

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik, Nephrologie

Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

**DIE ROLLE VON UCH-L1 FÜR DIE PODOZYTÄRE
ENTDIFFERENZIERUNG IN DER MEMBRANÖSEN
GLOMERULONEPHRITIS**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Eva-Maria Theresia Klupp
aus Bayreuth

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12. 02. 2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. A. Stahl

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. M. Kemper

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Harendza

**Trabaja, como nunca necesitaras dinero,
Ama, como nunca te hubieran hecho daño
y Baila, como nunca te estuvieron viendo.**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Die membranöse Glomerulonephritis	4
1.2	Der Podozyt.....	7
1.3	Die Proteindegradation.....	9
1.4	Die Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1)	13
2	Arbeitshypothese und Fragestellung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material.....	16
3.1.1	Antikörper.....	16
3.1.2	Chemikalien	17
3.1.3	Material	20
3.2	Methoden	28
3.2.1	Zellkultur	28
3.2.1.1	Transfektion der immortalisierten Podozyten	28
3.2.1.2	Kultivierung von immortalisierten Podozyten.....	32
3.2.1.3	Ausdifferenzieren der Podozyten	32
3.2.1.4	Passagieren der Zellen	32
3.2.1.5	Zellzahlbestimmung in der Neubauer- Kammer	33
3.2.1.6	Aussäen und Fixation von Podozyten auf Deckgläschen.....	33
3.2.1.7	Ernten von Zellen für weitere Experimente.....	34
3.2.2	Zellkulturexperimente.....	34
3.2.2.1	UCH-L1 Inhibition durch LDN57444 bei nicht transfizierten Podozyten.....	34
3.2.2.2	Proteasom-Hemmung mit MG132.....	34
3.2.2.3	Hemmung der Autophagie durch Pepstatin A	34
3.2.3	Die Passive Heymann-Nephritis	35
3.2.3.1	Induktion der PHN und Betreuung der Tierstaffel.....	35
3.2.3.2	Tötung der Versuchstiere und Organentnahme	36
3.2.3.3	Glomeruliisolation	36
3.2.4	Fluoreszenz- und Immunhistologische Färbungen	37
3.2.4.1	Färbung von Gewebeschnitten der Tierstaffel.....	38
3.2.4.1.1	PAS-Färbung von Gewebeschnitten der Tierstaffel	38

3.2.4.1.2	Kollagen Typ IV- Ubiquitin-Färbung der Rattennieren.....	38
3.2.4.1.3	UCH-L1-Immunhistochemie der Rattenniere	39
3.2.4.2	Färbung kultivierter Podozyten.....	40
3.2.4.2.1	DAPI- und Phalloinfloureszenzfärbung.....	40
3.2.4.2.2	Immunfluoreszenz gegen UCH-L1	40
3.2.4.2.3	Immunfluoreszenz gegen Ubiquitin	40
3.2.4.2.4	Immunfluoreszenz der lysosomalen Proteine LIMP-2 und LAMP-2	41
3.2.4.2.5	Immunfluoreszenz des Autophagie-assoziierten Proteins LC-3	41
3.2.4.2.6	Tunelfärbung der Podozyten	41
3.2.4.3	Auswertung der Färbungen	42
3.2.5	Proteinbiochemie	42
3.2.5.1	Proteinextraktion aus Podozyten.....	42
3.2.5.2	Westernblotanalysen.....	42
3.2.5.2.1	Eindimensionale SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
3.2.5.2.2	Immunoblot	43
3.2.5.3	Proteinnachweis im Rattenurin durch Coomassie	43
3.2.5.4	ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	44
3.2.6	Molekularbiologie	45
3.2.6.1	Isolierung von DNA aus Podozyten.....	45
3.2.6.2	Bestimmung der DNA- Konzentration durch Spektrophotometrie ..	45
3.2.6.3	Proteasomaktivitätstest	45
3.2.7	Statistik	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Stabile Überexpression und stabiler Knock down von UCH-L1 in kultivierten Podozyten	47
4.2	Die UCH-L1 beeinflusst den Phänotyp der Podozyten.....	48
4.2.1	Die UCH-L1 verhindert die Podozytendifferenzierung	49
4.2.2	Zunahme der Proliferation der Podozyten durch UCH-L1.....	54
4.2.3	UCH-L1 Überexpression führt zu einem Anstieg der Apoptoserate	55
4.2.4	DNA-Anstieg in den Podozyten durch UCH-L1.....	57
4.3	UCH-L1 beeinflusst die Proteindegradation in Podozyten.....	58
4.3.1	UCH-L1 hemmt das Ubiquitin-Proteasom-System.....	59
4.3.1.1	Akkumulation von Polyubiquitin bei UCH-L1 Überexpression	59

4.3.1.2	Reduktion der proteasomalen Aktivität durch die UCH-L1	60
4.3.1.3	Ubiquitinaggregatbildung bei UCH-L1 Überexpression	61
4.3.1.4	UCH-L1 führt zu vermehrter K63-Polyubiquitinierung	63
4.3.2	Die UCH-L1 beeinflusst die Lysosomal und Autophagie vermittelte Proteindegradation.....	64
4.3.2.1	Verstärkte Autophagie und Verbrauch von LC-3 durch Überexpression von UCH-L1	64
4.3.2.2	Gehemmte Autophagie bei UCH-L1 Knockdown	67
4.4	Die Passive Heymann Nephritis	70
4.4.1	Klinik der Passiven Heymann-Nephritis	70
4.4.1.1	Körpergewicht	70
4.4.1.2	Serum- Harnstoff und Serum-Kreatinin	71
4.4.1.3	UCH-L1 Überexpression bei PHN	72
4.4.2	Verringerte podozytäre Schädigung in der PHN durch Inhibition der UCH-L1 Hydrolaseaktivität.....	73
4.4.3	Abnahme der Proteinurie bei PHN durch Hemmung der UCH-L1 Hydrolaseaktivität.....	74
5	Diskussion	77
6	Zusammenfassung	87
7	Abkürzungsverzeichnis.....	88
8	Literaturverzeichnis.....	91
9	Danksagung.....	97
10	Lebenslauf	98
11	Veröffentlichung.....	100
12	Eidesstattliche Erklärung	102

1 Einleitung

1.1 Die membranöse Glomerulonephritis

Die membranöse Glomerulonephritis (mGN) ist in der Bundesrepublik Deutschland nach Diabetes Mellitus die zweithäufigste Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz und, mit einem Anteil von 20 %, die häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom im Erwachsenenalter. Kennzeichnend für das nephrotische Syndrom ist der Symptomkomplex aus großer Proteinurie ($> 3,5 \text{ g/24 h}$), Hypoproteinämie, hypalbuminämische Ödeme und Hyperlipidämie. Die Inzidenz dieser Erkrankung liegt bei etwa $1:10^5/\text{Jahr}$ (1).

Bei nur 20 % aller Glomerulonephritiden lassen sich direkte Ursachen für die Krankheitsentstehung nachweisen. Infektionskrankheiten wie Hepatitis B oder C, HIV oder Malaria können sekundär eine mGN verursachen. Auch Autoimmunerkrankungen wie der Systemische Lupus erythematodes oder Malignome können Auslöser für eine mGN darstellen. Weitere sekundäre Ursachen einer mGN stellen Medikamente dar. NSAR, Goldsalze oder Penicillamin sind die häufigsten mit einer mGN assoziierten Pharmaka. Bei mit 80 % der Mehrheit der Patienten lassen sich jedoch keine Ursachen für die Entstehung einer mGN finden und die primäre Erkrankung wird als idiopathisch angesehen (2). Obwohl bei der mGN eine Spontanremission in bis zu 25 % aller Fälle möglich ist, kommt es bei etwa 40% der Patienten innerhalb von 10 Jahren zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz, die eine Dialysetherapie und eine Nierentransplantation erforderlich macht.

Pathogenetisch kommt es bei der mGN nach subepithelialer Immunkomplexbildung zur Aktivierung und Schädigung der glomerulären Epithelzellen (Podozyten) und damit zur Entwicklung einer großen Proteinurie. Durch die Ablagerung der Immunkomplexe an der Außenseite der glomerulären Basalmembran (lamina rara externa) kommt es, sichtbar im Lichtmikroskop, zunächst zur Ausbildung von Spikes und später zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Verdickung der Basalmembran (2).

Die Entstehung dieser Immundepots ist bis heute noch ungeklärt. Verschiedene Theorien, wie die subepitheliale Ablagerung systemisch zirkulierender Immunkomplexe aufgrund von Größe- und Ladungseigenschaften oder die subepitheliale Ablagerung von Fremdanigenen und daraus resultierende Immunkomplexbildung, werden diskutiert (3, 4). Ein dritter theoretischer Ansatz der Entstehung der mGN geht von einer in situ Bildung der Immunkomplexe durch Bindung zirkulierender Antikörper an podozytäre Antigene aus. Für diese Hypothese spricht die Identifizierung der Neutralen Endopeptidase auf glomerulären Epithelzellen (Podozyten) als Antigen bei neonataler mGN (4, 5) von Ronco et al. und die vor kurzem veröffentlichten Beschreibungen des M-Typ Phospholipase A2-Rezeptors (6) und der Aldose Reduktase + Superoxid-Dismutase (SOD2) (7) als potentielle Antigene bei der idiopathischen mGN.

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der mGN spielt das Komplementsystem. Die abgelagerten Immunkomplexe bestehen aus (vorwiegend) unbekanntem Antigenen, Antikörpern, meist IgG4, und dem Membrane attack complex (MAC), der aus den Komplementfaktoren C5b-9 gebildet wird. Folge der Aktivierung der Komplementkaskade ist die Bildung und Insertion sublytischer C5b-9-Komplexe in die Membran der Podozyten. Dort führen sie zur Aktivierung und Stimulation der Podozyten und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Prostanoiden, Proteasen und Cytokinen. Es kommt zu einem Verlust der Integrität der glomerulären Basalmembran (siehe 1.2) und der Filtrationsbarriere und damit zur Entwicklung einer starken Proteinurie (8).

Klinisch wichtige Parameter für die Prognose dieser Nierenerkrankung sind vor allem die Stärke der Proteinurie und die glomeruläre Filtrationsrate (9). Das Alter (>50 Jahre), männliches Geschlecht, arterielle Hypertonie, die Ablagerung von Komplement und eine reduzierte Kreatininclearance sind weitere Faktoren, die den Verlauf der mGN bestimmen (1).

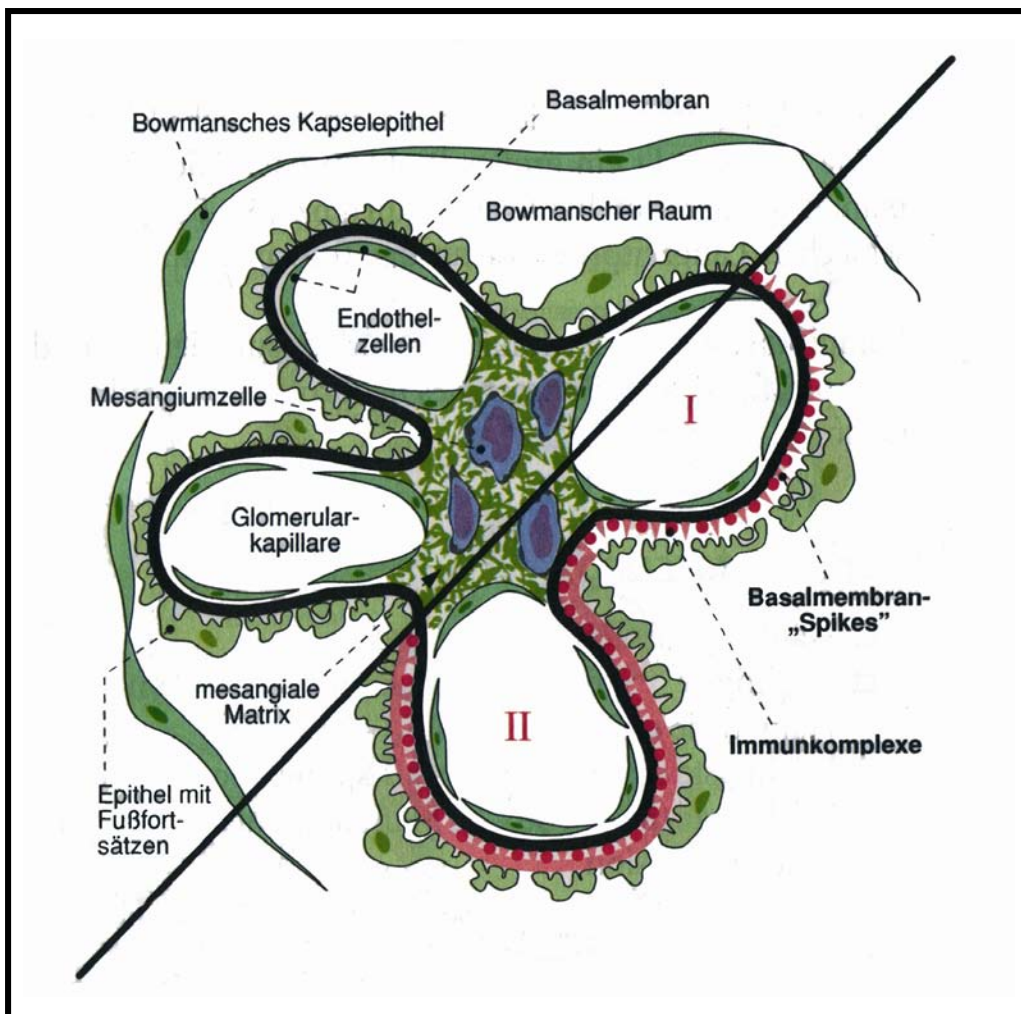


Abb. 1: Membranöse Glomerulonephritis (2)

Wichtigste Veränderung ist die Ablagerung von Immunkomplexen an der Außenseite der Basalmembran

- I. Frühform: einzelne Immunkomplexe auf der Außenseite (subepithelial) der Basalmembran (= Spikes)
- II. Spätstadium: Subepitheliale Immunkomplexe werden außen von der Basalmembran eingeschleudert

Ein Großteil des heutigen Wissens über die Pathogenese der humanen mGN wurde aus den Heymann-Nephritis-Modellen, experimentellen Glomerulonephritiden der Ratte, gewonnen. Sie wurden 1959 erstmals von Heymann et al. beschrieben und besitzen große morphologische und funktionale Ähnlichkeiten mit der humanen mGN (10). Es existiert ein aktives und passives Modell der Heyman Nephritis. Die aktive Form wird induziert, indem die Tiere direkt mit einer Fraktion aus Bürstensaum proximaler Tubulusepithelzellen (FX1A) immunisiert werden.

In der Passiven Heymann Nephritis (PHN), welches in dieser Arbeit verwendet wurde, erfolgt die glomeruläre Schädigung durch Applikation eines Antiserums mit präformierten Antikörpern, die subepithelial an Podozyten binden. Das Antiserum wird durch repetitive Immunisierung von Schafen oder Kaninchen mit dem Bürstensaum proximaler Tubuli (FX1A) gewonnen. In der Ratte kommt es als Folge der Erkrankung zu einem zweiphasigen Proteinurieverlauf. Die erste (heterologe) Phase entsteht durch Bindung des präformierten Antikörpers an ein podozytäres Zielantigen in der Ratte. Anschließend kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen den noch podozytär gebundenen Schaf-/Kaninchenantikörper durch das Rattenimmunsystem und damit zur zweiten, autologen Phase und erneut zur Proteinurie (11). Der Zeitverlauf der heterologen und autologen Phase ist dabei je nach Potenz der Serums unterschiedlich. 1982 wurde als Zielantigen der präformierten Antikörper ein 550kD großes Protein identifiziert (gp330), das sowohl in Podozyten, als auch in Epithelien des proximalen Tubulus exprimiert wird (12). Heute ist gp330 als Megalin bekannt. Megalin ist ein Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie und fungiert als Multiligandenrezeptor für die Aufnahme verschiedener Makromoleküle. Megalin wird in Clathrin-coated pits exprimiert, die auf den basalen Seiten der Podozytenfortsätze lokalisiert sind. Dort findet auch die initiale in situ Bildung von Immunkomplexen statt (13). Für die Entstehung der humanen mGN kann Megalin nicht verantwortlich sein, da es in humanen Podozyten oder in den subepithelialen Immundepots nicht gefunden wurde (3).

In der PHN lösen die Immundepots die Komplementkaskade mit Bildung des MAC aus. Als Reaktion auf die Entstehung des C5b-9-Komplexes kommt es im Podozyt wie in der mGN zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Proteasen, Prostanoiden, extrazellulärer Matrix und Zytokinen. Folge ist die Alteration des podozytären Zytoskeletts, die Umverteilung von Schlitzmembranproteinen (vor allem Nephrin) (14) und Fussfortsatz Effacement. Es kommt zur Ablösung der Podozyten und zur Zerstörung der funktionalen Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere mit Entwicklung einer starken Proteinurie (8).

1.2 Der Podozyt

Die Niere spielt eine zentrale Rolle in der Regulation lebenswichtiger physiologischer Abläufe. Die wesentlichen Aufgaben sind zum einen die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und körperfremden Substanzen, wie zum Beispiel Pharmaka, und die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts sowie des Säure-Basen-Gleichgewichts. Darüber hinaus zählen die Kontrolle des Blutdrucks und die Bildung von Hormonen (z.B. Erythropoetin) zu den wichtigen Funktionen (1,2).

Diese differenzierten Leistungen der Niere werden durch spezielle morphologische Strukturen ermöglicht. Die kleinste funktionelle Baueinheit der Niere ist das Nephron (Nierenkörperchen). Es setzt sich zusammen aus dem Glomerulus, einem Kapillarkonvolut umschlossen von der Bowmannschen Kapsel, und einen Tubulussystem, das in die Sammelrohre mündet.

In jeder Niere sind etwa 1 Million Nephrone vorhanden. Die Hauptfunktion der renalen Glomeruli ist die Primärharnbildung durch Ultrazentrifugation des Blutes. Pro Tag werden etwa 180L Primärharn produziert, wobei niedermolekulare Stoffwechselprodukte ausgeschieden und gleichzeitig Albumin und größere Eiweiße zurückgehalten werden sollen. Die dafür nötige Filtrationsbarriere mit einer ladungs- und größenspezifischen Filterfunktion besteht aus 3 Schichten: dem fenestrierten Endothel der Kapillare, den harnseitig dem Kapillarkonvolut anliegenden visceralen glomerulären Epithelzellen (Podozyten), die mit ihren Fortsätze Filtrationsschlitz bilden, und der dazwischen liegenden glomerulären Basalmembran (GBM) (15).

Die Podozyten als letzte Barriere des Filters sind hoch spezialisierte Zellen mit einer komplexen Zytoarchitektur. Von den großen Zellkörpern der Zellen gehen lange primäre Fortsätze ab, die die Glomeruluskapillare umgreifen und sich in weitere, zahlreiche sekundäre Fussfortsätze aufzweigen (16, 17). Im Zelleib und in den Primärfortsätzen dominieren Mikrotubuli und Intermediärfilamente wie Vimentin und Desmin. Die Fussfortsätze dagegen verfügen über ein dichtes Netz an Aktinfilamenten, die Teil des kontraktiven Apparates aus Aktin, Myosin II, Talin, Vinculin und α -Aktinin-4 sind (18, 19). Die Aktinfilamente sind mittels Integrinen ($\alpha\beta 1$) (20) und Dystroglykanen (α und β) (21) in der GBM verankert. Die Fussfortsätze benachbarter Podozyten stehen miteinander über interzelluläre Kontakte in Verbindung und bilden ein interdigitierendes Muster mit 20-30 nm breiten freien Filtrationsschlitz. Dadurch kommt es zu einer von der Proteingröße abhängigen Filterfunktion. Die Filtrationsschlitz werden von einer Schlitzmembran überdeckt, die den Podozyten in eine apikale, eine basale und eine Schlitzmembrandomäne unterteilt. Die apikale Podozytenmembran und die Schlitzmembran sind von einer dicken Glykokalix bedeckt, die reich an Sialoglykoproteinen wie Podocalyxin und Podoendin ist, und eine negative Oberflächenladung der Podozyten bewirkt (22, 23). Die Schlitzmembran wurde 1974 von Rodewald und Karnovsky aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen als reißverschlussartige Struktur beschrieben (24). Sie ist, wie die Podozyten mit ihren Fortsätzen, unabdingbar für die Integrität der Filtrationsbarriere. Verschiedenste

Proteine sind mit dem Aufbau der Schlitzmembran assoziiert. Dazu zählen unter anderem Nephrin, CD2AP, FAT, Podocin und P-Cadherin (25).

Zu den Funktionen der Podozyten zählen neben der Filtrationsschlitz- und Schlitzmembranbildung die Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere durch Synthese von Bestandteilen der GBM und die Stabilisation der glomerulären Struktur (26).

Da es sich bei Podozyten um terminal differenzierte Zellen handelt, haben sie ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren. Auf Schädigung kann dieser Zelltyp lediglich mit Zellhypertrophie, nicht aber mit Proliferation, reagieren (27).

Eine podozytäre Schädigung ist aufgrund der zentralen Rolle der Zellen für die Aufrechterhaltung einer funktionalen glomerulären Filtrationsbarriere meist mit einer massiven Proteinurie assoziiert. Morphologisch geht die starke Proteinurie bei der mGN mit einer Alteration des Zytoskeletts und Umverteilung von Schlitzmembranproteinen einher, die bedingt ist durch die Verschmelzung der Fussfortsätze (Effacement) (25, 28). Der exakte Mechanismus dafür ist unbekannt.

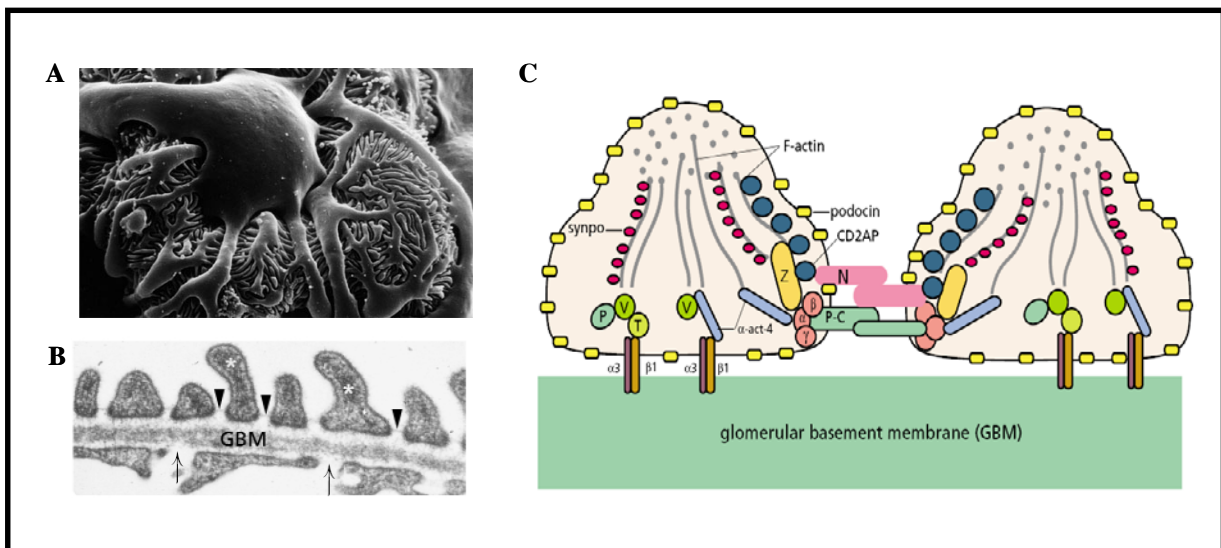


Abb. 2: Podozytenmorphologie und Schlitzmembranproteine (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozyten in situ; der Zellkörper wölbt sich in den Bowmannschen Kapselraum vor und entsendet Primärfortsätze, die mit ihren Fußfortsätzen an der Kapillarwand anhaften (Vergrößerung: 5300x, Quelle: 29). (B) Ultrastruktur der glomerulären Kapillarwand; die Filtrationsbarriere besteht aus dem fenestrierten Endothel (Pfeile), der GBM und den Podozytenfußfortsätzen (Asteriske) mit der die Filtrationsschlitze überbrückenden Schlitzmembran (Pfeilköpfe) (Quelle: 16) (C) Schematische Darstellung der Schlitzmembran und ihrer Komponenten; der Podozytenfußfortsatz enthält einen kontraktilen Apparat aus Aktin, Myosin μ , - 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: 16)

1.3 Die Proteindegradation

Der intrazelluläre Abbau von Proteinen ist ein streng regulierter Prozess, der die normale Zellhomöostase aufrecht erhält. In der Zelle existieren verschiedene Systeme der Proteolyse, wobei die Regulation des Abbaus der meisten kurzlebigen Proteine in eukaryoten Zellen über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) erfolgt. (30). Eine alternative, jedoch unspezifischere, Möglichkeit intrazelluläre Proteine abzubauen ist deren Degradation durch Lysosomen (31).

Das UPS ist ein hochkonserviertes System, abhängig von ATP. Die Kennzeichnung („targeting signal“) von Proteinen für die proteasomale Degradation erfolgt über die kovalente Bindung mit Ubiquitin. Ubiquitin ist ein kleines Polypeptid aus 76 Aminosäuren und kommt ubiquitär in allen eukaryoten Zellen vor. Die Ubiquitinierung von Proteinen ist ein wichtiger Bestandteil vieler zentraler zellulärer Prozesse wie Zellzyklusregulation, Transkription, Signaltransduktion, Rezeptorlokalisations- und -aktivität, Antigenpräsentation oder Endozytose (31, 32).

2004 wurden A. Hershko, A. Ciechanover und Irwin Rose für die Erforschung der Grundlagen der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation der Nobelpreis für Chemie verliehen (33).

Das UPS beinhaltet Enzyme, die Zielproteine ubiquitinieren oder deubiquitinieren und den 26S-Proteasom-Komplex, welcher die gekennzeichneten Proteine degradiert. Die Ubiquitinierung erfolgt über eine enzymatische Übertragung von Ubiquitin auf die Aminosäure Lysin des Zielproteins. Es entsteht dabei eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe des Lysins. Für diese Reaktion sind drei verschiedene Enzyme nötig: E1 aktiviert ATP-abhängig den C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend temporär an E2, ein Ubiquitin-carrier-Protein, gebunden, und als letzten Schritt durch E3, eine Ligase, auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins übertragen (30).

Zielproteine können an einem oder mehreren Lysinresten durch Mono- oder Polyubiquitinierung modifiziert werden, wobei Länge und Konfiguration der Ubiquitinketten über das Schicksal des Proteins entscheiden. Typischerweise werden Polyubiquitinketten über das Lysin an der 48. Stelle der Aminosäuresequenz (K48) des Ubiquitins verbunden. Die K48 Polyubiquitinierung gilt als Zielsetzungssignal der Degradation über das 26S-Proteasom. Das Zielprotein bindet an den 26S-Komplex und wird proteolytisch degradiert. Alternativ sind Polyubiquitinierungen an Lysin K11, K29 und K63 möglich, wodurch andere Funktionen und Ziele als die proteasomale Degradation für das markierte Protein festgelegt werden (30). K63-verlinkte Polyubiquitinierungen spielen eine Rolle bei der DNA-Reparatur, in der Regulation von Translationsvorgängen und der Endozytose und verfügen vermutlich auch über einen proteinstabilisierenden Effekt, durch den Proteine von der proteasomalen Degradation bewahrt werden (34). Außerdem gilt eine K63-Polyubiquitinierung als

Zielsetzung für den Abbau eines Proteins über den lysosmalen Degradationsweg. (35).

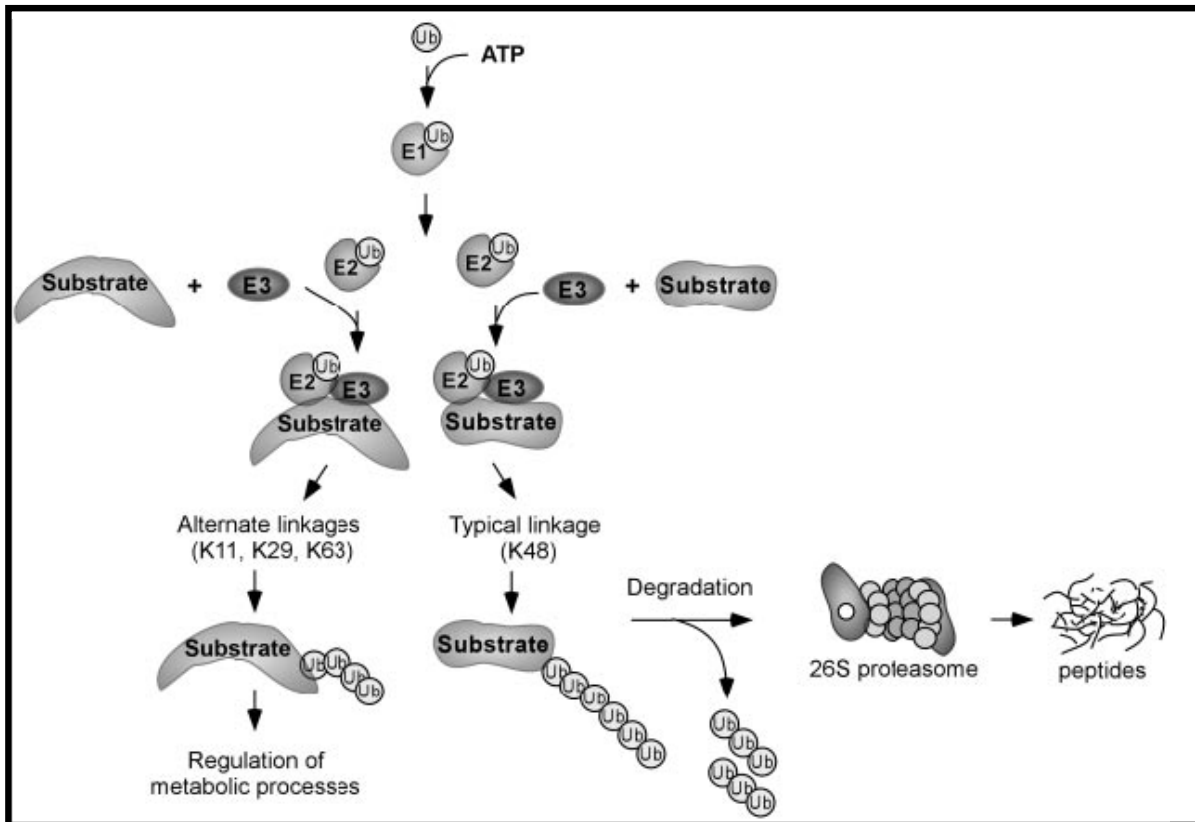


Abb. 3: Ubiquitin-Proteasom System (31) Die Mehrheit der Polyubiquitinierungen erfolgt über das Lysin 48 (K48) und führt zum Abbau des polyubiquitinierten Proteins im Proteasom. Alternative Polyubiquitinierungen an K11, K29 oder K63 regulieren dagegen Zellzyklusprozesse wie Apoptose oder DNA-Reparatur.

Nicht nur Polyubiquitinierungen, auch die Konjugation mit Monoubiquitin stellt eine zentrale regulatorische Modifikation dar und ist vergleichbar mit einer Phosphorylierung. Durch Monoubiquitinierung werden Aktivität und Lokalisation zellulärer Proteine reguliert und sie dient als Signal für die Internalisierung von Oberflächenproteinen und von membranständigen Rezeptoren über den Endozytoseweg, der auch in den lysosmalen Degradationsweg führen kann (35, 36).

Neben dem Energie-abhängigen Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System, welches K48-verlinkte polyubiquitinierte Proteine degradiert, können viele Moleküle und zelluläre Bestandteile auch intrazellulär durch Lysosomen abgebaut werden. Dieser Prozess wird als Autophagie bezeichnet. Es existieren drei verschiedene Formen der Autophagie, die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperone-mediated Autophagie (CMA). Bei der Mikroautophagie werden abzubauenende Bestandteile direkt von Lysosomen eingeschlossen, bei der CMA werden markierte Proteine durch heat shock cognate Proteine (hsc) erkannt und zu den Lysosomen transportiert. Dort werden sie über ein lysosomales Membranprotein, Lamp-2, erkannt und degradiert. Die Makroautophagie ist die bislang am intensivsten

erforschte Form der Autophagie (37). Die durch K63-Polyubiquitinierung für den Abbau durch Autophagie markierten Proteine werden von einer doppelten Membran umschlossen und es bildet sich ein Autophagosom. Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert mit einem Lysosom zu einem Autophagolysosom, in dem anschließend die Degradation der Proteine und der inneren Membran des zuvor gebildeten Autophagosoms stattfindet. Für diesen mehrschrittigen Prozess sind verschiedene Proteine, unter anderem p62 und LC-3, notwendig. Das Protein LC-3 kommt in zwei Formen vor. Das zytosolisch vorliegende LC-3I wird durch die Bindung an Phosphatidylethanolamin zu LC-3II umgewandelt, welches zur Fusion der Membran von Autophagosomen mit Lysosomen notwendig ist. LC-3II wird anschließend nach Fusion der Lysosomen mit Autophagosomen von lysosomalen Hydrolasen degradiert. LC-3II dient somit als Marker für die Bildung von Autophagolysosomen. Ein Anstieg an LC-3II zeigt Mangelsituationen der Zellen, die zu verstärkter Autophagie führen, an. Durch die Abnahme von LC-3II wiederum lässt sich die späte Autophagieperiode beurteilen, in der es zum Abbau von LC-3II im Lysosom kommt. (38).

Eine Alternative zur Darstellung der Autophagie ist die Messung der Degradation von p62. Das Protein p62 ist ein K63-Ubiquitin- und LC-3- bindendes Protein. Es dient nach Bindung an K63 als Bindungssignal für LC-3, welches das Signal für die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom darstellt. Nach dem Transport mit ubiquitinierten Proteinen (39) in das Lysosom dient p62 dort als selektives Substrat der Autophagie (40). Wird die Autophagie einer Zelle gehemmt, kommt es folglich zur Akkumulation von p62 (39). Außerdem wurde p62 als Bestandteil von Einschlusskörperchen identifiziert (39), wie sie vor allem bei humanen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson vorkommen, und deren Entstehung mit veränderter Funktion der UCH-L1 in Verbindung gebracht wird.

