demnach möglich, daß die UCH-L1 über Monoubiquitinierungsvorgänge oder über die Regulation des Monoubiquitinpools auf die Distribution und den Abbau von α -Aktinin-4 und β -Catenin Einfluß nimmt.

Podozyten weisen große morphologische und biochemische Ähnlichkeiten mit Neuronen auf (108). Beide Zellen besitzen lange Zellfortsätze und verfügen über eine ähnliche Organisationsstruktur des Zytoskeletts mit übereinstimmenden Mechanismen der Zellfortsatzbildung (60, 62). Zudem exprimieren sie gleiche Proteine wie Nephrin (105) und Synaptopodin (89) und verfügen über keine mitotische Aktivität (3). Sakurai et al. belegten die zentrale Rolle der UCH-L1 und ihrer monoubiquitininstabilisierenden Wirkung in Neuronen für deren Morphologie und Differenzierung (119).

In Analogie zu der Funktion der UCH-L1 in Neuronen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Einfluß der UCH-L1 auf die Zellfortsatzbildung und Differenzierung von Podozyten nachgewiesen. Zum einen wurde eine Abhängigkeit der UCH-L1-Expression von dem Differenzierungsstatus des Podozyten belegt, wobei ein differenzierter Phänotyp mit einer geringen UCH-L1-Expression einhergeht. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß die Fortsatzbildung des Podozyten von der UCH-L1-Expression bzw. deren enzymatischer

Aktivität abhängt.

In Neuronen ist die UCH- L1 an der proteasomalen Degradation von Proteinen beteiligt und ist in mehrere neurodegenerative Erkrankungen involviert, die sich durch die Akkumulation von unlöslichen proteinreichen Ablagerungen auszeichnen (95). So wurde UCH- L1 in amyloiden Plaques und Fibrillen beim M. Alzheimer und in Lewy- Körpern beim M. Parkinson nachgewiesen (79). Choi et al. (12) gelang es, einen direkten Zusammenhang zwischen verminderter neuronaler UCH- L1- Aktivität und der Akkumulation abnormer Proteine durch eingeschränkten proteasomalen Abbau herzustellen. Aufgrund der großen strukturellen und biochemischen Ähnlichkeiten von Neuronen und Podozyten (60, 62, 89, 105, 108) erscheint es möglich, daß eine geringe Aktivität der UCH- L1 analog zu ihrer Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen mit der Akkumulation von Proteinen in der GBM assoziiert ist. In der Heymann- Nephritis beginnt die Entstehung von Immundepots bereits einige Minuten (120) nach Injektion des heterologen Antikörpers, während die UCH- L1- Expression erst um Tag 6 induziert wurde. Damit wurde belegt, daß die UCH- L1- Induktion keine ursächliche Wirkung an der Entstehung von Immundepots in der GBM besitzt. Die Beobachtung stützt vielmehr die Hypothese, daß die subepitheliale Akkumulation von Immundepots im Glomerulum die UCH- L1- Expression erst induzieren könnte. Es erscheint möglich, daß die UCH- L1 am Abbau von Bestandteilen der Immundepots beteiligt ist und daher im Rahmen der Heymann- Nephritis verstärkt exprimiert wird.

Die in der PAS- Färbung beobachtete Vakuolisierung des podozytären Zytoplasmas in pHN- Tieren war vermutlich durch die endozytotische Resorption von Proteinen bedingt, die in Resorptionstropfen in der Zelle akkumulieren, bevor sie lysosomal abgebaut werden. Zusätzlich besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Vakuolisierung auf einer autophagozytotischen Aktivität des Podozyten beruht, die durch die passive Heymann- Nephritis verursacht wurde. Autophagozytose ist ein zellulärer Prozess, der dem Abbau von zelleigenen Bestandteilen wie Zellorganellen oder Proteinen dient. Die Zellkomponenten werden zur Degradation per Autophagozytose zum Lysosom transportiert, das nach Verschmelzen mit dem Autophagosom als Autolysosom bezeichnet wird. Je nach Transportmechanismus unterscheidet man dabei zwischen Makro-, Mikro- und Chaperon- vermittelter Autophagozytose (145, 86). Die Autophagozytose spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Bereitstellung von Aminosäuren unter Streßbedingungen und dient darüber hinaus der Zytoprotektion durch die Beseitigung von Aggregaten fehlgefalteter Proteine, beschädigten Zellorganellen und langlebigen Proteinen (58). Die