Lysosomen, als alternativer Degradationsort zum UPS, sind 0,2 – 2 µm kleine Zellorganellen, die von einer einfachen Membran umhüllt werden. Lysosomen setzen sich aus etwa 120 verschiedenen Membranproteinen und löslichen sauren Hydrolasen wie Glykosidasen, Proteasen, Phosphatasen, Lipasen oder Nukleasen zusammen, die ihre optimale Wirkung bei saurem pH entfalten. Primäre Lysosomen entstehen durch Abschnürung aus dem Golgi-Apparat (41); durch Fusion mit verschiedenen intrazellulären Vesikeln wie Endosomen, Phagosomen oder die beschriebenen Autophagosomen, die Makromoleküle, Bakterien oder funktionslos gewordenen Zellorganellen enthalten, entstehen sekundäre Lysosomen oder Autophagolysosomen. In diesen findet anschließend der hydrolytische Abbau statt.

Den größten Anteil mit über 50% aller lysosomalen Membranproteine bilden die Proteine Lamp -1 und -2 (lysosomal associated membrane proteine) und Limp-1 und -2 (lysosomal integral membrane proteine) (42). Es handelt sich dabei um transmembranäre und stark N-glykolisierte Proteine, die ubiquitär an der Oberfläche der Lysosomen exprimiert werden. Ein Knock out von Lamp-2 geht mit einer erhöhten postnatalen Letalität und der Akkumulation von Autophagosomen einher

(43). Lamp-2 spielt auch eine wichtige Rolle in der lysosomalen Stabilität und bei der Reifung und Fusion der Lysosomen mit (Auto)Phagosomen. Es dient außerdem als Rezeptor für die Chaperon-vermittelte Autophagie (44). Fehlt Lamp-2 kommt es zur Akkumulation von LC-3. Lamp-2 dagegen spielt eine Rolle als Rezeptor bei der M6P-unabhängigen Sortierung von lysosomalen Proteinen (45). Ein Fehlen von Lamp-2 führt in Mäusen zu einer Obstruktion des Urogenitaltraktes, Taubheit und Neuropathie (42).

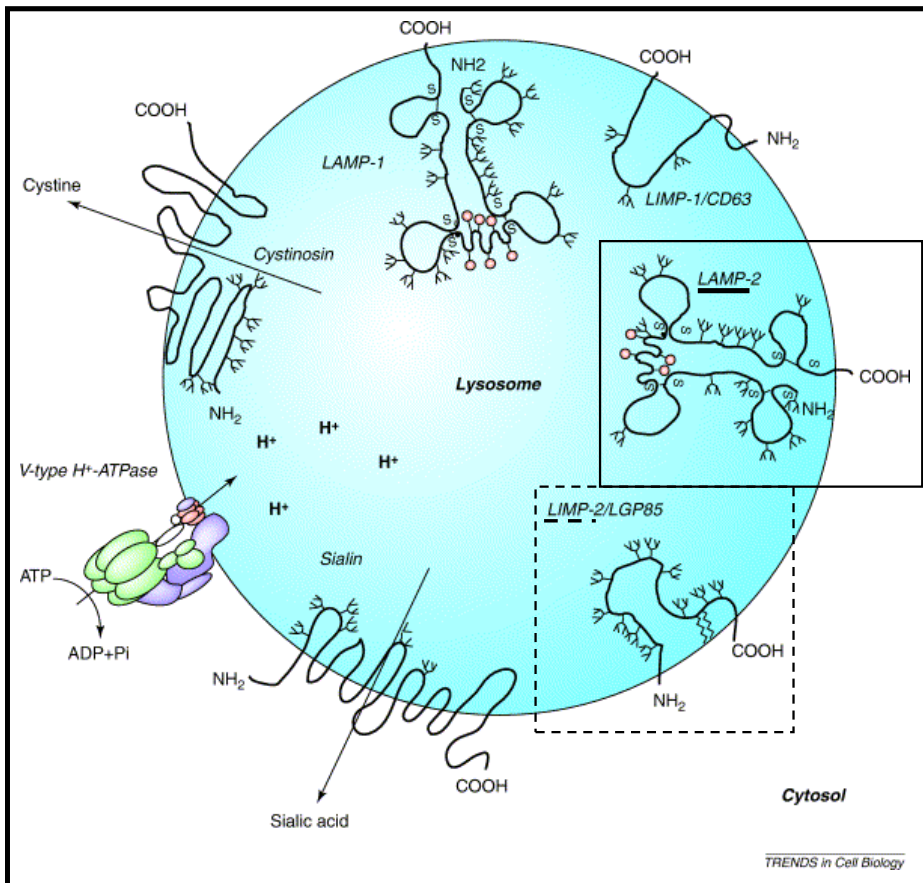


Abb 4: Darstellung eines Lysosom mit den häufigsten lysosomalen Membranproteinen, hervorgehoben dabei Lamp-2 und Limp-2 (42) durchgezogener Rahmen zeigt die Struktur von Lamp-2; gestrichelter Rahmen zeigt die Struktur von Limp-2

Ursprünglich wurden das UPS und das lysosomale/Autophagie-assoziierte System als voneinander unabhängige Systeme der Proteindegradation angesehen. Aufgrund neuerer Daten scheint jedoch ein Zusammenhang der Autophagie und der proteasomalen Proteindegradation sehr wahrscheinlich (46). Beispielsweise reicht die alleinige Überexpression von p62 bei sonst normalen Zellen aus, um einen inhibierenden Effekt auf das UPS auszulösen (46). Auch konnte nachgewiesen werden, dass ein wichtiges deubiquitinierendes Enzym des UPS, die UCH-L1, direkt mit dem lysosomalen Membranprotein Lamp-2 interagiert (44).

1.4 Die Ubiquitin-C-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1)

Wie andere posttranslationale Modifizierungen ist auch die Ubiquitinierung als Zielsetzungssignal für die Proteolyse von Proteinen ein reversibler Prozess. Durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) ist eine Abspaltung des Ubiquitins von Proteinen möglich. Die deubiquitinierenden Enzyme werden in zwei Klassen unterteilt: die kleinen Ubiquitin-C-terminalen Hydrolasen (UCHs) und die großen Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBPs) (47).

Das Enzym UCH-L1 gehört zu den C-terminalen Hydrolasen und ist auch bekannt unter dem Namen PGP9.5. Drei humane Isoenzyme wurden bisher kloniert (48).

UCH-L1 ist ein Protein aus 230 Aminosäuren und weist im Körper eine strenge gewebespezifische Verteilung auf. Das Protein wird vor allem in neuronalen Gewebe und während aller Stadien der neuronalen Entwicklung exprimiert. UCH-L1 ist mit 1-2% eines der am stärksten exprimierten löslichen Proteine im Gehirn von Säugetieren (49). Zudem findet sich UCH-L1 in Zellen des neuroendokrinen Systems (48). Darüber hinaus wird UCH-L1 in Ovarien (50), Testes (51) und Tumoren (Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom) (52, 53, 54,) exprimiert.

Bislang ist keines der spezifischen Substrate der UCH-L1 in vivo bekannt und auch nur wenig über die spezifische Aktivität des Enzyms in vivo. Durch ihre Hydrolaseaktivität ist UCH-L1 in der Lage freies Monoubiquitin zu generieren, das für weitere Konjugierungen verwendet werden kann. Die Hydrolaseaktivität verhindert auch die Akkumulation freier Polyubiquitinketten, die an den 26S Proteasom-Komplex binden können und dadurch die Proteolyse behindern. Zusätzlich besitzt UCH-L1 die Fähigkeit in vitro Homodimere zu bilden. Verbunden mit dieser Dimerisierung ist die Entstehung einer Ligaseaktivität, die zur Verkettung von Ubiquitinmonomeren an K63 führt (55), wodurch der Monoubiquitingehalt der Zelle verkleinert werden kann. Außerdem ist eine Beteiligung der UCH-L1 am Recycling von freiem Ubiquitin aus ubiquitinierten Peptiden, die aus der proteasomalen Degradation stammen, bekannt (55).

Unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität besitzt UCH-L1 in vivo eine monoubiquitin-stabilisierende Wirkung (56). Somit ist das Enzym UCH-L1 in der Lage über gegenläufige enzymatische Aktivitäten den Ubiquitingehalt in den Zellen zu regulieren. In einer Mehrzahl von Tumoren konnte eine Hochregulation der UCH-L1 gezeigt werden (57, 58). Ob diese Hochregulation bei Tumoren eine Antwort auf oder die Ursache des Tumorwachstums ist, ist noch unklar.

Im Gehirn konnte gezeigt werden, dass eine Modifizierung oder Herabregulation der UCH-L1 mit der Entwicklung von Alzheimer und Parkinson assoziiert ist (59). Die UCH-L1 moduliert zudem die neuronale Morphologie und ihre Expression nimmt bei neuronaler Differenzierung zu. Durch Knock-out der UCH-L1 in Mäusen kommt es zu einem Verlust der Struktur und Funktion der neuromuskulären Endplatte und als Ergebnis zu einer Neurodegeneration des peripheren Nervensystems mit letalem

Ausgang (60). Da Neuronen und Podozyten große morphologische und biochemische Ähnlichkeiten aufweisen (61), ist es möglich, dass UCH-L1 auch in der Nierenentwicklung eine Rolle spielt.

In der humanen und in der Rattenniere konnte gezeigt werden, dass UCH-L1 in tubulären Epithelzellen in Sammelrohren und in Parietalzellen exprimiert wird (62, 63). In den Parietalzellen der Ratte wurde UCH-L1 als spezifischer Marker beschrieben (62). Eine Rolle von UCH-L1 in der Nierenentwicklung, in der Zelldifferenzierung von wachsenden Nierentubuli und in der Zellzyklusregulation wird aufgrund von Studien an Nierenzellen und Tiermodellen mit Nierenerkrankungen vermutet (63). Im ausdifferenzierten, gesunden Glomerulus dagegen wurde bisher keine UCH-L1 Expression in Podozyten beobachtet. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch eine Neuexpression von UCH-L1 im Podozyten bei bestimmten glomerulären Erkrankungen, wie bei der membranösen Glomerulonephritis, nachweisen (64). Auch scheint UCH-L1 eine wichtige Rolle bei der Ausdifferenzierung der Podozyten zu spielen (64).

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Ziel dieser Promotion ist es, die Rolle von UCH-L1 für den podozytären Phänotyp und die Proteindegradation zu untersuchen und zu klären, ob eine UCH-L1 Hemmung den Podozytenschaden und damit den Verlauf der membranösen Glomerulonephritis beeinflusst.

UCH-L1 ist ein Schlüsselenzym des Ubiquitin-Proteasom-Systems und reguliert den Monoubiquitinpool und damit die Degradation von Proteinen. Das Enzym steuert die morphologische und funktionelle Differenzierung von Neuronen und reguliert in Tumorzellen die Proliferation und Apoptose. Die morphologischen Ähnlichkeiten von Neuronen und Podozyten lassen eine Beteiligung von UCH-L1 an der Podozytenentdifferenzierung bei der membranösen Glomerulonephritis durch eine Beeinflussung der podozytären Proteindegradation vermuten. Eine Beeinflussung der podozytären Proteindegradation und Entdifferenzierung könnte den Verlauf der Erkrankung abmildern.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollen folgende Fragestellungen durch diese Arbeit weiter erläutert werden:

1. Beeinflusst eine stabile UCH-L1 Überexpression, ein stabiler UCH-L1 Knock down oder eine UCH-L1 Hydrolasehemmung in Kultur die podozytäre Differenzierung und das Proliferationsverhalten von Podozyten?
2. Beeinflusst eine stabile UCH-L1 Überexpression oder ein stabiler UCH-L1 Knock down die podozytäre Proteindegeneration über das Ubiquitin-Proteasom-System oder das Autophagosomale-/lysosomale System?
3. Verhindert oder verringert eine UCH-L1 Hemmung den podozytären Schaden in vivo in der Passiven Heymann Nephritis?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti-β-Aktin	Maus	Westernblot	1: 3000	Sigma
Anti-Ezrin	Maus	Westernblot	1: 2000	Sigma
Anti-K63-Ubiquitin	Kaninchen	Westernblot	1: 1000	Millipore
Anti-LC-3	Kaninchen	Westernblot	1: 1000	Cell Signalling
		Immunfluoreszenz	1: 50	
Anti-Lamp2	Ratte	Westernblot	1: 1000	Sigma
		Immunfluoreszenz	1:100	
Anti-Limp2	Kaninchen	Westernblot	1: 2000	P.Saftig
		Immunfluoreszenz	1: 100	
Anti-p62	Meerschweinchen	Westernblot	1: 1000	Progen
		Immunfluoreszenz	1: 50	
Anti-Ubiquitin	Maus	Westernblot	1: 250	Millipore
		Immunfluoreszenz	1: 50	
Anti-UCH-L1	Kaninchen	Westernblot	1:1000	Chemicon
		Immunfluoreszenz	1: 50	Abcam

Anti-Kollagen Typ IV	Ziege	Immunfluoreszenz	1: 200	SouthernBiotech
Anti-β-5	Kaninchen	Westernblot	1: 5000	X. Wang

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper für Immunfluoreszenz und Westernblot

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konjugation	Verdünnung	Hersteller
Anti-Meerschweinchen	Esel	HRP	1: 20 000	Jackson Immunoresearch
Anti-Maus	Esel	Biotin	1: 100	Jackson
Anti-Maus	Esel	HRP	1: 40 000	Jackson
Anti-Maus	Esel	Cy2	1: 100	Jackson
Anti-Kaninchen	Esel	HRP	1: 10 000	Jackson
Anti-Kaninchen	Ziege	Biotin	1: 100	Jackson
Anti-Ratte	Esel	HRP	1: 15 000	Jackson
Anti-Ratte	Esel	Biotin	1: 100	Jackson
Anti-Ziege	Esel	Cy2	1:100	Jackson

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz und Westernblot

3.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
ABC- AP- Kit	Vector
Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma
Alexa Fluor 568 Phalloidin	Invitrogen

Material und Methoden

Aqua ad iniectabilia	Braun
ApoTagPeroxidase	Millipore
Avidin- Biotin- Blocking Kit	Vector
Caliculin A	Merck
Complete 25x	Merck
DAPI Vectashield Hard Set Mount	Vector
Dimethylsulfoxid	Sigma
Diothiothreitol	Sigma
ECL-Chemilumineszenz-Entwicklungslösung	Pierce
Ethanol 100%	J.T. Baker
Epoxomycin	Calbiochem
FITC- Avidin	Vector
Fluoromount	SouthernBiotech
Formalin	Merck
Gel Code Blue Stain Reagent	Pierce
Glycin	Roth
Goatserum	Vector
Hämatoxylin	Serva
HCl 1N	Merck
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
Interferon γ	PeptoTech
Isofluran	Abbot
Isopropanol	Fluka
Magermilchpulver	Spinnrad
Methanol	Roth
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Serva
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck
Naphtol- AS- Bisphosphat	Fluka

Material und Methoden

Natriumacetat 3M	Merck
Natriumacid	Serva
Natriumchlorid	Serva
Natriumcitrat x 2 H ₂ O	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumfluorid	Merck
Natriumjodat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Merck
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck
Natriumvanadat	Merck
Neufuchsin	Serva
Ovalbumin	Sigma
Paraformaldehyd (16%)	Electron Microscopy Sciences
Perjodsäure	Merck
Pferdeserum	Vector
Phosphokreatin	Sigma
Phosphokreatinkinase	Calbiochem
Protease XIV	Sigma
Proteasomsubstrat Suc-LLVY-AMC	Calbiochem
Reagenz A+B, Protein Assay	BioRad
Reverse Transkriptase	Qiagen
Schiffsches Reagenz	Sigma
Superblock blocking reagent	Pierce
Tissue freezing medium	Jung
T- Per Tissue Protein Extraction Reagent	Pierce
Topro	Invitrogen
Tris	Sigma
TritonX 100	Sigma
TSA- Kit	NEN life science

Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma
Xylol	Th. Geyer GmbH & CoKG

Inhibitoren

LDN 57444	Calbiochem
MG 132	Calbiochem
Pepstatin A	Merck

3.1.3 Material

Blotkammer (Novex Mini Cell)	Invitrogen
Deckgläschen (13 mm)	Roth
Deckgläser (24x32mm, 24x60mm)	Marienfeld
Minipumpen	Alzet
FlexiPerm	Greiner
Fettstift	Dako
Gelkammer	Peqlab Biotechnology GmbH
Gummisirup	WTW
NuPage 4-12% Bis- Tris- Gel	Invitrogen
Petrischalen	Sarstedt
Platte - (96-wells)	Sarstedt
PVDF- Membran (Immobilon)	Millipore
Rattenurin- Albumin- ELISA (Nephrat)	Exocell Inc.
Röntgenfilm (Super RX)	Fuji
Schwämme	Invitrogen
Siebe (53 µm)	Retsch
Siebe (90 µm)	Retsch

Skalpelle	Braun
Urin- Stix (Multistix 10SG)	Siemens
Whatman- Filterpapier	Schleicher & Schuell

Immortalisierte Podozyten

Konditional immortalisierte Podozyten	Prof. K.H. Endlich
---------------------------------------	--------------------

Zellkulturmedium

RPMI- 1640 + 10% FCS + 10mmol/l HEPES + 1mmol/l NaP

500 ml	RPMI-1640 (mit 300 mg/l L-Glutamin)	Gibco
50 ml	FCS	Gibco
7,5 ml	HEPES	Gibco
5 ml	Natriumpyruvat	Gibco
5 ml	Penicillin/Streptomycin	Gibco
	Interferon γ	PeptoTech

Zellkultursubstanzen und Materialien

Kulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Neubauer- Zählkammer	Optik Labor
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Lonza
RPMI- 1640 mit L- Glutamin	Gibco
Trypsin- EDTA (0,5%)	Gibco

Versuchstiere

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

Mikroskope

Lichtmikroskop (Axioskop 40)	Zeiss
Inverses Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss

Inverses Mikroskop (IM 35)	Zeiss
Konfokales Mikroskop (LSM 510 β)	Zeiss

Software

Adobe Illustrator	Adobe
Adobe Photoshop	Adobe
Excel	Microsoft
Windows XP	Microsoft
PRISM	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
Fluoreszenzspektrometer Mithras LB 940	Berthold Technology
Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnology
Heizblock (Neoblock 1)	Neolab
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Gefrierlschrank -20°C	Privileg
Gefrierschrank -80°C	Privileg
Magnetrührer (Variomag Maxi)	Komet
Mikrowelle (Microwave 800)	Severin
Mikrowelle	Bosch
Nanodrop Spektrophotometer (ND 1000)	Nanodrop Technologies
Netzgerät	Pharmacia Biotech
PC	LG

pH- Meter (Inolab)	WTW
PlateReader EI 808	Dynatech Laboratories
Pipetten	Sarstedt
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 + Proteinbestimmung

1 x Complete Protease- Inhibitor- Cocktail (25x)

1 mM Natriumvanadat

1 mM Natriumfluorid

5 µg/ml Epoxomycin

1 mM Caliculin A

ad TPER (bis zur gewünschten Menge an Lysepuffer)

Morpholinoethansulfonsäure- Puffer (MES) 20x

50 mM MES

50 mM Tris Base

0,1 % SDS

1 mM EDTA

ad 1 l H₂O

Morpholinopropansulfonsäure- Puffer (MOPS) 20x

50 mM MOPS

50 mM Tris Base

0,1 % SDS

1 mM EDTA

ad 1 l H₂O

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	

TBS- Puffer

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

TBST- Puffer

0,05 %	Tween 20
in TBS	

TE – Puffer

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
ad	1 LH ₂ O

TNT- Puffer

6,35 g	Tris
9 g	NaCl
25 ml	1 M HCl

1 g Tween 20
1025 ml H₂O

Waschpuffer für ELISA

0,1 % Tween 20
in PBS

Waschpuffer für Glomeruliisolation

0,5 % BSA
in PBS

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 H₂O
10 g Aluminiumkaliumsulfat x 12 H₂O
0,1 g Natriumjodat
0,5-1 g Hämatoxylin
10 g NN- Dimethylformamid

Neufuchsin- Lösung

0,3 g	Natriumnitrit
7,5 ml	H ₂ O
300 ul	Neufuchsin- Stammlösung
800 ul	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 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden mit konditional immortalisierten, murinen Podozytenzelllinien durchgeführt, die freundlicherweise von Herrn Professor Dr. K. H. Endlich, Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt wurden. Da es sich bei Podozyten um terminal differenzierte und teilungsunfähige Zellen handelt, die in Kultur nicht propagiert werden können, wurden aus Immorto Mäusen primär Glomeruli isoliert und daraus konditionell immortalisierte Podozytezelllinien generiert. Dadurch wurde ein Arbeiten mit Podozyten in Zellkultur möglich (65). Die Immorto Mäuse sind Träger einer temperatur-sensitiven (ts) Mutante des immortalisierenden SV40 T-Antigens. SV40 (Simian Virus) führt zur Expression von SV40 T-Antigen. Dies hemmt die Funktion von p53 und des Tumorsuppressorproteins RB und ermöglicht damit die Proliferation der Zellen (66). Die Funktion von SV40 T-Antigen kann durch einen Interferon- γ -induzierbaren H-2Kb-Promotor kontrolliert werden (65) Unter permissiven Bedingungen weisen diese Podozyten einen undifferenzierten Phänotyp auf und proliferieren. Unter nicht-permissiven Bedingungen stellen sie die Proliferation ein und differenzieren aus, was sich durch morphologische Veränderungen wie Fortsatzbildung oder Expression spezifischer Marker differenzierter Podozyten, wie Synaptopodin oder Podocin auszeichnet (siehe 3.2.1.2.).

3.2.1.1 Transfektion der immortalisierten Podozyten

Murine immortalisierte Podozyten, sowohl undifferenziert als auch differenziert, exprimieren im Gegensatz zu humanen ausdifferenzierten Podozyten UCH-L1. Zur Analyse der Rolle der UCH-L1 in vitro wurden durch Transfektion der immortalisierten murinen Podozyten polyklonale stabile Zelllinien generiert, die eine Überexpression oder einen Knockdown des Enzyms UCH-L1 zeigen.

Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der Transfektion der in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien handelt es sich um eine stabile Transfektion. Genetische Information in Form von rekombinanten Plasmiden wird durch Viren, die als Vektoren dienen, dauerhaft in das Genom der Zielzellen eingebracht.

Für die Generation der UCH-L1 überexprimierenden Zelllinie wurde zunächst aus murinen Podozyten die komplette RNA extrahiert und durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der Abschnitt der cDNA, der für das Enzym UCH-L1 kodiert, wird als UCH-L1 coding sequence (CDS) bezeichnet. Durch PCR (Phusion Polymerase, Finnzymes) wurde dieser Abschnitt vervielfältigt und in dem retroviralen murinen Stammzellvektor pMSCV puro Expressionsvektor kloniert. Als Klonierung bezeichnet man ein molekulargenetisches Verfahren zur Vermehrung und Expression von rekombinanter DNA (Vektor mit integriertem DNA-Fragment) in einem geeigneten Wirtssystem. In dieser Arbeit wurde das pMSCVpuro mUCH-L1

Plasmid in E.coli Bakterien eingebaut. Die Selektion derjenigen Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden, erfolgte durch ein im Plasmid enthaltenes Antibiotikaresistenzgen gegen Ampicillin und dementsprechend durch Wachstum auf Ampicillin-haltigen Agarplatten.

Die Generation stabiler UCH-L1 knockdown Zelllinien erfolgte über die Herstellung stabiler shRNAs (single hairpin RNA) auf Grundlage von drei shRNA Sequenzen (entworfen von Dr. C Meyer-Schwesinger, Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), die nach Transfektion in Podozyten durch Anlagerung an bestimmte Stellen der UCH-L1 mRNA einen stabilen Knockdown der UCH-L1 in der Zielzelle zeigen (Tabelle 3). Als Vektor für die Klonierung diente pLKO.1 puro. Die Herstellung des pLKO.1puro Plasmids erfolgte wie bei Moffat et al. (67) beschrieben. Die Klonierung und Selektion erfolgte entsprechend dem pMSCV puro UCH-L1 Plasmid durch Transformation in E.coli und Wachstum auf Ampicillin-haltigen Agarplatten. Die Plasmid-DNA der positiven Bakterienklone wurde anschließend extrahiert und auf mögliche Mutationen hin überprüft. Im Anschluss erfolgte die Transfektion der immortalisierten Podozyten durch retroviralen Gentransfer mit Hilfe von Verpackungszellen. Durch Transfektion dieser Verpackungszellen mit DNA/CaCl₂-Präzipitaten wurden die DNA-Plasmide in die Zellen eingebaut. Der Einbau des pMSCVpuro Plasmids erfolgte mit Hilfe von Phoenix ecotropic-Verpackungszellen in Retroviren (Sicherheitsstufe 1); das pLKO.1puro Plasmid wurde durch 293T-Verpackungszellen in Lentiviren (Untergruppe der Retroviren) eingebaut (Sicherheitsstufe 2). Anschließend erfolgte die Transfektion undifferenzierter Podozyten (Zielzellen), wobei der Infektionszyklus mit den Viren zwei Mal wiederholt wurde. Nach 24 h wurden die erfolgreich infizierten Zielzellen durch Zugabe von 1,5 µg/ml Puromycin in das Wachstumsmedium der Podozyten selektioniert, da diese durch das aufgenommene rekombinante Plasmid zusätzlich eine Puromycin-Resistenz erworben hatten.

RNA Name	Sequenzen (in 5` zu 3` Richtung)	
NM_011670_stealth_344	CGUCCUGAAACAGUUUCUGUCUGAA	Sense
NM_011670_stealth_344	UUCAGACAGAAACUGUUUCAGGACG	Antisense
NM_011670_stealth_627	GGGUAGAUGACAAAGUGAAUUUCCA	Sense
NM_011670_stealth_627	UGGAAAUUCACUUUGUCAUCUACCC	Antisense
NM_011670_stealth_817	CGUGGCUCUCUGCAAAGCAGCUUAA	Sense
NM_011670_stealth_817	UUAAGCUGCUUUGCAGAGAGCCACG	Antisense

Tabelle 3: Darstellung der verwendeten Oligonukleotide zu Generation der 3 verschiedenen shRNAs, die zum Knockdown der UCH-L1 in den pLKO.1 puro Vektor integriert wurden

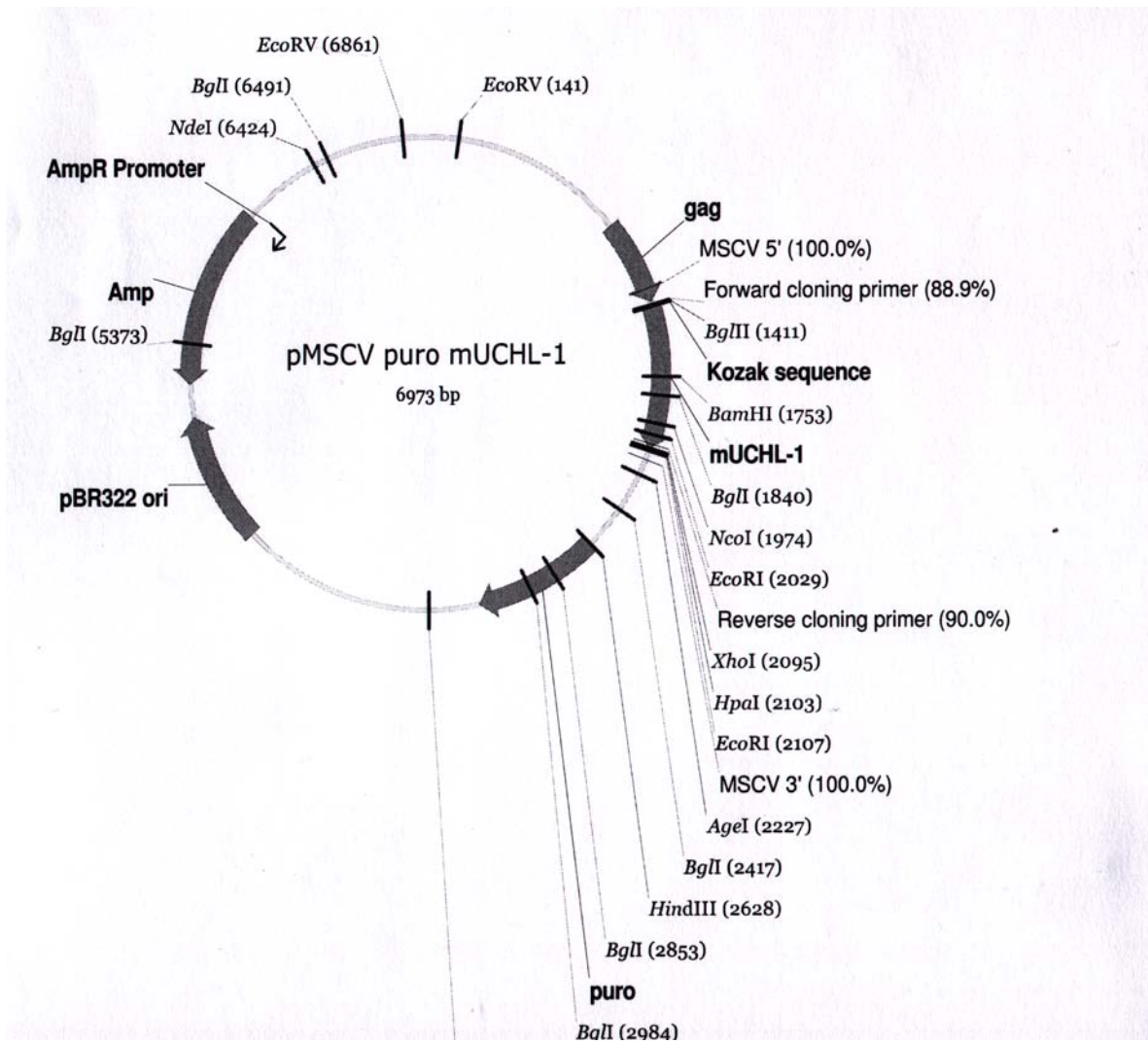


Abb. 5: Schematische Darstellung des pMSCVpuro mUCL-1 zur Generation UCH-L1 überexprimierender Podozyten

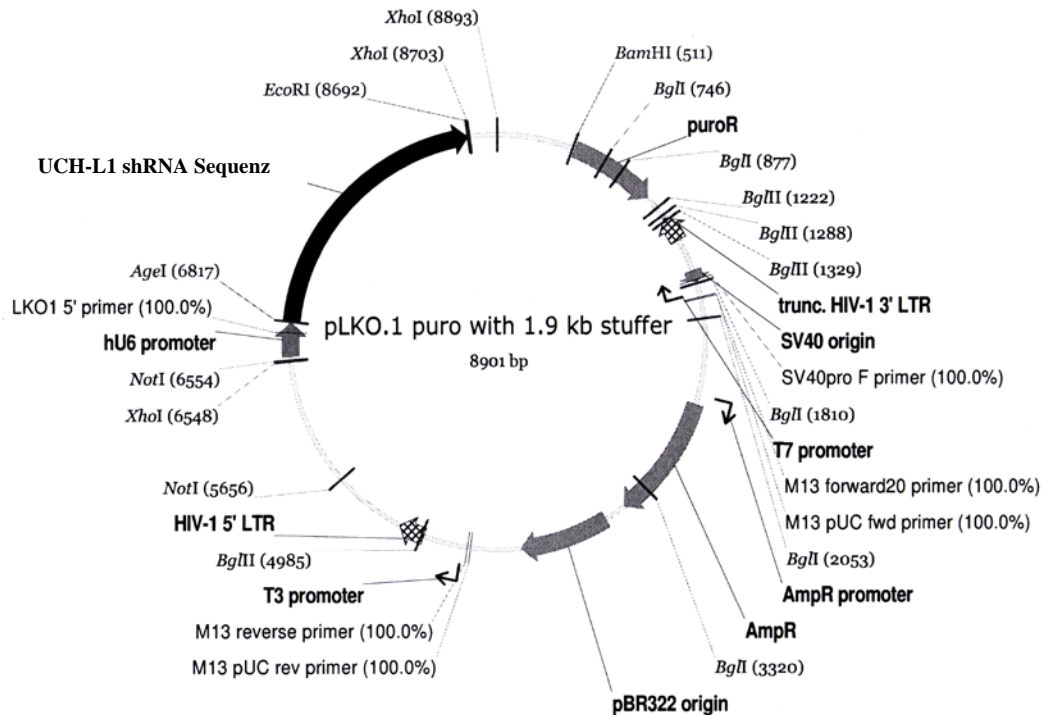


Abb. 6: Schematische Darstellung des pLKO.1 puro Vektors zur Generation von UCH-L1 Knockdown Podozyten

Für Negativ-Kontrollen aller Zellkulturexperimente wurden zu den UCH-L1-überexprimierenden und UCH-L1 Knockdown Podozyten entsprechende Kontrollzelllinien generiert. Der UCH-L1 überexprimierenden Zelllinie (in dieser Arbeit als „UCH-L1-OE“ bezeichnet) dienten „mock“ Podozyten, transfiziert mit einem pMSVC puro Leervektor ohne genetische Information, als Kontrolle. Zur Kontrolle der UCH-L1 Knockdown-Zelllinie (bezeichnet als „shRNA“) wurden Podozyten mit einem pLKO.1puro Plasmid transfiziert, welches für eine shRNA ohne sinnvolle Sequenz kodierte, so dass keine Anlagerung an die UCH-L1 mRNA, und somit kein Knockdown des Enzyms, stattfinden konnte.

Die Generierung der vorgestellten Zelllinien wurde freundlicherweise von Henning Sievert und Dr. Stefan Balabanov (Medizinische Klinik I, Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) gemeinsam mit Dr. Cathérine Meyer-Schwesinger vor Beginn dieser Doktorarbeit durchgeführt.

Nachgewiesen und zwischen den Zellkulturexperimenten kontrolliert wurde die Überexpression bzw. der Knockdown der UCH-L1 in den transfizierten Podozyten durch Westernblotanalysen und Fluoreszenzfärbungen gegen das Enzym.

3.2.1.2 Kultivierung von immortalisierten Podozyten

Zunächst wurden die immortalisierten Podozyten unter permissiven Bedingungen kultiviert, (33°C, 5 % CO₂; Medium: RPMI 1640, 10 % fetalen Rinderserum, 10mmol/l HEPES, 1mmol/l Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin. Zusätzlich wurde dem Medium 10U/ml Interferon γ zugefügt, um die T-Antigen Expression und damit die Proliferation zu ermöglichen).

Die Kultivierung der Podozytenzelllinien wurde in unbeschichteten 75 cm², Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Medium durchgeführt. Alle 2-3 Tage wurde das Medium in den Flaschen gewechselt.

Morphologisch zeichneten sich die undifferenzierten Podozyten durch geringe Fußfortsatzbildung, wenig Zell-Zell-Kontakte und ein gleichmäßiges Wachstum, ähnlich einem Kopfsteinpflaster (68), aus.