Autophagozytose ist damit neben dem Ubiquitin- Proteasom- System ein weiterer Mechanismus der intrazellulären Qualitätskontrolle von Proteinen und anderen Zellbestandteilen. Im Gegensatz zu dem hochspezifischen UPS ist der autophagosomale Abbau jedoch weniger selektiv (58, 30). Studien haben gezeigt, daß das Targeting von Proteinen für den autophagosomalen Abbau ebenfalls über Ubiquitinierungen am Zielprotein erfolgt. Auch Monoubiquitinierungen wurden in diesem Zusammenhang beobachtet (58). Die Autophagozytose steht in engem Zusammenhang mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen. So wurde in Autophagozytose- defizienten Neuronen eine Akkumulation abnormer Proteine nachgewiesen (30). Zudem wurde sowohl bei M. Alzheimer als auch bei M. Parkinson eine Akkumulation von autophagischen Vakuolen in den Neuronen beobachtet (86). Interessanterweise konnten Sato et al. elektronenmikroskopisch eine Autophagozytose in Podozyten in humanen Nierenbiopsien nachweisen (125). Zudem zeigten Asanuma et al. eine vermehrte podozytäre Phagozytose in der PAN- Nephritis der Ratte (3). In Neuronen konnten Kabuta et al. eine Beteiligung der UCH- L1 an der Chaperon- vermittelten Autophagozytose (CMA) von α - Synuclein nachweisen (46). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß in der Heymann- Nephritis die Degradation von Zellproteinen und beschädigten Organellen ebenfalls über Autophagozytose erfolgen könnte. In der Heymann- Nephritis zeigte sich die zytoplasmatische Vakuolisierung der Podozyten insbesondere an Tag 21 und 35, den Zeitpunkten der stärksten Expression von UCH- L1 mit dem höchsten Gehalt an Monoubiquitinen in der Zelle. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die UCH- L1 entweder direkt über ihre enzymatische Aktivität oder indirekt über die Regulation des Monoubiquitinpools an einer Autophagozytose in den geschädigten Podozyten beteiligt sein könnte.

Zusammenfassend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wichtige Erkenntnisse über die Regulation der UCH- L1 in der membranösen Glomerulonephritis der Ratte sowie über deren Funktionen erlangt. In Zellkulturexperimenten wurde eine inverse Korrelation von UCH- L1- Expression und dem Differenzierungsstatus des Podozyten nachgewiesen. Dieses Ergebnis erlaubt die Hypothese, daß die UCH- L1 einen podozytären Differenzierungsmarker darstellen könnte. In vivo würde dies zum einen einen Dedifferenzierungsprozess geschädigter Podozyten in der Heymann- Nephritis belegen, da

die UCH- L1 in gesunden Podozyten nicht exprimiert wird und eine Induktion der UCH- L1 erst bei Schädigung erfolgt. Zudem könnte histologisch durch den Nachweis der UCH- L1 eine Differenzierung zwischen gesunden und geschädigten Podozyten ermöglicht werden. Dies könnte eventuell eine Aussage über die Schwere einer Erkrankung erlauben und als prognostisches Kriterium gewertet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität in der Heymann- Nephritis führte zu einer Reduktion der Proteinurie in den behandelten Tieren. Es könnte sich damit bei der UCH- L1- Inhibition um eine Therapieoption der membranösen Glomerulonephritis des Menschen handeln. Es wären aber noch weitere umfassende Untersuchungen notwendig, um diesen Ansatz näher zu untersuchen.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation und Funktion der Ubiquitin- C-terminalen Hydrolase L1 (UCH- L1) in der experimentellen membranösen Glomerulonephritis der Ratte untersucht. Die UCH- L1 ist ein insbesondere neuronal exprimiertes Enzym aus der Familie der deubiquitinierenden Enzyme (DUBs) und verfügt neben einer Hydrolaseaktivität über eine mit Dimerisation verbundene Ligase- Aktivität. Über die gegenläufigen enzymatischen Aktivitäten ist die UCH- L1 in der Lage, auf den intrazellulären Monoubiquitinpool Einfluß zu nehmen, den sie zudem unabhängig von der enzymatischen Aktivität stabilisiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in geschädigten Podozyten in der membranösen Glomerulonephritis der Ratte eine Neuexpression der UCH- L1 stattfindet. Per Real time- PCR wurde nachgewiesen, daß die Regulation der UCH- L1- Expression zumindest zum Teil auf Transkriptionsebene erfolgt. Immunhistologisch fanden sich Hinweise auf eine Hochregulation der UCH- L1 über einen verminderten proteasomalen Abbau. In immunhistochemischen Färbungen konnte zudem eine Korrelation der Neuexpression der UCH- L1 mit einem vermehrten podozytären Gesamtubiquitin nachgewiesen werden. Westernblotanalysen zeigten auf, daß der Anstieg der UCH- L1 in der Heymann- Nephritis insbesondere mit einer Vergrößerung des Monoubiquitinpools einherging. Zu den Zeitpunkten der stärksten UCH- L1- Expression wurde in den Podozyten der pHN- Tiere demnach ein maximales Gesamtubiquitin sowie ein vergrößerter Monoubiquitinpool nachgewiesen.