3.2.1.3 Ausdifferenzieren der Podozyten

Die Mehrzahl der Zellkulturexperimente wurde mit terminal differenzierten Podozyten durchgeführt. Für die Ausdifferenzierung wurden die Zellen für mindestens 14 Tage unter nicht-permissiven Bedingungen (38°C und 5 % CO₂; Medium (s. 3.2.1.1) ohne Interferon γ) kultiviert. Die Abwesenheit von Interferon γ und die erhöhte Temperatur bewirkt eine Herunterregulation des tsSV40-T-Antigens, wodurch die Zellen die Proliferation einstellen und ausdifferenzieren. Ausdifferenzierte Podozyten weisen einen flachen, arborisierten Phänotyp aus. Fortsätze und Zell-Zell-Kontakte werden gebildet, was sich durch Expression von Fußfortsatzproteinen wie α -Aktinin-4 oder Synaptopodin nachweisen lässt. Die Zelldichte wurde während der Phase der Ausdifferenzierung unter 80 % gehalten, um eine Fortsatzbildung zu ermöglichen.

3.2.1.4 Passagieren der Zellen

Erreichten die Podozyten unter permissiven Bedingungen eine Konfluenz von 75 %-80 %, wurden sie zur Erhaltung der Zellkultur neu aufgeteilt und in neue Kulturflaschen überführt.

Das verbrauchte Medium wurde aus den Flaschen mittels Vakuumpumpe entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gespült, um Serumreste zu entfernen, die die anschließende Trypsinierung beeinträchtigen könnten. Pro Flasche wurden die Podozyten gleichmäßig mit 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA bedeckt und für etwa 2-3 min inkubiert. Trypsin löst die adhärenen Podozyten durch seine proteolytische Aktivität vom Flaschenboden ab, so dass eine Zellsuspension mit gelösten Podozyten entsteht. Um die Trypsinwirkung zu stoppen, wurden der Suspension 4 ml vorgewärmtes Medium mit FCS zugefügt und die Zellen auf neue vorbereitete Kulturflächen mit je 10 ml vorgewärmten Medium neu ausplattiert.

Podozyten, die unter permissiven Bedingungen kultiviert wurden, wurden in einem Verhältnis von 1:10 neu ausplattiert. Zellen, die unter nicht-permissiven Bedingungen kultiviert wurden, in einem Verhältnis von 1:3.

3.2.1.5 Zellzahlbestimmung in der Neubauer- Kammer

Um die exakte Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Wie beim Passagieren beschrieben (s. 3.2.1.3.), wurde zunächst eine Zellsuspension hergestellt und davon nach Durchmischung mit einer Pipette 10 μ l entnommen und vorsichtig auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden anschließend 4 große Quadrate ausgezählt und daraus der arithmetische Mittelwert gebildet. Der errechnete Wert entspricht der Zellzahl $\times 10^4$ /ml.

Um den Einfluss der UCH-L1 auf die Proliferation in vitro zu untersuchen, wurden die Podozyten nach exakter Zellzahlbestimmung in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro 10 ml Medium in neue Flaschen ausplattiert. Nach 72 h wurde erneut eine Zellzahlbestimmung durchgeführt und die verschiedenen Zelllinien mit ihrer jeweiligen Kontrollzelllinie verglichen. (UCH-L1 OE mit mock und shRNA mit der Kontrollgruppe „co“.)

3.2.1.6 Aussäen und Fixation von Podozyten auf Deckgläschen

Für die Aussaat der Zellen auf Deckgläser wurden Flexipermis mit 8 Kammern aus Silikon verwendet. Diese wurden vor Benutzung zunächst für 30 min in 70 % Alkohol desinfiziert und anschließend unter der Zellkulturwerkbank getrocknet, bevor sie mit leichtem Druck auf die Deckgläser gesetzt wurden.

Um die Kulturpodozyten auszusäen, wurden diese, wie unter 3.2.1.3. dargestellt, vom Flaschenboden gelöst und ein Teil der Suspension in einem sterilen FalconTube 1:100 mit Medium verdünnt. Mit einer 2 ml Stabpipette wurden die Wells der FLExiPerms mit der verdünnten Zellsuspension bis zu 2/3 gefüllt und in eine Petrischale gesetzt. Zum Absetzen der Podozyten auf dem Objektträger wurden die Petrischalen mindestens 24 h unter nicht-permissiven Bedingungen inkubiert.

Zur Fixation der Zellen auf dem Deckgläschen wurden 2 verschiedene Fixationslösungen verwendet. Die Verwendung war abhängig davon, welche Bestandteile der Zellen angefärbt werden sollten. Für die Anfärbung membran-gebundener Proteine oder des Zytoskeletts, wurden die Zellen mit einer Lösung aus 2 % Sucrose und 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert; bei Färbung von Bestandteilen des Zytosols wurde -20°C kaltes Methanol (100 %) verwendet, welches die Zellmembran zerstört und membran-gebundene Proteine löst. Nach Fixation mit Methanol ist auch eine Visualisierung des Zytoskeletts nicht mehr möglich.

Die Deckgläschen wurden mit je 1 ml der Fixierlösung für 10 min inkubiert, anschließend 3 x für 5 min mit PBS gespült und bis zur weiteren Verwendung für Färbungen bei 4°C in PBS gelagert.

3.2.1.7 Ernten von Zellen für weitere Experimente

Um Westenblotanalysen und Protein- oder DNA-Bestimmungen der Kulturpodozyten anzufertigen, wurden die Zellen geerntet und Pellets erstellt.

Dazu wurden Flaschen mit einer Konfluenz von 70 % herangezogen und die daraus erstellte Zellsuspension (s. 3.2.1.3.) wurde komplett in ein Falcontube überführt. Es folgte die Zentrifugation der Tubes für 5 min bei 4°C und 3500 rpm. Der entstandene Mediumüberstand wurde verworfen, das Zellpellet am Boden des Falcontubes mit 500 µl sterilem PBS gelöst und vollständig in ein vorgekühltes Eppendorftube gefüllt. Dieses wurde für 5 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2 Zellkulturexperimente

3.2.2.1 UCH-L1 Inhibition durch LDN57444 bei nicht transfizierten Podozyten

Um den Einfluss der UCH-L1 auf die Proliferation zu untersuchen, wurden Podozyten, deren UCH-L1-Expression nicht extern modifiziert wurde, mit unterschiedlich hoher Konzentration des spezifischen Hemmstoffs LDN 57444 inkubiert, der die Hydrolaseaktivität der UCH-L1 hemmt (69).

Für diese Experimente wurden 1×10^5 Podozyten pro Flasche ausplatiert. Dem Medium wurde anschließend LDN 57444 (gelöst in DMSO) in einer Endkonzentration von 0 µM (nur DMSO als Kontrollgruppe), 5 µM, 10 µM und 25 µM, hinzugefügt. Die Zellen wurden bei nicht-permissiven Bedingungen in Anwesenheit des Hemmstoffes oder DMSO alleine kultiviert. Nach 72 h wurde von allen Flaschen erneut eine Zellzahlbestimmung durchgeführt und die Gruppen untereinander verglichen.

3.2.2.2 Proteasom-Hemmung mit MG132

Das Zellkulturexperiment mit dem reversiblen Proteasomhemmstoff, MG132, sollte Auskunft darüber geben, ob es nach Proteasomhemmung, nicht nur in vivo, sondern auch in vitro zu einer UCH-L1-abhängigen vermehrten Bildung von Ubiquitinaggregaten kommt (70).

Differenzierte Podozyten mit über- oder fehlender UCH-L1-Expression und ihre jeweiligen Kontrollzellen wurden mit 2 µM MG132 für 8 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden Podozyten nur mit DMSO im Medium inkubiert, da MG132 in DMSO gelöst war. Die Aggregatbildung wurde per Westernblot und per Immunfluoreszenzfärbung gegen Ubiquitin analysiert.

3.2.2.3 Hemmung der Autophagie durch Pepstatin A

In differenzierten Podozyten wurde die Rolle der UCH-L1 auf die Proteindegradation über die Autophagie untersucht. Pepstatin A ist ein spezifischer Inhibitor saurer Proteasen und hat somit eine hemmende Wirkung auf die Hydrolyse innerhalb der Lysosomen und damit auch auf die Autophagie der Zellen. LC-3 ist ein Enzym, dessen Menge mit der Anzahl an Autophagosomen assoziiert ist, aber selbst durch

Autophagie abgebaut wird (40). Das Experiment mit Pepstatin A sollte Aufschluss über die tatsächlich in den Podozyten vorhandene Menge an LC-3 geben und darstellen, welchen Einfluss eine UCH-L1-Überexpression oder ein UCH-L1 Knockdown auf die Autophagie der Podozyten hat.

Differenzierte Podozyten mit Über- oder fehlender UCH-L1-Expression und ihre jeweiligen Kontrollzellen wurden mit 1 μ M Pepstatin A (gelöst in DMSO) oder mit DMSO alleine für 24 h inkubiert. Anschließend wurden Zellpellets erstellt und daraus Westernblotanalysen gegen LC-3 durchgeführt.

3.2.3 Die Passive Heymann-Nephritis

3.2.3.1 Induktion der PHN und Betreuung der Tierstaffel

Die Passive Heymann Nephritis wurde in 20 männliche Sprague-Dawley-Ratten induziert. (positives Votum der Ethikkommission Nr. 82/06).

Die Induktion der Erkrankung erfolgte gemäß dem Protokoll von Salant und Cybulsky (11).

Am Tag -1 und 0 erfolgte bei 10 Tieren die Injektion von 600 μ l und 900 μ l FX1A-Serum in die Schwanzvene, welches aus dem Serum eines mit FX1A immunisierten Schafes gewonnen wurde (s. 1.5). Die restlichen 10 Tiere dienten als Kontrolltiere (PI-Tiere) und erhielten Präimmunserum (PI) in gleicher Dosierung. Das PI-Serum wurde aus den Schafen generiert, bevor diese mit FX1A immunisiert wurden.

Am Tag 4 nach der Erkrankung wurden jeweils 6 Tieren der PI- und der FX1A-Gruppe subkutan eine osmotische Minipumpe in die Nackenfalte implantiert, die den spezifischen UCH-L1-Hemmstoff LDN 57444, gelöst in DMSO und Zellkulturmedium, enthielt und kontinuierlich eine Dosis von 40 μ g/Kg Körpergewicht/24 h freisetzte. Die verbleibenden 4 Tiere jeder Gruppe wurden nicht behandelt und dienten als Kontrolltiere zu den Tieren mit Pumpe. In Vorversuchen verhielten sich Tiere mit implantierten osmotischen Minipumpen, die ausschließlich DMSO sezernierten, wie unbehandelte Tiere.

Während der 20-tägigen Betreuung der Tierstaffel wurde der Urin der Tiere an den Tagen -2 (vor Induktion der Erkrankung), 3, 6, 12 und 17 (vor Organentnahme) gesammelt und hinsichtlich der Proteinurie kontrolliert. Die Uringewinnung erfolgte über Stoffwechsellkäfige. Außerdem wurden die Tiere zu Beginn der Staffel und vor der Organentnahme gewogen.

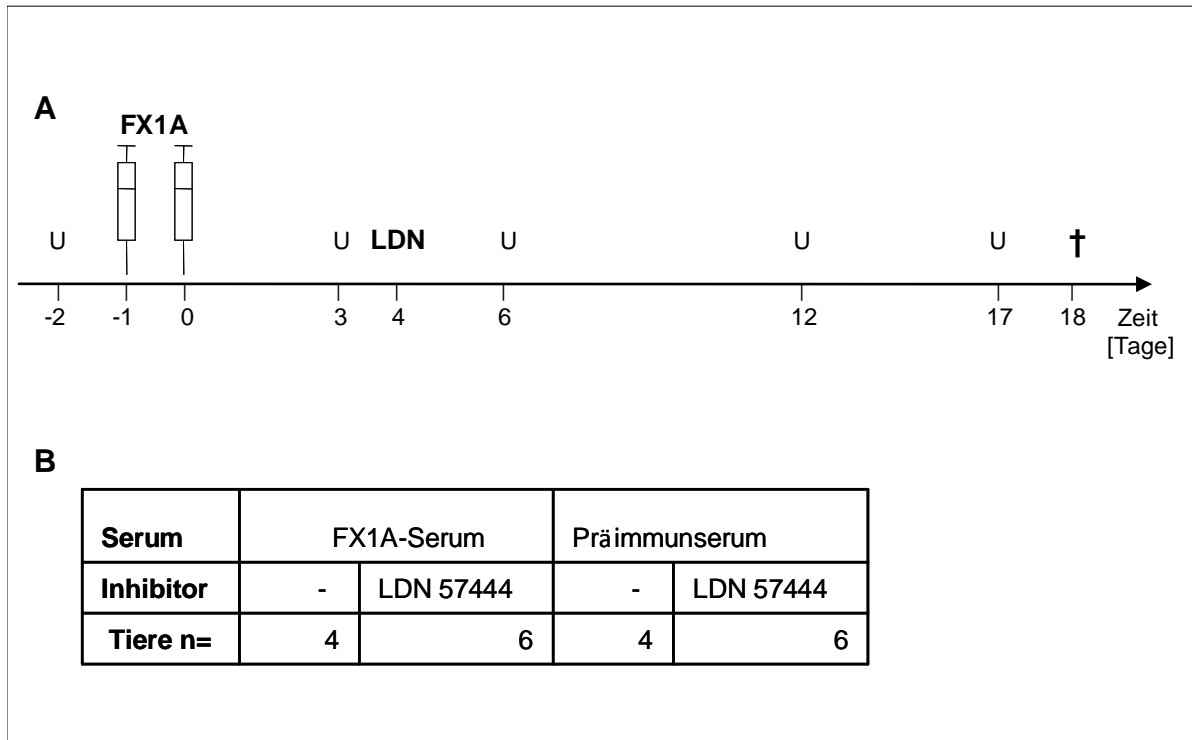


Abb. 7: Plan der Rattenstaffel:

FX1A= Induktion der PHN durch Injektion von FX1A-Serum, LDN = Implantation der Minipumpen mit dem spezifischen UCH-L1-Hemmstoff LDN57444, U = Urinentnahme, † = Organentnahme

3.2.3.2 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Am Tag 18 nach Induktion der Erkrankung erfolgte bei allen Tieren die Entnahme beider Nieren. Zunächst wurden die Ratten mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde der Bauch- und der Retroperitonealraum der Tiere eröffnet und die Aorta punktiert, um Blut für weitere Untersuchungen, wie Kreatinin- und Harnstoffbestimmung, abzunehmen. Anschließend wurden die Tiere intraaortal mit 150 ml PBS perfundiert, um das Blut aus den glomerulären Kapillarschlingen zu entfernen.

Die entnommenen Nieren wurden vor Ort gewogen und weiterverarbeitet. Je eine Nierenscheibe pro Versuchstier wurde für histologische Untersuchungen in 4% Formaldehydlösung eingelegt und nach 24 h in PBS umgebettet. Der restliche Teil der Nieren wurde für die Glomeruliisolation (siehe 3.2.3.3.) verwendet, die unmittelbar im Anschluss an die Organentnahme vorgenommen wurde.

3.2.3.3 Glomeruliisolation

Von den entnommenen Nieren wurde zunächst die Kapsel entfernt und die Niere in etwa 5 mm dünne Scheiben geschnitten ohne sie zu zerquetschen. Anschließend wurde der Nierenkortex, in dem sich die Glomeruli befinden, von der Medulla getrennt. Die Medulla wurde verworfen und die Rinde vorsichtig mit einem Skalpell in

feinste Stückchen gehackt und mithilfe eines Glaskolbens und unter Zugabe von Waschpuffer (PBS+ Epoxomycin) durch ein Sieb mit 90 µm Durchmesser gerieben. Dadurch wurden die Glomeruli und andere kleine Nierenbestandteile, welche die Maschen des Siebes passieren konnten, von größeren Fett- oder Bindegewebsresten getrennt. Die entstandene Suspension wurde dann auf ein Sieb mit 53 µm Durchmesser gegeben, so dass die Glomeruli zurück gehalten wurden und kleinere Bestandteile ausgewaschen werden konnten.

Die gewonnene Glomerulisuspension wurde bei 4°C und 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und 3 x mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Zum Abschluss folgte noch ein Waschschrift mit reinem PBS und das Schockgefrieren der Proben mit Flüssigstickstoff. Bis zur Verwendung für Westerblotanalysen wurden die Glomeruli bei -80°C gelagert.

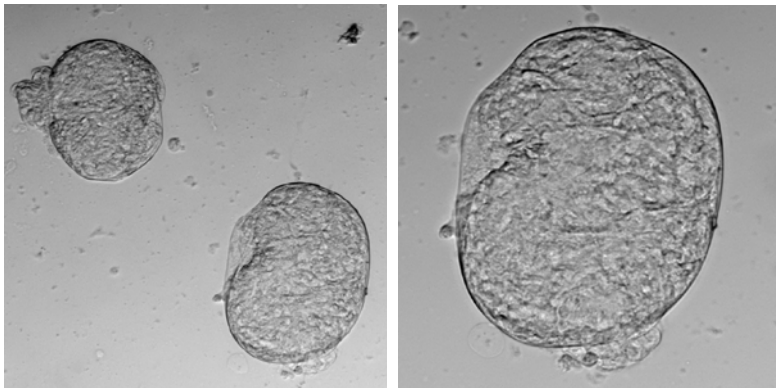


Abb 8:

Isolierte Glomeruli

In 10 facher und 40 facher
Vergrößerung

3.2.4 Fluoreszenz- und Immunhistologische Färbungen

Um bestimmte Proteine oder Zellbestandteile der Rattennieren oder der Podozyten nachzuweisen, wurden verschiedene Färbetechniken angewendet. Als Immunhistochemie, die in dieser Arbeit größtenteils verwendet wurde, wird eine Färbemethode bezeichnet, mit der Zellproteine mit Hilfe von Antikörpern detektiert und nachgewiesen werden können. Ein Primärantikörper bindet spezifisch an ein Epitop des nachzuweisenden Proteins (Antigen) und wird durch einen Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet ist, erkannt und gebunden. Der sekundäre Antikörper ist dabei mit einem Detektionssystem gekoppelt, wodurch das Antigen indirekt sichtbar gemacht werden kann. In dieser Arbeit wurden vorwiegend Fluoreszenzfarbstoffe als Detektionssystem eingesetzt, aber auch Enzyme, wie die alkalische Phosphatase, die Farbreaktionen katalysieren.

Außerdem wurden Antikörper-unabhängige Färbungen wie die PAS-Färbung oder Fluoreszenzfärbungen, die auf direkter Markierung eines Substrates mit einem Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) beruhen, angewendet, deren Mechanismen im entsprechenden Abschnitt erläutert werden.

3.2.4.1 Färbung von Gewebeschnitten der Tierstaffel

Um von den entnommenen Rattenieren Färbungen anzufertigen, wurden Paraffinschnitte erstellt. Dazu mussten die Gewebe zunächst in flüssiges Paraffin eingebettet werden. Anschließend wurden aus den erkalteten Paraffinblöcken 1-3 µm dicke Schnitte erstellt. Damit die Schnitte fest auf dem Objektträger haften, wurden diese über Nacht bei 40°C gebacken. Vor der gewünschten Färbung war es notwendig, die Gewebeschnitte durch Xylobäder für 3x5 min zu entparaffinieren. Anschließend wurden die Schnitte durch Ethanolbäder mit abfallender Alkoholkonzentration (100 %, 95 %, 75 % jeweils 2x für 5 min) rehydriert. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit dH₂O gespült.

3.2.4.1.1 PAS-Färbung von Gewebeschnitten der Tierstaffel

Die PAS-Färbung (Periodic Acid Schiff-Stain) ist eine histologische Färbetechnik, bei der vor allem kohlehydratreiche Zellkomponenten wie Muzin, Glykoproteine oder Glykogen sichtbar gemacht werden können. Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden zunächst für 1 min in 1 % Perjodsäure inkubiert, wodurch die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert wurden. Nach 2-3 min Spülen mit lauwarmem Leitungswasser, erfolgte die Inkubation mit Schiff'schem Reagenz für 40 min. Dabei bildet das in den Proben enthaltene schwefelsaure Fuchsin rötlich-violette Komplexe mit den vorher entstandenen Aldehydgruppen. Anschließend wurden die Schnitte erneut unter fließendem Leitungswasser für 5 min gespült. Um die Zellkerne besser darzustellen, wurde im Anschluss noch eine Hämalaun-Kernfärbung nach Böhmer durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte für 1-5 min in der Hämalaun-Lösung inkubiert und 1-5 Sekunden zum Differenzieren in HCL-Alkohol geschwenkt. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Gummisirup eingedeckt.

3.2.4.1.2 Kollagen Typ IV- Ubiquitin-Färbung der Rattennieren

Die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen Ubiquitin und Kollagen Typ IV diente der Darstellung von Ubiquitin, sowohl in Form von Mono- als auch von Polyubiquitin, und zur gleichzeitigen Visualisierung der Nierenstruktur durch Kollagen IV.

Bei dieser Färbung wurde die Streptavidin-Biotin-Methode als Verstärkungsschritt eingesetzt. Das bakterielle Protein Streptavidin besitzt durch 4 Biotin-Bindungsstellen eine hohe Affinität zu Biotin und damit für den biotinylierten Sekundärantikörper. Durch Koppelung des Streptavidin an FITC, ein Fluoreszenzfarbstoff, kann das Antigen indirekt sichtbar gemacht und das Fluoreszenzsignal verstärkt werden.

Zunächst erfolgte eine Antigendemaskierung durch Andau der deparaffinierten Schnitte mit der Protease XXIV für 15 min bei 37°C. Die Proteasereaktion wurde gestoppt, indem die Schnitte 2-3 x kurz in 100 % Alkohol getaucht wurden. Nach 3x 5 min Spülen mit H₂O wurden die Objektträger in 5 % Pferdeserum und Avidin (1:25) für 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach 2 x 2 min Spülen mit PBS, folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (Maus α-Ubiquitin 1:50, Ziege α-Kollagen Typ IV 1:200; jeweils gelöst in 5 % Pferdeserum mit Biotin

1:250) über Nacht. Nach 3 x 5 min waschen mit PBS wurde die Schnitte mit einem Cy3 gekoppelten anti-Ziege-Sekundäntikörper (gegen den Kollagen IV Primäntikörper gerichtet) und einem biotinylierten α -Maus-AK (gegen Ubiquitin), jeweils 1:100 in 5% Pferdeserum, inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min wurden die Schnitte noch mit Streptavidin FITC (1:100 in PBS) für 30 min inkubiert und nach einem letzten Waschgang (3 x 5 min mit PBS) mit Fluoromount (Southern Biotech) eingedeckt.

3.2.4.1.3 UCH-L1-Immunhistochemie der Rattenniere

Zur Darstellung von der UCH-L1 Neuexpression im erkrankten Podozyten wurde eine UCH-L1- Immunhistochemie der Rattennieren angefertigt.

Das bei dieser Färbung verwendete TSA-Kit (Tyramide Signal Amplification) dient als Signalverstärkung. Grundlage ist ein biotinyliertes Tyramid-Derivat, das von der Peroxidase (HRP) in ein reaktives Zwischenprodukt umgewandelt wird und Biotin anreichert. Das konjugierte Biotin kann anschließend durch AP(alkalische Phosphatase)-Streptavidin (ABC-Kit) detektiert werden. In dieser Färbung katalysiert das ABC-Kit die anschließende Neufuchsin-Reaktion und weist somit indirekt das Enzym UCH-L1 nach.

Zur Proteindemaskierung wurden die Schnitte in Citratpuffer pH 6,1 für 35 min in der Mikrowelle bei 680 W erhitzt und anschließend 10 min auf Eiswasser abgekühlt. Nach dem Waschen (2 x 5 min mit H₂O) folgte die Inkubation mit 3% H₂O₂ für 10 min bei RT, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Unspezifische Bindungen wurden nach einem Waschgang von 3 x 5 min mit H₂O durch Inkubation (30 min) mit 5 % Pferdeserum geblockt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht mit dem Primäntikörper bei 4°C inkubiert. Es folgte nach 2 x 5 min Waschen mit PBS die Applikation des biotinylierten Sekundäntikörpers in 5% Pferdeserum und nach 30 min die Inkubation mit Streptavidin-HRP 1:100 in TNB für 30 min bei RT. Nach einem weiteren Waschgang (3 x 5 min mit PBS) wurde die Schnitte für 8 min mit TSA inkubiert. Anschließend wurde erneut für 3 x 5 min mit PBS gewaschen und die Schnitte für 30 min bei RT mit Streptavidin-AP (ABC-Kit) inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte nach 3-5 minütigem Waschschrinen mit PBS und wurde dabei engmaschig kontrolliert. War das Ergebnis zufriedenstellend, wurde noch einmal für 3 x 5 min mit H₂O gespült und anschließend die Schnitte in HCl- H₂O für 20 min inkubiert, um ungebundenes Neufuchsin zu entfernen. Zuletzt wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun angefertigt (3.2.4.1.1), um die Zellkerne anzufärben. Abschließend wurden die Schnitte mit Gummisirup eingedeckt.

Die UCH-L1-Immunhistochemie wurde freundlicherweise von Frau Cathérine Meyer-Schwesinger (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) angefertigt.

3.2.4.2 Färbung kultivierter Podozyten

3.2.4.2.1 DAPI- und Phalloinfluoreszenzfärbung

Um die morphologischen Veränderungen der Podozyten beurteilen zu können, wurde das Aktinzytoskelett mit direkter Fluoreszenz durch mit Alexa 568 gekoppeltes Phalloidin dargestellt. Diese Fluoreszenzfärbung beruht nicht auf der Verwendung von Antikörpern, sondern auf der spezifischen Bindung des bityklichen Peptids Phalloidin, ein Toxin des Knollenblätterpilzes (*Amantadin phalloides*), an filamentäres Aktin (F-Aktin) der Zellen. Durch den an Phalloidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Alexa 589 kann F-Aktin mit Hilfe von UV-Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die mit PFA fixierten Zellen wurden zunächst für 3 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit Alexa Flour Phalloidin (1: 150 in PBS) bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde nochmals für 3 x 5 min mit PBS gewaschen und die Podozyten mit DAPI Hard Set Mount eingedeckt. Dies ist ein Eindeckmedium, das den unter UV-Licht blau leuchtenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI enthält, der sich an AT-reiche Regionen der DNA anlagert und somit die DNA im Zellkern anfärbt.

3.2.4.2.2 Immunfluoreszenz gegen UCH-L1

Zur Darstellung und zum Nachweis der Überexpression und des Knockdowns der UCH-L1 wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Podozyten gegen das Enzym angefertigt.

Die fixierten Zellen wurden zuerst für 15 min bei RT mit PBS+ 0,05% TX-100 permeabilisiert. Anschließend folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation für 30 min mit 5% Ziegen Serum. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (1:200 in Ziegen Serum) für 3 h inkubiert. Nach einem Waschgang von 3 x 5 min mit PBS+TX-100 wurde der Primärantikörper durch einen Cy2 gekoppelten Sekundärantikörper (Antikörper 1:200 verdünnt in 5% Ziegen Serum, dazu Alexa 589 Phalloidin 1:150, Inkubation für 30 min) detektiert. Alexa 589 Phalloidin wurde dazugegeben, um das Aktinzytoskelett darzustellen. Es folgte ein Waschgang von 3 x 5 min mit PBS. Um die Zellkerne der Podozyten anzufärben, wurde in dieser Färbung ToPro3 (1:2000 in PBS, Inkubation für 10 min) verwendet, da dieses am konfokalen Mikroskop, das für die Visualisierung dieser Färbung verwendet wurde, sichtbar gemacht werden konnte. Nach einem letzten Waschgang von 3 x 5 min wurden die gefärbten Objektträger mit Fluoromount eingedeckt.

3.2.4.2.3 Immunfluoreszenz gegen Ubiquitin

Durch die Anfärbung des Ubiquitins sollten Änderungen des Ubiquitinhaushaltes nach Behandlung der Podozyten mit dem Proteasomhemmstoff MG132 (8 h, 2 μ M im Medium) oder H₂O₂ (2 h, 2 mM) untersucht werden. Die Färbung wurde entsprechend der Immunfluoreszenz gegen UCH-L1 durchgeführt (siehe 3.2.4.2.2.). Der einzige Unterschied bestand darin, dass keine Zellkerne durch ToPro3 oder DAPI gefärbt wurden. Der Primärantikörper wurde 1:50 verdünnt verwendet, der Cy2 gekoppelte Sekundärantikörper 1:100.

3.2.4.2.4 Immunfluoreszenz der lysosomalen Proteine LIMP-2 und LAMP-2

Die folgenden Immunfluoreszenzen dienen der Bestätigung und Visualisierung der Ergebnisse der Westernblot-Analysen. Die Färbungen gegen die lysosomalen Proteine LIMP-2 und LAMP-2 wurden parallel und nach gleicher Anleitung angefertigt.

Die Podozyten, die mit -20°C kaltem Methanol fixiert wurden, wurden zuerst durch Inkubation mit PBS+0,05% TX-100 für 15 min bei RT permeabilisiert, bevor der Block unspezifischer Bindungen durch 5% Ziegen Serum für 30 min folgte. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert (LIMP-2 und LAMP-2 jeweils 1:100). Nachdem 3 x für 5 min mit PBS+TX-100 gewaschen wurde, folgte die Inkubation mit biotinylierten Sekundärantikörpern (gegen beide Proteine 1:100) für 30 min. Die Objektträger wurden erneut gewaschen und anschließend mit Streptavidin-FITC 1:100 in PBS für 30 min inkubiert. Die Streptavidin-Biotin-Methode wurde zur Signalverstärkung eingesetzt. Nach einem letzten Waschschrift von 3 x 5 min mit PBS konnten die gefärbten Zellen mit DAPI HardSetMount eingedeckt werden.

3.2.4.2.5 Immunfluoreszenz des Autophagie-assoziierten Proteins LC-3

Die Färbungen gegen das Autophagie-assoziierte Protein LC-3 wurden entsprechend der Immunfluoreszenzfärbungen gegen die lysosomalen Proteine angefertigt. Die Primärantikörper wurden für den Nachweis von LC-3 jeweils im Verhältnis 1:50 eingesetzt, die biotinylierten sekundären Antikörper im Verhältnis 1:100. Eingedeckt wurden die Objektträger mit DAPI HardSetMount.

3.2.4.2.6 Tunelfärbung der Podozyten

Um zu überprüfen, ob das verlangsamte Wachstum der shRNA- und mock - Zellreihen durch Apoptose verursacht wurde, wurde eine Tunelfärbung aller Zelllinien gemacht. Diese Methode stellt apoptotische Zellen durch enzymatische Markierung freier 3`OH-Enden, wie sie typischerweise bei Apoptose durch DNA-Fragmentierung entstehen, dar. Die Markierung der freien Enden der DNA-Stränge wird erreicht, indem mit Digoxigenin markierte Nukleotide durch das Enzym terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) an die freien 3`OH-Enden gebunden werden. An das Digoxigenin kann nun ein Antikörper binden, an den eine Peroxidase gekoppelt ist, die wiederum nach Substratzugabe eine Farbreaktion katalysiert.

Die mit PFA fixierten Zellen wurden für diese Färbung nach 2 x 5 min Waschen mit PBS in vorgekühlter (-20°C für 30 min) Ethanol-Essigsäure-Lösung im Verhältnis 2:1 für 5 min bei RT inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Nach erneutem Waschen (2 x 5 min mit PBS) folgte die Inkubation mit dem Equilibrierungspuffer (enthalten im ApoTag Kit) für 10 sek. Anschließend wurde eine Mischung aus Reaktionspuffer, der die markierten Nukleotide enthält, und TdT-Enzym (für alle Lösungen siehe Protokoll des Herstellers) auf die Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde mit Waschpuffer gestoppt (15 sek schwenken, dann Inkubation für 10 min) und die Objektträger kurz für 3 x 1 min mit PBS gewaschen, bevor mit

Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat für 30 min bei RT inkubiert wurde. Erneut folgte ein Waschgang von 4 x 2 min mit PBS und abschließend die Inkubation mit dem Peroxidase-Substrat Diaminobenzidin für 3 bis 10 min. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Um auch die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde nach einem Waschgang mit dH₂O (3 x 5 min) zusätzlich eine Hämalaun-Kernfärbung nach Böhmer angeschlossen (siehe 3.2.4.1.1.). Abschließend wurden die Zellen mit Gummisirup eingedeckt.

3.2.4.3 Auswertung der Färbungen

Die Darstellung und Auswertung der Fluoreszenzfärbungen wurde mit dem Lichtmikroskop Axioskop 40 (Zeiss) und dem konfokalen Mikroskop LSM 510 β durchgeführt. Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop wurden freundlicherweise von Herrn Tobias Meyer (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) angefertigt.

3.2.5 Proteinbiochemie

3.2.5.1 Proteinextraktion aus Podozyten

Um spezifische Proteine aus Podozyten oder Glomeruli nachzuweisen, wurden Zell- oder Glomerulilysate hergestellt. Hierfür wurden pro μ g Zellpellet oder Gewebstück die 5- bis 10-fache Menge an Lysepuffer in μ l (genaue Zusammensetzung siehe 3.1.) hergestellt, auf die Pellets pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 4°C und 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in vorgekühlte Eppendorftubes gegeben und für Proteinbestimmungen oder Westernblots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.5.2 Westernblotanalysen

Der Westernblot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger (wie Nitrocellulose) übertragen werden (die Übertragung ist das eigentliche "Blotting"). Die Methode besteht aus mehreren Arbeitsschritten. Im ersten Schritt, der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine durch Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, wodurch Proteinbanden entstehen.

Danach folgt die Übertragung der Banden auf eine Trägermembran durch Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamid-Gel stehenden elektrischen Feldes. Die Proteine wandern vom Gel auf die Membran, werden dabei durch Filter immobilisiert und haften aufgrund hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen auf der Trägermembran. Es wird eine Kopie des Gels produziert, das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten und die Proteine werden zugänglich für die folgende Antikörper-Bindung. Spezifische Antikörper binden an die aufgetrennten und geblotteten Proteine und werden durch Lumineszenz sichtbar gemacht.

3.2.5.2.1 Eindimensionale SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einem ersten Schritt denaturiert, indem Lysat mit 4x LDS im Verhältnis 3 : 1 versetzt und anschließend für 10 min auf 72°C erhitzt wurde. Für die Auftrennung der Proteine wurden 4-12 % NuPage Gradientengele benutzt. Vor Probenapplikation wurden die Gele 2 x mit Laufpuffer gespült. MOPS-Puffer wurde zur Auftrennung größerer Proteine verwendet, MES-Puffer zur Darstellung kleinerer Proteine, darunter vor allem Monoubiquitin. Je nachdem welches Protein nachgewiesen werden sollte, wurden je 10-30 µl der Proben in die Taschen des Gels geladen. Die Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese erfolgte bei 60 mA für ein Gel, (120 mA für 2 Gele) bei RT für 1 h in einer Peqlab-Gelkammer.