In Zellkulturexperimenten an immortalisierten humanen Podozyten konnte eine inverse

Korrelation von UCH- L1- Expression und zellulärem Differenzierungsstatus belegt werden. Podozyten mit einem differenzierten Phänotyp zeigten eine schwache UCH- L1- Expression, während undifferenzierte Podozyten eine starke UCH- L1- Expression aufwiesen. Zudem wurde eine inverse Korrelation von UCH- L1- Expression und Zellfortsatzbildung nachgewiesen. Podozyten, die bei Wachstum auf Extrazellulärmatrix-beschichteten Kulturgefäßen einen arborisierten Phänotyp annahmen, wiesen eine schwache UCH- L1- Expression auf, während auf unbeschichteten Gefäßen kultivierte Podozyten eine starke UCH- L1- Expression zeigten. Auch in dieser Versuchskonstellation korrelierte die Größe des podozytären Monoubiquitinpools mit der UCH- L1- Expression. Unter Hemmung der UCH- L1- Hydrolaseaktivität mit dem spezifischen Inhibitor LDN 57444 bildeten Kulturpodozyten Membranprotrusionen und Zellfortsätze aus. In vivo führte eine UCH- L1- Hemmung durch LDN 57444 nach 24 h zu einer Verminderung der Proteinurie in pHN- Tieren im Vergleich zu unbehandelten pHN- Tieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß im Rahmen der experimentellen membranösen Glomerulonephritis eine Neuexpression der UCH- L1 im Podozyten stattfindet. In Zellkulturexperimenten wurde eine inverse Korrelation von UCH- L1- Expression mit dem podozytären Differenzierungsstatus belegt sowie ein Einfluß der UCH- L1 auf Podozytenmorphologie und Zellfortsatzbildung nachgewiesen. Die UCH- L1- Expression korrelierte stets eng mit der Größe des podozytären Monoubiquitinpools, so daß eine entsprechende regulatorische Funktion der UCH- L1 anzunehmen ist. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die UCH- L1 im geschädigten Podozyten der membranösen Glomerulonephritis über eine Regulation des Monoubiquitinpools auf dessen Differenzierungsstatus und Morphologie Einfluß nimmt und eine entscheidende Rolle in Pathogenese und Verlauf der Erkrankung spielt.

Literaturverzeichnis

1. **Adler S**, Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors, *Am J Path* (1992) 141: 571- 578
2. **Amerik AY, Hochstrasser M**, Mechanism and function of deubiquitinating enzymes, *Biochim Biophys Acta* (2004) 1695: 189- 207
3. **Asanuma K et al.**, MAP- LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis, *FASEB Journal* (2003) 17: 1165- 1167
4. **Asanuma K, Mundel P**, The role of podocytes in glomerular pathobiology, *Clin Exp Nephrol* (2003) 7: 255- 259
5. **Barisoni L, Mundel P**, Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases, *Am J Nephrol* (2003) 23: 353- 360
6. **Barletta GM et al.**, Nephrin and Neph1 co- localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero- oligomers, *J Biol Chem* (2003) 278: 19266- 19271
7. **Beck LH et al.**, M- Type phospholipase A₂ receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy, *N Engl J Med* (2009) 361: 11- 21
8. **Benzing T**, Signaling at the slit diaphragm, *J Am Soc Nephrol* (2004) 15: 1382- 1391
9. **Boute N et al.**, NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal- recessive steroid- resistant nephrotic syndrome, *Nat Genet* (2000) 24: 349- 354
10. **Caballero OL et al.**, Interaction and colocalization of PGP9.5 with JAB1 and p27^{Kip1}, *Oncogene* (2002) 21: 3003- 3010
11. **Chase WH, Price J**, Glomerulonephritis: A review based on 52 renal biopsies, *Canad Med Ass J* (1966) 94: 105- 120
12. **Choi J et al.**, Oxidative modifications and down- regulation of Ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases, *J Biol Chem* (2004) 279: 13256- 13264
13. **Christiansen R et al.**, Glomerular charge barrier and development of proteinuria in passive Heymann nephritis, *Kidney Blood Press Res* (2008) 31: 203- 209
14. **Ciani L et al.**, Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype, *Mol Cel Biol* (2003) 23: 3575- 3582
15. **Ciechanover A, Schwartz A**, The ubiquitin- mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins, *FASEB J* (1994) 8: 182- 191
16. **Cybulsky A et al.**, Glomerular epithelial cell injury associated with mutant α - Actinin- 4, *Am J Physiol Renal Physiol* (2009) (Vorveröffentlichung)
17. **Cybulsky A, Quigg R, Salant D**, Experimental membranous nephropathy redux, *Am J Physiol* (2005) 289: 660- 671
18. **Debiec H et al.**, Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti- neutral- endopeptidase antibodies, *N Engl J Med* (2002) 346: 2053- 2060
19. **Dicker SE, Shirley DG**, Mechanism of compensatory renal hypertrophy, *J Physiol* (1971) 219: 507- 523
20. **Diomedes Camassei F et al**, Protein gene product 9.5 and ubiquitin are expressed in metabolically active epithelial cells of normal and pathologic human kidney, *Nephrol Dial Transplant* (2005) 20: 2714- 2719
21. **Doublier S et al.**, Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for

- proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome, *Am J Pathol* (2001) 158: 1723- 1731
22. **Dupré S, Urban- Grimal D**, Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells, *Biochim Biophys Acta* (2004) 1695: 89- 111
 23. **Endlich KH, Kriz W, Witzgall R**, Update in Podocyte Biology, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2001) 10: 331- 340
 24. **Farquhar MG et al.**, The Heymann nephritis antigenic complex: Megalin (gp330) and RAP, *J Am Soc Nephrol* (1995) 6: 35- 47
 25. **Fine LG, Norman J**, Cellular events in renal hypertrophy, *Annu Rev Physiol* (1989) 51: 19- 32
 26. **Fuchs SY et al.**, HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation- dependent degradation of IκB and β- catenin, *Oncogene* (1999) 18: 2039- 2046
 27. **Furness PN et al.**, Glomerular expression of nephrin is decreased in aquired human nephrotic syndrome, *Nephrol Dial Transplant* (1999) 14: 1234- 1237
 28. **Haglund K, Fiore PP, Dikic I**, Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis, *Trends in Biochemical Sciences* (2003) 28: 598- 603
 29. **Hamano Y et al.**, Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus, *J Biol Chem* (2002) 277: 31154- 31162
 30. **Hara T et al.**, Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice, *Nature* (2006) 441: 885- 889
 31. **Hershko A, Ciechanover A**, The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* (1998) 67: 425- 479
 32. **Herz J et al.**, 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor- related protein/α2- macroglobulin receptor, *J Biol Chem* (1991) 266: 21232- 21238
 33. **Heymann et al.**, Production of the nephritic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions, *Proc Soc Exp Biol Med* (1959) 100: 660- 64
 34. **Hibi K et al.**, PGP9.5 as a candidate tumor marker for non- small- cell lung cancer, *Am J Pathol* (1999) 155: 711- 715
 35. **Hicke L, Dunn R**, Regulation of membrane protein transport by Ubiquitin and Ubiquitin- binding proteins, *Annu Rev Cell Dev Biol* (2003) 19: 141- 172
 36. **Hicke L**, Protein regulation by monoubiquitin, *Mol Biol Cell* (2001) 2: 195- 201
 37. **Holthöfer H**, Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis, *Nephrol Dial Transplant* (2007) 22: 2124- 2128
 38. **Holthöfer H et al.**, Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney, *Am J Pathol* (1999) 155: 1681- 1687
 39. **Holzman LB et al.**, Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell, *KidneyInt* (1999) 56: 1481- 1491
 40. **Huber TB**, Molekulare Pathogenese der Proteinurie, *Dtsch Med Wochenschr* (2008) 133: 954- 958
 41. **Imai et al.**, IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy and lupus nephritis, *Kidney Int* (1997) 51: 270- 276
 42. **Inoue T**, Fat is a component of glomerular slit diaphragms, *Kidney Int* (2001) 59: 1003- 1012
 43. **Janicki R, Lingis J**, Unabated renal hypertrophy in uninephrectomized rats treated with hydroxyurea, *Am J Physiol* (1970) 219: 1188- 1191
 44. **Jin C et al.**, Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast

- cancer cells by enhancing migration and invasiveness, *Cancer Res* (2009) 69: 735- 40
45. **Jung JK et al.**, Hepatitis B virus X protein differentially affects the Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of β - catenin depending on the status of cellular p53, *J Gen Virol* (2007) 88: 2144- 2154
 46. **Kabuta T et al.**, Aberrant interaction between Parkinson's disease – associated mutant UCH- L1 and the lysosomal receptor for chaperone- mediated autophagy, *J Biol Chem* (2008) 283: 23731- 2373
 47. **Kaplan JM et al.**, Mutations in ACTN4, encoding α - Actinin- 4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis, *Nature Genet* (2000) 24: 251- 256
 48. **Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD**, Receptor downregulation and multivesicular- body sorting, *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3: 893- 905
 49. **Kerjaschki D**, Caught flat- footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis, *J Clin Invest* (2001) 108: 1583- 1587
 50. **Kerjaschki D, Neale TJ**, Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis), *J Am Soc Nephrol* (1996) 7: 2518- 2526
 51. **Kerjaschki D et al.**, Transcellular transport and membrane insertion of the C5b- 9 membrane attack complex of complement by glomerular epithelial cells in experimental membranous nephropathy, *J Immunol* (1989) 143: 546- 552
 52. **Kerjaschki D, Miettinen A, Farquhar MG**, Initial events in the formation of immune deposits in passive Heymann nephritis: Gp 330- antigen 330 immune complexes form in epithelial coated pits and rapidly become attached to the GBM, *J Exp Med* (1987) 166: 109- 128, 1987
 53. **Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG**, Identification and characterization of podocalyxin- the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell, *J Cell Biol* (1984) 98: 1591- 1596
 54. **Kerjaschki D, Farquhar MG**, Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithel cells of normal Lewis rats, *J Exp Med* (1983) 157: 667- 686
 55. **Kerjaschki D, Farquhar MG**, Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats, *J Exp Med* (1983) 157: 667- 686
 56. **Kerjaschki D, Farquhar MG**, The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border, *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79: 5557- 5561
 57. **Kestila M et al.**, Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephritic syndrome, *Molecular cell* (1998) 1: 575- 582
 58. **Kim PK et al.**, Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes, *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105: 20567- 20574
 59. **Kitamura HP et al.**, Unique localization of protein gene product 9.5 in type B synoviocytes in the joints of the horse, *J Histochem Cytochem* (1999) 47: 343- 351
 60. **Kobayashi N**, Mechanism of the process formation; Podocytes vs. Neurons, *Microscopy Research and Technique* (2002) 57: 217- 223
 61. **Kobayashi N et al.**, Morphogenetic activity of extracellular matrices on cultured podocytes. Laminin accelerates podocyte process formation in vitro, *Ital J Anat Embryol* (2001) 106: 423- 430
 62. **Kobayashi N, Mundel P**, A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non- neuronal cells, *Cell Tissue Res* (1998) 291: 163- 174

63. **Kos CH et al.**, Mice deficient in alpha- actinin- 4 have severe glomerular disease, *J Clin Invest* (2003) 111: 1683- 1690
64. **Kwon J et al.**, Developmental regulation of ubiquitin C- terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice, *Biol Reprod* (2004) 71: 515- 521
65. **Kwon J et al.**, Two closely related ubiquitin C- terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis, *Am J Pathol* (2004) 165: 1367- 1374
66. **Kreidberg JA et al.**, Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis, *Development* (1996) 122: 3537- 3547
67. **Kretzler M et al.**, Altering glomerular epithelial function in vitro using transient and stable transfection, *J Nephrol* (2001) 14: 211- 219
68. **Kriz W, Gretz N, Lemley KV**, Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit?, *Kidney Int* (1998) 54: 687- 697
69. **Kriz W et al.**, Structure- stabilizing forces in the glomerular tuft, *J Am Soc Nephrol* (1995) 5: 1731- 1739
70. **Larsen CN et al.**, Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: Ubiquitin C- terminal hydrolases, *Biochemistry* (1998) 37: 3358- 3368
71. **Larsen CN, Krantz BA, Wilkinson KD**, Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: Ubiquitin C- terminal hydrolases, *Biochemistry* (1998) 37: 3358- 3368
72. **Larsen CN et al.**, Substrate binding and catalysis by Ubiquitin- terminal hydrolases: identification of two active site residues, *Biochemistry* (1996) 35: 6735- 6744
73. **Larsen CN, Price JS, Wilkinson KD**, Substrate binding and catalysis by ubiquitin C- terminal hydrolase: identification of two active site residues, *Biochem* (1996) 35: 6735- 6744
74. **Leroy E et al.**, The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature* (1998) 395: 451- 452
75. **Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E**, CD2- associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton, *Am J Physiol Renal Physiol* (2002) 283: 734- 743
76. **Lim KL, Dawson VL, Dawson TM**, Parkin- mediated lysine 63- linked polyubiquitination: a link to protein inclusions formation in Parkinson's and other conformational diseases, *Neurobiol Aging* (2006) 27: 524- 529
77. **Liu Y et al.**, Discovery of inhibitors that elucidate the role of UCH- L1- activity in the H1299 lung cancer cell line, *Chemistry & Biology* (2003) 10: 837- 846
78. **Liu Y et al.**, The UCH- L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect α - synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility, *Cell* (2002) 111: 209- 218
79. **Lowe J et al.**, Ubiquitin carboxy- terminal hydrolase (PGP9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases, *J Pathol* (1990) 161: 153- 160
80. **Luchansky SJ, Lansbury PT, Stein RL**, Substrate recognition and catalysis by UCH- L1, *Biochem* (2006) 45: 14717- 14725
81. **Ly Jo, Alexander M, Quaggin SE**, A podocentric view of nephrology, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2004) 13: 299- 305
82. **Marshall CB, Shankland SJ**, Cell cycle regulatory proteins in podocyte health and disease, *Nephron Exp Nephrol* (2007) 106: 51- 59
83. **Meray RK, Lansbury PT**, Reversible monoubiquitination regulates the Parkinson disease- associated ubiquitin hydrolase UCH- L1, *J Cell Biol* (2007) 282: 10567- 10575
84. **Meyer- Schwesinger C et al.**, A new role for the neuronal ubiquitin C- terminal