3.2.5.2.2 Immunoblot

Die in der Peqlab-Kammer nach Größe aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Trägermembran übertragen, indem senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld angeschlossen wurde. Zum Proteintransfer wurde eine Blotkammer (Novex Mini Cell) verwendet.

Die Membran wurde zunächst durch 2 min Einweichen in Methanol (RT) aktiviert und anschließend ohne Luftblasen und in Richtung der Anode auf das Gel gelegt. Trägermembran und Gel wurden jeweils beidseits mit 3, in Blotpuffer eingeweichten, Filterpapieren und 3-5 Schwämmen in der Blotkammer fixiert. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte bei 30 V für 1 h. Die Blotkammer wurde dabei auf Eis gestellt.

Der Nachweis der aufgetrennten und auf die Membran übertragenen Proteine, erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 3-5 % Magermilchpulver (MMP) in TBST für 30 min geblockt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in Superblock) bei 4°C über Nacht auf einem Taumler. Nach Entfernung des Primärantikörpers wurde die Membran 4 x für 10 min mit TBST gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde mit dem Sekundärantikörper (in MMP) für 1 h bei RT auf den Schüttler inkubiert. Erneut wurde die Membran 4 x für 10 min gewaschen. Es folgte die Inkubation mit ECL-Entwicklungslösung für 5 min.

Der sekundäre Antikörper war an HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt, ein Enzym, das die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, wodurch eine Lumineszenz resultiert. Als Substrat der Peroxidase diente ECL (enhanced chemiluminescence) Super Signal. Das entstandene Lichtsignal wurde auf einem Film abgebildet.

3.2.5.3 Proteinnachweis im Rattenurin durch Coomassie

Zur semiquantitativen Bestimmung und Visualisierung des Proteingehalts der Rattenurine wurde ein Coomassie Blue Stain angewendet. Bei diesem, im Gegensatz zum Westernblot, unspezifischen Proteinnachweisverfahren werden durch SDS-Page-Gelelektrophorese die Proteine im Urin der Tiere entsprechend

ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch einen blauen Farbstoff sichtbar gemacht. Der im Coomassie enthaltene Farbstoff Triphenylmethan lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren der aufgetrennten Proteine unspezifisch an. Durch das Sichtbar werden der Proteinbanden konnte ein Überblick über die Schwere der Proteinurie der Tiere und ein Vergleich der verschiedenen Gruppen untereinander ermöglicht werden.

Zunächst wurden die unverdünnten Urinproben mit 4 x LDS (3 : 1) versehen und für 10 min bei 72°C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden je 20 µl von je 3 PHN-, PHN+LDN-, PI-, PI+LDN-Tieren in die Taschen eines 4-12 % NuPage Gradientengels aufgetragen und elektrophoretisch bei 60 mA und RT für 1h in einer Peqlab-Kammer aufgetrennt. Als Laufpuffer diente MOPS. Das Gel wurde anschließend 3 x mit dH₂O gewaschen und in 20 ml des unverdünnten Coomassie Blue Stain-Codes für 1 h geschwenkt, wodurch das Gel komplett blau angefärbt wurde. Durch anschließendes Entfärben des Gels durch Schwenken und waschen in dH₂O für 3 h, wurden die blau angefärbten Proteinbanden sichtbar.

3.2.5.4 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Als ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) wird ein, auf einer enzymatisch vermittelten Farbreaktion basierendes, immunologisches Verfahren bezeichnet, mit dem verschiedene Substanzen wie beispielsweise Proteine, Hormone und Viren nachgewiesen werden können. Hier wurde der ELISA zur Quantifizierung des Albuminverlustes in den Rattenurinen verwendet. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven Immunoassay, das bedeutet, dass das Albumin aus dem Urin (flüssige Phase) und stationäres Albumin (feste Phase) einer beschichteten 96-well-Platte miteinander um eine Antikörperbindestelle konkurrieren. Es werden zu einer mit Albumin beschichteten Platte die Urinprobe und der HRP-gekoppelter-Anti-Ratten-Albuminantikörper gegeben. Der Antikörper bindet entweder an das stationäre Albumin oder an das Albumin der flüssigen Phase. Nach einem Waschgang bleibt nur der an der festen Phase gebundene Antikörper zurück, dessen Konzentration durch photometrische Messung einer Farbreaktion, die durch Peroxidase katalysiert wird, bestimmt werden kann. Als Substrat der Peroxidase wird in diesem Fall Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Die Farbintensität ist dabei indirekt proportional zum Logarithmus der Albuminkonzentration der flüssigen Phase.

Die Rattenurine wurden vor der Albuminbestimmung durch den ELISA bei 4 °C und 3500 rpm zentrifugiert, um eventuelle Schwebeteilchen zu entfernen. Anschließend wurde der Albumingehalt des Urins semiquantitativ durch einen Urinstix bestimmt. Wenn sehr hohe Werte für Albumin nach Messung im Urinstix zu erwarten waren, wurde der Urin 1:10 mit dem mitgelieferten EIA (Enzyme Immunoassay) Diluent verdünnt, um den Messbereich des ELISA nicht zu überschreiten.

Sowohl für die Standardreihe (geometrische Verdünnungsreihe aus dem mitgelieferten Rattenserumalbumin für die Bereiche zwischen 10,0 bis 0,0 mg/dl) als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen der Albuminkonzentration

durchgeführt. In die Wells wurden je 100 µl des Standards oder der verdünnten Probe aufgetragen und nach einer Inkubationszeit von 20 min je 100 µl HRP-Anti-Albumin-Antikörper zu den Proben und Standard gegeben. Nach Inkubation von mindestens 30 min wurden die Wells 6 x mit Waschpuffer gewaschen, bevor der zur Farbentwicklung benötigte TMB-Colour-Developer (je 100µl pro Well) dazugegeben wurde. Nach 5 min Inkubation im Dunkeln wurde pro Well 100 µl ~~Stoppl~~ Stoppl hinzugefügt und die Farbreaktion am ELISA-PlateReader ausgelesen und die Konzentration errechnet.

3.2.6 Molekularbiologie

3.2.6.1 Isolierung von DNA aus Podozyten

Um DNA aus Podozyten zu isolieren, wurde zunächst eine Proteinbestimmung (nach BioRad) der lysierten Zellpellets gemacht. Für die Standardmessreihe wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit BSA (Bovine Serum Albumin) für den Konzentrationsbereich zwischen 10,0 – 0,0 mg/ml angefertigt. Nach Auftragen von je 5 µl Standard und Probe (jeweils in Doppelbestimmung) wurde in jedes Well 25 µl der Reagenz A und 200 µl der Reagenz B dazu gegeben und für 15 min inkubiert. Es folgte die Messung der Proteinkonzentration am PlateReader.

Nach erfolgreicher Proteinbestimmung der Lysate folgt die DNA-Fällung. Durch Errechnen der entsprechenden Menge an Protein konnte eine Probe von 50µg Protein hergestellt werden. Zu den jeweils 50 µl Probe wurden 5 µl 3M NaAcetat und 100 µl 100 % Ethanol gegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Pellet 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in TE-Puffer (s. 3.1) aufgenommen und bei 56°C im Thermoblock vollständig gelöst.

3.2.6.2 Bestimmung der DNA- Konzentration durch Spektrophotometrie

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mittels Spektrophotometrie am Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer durchgeführt. Die Grundlage dieser Messung beruht auf dem Lambert-Beer'schen-Gesetz ($E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$). Dabei ist die Extinktion E eines bestimmten Stoffes abhängig von der optischen Wellenlänge d, der Konzentration c und dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ . Durch Auflösen des Gesetzes nach c wurde die Konzentration der DNA-Proben errechnet. Die Quantifizierung der DNA durch photometrische Messung wurde bei 260 nm durchgeführt, da dies das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren darstellt.

3.2.6.3 Proteasomaktivitätstest

Der Aktivitätsstatus des Proteasoms in den Podozyten wurde durch die Messung der Hauptaktivität des Proteasoms in den verschiedenen Zelllinien mittels der „Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität“ bestimmt. 10 µg reines Protein aus Podozyten wurde in Inkubationspuffer (20 mmol/L HEPES; 0,5 mmol/L EDTA; 5 mmol/L

Dithiothreitol; 0,1 mg/ml Ovalbumin; 6 mmol/L ATP, 50 mmol/L Phosphokreatin und 0,2 U Phosphokreatinkinase) in Wasser (pH 7,8) bis zu einem Endvolumen von 50 μ L verdünnt und darin bei 4° für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde den Proben das fluogene Proteasomsubstrat Suc-LLVY-AMC (N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amido-4-methyl-cumarin) bis zu einer Endkonzentration von 60 μ mol/L zugegeben. Nach Inkubation der Proben bei 37° für eine Stunde im Dunkeln wurde die Proteasomale Aktivität mittels Fluoreszenzspektrometer bei 355 und 460 nm gemessen.

3.2.7 Statistik

Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardfehler angegeben (MW +/- SEM). Der paarige Student-T-Test wurde zum Vergleich von Mittelwerten innerhalb einer experimentellen Gruppe verwendet. Daten aus zwei Gruppen wurden durch den nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test verglichen. Ein Wert für $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm Excel und PRISM durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Stabile Überexpression und stabiler Knock down von UCH-L1 in kultivierten Podozyten

Um die enzymatischen Funktionen der UCH-L1 zu analysieren und deren Effekte auf die Podozytenmorphologie und auf die podozytäre Proteindegradation zu gewinnen, wurden murine Podozyten mit stabiler UCH-L1 Überexpression und UCH-L1 Defizienz generiert. Die von Prof. K.H. Endlich freundlicherweise zur Verfügung gestellten Podozyten stammen aus der ImmortoMaus und sind durch Transfektion mit einem temperatursensitiven SV40-T-Gen konditionell immortalisiert. Der Nachweis und die zwischenzeitliche Kontrolle der stabilen Transfektion erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbungen der Podozyten und Westernblot Analysen gegen das Enzym UCH-L1. Die UCH-L1 überexprimierenden Zellen zeigten einen erhöhten UCH-L1-Gehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen. Überexprimierte UCH-L1 war wie in den Kontrollzellen vor allem zytoplasmatisch lokalisiert. Teilweise konnte UCH-L1 auch in den Zellkernen lokalisiert werden.

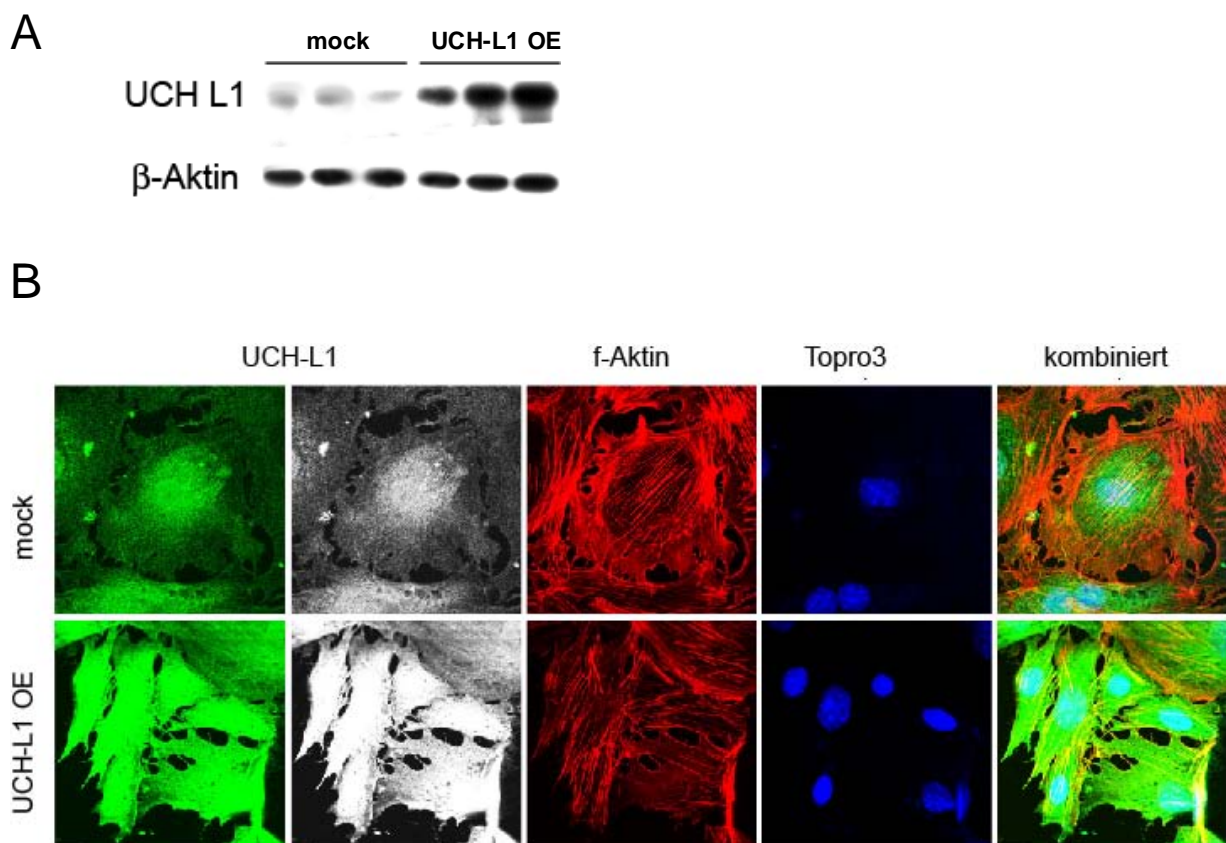


Abb 10: Stabile Überexpression von UCH-L1 in Podozyten A) Repräsentative Westernblots gegen UCH-L1. Gesamtzelllysate differenzierter UCH-L1 überexprimierender Podozyten (UCH-L1 OE) und Kontrollpodozyten (mock) wurden gegen UCH-L1 geblottet. β -Aktin der gleichen Membran wurde als Ladekontrolle verwendet. B) Repräsentative konfokale Aufnahmen differenzierter UCH-L1 überexprimierender (UCH-L1 OE) und Kontrollpodozyten (mock) nach Immunfluoreszenzfärbungen gegen UCH-L1 (FITC, grün),

filamentöses Aktin (Alexa Fluor Phalloidin 568, rot) und die Zellkerne (Topro3, blau) in 400 facher Vergrößerung.

Mittels shRNA Technologie generierte Podozyten mit stabilem UCH-L1 Knock down zeigten in Westernblots im Vergleich zu den Kontrollzellen, die eine scrambled shRNA exprimieren, keine UCH-L1 Expression. Auch in der Immunfluoreszenz konnte keine Expression der UCH-L1 in UCH-L1 defizienten Podozyten nachgewiesen werden.

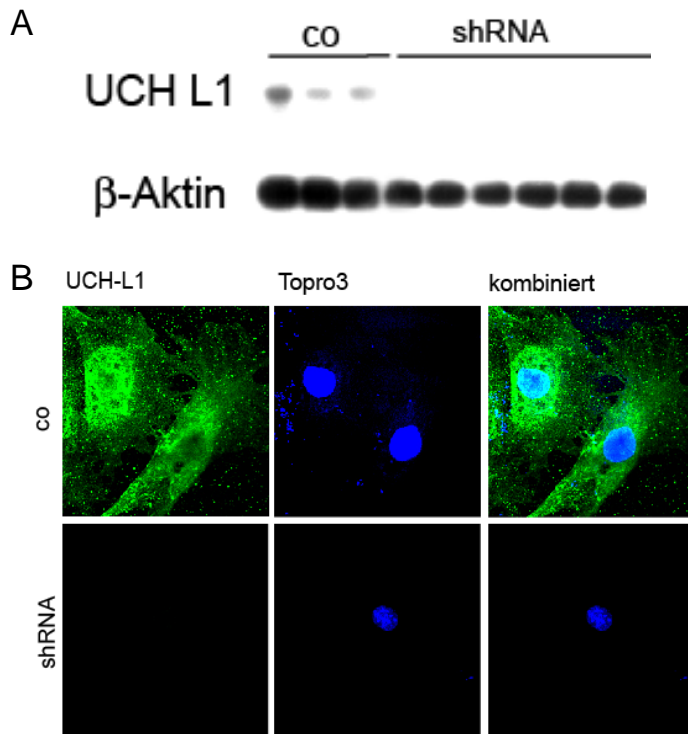


Abb 11: Stabiler Knock down von UCH-L1

A) Repräsentative Westernblots differenzierter UCH-L1 defizienter Podozyten (shRNA) und Kontrollpodozyten (co) gegen UCH-L1 mit β -Aktin als Ladekontrolle

B) Repräsentative konfokale Aufnahmen differenzierter Podozyten nach Immunfluoreszenzfärbung gegen UCH-L1 (FITC, grün) und den Zellkernen (Topro3, blau) in 400 facher Vergrößerung

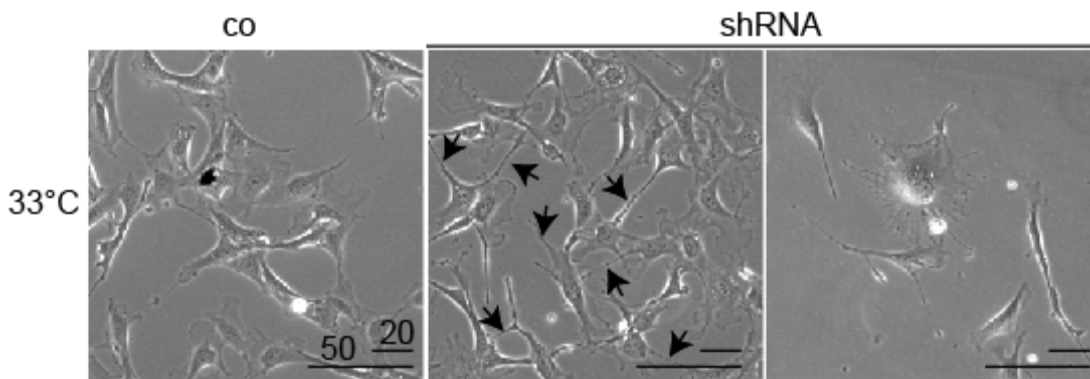
4.2 Die UCH-L1 beeinflusst den Phänotyp der Podozyten

Voruntersuchungen an humanen Podozyten in Zellkultur zeigten, dass eine UCH-L1-Expression mit einem undifferenzierten Phänotyp der Zellen assoziiert war und der Differenzierungsstatus von Kulturpodozyten invers mit der Expression der UCH-L1 korrelierte. (64). Die Differenzierung der Podozyten wurde dabei anhand der zunehmenden Expression der podozytären Differenzierungsmarker Nephrin, Synaptopodin und α -Aktinin-4 gemessen. Undifferenzierte Podozyten zeichnen sich durch einen lang gestreckten dreieckigen Zellkörper und wenig Fortsatzbildung aus. Ein weiteres typisches Merkmal undifferenzierter Podozyten ist die Fähigkeit der Proliferation. Bei Kultivierung der Podozyten unter nicht-permissiven Bedingungen, kommt es zu einem Teilungsstopp der Zellen und zur Ausdifferenzierung in einen flachen, arborisierten Phänotyp. Der Verlust der Zellteilung führt zur Ausbildung von Zellen mit zwei oder mehr Zellkernen, genannt Polyploidie.

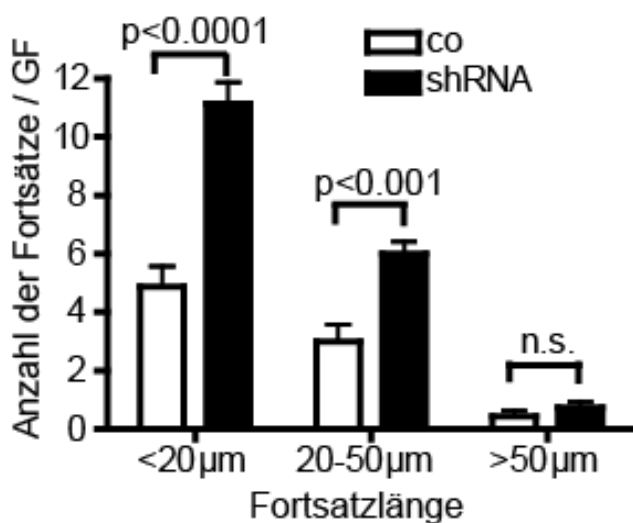
4.2.1 Die UCH-L1 verhindert die Podozytendifferenzierung

Bei Kultivierung der Podozyten unter permissiven Bedingungen zeigte sich bei den UCH-L1 defizienten Podozyten im Vergleich zu ihren Kontrollzellen ein signifikanter Unterschied im Phänotyp. Die Zellen mit fehlender UCH-L1 Expression entwickelten typische Merkmale differenzierter Podozyten, wie die Bildung von Fortsätzen. Die Quantifizierung erfolgte durch die Messung der Länge (aufgeteilt in < 20 , $20-50$, $> 50 \mu\text{m}$) (Abb. 12 B) und der Anzahl der Fortsätze pro Zelle (Abb. 12 C). UCH-L1 defiziente Zellen zeigten eine signifikant vermehrte Bildung von Fortsätzen. Zusätzlich ergab die Vermessung der Fortsatzlängen eine signifikante Längenzunahme der Fortsätze gegenüber den Fortsätzen der Kontrollzellen. Es konnte jedoch nicht nur eine vermehrte Fortsatzbildung als Zeichen der zunehmenden Differenzierung beobachtet werden. Auch die Entwicklung der Zellkörper einiger Podozyten zu flachen, breiten Zellkörpern, wie es typisch für differenzierte Podozyten ist (Abb. 12 A) wurde beobachtet.

A



B



C

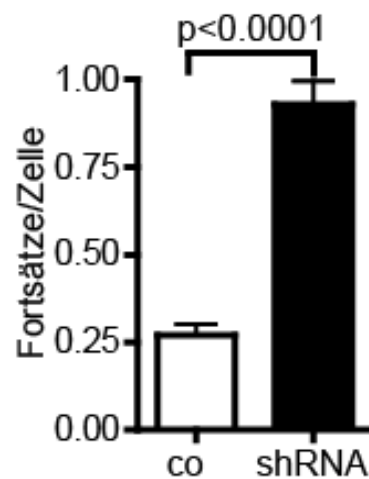
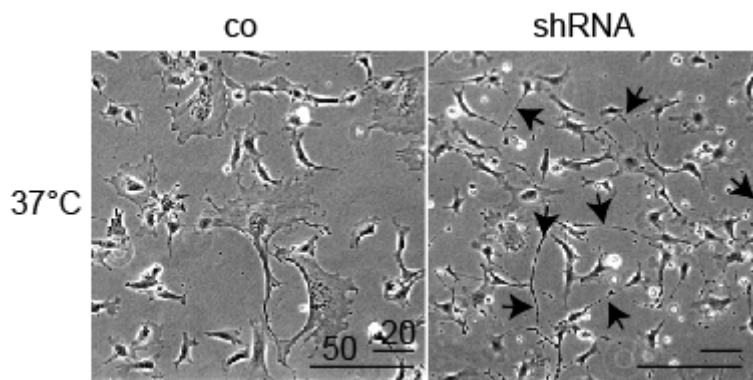


Abb 12: UCH-L1 Knock down führt zur Ausdifferenzierung der Podozyten unter permissiven Bedingungen. A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von co und UCH-L1 defizienten Podozyten (shRNA), die auf Plastikware ausplattiert und unter

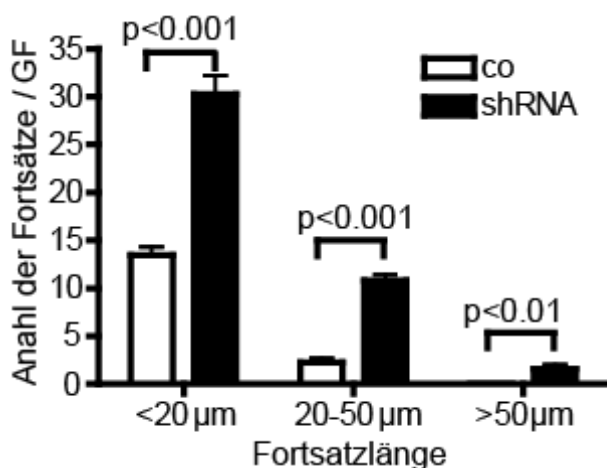
permissiven Bedingungen kultiviert wurden, in 400 facher Vergrößerung. Pfeile deuten auf Fortsätze hin, kurzer Balken 20µm, langer Balken 50µm. B) Anzahl der Fortsätze pro Gesichtsfeld, eingeteilt nach der Größe (< 20, 20-50, > 50 µm), Die Werte sind angegeben als Mittelwerte (MW) +/- SEM, die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test durch Auswertung von 50 Podozyten in n=10 Bildern pro Kondition ermittelt, $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant akzeptiert, n.s = nicht signifikant C) Fortsätze pro Zelle, Werte sind angegeben als MW +/- SEM, t-Test (50 Podozyten in n=10 Bildern pro Kondition und Zelllinie)

Bei Kultivierung der UCH-L1 defizienten Podozyten unter nicht-permissiven Bedingungen zeigten sich entsprechende Daten wie bei der Kultivierung unter permissiven Bedingungen. Die Zellen mit fehlender UCH-L1 Expression bildeten signifikant mehr und längere Fortsätze aus als ihre Kontrollzellen.

A



B



C

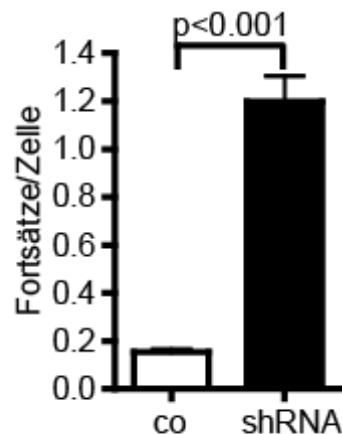


Abb 13: UCH-L1 Knockdown führt zur vermehrter Fortsatzbildung der Podozyten unter nicht-permissiven Bedingungen. A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von co und UCH-L1 defizienten Podozyten (shRNA), die auf Plastikware ausplattiert und unter nicht-permissiven Bedingungen kultiviert wurden, Vergrößerung 400-fach. Pfeile deuten auf Fortsätze hin, kurzer Balken 20µm, langer Balken 50µm. B) Anzahl der Fortsätze pro Gesichtsfeld, eingeteilt nach der Größe (< 20, 20-50, > 50 µm). Die Werte sind angegeben als Mittelwert (MW) +/- SEM, die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test durch

Auswertung von 50 Podozyten in n=10 Bildern pro Kondition pro Zelllinie ermittelt. C) Fortsätze pro Zelle, Werte sind angegeben als MW +/- SEM, t-Test (50 Podozyten in n=10 Bildern pro Kondition und Zelllinie)

Aufgrund der erhobenen Daten, die zeigten, dass eine fehlende UCH-L1 Expression zur Ausdifferenzierung der Podozyten unter permissiven und nicht-permissiven Bedingungen und zu einer verstärkten Fortsatzbildung führte, untersuchten wir, ob eine UCH-L1 Überexpression in den Podozyten deren Ausdifferenzierung verhinderte.

Bei Kultivierung der UCH-L1 überexprimierender Podozyten unter permissiven Bedingungen zeigte sich kein Unterschied im Phänotyp zu den Kontrollzellen (mock). Beide Zelllinien zeigten den typischen Phänotyp undifferenzierter Podozyten mit lang gestreckten dreieckigen Zellkörpern und wenig Fortsatzbildung (Abb. 14 A). Die anschließende Kultivierung unter nicht-permissiven Bedingungen zeigte einen signifikanten Unterschied in der Morphologie der UCH-L1 überexprimierenden Podozyten gegenüber ihren Kontrollzellen. Kontrollpodozyten begannen bei Kultivierung unter nicht-permissiven Bedingungen auszdifferenzieren und zeigten nach 14 Tagen Inkubation bei 37°C den typischen Phänotyp differenzierter Podozyten mit sehr großen, flachen Zellkörpern und einigen Fortsätzen. UCH-L1 überexprimierende Podozyten dagegen zeigten auch nach längerer Inkubation (> 14 Tage) unter nicht-permissiven Bedingungen wenig Anzeichen der Differenzierung. Der Zellkörper blieb verhältnismäßig klein und sie bildeten wenige Fortsätze aus. Nur gelegentlich zeigten einzelne Zellen einen etwas größeren, flachen Zelleib (Abb. 14 A). Die Quantifizierung der Daten erfolgte durch Auswertung von Phasenkontrastaufnahmen der Podozyten, die mindestens 14 Tage unter nicht-permissiven Bedingungen kultiviert wurden. Gezählt wurden Zellen pro Gesichtsfeld, eingeteilt nach deren gemessener Fläche (Abb. 14 B, C).

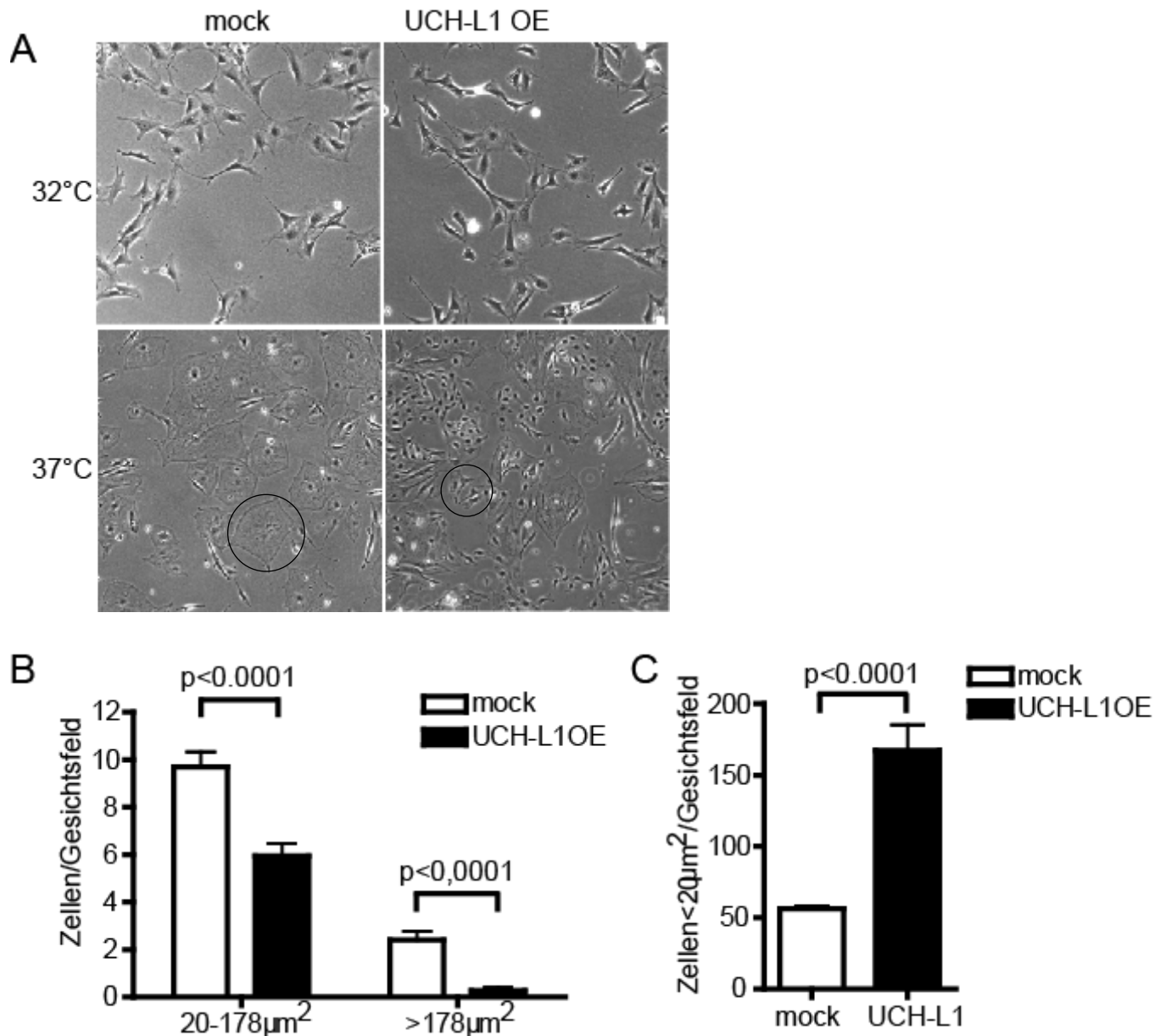


Abb 14: UCH-L1 verhindert die Ausdifferenzierung der Podozyten unter nicht-permissiven Bedingungen. A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von mock und UCH-L1 OE Podozyten, die auf Plastikware ausplattiert und unter permissiven und nicht-permissiven Bedingungen kultiviert wurden, in 400- (bei 33°C) und 200-facher (bei 37°C) Vergrößerung. Kreise deuten auf Podozyten hin. B) Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld, eingeteilt nach der gemessenen Zellfläche (20-178, > 178 μm^2). C) Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld mit einer Zellfläche < 20 μm^2 , Werte sind angegeben als MW \pm SEM, t-Test (50 Podozyten in n=10 Bildern pro Kondition und Zelllinie).

Die Ausbildung polyploider Zellen ist ein weiteres Zeichen der terminalen Podozytdifferenzierung. Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Ausbildung polyploider Zellen abhängig von der UCH-L1 Expression gab, wurden die Zellkerne

differenzierter Podozyten aller vier Zelllinien mit Hämalaun gefärbt und anschließend die Anzahl polyploider Zellen pro Gesamtzellanzahl pro Blickfeld in Prozent bestimmt. Nach Auswertung der Bilder zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Ausbildung polyploider Zellen zwischen UCH-L1 überexprimierenden Podozyten und ihrer Kontrolle (mock). Die Kontrollzellen bildeten im Gegensatz zu Podozyten mit UCH-L1 Überexpression signifikant mehr polyploide Zellen pro Gesamtzellzahl aus (1,7 +/- 0,03 bei mock gegenüber 0,04 +/- 0,004 bei UCH-L1 OE). Daraus lässt sich schließen, dass die UCH-L1 Überexpression die Ausbildung polyploider Zellen und damit die Differenzierung der Podozyten verhindert. UCH-L1 Defizienz in Podozyten führte dagegen zu keiner signifikanten Änderung der Polyploidie. Sowohl UCH-L1 defiziente Podozyten als auch ihre Kontrollzellen bildeten im vergleichbaren Maße mehrkernige Zellen aus (0,41 +/- 0,025 bei shRNA gegenüber 0,46 +/- 0,03 bei der Kontrolle).

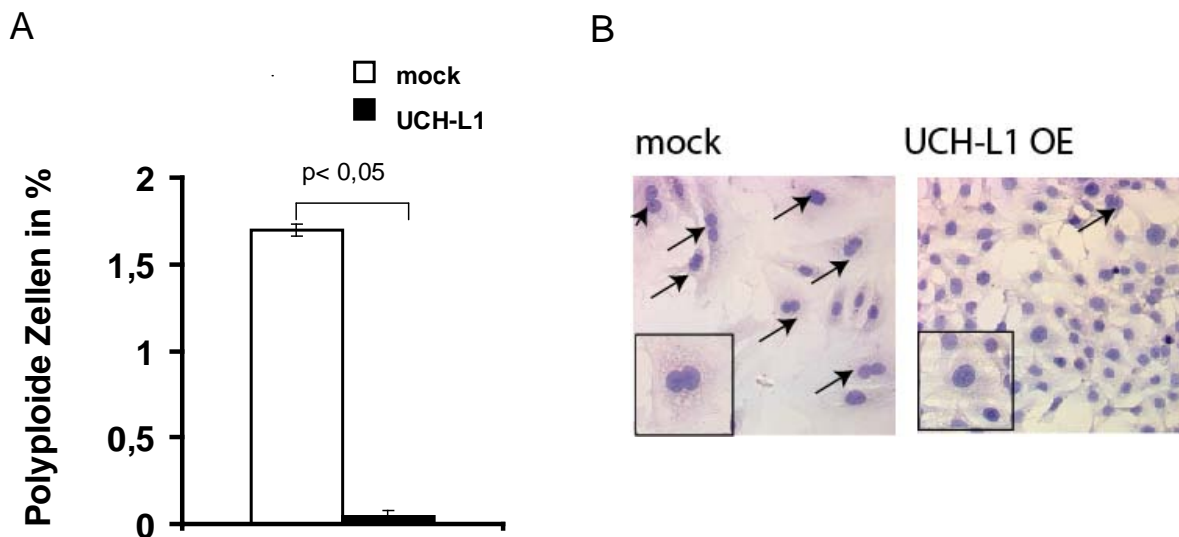


Abb 15: UCH-L1 Überexpression verhindert die Polyploidie der Podozyten. A) Anzahl polyploider Zellen pro Gesamtzellzahl und Gesichtsfeld angegeben in %, die Werte sind dargestellt als MW +/- SEM. Ausgewertet wurden die Versuche mit dem t-test mit 50 Podozyten in n=10 Bildern je Zelllinie). B) Repräsentative Aufnahmen differenzierter Podozyten nach Hämalaun-Kernfärbung in 200 facher Vergrößerung, kleine Bilder zeigen einen repräsentativen Podozyten; Pfeile deuten auf polyploide Zellen hin.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass UCH-L1 eine Rolle für den Differenzierungsstatus der Podozyten spielt. Eine Überexpression der UCH-L1 geht mit einem undifferenzierten Phänotyp der Podozyten einher, da das Enzym die Ausdifferenzierung der Zellen zu behindern scheint. Eine UCH-L1 Defizienz korreliert dagegen mit einem differenzierten Phänotyp der Podozyten.

4.2.2 Zunahme der Proliferation der Podozyten durch UCH-L1

Die stabile UCH-L1 Überexpression führte zu verringerter Fortsatzbildung und zu einer Polyploidieentwicklung. Dies könnte durch ein verändertes Proliferationsverhalten der Podozyten hervorgerufen werden. Im undifferenzierten Zustand proliferieren Podozyten; differenzieren die Podozyten in Kultur aus, kommt es zu einem Teilungsstopp und das Wachstum wird weitestgehend eingestellt. Da die UCH-L1 Überexpression mit einem undifferenzierten Phänotyp assoziiert ist, ist anzunehmen, dass eine Überexpression der UCH-L1 zu einer verstärkten Proliferation und ein Knockdown der UCH-L1 zu einer verlangsamten Proliferation führt.

Zellzahlzählungen 72 h nach Ausplattierung von 10^5 Podozyten zeigten in Podozyten mit UCH-L1 Überexpression ein signifikant verstärktes Wachstum gegenüber den Kontrollzellen (mock) (Abb. 16 A). Zellen mit fehlender UCH-L1 Expression zeigten ein signifikant verlangsamtes Wachstum gegenüber ihren Kontrollzellen (Abb. 16 B).

Um zu untersuchen, welche enzymatische Aktivität von UCH-L1 die Proliferation der Podozyten reguliert, wurde die Hydrolaseaktivität von UCH-L1 durch Zugabe des Inhibitors LDN 57444 reversibel gehemmt. Wildtyp-Podozyten mit nicht modifizierter UCH-L1 Expression wurden nach Ausplattierung von 10^5 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem spezifischen Hemmstoff der Hydrolaseaktivität LDN57444 behandelt. Nach 72 h UCH-L1 Hemmung wurde die Podozytenzellzahl ermittelt.

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Proliferationsabnahme der Podozyten. Je höher die Konzentration an LDN 57444 im Kulturmedium der Podozyten war, desto geringer war die Zellzahl nach 72 h Kultur (Abb 16 C).

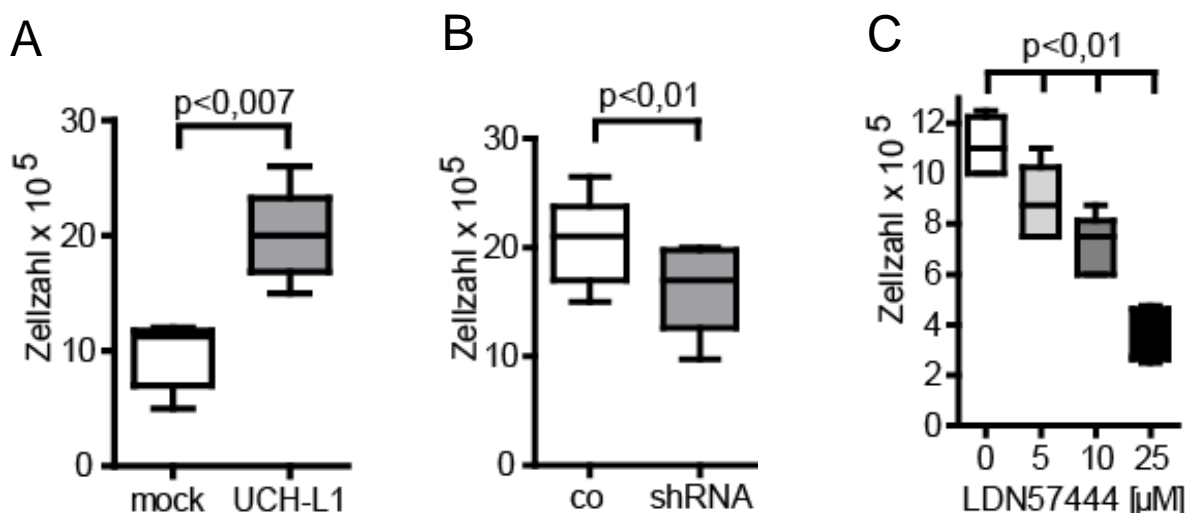


Abb. 16: UCH-L1 Überexpression führt zu verstärkter Zellzahlzunahme. Ergebnisse der Proliferationsversuche. Zellzahl differenzierter Podozyten $\times 10^5$, bestimmt in einer Neubauer-Kammer aus $n=10$ Ansätzen pro Zelllinien nach 72 h Kultur. A) UCH-L1 überexprimierende Podozyten (UCH-L1 OE) und Kontrollzellen (mock); B) UCH-L1 defiziente Podozyten

(shRNA) und Kontrollzellen (co); C) Wildtyp-Podozyten behandelt mit LDN57444; Die Werte sind dargestellt als MW +/- SEM, ausgewertet wurden die Versuche mit dem t-test.

Um auszuschließen, dass eine mutationsbedingte Expressionsänderung des temperatursensitiven T-Antigens das Proliferationsverhalten der Podozyten beeinflusst haben könnte, wurde ein Westernblot aller Zellreihen gegen T-Antigen durchgeführt. Der Westernblot ergab keine Änderung der Expression des T-Antigens, die eine verlangsamte Proliferation bei UCH-L1 defizienten Podozyten oder die vermehrte Proliferation bei UCH-L1 Überexpression erklären könnte.

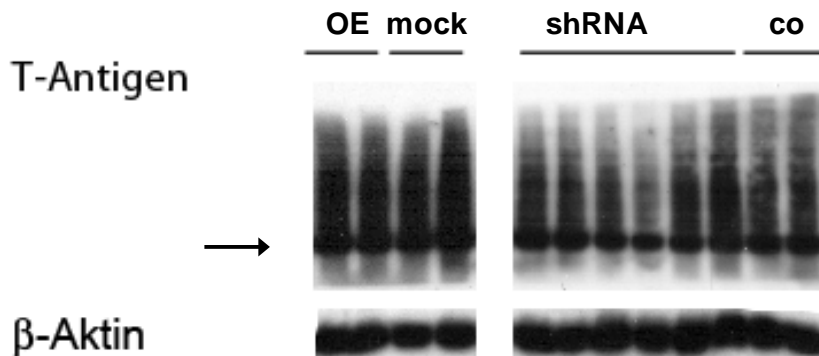


Abb. 17: Keine Expressionsänderung des T-Antigens. Repräsentativer Westernblot differenzierter Podozyten mit UCH-L1 Überexpression (UCH-L1 OE) und UCH-L1 Defizienz (shRNA) und ihren Kontrollen gegen T-Antigen mit β -Aktin als Ladekontrolle.

4.2.3 UCH-L1 Überexpression führt zu einem Anstieg der Apoptoserate

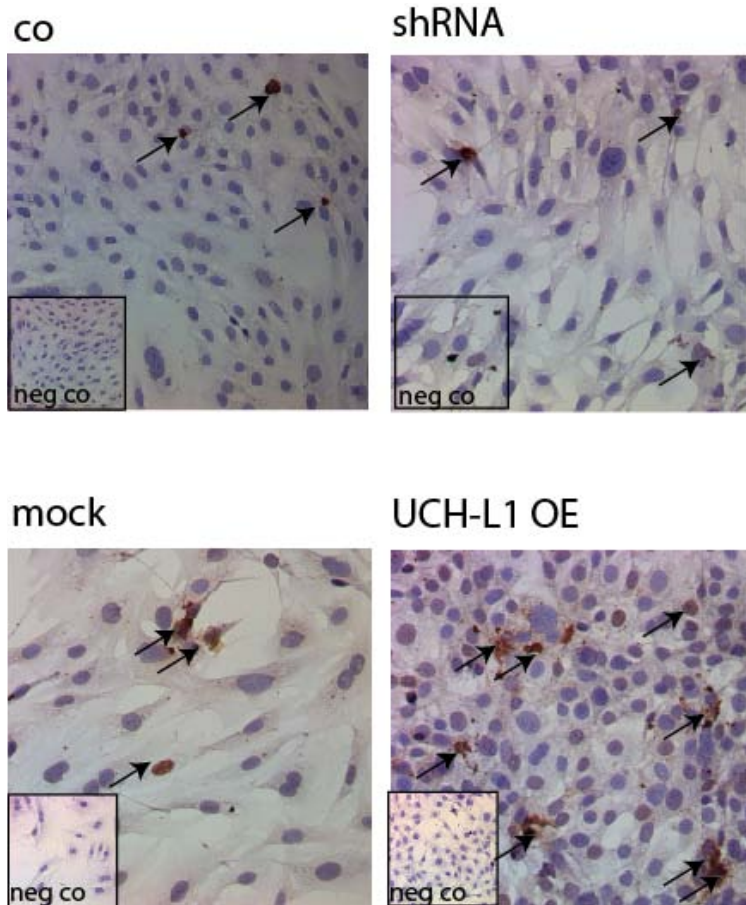
UCH-L1 defiziente Podozyten zeigten eine verringerte Zellzahl nach 72 h Kultur gegenüber den Kontrollzellen. Dies könnte durch eine gesteigerte Apoptoserate verursacht worden sein. Um zu untersuchen, ob eine gesteigerte Apoptose die verringerte Zellzahl erklären könnte, wurde die Anzahl apoptotischer Zellen mittels Tunelfärbung bestimmt.

Podozyten mit fehlender UCH-L1 Expression hatten vergleichbar viele apoptotische Podozyten pro Zellzahl wie ihre Kontrollzellen, sodass eine verlangsamte Proliferation vermutlich nicht die Ursache für deren vermehrten programmierten Zelltod ist.

Eine verringerte Apoptose bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten könnte zu der festgestellten erhöhten Zellzahl in den Proliferationsversuchen führen. Die Auswertung der Tunelfärbung ergab eine jedoch eine signifikante Zunahme der Apoptoserate der UCH-L1 überexprimierenden Podozyten. Trotz dieser erhöhten Apoptoserate war die Zellzahl der UCH-L1 überexprimierenden Podozyten nach 72 h Kultivierung signifikant höher als bei den Kontrollzellen (siehe 4.2.2). Somit kann die signifikante Zunahme der Proliferation der UCH-L1 überexprimierenden Zellen gegenüber der Kontrolle nicht durch eine verringerte Apoptose erklärt werden. Diese Daten stützen die Theorie, dass UCH-L1 zu verstärkter Proliferation und das Fehlen

des Enzyms zu einem Teilungsstopp führt und könnten bedeuten, dass ein erhöhter Zellumsatz durch eine UCH-L1 Überexpression induziert wird.

A



B

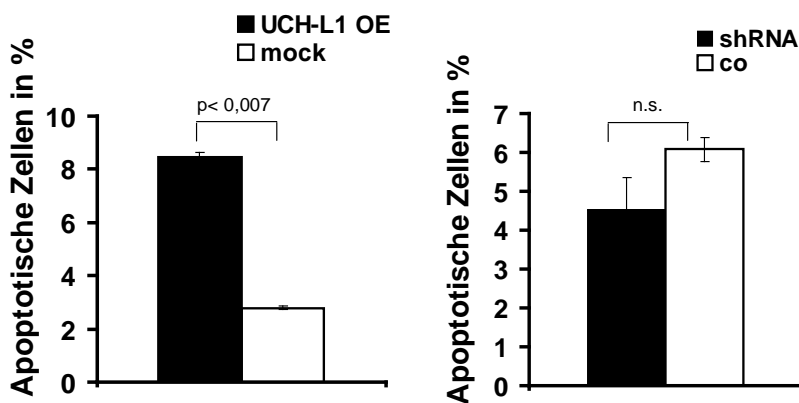


Abb 18: Vermehrte Apoptose bei UCH-L1 Überexpression. A) Repräsentative Aufnahmen differenzierter Podozyten nach Tunelfärbung in 20 facher Vergrößerung. Kleines Bild zeigt die Negativkontrolle der Färbung. Pfeile deuten auf apoptotische Zellen hin. B) Anzahl apoptotischer Zellen in % zur Gesamtzellzahl. Die Werte sind angegeben als Mittelwert

(MW) +/- SEM, die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test durch Auswertung von n=10 Bildern in 200 facher Vergrößerung pro Zelllinie ermittelt.

4.2.4 DNA-Anstieg in den Podozyten durch UCH-L1

In allen Färbungen der Podozyten fiel ein starker Größenunterschied der UCH-L1 überexprimierenden Podozyten im Gegensatz zu mock Kontrollzellen auf. Podozyten mit UCH-L1 Überexpression blieben im Vergleich zu den Kontrollzellen verhältnismäßig klein. Bei Vergleich der UCH-L1 defizienten Podozyten mit den Kontrollzellen war kein Größenunterschied erkennbar. Mehrere Gründe für den Größenunterschied sind denkbar. Zum Einen könnte er dadurch bedingt sein, dass die Kontrollzellen flacher sind und dadurch größer wirken oder umgekehrt die UCH-L1 überexprimierenden Podozyten aufgrund einer abgerundeten Struktur kleiner erscheinen. Außerdem könnte eine Hypertrophie einen Größenunterschied erklären. Eine zelluläre Hypertrophie ist biochemisch definiert als ein Anstieg des zellulären Proteingehalts im Verhältnis zum zellulären DNA-Gehalt (15).

Um zu klären, ob eine veränderte UCH-L1 Expression auch eine Hyper- oder Hypotrophie der Zellen zur Folge hat und ob es sich bei den vergleichsweise kleinen UCH-L1 überexprimierenden Podozyten um eine Hypotrophie-bedingte Zellgrößenveränderung handelt, wurde eine Bestimmung des DNA-/Protein-Quotient durchgeführt. Bestimmt wurde in diesem Fall der DNA-Gehalt aus 50 µg Protein einer Gesamtzelllysatsprobe. Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied im DNA-/Protein-Quotient zwischen den Podozyten mit UCH-L1 Defizienz und den Kontrollzellen. Bei Vergleich der UCH-L1 überexprimierenden Zellen mit den Kontrollpodozyten fiel ein signifikanter Anstieg des zellulären DNA-Gehaltes bei UCH-L1 Überexpression auf.

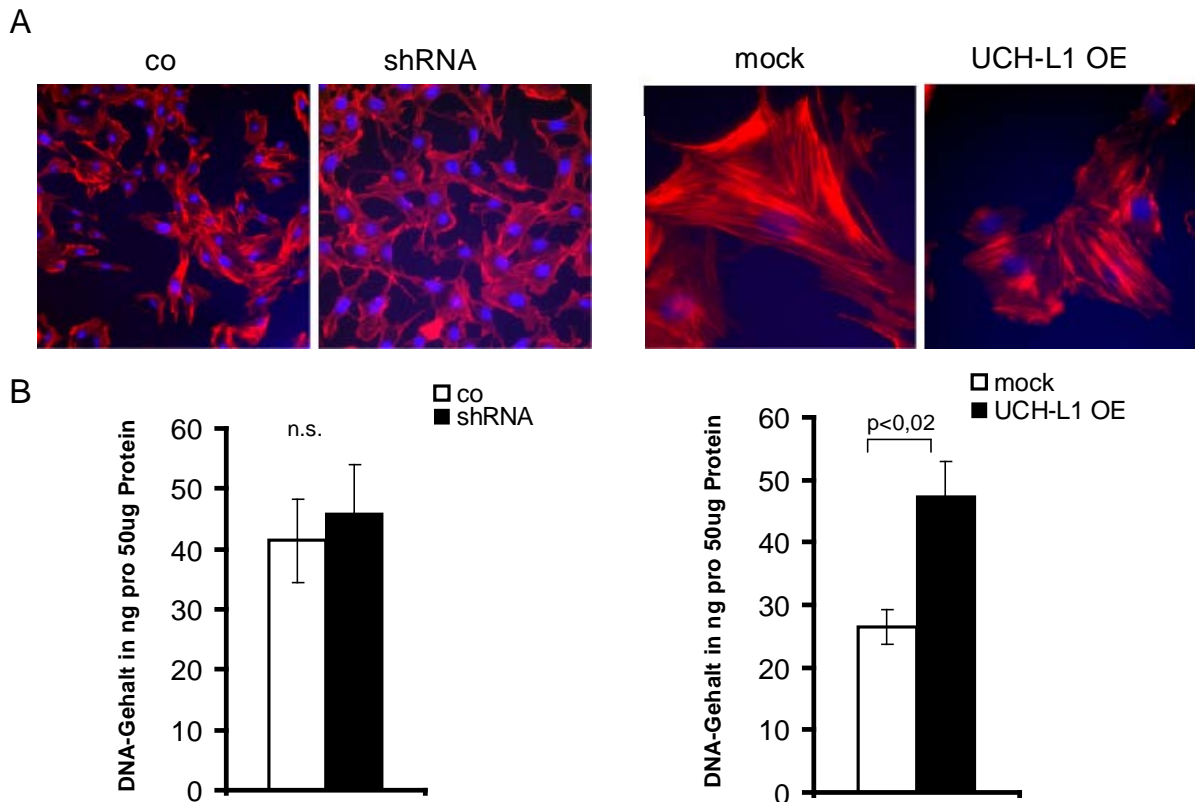


Abb 19: DNA-/Protein-Quotient bei UCH-L1 Überexpression A) Repräsentative Aufnahmen differenzierter Podozyten nach Fluoreszenzfärbung des Aktinzytoskeletts filamentösen Aktin (rot) und des Zellkerns (blau) in 20 facher Vergrößerung. B) DNA-Gehalt in ng aus 50 µg Protein eines Gesamtzelllysates, die Werte sind angegeben als Mittelwert (MW) +/- SEM, die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test durch Auswertung von n=7 Gesamtzelllysatsproben pro Zelllinie ermittelt.

4.3 UCH-L1 beeinflusst die Proteindegradation in Podozyten

UCH-L1 reguliert den intrazellulären Ubiquitingehalt der Zellen und ist eines der Schlüsselenzyme des UPS.

Bei der humanen mGN konnte in erkrankten Podozyten mit *de novo* UCH-L1 Expression ein erhöhter Ubiquitingehalt festgestellt werden (64). Auch in der PHN konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der UCH-L1 mit einem erhöhten Ubiquitingehalt in Podozyten assoziiert war (64).

Die Rolle der UCH-L1 bei der Proteindegradation bei podozytären Erkrankungen ist bislang unbekannt. Folgende Experimente sollten untersuchen, ob eine Modifikation des UCH-L1-Gehalts in kultivierten Podozyten einen Einfluss auf die Proteindegradation hat.

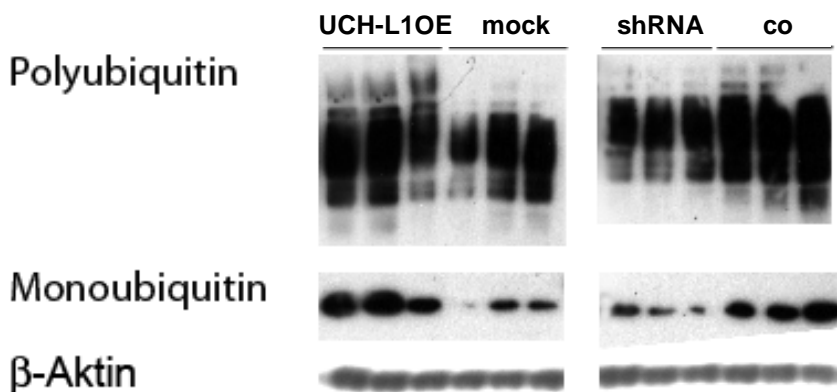
4.3.1 UCH-L1 hemmt das Ubiquitin-Proteasom-System

4.3.1.1 Akkumulation von Polyubiquitin bei UCH-L1 Überexpression

Um den regulatorischen Einfluss der UCH-L1 auf den Ubiquitinhaushalt und deren Monoubiquitin stabilisierende Funktion in den Podozyten zu bestätigen, wurden mit kultivierten Podozyten mit fehlender oder gesteigerter UCH-L1 Expression Westernblotanalysen und Färbungen gegen Ubiquitin angefertigt.

UCH-L1 überexprimierende Zellen zeigten eine Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen im Westernblot gegenüber ihren Kontrollzellen. Zusätzlich war auch ein erhöhter Monoubiquitingehalt der UCH-L1 überexprimierenden Zellen gegenüber der Kontrolle erkennbar. Entsprechend dazu zeigten die UCH-L1 defiziente Podozyten einen erniedrigten Gehalt an Poly- und Monoubiquitin. Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten die Ergebnisse. Der für die Färbung verwendete Antikörper erkannte gleichermaßen Poly- und Monoubiquitin, so dass diesbezüglich keine immunhistochemische Differenzierung möglich war und nur Aussagen über den Gesamtgehalt an Ubiquitin in den Podozyten möglich waren. Eine vermehrte UCH-L1 Expression in den Podozyten war mit einer Akkumulation von Ubiquitin in den Podozyten assoziiert.

A



B

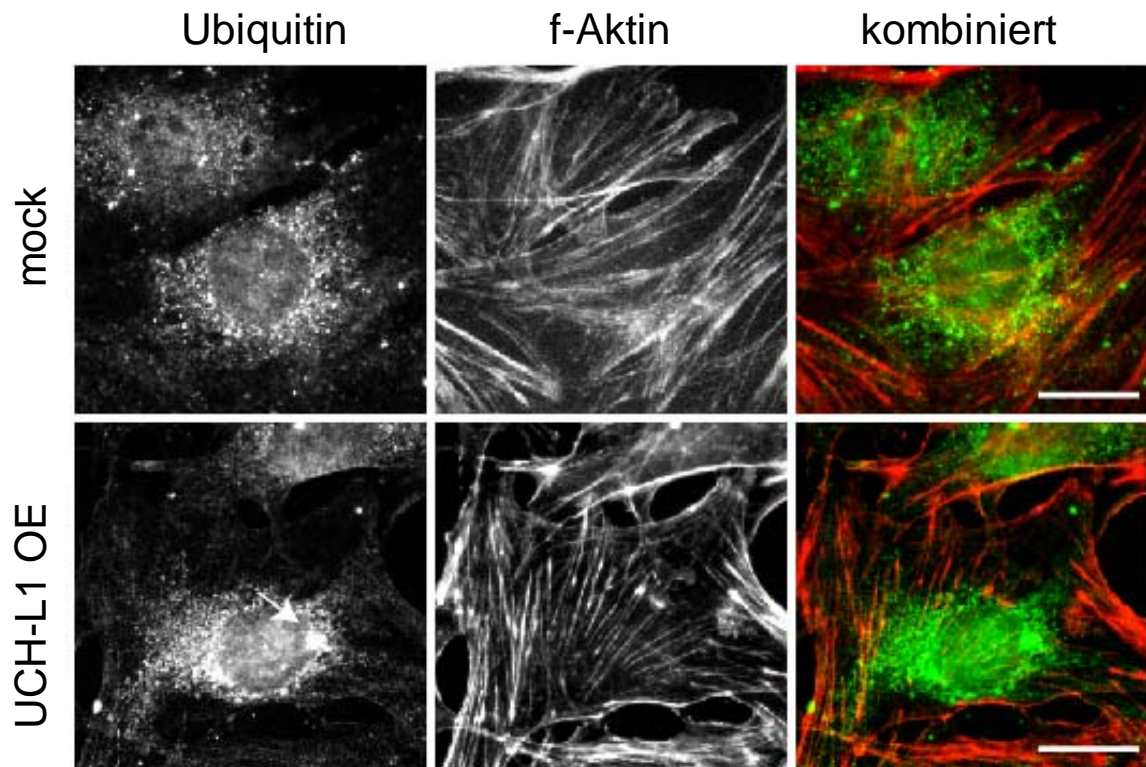


Abb 20: UCH-L1 Überexpression führt zur Akkumulation von Ubiquitin A) Repräsentativer Westernblot differenzierter UCH-L1 OE und shRNA Podozyten und ihren Kontrollzellen gegen Ubiquitin und β -Aktin als Ladekontrolle. B) Repräsentative konfokale Aufnahmen differenzierter UCH-L1 OE und mock Podozyten nach Immunfluoreszenzfärbung gegen Ubiquitin (grün) und filamentöses Aktin (rot) in 400 facher Vergrößerung. Pfeil deutet auf größere Ubiquitinsammlungen hin. Balken 1000 μ m

4.3.1.2 Reduktion der proteasomalen Aktivität durch die UCH-L1

In den UCH-L1 überexprimierenden Podozyten wurde ein erhöhter Gehalt an Mono- und Polyubiquitin festgestellt. Unklar ist jedoch, wie es zur Akkumulation von Ubiquitin bei UCH-L1 Überexpression kommt.

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte bei der PHN gezeigt werden, dass ein erhöhter Ubiquitingehalt assoziiert war mit einer gesteigerten Expression der UCH-L1 und einer reduzierten proteasomalen Aktivität. Die UCH-L1 ermöglicht durch die Bereitstellung von freiem Monoubiquitin die Polyubiquitinierung von Proteinen. Durch die anschließende proteasomale Degeneration der Proteine werden kleinere freie Ubiquitinketten generiert. Es ist bekannt, dass freie Ubiquitinketten einen inhibitorischen Effekt auf das UPS haben und die proteasomale Aktivität, und damit den Abbau von polyubiquitinierten Proteinen, behindern können (71,72). Es könnte demnach sein, dass UCH-L1 über die Bereitstellung von Monoubiquitin zunächst die Polyubiquitinierung von Proteinen und anschließend die Generierung von freien

Ubiquitinketten ermöglicht, die direkt zu einer Hemmung des Proteasoms und damit zur Akkumulation von Ubiquitin führen.

Untersucht wurde der Aktivitätsstatus des Proteasoms durch die Messung der Hauptaktivität des Proteasoms in den verschiedenen Zelllinien mittels „Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität“. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität des Proteasom bei den Podozyten mit fehlender UCH-L1 Expression (shRNA) gegenüber den Kontrollzellen.

Da unterschiedliche proteasomale Aktivitäten auch durch einen verringerten oder erhöhten Gehalt der Zellen an Proteasomen verursacht werden könnten, sollte dies anschließend durch Westernblotanalysen gegen $\beta 5$, eine Untereinheit des Proteasoms, ausgeschlossen werden. Aufgrund der einheitlichen Expression von $\beta 5$ bei allen Zelllinien im Westernblot konnte ein erhöhter Gehalt an Proteasomen als Ursache für die erhöhte Aktivität ausgeschlossen werden. Bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten konnte kein signifikanter Unterschied in der proteasomalen Aktivität gegenüber den Kontrollzellen (mock) festgestellt werden.

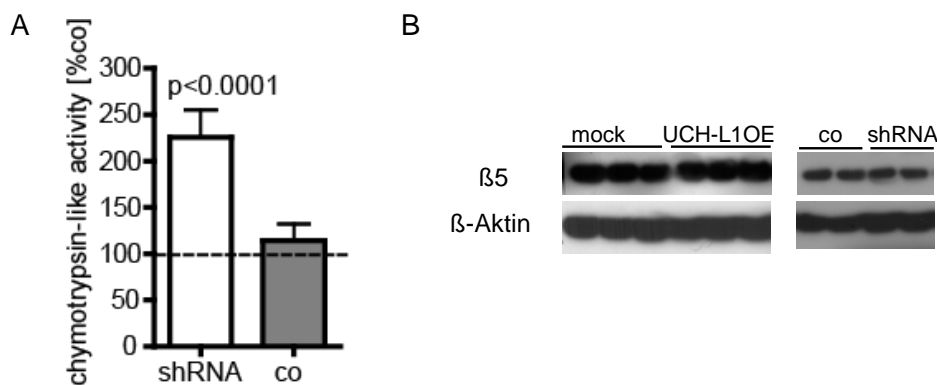


Abb 21: Knockdown der UCH-L1 in Podozyten führt zu erhöhter proteasomaler Aktivität. A) Bestimmung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms durch Messung der Chymotrypsin-ähnlichen-Aktivität differenzierter shRNA und Kontrollpodozyten mit n=9 Gesamtzelllysaten je Gruppe. Angabe der Werte als MW +/- SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test ermittelt. B) Repräsentativer Westernblot differenzierter UCH-L1 OE und shRNA Podozyten und ihren Kontrollzellen gegen die $\beta 5$ -Einheit des Proteasoms und β -Aktin als Ladekontrolle.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass die UCH-L1 eine inhibitorische Wirkung auf die proteasomale Aktivität ausübt und dadurch zur Akkumulation von Ubiquitin führen könnte.

4.3.1.3 Ubiquitinaggregatbildung bei UCH-L1 Überexpression

Zusätzlich zur Akkumulation von Ubiquitin korrelierte bei der humanen mGN die UCH-L1 Expression mit einer Ubiquitinaggregatbildung. Auch in der PHN konnte eine Bildung von Ubiquitinaggregaten in den Podozyten kranker Tiere festgestellt werden,

nachdem deren proteasomale Aktivität reduziert war. Dies war jedoch erst nach langer Krankheitsdauer (> ein Jahr) der Fall. Zu Beginn der Erkrankung, bei normaler proteasomaler Aktivität, konnte nur eine UCH-L1 Überexpression und eine Ubiquitinakkumulation, jedoch keine Aggregatbildung festgestellt werden. Nachdem in den Podozyten kranker Tiere das Proteasom durch den Inhibitor MG132 gehemmt wurde, konnte eine Aggregatbildung induziert werden. Folgender Versuch sollte in der Zellkultur wiederholt werden und klären, ob die Aggregatbildung in den Podozyten Folge einer UCH-L1 Überexpression bei gleichzeitig gehemmter proteasomaler Aktivität sein könnte. Da die proteasomale Aktivität in den UCH-L1 überexprimierenden Podozyten nicht reduziert war, wurde bei differenzierten UCH-L1 überexprimierenden Podozyten und Kontrollzellen das Proteasom durch Inkubation mit MG132 gehemmt. Die anschließend angefertigte Immunfluoreszenz gegen Ubiquitin zeigte in den mock-transfizierten Zellen eine Akkumulation von Ubiquitin, jedoch keine signifikante Aggregatbildung. Im Gegensatz dazu konnte in den Zellen mit UCH-L1 Überexpression eine Ubiquitinakkumulation und eine starke Aggregatbildung nachgewiesen werden. UCH-L1 defiziente Zellen zeigten dagegen nach Behandlung mit MG132 keine Aggregate.