- hydrolase- L1 (UCH- L1) in podocyte process formation and podocyte injury in human glomerulopathies, *J Pathol* (2009) 217: 452- 464
85. **Miner JH**, Renal basement membrane components, *Kidney Int* (1999) 56: 2016- 2024
 86. **Mizushima N**, Autophagy: process and function, *Genes Dev* (2007) 21: 2861- 2873
 87. **Morigi M et al.**, In response to proteinload podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin- 1 gene, *Am J Pathol* (2005) 166: 1309- 1320
 88. **Mundel P, Shankland SJ**, Podocyte biology and response to injury, *J Am Soc Nephrol* (2002) 13: 3005- 3015
 89. **Mundel P et al.**, Synaptopodin: An Actin- associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes, *J Cell Biol* (1997) 139: 193- 204
 90. **Murray RZ, Jolly LA, Wood SA**, The FAM deubiquitilating enzyme localizes to multiple points of protein trafficking in epithelia, where it associates with E- cadherin and β - catenin, *Mol Biol Cell* (2004) 15: 1591- 1599
 91. **Nakatsue T et al.**, Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy, *Kidney Int* (2005) 67: 2239- 2253
 92. **Natori Y et al.**, Production and polarized secretion of basement membrane components by glomerular epithelial cells, *Am J Physiol* (1992) 262: 131- 137
 93. **Noël LH**, Morphological features of primary focal and segmental glomerulosclerosis, *Nephrol Dial Transplant* (1999) 14: 53- 57
 94. **Noël LH et al.**, Glomerular and serum immunoglobulin G subclasses in membranous nephropathy and anti- glomerular basement membrane nephritis, *Clin Immunol Immunopathol* (1988) 46: 186- 194
 95. **Nussbaum RL, Ellis CE**, Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *N Engl J Med* (2003) 348: 1356- 1364
 96. **Oh J, Reiser J, Mundel P**, Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol* (2004) 19: 130- 137
 97. **Orisaka M et al.**, Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody, *J Immunol* (1988) 141: 807- 814
 98. **Orlando RA et al.**, The glomerular epithelial cell anti- adhesion podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin, *J Am Soc Nephrol* (2001) 12: 1589- 1598
 99. **Osaka H et al.**, Ubiquitin carboxy- terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron, *Human Molecular Genetics* (2003) 12: 1945- 1958
 100. **Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M**, Cell biology of the gomerular podocyte, *Physiol Rev* (2003) 83: 253- 307
 101. **Petersmann AT et al.**, Mitotic cell cycle proteins increase in podocytes despite lack of proliferation, *Kidney Int* (2003) 63: 113- 122
 102. **Pickart CM**, Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem* (2001) 70: 503- 533
 103. **Pietromonaco S et al.**, Molecular cloning of a cDNA encoding a major pathogenic domain of the Heymann nephritis antigen gp330, *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 1811- 1815
 104. **Ponticelli C**, Membranous nephropathy, *J Nephrol* (2007) 20: 268- 287
 105. **Putala H et al.**, The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death, *Human molecular genetics* (2001) 10: 1- 8
 106. **Rajan V, Mitch WE**, Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease, *Biochim Biophys Acta* (2008) 1782: 795- 799
 107. **Rajan V, Mitch WE**, Muscle wasting in chronic kidney disease: the role of the Ubiquitin proteasome system and its clinical impact, *Pediatr Nephrol* (2008) 23:

- 527- 535
108. **Rastaldi MP et al.**, Glomerular podocytes contain neuron- like functional synaptic vesicles, *FASEB J* (2006) 20: 88- 98
 109. **Regele HM et al.**, Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis, *J Am Soc Nephrol* (2000) 11: 403- 412
 110. **Reiser J et al.**, The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction, *J Am Soc Nephrol* (2000) 11: 1- 8
 111. **Rodewald R, Karnovsky MJ**, Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse, *J Cell Biol* (1974) 60: 423- 433
 112. **Rodriguez R et al.**, Stereological quantification of nerve fibers immunoreactive to PGP9.5, NYP and VIP in rat prostate during postnatal development, *J Androl* (2005) 26: 197- 204
 113. **Ronco P, Debiec H**, Podocyte antigens and glomerular disease, *Nephron Exp Nephrol* (2007) 107: 41- 46
 114. **Ronco P, Debiec H**, New insights into the pathogenesis of membranous glomerulonephritis, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2006) 15: 258- 263
 115. **Ronco P, Debiec H**, Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: from Heymann nephritis to alloimmunization, *J Am Soc Nephrol* (2005) 16: 1205- 1213
 116. **Roselli S et al.**, Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin- deficient mice, *Mol Cell Biol* (2004) 24: 550- 560
 117. **Ruotsalainen V et al.**, Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes, *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96, 7962- 7967
 118. **Saigoh K et al.**, Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice, *Nature Gen* (1999) 23: 47- 51
 119. **Sakurai M et al.**, Ubiquitin C- terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation, *J Cell Sci* (2006) 119: 162- 171
 120. **Salant DJ, Cybulski AV**, Experimental glomerulonephritis, *Methods in Enzymology* (1988) 162: 421- 461
 121. **Salant DJ, Darby C, Couser WG**, Experimental membranous glomerulonephritis in rats: quantitative studies of glomerular immune deposits formation in isolated Glomeruli and whole animals, *J Clin Invest* (1980) 66: 71- 81
 122. **Saleem MA et al.**, A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression, *J Am Soc Nephrol* (2002) 13: 630- 638
 123. **Salomon D**, Regulation of β - catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin- proteasome system, *J Cell Biol* (1997) 139: 1325- 1335
 124. **Saran AM et al.**, Complement mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy, *Kidney Int* (2003) 64: 2072- 2078
 125. **Sato S et al.**, Autophagy by podocytes in renal biopsy specimens, *J Nippon Med Sch* (2006) 73: 52- 53
 126. **Satoh JI, Kuroda Y**, A polymorphic variation of serine to tyrosine at codon 18 in the Ubiquitin C- terminal hydrolase L1- gene is associated with a reduced risk of sporadic Parkinson's disease in a Japanese population, *J Neurol Sci* (2001) 189: 113- 117
 127. **Schnell JD, Hicke L**, Non- traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins, *J Biol Chem* (2003) 278: 35857- 35860

128. **Schwarz K et al.**, Podocin, a raft- associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and Nephrin, *J Clin Invest* (2001) 108: 1621- 1629
129. **Sekiguchi S et al.**, Localization of Ubiquitin C- terminal hydrolase L1 in mouse ova and its function in the plasma membrane to block polyspermy, *Am J Pathol* (2006) 169: 1722- 1729
130. **Setsuie R, Wada K**, The functions of UCH- L1 and its relation to neurodegenerative diseases, *Neurochem Int* (2007) 51: 105- 111
131. **Shankland SJ**, The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis, *Kidney Int* (2006) 69: 2131- 2147
132. **Shankland SJ, Pippin JW, Couser WG**, Complement (C5b-9) induces glomerular epithelial cell DNA synthesis but not proliferation in vitro, *Kidney Int* (1999) 56: 538- 548
133. **Shih NY et al.**, CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to Nephrin via a novel C- terminal domain, *Am J Pathol* (2001) 159: 2303- 2308
134. **Shih NY et al.**, Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2- associated protein, *Science* (1999) 286: 312- 315
135. **Shirato I**, Process effacement in vivo, *Microsc Res Tech* (2002) 57: 241- 246
136. **Shirato I et al.**, Protein Gene Product 9.5 is selectively localized in parietal epithelial cells in Bowman's capsule in the rat kidney, *J Am Soc Nephrol* (2000) 11: 2381- 2386
137. **Shirato I et al.**, Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis, *Am J Pathol* (1996) 148: 1283- 1296
138. **Somlo S, Mundel P**, Getting a foothold in nephrotic syndrome, *Nat Gen* (2000) 24: 333- 335
139. **Smoyer W et al.**, Podocyte α - actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephritic syndrome, *Am J Physiol* (1997) 273: 150- 157
140. **Spicer ST et al.**, Induction of passive Heymann nephritis in complement component 6- deficient PVG rats, *J Immunol* (2007) 179: 172- 178
141. **Stawiecka- Mirota M et al.**, Nedd4, a human ubiquitin ligase, affects actin cytoskeleton in yeast cells, *Exp Cell Res* (2008) 314: 3318- 3326
142. **Suzuki Y et al.**, Alteration of glomerular anionic sites by the development of subepithelial deposits in experimental glomerulonephritis in the rat, *Virchows Arch [B]* (1983) 44: 209- 222
143. **Tan YY et al.**, Endoplasmatic reticulum stress contributes to the cell death induced by UCH- L1- inhibitor, *Mol Cell Biochem* (2008) 318: 109- 115
144. **Tezel E et al.**, PGP9.5 as a prognostic factor in pancreatic cancer, *Clin Cancer Res* (2000) 6: 4764- 4767
145. **Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ**, Autophagy: Principles and significance in health and disease, *Biochim Biophys Acta* (2009) 1792: 3-13
146. **Topham P et al.**, Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin, *J Clin Invest* (1999) 104: 1559- 1566
147. **Toth T, Takebayashi S**, Gomerular podocyte vacuolation in idiopathic membranous nephropathy, *Nephron* (1992) 61: 16- 20
148. **Tryggvason K, Wartiovaara J**, Molecular basis of glomerular permselectivity, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2001) 10: 543- 549
149. **Tryggvason K, Routsalainen V, Wartiovaara J**, Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney, *Int J Dev Biol* (1999) 43: 445- 451
150. **Wang S et al.**, Patterns of nephrin and new proteinuria- associated protein expression in human renal diseases, *Kidney Int* (2002) 61: 141- 147

151. **Wasserstein AG**, Membranous glomerulonephritis, *J Am Soc Nephrol* (1997) 8: 664- 674
152. **Welsh CA, Wellen I, Taylor HC**, Changes the renal function accompanying the hypertrophy of the remaining kidney after unilateral nephrectomy, *J Clin Invest* (1944) 23: 750- 754
153. **Wilkinson KD**, Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome, *Cell Develop Biol* (2000) 11: 141- 148
154. **Wilkinson KD**, Regulation of ubiquitin- dependent processes by deubiquitinating enzymes *FASEB J*, (1997) 11: 1245- 1256
155. **Wilkinson KD**, The neuron- specific protein PGP9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, *Science* (1989) 246: 670- 673
156. **Yamazaki T et al.**, PGP9.5 as a marker for invasive colorectal cancer, *Clin Cancer Res* (2002) 8: 192- 195
157. **Yao J et al.**, α - Aktinin- 4- mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein, *PLoS Biol* (2004) 2: 787- 794
158. **Yuan H et al.**, Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy, *J Am Soc Nephrol* (2002) 13: 946- 956
159. **Zoja C, Benigni A, Remuzzi G**, Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2004) 13: 31- 37

Publikation:

Meyer- Schwesinger C*, Meyer TN*, **Münster S**, Klug P, Saleem M, Helmchen U, Stahl RAK, *A new role for the neuronal ubiquitin C- terminal hydrolase L1 (UCH- L1) in podocyte process formation and podocyte injury in human glomerulopathies*, J Pathol (2009) 217: 452- 464. *equal contribution

Hamburg, den 18.09.2009

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Silvia Münster

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung das Erstellen der vorliegenden Promotionsschrift ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Stahl für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die vielfältige Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich insbesondere bei meiner Betreuerin Frau Dr. Catherine Meyer- Schwesinger bedanken, die mir stets mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand. Ihr Engagement und ihre Begeisterung für das Thema waren stets ansteckend, so daß die Laborarbeit zu einer wertvollen Erfahrung für mich wurde.

Mein Dank gilt zudem Frau Silke Dehde, Herrn Philipp Klug und Frau Mariola Reszka, die es mir ermöglichten, zahlreiche Techniken in kurzer Zeit zu erlernen, und damit zum Erstellen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich dem Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ für die umfassende Förderung meiner Dissertation danken. Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. Maura Dandri und Herrn PD Dr. Johannes Herkel für die interessante Gestaltung der Seminare sowie die hervorragende Betreuung im Rahmen des Stipendiums.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Nephrologie bedanken, die mich freundlich aufgenommen haben und mir gegenüber stets hilfsbereit waren.