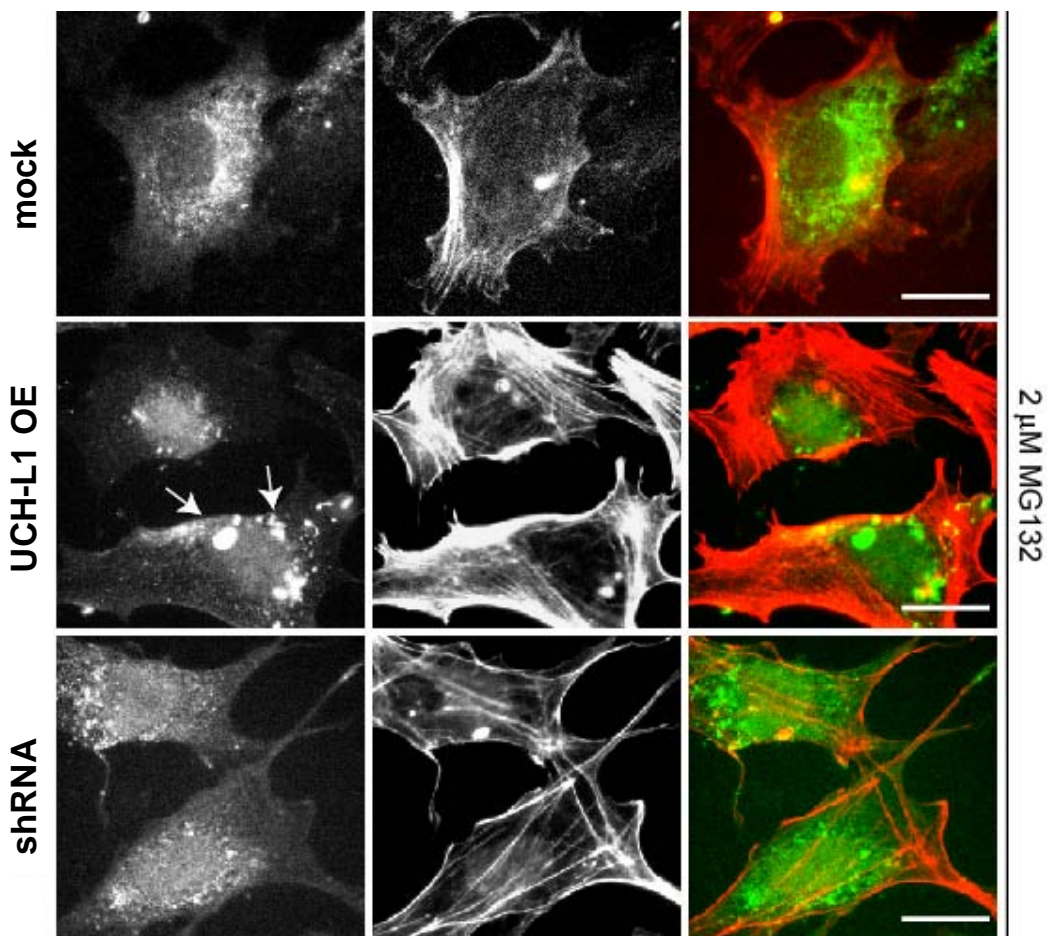


Abb 22: Ubiquitinaggregatbildung bei UCH-L1 Überexpression nach Hemmung des Proteasoms durch MG132. Repräsentative konfokale Aufnahmen differenzierter UCH-L1 OE, mock und shRNA-Podozyten nach Inkubation mit 1 μ M MG132 für 7 h und

anschließender Immunfluoreszenzfärbung gegen Ubiquitin (grün) und filamentöses Aktin (rot) in 630 facher Vergrößerung. Pfeile deuten auf Ubiquitinaggregate hin. Balken entsprechen 1000 µm.

Insgesamt bestätigen diese Daten die Ergebnisse der *in vivo* Experimente und deuten darauf hin, dass eine erhöhte UCH-L1 Expression zur Akkumulation von Ubiquitin führt. Als Folge einer Proteasomhemmung bei Überexpression von UCH-L1 kommt es zur Bildung von Ubiquitinaggregaten, während eine alleinige Hemmung des Proteasoms durch MG132 ohne UCH-L1 Überexpression dafür nicht ausreicht.

4.3.1.4 UCH-L1 führt zu vermehrter K63-Polyubiquitinierung

Die UCH-L1 hat zwei beschriebene enzymatische Aktivitäten. Einerseits ist sie durch ihre Hydrolaseaktivität in der Lage freies Monoubiquitin für weitere Konjugationen zu generieren. Nach Dimerisierung der UCH-L1 erlangt sie eine Ligaseaktivität, die zu einer Verkettung von Ubiquitinmonomeren an K63 führt. Eine K63-verlinkte Polyubiquitinierung von Proteinen ist eine Alternative zur typischen Ubiquitinierung von Proteinen an Lysin 48. Anstelle der Degradation des markierten Proteins über das UPS, dient eine K63-verlinkte Polyubiquitinierung unter anderem als Zielsetzung für den Abbau über den lysosmalen Degradationsweg (35).

Interessanterweise konnte durch Westernblot Analysen gegen K63-verlinktes Ubiquitin ein Anstieg dieser alternativen Ubiquitinierung bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten und entsprechend dazu eine Abnahme der K63-Ubiquitinierung bei Podozyten mit UCH-L1 Defizienz festgestellt werden.

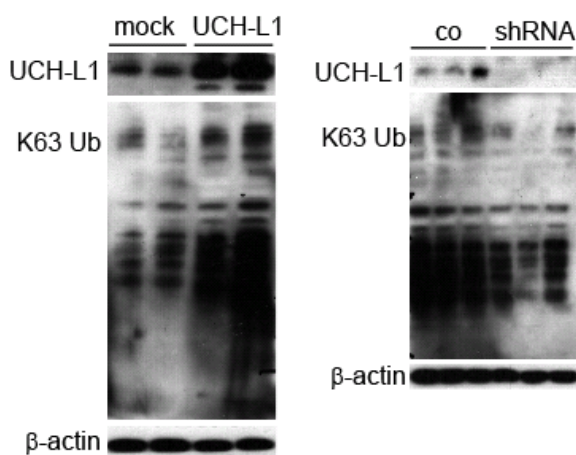


Abb 23: Vermehrte Ubiquitinierung an Lysin 63 bei UCH-L1 Überexpression.

Repräsentativer Westernblot differenzierter UCH-L1 OE und shRNA Podozyten und ihren Kontrollen gegen K63 verlinktes Ubiquitin mit β -Aktin als Ladekontrolle.

Eine vermehrte Polyubiquitinierung an Lysin 63 könnte durch eine erhöhte Ligaseaktivität der UCH-L1 bei deren Überexpression verursacht werden. Außerdem könnte die vermehrte Polyubiquitinierung an K63 mit Ziel der lysosmalen Degradation von Proteinen als Versuch der Podozyten mit UCH-L1 Überexpression

gedeutet werden, die mögliche inhibitorische Wirkung der UCH-L1 auf das Proteasom durch gesteigerte Degradation von Proteinen über den lysosomalen Degradationsweg auszugleichen. Eine weitere Erklärung für die Akkumulation K63 verknüpften Ubiquitins wäre dessen verringerter Abbau aufgrund einer gehemmten Autophagie der Podozyten mit UCH-L1 Überexpression.

4.3.2 Die UCH-L1 beeinflusst die Lysosomal und Autophagie vermittelte Proteindegradation

In eukaryoten Zellen existieren verschiedene Systeme der Proteolyse. Neben dem Energie-abhängigen Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System können viele Moleküle auch intrazellulär durch Lysosomen degradiert werden. Dieser zelluläre Abbauprozess wird als Autophagie bezeichnet.

Da ein Zusammenhang der UCH-L1 Expression und der Ubiquitinierung von Proteinen an Lysin 63, festgestellt werden konnte, wurde anhand folgender Experimente der Einfluss der UCH-L1 auf die Autophagie untersucht.

4.3.2.1 Verstärkte Autophagie und Verbrauch von LC-3 durch Überexpression von UCH-L1

Zunächst wurden die mit Autophagie assoziierten Proteine p62 und LC-3 mittels Westernblotanalysen untersucht, um zu überprüfen, ob die vermehrte K63-Polyubiquitinierung von Proteinen auf eine gehemmte Autophagie zurückgeführt werden konnte. Da p62 als Signalprotein für die Bindung von LC-3 an K63 polyubiquitinierte Proteine dient (39), und damit der Abbau des Proteins durch Autophagie festgelegt wird, spielt die Expression von p62 und LC-3 eine wichtige Rolle bei der Untersuchung und Interpretation der Autophagie.

Die Westenblots zeigten eine deutlich sichtbar geringere Menge von p62 bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten im Gegensatz zu Kontrollzellen. Diese verminderte Expression von p62 bei UCH-L1 Überexpression könnte durch einen gesteigerten Verbrauch des Proteins bei gesteigerter Autophagie der Podozyten oder durch eine gesteigerte Expression bzw. Induktion hervorgerufen werden.

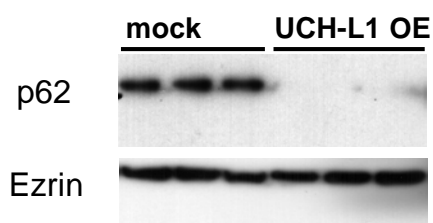


Abb 24: UCH-L1 Überexpression führt zu erniedrigtem Gehalt von p62. Repräsentativer Westerblot differenzierter UCH-L1 OE und Kontrollpodozyten gegen p62 und Ezrin als Ladekontrolle.

Zusätzlich zu p62 wurde die Expression von LC-3, ein Marker für die Bildung von Autophagolysosomen (38), durch Westernblotanalysen und Immunfluoreszenz untersucht. Der Antikörper erkannte gleichermaßen das zytoplasmatisch vorkommende LC-3I und das vesikulär enthaltene LC-3II. Die Detektion von LC-3I im Westernblot ist weniger sensitiv als die von LC-3II, sodass im Folgenden meist nur LC-3II dargestellt werden konnte (40).

In der Immunfluoreszenz konnten durch die Färbung von LC-3 Autophagosomen sichtbar gemacht werden, die bei UCH-L1 Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen vergrößert aber nicht vermehrt zu sehen waren. Im Westernblot zeigte sich eine leicht vermehrte LC-3 Expression bei UCH-L1 Überexprimierenden Podozyten (Abb. 25 A).

Die Interpretation eines Westernblot gegen LC-3 ist jedoch schwierig, da dieses Protein selbst durch Hydrolasen nach Fusion der Lysosomen mit den Autophagosomen abgebaut wird. Um die tatsächlich vorhandene Menge an LC-3 in den Podozyten zu bestimmen, wurden die Zellen für 24 h mit 1 μ M Pepstatin A (gelöst in DMSO) inkubiert und anschließend erneut Westernblotanalysen gegen LC-3 durchgeführt. Pepstatin A ist ein spezifischer Inhibitor saurer Proteasen und Hydrolasen und hat somit eine hemmende Wirkung auf die Hydrolyse innerhalb der Lysosomen und damit auf die Degradation des autophagosomal gebundenen LC-3.

Es zeigte sich sowohl bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten als auch bei der Kontrolle eine Zunahme an LC-3. Daraus lässt sich schließen, dass in beiden Zelllinien Autophagie, das heißt die Bildung von Autophagosomen und deren Fusion mit Lysosomen mit anschließender Degradation von LC-3 stattfindet, da eine Hemmung durch Pepstatin A zu einer Stabilisierung von LC-3 führte (Abb. 25 B). Die Ursache und der Mechanismus, die zu der Zunahme der Autophagie bei Überexpression von UCH-L1 führen, sind unklar.

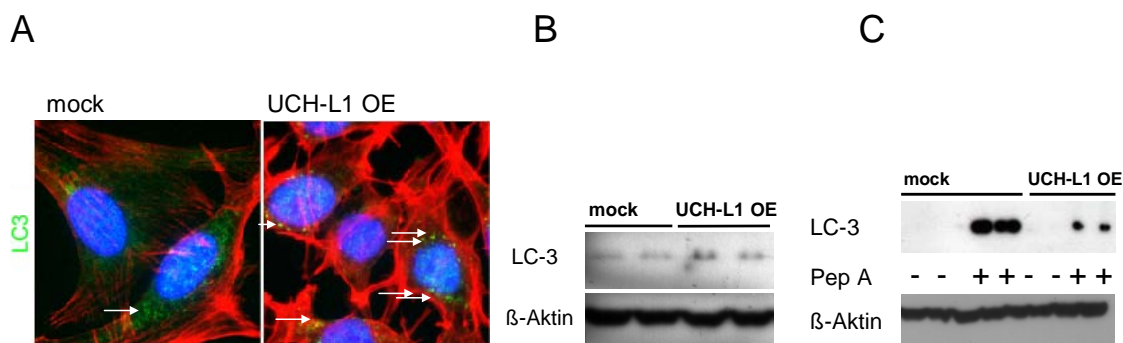
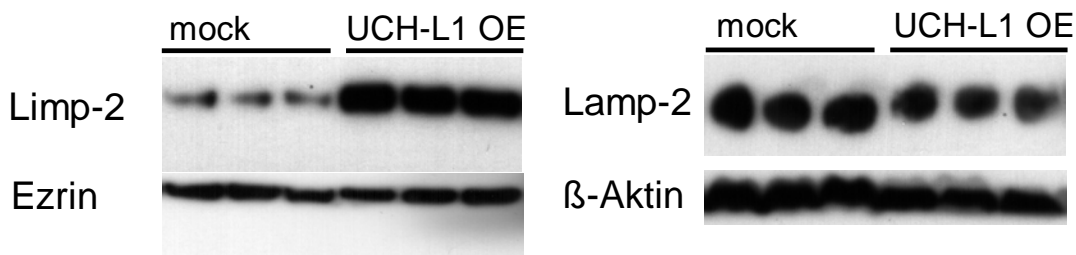


Abb 25: UCH-L1 Überexpression führt zu gesteigerten Verbrauch von LC-3 durch vermehrte Autophagie. A) Repräsentativer Westernblot differenzierter UCH-L1 OE und Kontrollpodozyten gegen LC-3 und β -Aktin als Ladekontrolle. B) Repräsentative Aufnahmen differenzierter Podozyten nach Immunfluoreszenzfärbung gegen LC-3 (FITC, grün), filamentöses Aktin (Phalloidin, rot) und den Zellkern (DAPI, blau) in 40 facher Vergrößerung C) Repräsentativer Westernblot differenzierter UCH-L1 OE und Kontrollpodozyten gegen

LC-3 und β -Aktin als Ladekontrolle nach Inhibitor (+) der lysosomalen Hydrolasen mit 1 μ M Pepstatin A (PepA) für 24 h

Da die Akkumulation von K63 polyubiquitinierten Proteinen, die bei den UCH-L1 überexprimierenden Podozyten festgestellt werden konnte, auch aufgrund einer veränderten lysosomalen Degradation beruhen könnte, wurde auch das lysosomale Kompartiment durch Westernblotanalysen und Immunfluoreszenzfärbungen gegen die lysosomalen Membranproteine Limp-2 und Lamp-2 untersucht. Es konnte ein starker Anstieg der Expression von Limp-2 bei Podozyten mit UCH-L1 Überexpression im Gegensatz zu mock Kontrollzellen festgestellt werden. Interessanterweise zeigte der Westernblot gegen Lamp-2 das Gegenteil. UCH-L1 überexprimierende Podozyten zeigten gegenüber den mock Kontrollzellen eine deutlich verringerte Expression von Lamp-2. Die Immunfluoreszenzfärbungen gegen Limp-2 und Lamp-2 bestätigten die Ergebnisse der Westernblots.

A



B

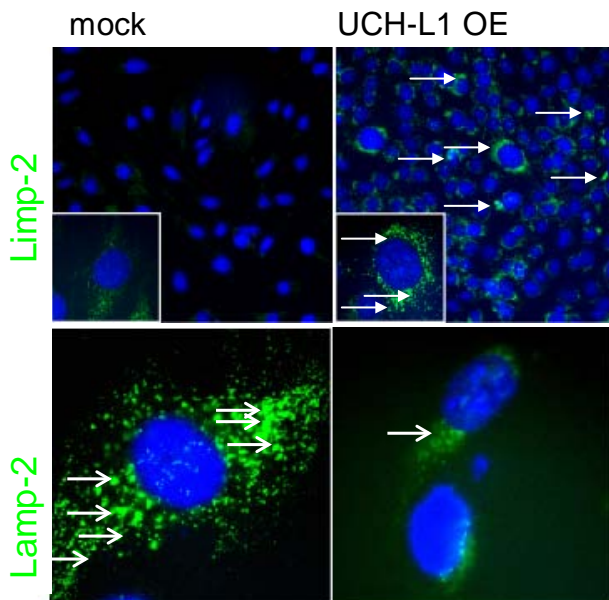


Abb 26: UCH-L1 beeinflusst die Expression der lysosomalen Membranproteine Limp-2 und Lamp-2.

A) Repräsentativer Westernblot differenzierter UCH-L1 OE und Kontrollpodozyten gegen Limp-2 und Lamp-2 und Ezrin bzw. β -Aktin als Ladekontrolle. B) Repräsentative Aufnahmen differenzierter Podozyten nach Immunfluoreszenzfärbung gegen Limp-2 und Lamp-2 (jeweils FITC, grün) und Zellkerne (DAPI, blau) in 400 facher (Limp-2) und 1000 facher (Lamp-2) Vergrößerung. Pfeile deuten auf Lysosomen hin.

Insgesamt deuten diese Daten auf einen Einfluss von UCH-L1 auf das autophagosomale/lysosomale System hin.

4.3.2.2 Gehemmte Autophagie bei UCH-L1 Knockdown

Bei UCH-L1 Überexpression wurde das autophagosomale/lysosomale System beeinflusst. Dies könnte eine UCH-L1-unabhängige Reaktion der Podozyten sein, um die stabile UCH-L1 Überexpression von großen UCH-L1-Proteinmengen zu reduzieren. Um einen spezifischen Einfluss der UCH-L1 auf die Autophagie zu zeigen, wurde das autophagosomale/lysosomale System in UCH-L1 defizienten Podozyten untersucht.

Zunächst wurde die Autophagie mittels Westernblot und Immunfluoreszenz gegen p62 und LC-3 untersucht. Der Westernblot gegen p62 zeigte einen deutlichen Anstieg des Proteins bei Podozyten mit fehlender UCH-L1 Expression gegenüber den Kontrollzellen. Der Westernblot und die Immunfluoreszenz gegen LC-3 zeigten ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression bei UCH-L1 defizienten Zellen. Die Doppelbande zeigt sowohl die Detektion von LC-3I (16kD), als auch von LC-3II (14kD).

Um die tatsächliche Menge an LC-3 in Podozyten beurteilen zu können, wurden zusätzlich die sauren Hydrolasen durch Zugabe von Pepstatin A gehemmt. Nach der Hemmung zeigte sich bei fehlender UCH-L1 Expression im Gegensatz zu den Kontrollzellen nur eine leichte Zunahme und damit keine deutliche Stabilisation von LC-3. Dies deutet auf einen gehemmten Autophagosomenumsatz hin.

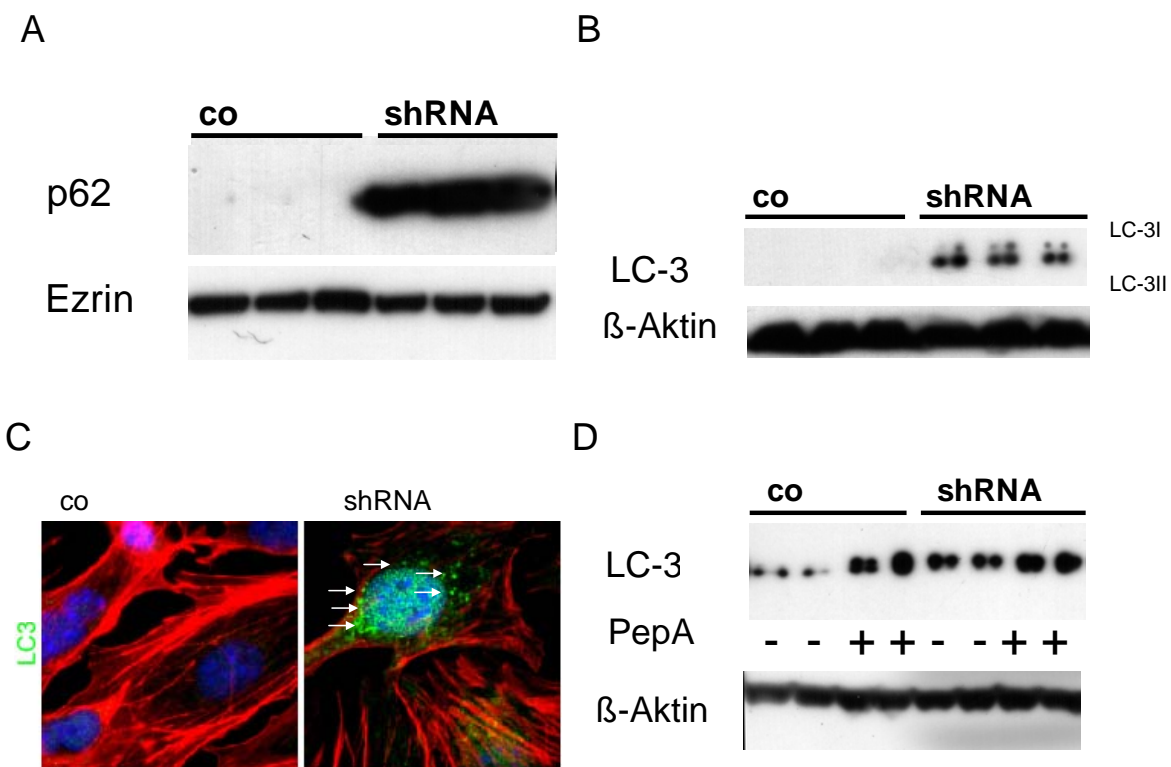
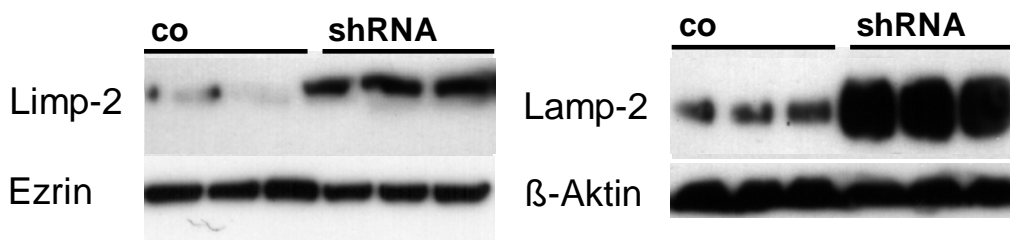


Abb 27: UCH-L1 Knockdown führt zur Akkumulation von Autophagosomen. A) Repräsentativer Westernblot differenzierter shRNA und Kontrollpodozyten gegen p62 und Ezrin als Ladekontrolle. B) Repräsentativer Westernblot differenzierter shRNA und Kontrollpodozyten gegen LC-3 und β-Aktin als Ladekontrolle. C) Repräsentative Aufnahmen

differenzierter Podozyten nach Immunfluoreszenzfärbung gegen LC-3 (grün), filamentöses Aktin (rot) und den Zellkern (blau) in 400 facher Vergrößerung. D) Repräsentativer Westernblot differenzierter shRNA und Kontrollpodozyten gegen LC-3 und β -Aktin als Ladekontrolle nach Inhibitor (+) der Autophagie mit 1 μ M Pepstatin A für 24 h. Die Pfeile deuten auf Autophagosomen hin.

Da die Akkumulation von Autophagosomen möglicherweise durch eine verminderte lysosomale Degradation aufgrund einer verminderten Anzahl an Lysosomen oder aufgrund einer gestörten Fusion von Autophagosomen und Lysosomen beruhen könnte, wurde bei UCH-L1 defizienten Podozyten die Expression der lysosomalen Membranproteine Limp-2 und Lamp-2 untersucht. Sowohl der Westernblot als auch die Immunfluoreszenz gegen Limp-2 und Lamp-2 ergaben einen deutlichen Anstieg der Expression bei UCH-L1 defizienten Podozyten gegenüber den Kontrollzellen. Die gehemmte Autophagie bei Podozyten ohne UCH-L1 Expression ist somit nicht auf eine verminderte Anzahl an Lysosomen, sondern könnte eher auf eine gestörte Fusion mit Lysosomen zurück zu führen sein.

A



B

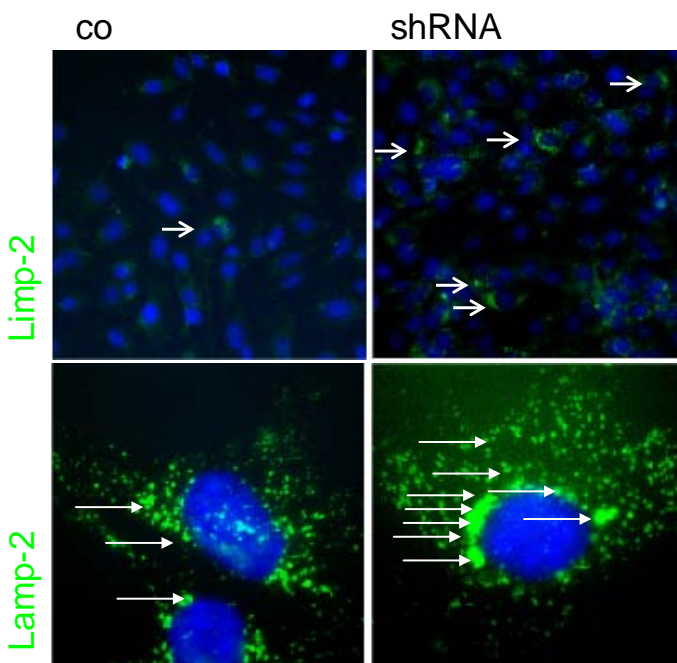


Abb 28: UCH-L1 Defizienz führt zu verstärkter Expression der lysosomalen Membranproteine Limp-2 und Lamp-2. A) Repräsentativer Westernblot differenzierter shRNA und Kontrollpodozyten gegen Limp-2 und Lamp-2 und Ezrin bzw. β -Aktin als Ladekontrolle.

B) Repräsentative Aufnahmen differenzierter Podozyten nach Immunfluoreszenzfärbung gegen Limp-2 und Lamp-2 (jeweils FITC, grün) und Zellkerne (DAPI, blau) in 400 facher (Limp-2) und 1000 facher (Lamp-2) Vergrößerung. Die Pfeile deuten auf Lysosomen hin

Insgesamt wird deutlich, dass die UCH-L1 in der Regulation der Autophagie als alternativen Proteindegradationsweg eine große Rolle spielen könnte. Weiterführende Experimente sind daher notwendig, um zu verstehen, wie und warum die UCH-L1 die Autophagie und lysosomale Degradation beeinflusst und wie die festgestellte Akkumulation von K63- und K48- Ubiquitin unter UCH-L1 Überexpression zu erklären ist.

4.4 Die Passive Heymann Nephritis

4.4.1 Klinik der Passiven Heymann-Nephritis

In der humanen membranösen Glomerulonephritis konnte eine UCH-L1-Neuexpression in Podozyten beobachtet werden (64). Die Passive Heymann Nephritis, eine experimentelle Glomerulonephritis der Ratte, besitzt große morphologische und funktionale Ähnlichkeiten mit der humanen mGN. In Vorversuchen konnte auch in der PHN eine de novo Expression der UCH-L1 in den Podozyten der Ratte festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob die UCH-L1 einen schädigenden oder begrenzenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausübt, wurde in Ratten die Passive Heymann Nephritis induziert. Die Hydrolaseaktivität der UCH-L1 wurde durch Applikation des spezifischen Hemmstoffs LDN 57444 reversibel gehemmt, um neue Erkenntnisse über den Einfluss und die Rolle des Enzyms bei podozytärer Schädigung zu erhalten.

Vier Tage nach der Induktion der Nierenerkrankung durch Injektion des FX1A-Serums wurde sechs PHN-Tieren (und sechs gesunden PI-Kontrolltieren) der spezifische Hemmstoff der Hydrolaseaktivität der UCH-L1, LDN 57444, über osmotische Minipumpen appliziert.

4.4.1.1 Körpergewicht

Klinisch zeigte sich bei den Tieren ein signifikanter Unterschied in der Entwicklung des Körpergewichtes. Die Tiere wurden zu Beginn der Staffel an Tag 6 (2 Tage nach Implantation der Pumpen mit LDN) und am Tag der Organentnahme (Tag 17) gewogen. An Tag 6 wogen die Tiere 271g (+/- 6,855g) und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiergruppen. An Tag 17 zeigte sich eine deutliche Zunahme des Körpergewichtes der mit Präimmunserum (PI) behandelten Kontrolltiere (co) im Vergleich zu den PI-Tieren, die an Tag 4 eine Pumpe mit dem spezifischen Hemmstoff der Hydrolaseaktivität der UCH-L1, LDN 57444, implantiert bekommen hatten (co+LDN). Die Kontrolltiere mit Pumpe wogen an Tag 17 (Pumpengewicht herausgerechnet) 323g (+/- 8,2g), während die Kontrollgruppe nur 281g (+/- 12,1) wog. Es zeigte sich darüber hinaus auch ein signifikanter Unterschied der Gewichtszunahme zwischen den kranken PHN Tieren und den PHN-Tieren mit UCH-L1 Inhibitor (PHN+LDN). Während an Tag 6 noch kein Unterschied im Körpergewicht bestand, wogen die PHN+LDN-Tiere an Tag 17 329g (+/- 4,7g; Pumpengewicht herausgerechnet) und damit signifikant weniger als die PHN-Tiere mit 354g (+/- 6,8g).

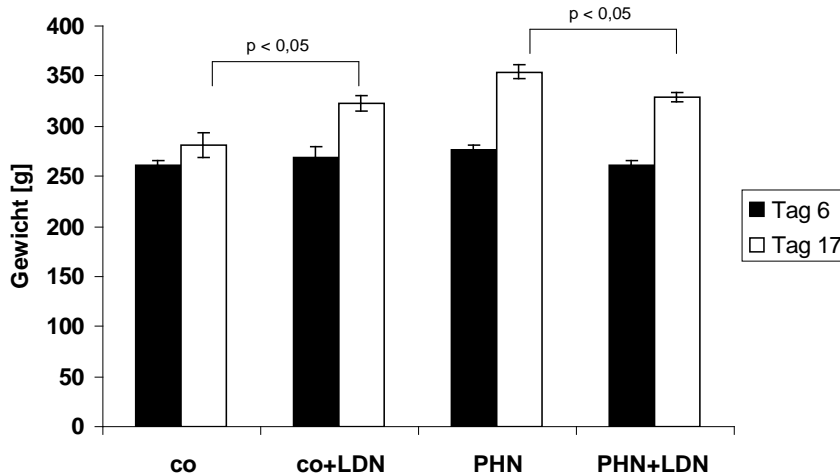


Abb 29: Körpergewicht an Tag 6 und Tag 17. Durchschnittliches Gewicht der Tiere in g, das Pumpengewicht ist herausgerechnet. Die Werte sind angegeben als MW +/- SEM, die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test ermittelt. n=4 Tiere bei co und PHN und n= 6 bei co+LDN und PHN+LDN

4.4.1.2 Serum- Harnstoff und Serum-Kreatinin

Bei Vergleich der Kreatinin- als auch der Harnstoffwerte aus dem Blutserum aller Tiergruppen zeigten sich wie auch in den Vorversuchen keine signifikanten Unterschiede. Das Kreatinin, angegeben in mg/dl Serum, betrug bei der gesunden PI Gruppe 0,28 +/- 0,025 und bei den PI-Tieren mit Inhibitor 0,33 +/- 0,03. Bei den PHN-Tieren wurde ein Mittelwert von 0,22 +/- 0,02 gemessen und bei den PHN-Tieren mit Inhibitor 0,21 +/- 0,01. Der Harnstoffgehalt, angegeben in mg/dl Serum, zeigte bei der PI-Tiergruppe einen Mittelwert von 19,5 +/- 1,26 und bei den PI-Tieren mit Inhibitor 25,0 +/- 1,15. Bei der PHN-Gruppe betrug der Harnstoffgehalt im Serum 16,25 +/- 1,18 und bei der PHN-Gruppe mit Inhibitor 18,8 +/- 0,54.

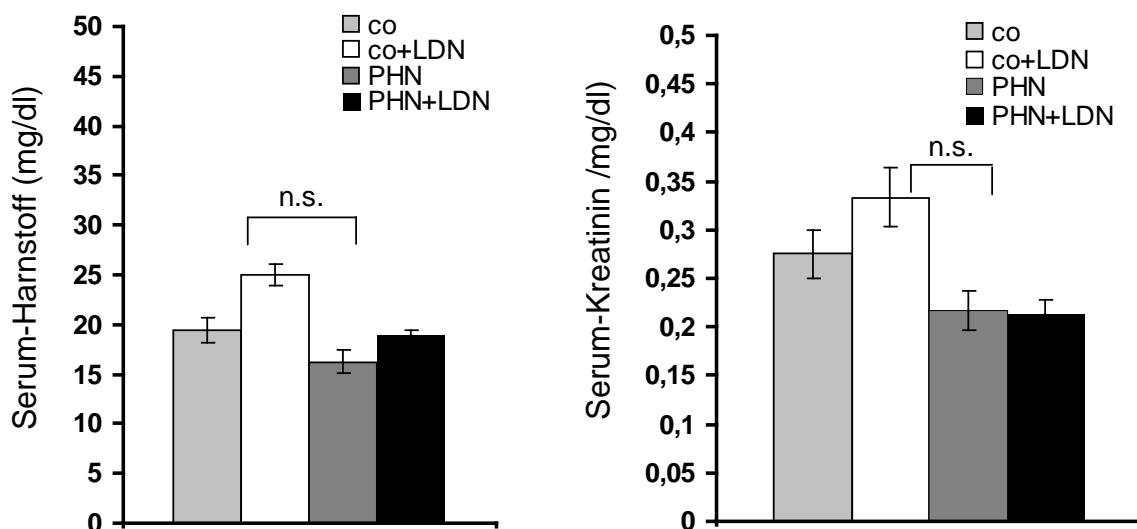


Abb 30: Serum-Harnstoff- und Serum-Kreatinin-Werte Tag 17. Die Daten sind dargestellt als MW +/- SEM, die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test untersucht.

4.4.1.3 UCH-L1 Überexpression bei PHN

Mittels UCH-L1 Immunhistochemie wurde untersucht, ob es zu einer UCH-L1 Neuexpression in Podozyten bei PHN kam, und ob diese durch die UCH-L1 Hemmung verändert wurde.

Es zeigte sich eine immunhistochemisch nachweisbare UCH-L1 Neuexpression in den Podozyten der PHN-Tiere mit und ohne Inhibitor. In den Podozyten der PI-Tiere konnte keine UCH-L1-Expression nachgewiesen werden. Die glomerulären Parietalzellen sowohl der PHN- und als auch der PI-Tiere zeigten eine UCH-L1 Expression (62, 63). Interessanterweise zeigte sich in den mit LDN 57444 behandelten PHN-Tieren ein deutlicher Anstieg der UCH-L1 Expression. In den PI-Tieren die mit dem Inhibitor behandelt wurden, konnte eine leichte Induktion der UCH-L1 in den Podozyten festgestellt werden.

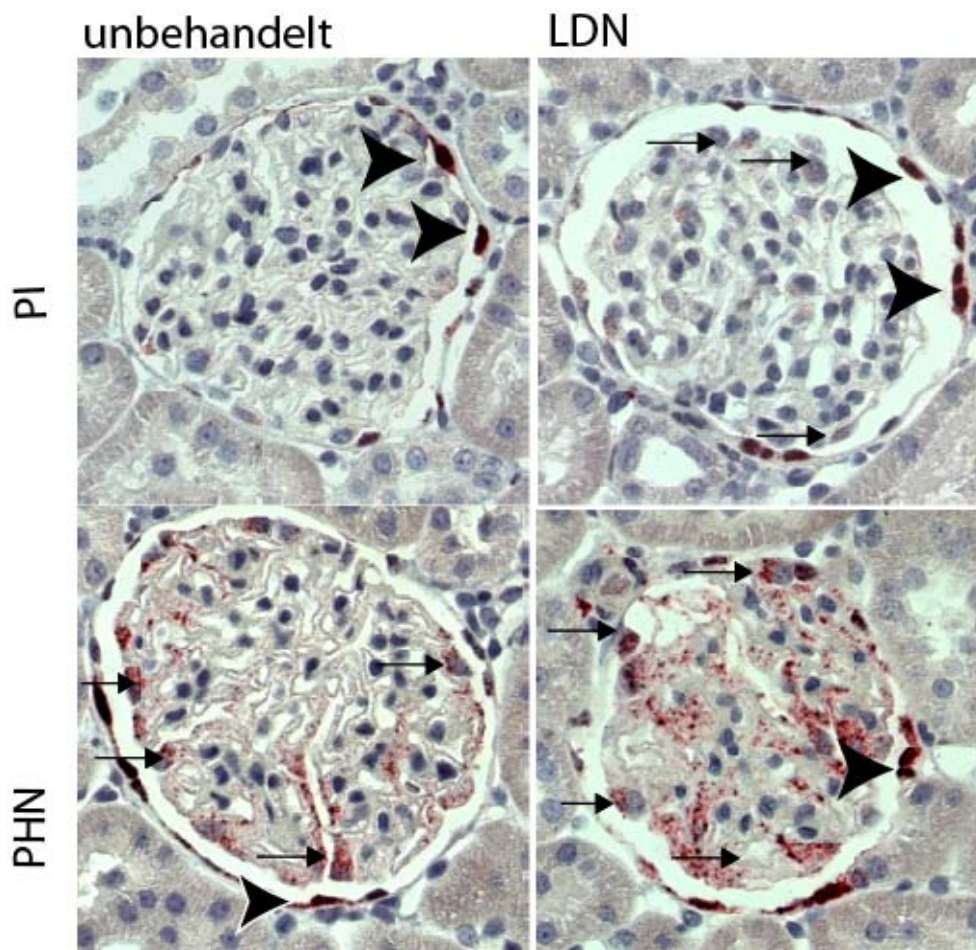


Abb 31: Podozytäre UCH-L1-Neuexpression bei PHN und Zunahme der UCH-L1 Expression bei Behandlung mit LDN 57444. Repräsentative Aufnahmen von Glomeruli nach UCH-L1-Immunhistochemie in 40 facher Vergrößerung. UCH-L1 positive Zellen sind rot gefärbt. Pfeilkopf deutet auf Parietalzellen hin. Pfeile zeigen Podozyten mit de novo Expression von UCH-L1.

4.4.2 Verringerte podozytäre Schädigung in der PHN durch Inhibition der UCH-L1 Hydrolaseaktivität

Zur Darstellung der glomerulären Strukturen, der Podozyten und der Basalmembran wurde von Nierengewebeschnitten aller Tiere eine PAS-Färbung gemacht. Anhand dieser Färbemethode konnte ein Unterschied in der glomerulären und podozytären Struktur der Glomeruli zwischen den PHN-Tieren mit und ohne Inhibitor festgestellt werden.

Neben der vermehrt granulären Struktur der GBM, wurden in den Glomeruli der PHN-Tiere eine deutliche Größenzunahme der Podozyten und eine vermehrte Vakuolisierung des Zytoplasmas erkennbar. In den PHN-Tieren, die mit dem UCH-L1-Inhibitor behandelt wurden, zeigten sich die pathologischen Veränderungen der Glomeruli weniger stark ausgeprägt. Vor allem die Größenzunahme der Podozyten konnte nur noch vereinzelt beobachtet werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Hemmung der neu exprimierten UCH-L1 durch LDN 57444 zu einer verringerten podozytären Schädigung führen könnte. In den PI-Tieren wurde keine Verdickung und keine Veränderung der Podozyten und der glomerulären Struktur festgestellt. Auch die Behandlung der PI-Tiere mit dem Inhibitor führte zu keinen lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Glomeruli.

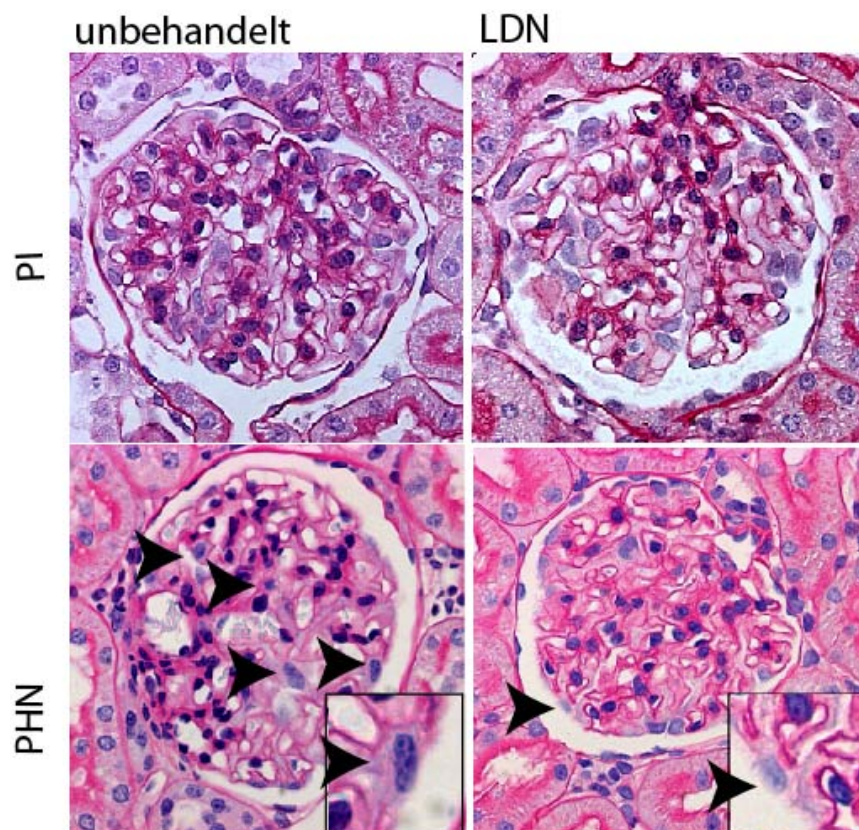


Abb 32: Verringerte Podozytäre Schädigung durch Hemmung der Hydrolaseaktivität der UCH-L1 durch LDN 57444. Repräsentative Aufnahmen von Nierengewebeschnitten nach PAS-Färbung in 400 facher Vergrößerung. Die Pfeilspitzen deuten auf Podozyten hin.

Ein zentrales Charakteristikum der PHN ist die Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen in der Lamina rara externa der glomerulären Basalmembran. Um zu beurteilen, ob die Immunkomplexeinlagerung und Alterierung der GBM im Zuge der PHN durch die Behandlung mit LDN 57444 verändert wurde, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Glomeruli gegen Kollagen IV angefertigt. Die Glomeruli der PI-Kontrolltiere mit und ohne LDN 57444 zeigten morphologisch keine pathologischen Veränderungen der Basalmembran.

Bei den PHN-Tieren mit und ohne Inhibitor zeigte sich dagegen eine diffuse Verdickung der GBM in den Kapillarschlingen gegenüber den PI-Tieren. Außerdem erschien die GBM in dieser Färbung als granuläre Struktur. Dies wird in der PHN durch die Ablagerung und Akkumulation von Immundepots an der Außenseite der GBM hervorgerufen. Bei Vergleich der Glomeruli der PHN-Tiere mit den PHN-Tieren, die mit dem UCH-L1 Inhibitor behandelt wurden, war kein Unterschied erkennbar.

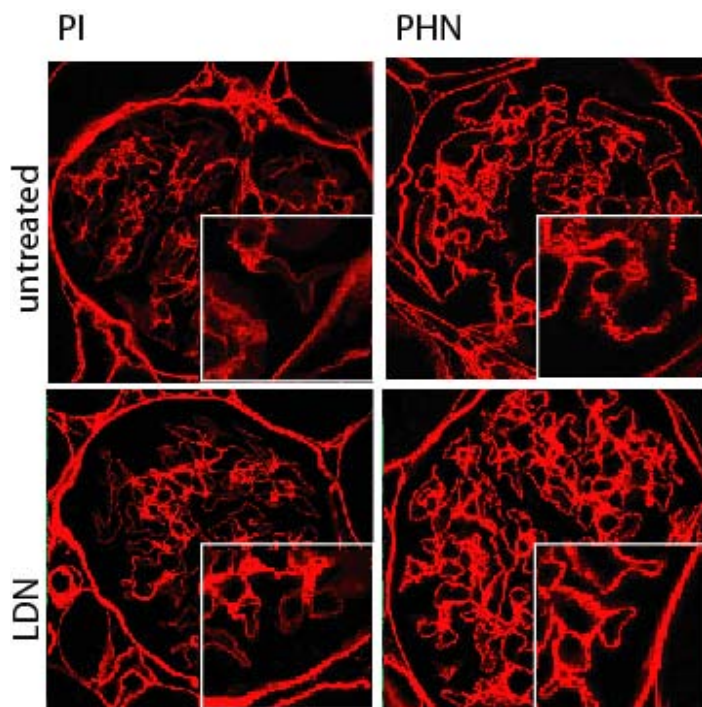


Abb 33: Darstellung der glomerulären Basalmembran.

Repräsentative konfokale Aufnahmen der Glomeruli nach Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen IV (rot) in 400 facher Vergrößerung.

4.4.3 Abnahme der Proteinurie bei PHN durch Hemmung der UCH-L1 Hydrolaseaktivität

In der Auswertung der Albumin-ELISA-Daten mit Normalisierung gegen den Kreatinin-Gehalt im Urin zeigte sich in den PHN-Tieren eine einsetzende Proteinurie ab Tag 6. Alle PHN-Tiere entwickelten innerhalb der ersten Woche nach Applikation des FX1A-Serums eine Proteinurie, die zwischen den einzelnen Tieren teilweise sehr stark variierte. In den Kontrolltieren, mit und ohne UCH-L1-Hemmung, wurde zu keinem Zeitpunkt eine Proteinurie beobachtet.

Bis zu Tag 10 der Staffel entwickelten die mit und ohne Inhibitor behandelten und PHN-Tiere eine vergleichbare Proteinuriestärke. Ab Tag 12 der Staffel zeigte sich in

der Entwicklung der Proteinurie erstmals ein signifikanter Unterschied. Die Proteinurie der PHN-Tiere ohne Inhibitor nahm im Verlauf der Staffel stark zu, während im Vergleich dazu der Gehalt an Albumin/Kreatinin im Urin der mit LDN 57444 behandelten PHN-Tiere nur noch leicht anstieg. Die PHN-Tiere, die mit dem Hemmstoff behandelt wurden, zeigten eine signifikant geringere Proteinurie als die PHN-Tiere ohne LDN57444. Dieser signifikante Unterschied in der Proteinuriestärke hielt bis zum Ende der Staffel an.

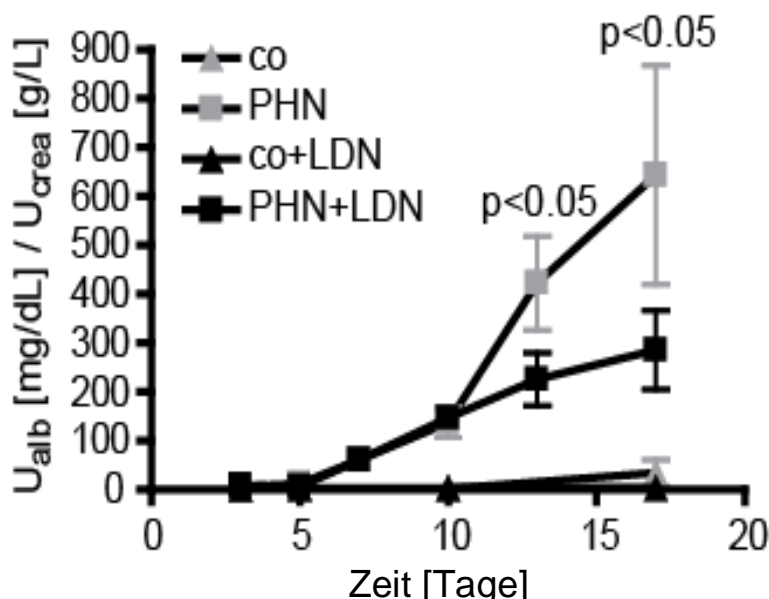


Abb 34: Hemmung der Hydrolaseaktivität durch LDN 57444 verringert die Proteinurie in der PHN. Der Albumingehalt wurde per ELISA quantifiziert und gegen den Kreatiningehalt [g/ Liter Urin] normalisiert. Die Werte sind dargestellt als MW +/- SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt, mit $n = 4$ bei co und PHN und $n = 6$ bei co+LDN und PHN+LDN. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant akzeptiert.

Da im ELISA nur der Albumingehalt im Urin erfasst werden konnte, wurde zusätzlich ein Coomassie Blue Stain der Rattenurine von Tag 17 angefertigt. Durch diese Methode wurden unspezifisch alle mit dem Urin ausgeschiedenen Proteine angefärbt und nachgewiesen. Entsprechend den Ergebnissen des ELISAs zeigte sich vor allem ein Unterschied in der Menge der Proteinausscheidung bei Proteinen mit einer Größe von etwa 70 kDa, welche der molekularen Masse von Albumin (69 kDa) entspricht. Die PHN-Tiere zeigten in diesem Bereich eine deutlich höhere Proteinurie als die PHN-Tiere, die mit dem UCH-L1-Inhibitor behandelt wurden. Auch eine Ausscheidung von Proteinen mit einer Molekülmasse über 70 kDa konnte bei PHN-Tieren im Gegensatz zu den mit LDN 57444 behandelten PHN-Tieren im Coomassie Blue Stain festgestellt werden. Somit zeigen die PHN-Tiere eine unselektive Proteinurie. Eine unselektive Proteinurie kommt bei schweren glomerulären Schäden vor und ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu Albumin größere Proteine

wie IgG mit dem Urin ausgeschieden werden (1). Bei den Kontrolltieren mit und ohne Inhibitor wurde keine pathologische Proteinurie festgestellt.

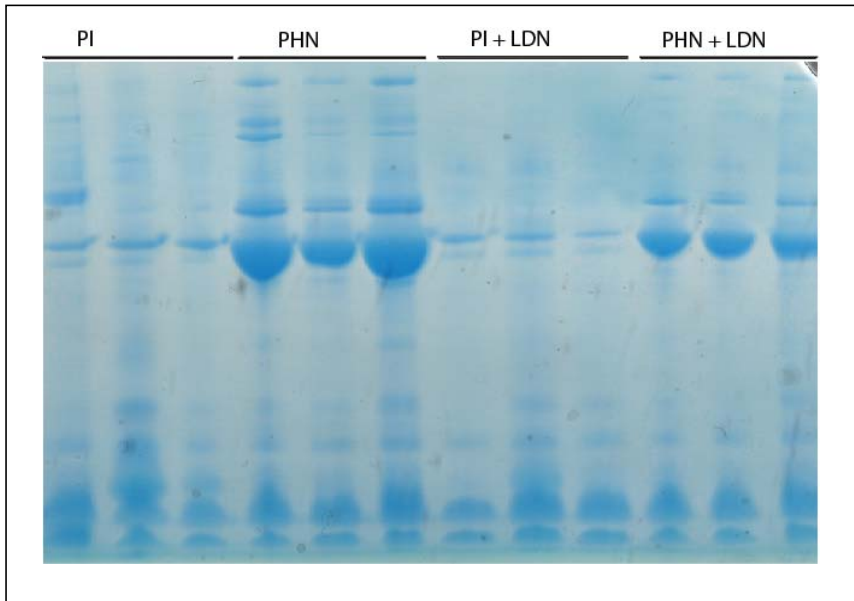


Abb 35: Hemmung der Hydrolaseaktivität durch LDN 57444 führt zu einer geringeren Proteinurie in der PHN. Coomassie Blue Stain des Albumingehalts der Rattenurine von Tag 17 mit einem n=3 pro Tiergruppe.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass eine Hemmung der UCH-L1 Hydrolaseaktivität durch LDN57444 die glomeruläre und podozytäre Schädigung verringert und es dadurch zu einer geringeren Proteinurieentwicklung in der mGN kommt.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Rolle von UCH-L1 für den podozytären Phänotyp und die podozytäre Proteindegradation. Außerdem sollte der Einfluss der UCH-L1 Aktivität auf den Verlauf der mGN untersucht werden.

Podozyten sind terminal differenzierte Zellen und weisen große morphologische und biochemische Ähnlichkeiten mit Neuronen auf. Beide besitzen lange Zellfortsätze und verfügen über eine ähnliche Organisation des Zytoskeletts mit vergleichbaren Mechanismen der Zellfortsatzbildung (17, 73). UCH-L1 könnte demnach die Differenzierung in Podozyten beeinflussen. So zeigten Sakurai et al. die zentrale Rolle der Monoubiquitin-stabilisierenden Wirkung von UCH-L1 für die neuronale Differenzierung (74). In der humanen und in der Rattenniere konnte gezeigt werden, dass UCH-L1 immunhistochemisch in tubulären Epithelzellen, in Sammelrohren und in den Parietalzellen der Bowman'schen Kapsel exprimiert wird (62, 63). Shirato et al zeigten, dass während der Nephrogenese in der Rattenniere UCH-L1 diffus in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird. In Zellen, die sich zu Podozyten entwickeln, nimmt die UCH-L1 Expression im Verlauf der Entwicklung ab (62). Im humanen gesunden und ausdifferenzierten Glomerulus wurde bisher eine UCH-L1 Expression in Podozyten nicht beobachtet. Es zeigte sich jedoch eine podozytäre Neuexpression von UCH-L1 in Podozyten bei bestimmten glomerulären Erkrankungen, die mit einer Entdifferenzierung der Podozyten einhergehen (64, 75).

Analog zu diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit in vitro der Einfluss von UCH-L1 auf den podozytären Phänotyp gezeigt werden. Der Differenzierungsstatus der Podozyten korrelierte dabei invers mit deren UCH-L1 Expression. Podozyten mit fehlender UCH-L1 Expression begannen früh mit der Ausdifferenzierung in einen flachen und arborisierten Phänotyp und bildeten signifikant mehr und längere Fortsätze aus. Podozyten mit UCH-L1 Überexpression wiesen einen undifferenzierten Phänotyp, gekennzeichnet durch wenig Fortsatzbildung und einen kleinen Zellkörper, auf.

Ein typisches Merkmal undifferenzierter Podozyten ist die Fähigkeit der Proliferation. Bei der Ausdifferenzierung kommt es zu einem Teilungsstopp der Zellen und der Verlust der Zellteilung führt zur Ausbildung von polyploiden Zellen mit zwei oder mehr Zellkernen (68).

Neben der Morphologie konnte in dieser Arbeit auch eine Abhängigkeit der Proliferationsrate und der Polyploidie von der UCH-L1 Expression in den Podozyten gezeigt werden. So führte eine UCH-L1 Überexpression in den Podozyten zu einer signifikant höheren Proliferationsrate und zu einer signifikant geringeren Ausbildung polyploider Zellen. Dagegen war die Proliferation bei UCH-L1 defizienten Podozyten signifikant reduziert und es zeigte sich gegenüber der Kontrolle kein Unterschied bei der Entwicklung polyploider Zellen. Eine mutationsbedingte Änderung der Expression des temperatursensitiven T-Antigens in den Podozyten, die Unterschiede in der

Proliferation erklären könnte, wurde durch Westernblot ausgeschlossen. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass die verringerte Zellzahl nach 72h Kultur in den UCH-L1 defizienten Podozyten durch eine gesteigerte Apoptose bedingt sein könnte. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung zeigte jedoch keine Verstärkung der Apoptoserate bei Podozyten mit UCH-L1 Defizienz, die eine Abnahme der Proliferation erklärt. Dies spricht für die Theorie, dass die Proliferation in den Podozyten von deren UCH-L1 Expression abhängt und bei Fehlen von UCH-L1 die Proliferation der Podozyten geringer ist. Überraschenderweise zeigte sich bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten ein gesteigerter Zelluntergang. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten von Wang et al., die auch einen Zusammenhang der UCH-L1 Überexpression und der Zunahme der Apoptose in Tumorzellen zeigen (58). Erstaunlicherweise nimmt die in dieser Arbeit gemessene Proliferationsrate bei Zellen mit UCH-L1 Überexpression durch die vermehrte Apoptose nicht ab, sondern ist sogar gesteigert. Dadurch wird deutlich, dass die Proliferation in den Podozyten mit UCH-L1 Überexpression enorm gesteigert sein muss, um zunächst den erhöhten Zelluntergang auszugleichen. Ob die gesteigerte Proliferation eine Kompensation der Apoptose darstellt, oder ob die Apoptose eine Antwort auf die vermehrte Proliferation darstellt, ist unklar. Insgesamt deuten diese Daten auf einen erhöhten Zellumsatz und einen beschleunigten Zellzyklus, induziert durch verstärkte UCH-L1 Expression, hin.

Zusammenfassend könnte nach Betrachtung des Phänotyps eine UCH-L1-Expression in den Podozyten als podozytärer Differenzierungsmarker angesehen werden. UCH-L1 wird in gesunden, ausdifferenzierten Podozyten nicht exprimiert (64). Die Expression von UCH-L1 wird erst bei Schädigung der Podozyten induziert. Somit könnte durch histologischen Nachweis einer Neuexpression von UCH-L1 in Podozyten eine Differenzierung zwischen gesunden und geschädigten Podozyten und damit zwischen differenzierten und entdifferenzierten Podozyten ermöglicht werden.

UCH-L1 ist eines der Schlüsselenzyme des Ubiquitin-Proteasom-System und spielt eine wichtige Rolle in der Proteindegradation. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Eigenschaft von UCH-L1 den zellulären Gehalt an Monoubiquitin durch direkte Bindung zu stabilisieren (56, 60). Außerdem wird UCH-L1 für den Erhalt und der Struktur und der Funktion der neuromuskulären Endplatte benötigt (60) und spielt bei der Degradation von α -Synuklein und β -Amyloid eine entscheidende Rolle (55, 76) Da Neuronen und Podozyten über große morphologische und biochemische Ähnlichkeiten aufweisen, könnte UCH-L1 in Podozyten eine vergleichbare Rolle spielen. Auch konnte ein Zusammenhang der UCH-L1 Expression und dem Gehalt von Monoubiquitin in Podozyten gezeigt werden (64). Auch in dieser Arbeit bestätigte sich die Abhängigkeit des Ubiquitingehalts von der zellulären Expression von UCH-L1 in Podozyten. Bei UCH-L1-überexprimierenden Podozyten zeigte sich ein erhöhter Gehalt an Monoubiquitin, während UCH-L1 defiziente Zellen entsprechend dazu einen verminderten Gehalt an Monoubiquitin zeigten. Hiermit wird erneut die Vermutung bestätigt, dass die UCH-L1 direkt die Menge an verfügbaren Ubiquitin

reguliert und damit einen Einfluss auf die Morphologie von Zellen ausüben könnte (56, 74).

Außerdem konnte in dieser Arbeit eine UCH-L1-abhängige Akkumulation von Polyubiquitin beobachtet werden. Eine Polyubiquitinakkumulation ist eines der wesentlichen Merkmale neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise Parkinson und Alzheimer (77, 78). Eine Veränderung der enzymatischen Aktivität der UCH-L1 spielt dabei eine wichtige Rolle in der Pathogenese beider Krankheiten. Ardley et al zeigten, dass Mutationen der UCH-L1 zu einer seltenen Form von Parkinson führen (70). Durch die veränderte Aktivität von UCH-L1 kommt es zu einer veränderten Proteindegredation bzw. zu Fehlfunktionen des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Die Folge ist die exzessive Bildung und Akkumulation von abnormen oder unlöslichen polyubiquitinierten Proteinen und Aggregaten (70, 79). Auch in dieser Arbeit konnte eine Akkumulation von Ubiquitin und eine Ubiquitinaggregatbildung in Abhängigkeit von der UCH-L1 Expression festgestellt werden. UCH-L1 überexprimierende Podozyten zeigten eine Akkumulation von Polyubiquitin und eine Ubiquitinaggregatbildung, während bei UCH-L1 defiziente Podozyten dagegen ein verminderter Gehalt an Polyubiquitin und keine Aggregatbildung erkennbar war. Eine Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen in Zusammenhang mit einer UCH-L1 Überexpression wurde auch in Hoden UCH-L1 überexprimierender Mäuse (58) und in Neuronen (70) beobachtet. Ob die UCH-L1 dabei direkt für die Akkumulation der Polyubiquitinketten verantwortlich ist, ist unklar. Erklärbar wäre die Akkumulation von Polyubiquitin einerseits durch eine Blockierung des Proteasoms, die in einem verminderten Abbau polyubiquitinerter Proteine münden könnte. Eine Blockierung des Proteasoms könnte auch durch eine vermehrte Stabilisierung freier Ubiquitinketten erklärt werden, die entweder direkt durch die UCH-L1-Hydrolaseaktivität oder indirekt durch die Bereitstellung von Monoubiquitin und anschließende Bildung von Ubiquitinketten generiert wurden (56). Freie Ubiquitinketten können an Ubiquitin-Bindestellen des Proteasoms binden und führen so zu einer Hemmung der Proteindegredation durch Blockade des 26S Proteasom Komplexes (71, 72). Möglich wäre aber auch, dass die UCH-L1 direkt zu einer Hemmung des Proteasoms führt. Übereinstimmend mit dieser Erklärung konnte in dieser Arbeit ein inhibitorischer Effekt der UCH-L1 in den Podozyten auf die proteasomale Aktivität festgestellt werden. Podozyten mit fehlender UCH-L1 Expression wiesen gegenüber den Kontrollzellen eine signifikant erhöhte proteasomale Aktivität und einen erniedrigten Gehalt an Polyubiquitin auf. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre demnach, dass die UCH-L1 Überexpression zu einer verminderten Degradation polyubiquitinerter Proteine und zu deren Akkumulation führten könnte. In den Kulturpodozyten mit UCH-L1 Überexpression wurde auch eine Bildung von Ubiquitinaggregaten beobachtet. Diese Aggregatbildung wurde nur in UCH-L1 überexprimierenden Podozyten durch zusätzliche Hemmung des Proteasoms verstärkt. Dagegen reichte in den Podozyten mit fehlender UCH-L1 Expression die alleinige Hemmung des Proteasoms nicht aus, um eine vergleichbare Aggregatbildung zu induzieren. Ein ähnlicher Mechanismus

wurde von Ardley et al gezeigt. UCH-L1 überexprimierende Neuronen zeigten eine Ubiquitinaggregatbildung nach zusätzlicher Hemmung des Proteasoms (70). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die Aggregatbildung in geschädigten Podozyten sowohl von einer Hemmung des Proteasoms, als auch von einer UCH-L1 Überexpression abhängt und durch die UCH-L1 Überexpression induziert wird.

Die genauere Relevanz der Aggregatbildung und der Ubiquitinakkumulation und ihre Auswirkungen auf die Pathogenese der mGN sind derzeit noch unklar. Eine fehlerhafte Proteindegeneration mit der Bildung von Aggregaten in Podozyten könnte ein neues pathophysiologisches Konzept bei glomerulären Erkrankungen darstellen.

Neben der Akkumulation von Polyubiquitin fiel bei den Experimenten in dieser Arbeit auch eine Abhängigkeit der K63-verlinkten Ubiquitinierung von der UCH-L1 Expression in den Kulturpodozyten auf. Eine UCH-L1 Überexpression führte zu einer Zunahme der K63-Verlinkung von Ubiquitin und eine UCH-L1 Defizienz entsprechend zu einer Verminderung.

Von Hicke et al. konnte gezeigt werden, dass eine K63-Verknüpfung als Zielsetzungssignal dient, um Proteine alternativ zum Proteasom über das autophagosomale/lysosomale System in Lysosomen abzubauen (35). Eine K63 Polyubiquitinierung wurde außerdem von Tan et al. als einer der größten Verstärker bei der Bildung von Einschlusskörperchen, und deren anschließender Beseitigung durch Autophagie, identifiziert (80). Eine veränderte K63-Expression im Westernblot könnte auf einen Einfluss der UCH-L1 auf die autophagosomale Proteindegeneration in den Podozyten hinweisen. Hartleben et al. zeigten, dass die Autophagie eine wichtige Rolle für die Zellhomöostase in gesunden und vor allem in geschädigten Podozyten spielt (81). Hinweise, dass UCH-L1 nicht nur einen Einfluss auf das UPS, sondern auch auf die Autophagie von Zellen ausübt, zeigten Kabuta et al.. Demnach agiert UCH-L1 direkt mit Lamp2A, dem lysosmalen Rezeptor für die Chaperon-vermittelte Autophagie. Diese Interaktion wird noch verstärkt, wenn es sich um die I93M UCH-L1 handelt, eine mutierte Form von UCH-L1, die assoziiert ist mit der Entstehung von Parkinson (44). Auch Bifsha et al. konnten einen Zusammenhang von UCH-L1 und der Autophagie in Fibroblasten von Patienten mit lysosomaler Speicherkrankheit feststellen (82).

Der Anstieg der K63-Polyubiquitinierung bei UCH-L1 Überexpression könnte durch eine Beeinflussung der Autophagie erklärt werden, die in einer verringerten Degradation K63 verknüpfter polyubiquitinerter Proteine mündet. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das autophagosomale/lysosomale System in den Kulturpodozyten mittels der mit Autophagie-assoziierten Marker p62 und LC-3 untersucht. p62 ist ein K63-Polyubiquitin- und LC-3- bindendes Protein. Es dient nach Bindung an K63-Polyubiquitin als Bindungssignal für LC-3, das Signalprotein für die Fusion der Membran von Autophagosomen mit Lysosomen (39). Nach dem Transport mit K63-polyubiquitinierten Proteinen (39) in das Lysosom dient p62 dort als selektives Substrat der Autophagie (40). Wird die Autophagie einer Zelle

gehemmt, beispielsweise durch fehlerhafte Funktion der Lysosomen, kommt es zur Akkumulation von p62 (39), da dieses nicht degradiert werden kann. p62 wurde als Bestandteil von Einschlusskörperchen identifiziert (39), wie sie vor allem bei humanen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, vorkommen, und deren Entstehung mit veränderter Fusion der UCH-L1 in Verbindung gebracht wird (70). Daraus könnte sich ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung von UCH-L1, dem UPS und der Autophagie ergeben (46).

LC-3 ist ein Marker für die Bildung von Autophagolysosomen (38). LC-3 wird nach Fusion der Lysosomen mit Autophagosomen von lysosomalen Hydrolasen degradiert. Ein Anstieg an LC-3 zeigt Mangelsituationen der Zellen, die zu verstärkter Autophagie führen, an. Durch die Abnahme von LC-3 lässt sich die späte Autophagieperiode beurteilen, in der es zum Abbau von LC-3 nach Autophagosomaler-Lysosomaler-Fusion im Autophagolysosom kommt (38).

Podozyten mit UCH-L1 Überexpression zeigten in dieser Arbeit bei der eine deutliche Abnahme von p62 und eine leichte Zunahme der Expression von LC-3. Zur Beurteilung des autophagosomalen Fluxes, das heißt, das Einbringen der sauren Hydrolasen durch die Lysosomen und der anschließende Verdau und Verbrauch des Inhaltes der Autophagosomen, wurden die sauren Hydrolasen durch Pepstatin A gehemmt. Es zeigte sich eine Stabilisation von LC-3 bei UCH-L1 Überexpression. Insgesamt deuten diese Daten somit nicht auf eine gehemmte Autophagie, sondern eher auf einen gesteigerten Autophagosomenumsatz in den UCH-L1 überexprimierenden Podozyten hin. Dies könnte in den Podozyten mit UCH-L1 Überexpression durch einen Artefakt, bzw. als eine Folge der Überexpression von UCH-L1 erklärt werden. Möglicherweise sind die Podozyten durch die artifizielle UCH-L1 Überexpression mit zuviel Fremdprotein überlastet und versuchen dieses durch verstärkte autophagosomale Degradation abzubauen. Der Anstieg der K63 polyubiquitinierten Proteine kann durch diese Daten somit nicht erklärt werden.

Andere Ursachen für den Anstieg von K63-Polyubiquitin bei UCH-L1 Überexpression könnten auf lysosomaler Ebene liegen. Das lysosomale System wurde durch Analyse der lysosomalen Membranproteine Lamp-2 und Limp-2 untersucht (45). Lamp-2 spielt eine wichtige Rolle in der lysosomalen Stabilität und bei der Reifung und Fusion der Lysosomen mit (Auto)Phagosomen (42) und dient außerdem als Rezeptor für die Chaperon-vermittelte Autophagie (44). Kabuta et al. konnten eine direkte Interaktion der I93M UCH-L1 mit Lamp-2 nachweisen, indem das Enzym im oxidierten Zustand Lamp-2 bindet. Die I93M mutierte Form der UCH-L1 ist mit der familiären Form der Parkinson-Krankheit assoziiert (44). Limp-2 spielt neben der Membranstabilisierung eine Rolle als Rezeptor bei der M6P-unabhängigen Sortierung von lysosomalen Proteinen (45).

Die Analyse der lysosomalen Marker Limp-2 und Lamp-2 ergab hier bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten eine deutlich verminderte Expression von Lamp-2 und eine deutlich erhöhte Expression von Limp-2. Durch diese Daten lässt sich eine

verminderte Lysosomenanzahl als Ursache für die K63-Polyubiquitin Akkumulation nicht bestätigen. Aufgrund der Datenlage wäre eine Akkumulation von K63 durch eine Defizienz oder Abnahme von Lamp-2 möglich. Möglich wäre eine Interaktion von UCH-L1 mit Lamp-2, ähnlich wie von Kabuta et al. bewiesen (44), die zu veränderter Funktion von Lamp-2 führt. Weitere Experimente sind notwendig, um diese Hypothese weiter zu klären. Da Lamp-2 ein notwendig ist für die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen (42, 43), könnte es durch die Abnahme von Lamp-2 zu einem fehlerhaften Fusion und damit zu verringertem Abbau von K63-Polyubiquitin kommen. Die Hochregulation des lysosomalen Membranproteins Limp-2 könnte als Zeichen einer vermehrten oder vergrößerten Lysosomenzahl gedeutet werden, möglicherweise Folge des bereits festgestellten gesteigerten Autophagosomenumsatzes.

Noch eine weitere Erklärung für die Akkumulation von K63-Polyubiquitin ist denkbar. Bekannt ist, dass UCH-L1 die Fähigkeit besitzt in vitro Homodimere zu bilden. Verbunden mit dieser Dimerisierung ist die Entstehung einer Ligaseaktivität, die zur Verkettung von Ubiquitinmonomeren an K63 führen soll (55, 59). Durch die Überexpression von UCH-L1 könnte es aufgrund dieser Eigenschaft in den Podozyten zu einer Zunahme der Verkettung von Ubiquitin an K63 kommen und so zu einer Akkumulation führen. Diese Ligaseaktivität wird jedoch kontrovers diskutiert.

Da die Daten der UCH-L1 überexprimierenden Podozyten, die den Einfluss der UCH-L1 auf das autophagosomale System darstellen, möglicherweise auf einer durch die forcierte Überexpression bedingten Überladung der Zellen mit UCH-L1 Protein beruhen könnte, wurde die Autophagie mittels der entsprechenden Marker auch in Podozyten mit UCH-L1 Defizienz untersucht. Es zeigte sich sowohl ein deutlicher Anstieg von p62 als auch von LC-3 bei den Podozyten mit fehlender UCH-L1 Expression. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine deutliche Akkumulation LC3 positiver Autophagosomen. Nach Hemmung der sauren Hydrolase durch Pepstatin A zeigte sich keine Stabilisierung. Insgesamt deuten diese Daten auf eine Hemmung des Autophagosomenumsatzes bei Fehlen von UCH-L1 im Podozyten hin (38-40). Die Expression der lysosomalen Membranproteine Limp-2 und Lamp-2 als Marker für die Anzahl an Lysosomen (42) zeigte eine deutliche Zunahme der Expression sowohl von Lamp-2 als auch von Limp-2 in UCH-L1 defizienten Zellen. Diese Daten sprechen daher für eine Zunahme des Lysosomenanzahl oder für eine Größenzunahme der Lysosomen. Eine verminderte Lysosomenanzahl als Ursache für die gehemmte Autophagie bei UCH-L1 Defizienz scheint somit unwahrscheinlich.

Die veränderte Expression beider lysosomaler Membranproteine bei UCH-L1 Defizienz könnte auf eine Membranreifungsstörung der Lysosomen hindeuten und zu so einer fehlerhaften Fusion der Lysosomen mit Autophagosomen führen. Durch diese Theorie könnte die Akkumulation von Autophagosomen und der verringerte autophagosomale Flux erklärt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen.

Die beobachtete Abnahme von K63-Polyubiquitinierten Proteinen bei UCH-L1 defizienten Zellen lässt sich durch eine gehemmte Autophagie jedoch nicht erklären, denn es müsste zu deren Akkumulation kommen. Eine mögliche Erklärung der Abnahme von K63 polyubiquitinierten Proteinen ist, entsprechend der Akkumulation bei UCH-L1 Überexpression, dass die K63-Polyubiquitinierung abhängig ist von der UCH-L1-Dimerisierung und der damit verbundenen Ligaseaktivität (55). Eine UCH-L1 Defizienz könnte möglicherweise durch die fehlende Dimerisierung und Ligaseaktivität zu einer Abnahme der K63-Polyubiquitinierung führen.

Eine weitere Erklärung der Abnahme der K63 Polyubiquitinierung ist denkbar. Da eine UCH-L1 Defizienz zu einer Abnahme von Monoubiquitin führt (56) und Ubiquitinmonomere für die Polyubiquitinierung benötigt werden, ist es laut McNaught et al. (79) auch möglich, dass nicht genug Monoubiquitin für die K63 Polyubiquitinierung in den Zellen zur Verfügung steht.

Insgesamt wird deutlich, dass die UCH-L1 nicht nur das UPS, sondern auch das autophagosomale und lysosomale System der Podozyten zu beeinflussen scheint. Allerdings sind weiterführende Experimente notwendig, um die Rolle der UCH-L1 in der autophagosomalen Proteindegradation und die Bedeutung der veränderten K63-Polyubiquitinierung in Abhängigkeit von der UCH-L1 Expression weiter aufzuklären.

Die Daten der Kulturpodozyten deuten darauf hin, dass die UCH-L1 an der Entdifferenzierung der Podozyten beteiligt ist und die podozytäre Proteinhomöostase über das Ubiquitin-Proteasom-System und das autophagosomale System beeinflussen kann. Um zu untersuchen, welche Rolle diese Funktionen im geschädigten Podozyt spielen und welche Auswirkungen dies auf den Verlauf der Erkrankung hat, wurde in der experimentellen mGN der Ratte die Hydrolaseaktivität der UCH-L1 durch Behandlung mit dem reversiblen Inhibitor LDN 57444 gehemmt.

Die Immunhistochemie gegen UCH-L1 zeigte eine Zunahme der podozytären UCH-L1 Expression in den PHN-Tieren mit und ohne Inhibitor. Eine UCH-L1 Expression in geschädigten Podozyten konnte von mehreren Arbeitsgruppen festgestellt werden (64, 75). Von Meyer-Schwesinger et al. wurde gezeigt, dass eine podozytäre Schädigung mit einer Neuexpression von UCH-L1 assoziiert ist (64). Interessanterweise wurde in den mit LDN 57444 behandelten PHN-Tieren im Gegensatz zu den PHN Tieren ohne Inhibitor eine verstärkte UCH-L1-Expression beobachtet. Auch bei den gesunden PI-Tieren, die mit LDN 57444 behandelt wurde, zeigte sich eine leichte Induktion der UCH-L1 Expression. Diese verstärkte Expression ist möglicherweise auf einen Kompensationsmechanismus der Podozyten zurück zu führen, die versuchen, die Hemmung der Enzymaktivität durch verstärkte Proteinexpression auszugleichen.

Klinisch fiel ein signifikanter Unterschied in der Entwicklung des Körpergewichts zwischen den verschiedenen Tiergruppen auf. Zu Beginn der Staffel zeigten alle Gruppen ein vergleichbares durchschnittliches Körpergewicht und alle Tiere nahmen im Verlauf der Staffel an Gewicht zu. Am Tag 17 wogen die Tiere, die nur mit PI-

Serum behandelt wurden, signifikant weniger, als die PI-Tiere, die mit dem Inhibitor behandelt wurden. Das Pumpengewicht wurde dabei herausgerechnet. Sowohl die PI-, als auch die Pi-Tiere mit Inhibitor waren klinisch gesund und zeigten keine sichtbaren Ödeme oder Aszites. Bei den behandelten PI-Tieren zeigte sich um die implantierten Pumpen herum teilweise eine Flüssigkeitsansammlung, die möglicherweise den Unterschied in der Entwicklung des Körpergewichts der gesunden PI-Tiere erklären könnte. Auch bei den PHN-Tieren zeigte sich ein Unterschied im Körpergewicht an Tag 17. Die mit LDN 57444 behandelten PHN-Tiere zeigten ein signifikant geringeres Körpergewicht gegenüber den kranken PHN-Tieren ohne Inhibitor. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es bei den PHN-Tieren durch die Induktion der Nierenerkrankung zu einer Ödem- und Aszitesbildung kam. Dies würde eine Gewichtszunahme erklären. Durch die Implantation der Pumpe mit dem Inhibitor der UCH-L1 konnte möglicherweise das Ausmaß der Nierenschädigung bei den PHN-Tieren mit LDN 57444 so weit reduziert werden, dass die Nierenfunktion weitestgehend erhalten blieb und es somit nicht zu einer Ödem-/Aszitesbildung und nicht zu einer Gewichtszunahme wie bei den PHN-Tieren kam. Dafür spricht, dass das Körpergewicht der behandelten PHN-Tiere dem Körpergewicht der behandelten gesunden PI-Tiere entsprach.

Bei Vergleich der klinischen Retentionsparameter Harnstoff und Kreatinin zeigte sich, entsprechend den Daten anderer Arbeitsgruppen kein Unterschied zwischen den PI- und PHN-Tiergruppen (83, 84). Auch die Behandlung mit LDN 57444 zeigte keinen Einfluss auf die Retentionsparameter.

Der Einfluss einer UCH-L1 Hemmung auf die Morphologie der Podozyten und die glomeruläre Basalmembran wurde durch PAS-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen IV untersucht. Pathogenetisch kommt es bei der mGN nach subepithelialer Immunkomplexbildung und Aktivierung der Komplementkaskade zur Bildung von C5b-9-Komplexe. Die Insertion der sublytischen C5b-9-Komplexe in die Membran der Podozyten führt zur Aktivierung und Schädigung der Podozyten (8). Durch die Ablagerung der Immunkomplexe an der Außenseite der glomerulären Basalmembran, sichtbar als granuläre Struktur, kommt es zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Verdickung der Basalmembran (2).

Stereotype Reaktionen des Podozyten auf Schädigung unterschiedlicher Art umfassen Hypertrophie, Fussfortsatz Effacement, Vakuolisierung des Zytoplasmas und letztendlich das Ablösen von der GBM (18). Durch die PAS-Färbung sollte die Morphologie der Podozyten untersucht werden. Bei den PHN-Tieren mit und ohne Inhibitor zeigte sich eine diffuse Verdickung der GBM in den Kapillarschlingen gegenüber den PI-Tieren. Auffällig war vor allem die verringerte podozytäre Anschwellung bei den PHN-Tieren mit UCH-L1 Hemmung im Vergleich zu den PHN-Tieren ohne Inhibitor. Die Anschwellung könnte ein Zeichen einer Podozytenhypertrophie sein. Laut Pavenstädt et al (19) und Marshall et al. (27) stellt die Hypertrophie nach Schädigung oder Stress einen Kompensationsmechanismus des Podozyten dar, nackte Stellen der GBM, die durch Ablösen benachbarter

Podozyten entstanden sind, zu überdecken. Der Podozyt versucht damit die Integrität der Filtrationsbarriere zu bewahren (27). In den PHN-Tieren, die mit LDN 57444 behandelt wurden, zeigte sich in dieser Arbeit nur vereinzelt eine podozytäre Hypertrophie. Es ist möglich, dass die Behandlung mit LDN 57444 das Fussfortsatz Effacement der Podozyten und deren Hypertrophie verhinderte.

Mittels der Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen IV sollte die GBM untersucht werden. Entsprechend der Pathogenese der Erkrankung zeigte sich bei den PHN-Tieren mit und ohne Inhibitor eine diffuse Verdickung der GBM in den Kapillarschlingen gegenüber den PI-Tieren. Außerdem erschien die GBM in dieser Färbung als granuläre Struktur, wie bei Nanganku et al. (8) und Kerjaschki et al. (13) beschrieben. Die GBM der PI-Tiere zeigte keine pathologischen Veränderungen. Bei Vergleich der PHN-Tiere mit und ohne Inhibitor zeigte sich kein Unterschied in der Struktur der GBM. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Behandlung mit LDN 57444 die Initiation der Erkrankung und die Immundepotablagerung nicht beeinflusst. Eher ist somit ein direkter Effekt der UCH-L1-Hemmung auf den Podozyt anzunehmen. Um diese Hypothese zu beweisen, wäre noch eine Immunfluoreszenzfärbung der Glomeruli gegen Schaf-IgG, zur Bestimmung des Bindungsverhaltens des im FX1A-Serum enthaltenen Schaf-Antikörpers im Rattenglomerulus und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Ratten-IgG, zum Nachweis der Immunantwort der Tiere auf das Antiserum, notwendig.

Insgesamt lassen die Daten der PHN, entsprechend zu den Daten der Experimente mit den Kulturpodozyten, vermuten, dass die UCH-L1, ähnlich wie in Neuronen (74), einen direkten Einfluss auf die Podozytenmorphologie ausübt. Die verringerte podozytäre Hypertrophie in der PHN bei UCH-L1 Hemmung mit LDN 57444 korrelierte auch mit einer Verbesserung der Proteinurie.

Die Hemmung der Hydrolaseaktivität der UCH-L1 4 Tage nach Induktion der Erkrankung bewirkte in den behandelten PHN-Tieren eine signifikante Abnahme der Proteinurie. Dies ist möglicherweise auf die morphologisch festgestellte verringerte podozytäre Schädigung zurückzuführen. Außerdem zeigten die PHN-Tiere mit LDN 57444 im Gegensatz zu den PHN-Tieren ohne Inhibitor im Coomassie Blue Stain keine unselektive Proteinurie. Ein fehlender Nachweis von IgG, das Markerprotein der unselektiven Proteinurie, im Urin der PHN-Tiere, die mit LDN 57444 behandelt wurden, würde diese Beobachtung beweisen. Die unselektive Proteinurie in den PHN-Tieren deutet auf einen schweren glomerulären Schaden hin (1). Somit sprechen die Unterschiede in der Art der Proteinurie auch dafür, dass durch die Behandlung der PHN-Tiere mit LDN 57444 der glomeruläre Schaden verringert wurde.

Zusammengefasst scheint eine UCH-L1-Neuexpression in geschädigten Podozyten eine wichtige Rolle zu spielen und den Verlauf glomerulärer Erkrankungen zu beeinflussen. Vor allem auf die Proteinurie und die Podozytenmorphologie scheint UCH-L1 einen krankheitsverstärkenden Einfluss zu haben. Es könnte sich bei einer

UCH-L1-Hemmung um eine mögliche Therapieoption der Proteinurie bei der membranösen Glomerulonephritis handeln. Weitere umfassende Untersuchungen sind jedoch noch notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen.

6 Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der Ubiquitin C-terminalen Hydrolase L1 (UCH-L1) für den podozytären Phänotyp und die Proteindegradation. UCH-L1, ein Schlüsselenzym des Ubiquitin-Proteasom-Systems, spielt eine Rolle bei der Degradation von Proteinen und ist assoziiert mit neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs. Bei bestimmten Nierenerkrankungen, wie der mGN, konnte eine podozytäre Neuexpression von UCH-L1 gezeigt werden. Die membranöse Glomerulonephritis ist die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter. Die Therapiemöglichkeiten basieren bis heute meist nur auf empirischen Untersuchungen. Zur Entwicklung einer kausalen Therapie ist es wichtig den Pathomechanismus der membranösen Glomerulonephritis näher zu erforschen und weitere Kenntnisse über die Reaktion von Podozyten auf Schaden und ihre Rolle bei der Pathogenese der membranösen Glomerulonephritis zu erhalten.

Hierzu wurden die UCH-L1-Expression und deren Einfluss auf die Differenzierung und Morphologie muriner Podozyten mit stabiler UCH-L1 Überexpression oder UCH-L1 Defizienz untersucht. Außerdem sollte geklärt werden, ob eine UCH-L1 Überexpression oder Defizienz die proteasomale und autophagosomale Proteindegradation in Podozyten beeinflusst. In der Passiven Heymann Nephritis, einem Rattenmodell der membranösen Glomerulonephritis, wurde die Rolle von UCH-L1 in vivo für den Verlauf der podozytären Schädigung untersucht. Die Zellkulturexperimente zeigten einen inversen Zusammenhang zwischen dem zellulären Differenzierungsstatus und der UCH-L1 Expression. Podozyten mit UCH-L1 Überexpression zeigten bei Kultivierung unter permissiven und nicht-permissiven Bedingungen einen undifferenzierten Phänotyp mit wenig Zellfortsätzen und einer gesteigerten Proliferation und Apoptoserate. Podozyten mit UCH-L1 Defizienz hingegen begannen bereits unter nicht-permissiven Bedingungen in einen arborisierten Phänotyp auszdifferenzieren. Es kam dazu zum Teilungsstopp und zur Ausbildung polyploider Zellen. Weitere Experimente zeigten einen Einfluss von UCH-L1 auf die proteasomale und autophagosomale Proteindegradation. Bei UCH-L1 überexprimierenden Podozyten wurde eine Akkumulation von Mono- und Polyubiquitin und nach zusätzlicher Hemmung des zellulären Proteasoms durch MG132 auch eine UCH-L1 abhängige Ubiquitinaggregatbildung festgestellt. Weiterhin hemmte UCH-L1 die Aktivität des Proteasoms. Bei UCH-L1 Defizienz kam es zur Akkumulation von Autophagosomen bei verringertem autophagosomalen Flux. In der Passiven Heymann Nephritis konnte durch frühzeitige Hemmung der UCH-L1-Hydrolaseaktivität eine verringerte podozytäre Schädigung beobachtet werden mit einer signifikanten Reduktion der Proteinurie.

Eine UCH-L1-Hemmung könnte daher ein therapeutische Konzept bei membranöser Glomerulonephritis beinhalten, möglicherweise durch Beeinflussung der Degradation von Proteinen, die eine Rolle bei der schadenbedingten Entdifferenzierung des Podozyten spielen.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin- Biotin- Komplex
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CMA	Chaperone-mediated Autophagy
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	Diamidino - Phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
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
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

GAD	Grazile axonale Dystrophie
GITC	Guanidinisoithiocyanat
GBM	glomeruläre Basalmembran
h	hour/ Stunde
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
hsc	heat shock cognate
Ig	Immunglobulin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Ko	Kontrolle, Kontrolltier
l	Liter
Lamp	lysosomal
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Limp	lysosomal integral membrane protein
m	milli ($\times 10^{-3}$)
μ	mikro
M	Molarität
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MAC	Membrane attack complex
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mGN	Membranöse Glomerulonephritis
MMP	Magermilchpulver
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MSCV	Muriner Stammzellvirus
n	nano
NEP	Neutrale Endopeptidase
NSAR	Nicht-steroidale Anti-Rheumatica
NTP	Nukleosidtriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

PAS	Periodic Acid Schiff stain
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PHN	Passive Heymann Nephritis
PI	Präimmun
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	single hairpin RNA
SV	Simian Virus
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline + Tween 20
TdT	Terminal Desoxynucleotidyltransferase
TMB	Tetramethylbenzidin
TSA	Tyramide Signal Amplification
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
TX	Triton X 100
U	Unit
UBP	Ubiquitin- spezifische Protease
UCH	Ubiquitin- Carboxy- terminale Hydrolase
UPS	Ubiquitin- Proteasom- System

8 Literaturverzeichnis

1. **Herold G.**, Innere Medizin 2009, Kapitel VI, 566-580
2. **Classen M, Dirk V, Kochsiek K**, Innere Medizin, Urban+Fischer-Verlag, 5. Auflage, 1615-1728
3. **Ronco P, Debiec H**, Molecular pathomechanisms of membranous nephropath from Heymann nephritis to alloimmunization, *J Am Soc Nephrol* (2005) 16, 1205-1213
4. **Ronco P, Debiec H**, Podocyte antigens and glomerular disease, *Nephron Exp Nephrol* (2007) 107, 41-46
5. **Ronco P, Debiec H**, New insights into the pathogenesis of membranous Glomerulonephritis, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2006) 15, 258-263
6. **Beck LH, Jr., Bonegia RG, Lambeau G et al.**, M-type Phospholipase A Receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy *N Engl J Med* (2009) 361, 11-21
7. **Prunotto M et al.**, Autoimmunity in Membranous Nephropathy Targets Aldose Reductase and SOD2, *J Am Soc Nephrol* (2010) 21, 507-519
8. **Nanganku M, Shankland S, Couser W**, Cellular Response to Injury in Membranous Nephropathy, *J Am Soc Nephrol* (2005) 16: 1195-1204
9. **Troyanov S, Roasio L, Pandes M, Herzenberg AM, Cattran DC**, Renal pathology in idiopathic membranous nephropathy: A new perspective, *Kidney international* (2006) 69, 1641-1648
10. **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- 664
11. **Salant DJ, Cybulski AV**, Experimental Glomerulonephritis, *Methods in Enzymology* (1988) 162: 421- 461
12. **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
13. **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

14. **Nakatsue T et al.**, Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy, *Kidney Int* (2005) 67: 2239- 2253
15. **Welsch**, Lehrbuch Histologie, Urban+Fischer-Verlag, 1. Auflage, 405- 425
16. **Somlo S, Mundel P**, Getting a foothold in Nephrotic Syndrome, *Nat Genet* (2000) 24, 333-335
17. **Kobayashi N**, Mechanism of the process formation; Podocytes vs. Neurons, *Microscopy Research and Technique* (2002) 57: 217- 223
18. **Shankland SJ**, The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis, *Kidney international* (2006) 69: 2131- 2147
19. **Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M**, Cell biology of the glomerular podocyte, *Physiol Rev* (2003) 83: 253- 307
20. **Adler S**, Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors, *Am J Path* (1992) 141: 571- 578
21. **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
22. **Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG**, Identification and characterization of podocalyxin- the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell, *Journal of cell biology* (1984) 98: 1591- 1596
23. **Barisoni L, Mundel P**, Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases, *Am J Nephrol* (2003) 23: 353- 360
24. **Rodewald R, Karnovsky MJ**, Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse, *The journal of cell biology* (1974) 60: 423- 433
25. **Mundel P, Shankland SJ**, Podocyte Biology and Response to Injury, *J AM Soc Nephrol* (2002) 13, 3005-3015
26. **Kritz W, Kretzler M, Provoost AP, et al.**, Stability and leakiness. Opposing challenges to the glomerulus, *Kidney international* (1996) 49, 1570-1574
27. **Marshall CB, Shankland SJ**, Cell cycle and glomerular Disease: A minireview, *Nephron Exp Nephrol* (2002) 13, 946-956
28. **Koop K et al.**, Expression of Podocyte-associated Molecules in Acquired kidney diseases, *J AM Soc Nephrol* (2003) 14, 2063-2071
29. **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
30. **Hershko A, Ciechanover A**, The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* (1998) 67: 425- 479

31. **Debigaré R, Price SR**, Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system and renal diseases, *AM J Renal Physiol* (2003) 285, F1-F8
32. **Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A**, Ubiquitin as a central Cellular Regulator, *Cell, Vol.* (2004) S116, 29-32
33. **Rajan V, Mitch WE**, Ubiquitin, proteasomes and proteolytic mechanisms activated by kidney disease, *Biochim Biophys Acta* (2008) 1782: 795- 799
34. **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
35. **Hicke L**, Protein regulation by monoubiquitin, *Mol Biol Cell* (2001) 2: 195- 201
36. **Hicke L, Dunn R**, Regulation of membrane protein transport by Ubiquitin and Ubiquitin- binding proteins, *Annu Rev Cell Dev Biol* (2003) 19: 141- 172
37. **Mizushima N, Yoshimori T, Levine B**, Methods in mammalian autophagy, *Cell* 140 (2010): 313-326
38. **Tanida I, Waguri S**, Measurement of Autophagy in Cells and Tissues, *Concepts and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Springer Science+Business Media, Chapter 13
39. **Ichimura Y, Komatsu M**, Selective degradation of p62 by autophagy, *Semin Immunopathol* (2008), Springer Verlag
40. **Mizushima N, Yoshimori T**, How to interpret LC3 Immunoblotting, *Autophagy* (2007) 3:6, 542-545,m
41. **Löffler G**, Basiswissen Biochemie, Springer-Verlag 2001, Kapitel 16, 429-449,
42. **Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P**, At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins, *Trends in Cell Biology Vol.13 No.3* (2003)
43. **Saftig P, Beersten W, Eskelinen EL**, Lamp-2, *Autophagy* (2008) 4: 510-512
44. **Kabuta T, Furuta A, Shunsuke A, Furuta K, Wada K**, Aberrant interaction between Parkinson-Disease-associated Mutant UCH-L1 and the lysosomal Receptor for Chaperone-mediated Autophagy, *JBC* (2008) 283: 23731-23738
45. **Braulke T, Bonifaciano JS**, Sorting of lysosomal proteins, *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) Cell Research* 1793, (2009), 605-614
46. **Karolchuk V et all**, A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system, *Autophagy* (2009) 5:6, 862-863
47. **Wilkinson KD**, Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome, *Cell Develop Biol* (2000) 11: 141- 148

48. **Wilkinson KD**, Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes, *Faseb J* (1997) 11, 1245-1256
49. **Wilkinson KD**, The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, *Science* (1989) 246: 670- 673
50. **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
51. **Kwon J et al.**, Developmental regulation of ubiquitin C- terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice, *Biol Reprod* (2004) 71: 515- 521
52. **Tezel E et al**, PGP9.5 as a prognostic factor in pancreatic cancer, *Clin Cancer Res* (2000) 6: 4764- 4767
53. **Yamazaki T et al.**, PGP9.5 as a marker for invasive colorectal cancer, *Clin Cancer Res* (2002) 8: 192- 195
54. **Hibi K et al.**, PGP9.5 as a candidate tumor marker for non- small- cell lung cancer, *Am J Pathol* (1999) 155: 711- 715
55. **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
56. **Osaka H et al.**, Ubiquitin carboxy- terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron, *Human Molecular Genetics* (2003) 12:1945- 1958
57. **Hibi K, Liu Q, Beaudry GA et al.**, Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer, *Cancer Res* (1998) 58, 5690-5694
58. **Wang WJ et al**, Over-expression of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 induces apoptosis in breast cancer cells, *Int J Oncol* (2008), 33, 1037-1045
59. **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
60. **Chen F et al.**, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 is required for maintaining the structure and function of the neuromuscular junction, *PNAS Early edition* (2009)
61. **Rastaldi MP et al.**, Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles, *FASEB J* (2006) 20: 88- 98
62. **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
63. **Diomedi-Camassei F, Rava L, Lerut E, et al.**, Protein-gene-product 9.5 and ubiquitin are expressed in metabolic avtice epithelial cells of normal and pathologic human kidney, *Nephrol Dial Transplant* (2005), 20, 2714-2719

64. **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
65. **Schiwek D, Endlich N, et al.**, Stable expression of nephrin and localisation to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines, *Kidney Int*, (2004) 66, 91-101
66. **Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F et al.**; Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypothesis, *Virology* (2004), 318(1) 1-9. Review
67. **Moffat et al**, A lentiviral RNAi Library for human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen, *Cell* (2006) 124, 1283-1298
68. **Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, Mundel P**, Podocytes in present, past and future, *Kidney international* (2007), 72, 26-36
69. **Cartier A, Djakovic S, Salehi A, et al.**: Regulation of Synaptic Structure by the Ubiquitin C-terminal Hydrolase UCH-L1, *J Neurosci.* (2009), 29 (24): 7857–7868
70. **Ardley CH, Scott GB, Rose SA, et al.**, UCH-L1 aggresome formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's Disease, *Journal of Neurochemistry* (2004) 90, 379-391
71. **Larsen NC, Price JS, Wilkinson KD**, Substrate binding and Catalysis by Ubiquitin C-Terminal Hydrolases: Identification of Two active Site Residues, *Biochemistry* (1996), 35, 6735-6744
72. **Piotrowski J, Beal R, Hoffmann L, et al**, Inhibition of the 26S proteasome by polyubiquitin chains synthesized to have defined lengths. *J Biol Chem* (1997) 272: 23712-23721
73. **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
74. **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
75. **Liu Y, Wu J, Wu H, et al.** UCH-L1 expression of podocytes in diseased glomeruli and in vitro, *Journal of Pathology* (2009) 217: 642-653
76. **Gong B, Cao Z, Zheng P, et al.** Ubiquitin Hydrolase Uch-L1 rescues beta-amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. *Cell* (2006) 126:775-788
77. **Chung KK, Dawson VL, Dawson TM**, New insights into Parkinson's Disease, *J Neurol* (2003), 250 Suppl 3 III 15-24

78. **Vigouroux S, Briand M, Briand Y**, Linkage between the proteasome pathway and neurodegenerative diseases and aging, *Mol Neurobiol* (2004) 30: 201-221
79. **McNaught KS, Olanow CW**, Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's Disease, *Neurobiol Aging* 27(2006) 530-545
80. **Tan J, Wong E, Kirkpatrick D et al.**; Lysin 63-linkes ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases, *Human Molecular Genetics* (2008), Vol 17 No 3, 431-439
81. **Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger et al.**;Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice, *The Journal of Clinical Investigation* (2010), 4: 1084-1096
82. **Bifsha P, Landry K, Ashmarina L, et al.**; Altered gene expression in cells from patient with lysosomal storage disorders suggests impairment of the ubiquitin pathway, *Cell Death and Differentiation* (2007), 14: 511-523
83. **Bonegio RG, Fuhro R, Wang Z, et al.** Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy, *J AM Soc Nephrol* (2005), 16: 2063-2072
84. **Salant DJ, Darby C, Couser WG**, Experimental membranous glomerulonephritis in rats: quantitative studies of glomerular immune deposit formation in isolated glomeruli an whole animals, *J Clin Invest* (1980), 66:71-81

9 Danksagung

Beginnen möchte ich mit einem großen Dank an Herrn Prof. Dr. Rolf A. K. Stahl, der es mir ermöglicht hat, in seiner Abteilung an einem interessanten Thema zu forschen und meine Doktorarbeit zu schreiben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Tobias N. Meyer, der mich mit seiner großen Begeisterung für das Fach Nephrologie angesteckt hat und ohne den diese Arbeit wohl nie entstanden wäre.

Ein unglaubliches großes Dankeschön geht an Dr. Cathérine Meyer-Schwesinger, die mich mit ihrer herzlichen und motivierenden Art während der Zeit im Labor, und auch anschließend bei den Korrekturen, sehr unterstützt hat und sich für meine vielen Fragen und Probleme immer Zeit genommen hat.

Für die Unterstützung und Hilfe bei der Labortätigkeit, möchte ich mich vor allem bei Marlies Sachs, aber auch bei der gesamten Abteilung der III. Medizinischen Klinik bedanken.

Bei Dr. Kemper bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Funktion als Gutachter.

Nicht unerwähnt bleiben sollen, Frithjof Lohmann und Anne Wegener. Ich danke ihnen vor allem für die gute freundschaftliche Zusammenarbeit, die schönen und lustigen Erlebnisse während der Zeit im Labor und die Pausen zwischendurch. Außerdem danke ich ihnen für das Zustandekommen des Wahlfachs Experimentelle Nephrologie.

Bei Anna Hammel möchte ich mich für die vielen anregenden Diskussionen während und nach meiner Labortätigkeit und ganz besonders für die tolle Freundschaft bedanken.

Danken möchte ich auch dem Computerexperten Marc Holze für die großartige technische Unterstützung und das Verhindern mehrerer Nervenzusammenbrüche.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer, nicht nur während der Doktorarbeit, in jeder denkbaren Situation unterstützt haben und mir das Medizinstudium überhaupt erst möglich machten.

Darüber hinaus möchte ich Dr. Brian R. Grell danken, der durch seine Motivation und Unterstützung und vor allem durch seine Geduld sehr zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat.

Siempre hay más tiempo que vida.

10 Lebenslauf

CURRICULUM VITAE

Persönliche
Daten

Eva-Maria Theresia Klupp
Medizinstudentin
geboren am 4. Oktober 1986 in Bayreuth

Anschrift

Frickestraße 42
20251 Hamburg

Ausbildung

seit 04/2011

Ausbildung zum DTB-Group Fitness-Trainer

10/2009 –
04/2011

Promotion in der Experimentellen Nephrologie

III. Medizinische Klinik UKE Hamburg, AG Meyer-Schwesinger

Thema der Dissertation:

Die Rolle von UCH-L1 für die podozytäre Entdifferenzierung in
der membranösen Glomerulonephritis

seit 10/2006

Studium der Humanmedizin

an der Freien Universität Hamburg, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf (UKE)

1. Staatsexamen 08/2008 (Endnote: 3,0)

2009 Zusatzkurs Forensische Anthropologie

Wahlfach: Experimentelle Nephrologie

Beginn des Praktischen Jahrs (PJ) vorraussichtlich August 2011
(Wahlfach: Tropenmedizin)

09/1997 –
07/2006

Schulbildung

Grundschule Gesees (Bayern)

Richard-Wagner-Gymnasium Bayreuth (Bayern)

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4)

Berufspraxis

seit 11/2008

Studentische Hilfskraft

Auf verschiedenen Stationen des UKE (vorwiegend Psychiatrie,
Neurologie, Endoskopie)

02/2011

Famulatur in Cartago, Costa Rica

Centro Médico Dr. Alejandro Sanabria Garita
Allgemeinmedizin

01/2011

Famulatur in San José, Costa Rica

Hospital San Juan de Dios
Kardiologie

08/2010

Famulatur in Bergen auf Rügen

Sana Krankenhaus Bergen auf Rügen
Innere Medizin und Notaufnahme

08/2009

Famulatur in Kumasi, Ghana

Komfo Anokye Teaching Hospital
Innere Medizin

08-09/2007

Pflegepraktikum in Bayreuth

Klinikum Bayreuth
Unfallchirurgie

07-08/2006

Pflegepraktikum in Dar-es-Salaam, Tansania

Shree Hindu Mandal Hospital
Intensivstation

11 Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Poster-Präsentation vorgestellt bei der:

Renal Week
der
American Society of Nephrology (ASN)
2010, Denver, Colorado, USA, November 16 – 21

Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 (UCH-L1) Activity Induces Polyubiquitin Accumulation in Podocytes and Increases Proteinuria in Rat Membranous Nephropathy

Catherine Meyer-Schwesinger^{1*}, Tobias N. Meyer^{1*}, Henning Sievert², Frithjof Lohmann¹, Anna Hammel¹, Elion Hoxha¹, Marlies Sachs¹, Eva-Maria Klupp¹, Silvia Münster¹, Stefan Balabanov², Lucie Carrier^{3,4,5}, Udo Helmchen⁶, Friedrich Thaiss¹, Rolf A.K. Stahl¹

1 Department of Internal Medicine, Nephrology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; 2 University Cancer Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. 3 Department of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Cardiovascular Research Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; 4 Inserm U974, Paris, France, 5 Université Pierre et Marie Curie-Paris, UMR-S974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, IFR14, Paris, F-75013, France. 6 Department of Pathology, Nierenregister, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorgestellt im:

**American Journal of Pathology,
Vol 178, No. 5, May 2011**

**Ubiquitin C-Terminal Hydrolase - L1 Activity Induces
Polyubiquitin Accumulation in Podocytes and Increases
Proteinuria in Rat Membranous Nephropathy**

Catherine Meyer-Schwesinger^{1*}, Tobias N. Meyer^{1*}, Henning Sievert², Frithjof Lohmann¹, Anna Hammel¹, Elion Hoxha¹, Marlies Sachs¹, Eva-Maria Klupp¹, Silvia Münster¹, Stefan Balabanov², Lucie Carrier^{3,4,5}, Udo Helmchen⁶, Friedrich Thaiss¹, Rolf A.K. Stahl¹

1 Department of Internal Medicine, Nephrology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; 2 University Cancer Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. 3 Department of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Cardiovascular Research Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; 4 Inserm U974, Paris, France, 5 Université Pierre et Marie Curie-Paris, UMR-S974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, IFR14, Paris, F-75013, France. 6 Department of Pathology, Nierenregister, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

12 Eidesstattliche Erklärung

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.

Unterschrift: