

Einfluss eines dysfunktionalen UCH-L1- Enzyms auf die podozytäre Proteostase in der Membranösen Nephropathie

Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Julia Reichelt
geb. in Saalfeld (Saale)

Hamburg, 2019

Vorsitzender der Prüfungskommission:

PD Dr. Hartwig Lüthen

Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Hamburg

Datum der Disputation: 13.03.2020

Gutachterinnen:

1. Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Prof. Dr. Julia Kehr

Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Universität Hamburg

*Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.*

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	13
Summary	15
1 Einleitung	17
1.1 Die Membranöse Nephropathie	17
1.2 Ausgewählte experimentelle Tiermodelle der Membranösen Nephropathie	21
1.3 Der glomeruläre Filter	22
1.4 Der Podozyt	23
1.5 Das Ubiquitin Proteasomale System (UPS)	27
1.6 Die Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1)	30
1.7 Rolle von UCH-L1 im Podozyten	33
1.8 Zielsetzung	34
2 Material und Methoden	36
2.1 Material	36
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Längenstandards und Kits	36
2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Laborgeräte und Software	41
2.1.3 Bakterienstämme	44
2.1.4 Vektoren und rekombinante Plasmide	45
2.2 Methoden	46
2.2.1 Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	54
2.2.3 Kultivierung von Bakterien	59
2.2.4 Tierversuche	60

2.2.5	Zellbiologische Methoden	62
2.2.6	Histologie	63
3	Ergebnisse	66
3.1	Charakterisierung naiver UCH-L1-überexprimierender Mäuse	66
3.1.1	Generierung und Verifizierung transgener Mäuse	66
3.1.2	Anzeichen von leichtem podozytären Stress in UCH-L1 ^{I93M} - aber nicht in UCH-L1 ^{WT} -Mäusen	69
3.1.3	Die Überexpression von UCH-L1 ^{WT} resultiert in einer milden Proteinurie, führt aber nicht zum Podozytenverlust.....	70
3.1.4	Überexpression von UCH-L1 ^{I93M} resultiert in einer beeinträchtigten proteasomalen Aktivität und Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen	73
3.1.5	UCH-L1 interagiert mit dem Proteasom, aber nur die Bindung von UCH-L1 ^{I93M} beeinträchtigt die katalytische Aktivität	76
3.1.6	Kompensatorische Hochregulation des lysosomalen Systems in UCH-L1 ^{I93M} - aber nicht in UCH-L1 ^{WT} -Mäusen	78
3.2	Charakterisierung UCH-L1-überexprimierender Mäuse in der Anti-Podozyten-Nephritis (APN)	79
3.2.1	Verifizierung der UCH-L1-Überexpression im experimentellen Tiermodell.....	80
3.2.2	UCH-L1-Expression korreliert mit dem Auftreten von oxidativem Stress in Podozyten von MN-Patienten	81
3.2.3	Verminderte Stressantwort in UCH-L1 ^{WT} -Tieren in der Anti-Podozyten-Nephritis.....	81
3.2.4	UCH-L1 ^{I93M} -überexprimierende Mäuse entwickeln in der APN eine massive Proteinurie infolge einer ausgeprägten Podozytenschädigung.....	83
3.2.5	Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen trotz stabiler proteasomaler Aktivität in UCH-L1 ^{I93M} - aber nicht in UCH-L1 ^{WT} -überexprimierenden Tieren.....	85
3.3	Charakterisierung von UCH-L1-Autoantikörpern in der MN	90
3.3.1	Validierung der Transfektionseffizienz.....	91

3.3.2	Identifizierung von UCH-L1-Autoantikörpern im Serum von MN- und MCD-Patienten mit höherer Bindungsaffinität zum dysfunktionalen I93M-Protein	92
4	Diskussion	96
4.1	Die <i>toxic gain of function</i> -Hypothese	96
4.2	UCH-L1 - mehr als nur ein Modulator der proteasomalen Aktivität	100
4.3	Dysfunktionale UCH-L1 ^{I93M} als Mediator des Podozytenschadens	104
4.4	Aktive UCH-L1 wirkt antioxidativ	107
4.5	Ein neuer Biomarker für die MN?	108
4.6	Fazit	109
	Literaturverzeichnis	110
	Veröffentlichungen	128
	Danksagung	130
	Eidesstattliche Erklärung	131

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Histologien einer Nierenbiopsie eines Patienten mit primärer Membranöser Nephropathie.	18
Abb. 1-2: Mögliche Pathomechanismen, die zur Entstehung von Immundepots im Subepithelialraum des Podozyten führen.	19
Abb. 1-3: Podozytenmorphologie.	26
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Ubiquitinierungskaskade mit anschließender Degradation über das 26S-Proteasom.	28
Abb. 3-1: Generierung von transgenen Mäusen mit podozytenspezifischer Überexpression von UCH-L1 ^{WT} und UCH-L1 ^{I93M} .	67
Abb. 3-2: Verifizierung der Überexpression von UCH-L1 ^{WT} und UCH-L1 ^{I93M} in Podozyten.	69
Abb. 3-3: Podozytärer Stress ist leicht erhöht in UCH-L1 ^{I93M} -überexprimierenden Podozyten.	70
Abb. 3-4: Charakterisierung der Podozytenintegrität von UCH-L1 ^{WT} - und UCH-L1 ^{I93M} -Mäusen.	71
Abb. 3-5: Charakterisierung podozytenspezifischer Proteine UCH-L1-überexprimierender Tiere.	73
Abb. 3-6: Regulation der podozytären Proteostase in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität.	74
Abb. 3-7: Expressionsanalyse der hauptkatalytischen Untereinheiten des Standard- sowie des Immunoproteasoms.	76
Abb. 3-8: Interaktionsstudien zwischen UCH-L1 und dem Proteasom.	77
Abb. 3-9: Regulation des lysosomal/autophagosomalen Systems in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität.	79

Abb. 3-10: Verifizierung der Überexpression von UCH-L1 ^{WT} und UCH-L1 ^{I93M} in Podozyten APN-behandelter Mäuse.	80
Abb. 3-11: Charakterisierung der UCH-L1- und oxidativen Stress-Level in Podozyten während der MN.	81
Abb. 3-12: Untersuchung der oxidativen Stressantwort in UCH-L1-überexprimierenden Podozyten im Krankheitsmodell der MN.	82
Abb. 3-13: Charakterisierung der Podozytenintegrität in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität in der APN.	84
Abb. 3-14: Regulation der podozytären Proteostase in Abhängigkeit der UCH-L1-Aktivität in der APN.	86
Abb. 3-15: Expressionsanalyse der hauptkatalytischen Untereinheit des Standardproteasoms im experimentellen Tiermodell der MN.	88
Abb. 3-16: Expressionsanalyse der hauptkatalytischen Untereinheit des Immunoproteasoms im experimentellen Tiermodell der MN.	89
Abb. 3-17: Überprüfung der Effizienz transient transfizierter HEK293-T-Zellen.	91
Abb. 3-18: Charakterisierung der Bindungsaffinität von UCH-L1-Autoantikörpern im nephrotischen Syndrom.	93
Abb. 3-19: Charakterisierung von UCH-L1-Autoantikörpern in Kontroll-Probanden.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Chemikalien und Enzyme	36
Tabelle 2-2: Isolierungssysteme und Reaktionskits	39
Tabelle 2-3: DNA- und Protein-Längenstandards	39
Tabelle 2-4: verwendete Primär- und Sekundärantikörper	40
Tabelle 2-5: Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 2-6: Geräte und Apparaturen	42
Tabelle 2-7: Software	44
Tabelle 2-8: Bakterienstämme	44
Tabelle 2-9: Ursprungsvektoren	45
Tabelle 2-10: generierte rekombinante Plasmide	45
Tabelle 2-11: verwendete Primer zur Genotypisierung der UCH-L1-Überexpressions-Mauslinien	57
Tabelle 2-12: PCR-Programme (WT und KI / Cre)	57
Tabelle 2-13: Antibiotikazusätze für <i>E. coli</i> -Kulturmedien	60

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
4-HNE	4-Hydroxynonenal
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AD	engl. <i>Alzheimer's disease</i>
ad	auffüllen
Adrm1	engl. <i>adhesion regulating molecule 1</i>
APN	Anti-Podozyten-Nephritis
AR	Aldose-Reduktase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPB	Komplex V-assozierte ATPase
BAP1	BRCA1-assoziertes Protein 1
bar	Druck
C3	Komplementfaktor
C5b-9	Membranangriffskomplex
ca.	circa
CAG	Hybridpromotor
CD2AP	engl. <i>CD2-associated protein</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
CNF	kongenitales nephrotisches Syndrom vom Finnischen Typ

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	engl. <i>cyclization recombination</i> , Rekombinase-Enzym aus dem Bakteriophagen P1
CyPGs	Cyclopentenon-Prostaglandine
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDK	Flag-Tag
<i>de novo</i>	lat. <i>von neuem</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DUB	deubiquitinierendes Enzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Proteinligase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verstärktes Grün-fluoreszierendes Protein
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	lat. <i>und andere</i>
<i>ex vivo</i>	lat. <i>außerhalb des Lebendigen</i>
EXT1	Exostosin 1
EXT2	Exostosin 2
F1	Filial-Generation
FCS	Fetales Kälberserum
<i>flt</i>	engl. <i>FLP recombinase target</i> , Signalsequenz für Flippase (FLP)-Rekombinase
FSGS	Fokale Segmentale Glomerulosklerose

Fx1A	Extrakt aus Nierenrinde mit Bürstensaum proximaler Tubulusepithelzellen
g	Gramm
GBM	glomeruläre Basalmembran
gp330	Glykoprotein 330
h	Stunde
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HA	engl. <i>Human influenza hemagglutinin</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HEK-Zellen	engl. <i>human embryonic kidney</i> -Zellen
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HN	Heymann-Nephritis
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsc70	engl. <i>heat shock cognate protein 70</i>
Hsp90	engl. <i>heatshock protein 90</i>
huPLA2R1	humanes PLA2R1-Konstrukt
huTHSD7A	humanes THSD7A-Konstrukt
huUCH-L1 ^{I93M}	humanes UCH-L1 ^{I93M} -Konstrukt
huUCH-L1 ^{WT}	humanes UCH-L1 ^{WT} -Konstrukt
Hz	Hertz
IFN-α	Interferon-Alpha
IFN-β	Interferon-Beta
IFN-γ	Interferon-Gamma
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
<i>in utero</i>	lat. <i>in der Gebärmutter</i>
<i>in vitro</i>	lat. „im Reagenzglas“, außerhalb des Organismus
<i>in vivo</i>	lat. <i>im lebenden Organismus</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle

kDa	Kilodalton
Ktrl	Kontrolle
L	Liter
Lamp2	engl. <i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LC3	engl. <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
Limp2	engl. <i>lysosomal integral membrane protein 2</i>
loxP	engl. <i>locus of X-over of P1</i> , Schnittsequenz
M	Molare Masse
mA	Milliampere
MCD	Minimal Change Glomerulonephritis
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MN	Membranöse Nephropathie
MnSOD/SOD	Mangan-abhängige Superoxid Dismutase
mUb	Monoubiquitin
muUCH-L1 ^{I93M}	murines UCH-L1 ^{I93M} -Konstrukt
muUCH-L1 ^{WT}	murines UCH-L1 ^{WT} -Konstrukt
Na ₂ EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NEDD8	engl. <i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i>
Neo	Neomycin
NEP	Neutrale Endopeptidase
NEPH1	engl. <i>nephrin-like protein 1</i>
NEPH2	engl. <i>nephrin-like protein 2</i>
NEPH3	engl. <i>nephrin-like protein 3</i>

NeuN	engl. <i>Neuron-specific nuclear protein</i>
NHERF	engl. <i>Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor</i>
nm	Nanometer
<i>NPHS1</i>	Gen, welches für Nephtrin kodiert
<i>NPHS2</i>	Gen, welches für Podocin kodiert
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
NSE	engl. <i>Neuron-specific enolase</i>
p	p-value
pA	Polyadenylierungssignal
PAS	engl. <i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
PBS	phosphathaltige Pufferlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	engl. <i>Parkinson's disease</i>
PGP9.5	engl. <i>protein gene product 9.5</i>
PHN	passive Heymann-Nephritis
PLA ₂ R1	M-Typ Phospholipase-A ₂ -Rezeptor 1
pUb	Polyubiquitin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	engl. <i>Real-Time PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	der Standardfehler des Mittelwerts
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes

SRN	Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom
ssDNA	einzelsträngige DNA
STED	engl. <i>Stimulated Emission Depletion</i>
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-T	engl. <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
THSD7A	engl. <i>Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7A</i>
T _m	Schmelztemperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNT	Tris-NaCl-Tween 20 (Puffer)
TRPC6	engl. <i>Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6</i>
U/μl	Unit pro Mikroliter
UBA	engl. <i>Ub-associated domain</i>
UBL	engl. <i>Ub-like</i>
UCH	Ubiquitin C-terminale Hydrolase
UCH-L1	Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1
UCH-L5	Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L5
ÜNK	Übernachtkultur
UPS	Ubiquitin Proteasomales System
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VIS	engl. <i>visible</i> , sichtbares Licht
WT-1	Wilms Tumor-1
x	fach

Zusammenfassung

Die Membranöse Nephropathie (MN) ist die häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom im Erwachsenenalter und wird durch die Bindung von zirkulierenden Autoantikörpern an podozytenspezifische Antigene ausgelöst. Dabei wird ein von erhöhtem oxidativen Stress begleiteter entzündlicher Prozess induziert, der zu einem Struktur- und Funktionsverlust der Podozyten führt. Neue Studien demonstrieren eine zunehmende Bedeutung von proteinabbauenden Systemen wie dem Ubiquitin Proteasomalen System (UPS) in geschädigten Podozyten. In der MN weisen Podozyten trotz Hochregulation des UPS eine gestörte Proteinhomöostase auf, die sich in einer beeinträchtigten proteasomalen Aktivität und einer krankhaften Akkumulation geschädigter Proteine widerspiegelt. Dabei wird im erkrankten Podozyten vor allem die UPS-Komponente Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1) am stärksten *de novo* exprimiert. In Neuronen ist UCH-L1 ein essenzieller Regulator des Monoubiquitinpools. Die Rolle von UCH-L1 beim Podozytenschaden ist bisher ungeklärt. In einem etablierten Mausmodell der MN wurde gezeigt, dass das Fehlen von UCH-L1 im Podozyten eine protektive Wirkung auf die Podozytenintegrität hat und einer Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen entgegenwirkt (unveröffentlicht). Diese Daten implizieren, dass die UCH-L1-Aktivität den Schaden im erkrankten Podozyten aufrechterhält bzw. fördert. Die in neurodegenerativen Erkrankungen beschriebenen UCH-L1-Fehlfunktionen beruhen auf einer Punktmutation im katalytischen Zentrum (I93M) oder auf oxidativer Modifikation des Enzyms und sind, wie in der MN, durch einen akkumulativen Phänotyp gekennzeichnet. Es wurde gezeigt, dass oxidativ-geschädigte UCH-L1 vergleichbare strukturelle und biochemische Eigenschaften wie die Parkinson-assoziierte I93M-Mutation besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe grundlegender Charakterisierungsexperimente und mechanistischer Studien sowohl im naiven Tier als auch im Mausmodell der MN geklärt werden, inwiefern eine durch oxidativen Stress bedingte strukturelle und funktionelle Veränderung von UCH-L1 1) den Podozytenschaden im Vergleich zum Wildtypprotein begünstigt und 2) welche direkten oder indirekten Interaktionen dieses entstandene aberrante Protein eingeht. Zu diesem

Zweck wurden erstmalig zwei Mauslinien generiert, die podozytenspezifisch das UCH-L1-Wildtypprotein bzw. oxidativ-modifizierte UCH-L1 (repräsentiert durch Einbringen der dysfunktionalen I93M-Mutation) überexprimieren.

Proteinbiochemische und mikroskopische Untersuchungen demonstrieren, dass die Überexpression des Wildtyp-UCH-L1-Enzyms als auch des dysfunktionalen UCH-L1^{I93M}-Enzyms in naiven Podozyten keine Stressantwort auslöst. Trotzdem weisen die Tiere mit dem überexprimierten UCH-L1^{WT}-Protein eine Proteinurie auf, die nicht auf einem Podozytenverlust beruht, sondern vielmehr auf veränderte Expressionslevel podozytenspezifischer Proteine wie Nephritin und α -Aktinin-4 zurückzuführen ist, die für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere essenziell sind. Im Gegensatz dazu zeigen Mäuse mit einer podozytenspezifischen Überexpression von UCH-L1^{I93M} keine Proteinurie und keine veränderte Podozytenintegrität. Dennoch wirkt sich die Hochregulation von UCH-L1^{I93M} negativ auf die Proteinhomöostase im Podozyten aus, da trotz verstärkter Expression der katalytisch wirksamen Beta-5-Untereinheit die proteasomale Aktivität beeinträchtigt ist und der Abbau akkumulierter polyubiquitinerter Proteine nicht bewältigt werden kann. Diese Tiere weisen eine kompensatorische Induktion des lysosomalen Abbauweges auf. Immunopräzipitations- und proteasomale Aktivitätsexperimente zeigen, dass UCH-L1 an das Standardproteasom bindet, wobei nur die dysfunktionale UCH-L1^{I93M}-Form die proteasomale Aktivität herabsetzt. Untersuchungen im Mausmodell der MN verweisen ebenfalls darauf, dass nur die UCH-L1^{I93M}-Variante den für die MN typischen akkumulativen Phänotyp hervorruft, der mit einem starken Podozyten- und Strukturverlust sowie einer schweren Proteinurie einhergeht. Diese Ergebnisse decken sich mit den in Patientenserum identifizierten Autoantikörpern gegen UCH-L1, die vor allem das dysfunktionale Protein mit einer hohen Affinität binden.

In dieser Arbeit konnte ein möglicher Mechanismus aufgezeigt werden, wie UCH-L1 eine Dysregulation des UPS im gesunden und erkrankten Podozyten hervorruft und sekundär den Podozytenschaden begünstigt. Zusammen mit den nachgewiesenen Patienten-Autoantikörpern identifizieren diese Erkenntnisse das dysfunktionale UCH-L1 Enzym als potenziellen Progressionsmarker in der MN.

Summary

Membranous nephropathy (MN) is the most frequent cause of nephrotic syndrome in adults and is induced by binding of circulating autoantibodies to antigens expressed by podocyte foot processes. This autoantibody/antigen reaction results in an enhanced oxidative stress, which induces loss of podocyte structure and function. Recent studies demonstrate an involvement of protein degradation systems such as the ubiquitin proteasomal system (UPS) in podocyte injury. Even though podocytes exhibit a marked induction of the UPS in MN their proteostasis is altered, a condition reflected by a reduced proteasomal activity and by an accumulation of damaged proteins. Among the strongest *de novo* induced UPS proteins is the neuronal Ubiquitin C-terminal Hydrolase-L1 (UCH-L1). In neurons, UCH-L1 represents an essential regulator of the intracellular pool of monoubiquitin. The role of UCH-L1 in podocyte injury is not known. Unpublished data of our group demonstrate that podocyte-specific deletion of UCH-L1 exerts a protective effect on podocyte integrity in an established murine model of MN and prevents an accumulation of polyubiquitinated proteins. These findings suggest that UCH-L1 activity maintains or perpetuates podocyte injury. In neurodegenerative disease, UCH-L1 malfunctions, which depend on a point mutation (I93M) within the catalytic center or on an oxidative modification of the enzyme, have been described and result in an accumulative phenotype. Interestingly, oxidative-modified UCH-L1 exhibits comparable structural and biochemical alterations to the Parkinson-associated I93M mutation. Which mechanistic factor(s) contribute to the accumulative phenotype in UCH-L1 malfunction is unknown.

Aim of the current project was to perform phenotypic and mechanistic analyses of transgenic mice overexpressing the wildtype or the I93M mutated UCH-L1 in podocytes in the naive condition and following induction of MN, and to assess in what way oxidative stress induced structural and functional alterations of UCH-L1 affect podocyte injury, and which direct or indirect interactions are engaged by this aberrant protein. Proteinbiochemical and microscopic evaluations demonstrate that both overexpression of wildtype and of I93M mutated UCH-L1 do not *per se* induce a severe stress response. Mice that overexpress the UCH-L1^{WT} protein in podocytes develop proteinuria, which does not result from podocyte loss but rather from an altered expression of podocyte-specific proteins such as nephrin and α -actinin-4, which are

essential for the maintenance of the glomerular filtration barrier. Contrastingly, mice that overexpress UCH-L1^{I93M} in podocytes exhibit disturbances in their proteostasis, however no proteinuria. Specifically, despite enhanced levels of the beta-5 subunit of the proteasome, proteasomal activity is reduced and polyubiquitinated proteins accumulate. These mice exhibit a compensatory induction of the lysosomal degradation pathway. Immunoprecipitation and proteasomal activity assays demonstrate that UCH-L1 binds to the standard proteasome, whereby only binding of UCH-L1^{I93M} results in a decrease of proteasomal activity. Investigations in the murine model of MN demonstrate that only UCH-L1^{I93M} induces the for MN typical protein accumulations, which is accompanied by a severe podocyte loss and morphological alteration of the glomerular filtration barrier resulting in nephrotic range proteinuria. These results are mirrored by the finding in patient sera, in which we identified autoantibodies against UCH-L1 with a preferential affinity to the dysfunctional enzyme.

In summary we propose a mechanism by which UCH-L1 induces a dysregulation of the UPS in naive and injured podocytes that perpetuates injury. In conjunction with the discovered patient antibodies these findings identify dysfunctional UCH-L1 as a potential marker for progressive podocyte injury in MN.

1 Einleitung

1.1 Die Membranöse Nephropathie

Die Membranöse Nephropathie, auch Membranöse Glomerulonephritis genannt, ist mit einem Anteil von 20 % die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms bei erwachsenen Kaukasiern. Beim nephrotischen Syndrom handelt es sich um einen Sammelbegriff für eine Reihe von klinischen Leitsymptomen wie Hypoproteinämie und Hyperlipidämie sowie hypalbuminämischen Ödemen, die auf Grund der großen Proteinurie ($> 3,5 \text{ g/24 h}$) entstehen (Segeher und Wanner, 2014). Mit einer Inzidenz von 1:100000 stellt die Membranöse Nephropathie (MN) eine der häufigsten glomerulären Erkrankungen dar, die doppelt so häufig Männer wie Frauen zwischen 40 und 50 Jahren betrifft (Hogan *et al.*, 1995). Dass es sich bei der MN um eine sehr heterogene Erkrankung handelt, zeigt der inkonstante klinische Verlauf. Während ca. 25 % der Patienten eine Spontanremission mit Erhalt der Nierenfunktion aufweisen, kommt es bei ca. 1/3 der Patienten innerhalb von 10-15 Jahren trotz immunsuppressiver Therapie zu einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz (Wasserstein, 1997). Einen nur schwer abschätzbaren Krankheitsverlauf zeigt die dritte Patientengruppe, die mit anhaltenden gemäßigten Proteinurien ($3\text{-}5 \text{ g/24 h}$) aber unveränderter Nierenfunktion zunächst nur supportiv behandelt werden.

In 80 % der Fälle wird die Erkrankung als autoimmun bzw. idiopathisch angesehen (primäre MN) während die sekundäre MN als Folge von anderen Erkrankungen wie Infektionskrankheiten (Hepatitis B/C, HIV, Malaria), Autoimmunerkrankungen (Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)) oder Malignomen auftritt (Wasserstein, 1997). Als weitere Ursachen sind auch Medikamenten-assoziierte Formen durch Goldsalze, Penicillinamin und nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) beschrieben (Ponticelli, 2007).

Nach Ausschluss sekundärer Ursachen erfolgt die Diagnosestellung der idiopathischen Membranösen Nephropathie vorrangig durch die histologische Differenzierung gewonnener Nierenbiopsien. Granuläre Ablagerungen von Immunkomplexen entlang der glomerulären Kapillarschleife sowie die Akkumulation elektronendichter subepithelialer Depots in der glomerulären Basalmembran (GBM) prägen das typische morphologische Bild der MN. Die daraus resultierende

Schädigung der aufliegenden Podozyten führt zur Neusynthese von extrazellulärem Material, welches um die Depots herum eingelagert wird und mikroskopisch als Dorn-ähnliche Strukturen erkennbar ist. Dadurch erscheint die GBM verbreitert ohne das Anzeichen von Zellproliferation vorliegen (Abbildung 1-1).



Abb. 1-1: Histologien einer Nierenbiopsie eines Patienten mit primärer Membranöser Nephropathie. (D): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines erkrankten Glomerulus mit charakteristischem granulärem Immunglobulin G (IgG)-Färbemuster entlang der Kapillarschleifen. (E): Elektronenmikroskopische Aufnahme einer verdickten glomerulären Basalmembran (GBM), die durch abgelagerte elektronendichte Immunkomplexe (weiße Sternchen) in der Lamina rara externa der GBM unterhalb der Podozyten (P) hervorgerufen wird. Schwarze Sternchen verweisen auf von Podozyten neusynthetisiertes extrazelluläres Material, das zwischen den Depots akkumuliert. CL: Kapillarlumen, EN: Endothelzelle. (modifiziert nach Beck und Salant, 2014)

Die Depots bestehen zum größten Teil aus Immunglobulinen (Ig; vor allem IgG4), unbekanntem Antigenen, C3-Komplementfaktor und dem Membranangriffskomplex C5b-9 (Ronco und Debiec, 2005 und 2007). Die Pathomechanismen, die der Immundepotenzstehung in der MN zugrunde liegen, sind weitestgehend ungeklärt. Aktuell werden drei Konzepte zur Entstehung der Immunkomplexe in experimentellen Tiermodellen und Patienten mit MN diskutiert (Abbildung 1-2). So existiert die Theorie, dass systemisch zirkulierende Immunkomplexe auf Grund ihrer Größe und Ladungseigenschaften die Basalmembran passiv durchqueren und sich dort ablagern. Des Weiteren wird hypothetisiert, dass die Immunkomplexe auch dissoziieren können und nach Passieren der Basalmembran wieder konglomerieren und sich unterhalb der Podozyten ansammeln (Fujigaki *et al.*, 1993; Abbildung 1-2 A). Auch die *in situ*-Bindung von Antikörpern an subepithelial abgelagerte Fremddantigene, die auf Grund ihrer Positivität mit negativ geladenen Strukturen in der Basalmembran interagieren, ist beschrieben (Border *et al.*, 1982; Abbildung 1-2 C). Beide Konzepte werden vor allem als allogene Reaktion nach Nierentransplantationen oder im Zusammenhang mit sekundärer MN als Folge beispielsweise viraler Infektionen oder Systemischen Lupus

Erythematodes (SLE) diskutiert (Johnson und Couser, 1990; Schmiedeke *et al.*, 1989). Auch die Ablagerung von zirkulierenden Kuhmilchantigenen mit sekundärer subepithelialer Immunkomplexbildung wurde als möglicher Auslöser einer MN bei Kindern definiert (Debiec *et al.*, 2011).

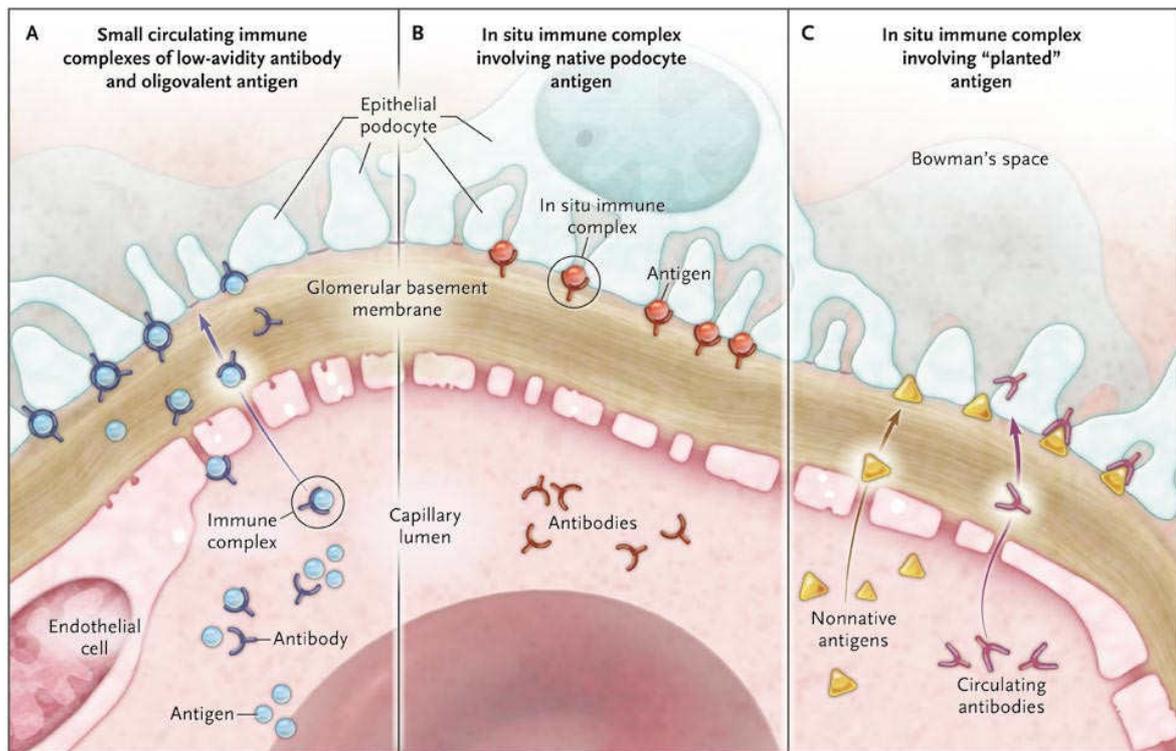


Abb. 1-2: Mögliche Pathomechanismen, die zur Entstehung von Immundepots im Subepithelialraum des Podozyten führen. Die systemisch zirkulierenden Autoantikörper können in Form bereits bestehender löslicher Immunkomplexe (A), nach Bindung eines endogenen podozytenspezifischen Zielantigens (B) oder Bindung eines angesiedelten Fremdantigens (C) als elektronendichte Aggregate unterhalb der Podozyten abgelagert werden und eine Schädigung glomerulärer Strukturen initiieren. (Glasscock, 2009)

Der dritten Theorie nach kommt es zur *in situ*-Bindung von Autoantikörpern an endogene Antigene auf der Podozytenoberfläche. Den Beweis, dass zirkulierende Antikörper durch *in situ*-Bindung glomerulärer Strukturen eine Membranöse Nephropathie im Menschen auslösen, erbrachten erstmals Debiec *et al.* 2002 mit der Charakterisierung des podozytenspezifischen Antigens Neutrale Endopeptidase (NEP). In diesem Fall handelt es sich um eine kongenitale Form einer neonatalen MN bei der betroffene Mütter auf Grund eines Gendefektes der NEP während der Schwangerschaft gegen die NEP des Kindes immunisiert werden. Die maternalen Antikörper sind in der Lage die Plazentaschranke zu passieren und verursachen durch Bindung an das fetale Protein beim Kind eine MN bereits im Mutterleib. Jedoch ist die

NEP nur für diese seltene Form der MN bei Neugeborenen von Bedeutung und spielt in der Pathogenese bei Erwachsenen keine Rolle.

Auf der Suche nach weiteren Zielantigenen wurde mit der Entdeckung von zirkulierenden Antikörpern im Serum von MN-Patienten gegen den M-Typ Phospholipase-A₂-Rezeptor 1 (PLA₂R1) ein großer Durchbruch erzielt (Beck *et al.*, 2009). Die identifizierten Autoantikörper gehören überwiegend zur IgG4-Subklasse und können bei 70-80 % der Patienten mit primärer MN nachgewiesen werden, nicht aber im Serum von gesunden Menschen sowie bei Patienten mit sekundärer MN oder anderen Nierenerkrankungen. Zudem wurde gezeigt, dass der PLA₂R1-Titer mit dem Krankheitsverlauf PLA₂R1-positiver MN-Patienten korreliert und somit ein bedeutender diagnostischer Marker zur Beurteilung der Progression und Therapieeffizienz ist (Beck *et al.*, 2009; Hofstra *et al.*, 2011; Hoxha *et al.*, 2011). Die Beschreibung von Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7A (THSD7A) als zweites endogenes Zielantigen ermöglichte eine weitere Einteilung der Patienten mit Membranöser Nephropathie (Tomas *et al.*, 2014). Mit nur 2-3 % stellen die THSD7A-positiven MN-Patienten eine sehr kleine Kohorte dar. Es wurde gezeigt, dass THSD7A-Autoantikörper ebenfalls spezifisch für die primäre MN sind und erste Studien weisen auch hier eine Korrelation zwischen dem THSD7A-Titer und dem Krankheitsverlauf auf. In der engen Verknüpfung von THSD7A-positiver MN mit bösartigen Tumoren liegt der bedeutendste klinische Unterschied zur PLA₂R1-assoziierten MN. Bei etwa 20 % der THSD7A-assoziierten MN-Patienten wurde drei Monate nach Erhebung des MN-Befunds ein Malignom diagnostiziert (Hoxha *et al.*, 2017).

Für die ca. 20 % PLA₂R1- und THSD7A-doppel negativen Patienten sowie Patienten mit autoimmuner sekundärer MN konnte bisher noch kein Zielantigen charakterisiert werden. In einer kürzlich veröffentlichten Pilotstudie mit PLA₂R1-positiven und -negativen Patienten, deren Erkrankung teilweise mit SLE assoziiert ist, wurden zwei neue putative Zielantigene namens Exostosin 1 (EXT1) und Exostosin 2 (EXT2) identifiziert (Sethi *et al.*, 2019).

1.2 Ausgewählte experimentelle Tiermodelle der Membranösen Nephropathie

Das experimentelle Rattenmodell der Heymann-Nephritis (HN) wurde erstmals 1959 von Heymann *et al.* beschrieben und war das erste Krankheitsmodell in welchem die klinischen und histologischen Merkmale der Membranösen Nephropathie reproduziert werden konnten. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die abgelagerten Immunkomplexe *in situ* entstehen und dass das Komplementsystem sowie oxidativer Stress Einfluss auf die Proteinurieentwicklung haben. Die Induktion der aktiven HN erfolgt durch Immunisierung von Lewis-Ratten mit einem Extrakt aus Nierenrinde mit Bürstensaum proximaler Tubulusepithelzellen (Fx1A) und Freundesches Adjuvans. Da zur Untersuchung pathologischer Mechanismen in der MN ein kalkulierbarer und reproduzierbarer Zeitablauf nötig ist, wurde ein passives Heymann-Nephritis (PHN)-Modell entwickelt, in dem Ratten mit speziesfremden präformierten Antikörpern gegen Fx1A immunisiert wurden. Die anschließend eluierten glomerulären Immunglobuline ermöglichten eine Immunopräzipitation solubilisierter Membranproteine aus isolierten tubulären Mikrovilli. Das so identifizierte Glykoprotein 330 (gp330) ist heute als Megalin bekannt und fungiert in vielen Epithelien, unter anderem auf der basalen Seite der Podozytenfußfortsätze, als Endozytoserezeptor (Kerjaschki und Farquhar, 1982; Farquhar *et al.*, 1995). Die dort *in situ* formierten Immunkomplexe werden vom Podozyten abgestoßen und mit der GBM vernetzt, wo sie schließlich akkumulieren und nicht mehr phagozytiert werden können (Kerjaschki *et al.*, 1987). Da Megalin nur in proximalen Tubulusepithelzellen, nicht aber auf humanen Podozyten exprimiert wird, kommt es als endogenes Antigen für die Entstehung der MN beim Menschen nicht in Frage. Darüber hinaus zeigten Versuche mit aufgereinigtem Anti-Megalin-IgG, dass die *in situ*-Bindung von Megalin zwar die Entstehung von Immundepots induziert, jedoch nicht zur Entwicklung einer Proteinurie führt. Diese Erkenntnisse verweisen darauf, dass es neben Megalin noch mindestens ein weiteres nephritogenes Antigen geben muss, dessen Bindung das Vollbild der PHN mit konsekutiver Proteinurie hervorruft (Kamata *et al.*, 1985). Weitere Arbeiten beweisen, dass die Proteinurie eine Konsequenz der Aktivierung des Membranangriffkomplexes C5b-9 ist, der ebenfalls verstärkt in den Immundepots lokalisiert werden konnte (Couser *et al.*, 1985). Der Nachweis von C5b-9-positiven Vesikeln in Podozyten und im Kapselraum lassen vermuten, dass Podozyten abgelagertes C5b-9 verstärkt aufnehmen und in Endosomen konzentrieren bevor C5b-9 in den Bowman-Kapselraum per Transzytose sezerniert wird (Kerjaschki *et al.*, 1989). Da mehr Komplement aufgenommen als

prozessiert wird, kommt es zum Einbau des Membranangriffkomplexes in die podozytäre Plasmamembran. Dieses Ereignis resultiert in einer veränderten Proteinbiosynthese, die zahlreiche Signalkaskaden aktiviert und den glomerulären Schaden induziert. Dazu zählt die Aktivierung von Proteinkinasen, Phospholipasen, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren sowie Stress-assoziierten Proteinen und NADPH-Oxidasen. Dieses vorherrschende Milieu wirkt sich negativ auf verschiedenste Signalwege aus, die für die Aufrechterhaltung des Metabolismus, der Struktur und Funktion sowie Integrität des Zytoskeletts und Schlitzmembran im Podozyten von Bedeutung sind (Cybulsky *et al.*, 2005). Zum einen resultiert diese Stressantwort in einer Umverteilung von Schlitzmembranproteinen und über einen unbekanntem Mechanismus induzierten Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze (*effacement*) bis hin zum Podozytenverlust. Dadurch geht die Integrität der Filterbarriere verloren und Albumin sowie größere Eiweißproteine können nicht mehr zurückgehalten werden (Nangaku *et al.*, 2005). Andererseits wird angenommen, dass die durch den Oxidoreduktasekomplex produzierten großen Mengen freier Sauerstoffradikale (ROS) in den subepithelialen Raum freigesetzt werden und dort ansässige Matrixkomponenten oxidativ schädigen (Neale *et al.*, 1993). Das führt zu einer Neusynthese und Einlagerung von extrazellulärer Matrix in die GBM.

Das Modell der Anti-Podozyten-Nephritis (APN) ermöglicht die Analyse einer Immunkomplex-vermittelten Nierenerkrankung in Mäusen. Zu diesem Zweck werden Schafe mit kultivierten murinen Podozyten immunisiert. Im Rahmen der Immunantwort bilden diese polyklonale Antikörper gegen verschiedenste podozytäre Antigene. Das gewonnene Serum wird anschließend in Mäuse injiziert und führt nach ca. 14 Tagen zur Ausbildung eines Podozytenschadens, der durch eine ausgeprägte Proteinurie, Fußfortsatzverschmelzung sowie subepithelial abgelagerte Immunkomplexe charakterisiert ist (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011).

1.3 Der glomeruläre Filter

Die Nieren sind die wichtigsten Ausscheidungsorgane, die durch Ultrafiltration des Blutes niedermolekulare Stoffwechselprodukte und körperfremde Substanzen über den Harn eliminieren. Neben der Regulation des Elektrolythaushaltes und Säure-Base-Gleichgewichts, stellen sie ein bedeutendes endokrines Organ dar, das durch Produktion bzw. Modifikation von Hormonen den Blutdruck (Renin), die

Knochenmineralisierung (Aktivierung von Vitamin D) sowie Blutbildung (Erythropoetin) modulieren (Segeer und Wanner, 2014). Um dieser komplexen Filterfunktion nachzukommen, passieren ca. 1 L Blut/min die Nieren (Munger *et al.*, 2011). Aus diesem Grund ist die Nierenrinde, in der sich pro Niere ca. eine Million filtrierende Nephrone befinden, im Gegensatz zum Nierenmark besonders gut durchblutet (Puelles *et al.*, 2011). Ein Nephron stellt die kleinste funktionelle Einheit der Niere dar und setzt sich aus einem Glomerulus mit dem nachgeschalteten tubulären System zusammen. Das Glomerulus wiederum besteht aus einem Kapillarknäuel und einer umgebenen Bowman-Kapsel, die den Ausfluss von filtriertem Primärharn ins Tubulointerstitium verhindert. Der in den Kapselraum filtrierte Primärharn wird anschließend in ein Tubulussystem geleitet in welchem die Rückresorption und Konzentration von bis zu 180 L Ultrafiltrat täglich erfolgt.

Wichtige glomeruläre Komponenten sind die Kapsel-assoziierten Parietalzellen und zentral angeordneten Mesangialzellen sowie die dreischichtige glomeruläre Filtrationsbarriere bestehend aus dem fenestrierten glomerulären Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den harnseitig aufliegenden Podozyten. Auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften verhindert die GBM den Durchtritt von anionischen Makromolekülen und hochmolekularen Substanzen wie Albumin, sodass der gebildete Urin nahezu frei von Proteinen ist (Chang *et al.*, 1975; Thomson und Blantz, 2010).

1.4 Der Podozyt

Podozyten sind hochspezialisierte postmitotische Epithelzellen, die ihre Fähigkeit zur Teilung verloren haben. Vom harnseitig liegenden voluminösen Zellkörper gehen lange primäre Ausläufer ab, die sich um die Kapillarschlingen im Glomerulus wickeln und dabei in weitere zahlreiche sekundäre Fußfortsätze verzweigen. Diese bilden zusammen mit Fußfortsätzen benachbarter Podozyten über Zell-Zell-Kontakte ein interdigitierendes Muster, das von einer extrazellulären Schlitzmembran bedeckt wird. Diese Strukturen verleihen dem Podozyten Polarität und gliedern die sekundären Fußfortsätze in apikale, basale und laterale Membrandomänen, die sich vor allem in ihrer Lipid-Zusammensetzung unterscheiden (Kerjaschki, 2001). Diese Heterogenität äußert sich auch in der einzigartigen Architektur des podozytären Zytoskeletts, die für Morphologie und Elastizität maßgeblich ist, um auf den kontraktiven Kapillargefäßen

zu bestehen (Abb. 1-3). Zusätzlich sind Podozyten auch strukturgebende Elemente indem sie die glomeruläre Kapillarwand stabilisieren und dem hydrostatischen Druck des Blutes entgegenwirken (Suleiman *et al.*, 2017). Während im Zellkörper und den primären Fußfortsätzen das Zytoskelett durch Mikrotubuli (24 nm) und Intermediärfilamente (10 nm) wie Vimentin oder Desmin gebildet wird, liegen in den sekundären Fußfortsätzen Mikrofilamente (7-9 nm) vor, deren Hauptkomponente - wie in glatten Muskelzellen - filamentöses Aktin (F-Aktin) ist (Andrews, 1981; Vasmant *et al.*, 1984; Cortes *et al.*, 2000; Shankland, 2006). Dieser kontraktile Apparat aus F-Aktin und seinen Adhäsionsmolekülen beschreibt eine sehr dynamische Struktur, die schnell polymerisiert und seine Zusammensetzung verändern kann. Die Aktinfilamente sind in gepaarten Bündeln angeordnet, die über α -Aktinin-4 und Myosin vernetzt sind und mit den Mikrotubuli der primären Fußfortsätze interagieren (Drenckhahn und Franke, 1988; Gordon *et al.*, 2000).

Die sekundären Fußfortsätze des Podozyten sind im Bereich der basalen Membrandomäne über Fokalkontakte wie Integrine oder Dystroglykan in der GBM verankert. Der transmembrane Dystroglykankomplex verbindet das Aktinskelett über Utrophin mit Laminin oder Agrin in der GBM (Raats *et al.*, 2000; Regele *et al.*, 2000). Ebenso binden Integrine wie $\alpha_3\beta_1$ -Integrin, Matrixproteine wie Laminin, Entactin und Kollagen IV und verknüpfen sie mit intrazellulären zytoskelettalen Adapterproteinen wie Paxillin, Vinculin oder α -Aktinin-4 (Dedhar *et al.*, 1992). Dabei kommt dem Adhäsionsmolekül α -Aktinin-4 eine besondere Bedeutung bei der Entstehung von glomerulären Schäden zu. Mutationen im *ACTN4*-Gen bedingen eine erhöhte Bindungsaffinität für Aktin und sind für eine hereditäre Form der Fokalen Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und massiver Proteinurie verantwortlich (Kaplan *et al.*, 2000). Ein wichtiger Modulator der α -Aktinin-4-Expression ist das 1997 von Mundel *et al.* beschriebene Synaptopodin. Für dieses Aktin-bindende Protein sind zwei PEST-Motive beschrieben, deren Sequenzabschnitte reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) oder Threonin (T) sind (Weins *et al.*, 2001). Es ist beschrieben, dass PEST-Regionen Proteine für einen schnellen proteasomalen Abbau markieren (Rechsteiner und Rogers, 1996). Somit sind Matrixproteine, Fokalkontakte und ihre Adhäsionsmoleküle demnach nicht nur reine Strukturelemente, sondern Teil des sensiblen Netzwerkes zur Regulation der Aktin-Dynamik und der damit verbundenen Mobilität und Motilität (Byers *et al.*, 1992; Ballestrem *et al.*, 2001). Störungen dieses

Systems führen zur Umverteilung von zytoskelettalen Strukturproteinen und Verlust der adhäsiven Interaktion mit der Membranmatrix, die für die Funktion der Filtrationsbarriere elementar ist (Ito *et al.*, 1986; Whiteside *et al.*, 1993).

Während die Podozytenfußfortsätze mit der GBM verbunden sind, liegen die Zellkörper frei im Kapselraum. Das Soma beherbergt neben dem prominenten Zellkern, Zellkompartimente wie Golgi-Apparat, raues und glattes Endoplasmatisches Retikulum (ER), lysosomale Vesikel und zahlreiche Mitochondrien, die alle auf eine hohe anabole und katabole Aktivität hinweisen (Pavenstädt *et al.*, 2003). So wird der Großteil der Komponenten der GBM wie z.B. Kollagen IV, Laminin, Entactin und Agrin im Podozyten synthetisiert und sezerniert (Miner, 1999). Der Zellkörper ist von einer anionischen Glykokalyx überzogen, die mit Podocalyxin, Podoplanin und Podoendin angereichert ist (Kerjaschki *et al.*, 1984; Matsui *et al.*, 1999). Diese negative Oberflächenladung gewährleistet, dass ebenfalls negativ geladene Proteine wie Albumin die glomeruläre Filtrationsbarriere nicht passieren können. Darüber hinaus ist die zytoplasmatische Podocalyxin-Domäne über den NHERF (*Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor*)/Ezrin-Komplex mit dem Aktinzytoskelett assoziiert und somit ein weiterer Modulator der Podozytenmorphologie (Schmieder *et al.*, 2004).

Die Grenzlinie zwischen der apikalen und basalen Podozytenmembran bildet als dritte, laterale Struktur, die Schlitzmembran. Sekundäre Fußfortsätze benachbarter Podozyten formen Filtrationsschlitze mit einer konstanten Weite von 30-40 nm und durchschnittlichen Porengröße von 12.1 nm, die von einer membranähnlichen Struktur miteinander verbunden werden (Rodewald und Karnovsky, 1974; Furukawa *et al.*, 1991; Gagliardini *et al.*, 2010). Die Schlitzmembran repräsentiert einen Zell-Zell-Kontakt, der zahlreiche Signalwege zum Erhalt der Morphologie und Motilität (Regulation Zellpolarität, Organisation des Zytoskeletts), Zellvitalität (Endozytose) sowie Filterfunktion steuert (Benzing, 2004; Sampogna und Al-Awqati, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass es sich um einen modifizierten Zell-Zell-Kontakt handelt, der morphologische Eigenschaften und Expressionslevel von Markerproteinen aufweist, die typisch für *tight junctions*, *adherens junctions* und *gap junctions* sind. Durch die Expression von Nephrin und Neph1 werden diese Zell-Zell-Kontakte weitestgehend ersetzt und verbleiben nahe der Schlitzmembran, obwohl sie auf Grund der interzellulären Distanz von 40 nm nicht mehr effizient interagieren können (Grahammer *et al.*, 2013).

NEPH1 *in vivo* und *in vitro* assoziieren und über intrazelluläre Phosphorylierungsdomänen Signale zur Organisation des Zytoskeletts vermitteln (Garg *et al.*, 2007). Diese Interaktion spiegelt die von Rodewald und Karnovsky 1974 beschriebene Reißverschlussartige Struktur der Schlitzmembran wider.

Zur NEPH-Familie gehören noch zwei weitere Proteine, NEPH2 und NEPH3. Alle drei NEPH-Proteine werden podozytär exprimiert und weisen eine konservierte Podocin-Bindedomäne auf (Sellin *et al.*, 2002). Podocin gehört wie TRPC6 (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6*) und CD2AP (*CD2-associated protein*) zu den Schlitzmembran-assoziierten Proteinen, die nicht nur strukturelle Komponenten sind, sondern ebenfalls Funktionen im Podozyten-Signalling übernehmen (Perico *et al.*, 2016). Podocin gehört der Stomatin-Proteinfamilie an und ist ein podozytenspezifisches integrales Membranprotein, dessen C- und N-terminales Ende im Zytoplasma liegt. Roselli *et al.* konnten 2002 zeigen, dass Podocin nahe der lateralen Membrandomäne exprimiert wird und in *lipid rafts* – Mikrodomänen der Zellmembran mit einer speziellen Lipid- und Proteinzusammensetzung – lokalisiert ist. Darüber hinaus ist Podocin über seinen C-Terminus mit CD2AP und Nephrin assoziiert (Schwarz *et al.*, 2001). Mutationen im Podocin-kodierenden *NPHS2*-Gen sind bei Kindern mit einem Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom (SRN) mit FSGS verknüpft (Boute *et al.*, 2000). Die mit SRN-assoziierten Punktmutationen R138Q und R138X verhindern die Rekrutierung von Nephrin in die *lipid rafts*, sodass das nachfolgende Nephrin-Signalling gestört ist (Huber *et al.*, 2003).

1.5 Das Ubiquitin Proteasomale System (UPS)

Die intrazelluläre Proteindegradation ist ein streng regulierter Prozess, der für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase essenziell ist. Die Proteostase ist das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, -qualitätskontrolle und -abbau. In der Zelle existieren verschiedene Abbausysteme von denen das hoch konservierte Ubiquitin Proteasomale System (UPS) vor allem für die Degradation von kurzlebigen, fehlgefalteten, beschädigten und regulatorischen Proteinen zuständig ist (Hershko und Ciechanover, 1998). Dadurch nimmt das UPS Einfluss auf eine Reihe wichtiger zellulärer Prozesse wie die Zellzyklus-Regulation, DNA-Reparatur, Regulation der Immun- und Entzündungsantwort sowie Entwicklung und Differenzierung (Ciechanover *et al.*, 2000).

Das *target signal* für den Proteinabbau ist Ubiquitin, ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das hoch konserviert ist und ubiquitär exprimiert wird. Dieses wird kovalent als posttranslationale Modifikation an das abzubauenende Substrat gebunden und induziert somit die Degradation von über 80 % der intrazellulären Proteine (Pickart, 2001). So entscheidet der Ubiquitinierungsstatus eines Proteins über dessen zelluläre Lokalisation, Aktivität, Halbwertszeit und Interaktion mit anderen Molekülen (Ciechanover *et al.*, 2000; Hochstrasser, 2000).

Der Abbau der ubiquitinierten Substrate erfolgt in zwei Schritten: Zuerst wird das Substrat in einer ATP-abhängigen Reaktion ubiquitiniert und anschließend durch das 26S-Proteasom degradiert (Abb. 1-4) (Hershko und Ciechanover, 1998).

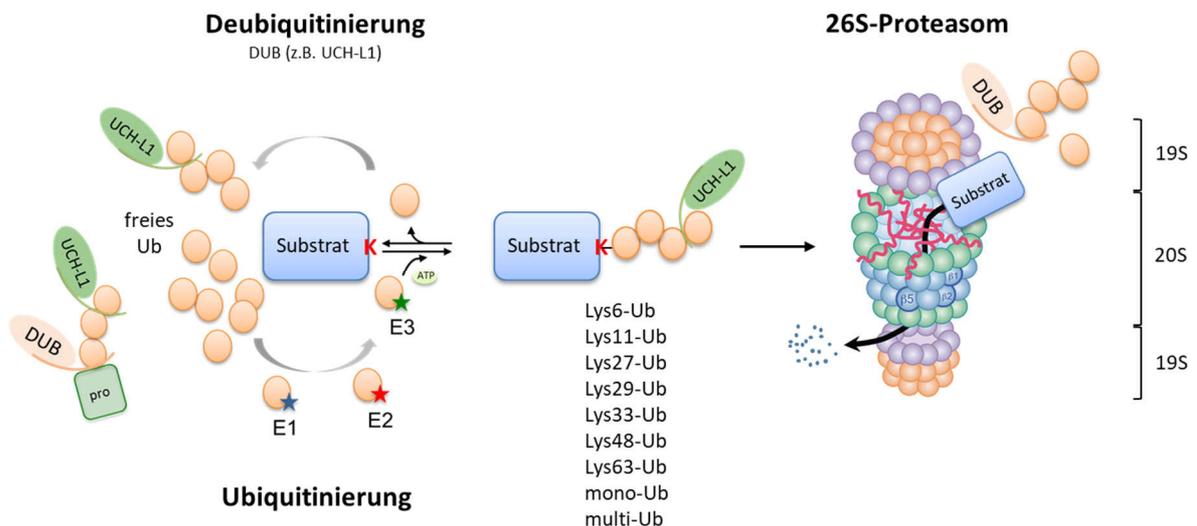


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Ubiquitinierungskaskade mit anschließender Degradation über das 26S-Proteasom. Um Proteine für den Abbau zu markieren, wird Ubiquitin in einem ATP-verbrauchenden Prozess durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert, an einen Cystein-Rest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) gebunden, welches das Ubiquitinmolekül anschließend zusammen mit der Ubiquitin-Proteinligase (E3) auf einen Lysin-Rest des Zielsubstrates transferiert. Diese Kaskade kann beliebig oft wiederholt werden. Die Anzahl der ligierten Ubiquitine sowie die Art der Verzweigung entscheiden unter anderem über den Abbau des Proteins. Eine Polyubiquitinierung über Lysin 48 (K48)-Reste ist signalgebend für den Abbau durch das 26S-Proteasom, während eine K63-Verlinkung der Ubiquitine den lysosomalen Abbauweg einleitet. Die Degradation erfolgt im 20S-Kernkomplex durch die katalytisch aktiven $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 5$ -Untereinheiten. Die freigesetzten Polyubiquitinketten werden von deubiquitinierenden Enzymen (DUB) wie z.B. UCH-L1 prozessiert und stehen so für neue Markierungsreaktionen zur Verfügung.

In einer dreistufigen Enzymkaskade wird Ubiquitin über eine Isopeptidbindung an ein Lysin des Zielsubstrates geknüpft. Im ersten Schritt erfolgt unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) die Aktivierung des Ubiquitinmoleküls durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1). Dabei kommt es zur Ausprägung einer Thioesterbindung

zwischen einem C-terminalen Glycin-Rest von Ubiquitin und einem Cystein-Rest im katalytischen Zentrum von E1. Nachfolgend wird das aktivierte Ubiquitin an einen Cystein-Rest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) transferiert um im letzten Schritt mit Hilfe der Ubiquitin-Proteinligase (E3) auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Substrates übertragen zu werden (Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). Durch mehrfaches Durchlaufen der Enzymkaskade können weitere Ubiquitine an verschiedene Lysin-Reste angehängt und Substrate mono- und multiubiquitiniert werden. Die Art der Verzweigung und Länge der Ubiquitinketten entscheidet über das Schicksal des Proteins. Damit das Substrat für den proteasomalen Abbau erkannt wird, muss eine Polyubiquitinierung über Lysin 48 (K48)-Reste erfolgen und aus mindestens vier Ubiquitinen bestehen (Chau *et al.*, 1989; Thrower *et al.*, 2000).

Im zweiten Schritt wird das Substrat direkt oder über UBA (*Ub-associated domain*)/UBL (*Ub-like*)-Helferproteine, die sowohl über Ubiquitin- als auch Proteasom-bindende Eigenschaften verfügen, auf das 26S-Proteasom übertragen und prozessiert (Chen *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001). Das 26S-Proteasom setzt sich aus zwei Multienzymkomplexen zusammen: Dem hochkonservierten proteolytisch aktiven 20S-Kernkomplex (*catalytic core*), der ein- oder beidseitig mit 19S-Kappen assoziieren kann. Jede 19S-Untereinheit besteht aus zwei Subkomplexen, die die Substratbindung, -deubiquitinierung sowie -entfaltung bewerkstelligen und das Substrat dem *catalytic core* zuführen. Die Abspaltung der Polyubiquitinketten erfolgt entweder direkt durch die Metallopeptidaseaktivität des 19S-Komplexes oder durch assoziierte deubiquitinierende Enzyme (DUB) wie die Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L5 (UCH-L5) (Verma *et al.*, 2002; Funakoshi *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2006). DUB prozessieren Polyubiquitinketten sowohl vom proximalen als auch distalen Ende und regulieren so den Monoubiquitinpool (Shabek und Ciechanover, 2010). Zudem verhindern sie eine kompetitive Hemmung der Ubiquitinbindungsstellen am Proteasom durch Polyubiquitinketten (Lim *et al.*, 2013). Da die Ubiquitinierung ein reversibler Prozess ist, können Proteine oder Propeptide durch sukzessive Deubiquitinierung z.B. durch die Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1) vor dem Abbau gerettet werden.

Durch die Bindung von Aktivatoren wie PA28 (11S) oder PA200 kann die proteolytische Aktivität des 20S-Proteasoms auch ATP- und Ubiquitin-unabhängig erfolgen (Stadtmueller und Hill, 2011). Die drei katalytischen Untereinheiten des Standard-20S-Proteasoms unterscheiden sich in ihrer Spezifität und wurden auf Grund

ähnlicher Spaltpräferenzen nach anderen Proteasen benannt. Die β 1-Untereinheit spaltet Peptide bevorzugt nach sauren Aminosäuren (Caspase-ähnliche Aktivität), die mit der β 2-Untereinheit assoziierte Trypsin-ähnliche Aktivität nach basischen Aminosäuren und die auf der β 5-Untereinheit lokalisierte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität spaltet nach hydrophoben Aminosäuren (Heinemeyer *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 1997). Proinflammatorische Interferone können die *de novo*-Synthese von drei alternativen katalytisch wirksamen Untereinheiten induzieren: LMP2 (β 1i), MECL1 (β 2i) und LMP7 (β 5i) (Aki *et al.*, 1994). Diese werden anstatt der Standard- β -Untereinheiten in das naszierende Proteasom inkorporiert und besitzen veränderte Spaltpräferenzen weshalb andere Peptide mit einer höheren Effizienz generiert werden (Cerundolo *et al.*, 1995; Krüger und Kloetzel, 2012).

Das Endosomal-lysosomale Abbausystem stellt eine weitere Möglichkeit des Proteinrecyclings dar. Zielsubstrate sind vor allem Transmembranproteine, Makromoleküle oder Organellen, die über Endozytose, Autophagie oder Phagozytose in das System eintreten können (Lamb *et al.*, 2013; Tooze *et al.*, 2014). Der intrazelluläre Abbau erfolgt durch Makro- und Mikroautophagie, sowie über die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA). Im Fall der Makroautophagie werden K63-polyubiquitinierte Proteine, die für den autophagosomalen Abbau markiert sind, von einer doppelten Membran umschlossen. Das gebildete Autophagosom verschmilzt mit einem Lysosom zu einem Autophagolysosom, in dem die Proteine anschließend degradiert werden. Bei der Mikroautophagie hingegen erfolgt die Aufnahme kleinster Proteine direkt über die lysosomale Membran in das Zytoplasma (Xie und Klionsky, 2007). Die Aktivierung der CMA erfolgt vor allem unter physiologischem Stress wie Nährstoffmangel oder oxidativem Stress. Besonders fehlgefaltete oder beschädigte Proteine werden über einen Chaperon-Komplex erkannt und den Lysosomen zugeführt (Majeski und Dice, 2004).

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

Wie viele posttranslationale Modifikationen ist auch die Ubiquitinierung ein reversibler Prozess, der von deubiquitinierenden Enzymen (DUB) katalysiert wird. DUB umfassen Cystein- und Metalloproteasen und werden in fünf Unterfamilien unterteilt (Nijman *et al.*, 2005). Eine Untergruppe repräsentieren die Ubiquitin C-terminalen Hydrolasen

(UCH), die auf Grund ihrer Thiolgruppe im aktiven Zentrum den Cysteinproteasen zugeordnet werden. Neben der Ubiquitin C-terminalen Hydrolase-L3 und -L5 (UCH-L3/UCH-L5) gehören auch das BRCA1-assoziierte Protein 1 (BAP1) sowie Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1) dieser Untergruppe an. Eine weitere gängige Bezeichnung für UCH-L1 sind PGP9.5 (*protein gene product 9.5*) oder PARK5. UCH-L1 zeigt eine spezifische Gewebsverteilung und wird vor allem in neuronalem Gewebe während aller Stadien der neuronalen Differenzierung exprimiert. In Neuronen ist UCH-L1 mit einem Anteil von bis zu 5 % am Gesamtprotein eines der am stärksten exprimierten Proteine (Wilkinson *et al.*, 1989; Day und Thompson, 2010). Eine geringere UCH-L1-Expression wurde in Zellen des neuroendokrinen Systems, der Testis, Ovarien, Tubulus- und Sammelrohrepithel sowie Parietalzellen der Bowmanschen Kapsel in der Niere nachgewiesen (Shirato *et al.*, 2000; Diomedici-Camassei *et al.*, 2005; Sekiguchi *et al.*, 2006; von Kopylow *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnte eine UCH-L1-Expression in bösartigen Geweben wie Pankreas-, Dickdarm- oder Brustkrebs gezeigt werden, die unter gesunden, physiologischen Bedingungen negativ für UCH-L1 sind (Tezel *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2002; Miyoshi *et al.*, 2006). Auf Grund der spezifischen Expression, die sich vorwiegend auf Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems beschränkt, wird UCH-L1 als Biomarker bei Hirnschäden eingesetzt (Liu *et al.*, 2002). UCH-L1 ist hauptsächlich zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert, in kultivierten Rattenneuronen sowie im humanen Gehirn konnte auch eine Membran-assoziierte Form detektiert werden (Luo *et al.*, 2009; Bishop *et al.*, 2014). Da UCH-L1 aber kaum über Lipid-Bindedomänen verfügt, wird vermutet, dass dieses Enzym mit einem membrangebundenen Proteinkomplex interagiert (Sowa *et al.*, 2009).

Das Grundgerüst des UCH-L1-Proteins wird als Gordischer Knoten mit kurzen C- und N-terminalen Ausläufern beschrieben und stellt damit eine der kompliziertesten Proteinstrukturen dar. Es wird vermutet, dass diese Struktur das Protein vor ungewollter Entfaltung und anschließendem proteasomalen Abbau schützt (Virnau *et al.*, 2006). Dadurch ist die Proteinstruktur sehr anfällig für Störungen, die mit Umverteilung von α -Helices und β -Faltblattstrukturen einhergeht und durch Offenbarung des hydrophoben Kerns die Löslichkeit des Proteins herabsetzt. Dadurch verliert UCH-L1 die Fähigkeit, Ubiquitin zu binden, geht aberrante Interaktionen ein und aggregiert (Kim *et al.*, 2014; Koharudin *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2011). Wie

die meisten DUB wird auch UCH-L1 erst durch Bindung des Substrates aktiviert. Bindet Ubiquitin im aktiven Zentrum am Cystein⁹⁰-Rest, bewirkt dies eine Konformationsänderung, sodass die katalytische Triade, bestehend aus Aspartat¹⁷⁷, Histidin¹⁶¹ und Cystein⁹⁰, in räumliche Nähe zueinander gelangt (Boudreaux *et al.*, 2010).

UCH-L1 besitzt eine hohe Bindungsaffinität für Ubiquitin und ist in der Lage einzelne Ubiquitine vom C-terminalen Ende her abzuspalten. Auf Grund dieser Hydrolase-Aktivität wird vermutet, dass UCH-L1 an der Prozessierung von freien Polyubiquitinketten beteiligt ist, die aus der proteasomalen Degradation stammen, und dadurch den Monoubiquitinpool reguliert (Larsen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002). UCH-L1 ist zusätzlich in der Lage das Ubiquitin-ähnliche Molekül NEDD8 zu binden, dass vor allem in neuronalem Gewebe weit verbreitet ist, kann dieses aber nicht hydrolysieren (Wada *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde UCH-L1 *in vitro* eine Ligase-Aktivität durch Dimerisierung von Ubiquitinmonomeren am Lysin 63-Rest zugesprochen, die jedoch sehr umstritten ist. Durch diesen Protein-stabilisierenden Effekt sollen Proteine vor der proteasomalen Degradation bewahrt werden können (Liu *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2006).

Fehlfunktionen von UCH-L1 sind mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson (*Parkinson's disease*, PD) und Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD) assoziiert. Die Punktmutation im UCH-L1-Gen an Position 93, die einen Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Methionin nach sich zieht, führt zu einem Struktur- und Funktionsverlust sowie zu aberranten Interaktionen von UCH-L1 mit anderen Proteinen (Nishikawa *et al.*, 2003; Kabuta *et al.*, 2008a; Andersson *et al.*, 2011). Auf Grund des Nachweises von UCH-L1 in Lewy-Körperchen wird diese Mutation im Kontext der PD besonders untersucht (Yasuda *et al.*, 2009). Weitere UCH-L1 Punktmutationen, die vor allem für mechanistische Studien verwendet werden, sind C90S (Cystein → Serin), die durch eine verminderte Hydrolase-Aktivität gekennzeichnet ist und die D30A-Variante (Asparaginsäure → Alanin), die in einer verminderten Hydrolase-Aktivität und Ubiquitin-Bindefähigkeit resultiert (Osaka *et al.*, 2003). Des Weiteren geht die E7A-Mutation (Glutamin → Alanin) mit einem Verlust der Hydrolaseaktivität und der Fähigkeit Ubiquitin zu binden einher (Bilguvar *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde dem S18Y-Polymorphismus (Serin → Tyrosin) ein neuroprotektiver Effekt

zugesprochen, da dieser eine verminderte Ligase- aber stabile Hydrolase-Aktivität nach sich zieht und *in vitro* antioxidativ wirkt (Liu *et al.*, 2002; Kyratzi *et al.*, 2008).

1.7 Rolle von UCH-L1 im Podozyten

Mittels Immunhistochemie konnte in der Niere gezeigt werden, dass UCH-L1 in tubulären Epithelzellen, in Sammelrohrzellen sowie in Parietalzellen der Bowmanschen Kapsel exprimiert wird und für letztere sogar als spezifischer Marker in Rattennieren gilt (Shirato *et al.*, 2000; Diomedi-Camassei *et al.*, 2005). *In vivo*- und *in vitro*-Studien demonstrieren, dass UCH-Enzyme eine Rolle bei der Nierenentwicklung, Zelldifferenzierung von wachsenden Nierentubuli und in der Zellzyklus-Regulation spielen (Franch, 2002; Debigare und Price, 2003). Tatsächlich wurde gezeigt, dass UCH-L1 während der Nephrogenese in allen Zellen des „Comma-shaped body“ exprimiert wird, während das Protein zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt im „S-shaped body“ vorrangig in künftigen Parietalzellen und kaum in späteren Podozyten nachgewiesen werden konnte (Shirato *et al.*, 2000). Daher könnte insbesondere UCH-L1, ähnlich wie in Neuronen, eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Reifung des Glomerulus, speziell der Podozyten, spielen.

Während UCH-L1 in ausdifferenzierten, gesunden Podozyten kaum exprimiert wird, konnte in Patienten mit Membranöser Nephropathie eine starke *de novo*-Expression beschrieben werden (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008). Diese korrelierte nicht nur mit der Akkumulation polyubiquitinerter Proteine, sondern auch mit einer gestörten Proteostase podozytenspezifischer Proteine wie Nephrin und α -Aktinin-4. Versuche mit kultivierten Podozyten demonstrieren, dass die Aufrechterhaltung des Differenzierungsgrades und verzweigten Phänotyps nur gegeben ist, wenn UCH-L1 fehlt oder in ihrer Aktivität beeinträchtigt ist (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2009). Eine Hemmung der UCH-L1-Aktivität wirkt sich sowohl positiv auf den Proteinabbau als auch auf den Krankheitsverlauf in der MN aus (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011). Mit Hilfe eines podozytenspezifischen UCH-L1-*Knock-outs* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Mäuse in der APN durch eine Hochregulation des UPS sowie einen intakten Proteinabbau geschützt sind, was in einer verminderten Proteinurie resultiert (unveröffentlicht). Weitere zytotoxische Effekte von UCH-L1 konnten bei der Entwicklung einer podozytären Hypertrophie durch einen gestörten Abbau des Zell-Zyklus-Inhibitors p27^{Kip1} in der MN sowie bei der

TNF- α -induzierten Nekroptose in Podozyten beobachtet werden (Sosna *et al.*, 2013; Lohmann *et al.*, 2014).

1.8 Zielsetzung

Die bisherigen Erkenntnisse zu UCH-L1 in der Niere untermauern, dass eine erhöhte UCH-L1-Expression in geschädigten Podozyten repräsentativ für eine gestörte Proteostase ist und den Podozytenschaden durch Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität begünstigt. Die Mechanismen, die diesem UCH-L1-abhängigen Effekt zu Grunde liegen, sind weitestgehend ungeklärt. Dies ist vor allem auf die komplexe biochemische Funktion (Ligase- und Hydrolase-Aktivität), unbekannte UCH-L1-Interaktionspartner sowie Proteinmodifikationen, die den Aktivitätszustand von UCH-L1 beeinflussen, zurückzuführen. In dieser Arbeit soll eine mögliche posttranslationale Modifikation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Ursache des zytotoxischen Potentials von UCH-L1 untersucht werden. Es ist gezeigt, dass die Membranöse Nephropathie mit der Freisetzung großer Mengen ROS assoziiert ist. Es wird hypothetisiert, dass *de novo* exprimierte UCH-L1 durch oxidative Modifikation in ihrer Struktur und Funktion so weit geschädigt wird, dass ein dysfunktionales Enzym entsteht, das aberrante Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht und so die podozytäre Proteostase negativ moduliert. Um einen möglichen Funktions-*shift* zu untersuchen, wurden Mäuse generiert, die podozytenspezifisch aktive UCH-L1 sowie dysfunktionale UCH-L1 (repräsentiert durch eine I93M-Punktmutation im aktiven Zentrum) überexprimieren. Die verwendete I93M-Mutation ist im Gehirn im Kontext von degenerativen Erkrankungen bereits gut untersucht und besitzt sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten mit oxidativ-modifizierter UCH-L1 (Kabuta *et al.*, 2008a).

Ziele dieser Arbeit sind:

- 1) Durchführung von Untersuchungen, ob die transgene Überexpression des UCH-L1-Wildtypproteins und des UCH-L1-I93M mutierten Proteins in Podozyten geeignete Modelle für mechanistische Studien zur *toxic gain of function* oxidativ-modifizierter UCH-L1 in der MN darstellen.

- 2) Identifikation podozytärer Interaktionspartner von UCH-L1, die eine *toxic gain of function* in der MN hervorrufen.
- 3) Identifikation und Analysen zur Bindungsaffinität von UCH-L1-Autoantikörpern gegen das dysfunktionale Protein in Patienten mit MN.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Längenstandards und Kits

In den nachfolgenden Tabellen (Tab. 2-1 bis 2-4) sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, die zur Herstellung von Puffer und Lösungen verwendet wurden, Enzyme, Kits, Längenstandards sowie Primär- und Sekundärantikörper zusammengefasst. Die Kultivierungsmedien und Lösungen wurden, wenn nicht anders genannt, mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Tabelle 2-1: Chemikalien und Enzyme

Chemikalie/Enzym	Hersteller
Abberior Mount Solid Antifade	Abberior (DE)
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Agar	Thermo Fisher Scientific (US)
Agarose, UltraPure™	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (US)
Albumin (Maus)	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Aluminiumkaliumsulfat	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Aqua	B. Braun (DE)
Bromphenolblau	Th. Geyer (DE)
BSA	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Coomassie® Blau R 250	Carl Roth (DE)
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth (DE)
DirectPCR Lysis Reagent (Mouse Tail)	Viagen Biotech (US)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Thermo Fisher Scientific (US)
Dimethylformamid	Carl Roth (DE)
DNase I	Roche (CH)

dNTP Set (100 mM)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (US)
10 x DreamTaq Green Buffer	Thermo Fisher Scientific (US)
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific (US)
1,4- Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Epoxomicin	Biozol (DE)
Essigsäure 99-100 %	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Ethanol absolut	Th. Geyer (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Ethidiumbromid-Lösung, 1 %ig (10 mg/ml)	Carl Roth (DE)
Eukitt	Orsatec (DE)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific (US)
Fluoromount-G	Southern Biotech (US)
Forene® 100 % (v/v) (Isofluran)	Abbvie (US)
Formaldehydlösung, etwa 37 %	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Glycerol	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Glucose	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Glycin	Carl Roth (DE)
Hämatoxylin	SERVA Electrophoresis (DE)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific (US)
Hepes	Thermo Fisher Scientific (US)
HEPES Buffer Solution (1 M)	Gibco/Thermo Fisher Scientific (US)
Hoechst 33342	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (US)
Isopropanol	Th. Geyer (DE)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun (DE)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Kollagenase IA (<i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Kreatinin	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
LB Broth Base	Thermo Fisher Scientific (US)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Methanol	J.T. Baker (US)
Milchpulver	Carl Roth (DE)

Naphtol-AS-Bisphosphat	Sigma-Aldrich (DE)
Natriumchlorid	Carl Roth (DE)
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Natriumiodat	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth (DE)
Natriumnitrit	Merck (DE)
Neufuchsin	SERVA Electrophoresis (DE)
Ovalbumin	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco/Thermo Fisher Scientific (US)
Perjodsäure	Carl Roth (DE)
Ponceau S-Lösung (0,2 %)	SERVA Electrophoresis (DE)
PowerUp SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific (US)
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Proteinase K	Th. Geyer (DE)
Random Primers	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (US)
rDNase Buffer Set	Macherey-Nagel (DE)
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/μL)	Thermo Fisher Scientific (US)
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (US)
Schiffs Reagenz	Merck (DE)
Salzsäure	Thermo Fisher Scientific (US)
Suc-LLVY-AMC	Calbiochem/Merck (DE)
SuperBlock™ (TBS) Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific (US)
Sucrose	SERVA Electrophoresis (DE)
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific (US)
SuperSignal™ West Pico PLUS Luminol/Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific (US)
SuperSignal™ West Pico PLUS Stable Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific (US)

Target Retrieval Solution (10x), Citrate pH 6	Agilent Technologies (US)
Target Retrieval Solution (10x), pH 9	Agilent Technologies (US)
T-PER™	Thermo Fisher Scientific (US)
Tris (Trizma® base)	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck (DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Merck) (DE)
Trizol	Ambion/Thermo Fisher Scientific (US)
Tween® 20	Merck (DE)
Tungsten Carbide Beads 3mm	Quiagen (US)
Xylencyanol	Carl Roth (DE)
Xylol	Th. Geyer (DE)
ZytoChem Plus (AP) Polymer Kit mouse/rabbit	Zytomed Systems (DE)

Tabelle 2-2: Isolierungssysteme und Reaktionskits

Kit	Hersteller
PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific (US)
ELISA Starter Accessory Kit	Bethyl Laboratories (US)
Creatinin Jaffe (Fluid 5+1)	Hengler Analytik (DE)

Tabelle 2-3: DNA- und Protein-Längenstandards

Marker	Hersteller
100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (US)
CozyHi™ Prestained Protein Ladder	highQu (DE)
CozyXL™ Prestained Protein Ladder	highQu (DE)

Tabelle 2-4: verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Western Blot: Primärantikörper			
Anti-UCH-L1	Ratte	1:200	laborintern
Anti-ATPB	Maus	1:1000	Abcam
Anti-SOD1/2	Kaninchen	1:1000	Origene
Anti-Nephrin	Meerschwein	1:2000	Progen
Anti- α -Aktinin-4	Kaninchen	1:1000	Immunoglobe
Anti-pUb	Maus	1:250	Millipore
Anti-K48	Kaninchen	1:1000	Millipore
Anti- β 5	Kaninchen	1:5000	Saskia Schlossarek
Anti-LMP7	Kaninchen	1:5000	Elke Krüger
Anti-Flag	Maus	1:1000	Sigma
Anti-Lamp2	Kaninchen	1:1000	Sigma
Anti-Limp2	Kaninchen	1:2000	Paul Saftig
Anti-Beclin-1	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
Anti-LC3	Kaninchen	1:5000	Sigma
Anti- β -Aktin	Maus	1:10000	Sigma
Western Blot: Sekundärantikörper HRP			
Anti-Kaninchen	Esel	1:10000	Jackson
Anti-Ratte	Ziege	1:15000	Jackson
Anti-Maus	Esel	1:20000	Jackson
Anti-Meerschwein	Esel	1:20000	Jackson
Immunfluoreszenz: Primärantikörper			
Anti-UCH-L1	Ratte	1:50	laborintern
Anti-UCH-L1	Kaninchen	1:100	laborintern
Anti-SOD1/2	Kaninchen	1:300	Origene
Anti-Nephrin	Meerschwein	1:200	Progen
Anti- α -Aktinin-4	Kaninchen	1:300	Immunoglobe
Anti-pUb	Maus	1:300	Millipore
Anti- β 5	Kaninchen	1:300	Saskia Schlossarek
Anti-Limp2	Kaninchen	1:300	Paul Saftig
Anti-LMP7	Kaninchen	1:300	Abcam

Immunfluoreszenz: Sekundärantikörper			
Cy3rat	Esel	1:100	Jackson
Cy2rb	Ziege	1:100	Jackson
Cy5gp	Esel	1:100	Jackson
StarRed-gp (STED)	Esel	1:100	Jackson

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Laborgeräte und Software

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte sowie Software sind in Tabelle 2-5 bis Tabelle 2-7 aufgelistet.

Tabelle 2-5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cell Strainer, 100µm	Sarstedt (DE)
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (DE)
Deckgläser 24x50 cm	Paul Marienfeld (DE)
Deckgläser High Precision	Paul Marienfeld (DE)
Dynabeads™ M-450 Tosylactivated	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (US)
Extra Thick Blot Filter Paper, Precut, 8.6 x 13.5 cm	Bio-Rad Laboratories (DE)
Gelloader Pipettenspitze 1-200 µl	Sarstedt (DE)
Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45 µm, 26,5 cm x 3,75 m	Merck (DE)
Mikrotestplatte 96 Well ELISA, High Bind, F	Sarstedt (DE)
Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt (DE)
Microplate PS, 96 Well F-Bottom Black Fluotrac	Greiner Bio-One (DE)
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	Bio-Rad Laboratories (DE)
Multistix	Siemens (DE)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (DE)

Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml und 2 ml)	Sarstedt (DE)
Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One (DE)
Serologische Pipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt (DE)
Spritze, Discardit II	BD (US)
Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)	VWR International (DE)
TC-Schale 100, Standard	Sarstedt (DE)
Wattetupfer	Meditrade (DE)

Tabelle 2-6: Geräte und Apparaturen

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Block-Heizgerät	Thermomixer comfort	Eppendorf (DE)
Dampfgarer		B. Braun (DE)
Elektroblotter	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories (DE)
Elektrophorese-system DNA	PerfectBlue™ Horizontal Wide-Format Minigel-systems Mini ExW	Peqlab Biotechnologie (DE)
	Gelträger mit Gummidichtung	Peqlab Biotechnologie (DE)
	Kamm 50-well	Peqlab Biotechnologie (DE)
Elektrophorese-system Protein	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories (DE)
Fluoreszenz-mikroskop	LSM510	Zeiss (DE)
	LSM800	Zeiss (DE)
Geldokumentations-system	Cell Biosciences Alphamanager MINI	Biozym Scientific (DE)
Imaging System	Amersham Imager 600	GE Healthcare Life Sciences (US)
Kühlschränke und Gefriergeräte	4 °C	Bauknecht (DE)
	-20 °C	Liebherr (DE)

	-80 °C	Thermo Fisher Scientific (US)
Lichtanlage OP	KL 1500 LCD	Zeiss (DE)
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss (DE)
Magnetic Particle Concentrator	DynaMag2™	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (US)
Mikroplattenleser	Mithras LB 940	Berthold Technologies (DE)
Mikrowelle		Clatronic (DE)
Multikanalpipette	Transferpette® S-8, 20-200 µl	Brand (DE)
Narkoseanlage		Völker (DE)
Netzgeräte	Electrophoresis Power Supply EPS 200 (DNA)	Pharmacia Biotech (Pfizer) (US)
	PowerPac Universal Power Supply (Protein)	Bio-Rad Laboratories (DE)
Pipetten	100 – 1000 µl	Eppendorf (DE)
	20 – 200 µl	Eppendorf (DE)
	2 – 20 µl	Eppendorf (DE)
	0,5 – 10 µl	Eppendorf (DE)
pH-Meter	InoLab pH Level 1	WTW (DE)
Pinzette		Merck (DE)
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand (DE)
Präzisionswaagen	L 610-D	Sartorius Lab Instruments (DE)
Real-Time PCR	QuantStudio® 3	Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific (US)
Schüttelinkubator	3032	GFL (DE)
Spektrophotometer	DeNovix DS-11	Biozym Scientific (DE)
	EL808 Ultra Microplate Reader	BioTek Instruments (US)
Stereomikroskop	Stemi DV4	Zeiss (DE)
Stoffwechselkäfige		Eigenkonstruktion
Stoppuhr		Carl Roth (DE)
Thermocycler	UNO-Thermoblock	Biometra (DE)

	T1 Thermocycler 48	Biometra (DE)
Tissue-Homogenizer	Tissue-Lyser II	Qiagen (US)
Wärmematte		Sanitas (LTU)
Wippschüttler	Rocky GRS	Labortechnik Froebel (DE)
Zentrifuge	5415 R	Eppendorf (DE)

Tabelle 2-7: Software

Software	Hersteller
KC Junior	BioTek Instruments (US)
GraphPad PRISM	GraphPad Software (US)
ImageJ	Wayne Rasband (US)
Microsoft Office	Microsoft (US)
QuantStudio Design&Analysis Software	Applied Biosystems (US)
Zen Blue Imaging Software	Zeiss (DE)

2.1.3 Bakterienstämme

Für die Transformation und Vervielfältigung von Plasmiden wurden die in Tabelle 2-8 aufgeführten Stämme verwendet.

Tabelle 2-8: Bakterienstämme

Organismus	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue GigaSingles™	<i>endA1 hsdR17</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> F [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q ZΔM15: Tn10 (Tc ^R)]	Novagen/EMD Biosciences (US)
NEB® 10-beta Competent <i>Escherichia coli</i>	Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	New England Biolabs (DE)

2.1.4 Vektoren und rekombinante Plasmide

Die für die Konstruktion rekombinanter Plasmide verwendeten Ursprungsvektoren sind in der Tabelle 2-9 aufgelistet.

Tabelle 2-9: Ursprungsvektoren

Vektor	Größe (Bp)	Resistenz	Referenz
pCMV6-Entry	4919	Kanamycin/Neomycin	AMS Biotechnology Europe (UK)
pLPCX	6264	Puromycin, Ampicillin	Clontech (DE)
CTV	2900	Kanamycin/Neomycin, Ampicillin	Thai <i>et al.</i> , 2007; Addgene #15912

Die in dieser Arbeit untersuchten huUCH-L1^{WT}- und huUCH-L1^{I93M}-Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Sandra Pohl (Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Osteologie und Biomechanik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Die Kontroll-Konstrukte huTHSD7A und huPLA2R1 wurden freundlicherweise von PD Dr. Gunther Zahner zur Verfügung gestellt (Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik und Poliklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Tabelle 2-10: generierte rekombinante Plasmide

Vektor	Insert (Größe)	Schnittstellen	Bemerkung	Referenz
pCMV6-Entry	huUCH-L1 ^{WT} (672 Bp)	<i>Sgfl/MluI</i>	C-term. Myc-DDK-Tag	Sandra Pohl
pCMV6-Entry	huUCH-L1 ^{I93M} (672 Bp)	<i>Sgfl/MluI</i>	C-term. Myc-DDK-Tag	Sandra Pohl
pCMV6-Entry	huTHSD7A full-length (4971 Bp)	<i>Sgfl/RsrII</i>	C-term. Myc-DDK-Tag	Tomas <i>et al.</i> , 2016 (Origene-Ref. RC213616)
pLPCX	huPLA2R1 full-length (4400 Bp)	<i>XhoI/NotI</i>	C-term. HA-Tag	Augert <i>et al.</i> , 2013

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der eindimensionalen SDS-PAGE können Proteine in einer Matrix bestehend aus stark vernetztem Polyacrylamid hinsichtlich ihrer Expression und Reinheit charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde das SDS-haltige, diskontinuierliche Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli (1970) eingesetzt. Das verwendete anionische Detergens SDS im Lauf- und Ladepuffer bindet an hydrophobe Bereiche im Protein und führt zur Aufspaltung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen, sodass Tertiär- und Sekundärstrukturen durch die Streckung des Moleküls aufgelöst werden. Zudem wird die Eigenladung der Proteine maskiert und es entstehen negativ geladene Protein-SDS-Komplexe (ca. 1,4 g SDS pro g Protein), die bei Anlegen einer Spannung durch die poröse Trägermatrix zur positiv geladenen Elektrode wandern und proportional zum Logarithmus ihrer molaren Massen aufgetrennt werden (Michov, 1995).

Für die gleichzeitige Charakterisierung von Proteinen unterschiedlichster Molekulargewichte wurden vorgefertigte 4-15 % Mini-PROTEAN® TGX™-Gradientengele sowie das Gelelektrophorese-System Tetra Cell von Bio-Rad genutzt. Dazu wurden je 12 µl Glomeruli-Lysat bzw. 10 µg HEK293-T-Zelllysate mit reduzierendem 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Währenddessen wurden die Fertiggele in die Gelträger eingespannt, in die Laufkammer überführt und mit 1 x SDS-Ladepuffer überschichtet. Nach dem Auftragen der Proben und 5 µl eines entsprechenden Proteingrößenstandards erfolgte die SDS-PAGE bei einer Spannung von 100-120 V für 80-100 min. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte entweder durch eine Coomassie-Färbung des Gels oder eines sich anschließenden Western Blots mit nachfolgender Immundetektion.

5 x SDS-Ladepuffer (reduzierend)

1,5 M	Tris-HCl pH 6,8
50 % (v/v)	Glycerol
25 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
10 % (w/v)	SDS
1 % (w/v)	Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS
pH 8,3	

2.2.1.2 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung können Proteine direkt im Gel fixiert und visualisiert werden. Der organische Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R 250 lagert sich sequenzunspezifisch an basische und aromatische Aminosäurereste, sodass alle aufgetrennten Proteine angefärbt werden. Hierzu wurden die SDS-Gele für 1 h in Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert und anschließend über Nacht in ddH₂O entfärbt bis sich ein distinktes Bandenmuster abzeichnete.

Coomassie-Färbelösung

0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R 250
10 % (v/v)	Essigsäure (100 %)
40 % (v/v)	Methanol

2.2.1.3 Proteintransfer

Bei der Western Blot-Methode werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine unter Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran transferiert, immobilisiert und mit Hilfe immunologischer Methoden detektiert (Towbin *et al.*, 1979). Auf diese Weise können unmarkierte Antigene in heterogenen Proteingemischen mit spezifischen Antikörpern, die mit einem Farbstoff, Enzym oder Isotop konjugiert sind, identifiziert und hinsichtlich ihrer Expression charakterisiert werden.

Für den elektrophoretischen Transfer wurde das *Semidry*-Blot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) unter Verwendung des Trans-Blot Turbo Systems von Bio-Rad angewandt. Infolge der Fließrichtung des elektrischen Stroms wandern die negativ geladenen Proteine aus dem SDS-Gel von der Kathode zur Anode und bleiben auf Grund hydrophober Wechselwirkungen unter Beibehaltung des gelelektrophoretischen Auftrennungsmusters an der Membranoberfläche haften. Um die Hydrophobie des Trägermaterials herabzusetzen, wurde die Polyvinylidendifluorid

(PVDF)-Membran vor dem Blotten 5 min mit 100 %igem Methanol aktiviert und danach in 1 x Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde das SDS-Gel luftblasenfrei kathodenseitig auf die äquilibrierte Membran gelegt und beidseitig mit in 1 x Transfer-Puffer getränkten Filterpapieren bedeckt, sodass die Voraussetzung für den Stromfluss gegeben ist. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten elektrischen Stromstärke von 1.3 A (ein Gel) bzw. 2.5 A (zwei Gele) und 25 V für 30 min. Um den Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Membran 5 min mit Ponceau S-Lösung auf dem Schüttler inkubiert und schrittweise mit ddH₂O entfärbt bis sich ein distinktes Bandenmuster zeigte. Dabei handelt es sich um einen Azofarbstoff, der reversibel positiv geladene Aminogruppen bindet und die nachfolgende Immundetektion nicht beeinträchtigt. Die Inkubation mit TBS-T 0,05 % bewirkte schließlich eine vollständige Entfärbung der Membran.

1 x Transfer-Puffer

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin
20 % (v/v)	Methanol
pH 8,5	

2.2.1.4 Immundetektion

Dem Transfer schließt sich die Visualisierung der auf der Membran gebundenen Zielproteine unter Verwendung spezifischer Antikörper an. Um unbesetzte Proteinbindungsstellen auf der Trägeroberfläche zu blockieren und somit eine unspezifische Antikörperbindung und starke Hintergrundsignale zu verhindern, wurde die Membran für 1 h mit 3 %iger Magermilch in TBS-T 0,05 % auf dem Schüttler inkubiert. Bei der Wahl der Blocklösung ist zu beachten, dass eine inerte Substanz verwendet wird, die mit dem nachfolgenden Antigennachweis nicht kreuzreagiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T 0,05 % für je 5 min wurde diese bei Bedarf geschnitten und mit den gewünschten Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurde der Primärantikörper recycelt und der Blot drei Mal mit TBS-T 0,05 % für je 5 min gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern, gefolgt von

drei Waschschritten mit TBS-T 0,05 %. Dabei binden die gewählten Sekundärantikörper wirtsspezifisch den konstanten Teil der schweren Ketten der jeweiligen Primärantikörper und verfügen über ein konjugiertes Reporterenzym. In diesem Fall katalysiert die verwendete Meerrettichperoxidase (HRP) die Oxidation von Luminol unter Freisetzung von Licht. Je nach erwarteter Signalstärke wurde die Membran 5 min mit den ECL Western Blot SuperSignal™-Reagenzien oder dem sensitiveren SuperSignal™ femto nach Angaben des Herstellers entwickelt, die Chemilumineszenz anschließend mit Hilfe des Amersham Imager 600 gemessen und die Signale mit ImageJ quantifiziert.

Auf Grund einer Limitation des Probenmaterials ist es häufig nötig, mehrere Proteine auf einer Membran zu analysieren. Da viele Zielproteine aber ähnliche molare Massen besitzen oder mit den gleichen Sekundärantikörpern detektiert werden, müssen vorherige Antigen-Antikörper-Bindungen gelöst und ausgewaschen werden, um unspezifische Hintergrundsignale zu unterbinden. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 15 min in Stripping-Puffer geschüttelt und anschließend zwei Mal 10 min mit 1 x PBS und zwei Mal 5 min mit TBS-T 0,05 % gewaschen. Nach der erneuten Maskierung der unbesetzten Bindungsstellen, konnte die Membran mit einem weiteren Primärantikörper über Nacht inkubiert werden.

Stripping-Puffer

0,2 M	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS
1 % (v/v)	Tween 20
pH 2,2	

2.2.1.5 Glomeruli-Isolation

Nach Entkapseln der perfundierten Niere wurde ein kleines Polstück für spätere histologische Untersuchungen abgenommen, sofort in 4 % Formalin fixiert und bei 4 °C gelagert. Die restliche Niere wurde mit einem Skalpell zerkleinert und pro Tier auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zum Aufschließen des Gewebes folgte ein Kollagenase-Verdau (1,5 ml pro Reaktionsgefäß) für 15 min bei 37 °C und 1300 rpm. Nach Abstoppen der Reaktion auf Eis wurde die Nierensuspension beider Reaktionsgefäße nacheinander mit Hilfe eines Spritzenstößels durch je einen 100 µm

Filter in ein gemeinsames 50 ml Falcon gedrückt und mit jeweils 10 ml HBSS gespült. Das Filtrat wurde erneut gefiltert, gespült und in einem neuen 50 ml Falcon aufgefangen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 1700 rpm konnte das Pellet in 6 ml HBSS suspendiert und auf vier 2 ml Reaktionsgefäße pro Tier gleichmäßig verteilt werden. Die Reaktionsgefäße wurden insgesamt drei Mal für je 5 min am DynaMag2™ *Magnetic Particle Concentrator* (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) auf Eis inkubiert und das Pellet jeweils mit 1,5 ml HBSS + 0,05 % BSA (*bovine serum albumin*) gewaschen. Die Glomeruli aus vier Reaktionsgefäßen pro Tier wurden in 1 ml HBSS gesammelt und ihre Reinheit unter dem Mikroskop überprüft. Dies erfolgte durch das Auszählen von Glomeruli und Tubuli in 10 µl Glomeruli-Lösung. Die Glomeruli wurden anschließend für 5 min bei 4 °C und 4000 rpm geerntet, der Überstand verworfen und entweder direkt lysiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4 % Formalin-Lösung

320 ml	Sörensen-Puffer
40 ml	Formalin (37 %)

Sörensen-Puffer

22 mM	Natriumdihydrogenphosphat
80 mM	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
pH 7,2 – 7,4	

Kollagenasemischung

1,2 mg/ml	Kollagenase IA
50 U/µL	DNase I
ad	HBSS

2.2.1.6 Herstellung von Glomeruli-Lysaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Lysepuffer verwendet. Das eingesetzte Volumen an Lysepuffer richtete sich nach der Anzahl der ausgezählten Glomeruli und wurde entsprechend der Formel 150 µl Lysepuffer/5000 Glomeruli berechnet. Anschließend wurde die entsprechende Menge Lysepuffer zu den

Glomeruli gegeben und diese mit Hilfe eines Stößels mechanisch aufgeschlossen. Die Inkubation der Proben erfolgte für 30 min auf Eis. Nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand abgenommen und in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Lysepuffer I (Chymotrypsin-Aktivitätsassay):

T-Per

1 x Complete ohne EDTA

Lysepuffer II (Western Blot-Analysen):

T-Per

1 mM Natriumvanadat

1 mM Natriumfluorid

1 x Calyculin A

1 x Complete ohne EDTA

5 mM NEM

10 µM MG-132

2.2.1.7 Herstellung von HEK-Zelllysaten

Die Zellpellets wurden je nach Größe mit 150-300 µl Lysepuffer II versetzt und durch auf- und abpipettieren gelöst. Die Inkubation der Proben erfolgte für 30 min auf Eis. Nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand abgenommen und in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.8 Maus-Albumin-ELISA

Die Bestimmung des Albumingehalts im Mausurin erfolgte mittels Sandwich-ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Für die Durchführung wurde das Starter Accessory Kit von Bethyl Laboratories verwendet und die benötigten Lösungen (*Coating Buffer*, *Waschpuffer*, *Blocking Buffer*, *Conjugate Diluent*, TMB-Substrat) nach Herstellerangaben angesetzt. Zunächst wurde eine 96-well Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität mit Anti-Mausalbumin-Primärantikörper (1:100 in *Coating Buffer*) beschichtet und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Vorbereitung der

Proben erfolgte am kommenden Tag. Mit Hilfe von Urineststreifen wurden die Urine zunächst semiquantitativ charakterisiert und anschließend in *Conjugate Diluent* verdünnt. Je stärker die Albumin-Positivität des Teststreifens ausfiel, umso höher war der Verdünnungsfaktor (1:500 bis 1:500000). Um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Mikrotiterplatte drei Mal mit Waschpuffer gewaschen, gründlich ausgeklopft und anschließend für 30 min mit 200 $\mu\text{l/well}$ *Blocking Buffer* auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) äquilibriert. Die Herstellung eines Standards erfolgte in Form einer seriellen Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 15,625-1000 ng/ml Albumin. Nach dreimaligem Waschen der Platte wurden je 100 μl Probe bzw. Standard pro *well* pipettiert und für 1 h bei RT geschüttelt. Es schlossen sich fünf weitere Waschschritte gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit je 100 $\mu\text{l/well}$ HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:40000 in *Conjugate Diluent*) bei RT auf dem Schüttler an. In den folgenden fünf Waschschritten wurden ungebundene Antikörper entfernt und je 100 $\mu\text{l/well}$ chromogenes Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat dazugegeben, um die Antikörper-Antigen-Bindung nachzuweisen. Nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit 5,7 %iger H_3PO_4 -Lösung abgestoppt und die Extinktionen am Absorptions-Reader EL808 bei 450 nm gemessen.

2.2.1.9 Kreatinin-Bestimmung

Zur Beurteilung der Proteinurie ist es von Bedeutung neben dem Albumingehalt auch den Konzentrierungsgrad des Harns zu berücksichtigen. Die Quantifizierung von Kreatinin erfolgte mittels der von Max Jaffé 1886 beschriebenen Reaktion unter Verwendung des Creatinin Jaffe Kits von Hengler Analytik. Dabei bildet Kreatinin in stark alkalischem Milieu mit zugegebener Pikrinsäure einen gelb-orangen Farbkomplex. Als Referenz wurde eine parallele Kreatinin-Standardverdünnungsreihe (0,02-0,5 g/L in NaCl 0,9 %) mitgeführt. In 96-*well* Mikrotiterplatten wurde 10 μl unverdünnter Urin bzw. Standard vorgelegt und 50 μl des nach Herstellerangaben angesetzten Reagenzgemischs R1+R2 dazugegeben. Die Quantifizierung des Farbumschlages erfolgte anschließend nach einer und fünf Minuten am Absorptions-Reader EL808 bei 492 nm.

2.2.1.10 Bestimmung der proteasomalen Aktivität

Die Bestimmung der proteasomalen Effizienz erfolgte durch Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des 20S-Proteasoms durch Umsatz des fluorogenen Substrates N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin (Suc-LLVY-AMC). Dazu wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen 10 µg Glomeruli-Lysat mit Aktivitätspuffer auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und für zwei Stunden bei 4 °C vorinkubiert. Ein weiterer Probenansatz diente als Assaykontrolle, dem nach 1,5 h Inkubation im Aktivitätspuffer 10 µM des irreversiblen Proteasomhemmers Epoxomicin zugesetzt wurde. Parallel erfolgte die Vorbereitung des Substratpuffers, der sich aus 60 µM Suc-LLVY-AMC in Aktivitätspuffer zusammensetzte. In einer auf Eis gehaltenen schwarzen 96-well Mikrotiterplatte wurden 50 µl Substratpuffer vorgelegt, mit je 50 µl vorinkubierter Probe gemischt und anschließend bei 37 °C inkubiert. Die Messungen erfolgten nach 30, 60, 90, 120 und 180 min am Mithras bei 485 und 355 nm (Filter A). Für die statistische Auswertung wurden nur die Messwerte nach 120 min Inkubation berücksichtigt.

Aktivitätspuffer

20 mM	HEPES
0,5 mM	EDTA
5 mM	DTT
1 mg	Ovalbumin
60 mM	ATP
pH 7,8	

2.2.1.11 Interaktionsstudien und NATIVE-Gel

Die *in vitro*-Interaktionsstudien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Elke Krüger in Berlin/Greifswald durchgeführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Glomeruli

Die Arbeiten erfolgten unter dem Abzug. Für die Gewinnung von RNA (Ribonukleinsäure) wurde das Pellet im Reaktionsgefäß mit einer Wolfram-Carbid-Kugel versehen und mit 250 µl Trizol (Raumtemperatur) versetzt. Um einen besseren Aufschluss der Glomeruli zu gewährleisten, erfolgte eine Homogenisierung der Probe für 1 min bei 30 Hz im Tissue Homogenizer. Nach fünf-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 1/6 Volumen Chloroform versetzt, eine Minute intensiv geschüttelt und anschließend erneut drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Zelltrümmer zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12000 rpm. Die obere, RNA-reiche Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Reinigung und Aufkonzentrierung der RNA erfolgte eine Fällung mit 100 µl kaltem Isopropanol für 30 min auf Eis. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10000 rpm wurde das Pellet insgesamt zwei Mal mit 250 µl 80 %igen Ethanol gewaschen und jeweils für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet unter dem Abzug getrocknet um Ethanolreste zu entfernen. Im Anschluss konnte das Pellet in 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration bestimmt werden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurden 200 ng RNA mit 1 µl DNase-Lösung (1:10 in Reaktionspuffer verdünnt) für 10 min bei 37 °C verdaut. Für die reverse Transkription erfolgte die Vorbereitung von zwei Mastermixen. Zunächst wurden 4 µl verdaute RNA mit Mastermix I (21 µl ddH₂O, 2 µl 100 ng/µl Random Hexamer Primer, 2 µl 10 mM dNTPs) für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. In der Zwischenzeit konnte Mastermix II vorbereitet werden (8 µl Reverse Transkriptase-Puffer, 1 µl RNase Out, 2 µl Reverse Transkriptase). Nach Zugabe von 11 µl Mastermix II erfolgte die Reverse Transkription der RNA für 10 min bei 25 °C, 1 h bei 42 °C, 10 min bei 70 °C, 4 °C Pause. Für die nachfolgende Real-Time-PCR wurde 1 µl cDNA mit 9 µl Mastermix (5 µl SYBR Green Master Mix, 2 µl 5 µM Primer *sense*, 2 µl 5 µM Primer *antisense*) versetzt und mit QuantStudio 3 von Applied Biosystems ausgewertet. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.3 Isolation genomischer DNA aus transgenen Mäusen

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus Schwanzbiopsien, die ca. zwei Tage nach Geburt der Versuchstiere durch das Kürzen der Schwanzspitze um maximal 5 mm gewonnen wurden. Pro Biopsie wurden 150 µl DirectPCR Lysis Reagent mit Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) versetzt und zusammen mit den Schwanzstücken in 1,5 ml Reaktionsgefäßen rotierend bei 55 °C über Nacht inkubiert. Um die Proteinase K zu inaktivieren, erfolgte am kommenden Tag eine Inkubation der Proben für 45 min im Wasserbad bei 85 °C. Nach anschließender Zentrifugation für 10 s bei 13000 rpm wurde die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert oder direkt für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

2.2.2.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen

Die Ermittlung des Gehalts an DNA und RNA erfolgte mit Hilfe des DeNovix DS-11 Spektrophotometers (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf), welches die Lichtabsorption bei 260 nm gegen einen Blindwert (Lysepuffer bzw. RNase-freies H₂O) misst. Um eine Verunreinigung der Proben auszuschließen, wurde der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt und sollte bei DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2 bzw. bei RNA-Eluaten zwischen 2,1 und 2,2 liegen.

2.2.2.5 Photometrische Quantifizierung von Proteinlösungen

Die Bestimmung des Proteingehalts angefertigter HEK293-T-Zelllysate erfolgte auf der Grundlage der Methode nach Lowry (1951) unter Verwendung des DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Diese Reaktion stellt eine Kombination von Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz dar und ist spezifisch für Substanzen mit mindestens zwei Peptidbindungen, weshalb dieser Assay als kolorimetrischer Nachweis von Proteinen geeignet ist. Dabei bildet sich in alkalischem, wässrigen Milieu (aktiviertes Reagenz A+S) ein Kupfer(II)-Protein-Komplex, in welchem das Kupfer-Ion darauffolgend durch Oxidation aromatischer Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan zu Kupfer(I) reduziert wird. Diese Reaktion unterstützt die Reduktion des gelben Folin-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren, Reagenz B) zu Molybdänblau. Die tiefblaue Farbreaktion wurde anschließend nach 15 min Inkubation bei RT am Absorptions-Reader EL808 bei

562 nm gemessen. Der Assay erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten nach Herstellerangaben von Bio-Rad.

2.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein nach Kary B. Mullis entwickeltes Verfahren (1986), welches durch Bindung eines gegenläufigen Primerpaares an komplementäre Bereiche der einzelsträngigen *sense*- bzw. *antisense*-Template-DNA die Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte ermöglicht. Das Prinzip der PCR beruht auf einer zyklischen Wiederholung (25-40 Zyklen) von drei Teilschritten (Denaturierung, Annealing, Elongation), sodass die Ziel-Sequenz exponentiell amplifiziert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode zur Bestimmung des Genotyps der transgenen Versuchstiere angewandt. Die Primer wurden freundlicherweise von PD Dr. Gunther Zahner konstruiert und über Invitrogen/Thermo Fisher Scientific bezogen. Eine Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte nicht, sodass immer 1 µl DNA-Lösung eingesetzt wurde.

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

genomische Template-DNA	1 µl
Primer <i>sense</i> (10 µM)	1 µl
Primer <i>antisense</i> (10 µM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl
10 x DreamTaq Green Buffer	2 µl
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 2-11: verwendete Primer zur Genotypisierung der UCH-L1-Überexpressions-Mauslinien

Primer		Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]	Fragmentgröße [Bp]
KI-PCR	CAG-enhancer Fw2	GTT ACT ATG GGA ACA TAC GTC ATT	64	433
	R26 Rev common	GTT GCA ATA CCT TTC TGG GAG TT		
WT-PCR	R26-Wt Fw	CGA AAA TCT GTG GGA AGT CTT GT	64	233
	R26 Rev common	GTT GCA ATA CCT TTC TGG GAG TT		
Cre-PCR	cre_fw.	GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT TGC TG	51	300
	cre_rev.	GGA CAT GTT CAG GGA TCG CCA GGC G		

Bei der Wahl des PCR-Programms ist zu berücksichtigen, dass die Annealing-Temperatur an die verwendeten Primer und die Elongationszeit an die Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes angepasst wird.

Tabelle 2-12: PCR-Programme (WT und KI / Cre)

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95 °C / 94 °C	3 min / 3 min	1 / 1
Denaturierung von dsDNA	95 °C / 94 °C	30 s / 45 s	40 / 30
Annealing der Primer an ssDNA	T _m - 3 °C	1 min / 1 min	
Elongation	72 °C / 72 °C	1 min / 1 min	1 / 1
Endelongation	72 °C / 72 °C	3 min / 8 min	
Pause	4 °C / 4 °C	∞	

2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Bei der Agarose-Gelelektrophorese dient das inerte Galactosepolymer Agarose als Trägermaterial für die Auftrennung von Nukleinsäuren. Je nach Konzentration der Agarose vernetzen sich die Polysaccharide zu einem Gel mit unterschiedlicher Porengröße in dem die negativ geladene DNA nach Anlegen eines elektrischen Feldes zum positiv geladenen Pol (Anode) wandert. Die Laufstrecke der Proben verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Fragmentlänge und die Wandergeschwindigkeit ist abhängig von der Agarose-Konzentration, Stromstärke und Konformation der Moleküle.

Zur Herstellung von 1,5 %igen (w/v) Agarosegelen wurde die Agarose in 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen mit 0,002 % Ethidiumbromid-Fluoreszenzfarbstoff (10 mg/ml-Stocklösung) versetzt und anschließend zum Aushärten in einen horizontalen, abgedichteten Gelträger mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Danach wurde das auspolymerisierte Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Um die Dichte der DNA-Lösungen gegenüber der des Puffers zu erhöhen und die Lauffront zu markieren, erfolgte die Zugabe von 10 x Ladepuffer. Die Proben wurden mit einem DNA-Längenstandard auf das Agarose-Gel aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt. Die Gelelektrophorese erfolgte in Abhängigkeit von der Größe der Gele bei 120 V und 400 mA für 30 min. Im Anschluss daran konnten die aufgetrennten DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexe mit Hilfe des Geldokumentationsgerätes mit Licht der Wellenlänge 254 nm angeregt und fotodokumentiert sowie nachfolgend durch den Vergleich mit dem Größenstandard charakterisiert werden.

50 x TAE-Puffer

2 M	Tris
50 mM	Na ₂ EDTA
5,72 % (v/v)	Essigsäure (100 %)
pH 8,0	

Die Lösung wurde anschließend bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert.

2.2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA aus den verschiedenen Bakterienstämmen für die Transfektion zur Verfügung zu stellen, wurde diese aus einer 25 ml Übernachtskultur mit Hilfe des PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Resuspension des DNA-Pellets erfolgte in 100 µl TE-Puffer. Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde mittels photometrischer Quantifizierung und Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die Proben anschließend bei -20 °C gelagert.

10 x Ladepuffer

50 % (w/v)	Sucrose
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol

2.2.3 Kultivierung von Bakterien

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Bakterienstämme wurden als Einzelklon in Glycerin-Dauerkultur (in LB-Broth-Base (LB)-Flüssigmedium, 25 % (v/v) Glycerin) weitergegeben und anschließend bei -80 °C gelagert.

LB-Flüssigmedium

LB-Broth-Base	20 g
NaCl	4,5 g

Die *E. coli*-Stämme wurden für weitere Versuche sowohl in LB-Flüssigmedium als auch auf Festmedium aerob kultiviert. Zur Herstellung von Agarplatten erfolgte die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar zum LB-Flüssigmedium. Alle Kulturmedien wurden daraufhin bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert.

Um den Selektionsdruck auf die Plasmid-tragenden Bakterienstämme aufrechtzuerhalten, wurde das handwarme (< 50 °C) Medium je nach verwendetem Vektorsystem mit sterilfiltriertem (0,45 µm Filter) Antibiotikum versetzt, gut gemischt und in sterile Kulturgefäße (Flüssigmedium) bzw. Petrischalen (Festmedium) gegossen.

Tabelle 2-13: Antibiotikazusätze für *E. coli*-Kulturmedien

Vektor	Zusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
pCMV6-Entry	Ampicillin	100 mg/ml, in ddH ₂ O	25 µg/ml
pLPCX	Kanamycin	50 mg/ml, in ddH ₂ O	100 µg/ml

2.2.3.1 Anzucht auf Festmedium

Um sicherzustellen, dass alle Zellen aus einer Einzigen hervorgegangen und somit nahezu identisch sind, wurde aus der Glycerin-Dauerkultur eine Reinkultur angelegt und die Klone unter Verwendung der Dreizehn-Strich-Methode auf LB-Agarplatten vereinzelt. Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte bei 37 °C über Nacht auf Kanamycin- und Ampicillin-haltigem Festmedium. Die Platten wurden anschließend für bis zu drei Wochen bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von Übernachtskulturen

In Form einer Batch-Kultur können *E. coli*-Zellen über Nacht angezogen und vermehrt werden, um daraus anschließend große Mengen Plasmid-DNA zu extrahieren. Zu diesem Zweck wurden abends je 100 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikazusatz in sterilen Kulturgefäßen vorgelegt und unter Verwendung eines sterilen Zahnstochers mit einer Einzelkolonie der vier generierten Bakterienstämme inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Schüttelinkubator (160 rpm) bis die stationäre Wachstumsphase erreicht wurde, sodass ein Maximum an intakten Zellen für die Präparation von Plasmid-DNA zur Verfügung stand.

2.2.4 Tierversuche

Die UCH-L1-überexprimierenden Linien wurden in der Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und gehalten. Die Tiere hatten stets freien Zugang zu Wasser und handelsüblichem Futter. Für die Durchführung der Versuche lagen alle Genehmigungen vor. Die transgenen Linien wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer generiert.

2.2.4.1 Induktion der Anti-Podozyten-Nephritis (APN) und Betreuung

Für Untersuchungen im experimentellen Tiermodell der Membranösen Nephropathie wurden 13-36 Wochen alte UCH-L1-überexprimierende C57Bl/6-Mäuse verwendet. Von den Tieren wurde vor Versuchsbeginn Urin im Stoffwechsellkäfig gesammelt (Präurin). Die Induktion der APN erfolgte mit konzentriertem Anti-Podozytenserum aus dem Schaf (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011). Dazu wurden die Versuchstiere in eine Isofluran-Kurznaarkose versetzt und pro Tier 225 µl APN-Serum retrobulbär appliziert. Kurze Zeit nach Verabreichen des Serums erfolgt meist eine starke Immunreaktion auf die gespritzten Antikörper. Da Mäuse auf Grund ihrer Körpergröße sehr schnell auskühlen, wurden die Tiere zum Aufwachen zurück in ihren Käfig gesetzt und dieser zu einem Drittel auf Wärmematten platziert. Bei Bedarf wurde Weichfutter verabreicht. Nach der Injektion erfolgte eine klinische Beurteilung durch den Wissenschaftler alle 8-12 h, bei unauffälligem Verlauf alle 24 h. Zur Überwachung des Krankheitsverlaufes wurden die Tiere an Tag 3, 6, 9 und 13 gewogen und Urin gesammelt. Die Organentnahme erfolgte an Tag 14.

2.2.4.2 Organentnahme und Nierenperfusion

In Vorbereitung wurden die Tiere mit der Bauchseite nach oben auf einer Wärmeplatte mittels hautfreundlicher Pflaster fixiert und über eine Inhalationsnarkose dauerhaft mit Isofluran betäubt. Nach Öffnen des Bauchraums mit einer Schere erfolgte die Entnahme von Blasenurin. Unter Verwendung von Wattetupfern wurde der Magen-Darm-Trakt sowie der Geschlechtsapparat vorsichtig zur Seite geschoben und arterielles Blut entnommen. Mit Hilfe einer atraumatischen Pinzette wurde die Aorta mit umliegender paravertebraler Muskulatur abwärts der Nierenabgänge gegriffen und vorsichtig unterhalb der Klemme bis zum Zwerchfell freipräpariert. Das freigelegte Nierenpaket wurde von den übrigen Organen getrennt wobei darauf zu achten war, dass ein Stück Leber zurückblieb. Dies ermöglichte beim anschließenden Perfundieren eine bessere Orientierung um die Nierenabgänge zu finden. Die Organe wurden zum Transport in vorgekühltem HBSS gelagert. Die Perfusion der Nierenarterie erfolgte *ex vivo* unter einem Stereomikroskop mit Hilfe von Dynabeads™ M-450 von Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (200 µl in 50 ml HBSS). Die magnetischen *beads* bleiben auf Grund ihrer Größe im Kapillargeflecht der Glomeruli hängen, sodass diese anschließend über einen Magneten isoliert werden können.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Transiente Transfektion von HEK293-T-Zellen

Für die Transfektion wurden immortalisierte HEK293-T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) durch transientes Einbringen von Fremd-DNA transfiziert. Dies erfolgte nach der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode, bei der das schlechter lösliche Kalziumphosphat mit der in der Lösung befindlichen DNA ausfällt.

Dazu wurden HEK293-T-Zellen in Kulturmedium (DMEM + 10 % Fetales Kälberserum (FCS) + 1 % Penicillin-Streptomycin) ausgesät und angezogen, bis eine Konfluenz von ca. 50 % erreicht war. Am Tag der Transfektion erfolgte 1 h vorher ein Mediumwechsel. Dazu wurde das Medium abgesaugt und 10 ml frisches Kulturmedium vorsichtig auf die Zellen gegeben. In der Zwischenzeit wurden pro Konstrukt 10 µg Plasmid-DNA langsam und kreisend zu 36 µl 2 M Kalziumchlorid-Lösung pipettiert und mit ddH₂O auf 300 µl aufgefüllt (Ansatz A). Nachdem 300 µl 2 x HBSS in ein zweites Reaktionsgefäß vorgelegt wurden, konnte der Inhalt aus Ansatz A vorsichtig dazugegeben werden. Die Probe darf nicht geschüttelt oder gevortext werden, damit sich die Präzipitationskristalle nicht zu schnell oder zu große Komplexe bilden. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden je 600 µl Gesamtansatz pro Konstrukt auf die HEK293-T-Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Am Folgetag wurden die Zellen in sterilem 1 x PBS gekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4 °C und 3000 rpm geerntet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2 x HBSS

280 mM	NaCl
10 mM	KCl
1,5 mM	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
12 mM	Glucose
50 mM	Hepes
pH 7,05	

2.2.6 Histologie

Die Paraffinblöcke wurden am Mikrotom Leica RM2255 zu 1-3 µm dicken Schnitten verarbeitet und anschließend über Nacht bei 40 °C gebacken.

2.2.6.1 Entparaffinieren

Um das Nierengewebe für Antikörper bzw. Farbstoffe zugänglich zu machen, wurden die Schnitte auf den Objektträgern in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Die Inkubation erfolgte für je 5 min 3 x in Xylol, 3 x in Ethanol 100 %, 2 x in Ethanol 96 %, 2 x in Ethanol 70 % und 2 x in ddH₂O.

2.2.6.2 PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)

Dem Entparaffinieren schloss sich eine 15-minütige Inkubation in 1 %iger Perjodsäure an. Nachdem die Küvette 2-3 min unter fließendem, warmen Leitungswasser stand, wurden die Schnitte kurz mit ddH₂O gespült und für 40 min mit Schiff'sche Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Inkubation unter fließendem, warmen Leitungswasser für 7 min, erfolgte die Kernfärbung. Dazu wurden die Schnitte 1-2 min in Hämatoxylin inkubiert, 3 min mit fließendem, warmen Leitungswasser gespült und in HCl-Alkohol differenziert. Es erfolgte eine Kontrolle unter dem Mikroskop. War die Kernfärbung zu schwach, wurden die Schnitte erneut mit Hämatoxylin inkubiert. Der Kernfärbung schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe (1 x in 70 % für 2 min, 3 x in 96 % für 2 min, 1 x in 100 % für 2 min, 1 x in 100 % für 5 min, 1 x in 100 % für 10 min, 3 x in Xylol für je 5 min) an. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Hämatoxylin nach Böhmer

1. Vorlösung: 200 ml ddH₂O + 10 g Aluminiumkaliumsulfat x 12 H₂O + 0,1 g Natriumiodat (über Nacht lösen)
 2. Vorlösung: 0,5 g Hämatoxylin + 10 ml Ethanol 100 % (über Nacht lösen)
- beide Vorlösungen werden am Folgetag gemischt

HCl-Alkohol

100 ml Ethanol 100 % + 1 ml HCl 25 %

2.2.6.3 Immunhistochemie (p57)

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte für 40 min bei 98 °C in 1 x Citratpuffer (Target Retrieval Solution (10x), Citrate pH 6) gekocht. Zum Abkühlen wurden die Schnitte im Citratpuffer mit offenem Deckel für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 Mal je 5 min mit Leitungswasser gewaschen. Um ein Auslaufen der Lösungen zu verhindern, erfolgte eine Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift. Im Anschluss wurden diese sofort mit 1 x PBS benetzt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, erfolgte eine Blockreaktion mit 1:20 normalen Pferdeserum in 1 x PBS zusätzlich 0,05 % Triton X-100 bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde der Block abgesaugt und pro Schnitt je 40 µl 1:400 p57-Primärantikörper (Santa Cruz, in 1:20 normalen Pferdeserum in 1 x PBS + 0,05 % Triton X-100) dazugegeben und über Nacht bei 4 °C in einer geschlossenen Box inkubiert. Am Tag darauf folgten drei Waschvorgänge mit 1 x PBS für je 5 min mit anschließender Inkubation mit dem Sekundärantikörper (ZytoChem Plus (AP) Polymer Kit mouse/rabbit) für 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte erneut drei Mal für je 5 min gewaschen und anschließend in Neufuchsin entwickelt. Dafür wurden in einem Falcon 7,5 ml ddH₂O + 300 mg Natriumnitrit + 300 µl Neufuchsin-Stammlösung angesetzt und zusammen mit 800 µl Naphthol-AS-Bisphosphat zu 150 ml TNT-Puffer gegeben. Die Entwicklung erfolgte im Dunkeln und wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Hatte die Färbung die gewünschte Intensität erreicht, wurde die Reaktion mit ddH₂O abgestoppt und die Schnitte anschließend mit Gummi arabicum eingedeckt.

TNT-Puffer

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

Neufuchsin-Stammlösung

2,5 g	Neufuchsin
50 ml	2 N HCl

Naphtol-AS-Bisphosphat-Lösung

250 mg	Naphtol-AS-Bisphosphat
9375 mg	DMF

2.2.6.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte für 40 min bei 98 °C in 1 x Citratpuffer (Target Retrieval Solution (10x), Citrate pH 6 für die Färbungen: UCH-L1, SOD1/2, Nephrin, α -Aktinin-4, Polyubiquitin und Limp2; Target Retrieval Solution (10x), pH 9 für die Färbungen: β 5 und LMP7) gekocht. Zum Abkühlen wurden die Schnitte im Citratpuffer mit offenem Deckel für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 Mal je 5 min mit Leitungswasser gewaschen. Um ein Auslaufen der Lösungen zu verhindern, erfolgte eine Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift. Im Anschluss wurden diese sofort mit 1 x PBS benetzt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, erfolgte eine Blockreaktion mit 1:20 normalen Pferdeserum in 1 x PBS zusätzlich 0,05 % Triton X-100 bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde der Block abgesaugt und pro Schnitt je 40 μ l Primärantikörper (in 1:20 normalen Pferdeserum in 1 x PBS + 0,05 % Triton X-100) dazugegeben und über Nacht bei 4 °C in einer geschlossenen Box inkubiert. Am Tag darauf folgten drei Waschvorgänge mit 1 x PBS für je 5 min mit anschließender Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur (Höchst-Mastermix (1:1000 in Blockpuffer) + 1:100 Sekundärantikörper). Danach wurden die Schnitte erneut drei Mal für je 5 min gewaschen, anschließend mit Fluoromount eingedeckt und dunkel gelagert.

Für die STED-Färbungen wurde das Protokoll bis auf folgende Abweichungen befolgt: Die Schnitte wurden in Target Retrieval Solution (10x), pH 9 gekocht. Bei der Vorbereitung des Sekundärantikörpers wurde auf Höchst verzichtet. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit SOLID Mounting Medium und High Precision-Deckgläsern.

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche dienen der Analyse der Rolle eines dysfunktionalen UCH-L1-Proteins in der Niere, speziell im Podozyten. Um den Einfluss des defekten Proteins auf die podozytäre Zellhomöostase und insbesondere auf den Proteinabbau zu untersuchen, wurde eine umfangreiche Grundcharakterisierung von Glomeruli-Lysaten in naiven transgenen Mäusen sowie im experimentellen Krankheitsmodell unternommen. Ergänzend erfolgten zur Aufklärung eines möglichen UCH-L1-assoziierten Pathomechanismus *in vitro* Immunopräzipitations- und Interaktionsstudien. Abschließend wurde in einem translationalen Ansatz geprüft, ob Patienten mit Membranöser Nephropathie Autoantikörper gegen UCH-L1 bilden und wenn ja, ob diese zur Beurteilung der Krankheitsprognose als Marker herangezogen werden können.

3.1 Charakterisierung naiver UCH-L1-überexprimierender Mäuse

3.1.1 Generierung und Verifizierung transgener Mäuse

Um die Beeinflussung der Zellhomöostase in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität in Podozyten zu untersuchen, wurden unter Verwendung des *Cre/loxP*-Systems transgene Mäuse generiert. Da UCH-L1 in gesunden Podozyten nur schwach exprimiert wird, war es nötig eine *Knock-in*-Strategie zu verwenden, die eine podozytenspezifische Überexpression von aktivem UCH-L1-Wildtypprotein (UCH-L1^{WT}) sowie von dysfunktionalem UCH-L1-Protein (UCH-L1^{I93M}) erlaubt. Der Aminosäureaustausch an Position 93 führt zu einer Konformations- und Aktivitätsänderung des Proteins, das strukturell und funktionell oxidativ-geschädigter UCH-L1 ähnelt (Kabuta *et al.*, 2008a). Die Expression von UCH-L1 mit dieser gezielt eingesetzten Punktmutation repräsentiert demnach oxidativ-modifizierte UCH-L1 im Podozyten.

Die Insertion der auf den Target-Vektoren enthaltenen genetischen Informationen für die murinen UCH-L1-Konstrukte erfolgte durch homologe Rekombination in den ROSA26-Lokus von Founder-C57Bl/6-Mäusen, da dieser eine stabile Expression von Genen in allen Entwicklungsstadien ermöglicht (Zambrowicz *et al.*, 1997). Dadurch kommt es ebenfalls zum Einbau einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES, *internal ribosomal entry site*) gefolgt von einem eGFP-Gen (*enhanced green*

fluorescent protein), das als konstitutiver Reporter mit dem Zielgen ko-exprimiert wird. Von besonderer Bedeutung ist die Insertion einer von zwei *loxP*-Sequenzen (*locus of X-over of P1*)-flankierten Stop-Kassette, die die Transkription des nachgeschalteten UCH-L1-Gens verhindert. Erst durch Verpaarung mit einer *Cre* (*cyclization recombination*)-transgenen Maus wird die Stop-Kassette in Form eines zirkulären Produktes aus dem ROSA26-Lokus entfernt und das Zielgen unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CAG-Promotors abgelesen.

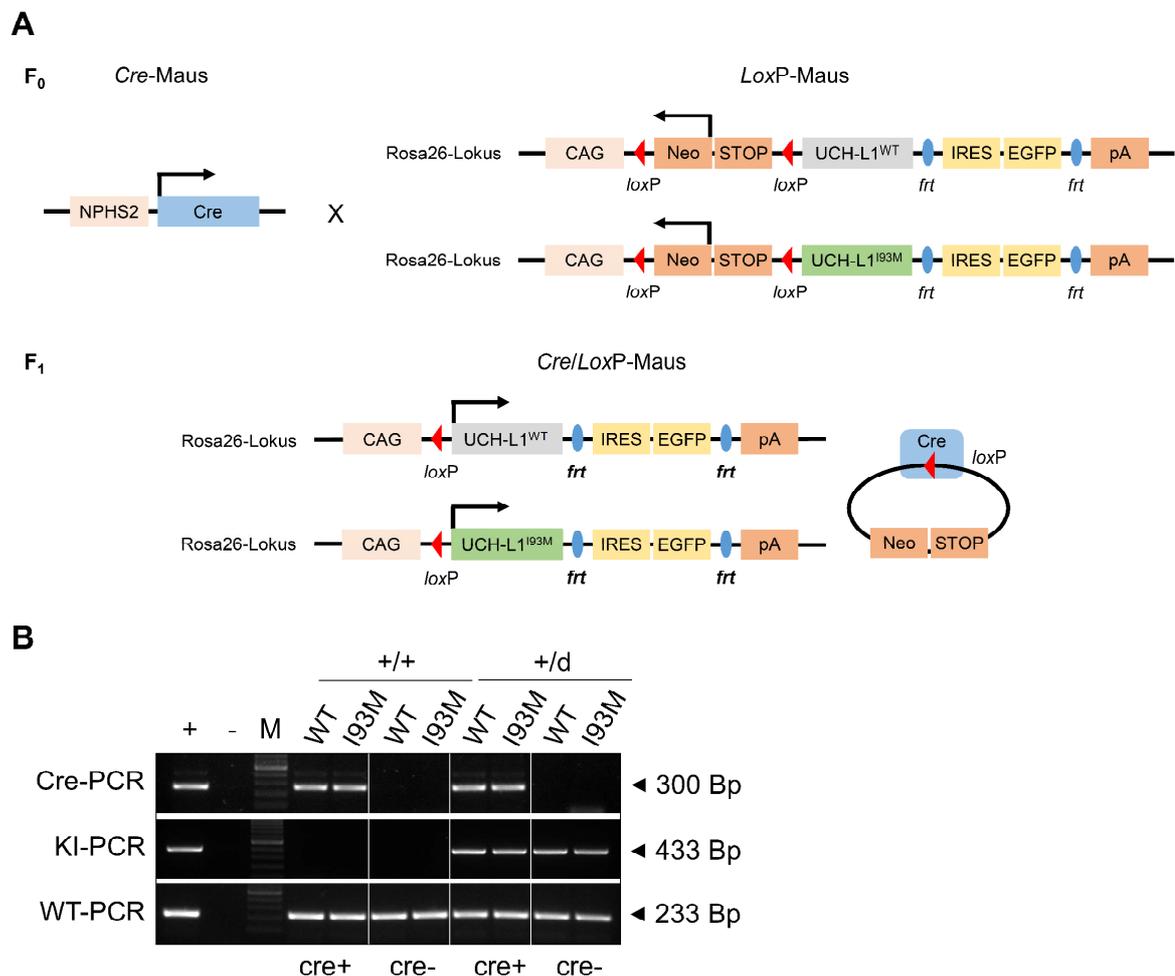


Abb. 3-1: Generierung von transgenen Mäusen mit podozytenspezifischer Überexpression von UCH-L1^{WT} und UCH-L1^{193M}. (A): Schematische Darstellung der Züchtung von *Cre/loxP*-Mäusen durch Kreuzung *Cre*-transgener Tiere mit *loxP*-Mäusen. Die murine UCH-L1^{WT}- sowie UCH-L1^{193M}-cDNA wurde über homologe Rekombination des Target-Vektors mit dem ROSA26-Lokus in das Genom von C57Bl/6-Founder-Tieren integriert. Durch Verpaarung mit *Cre*-Mäusen, die eine Podocin (*NPHS2*)-abhängige *Cre*-Rekombinase-Expression zeigen, wird in der Folgegeneration F_1 die gefloxtete Stop-Kassette entfernt und UCH-L1^{WT} bzw. UCH-L1^{193M} im Podozyten überexprimiert. (CAG: Promotor; *loxP*: Signalsequenz für *Cre*-Rekombinase; Neo: Neomycin-Resistenz; *frt*: *FLP recombinase target*, Signalsequenz für Flippase (FLP)-Rekombinase; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle; EGFP: grün fluoreszierendes Protein; pA: Polyadenylierungssignal) (B): Repräsentatives Agarosegelbild zeigt die erfolgreiche Integration des *Cre*-Gens bei 300 Bp (cre+). Wird neben dem Wildtypallel (233 Bp) noch ein Amplifikat mit 433 Bp erzielt, konnte das eGFP-Gen erfolgreich integriert werden und das entsprechende Tier ist heterozygot für das Zielgen.

Das Rekombinase-Enzym aus dem Bakteriophagen P1 erkennt mit hoher Affinität *loxP*-Signalsequenzen, wovon eine *loxP*-Stelle nach der Exzision auf dem Chromosom verbleibt (Sauer und Henderson, 1988). Da in diesem Modell die Expression der *Cre*-Rekombinase unter Kontrolle des gewebsspezifischen Podocin (*NPHS2*)-Promotors erfolgt, wird das UCH-L1^{WT}- bzw. UCH-L1^{I93M}-Gen in der F1 (Filial)-Generation auch nur in Podozyten transkribiert (Abb. 3-1 A). Die Genotypen wurden unter Verwendung spezifischer Primer mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Abbildung 3-1 B zeigt ein repräsentatives Agarosegel mit *Cre*-positiven und *Cre*-negativen Wildtyp- bzw. heterozygoten Tieren. Ergibt die PCR ein Amplifikat mit einer Größe von 300 Bp, so konnte das *Cre*-Rekombinase-Gen erfolgreich in die Founder-Maus eingebracht werden. Demgegenüber sind nur jene Tiere heterozygot, die zusätzlich zum Wildtyp-Gen bei 233 Bp, ein positives Signal bei 433 Bp zeigen, da der verwendete Primer im eGFP-Gen bindet. Ist dies nicht der Fall, entsteht ein kleineres Fragment (233 Bp) und das entsprechende Tier trägt die genetische Information für das Zielgen nicht und wird als Wildtyp geführt.

Alle nachfolgenden Western Blot-Analysen erfolgten mit isolierten Glomeruli aus fünf bis sieben Wochen alten heterozygoten Mäusen (+/d *cre*⁺). Als Kontrollen (Ktrl) wurden in allen Experimenten Wildtyp-*littermates* (+/+ *cre*^{+/-} bzw. +/d *cre*⁻) der jeweiligen Linie mitgeführt.

Die Verifizierung der podozytenspezifischen Überexpression von UCH-L1^{WT} und UCH-L1^{I93M} erfolgte mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 3-2). Die Analyse geblotteter Glomeruli-Lysate gegen UCH-L1 zeigt eine signifikante Überexpression beider Proteine im Vergleich zu den Kontrollen, die nur schwach positiv sind (Abb. 3-2 A). Insbesondere die Immunfluoreszenzfärbungen spiegeln eine starke und effiziente *Cre*-vermittelte UCH-L1-Überexpression (grün) in ca. 60-80 % der Podozyten eines Glomerulums wider (Abb. 3-2 B). Auf Grund der stabilen UCH-L1-Expression sind die generierten Mauslinien für die nachfolgenden Untersuchungen geeignet.

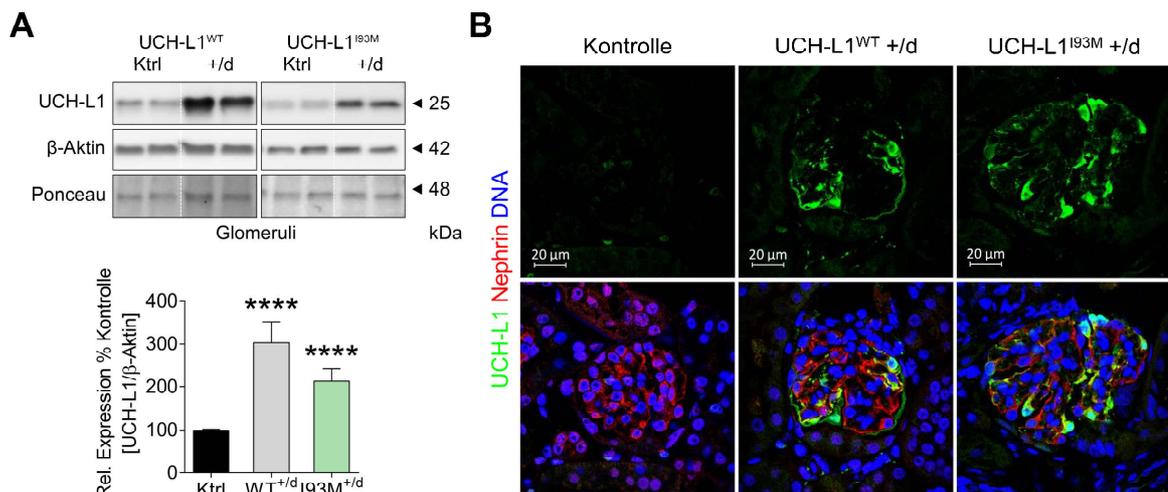


Abb. 3-2: Verifizierung der Überexpression von UCH-L1^{WT} und UCH-L1^{I93M} in Podozyten. (A): Repräsentative Western Blot-Analysen aus isolierten Glomeruli mit dazugehöriger Densitometrie demonstrieren einen signifikant erhöhten UCH-L1-Gehalt in beiden Mauslinien. β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle (n=8-19 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test ****p <0,0001; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). (B): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephrin (rot) als Marker der Schlitzmembran, Zellkerne (blau) und UCH-L1 (grün) zeigen eine starke podozytenspezifische Überexpression (LSM510).

3.1.2 Anzeichen von leichtem podozytären Stress in UCH-L1^{I93M}- aber nicht in UCH-L1^{WT}-Mäusen

Es wurde zunächst geprüft, ob eine Überexpression des dysfunktionalen UCH-L1-Proteins (UCH-L1^{I93M}) bereits im naiven Tier Auswirkungen auf die Zellhomöostase hat. Zu diesem Zweck wurde die Expression von beschriebenen mitochondrialen Stressmarkern wie der Komplex V-assoziierten ATPase (ATPB) und Mangan-abhängigen Superoxid Dismutase (MnSOD/SOD2) auf Proteinebene sowie histologisch untersucht (Abb. 3-3). Abbildung 3-3 C zeigt in UCH-L1-positiven Podozyten (rot) beider überexprimierenden Linien eine erhöhte Expression von SOD2, wobei dieser Effekt in den UCH-L1^{I93M}-Tieren deutlich stärker ausgeprägt ist. Das in der Histologie gewonnene Ergebnis spiegelt sich nur tendenziell im Western Blot wider und wies in den Experimenten eine höhere Streuung auf (Abb. 3-3 B). Ursächlich für diese Unterschiede sind die im Western Blot analysierten Glomeruli-Lysate, die neben Podozyten auch noch Mesangial-, Endothel- und Parietalzellen enthalten und somit eine mögliche Signifikanz der Ergebnisse im Podozyten beeinflussen. Ähnliche Tendenzen und hohe Schwankungen wurden im Western Blot gegen ATPB beobachtet zu dem aber keine verifizierende konfokale Analyse vorliegt (Abb. 3-3 A). Unter Berücksichtigung der Limitation der verwendeten Systeme implizieren die

Ergebnisse, dass die Überexpression von UCH-L1^{I93M} aber nicht von UCH-L1^{WT} mit leicht erhöhtem zellulären Stress in den Podozyten einhergeht.

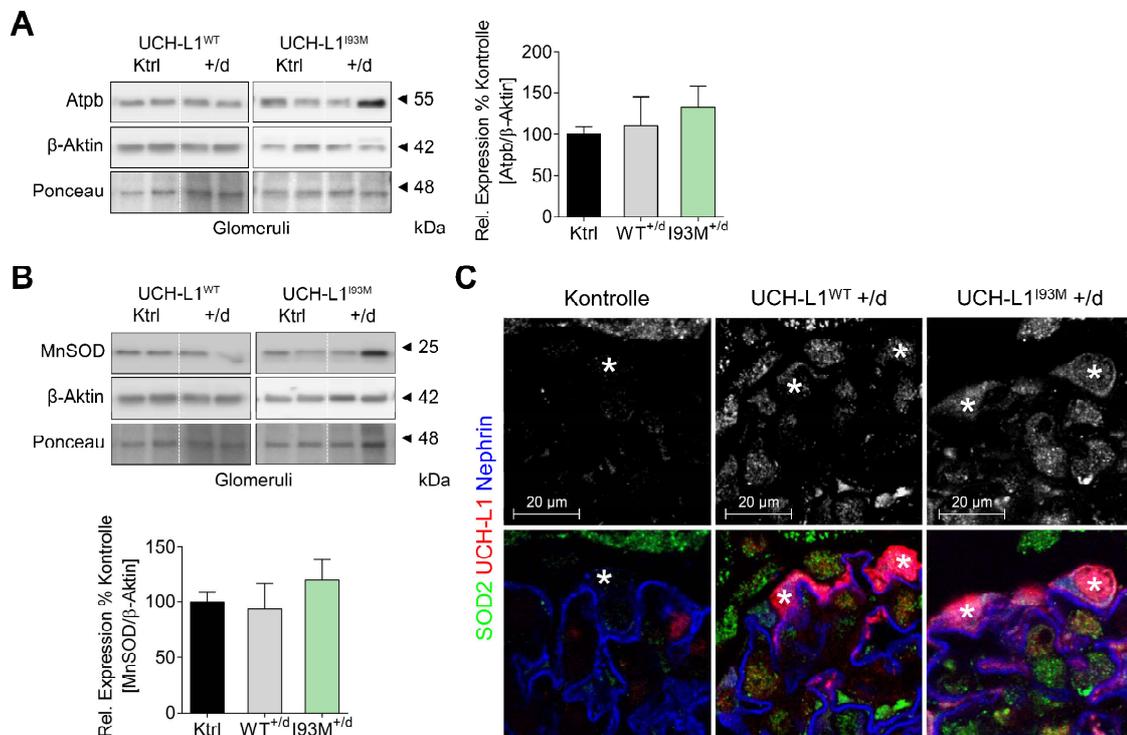


Abb. 3-3: Podozytärer Stress ist leicht erhöht in UCH-L1^{I93M}-überexprimierenden Podozyten. Repräsentative Western Blot-Analysen aus isolierten Glomeruli mit dazugehörigen Densitometrien demonstrieren eine tendenzielle Hochregulation relevanter mitochondrialer Stressmarker wie ATPB (**A**) und MnSOD (**B**) als Folge der Überexpression von UCH-L1^{I93M}. β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle (n=4-17 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). (**C**): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephhrin (blau) als Marker der Schlitzmembran, UCH-L1 (rot) zur Kennzeichnung überexprimierender Podozyten und SOD2 (weiß/grün) als Stressmarker. UCH-L1^{I93M}-Tiere zeigen in den Podozyten (weiße Sternchen) eine stärkere Hochregulation des antioxidativen Systems als UCH-L1^{WT}-überexprimierende Mäuse (LSM510).

3.1.3 Die Überexpression von UCH-L1^{WT} resultiert in einer milden Proteinurie, führt aber nicht zum Podozytenverlust

Da eine verstärkte Expression antioxidativer Marker besonders in UCH-L1^{I93M}-Tieren gezeigt werden konnte, sollte analysiert werden, ob dieses Stresslevel Auswirkungen auf die Struktur und Funktion der Podozyten hat. Zur Beurteilung der Podozytenintegrität wurde der Albumin-Gehalt Kreatinin-korreliert im Maus-Sammelurin mittels Maus-Albumin-ELISA sowie via SDS-PAGE aus dem Blasenurin untersucht. Interessanterweise zeigen UCH-L1^{WT}-Tiere eine milde Proteinurie, die mit 0,46 mg/mg doppelt so hoch ist wie die der Kontrollen (0,24 mg/mg) bzw. der

UCH-L1^{I93M}-Mäuse (0,26 mg/mg) (Abb. 3-4 A). Der Verlust von Albumin über den Urin ist aber nicht repräsentativ für einen massiven Podozytenschaden, da die Filtrationsbarriere in beiden transgenen Linien im Vergleich zu den Kontrollen nur für niedermolekulare Proteine mit einem Gewicht unter 70 kDa durchlässig ist (Abb. 3-4 B). Lichtmikroskopisch zeigen beide UCH-L1-überexprimierende Linien einen intakten Gewebeverbund und normale Glomeruli wobei vereinzelt geschwollene Podozyten beobachtet wurden (Abb. 3-4 C).

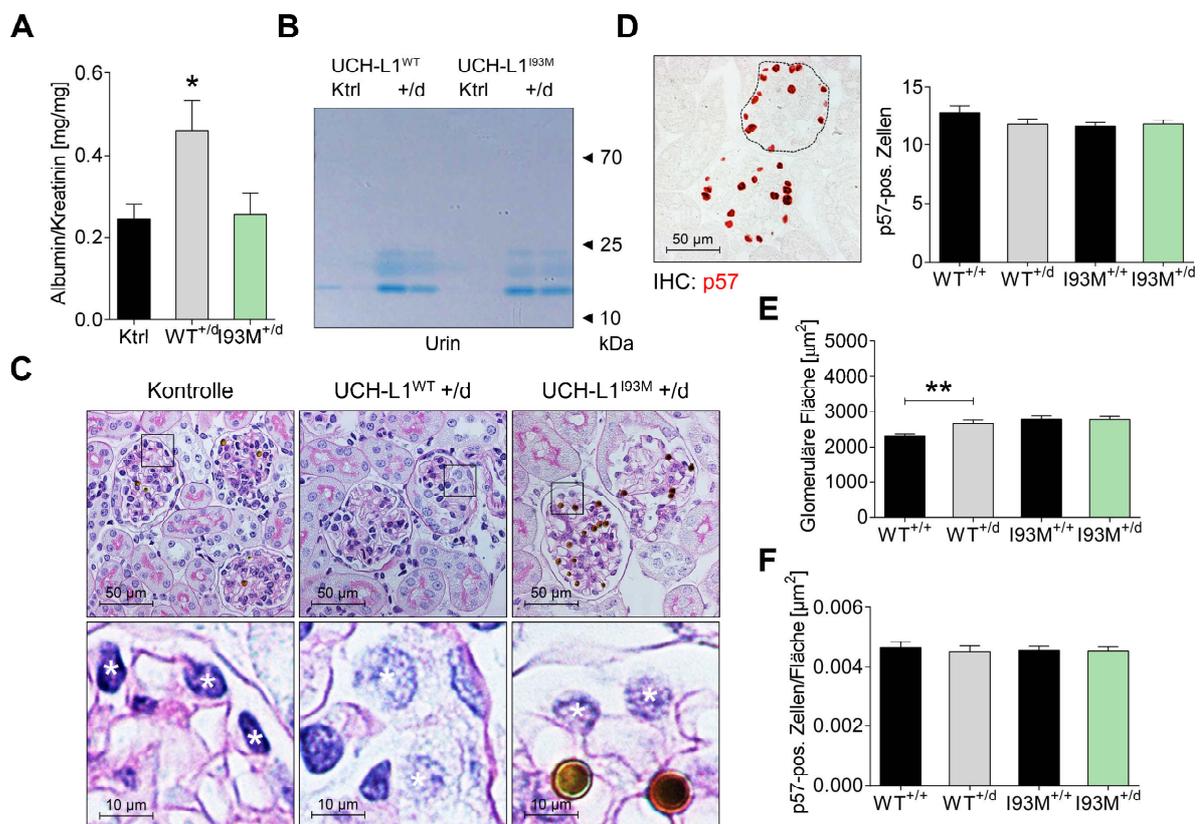


Abb. 3-4: Charakterisierung der Podozytenintegrität von UCH-L1^{WT}- und UCH-L1^{I93M}-Mäusen. (A): UCH-L1^{WT}- aber nicht UCH-L1^{I93M}-Tiere zeigen eine milde Proteinurie, dargestellt durch eine signifikant erhöhte Albumin/Kreatinin-Ratio (n=14-21 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05). (B): Coomassie-Färbung von aufgetrennten Kreatinin-adaptierten Urinen demonstrieren in beiden transgenen Linien einen Verlust von niedermolekularen Proteinen (< 70 kDa) im Vergleich zur jeweiligen *littermate*-Kontrolle und das Fehlen eines Verlustes hochmolekularer Proteine (> 70 kDa). (C): Repräsentative Aufnahmen von PAS-Färbungen zeigen intaktes Gewebe und vereinzelt geschwollene Podozyten in UCH-L1^{WT}- und UCH-L1^{I93M}-Mäusen. Die braunen Kugeln stellen die für die Nierenperfusion verwendeten Dynabeads dar (40x-Vergrößerung, weiße Sternchen markieren Podozyten). (D-F): Statistiken der Immunhistochemie (IHC) gegen den Podozytenmarker p57 verdeutlichen, dass UCH-L1^{WT}-Tiere eine größere glomeruläre Fläche aufweisen aber in keinen der beiden Linien eine Abnahme ansässiger Podozyten zu verzeichnen ist (n=2-4 á 30 Glomeruli pro Gruppe; SEM, ungepaarter t-Test **p < 0,01).

Um zu prüfen, ob die Proteinurie Folge eines Podozytenverlustes ist, erfolgte eine immunhistochemische Färbung gegen den konstitutiv exprimierten Zellzyklusinhibitor p57. Daraufhin wurden ca. 30 Glomeruli pro Tier hinsichtlich ihrer Fläche vermessen und p57-positive Podozyten gezählt. Beide transgenen Linien zeigen unveränderte Podozytenzahlen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3-4 D), unterscheiden sich aber in der ausgemessenen glomerulären Fläche, die in den UCH-L1^{WT}-Tieren signifikant vergrößert ist (Abb. 3-4 E). Die Anzahl p57-positiver Podozyten pro Fläche wird durch den Quotienten beider Parameter gebildet und zeigt keine Veränderungen in den Linien (Abb. 3-4 F). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die Proteinurie nicht das Resultat massiver lichtmikroskopisch sichtbarer morphologischer Veränderungen ist und auch nicht auf einen Verlust von Podozyten zurückgeführt werden kann.

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob die in den UCH-L1^{WT}-Tieren ermittelte Proteinurie mit einer Fehlregulation podozytenspezifischer Proteine assoziiert ist. Zu diesem Zweck wurden Glomeruli-Lysate im Western Blot und auf Transkriptebeine gegen das Schlitzmembranprotein Nephrin und zytoskelettalem Adapterprotein α -Aktinin-4 analysiert. Sowohl die Western Blot- als auch qPCR-Ergebnisse zeigen in den UCH-L1^{WT}-Mäusen deutlich erhöhte Nephrin-Expressionslevel (Abb. 3-5 A und B) während der α -Aktinin-4-Gehalt auf Proteinebene signifikant reduziert ist und transkriptionell kompensatorisch hochreguliert wird (Abb. 3-5 C und D). Demgegenüber sind die Expressionslevel in den UCH-L1^{I93M}-Mäusen unverändert stabil. Die verifizierenden Immunfluoreszenzfärbungen geben Aufschluss über die Lokalisation des verstärkt exprimierten Nephrins in den UCH-L1^{WT}-Mäusen (Abb. 3-5 E). Demnach wird dieses entweder verstärkt internalisiert oder akkumuliert im Zytoplasma der Podozyten. Auch die Expression von α -Aktinin-4 ist deutlich geringer als im Kontroll- und UCH-L1^{I93M}-Tier. Eine ergänzende Analyse des *Wilms Tumor-1* Gens (*WT-1*), welches für einen podozytenspezifischen Transkriptionsfaktor kodiert, der die Genaktivität oben genannter Proteine reguliert, weist ebenfalls nur in den UCH-L1^{WT}-überexprimierenden Mäusen erhöhte Expressionslevel auf (Abb. 3-5 F). Diese Ergebnisse implizieren, dass eine Regulation des Schlitzmembranproteins Nephrin und α -Aktinin-4 im Podozyten in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität erfolgt.

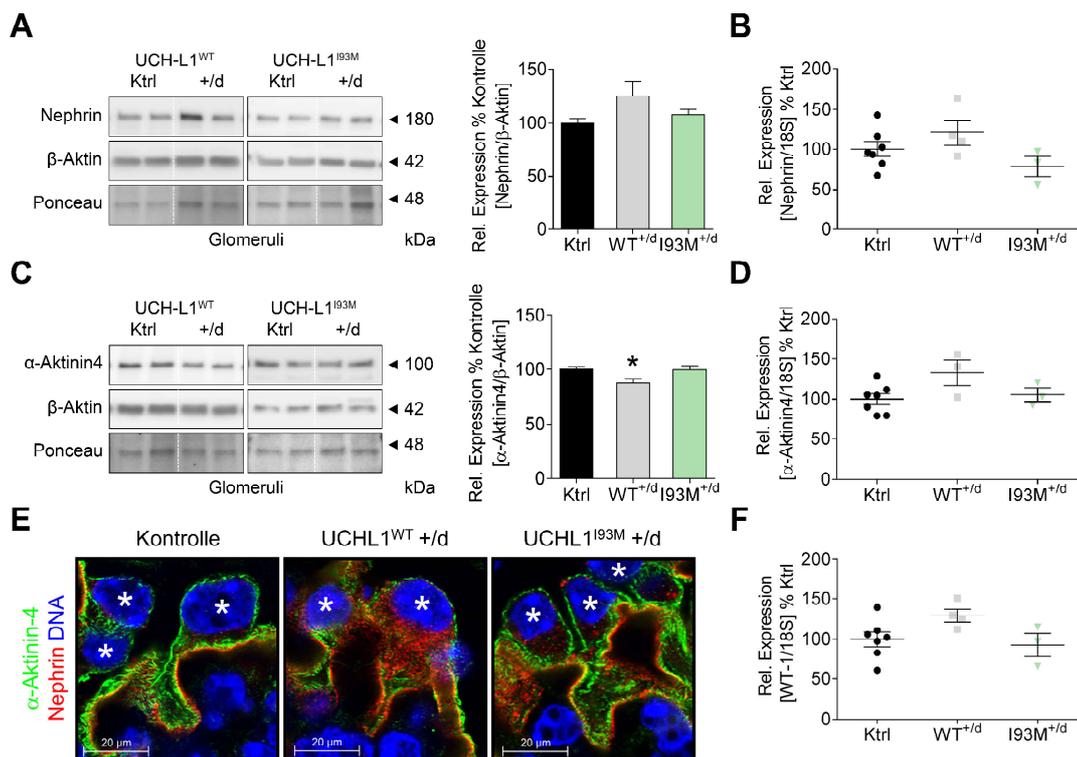


Abb. 3-5: Charakterisierung podozytenspezifischer Proteine UCH-L1-überexprimierender Tiere. **(A+C):** Repräsentative Western Blot-Analysen aus isolierten Glomeruli mit dazugehörigen Densitometrien demonstrieren eine erhöhte Nephrin- sowie reduzierte α-Aktinin-4-Expression in UCH-L1^{WT}-Mäusen, nicht aber in UCH-L1^{I93M}-Tieren. β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle (n=6-19 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). **(B+D+F):** qPCR-Analysen von Nephrin und α-Aktinin-4, deren Transkription unter anderem von WT-1 reguliert wird, sind ausschließlich in UCH-L1^{WT}-Mäusen erhöht (n=3-7 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test). **(E):** Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephrin (rot) als Marker der Schlitzmembran, α-Aktinin-4 (grün) und Zellkerne (blau). Überexpression von UCH-L1^{WT} bewirkt in Podozyten (weiße Sternchen) eine starke Internalisierung oder Akkumulation von Nephrin im Zytoplasma, während das Schlitzmembran-assoziierte Protein α-Aktinin-4 vermindert exprimiert wird (LSM800 mit Airyscan).

3.1.4 Überexpression von UCH-L1^{I93M} resultiert in einer beeinträchtigten proteasomalen Aktivität und Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Expressionsstärken podozytenspezifischer Proteine auf einen veränderten Proteinabbau zurückzuführen sind, wurde der Ubiquitin-Status in beiden Mauslinien näher untersucht. Western Blot-Analysen gegen Gesamt-Ubiquitin (pUb) zeigen in UCH-L1^{WT}-Mäusen einen intakten Proteinabbau, da signifikante Mengen Monoubiquitin (mUb) für Markierungsreaktionen zur Verfügung stehen und polyubiquitinierte Proteine nicht akkumulieren (Abb. 3-6 A und C). Demgegenüber weisen UCH-L1^{I93M}-Mäuse Störungen im Proteinabbau auf, da trotz eines stabilen Monoubiquitinpools massiv polyubiquitinierte Proteine

akkumulieren (Abb. 3-6 B und C). Eine zusätzliche histologische Färbung zeigt zum einen, dass die beobachtete Akkumulation innerhalb der Glomeruli vor allem auf die Podozyten (weißes Sternchen) beschränkt und zum anderen vor allem in den UCH-L1^{I93M}-Tieren das podozytäre Ubiquitin-Signal leicht erhöht ist im Vergleich zu den Kontrollen und UCH-L1^{WT}-Tieren (Abb. 3-6 D).

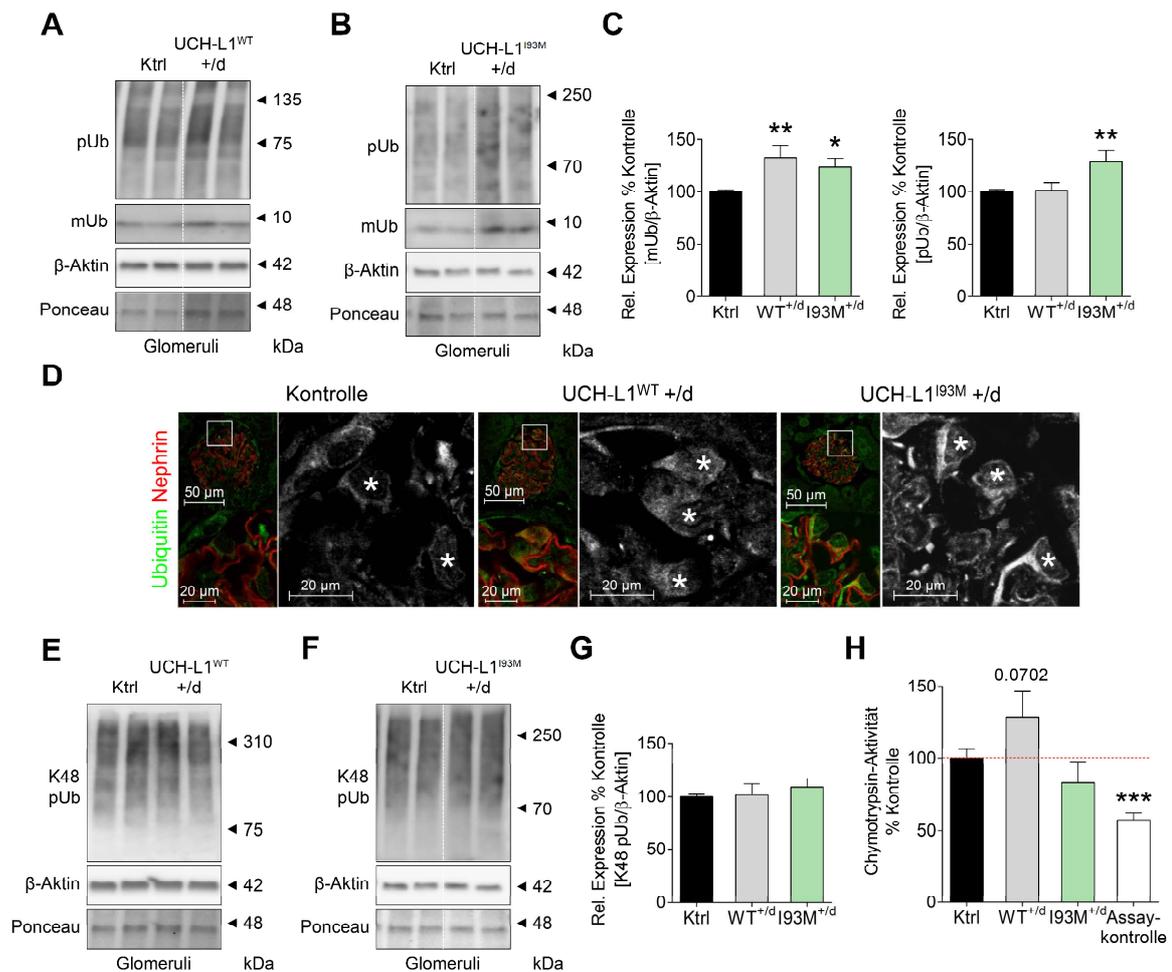


Abb. 3-6: Regulation der podozytären Proteostase in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität. Repräsentative Western Blot-Analysen und dazugehörige Densitometrien zeigen (A-C) in beiden Linien eine Stabilisierung des Monoubiquitinpools (mUb), aber nur in UCH-L1^{I93M}-Mäusen eine massive Akkumulation polyubiquitinerter Proteine (pUb). Diese Ergebnisse korrelieren trotz unauffälligen Gehalts proteasomal abzubauenender Proteine (K48 pUb) (E-G) mit einer deutlich verminderten proteasomalen Aktivität in isolierten Glomeruli UCH-L1^{I93M}-überexprimierender Tiere (H). Demgegenüber bewirkt eine erhöhte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität in UCH-L1^{WT}-Mäusen einen beständigen Proteinabbau. Die Assaykontrolle wurde mit 10 µM Epoxomicin versetzt (n=4-16 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test ***p < 0,001). (A-C, E-G): β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle (n=8-15 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05; **p < 0,01; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). (D): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephtrin (rot) als Marker der Schlitzmembran und Ubiquitin (grün/weiß) demonstrieren einen erhöhten podozytären Ubiquitin-Gehalt in den UCH-L1^{I93M}-Tieren im Vergleich zu einem leicht erhöhten podozytären Ubiquitin-Gehalt in UCH-L1^{WT}-Mäusen (LSM510; weiße Sternchen markieren Podozyten).

Um den Anteil der für den proteasomalen Abbau bestimmten Proteine zu untersuchen, erfolgte eine weitere Proteinfärbung gegen ubiquitiniertes Lysin 48 (K48 pUb). Während im Western Blot nur in den UCH-L1^{I93M}-Mäusen ein leichter akkumulativer Trend beobachtet wurde (Abb. 3-6 E bis G), zeichnete sich im proteasomalen Aktivitätsassay eine deutlichere Tendenz ab. Die ermittelte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (erfasst die hauptproteolytische Aktivität des Proteasoms) von Glomeruli-Lysaten zeigt in UCH-L1^{WT}-Mäusen mit ca. 130 % eine merklich erhöhte proteasomale Effizienz, während die in den UCH-L1^{I93M}-Mäusen um 20 % reduziert und damit deutlich beeinträchtigt ist (Abb. 3-6 H). Diese Ergebnisse korrelieren mit dem akkumulativen Phänotyp polyubiquitinerter Proteine in den UCH-L1^{I93M}-Tieren und implizieren einen gestörten Proteinabbau, der durch Überexpression des dysfunktionalen UCH-L1-Proteins (I93M) und nicht des enzymatisch intakten UCH-L1-Proteins hervorgerufen wird.

Überdies sollte überprüft werden, ob die beeinträchtigte proteasomale Aktivität in der UCH-L1^{I93M}-Linie auf eine Fehlregulation relevanter Untereinheiten des Standard- sowie des Immunoproteasoms zurückzuführen ist. Dabei wurde jeweils die hauptkatalytische Untereinheit Beta-5 (β 5) bzw. LMP7 (β 5i) betrachtet. Die Western Blot-Analysen zeigen ausschließlich signifikant erhöhte β 5-Level in isolierten Glomeruli UCH-L1^{I93M}-überexprimierender Tiere (Abb. 3-7 A) während die Expression der Immunoproteasom-assoziierten Untereinheit LMP7 in beiden Linien unverändert bleibt (Abb. 3-7 C). Eine Immunfluoreszenzfärbung gegen β 5 verifiziert diese Ergebnisse und zeigt in UCH-L1^{I93M}-Mäusen die stärkste Expression im podozytären Zytoplasma (Abb. 3-7 B). Diese Daten deuten an, dass eine verstärkte Bereitstellung des Standardproteasoms erfolgt um die proteasomale Defizienz in Mäusen mit dysfunktionalem UCH-L1-Protein (I93M) zu kompensieren.

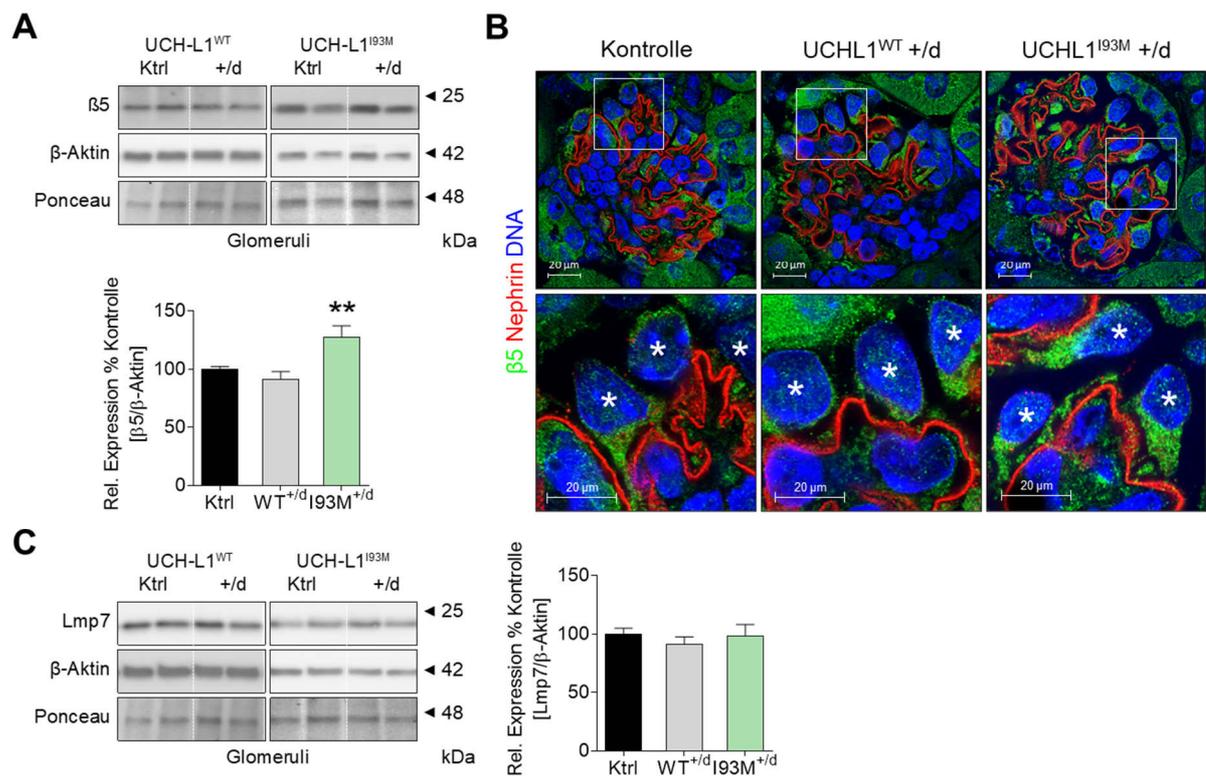


Abb. 3-7: Expressionsanalyse der hauptkatalytischen Untereinheiten des Standard- sowie des Immunoproteasoms. Repräsentative Western Blot-Analysen und dazugehörige Densitometrien zeigen eine ausschließlich verstärkte Expression der β5-Untereinheit des Standardproteasoms in Podozyten UCH-L1^{I93M}-überexprimierender Mäuse (**A**) während in beiden Linien keine weiteren Untereinheiten des Immunoproteasoms (LMP7) bereitgestellt werden (**C**). β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle (n=6-15 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test **p < 0,01; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). (**B**): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephrin (rot) als Marker der Schlitzmembran, β5 (grün) und Zellkerne (blau) demonstrieren eine podozytenspezifische Hochregulation der hauptkatalytischen Untereinheit des Standardproteasoms in UCH-L1^{I93M}- nicht aber in UCH-L1^{WT}-Mäusen (LSM800 mit Airyscan; weiße Sternchen markieren Podozyten).

3.1.5 UCH-L1 interagiert mit dem Proteasom, aber nur die Bindung von UCH-L1^{I93M} beeinträchtigt die katalytische Aktivität

Die folgenden Versuche sollten darüber Aufschluss geben, inwiefern die Überexpression von UCH-L1^{I93M} im Podozyten die proteasomale Aktivität trotz Hochregulation der katalytisch aktiven Untereinheit β5 beeinträchtigt. Zu diesem Zweck wurden HEK293-T-Zellen mit humanen (hu)UCH-L1^{WT}-myc-FLAG- bzw. (hu)UCH-L1^{I93M}-myc-FLAG-Konstrukten transient transfiziert und zunächst hinsichtlich der Transfektionseffizienz überprüft. Abbildung 3-8 A zeigt im Western Blot sowohl gegen Flag als auch UCH-L1 positive Signale mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa, die dem getagten UCH-L1-Protein entsprechen. Neben dem getagten Protein wurde auch endogenes HEK-UCH-L1 auf einer Höhe von 25 kDa detektiert. Dabei

fungierten untransfizierte HEK293-T-Zellen als Kontrolle. Mit diesen Lysaten erfolgte im Anschluss eine Ko-Immunopräzipitation von UCH-L1 und dem Standardproteasom sowohl mit dem Flag-Antikörper (Abb. 3-8 B) als auch mit einem gegen die $\alpha 6$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms gerichteten Antikörpers (Abb. 3-8 C). Die Ergebnisse zeigen, dass UCH-L1 mit dem Proteasom interagiert, da sowohl $\alpha 4$ -Untereinheiten mit dem Flag-Antikörper (Abb. 3-8 B, oben, 29 kDa) als auch UCH-L1 mit dem $\alpha 6$ -Antikörper (Abb. 3-8 C, mittig/unten, 32 kDa) ko-immunopräzipitiert wurden. Diese Reaktion ist spezifisch, da die untransfizierten HEK293-T-Zellen keine Signale gegen präzipitiertes $\alpha 4$ und UCH-L1 zeigen. Die in Abbildung 3-8 B und C detektierten Banden auf Höhe von 25 kDa repräsentieren die denaturierten leichten Immunglobulinketten der für die Präzipitation verwendeten Antikörper. Des Weiteren wurden die Lysate in einer nicht-denaturierenden NATIVE-PAGE aufgetrennt und die Aktivität der separierten Proteasomkomplexe in Abhängigkeit der UCH-L1-Expression im Gel durch Zugabe des Substrates Suc-LLVY-AMC ermittelt (Abb. 3-8 D). Dabei konnte nur in den huUCH-L1^{I93M}-myc-FLAG exprimierenden HEK-Zellen ein geringerer Substratumsatz beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass nur die Interaktion von dysfunktionalem UCH-L1-Protein (I93M) mit dem Proteasom die katalytische Effizienz beeinträchtigt.

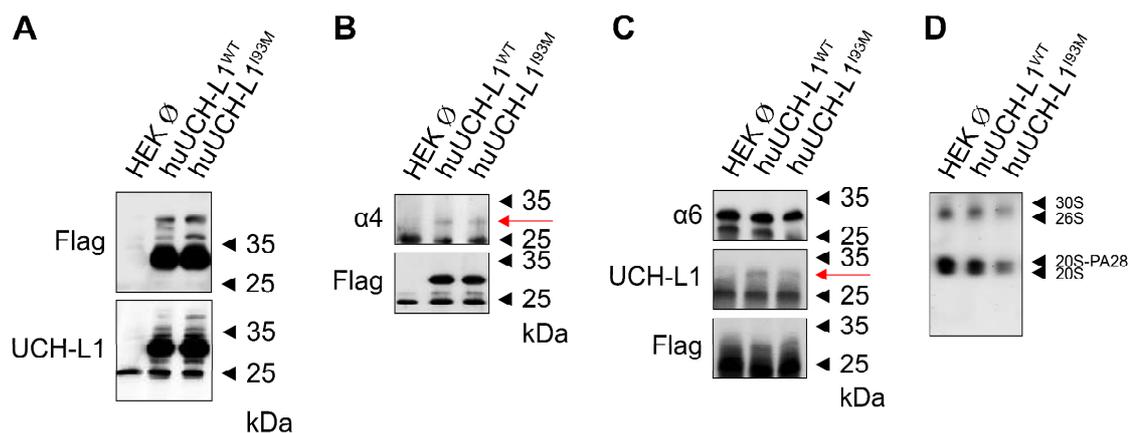


Abb. 3-8: Interaktionsstudien zwischen UCH-L1 und dem Proteasom. HEK293-T-Zellen wurden transient mit huUCH-L1^{WT}-myc-FLAG oder huUCH-L1^{I93M}-myc-FLAG transfiziert. Repräsentative Western Blot-Analysen gegen (A) den Flag-Tag sowie UCH-L1 zeigen eine gleichmäßige Transfektionseffizienz beider Konstrukte (32 kDa). In der mitgeführten untransfizierten Kontrolle wurde nur endogenes UCH-L1 (25 kDa) detektiert. Eine Interaktion zwischen beiden UCH-L1-Konstrukten und dem Proteasom konnte in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten sowohl mit dem Flag-Antikörper (B) als auch einem Proteasom-spezifischen $\alpha 6$ -Antikörper (C) nachgewiesen werden. Die jeweils interagierende Komponente ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet ($\alpha 4$: Untereinheit des 20S-Proteasoms; n=3). (D): In-Gel Aktivitätsmessungen proteasomaler Untereinheiten aus transfizierten HEK293-T-Zelllysaten zeigen nur in Anwesenheit des huUCH-L1^{I93M}-myc-FLAG-Konstrukts eine verminderte katalytische Effizienz (n=2).

3.1.6 Kompensatorische Hochregulation des lysosomalen Systems in UCH-L1^{193M}- aber nicht in UCH-L1^{WT}-Mäusen

Da vorherige Untersuchungen gezeigt haben, dass der Proteinabbau auf Grund einer proteasomalen Beeinträchtigung in den UCH-L1^{193M}-Mäusen gestört ist, sollte nachfolgend geprüft werden, ob andere Abbausysteme im Podozyten kompensatorisch reguliert werden. Durchgeführte Western Blot-Analysen gegen lysosomale Marker zeigen eine erhöhte Expression von *lysosomal associated membrane protein 2* (Lamp2) (Abb. 3-9 A) und *lysosomal integral membrane protein 2* (Limp2) (Abb. 3-9 B) in isolierten Glomeruli UCH-L1^{193M}-überexprimierender Mäuse, aber nicht in UCH-L1^{WT}-Tieren. Verifizierende Immunfluoreszenzfärbungen untermauern, dass Limp2 nicht nur im Podozyten (weiße Sternchen) sondern auch in Endothel- und Mesangialzellen hochreguliert wird, was das starke Western Blot-Signal erklärt (Abb. 3-9 C). Demgegenüber zeigen UCH-L1^{WT}-Mäuse Veränderungen im Expressionsgehalt des Autophagie-assoziierten Proteins LC3, nicht aber von Beclin-1 (Abb. 3-9 D und E). LC3 wird für den Aufbau und die Reifung von Autophagosomen-Membranen benötigt. Dafür wird die zytoplasmatische Form LC3-I nach Lipidierung zur membrangebundenen LC3-II-Form. Der errechnete Quotient aus LC3-II zu LC3-I weist darauf hin, dass in UCH-L1^{WT}-Glomeruli vermehrt Autophagosomen gebildet werden. Ergänzende Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen die verstärkte Bereitstellung von LC3 in Podozyten (weiße Sternchen) von UCH-L1^{WT}-Tieren (Abb. 3-9 F). Die Überexpression von UCH-L1^{193M} zieht eine Hochregulation des lysosomalen Systems nach sich, um die vorhandene proteasomale Defizienz zu kompensieren.

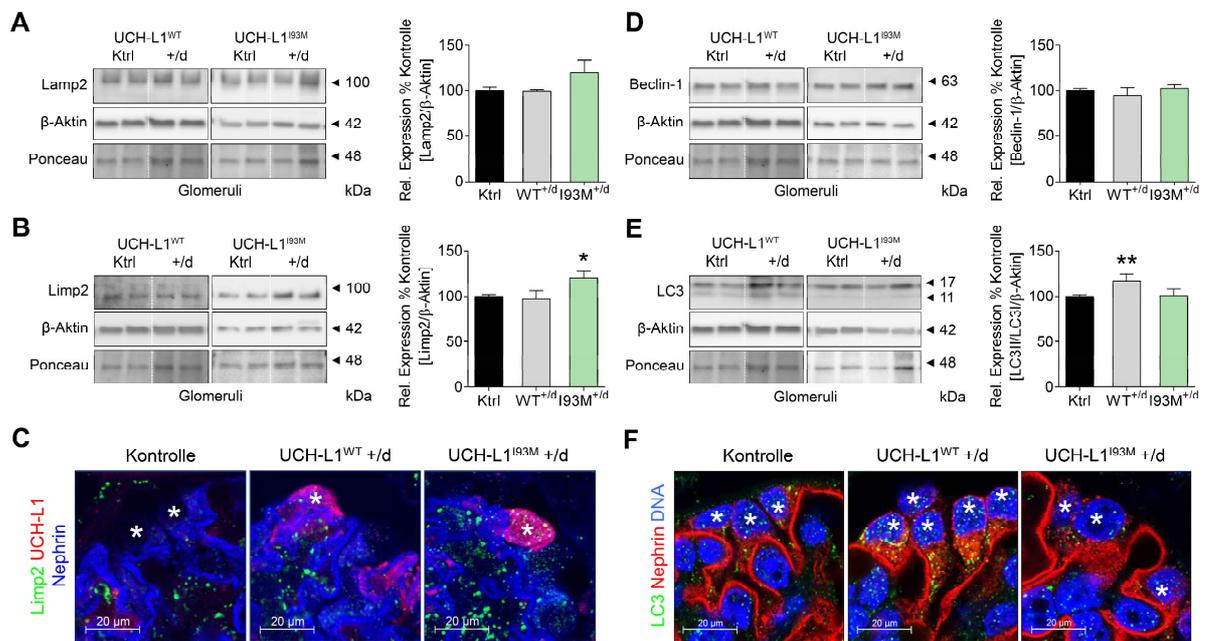


Abb. 3-9: Regulation des lysosomal/autophagosomalen Systems in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität. Repräsentative Western Blot-Analysen und dazugehörige Densitometrien zeigen in UCH-L1^{I93M}-Mäusen eine verstärkte Expression der lysosomalen Proteine Lamp2 (**A**) und Limp2 (**B**). (**C**): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Nephrin (blau) als Marker der glomerulären Schlitzmembran, UCH-L1 (rot) zur Kennzeichnung überexprimierender Podozyten und Limp2 (grün) verdeutlichen, dass Limp2 neben Podozyten (weiße Sternchen) auch von anderen glomerulären Zellen exprimiert wird (LSM510). Demgegenüber regulieren UCH-L1^{WT}-überexprimierende Mäuse vor allem Autophagiemarker wie LC3, aber nicht Beclin-1 (**D+E**). Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephrin (rot) als Marker der Schlitzmembran, LC3 (grün) und Zellkerne (blau) demonstrieren eine starke zytoplasmatische Verteilung von LC3 im Podozyten (weiße Sternchen) in UCH-L1^{WT}-Mäusen (LSM800 mit Airyscan) (**F**). (β -Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle. n=4-16 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05; **p < 0,01; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten).

3.2 Charakterisierung UCH-L1-überexprimierender Mäuse in der Anti-Podozyten-Nephritis (APN)

Im ersten Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob die Überexpression eines dysfunktionalen UCH-L1-Proteins (I93M) im Vergleich zum aktiven UCH-L1-Protein (WT) bereits im naiven Tier einen Phänotyp hervorruft. Entsprechend der Hypothese, dass UCH-L1 im Rahmen der Membranösen Nephropathie (MN) oxidativ modifiziert wird, sollen nun UCH-L1^{WT} sowie das vermutlich oxidativ-geschädigte Protein (repräsentiert durch UCH-L1^{I93M}) in erstmaligen Vorversuchen im experimentellen Tiermodell untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 13-36 Wochen alte heterozygote UCH-L1-überexprimierende Mäuse (+/d cre⁺) bzw. Wildtyp-littermates (+/+ cre^{-/-} bzw. +/d cre⁻) der jeweiligen Linie mit Anti-Podozyten-Nephritis (APN)-Antikörpern behandelt und nach 14 Tagen geopfert. Alle nachfolgenden immunologischen und biochemischen Analysen erfolgten mit isolierten Glomeruli.

3.2.1 Verifizierung der UCH-L1-Überexpression im experimentellen Tiermodell

Analysen isolierter Glomeruli aus UCH-L1-überexprimierenden Tieren zeigen im Western Blot in beiden Linien eine massive Hochregulation des UCH-L1-Levels um mindestens das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-10 A). Die ergänzende Immunfluoreszenz gibt einen Überblick über die Verteilung der UCH-L1-Expression im erkrankten Glomerulum (Abb. 3-10 B). In beiden transgenen Mauslinien konzentriert sich die UCH-L1-Expression im Zytoplasma und Zellkern der aufliegenden Podozyten, konnte aber ebenfalls auch im Endothel und Mesangium detektiert werden. Die untersuchten Kontrolltiere weisen eine deutliche Menge podozytäres UCH-L1 auf, die jedoch geringer ist als in den transgenen Tieren. Auf Grund der stabilen UCH-L1-Expression sind die generierten Mauslinien für die nachfolgenden Untersuchungen geeignet.

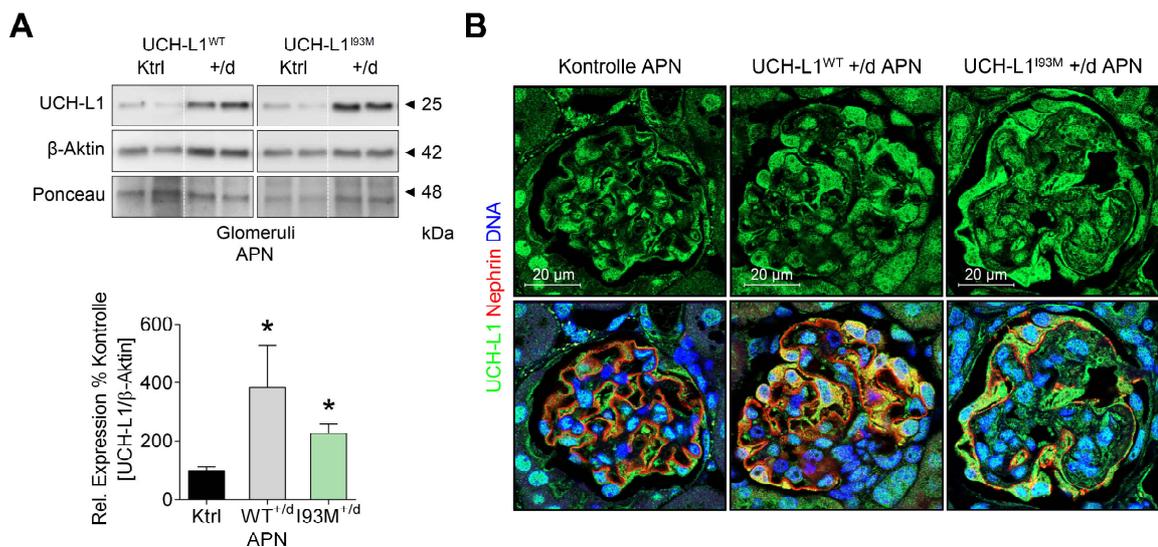


Abb. 3-10: Verifizierung der Überexpression von UCH-L1^{WT} und UCH-L1^{I93M} in Podozyten APN-behandelter Mäuse. (A): Repräsentative Western Blot-Analysen aus isolierten Glomeruli mit dazugehöriger Densitometrie demonstrieren einen signifikant erhöhten UCH-L1-Gehalt in beiden transgenen Mauslinien. β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle (n=3-11 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). **(B):** Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephritin (rot) als Marker der Schlitzmembran, Zellkerne (blau) und UCH-L1 (grün) zeigen eine starke podozytenspezifische Überexpression (LSM800 Airyscan).

3.2.2 UCH-L1-Expression korreliert mit dem Auftreten von oxidativem Stress in Podozyten von MN-Patienten

Es ist beschrieben, dass die MN mit einer massiven *de novo*-Expression von UCH-L1 (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2009) sowie einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert ist (Neale *et al.*, 1993). Nachfolgend sollte anhand von Immunfluoreszenzfärbungen humaner Biopsien dieser Zusammenhang aufgezeigt werden. Abbildung 3-11 demonstriert eine Hochregulation der antioxidativ wirksamen Superoxid Dismutase 2 (SOD2) in ausschließlich UCH-L1-positiven Zellen des Glomerulums in der PLA₂R1-assoziierten MN. Im Rahmen der Erkrankung kommt es ebenfalls zu einem Strukturverlust des linearen Nephrinmusters und zur verstärkten Internalisierung dieses Proteins. Diese Ergebnisse implizieren, dass der UCH-L1-Gehalt mit der ROS-Konzentration im Glomerulum korrelieren könnte.

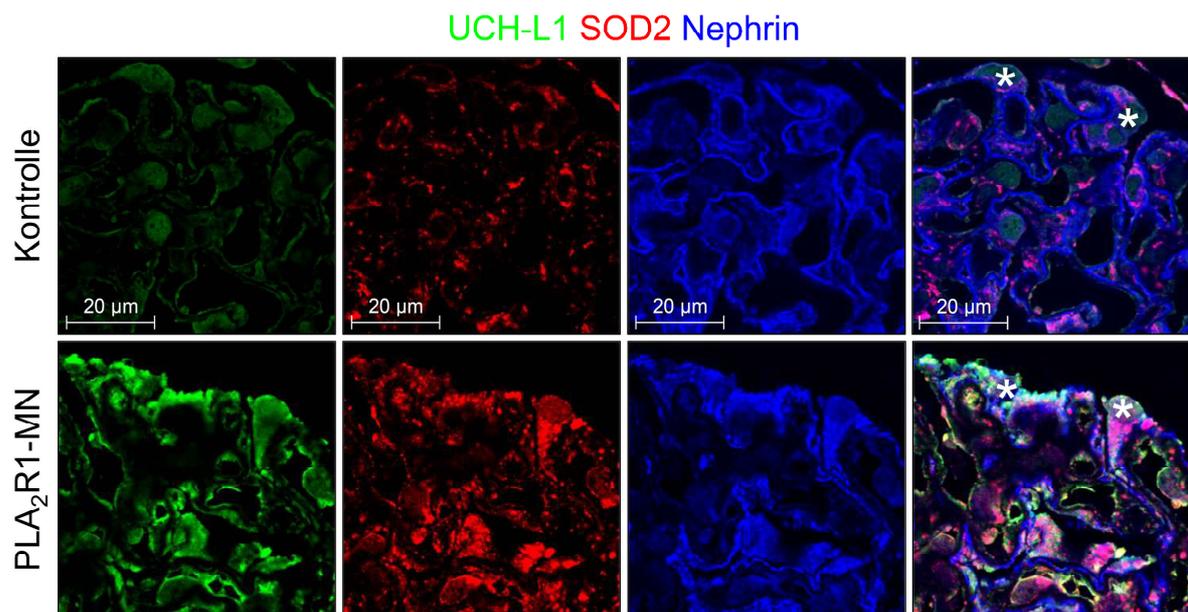


Abb. 3-11: Charakterisierung der UCH-L1- und oxidativen Stress-Level in Podozyten während der MN. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von humanen Biopsien gegen UCH-L1 (grün), SOD2 (rot) und Nephrin (blau) als Marker der Schlitzmembran demonstrieren eine Korrelation zwischen der UCH-L1-Expression und dem SOD2-Gehalt als indirektem Sensor für oxidativen Stress in Podozyten (weiße Sternchen) im Rahmen der MN (LSM510).

3.2.3 Verminderte Stressantwort in UCH-L1^{WT}-Tieren in der Anti-Podozyten-Nephritis

Dieser mögliche Zusammenhang zwischen der UCH-L1-Expression und oxidativem Stress sollte nachfolgend auch in Glomeruli APN-behandelter Mäuse untersucht werden. Dazu wurde erneut die Expression von ATPB und MnSOD auf Proteinebene

analysiert. Im Western Blot deutet sich besonders in den Glomeruli UCH-L1^{WT}-überexprimierender Tiere eine deutliche Reduktion beider Stressmarker an während die Stressantwort in UCH-L1^{I93M}-Mäusen unverändert ist und keine Anzeichen von oxidativem Stress zeigt (Abb. 3-12 A und B). Die Auswertung von SOD1-Immunfluoreszenzfärbungen bestätigte den verminderten Proteingehalt in Podozyten von UCH-L1^{WT}-Mäusen, zeigte aber tendenziell eine höhere SOD1-Expression in Podozyten und im Mesangium von UCH-L1^{I93M}-überexprimierenden Tieren (Abb. 3-12 C), die auf eine mögliche induzierte Stressantwort in dieser Linie hinweist. Die Überexpression des aktiven UCH-L1-Proteins (WT) scheint im Vergleich zu dysfunktionaler UCH-L1 (I93M) einen protektiven Effekt auf die Zellhomöostase zu besitzen.

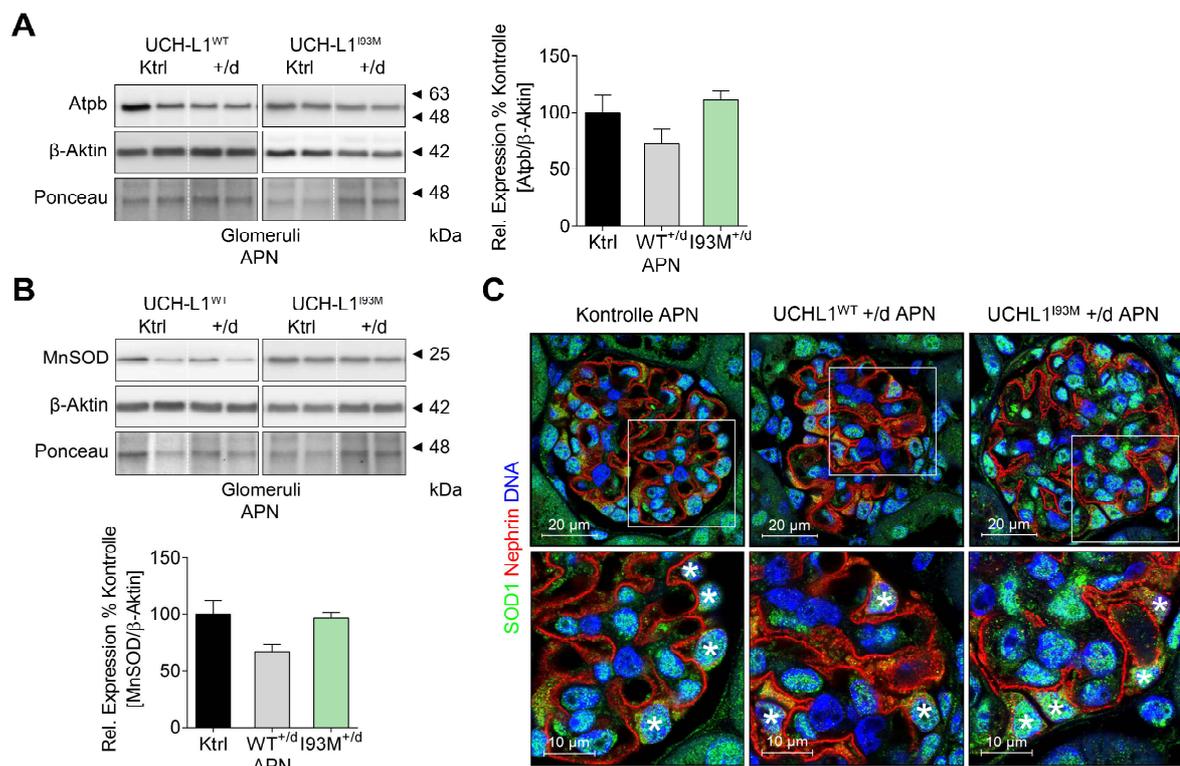


Abb. 3-12: Untersuchung der oxidativen Stressantwort in UCH-L1-überexprimierenden Podozyten im Krankheitsmodell der MN. Repräsentative Western Blot-Analysen aus isolierten Glomeruli mit dazugehöriger Densitometrie demonstrieren in Podozyten von UCH-L1^{WT}-Mäusen eine verminderte Stressantwort infolge einer reduzierten Expression von ATPB (**A**) und MnSOD (**B**). β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle (n=3-11 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). (**C**): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephrin (rot) als Marker der Schlitzmembran, Zellkerne (blau) und SOD1 (grün) weisen hingegen auf eine verstärkte Expression von antioxidativer SOD1 in UCH-L1^{I93M}-Mäusen hin (LSM800 mit Airyscan; weiße Sternchen markieren Podozyten).

3.2.4 UCH-L1^{I93M}-überexprimierende Mäuse entwickeln in der APN eine massive Proteinurie infolge einer ausgeprägten Podozytenschädigung

Bei der Anwendung eines experimentellen Tiermodells der MN ist es elementar zu überprüfen, ob es im Verlauf der erzeugten Erkrankung zu einer Podozytenschädigung durch den gebundenen Antikörper kommt. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob dieser Schaden von der UCH-L1-Aktivität beeinflusst wird. Der wichtigste Parameter zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufes ist zunächst die Bestimmung der Albumin/Kreatinin-Ratio (Proteinurie). Dazu wurde Mausurin an Tag 0 (Präurin) sowie Tag 3, 6, 9 und 13 nach Injektion des APN-Antikörpers gesammelt und analysiert. Abbildung 3-13 A demonstriert, dass UCH-L1^{I93M}-überexprimierende Tiere eine massive Proteinurie entwickeln, die bereits ab Tag 6 einsetzt und sich bis Tag 13 (149 mg/mg) kontinuierlich steigert. Die Kontroll- sowie UCH-L1^{WT}-Mäuse zeigen erst ab Tag 10 eine leichte Proteinurie, die an Tag 13 einen Maximalwert von ca. 6 mg/mg erreicht. Alle Tiere weisen im Versuchsverlauf keine äußeren Anzeichen von Schmerz oder motorischen Einschränkungen auf. Die durchgeführte PAS-Färbung demonstrierte weitestgehend intaktes tubulointerstitielles Nierengewebe, zeigte aber in den Kontrollen sowie in beiden UCH-L1-überexprimierenden Linien ein deutlich geschwollenes glomeruläres Kapillarkonvolut (Abb. 3-13 B). Dieser Effekt war in den UCH-L1^{I93M}-Tieren durch Verschmelzen von glomerulären Zellen am stärksten ausgeprägt, da kaum angeschnittene Kapillargefäße beobachtet werden konnten. Zudem wurden im Vergleich zur Kontrolle und zu UCH-L1^{WT}-Mäusen nur wenig aufliegende Podozyten detektiert, die größtenteils geschwollene Zellkerne und Zytoplasma aufwiesen. Eine immunhistochemische Färbung von p57 mit anschließender Vermessung des Kapillarkonvoluts bestätigte, dass die Überexpression von UCH-L1^{I93M} in der APN mit einem massiven Podozytenverlust (mind. 25 %) einhergeht (Abb. 3-13 C). Demgegenüber zeigten UCH-L1^{WT}-Mäuse wie in den naiven Versuchen eine stabile Podozytenzahl und eine vergrößerte glomeruläre Fläche im Vergleich zu Kontroll-*littermates* (Abb. 3-13 C und D). Folglich zeigten UCH-L1^{WT}-Tiere deutlich mehr Podozyten pro Fläche als UCH-L1^{I93M}-überexprimierende Mäuse (Abb. 3-13 E). Dieser Podozytenverlust äußert sich auch in den Western Blot-Analysen isolierter Glomeruli, in denen nur in UCH-L1^{I93M}-Mäusen ein um ein Drittel reduzierter Nephrin-Gehalt detektiert wurde (Abb. 3-13 F). Diese Ergebnisse spiegeln sich ebenfalls in der Ultrastruktur der podozytären Schlitzmembran wider. Mit Hilfe der STED (*Stimulated Emission Depletion*)-Mikroskopie ist es möglich, Strukturen unter

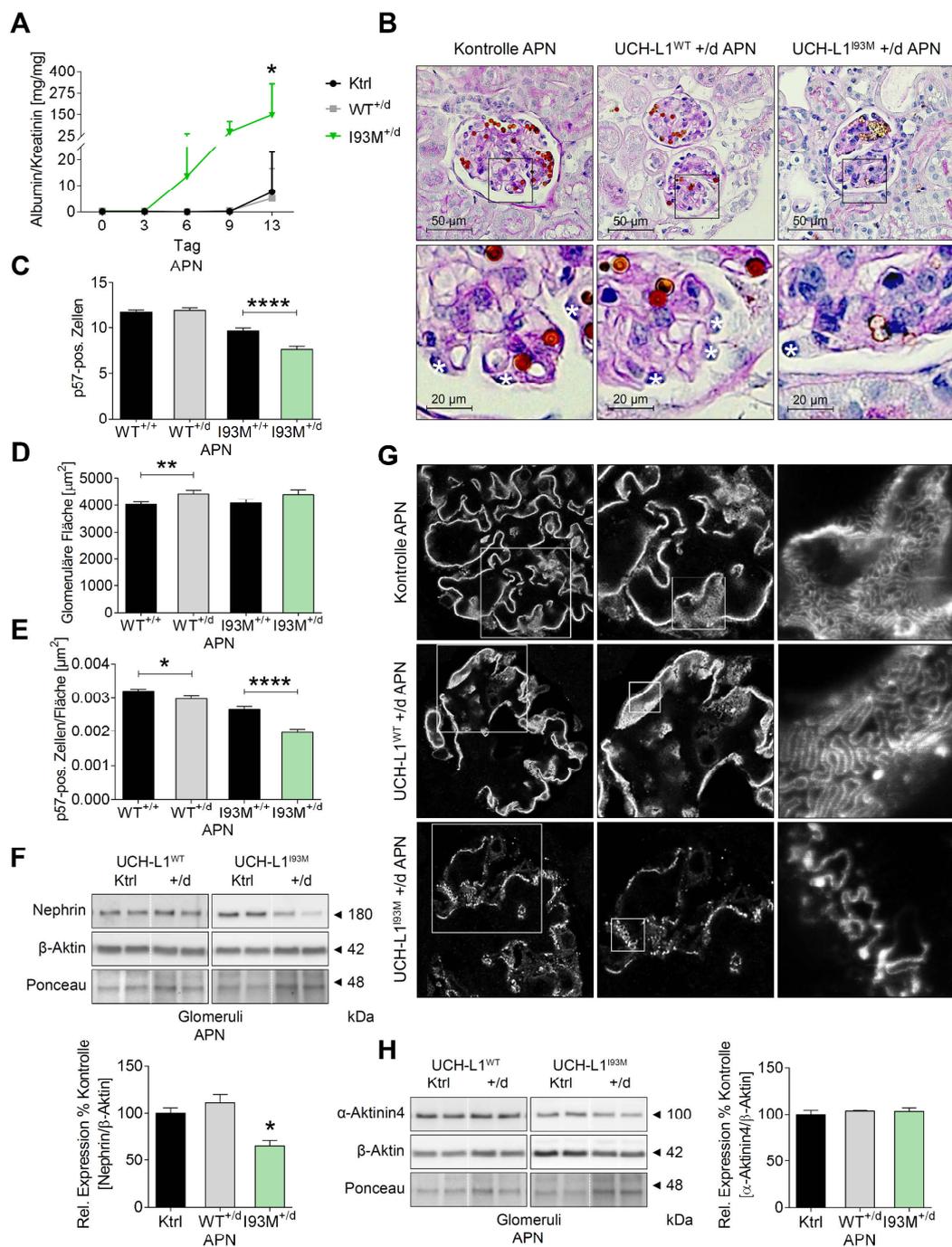


Abb. 3-13: Charakterisierung der Podozytenintegrität in Abhängigkeit von der UCH-L1-Aktivität in der APN. UCH-L1^{I93M}-Tiere entwickeln einen aggravierten Verlauf der APN mit einer verfrüht einsetzenden und verstärkten Proteinurie (**A**) infolge eines signifikanten Podozytenverlustes (**C-E**) und einer Reduktion der Nephrynexpression (**F**). In beiden transgenen Linien wurden keine Veränderungen in der Expressionsstärke des Nephryn-assoziierten Proteins α -Aktinin-4 festgestellt (**H**). (β -Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle. n=3-11 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten). (**B**): Repräsentative PAS-Färbung zeigt einen lichtmikroskopischen Verschluss der Kapillarlumina und geschwollene Podozyten sowie Zytoplasmen in allen drei Gruppen, mit der stärksten Ausprägung in den UCH-L1^{I93M}-Mäusen, in denen zusätzlich kaum aufliegende Podozyten detektiert wurden (40x-Vergrößerung, weiße Sternchen markieren Podozyten). (**G**): Repräsentative STED-Aufnahmen der podozytären Schlitzmembran anhand einer Färbung gegen Nephryn demonstrieren eine massive Störung der Podozytenintegrität durch Verlust des interdigitierenden Fußfortsatzmusters ausschließlich in UCH-L1^{I93M}-überexprimierenden Mäusen.

20 nm aufzulösen und somit die physikalischen Limitationen eines gängigen Fluoreszenzmikroskops zu umgehen. Die durchgeführten STED-Analysen von Nephrin-gefärbten Nierenschnitten zeigen eindrucksvoll, dass das engmaschige Fußfortsatzmuster, das in den Kontrollen und UCH-L1^{WT}-Mäusen zu beobachten ist, in den UCH-L1^{I93M}-überexprimierenden Tieren durch Verschmelzen der Fußfortsätze komplett aufgehoben wurde (Abb. 3-13 G). Die Expression des Schlitzmembran-assoziierten Proteins α -Aktinin-4 hingegen, bleibt in beiden Mauslinien unverändert (Abb. 3-13 H). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression eines dysfunktionalen UCH-L1-Proteins (I93M) mit einem Verlust der Podozytenintegrität einhergeht und den Podozytenschaden im experimentellen Tiermodell der MN fördert.

3.2.5 Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen trotz stabiler proteasomaler Aktivität in UCH-L1^{I93M}- aber nicht in UCH-L1^{WT}-überexprimierenden Tieren

Es wurde gezeigt, dass die Membranöse Nephropathie mit einer krankhaften Akkumulation polyubiquitinerter Proteine assoziiert ist (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011). Es sollte nun geklärt werden, ob die Expression von aktiver (WT) und dysfunktionaler (I93M) UCH-L1 die Ubiquitinhomöostase im Podozyten beeinflusst. In Abbildung 3-14 sind die Ergebnisse zur Analyse des Gesamtubiquitins (pUb) sowie von K48-polyubiquitinierten (K48 pUb) Proteinen, die für den proteasomalen Abbau bestimmt sind, zusammengefasst. Dabei zeigen nur UCH-L1^{I93M}-überexprimierende Mäuse eine signifikante Akkumulation von abzubauenen pUb-Proteinen (Abb. 3-14 A bis C). Zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen demonstrieren in den Kontrollen und UCH-L1^{WT}-Mäusen eine äquivalente pUb-Expression in den Podozyten während in UCH-L1^{I93M}-Tieren deutlich mehr polyubiquitinierte Proteine akkumulieren und neben den Podozyten auch verstärkt endothelial und mesangial verteilt sind (Abb. 3-14 D). Darüber hinaus bilden die angehäuften polyubiquitinierten Proteine in den UCH-L1^{I93M}-überexprimierenden Mäusen klumpige Aggregate, die größer sind als in den anderen beiden untersuchten Gruppen (Abb. 3-14 D, weißer Pfeil). Western Blot-Analysen gegen K48-pUb Proteine zeigen hingegen keine Akkumulationen in beiden Linien (Abb. 3-14 E bis G) und nur eine leicht erhöhte proteasomale Aktivität in den UCH-L1^{I93M}-Tieren (Abb. 3-14 H). Bei der Auswertung der K48-Daten ist zu berücksichtigen, dass die Analyse mit Gesamt-Glomeruli erfolgte und insbesondere

das Endothel im Immunkomplex-vermittelten Erkrankungsmodell stark betroffen ist, sodass podozytäre Effekte dadurch maskiert werden können. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass nur die Überexpression des dysfunktionalen UCH-L1-Proteins einen vergleichbaren akkumulativen Phänotyp wie in der MN zeigt.

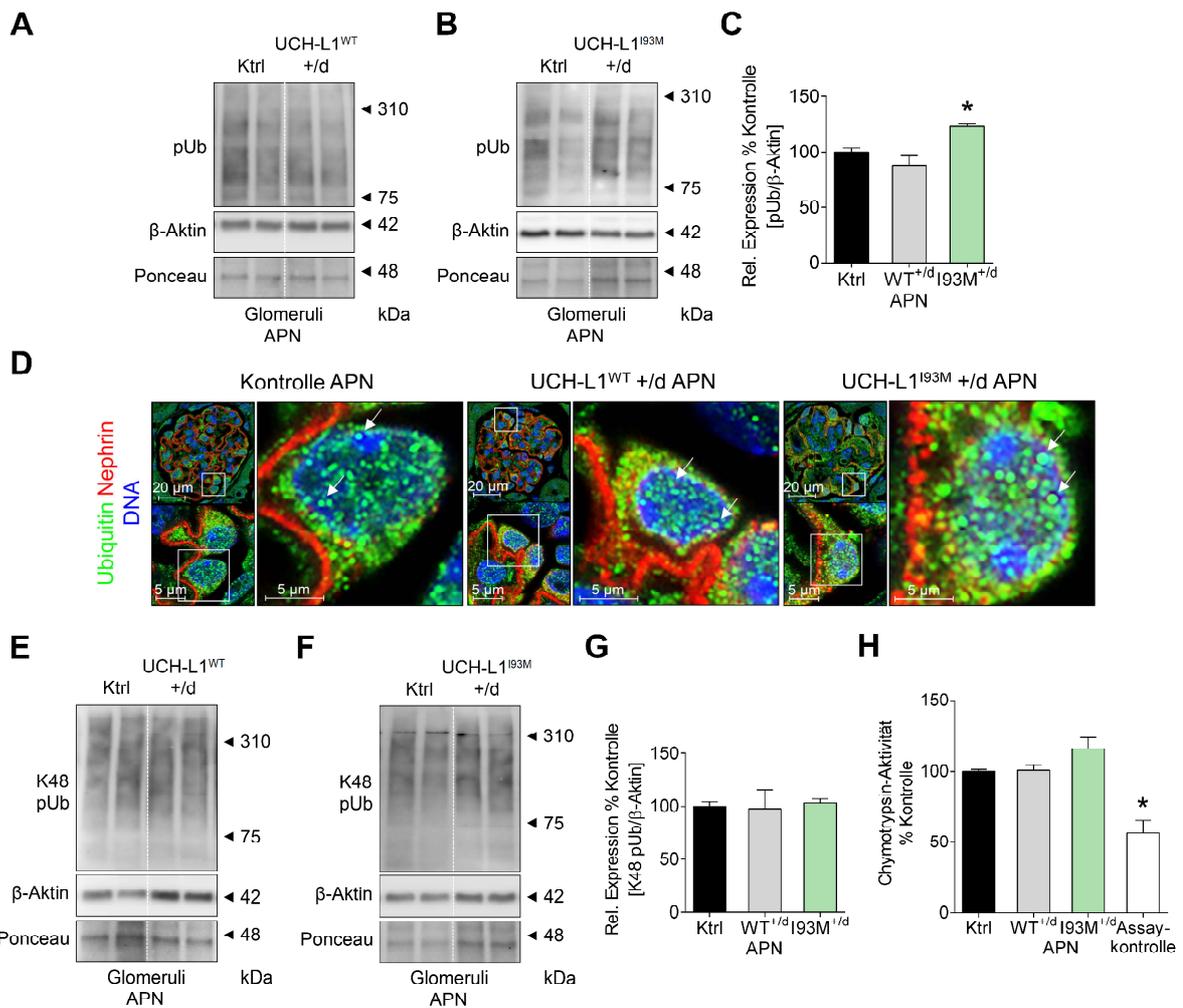


Abb. 3-14: Regulation der podozytären Proteostase in Abhängigkeit der UCH-L1-Aktivität in der APN. Repräsentative Western Blot-Analysen und dazugehörige Densitometrien zeigen eine signifikante Akkumulation polyubiquitiniertes Proteins in UCH-L1^{I93M}-Mäusen (**A-C**), die sich im Podozyten in größeren Aggregaten ablagern als in den Kontrollen bzw. in UCH-L1^{WT}-Tieren (**D**, weiße Pfeile, LSM800 mit Airyscan). Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephtrin (rot) als Marker der Schlitzmembran, Zellkerne (blau) und Polyubiquitin (pUb, grün) demonstrieren eine grobkörnige Ablagerung von pUb in Podozyten UCH-L1^{I93M}-überexprimierender Tiere. (**E-G**): Die Level K48-ubiquitiniertes Proteins unterscheiden sich in beiden Linien nicht von den Kontrollen und zeigen stabile proteasomale Aktivitäten (**H**). Die Assaykontrolle wurde mit 10 μ M Epoxomicin versetzt (n=2-8 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05). (β -Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle. n=3-8 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test *p < 0,05; gestrichelte weiße Linien: an dieser Stelle wurde der Blot geschnitten).

Um einen Einblick in die Zusammensetzung des Proteasoms in den beiden transgenen Linien im experimentellen Tiermodell zu erhalten und die in Abbildung 3-14 H gemessene proteasomale Aktivität zu validieren, erfolgten Analysen zur Expression der hauptkatalytischen Untereinheiten des Standard- (Abb. 3-15) bzw. des Immunoproteasoms (Abb. 3-16).

Im Vergleich zu den Ergebnissen im ersten Teil der Arbeit, wird die Expression der Beta-5 ($\beta 5$)-Untereinheit des Standardproteasoms sowohl in UCH-L1^{WT}- als auch UCH-L1^{I93M}-Mäusen drastisch hochreguliert (Abb. 3-15 A), wobei der Effekt in den I93M-Mäusen stärker ausfällt als in den UCH-L1^{WT}-Mäusen. Während $\beta 5$ in den Kontrolltieren vorrangig im Podozyten exprimiert wird, zeigen beide UCH-L1-überexprimierende Linien neben der podozytären auch eine endotheliale und mesangiale Expression (Abb. 3-15 B). Um positive Podozyten zu identifizieren und eine mögliche Ko-Lokalisation mit $\beta 5$ zu untersuchen, wurde UCH-L1 gegengefärbt. Der rote Kanal zeigt neben einer podozytären Expression auch positive Signale entlang der glomerulären Basalmembran, die auf eine Kreuzreaktion der Ratten-UCH-L1-Antikörper mit dem dort abgelagerten Maus-IgG zurückzuführen ist. In einer zur Verifizierung durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung gegen Ratten-IgG konnten nur positive Signale entlang der glomerulären Filtrationsbarriere aber nicht in den Podozyten detektiert werden, was die Spezifität des UCH-L1-Antikörpers bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Übereinanderlagerung beider Fluorophore zeigt, dass UCH-L1 mit $\beta 5$ ko-lokalisiert (*merge*-Kanal). Die Intensität dieser Ko-Lokalisation wurde mit Hilfe des Pearson-Koeffizienten unter Verwendung der Imaging-Software ZEN Pro von Zeiss bestimmt. Der Pearson-Koeffizient ist eine physikalische Größe, die den linearen Zusammenhang zwischen zwei metrischen Variablen beschreibt und stets zwischen -1 und 1 liegt. Die in Abbildung 3-15 C aufgetragenen Werte zeigen eine positive Korrelation (> 0) zwischen UCH-L1 und $\beta 5$, was die Interaktionsstudien bestätigen, unterscheiden sich aber nicht zwischen den beiden transgenen Linien.

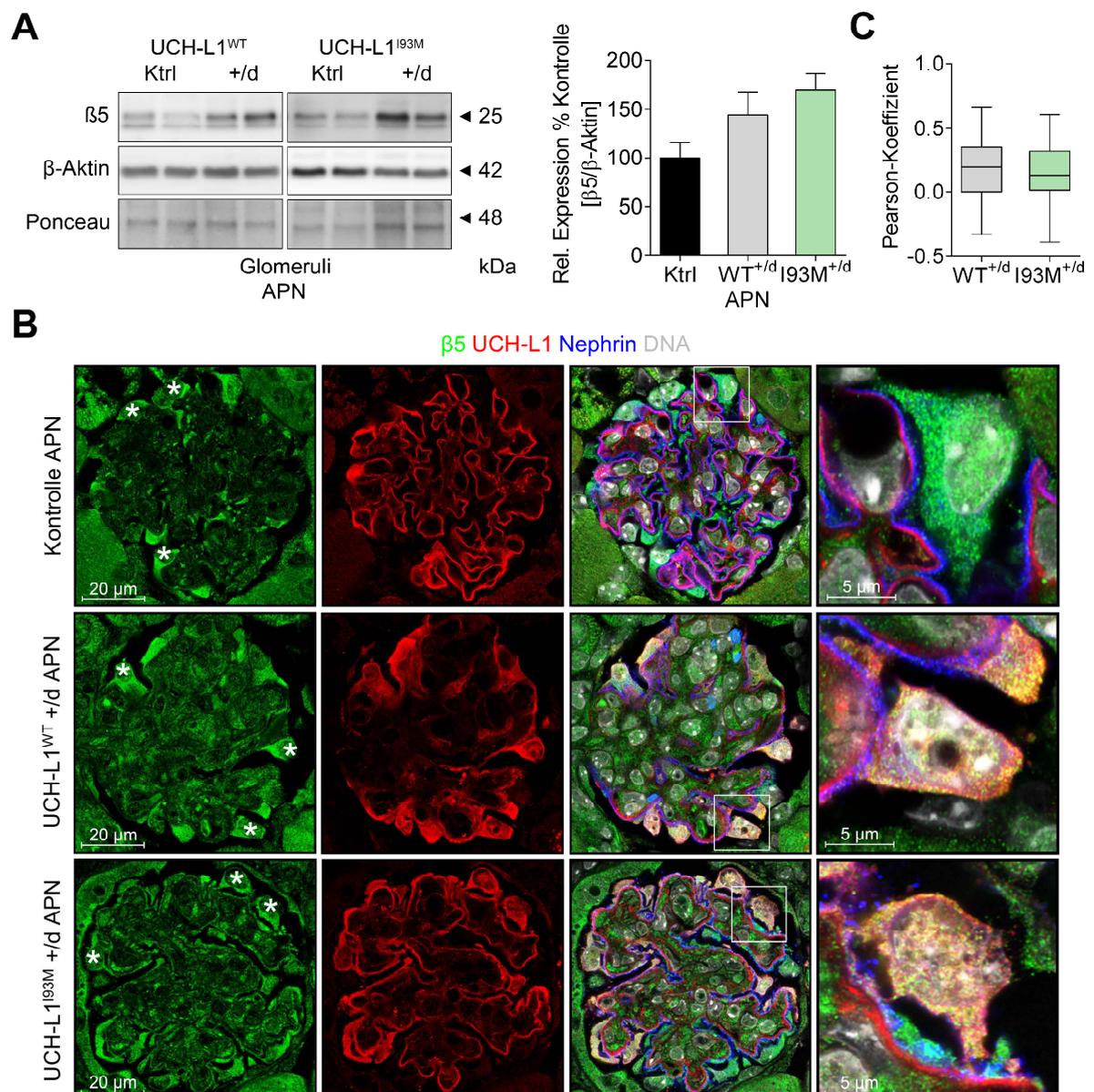


Abb. 3-15: Expressionsanalyse der hauptkatalytischen Untereinheit des Standardproteasoms im experimentellen Tiermodell der MN. Repräsentative Western Blot-Analysen und dazugehörige Densitometrien zeigen eine stark hochregulierte Expression der β5-Untereinheit sowohl in UCH-L1^{WT}- als auch UCH-L1^{193M}-Mäusen (**A**), die hauptsächlich im Podozyten, aber auch im Endothel und Mesangium lokalisiert ist (**B**, grüner Kanal): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephrin (blau) als Marker der Schlitzmembran, Zellkerne (grau), UCH-L1 (rot) zur Kennzeichnung überexprimierender Podozyten und β5 (grün) demonstrieren eine Ko-Lokalisation von UCH-L1 und β5 in Podozyten (weiße Sternchen markieren Podozyten). (**C**): Der Pearson-Koeffizient weist auf eine positive Korrelation hin, die sich aber nicht zwischen den beiden transgenen Linien unterscheidet. (β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle. n=3-8 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test).

Im Gegensatz zu den in naiven Tieren erzielten Ergebnissen, kommt es in der APN vor allem in UCH-L1^{WT}-Mäusen zu einer verstärkten Bereitstellung der mit dem Immunproteasom-assoziierten katalytischen Untereinheit LMP7 (Abb. 3-16 A). Dabei

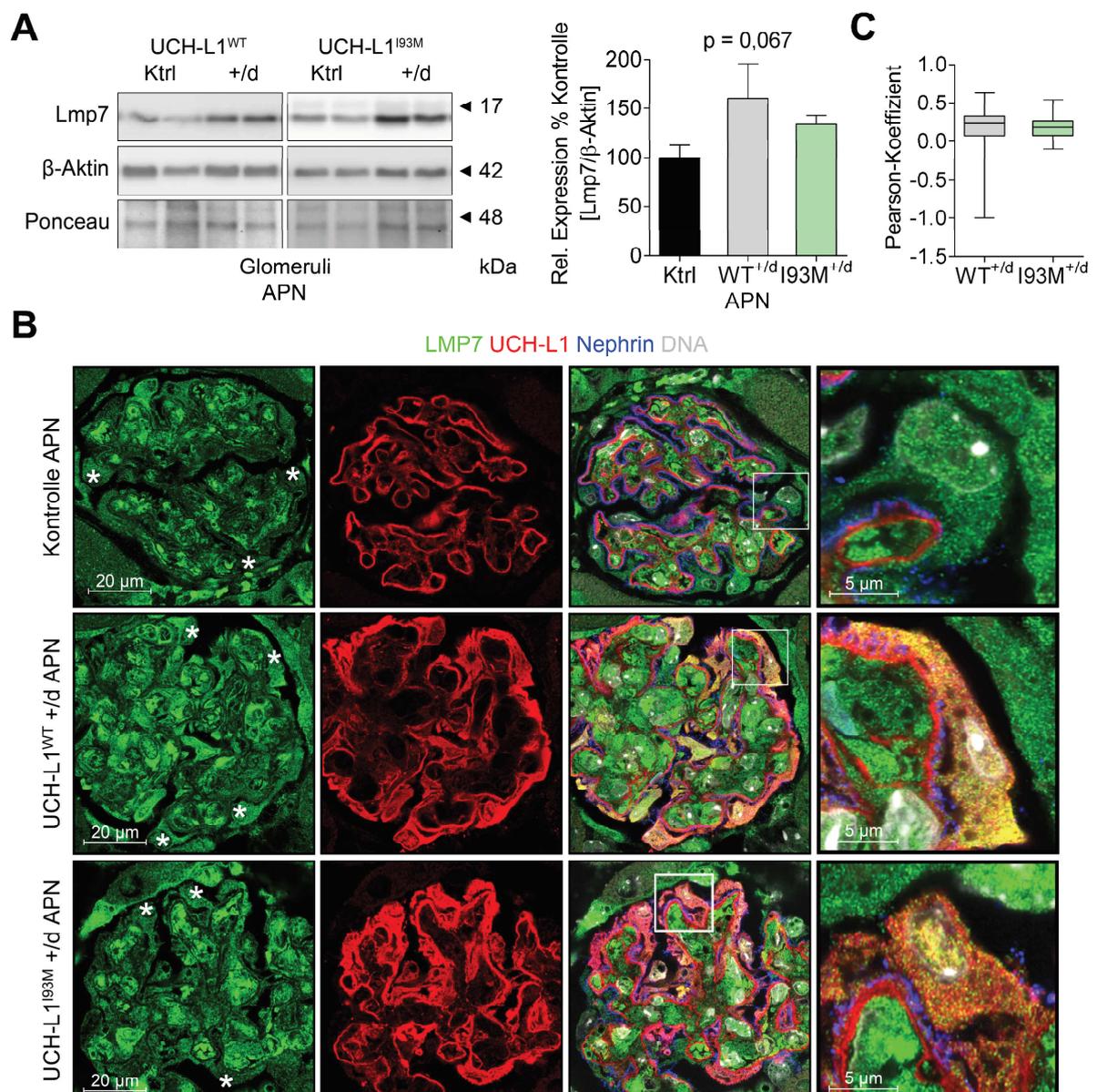


Abb. 3-16: Expressionsanalyse der hauptkatalytischen Untereinheit des Immunoproteasoms im experimentellen Tiermodell der MN. Repräsentative Western Blot-Analysen und dazugehörige Densitometrien zeigen eine stark hochregulierte Expression der LMP7-Untereinheit sowohl in UCH-L1^{WT}- als auch UCH-L1^{I93M}-Mäusen (**A**), die nicht nur im Podozyten, sondern auch besonders stark im Endothel und Mesangium lokalisiert ist (**B**, grüner Kanal): Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen Nephrin (blau) als Marker der Schlitzmembran, Zellkerne (grau), UCH-L1 (rot) zur Kennzeichnung überexprimierender Podozyten und LMP7 (grün) demonstrieren eine Ko-Lokalisation von UCH-L1 und LMP7 in Podozyten (weiße Sternchen markieren Podozyten). (**C**): Der Pearson-Koeffizient weist eine positive Korrelation auf, die sich aber nicht zwischen den beiden transgenen Linien unterscheidet. (β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle. n=3-8 pro Gruppe; SEM, Mann Whitney-U-Test).

handelt es sich um einen glomerulären Effekt, da ebenfalls stark positive LMP7-Signale in Endothel- und Mesangialzellen in der Immunfluoreszenz detektiert wurden (Abb. 3-16 B). Auch hier konnte in der Immunfluoreszenz eine Ko-Lokalisation von

UCH-L1 und LMP7 in beiden transgenen Mauslinien beobachtet werden. Die Auswertung mit Hilfe des Pearson-Koeffizienten ergab ebenfalls eine positive Korrelation beider Parameter, die in UCH-L1^{WT}- als auch UCH-L1^{I93M}-Mäusen vergleichbar war (Abb. 3-16 C).

Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass sowohl Standard- als auch Immunoproteasom-wirksame Untereinheiten in beiden transgenen Mauslinien in der APN glomerulär hochreguliert werden, wobei das in UCH-L1^{WT}-Mäusen vorwiegend LMP7 und in UCH-L1^{I93M}-überexprimierenden Tieren vor allem die β 5-Untereinheit ist. In beiden Linien konnte eine Ko-Lokalisation von UCH-L1 mit den jeweiligen katalytischen Untereinheiten gezeigt werden.

Insbesondere die konfokalen Analysen verdeutlichen, dass die Expression von sowohl Standard- als auch Immunoproteasom-relevanten Proteinen nicht podozyten-spezifisch ist, sondern auch in anderen glomerulären Zellen reguliert wird. Daher sollte die in Abbildung 3-14 H dargestellte proteasomale Aktivität kritisch bewertet werden.

3.3 Charakterisierung von UCH-L1-Autoantikörpern in der MN

Die ersten beiden Teile dieser Arbeit haben gezeigt, dass dysfunktionale UCH-L1 (I93M) sowohl in naiven als auch erkrankten Mäusen eine negative Auswirkung auf die Proteostase hat und im APN-Modell den Podozytenschaden begünstigt. Nachdem bereits Prunotto *et al.* das Vorhandensein von UCH-L1-Autoantikörpern gezeigt haben, wurde nun in einem translationalen Ansatz erstmals untersucht, ob Patienten mit einem nephrotischen Syndrom Autoantikörper gegen UCH-L1 bilden, die das dysfunktionale UCH-L1^{I93M}-Protein erkennen.

In diesem *in vitro*-Versuch wurden HEK293-T-Zellen mit huUCH-L1^{WT}-myc-FLAG- bzw. huUCH-L1^{I93M}-myc-FLAG-Konstrukten (in pCMV6) transient transfiziert. Da keine Informationen zum Antigenstatus der untersuchten Patienten vorlagen, wurden ebenfalls HEK293-T-Zellen generiert, die die huTHSD7A-Volllänge (in pCMV6) bzw. huPLA2R1-Volllänge (in pLPCX) transient exprimieren.

3.3.1 Validierung der Transfektionseffizienz

Die Überprüfung der Transfektionseffizienz ist elementar um zu zeigen, dass beide humanen UCH-L1-Konstrukte gleich stark von den HEK293-T-Zellen exprimiert werden und etwaige Bindungsunterschiede der Autoantikörper nicht auf eine variierende Expression zurückgeführt werden können. Dazu wurden im Western Blot je 10 µg HEK-Zelllysate gegen die Zielproteine sowie des jeweiligen fusionierten Tags untersucht. Abbildung 3-17 A zeigt in beiden UCH-L1-transfizierten HEK-Zelllinien sowohl gegen Flag als auch gegen UCH-L1 gleich starke positive Signale mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa. Neben dem getagten Protein wurde auch endogenes UCH-L1 auf einer Höhe von 25 kDa detektiert. In den THSD7A-exprimierenden HEK-Zellen konnte das Zielprotein sowie der Flag-Tag mit einem Molekulargewicht von ca. 250 kDa erfolgreich identifiziert werden (Abb. 3-17 B). Das mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag exprimierte PLA2R1-Protein zeigte ebenfalls positive Signale bei ca. 185 kDa (Abb. 3-17 C). Die Ergebnisse bestätigen, dass alle vier transient transfizierten HEK-Zelllinien für das nachfolgende Patienten-Screening geeignet sind.

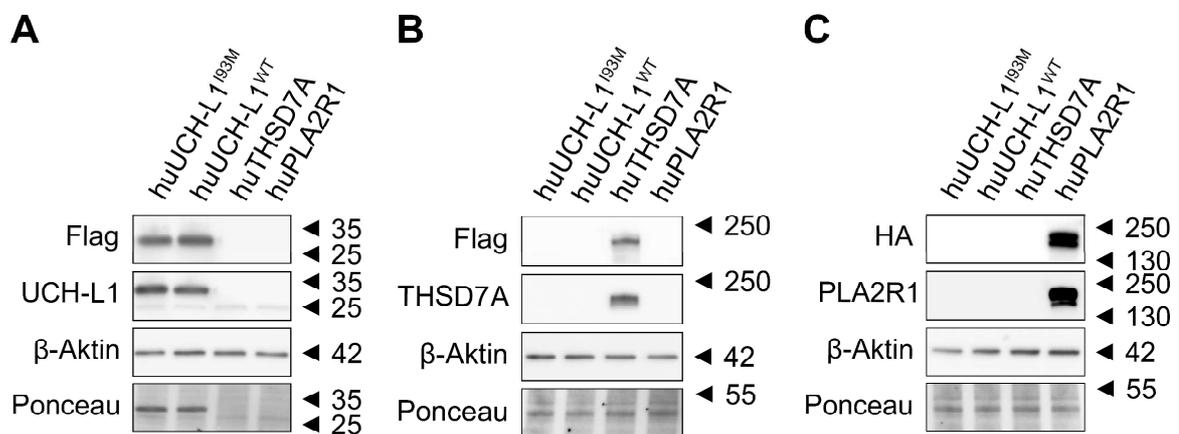


Abb. 3-17: Überprüfung der Effizienz transient transfizierter HEK293-T-Zellen. Repräsentative Western Blots gegen die Zielproteine und ihre jeweiligen fusionierten Tags zeigen eine gleich starke Expression beider humanen UCH-L1-Konstrukte bei ca. 32 kDa (**A**) sowie positive Signale in den Kontrolllysaten für huTHSD7A bei ca. 250 kDa (**B**) bzw. huPLA2R1 bei ca. 185 kDa (**C**). (β-Aktin und eine Ponceau-Färbung der Membran dienen als Ladekontrolle).

3.3.2 Identifizierung von UCH-L1-Autoantikörpern im Serum von MN- und MCD-Patienten mit höherer Bindungsaffinität zum dysfunktionalen I93M-Protein

Die für diese Untersuchungen notwendigen Patientenproben wurden vom Hamburger Glomerulonephritis Register zur Verfügung gestellt. Diese Institution sammelt Nierenbiopsien, Blutproben sowie genetische und klinische Daten von Patienten mit glomerulären Erkrankungen wie z.B. MN, Lupus Nephritis, Minimal Change Glomerulonephritis (MCD) oder Fokal Segmentaler Glomerulosklerose (FSGS). In einem doppel-verblindeten Ansatz wurden 30 Patientenserum auf das Vorhandensein von UCH-L1-Autoantikörpern gescreent. Als entsprechende Antigene dienen die von den HEK293-T-Zellen exprimierten Proteine huUCH-L1^{WT}, huUCH-L1^{I93M}, huTHSD7A und huPLA2R1. Dazu wurden Western Blot-Analysen mit je 10 µg HEK-Zelllysate gegen die einzelnen Patientenserum durchgeführt. Um die Auswertung zu erleichtern, wurde im Vorfeld ein Cut-off bezüglich der Blot-Entwicklungszeiten festgelegt, der positive von negativen Testergebnissen unterscheidet. Dies hat den Hintergrund, dass positive Seren, die sehr lange Entwicklungszeiten benötigen, auf einen schwachen UCH-L1-Titer hinweisen und somit nicht relevant sind. Für die statistische Auswertung wurden demnach nur Seren berücksichtigt, die positive UCH-L1-Signale bei bis zu 15 min Entwicklungszeit zeigen. Abbildung 3-18 A zeigt repräsentative Western Blots unter nicht-reduzierenden Bedingungen eines UCH-L1-positiven PLA2R1-positiven/THSD7A-negativen Serums (Patient A), UCH-L1-positiven doppel-negativen Serums (Patient B) sowie UCH-L1-negativen doppel-negativen Serums (Patient C). Von insgesamt 30 getesteten Patientenserum waren acht deutlich positiv für UCH-L1-Autoantikörper. Darunter befand sich kein THSD7A-positives Serum, 37 % wiesen eine Positivität für PLA2R1 auf und die restlichen 63 % waren weder PLA2R1- noch THSD7A-positiv (doppel-negativ) (Abb. 3-18 C).

Nach Korrelation der positiven UCH-L1-Banden mit den respektiven Flag-Banden der eingesetzten HEK-Zelllysate, wurden die verrechneten UCH-L1-Signale hinsichtlich ihrer Intensität densitometriert um Informationen bezüglich der Bindungsaffinität der Autoantikörper zu sammeln. Dabei erkennen die identifizierten UCH-L1-Autoantikörper bis auf eine Ausnahme das dysfunktionale UCH-L1-Protein (I93M) stärker als das aktive Enzym (WT) (Abb. 3-18 B). Um eine mögliche Korrelation mit klinischen Parametern herstellen zu können, erfolgte eine Entblindung der Seren durch Weitergabe von Informationen über die Art des nephrotischen Syndroms, den

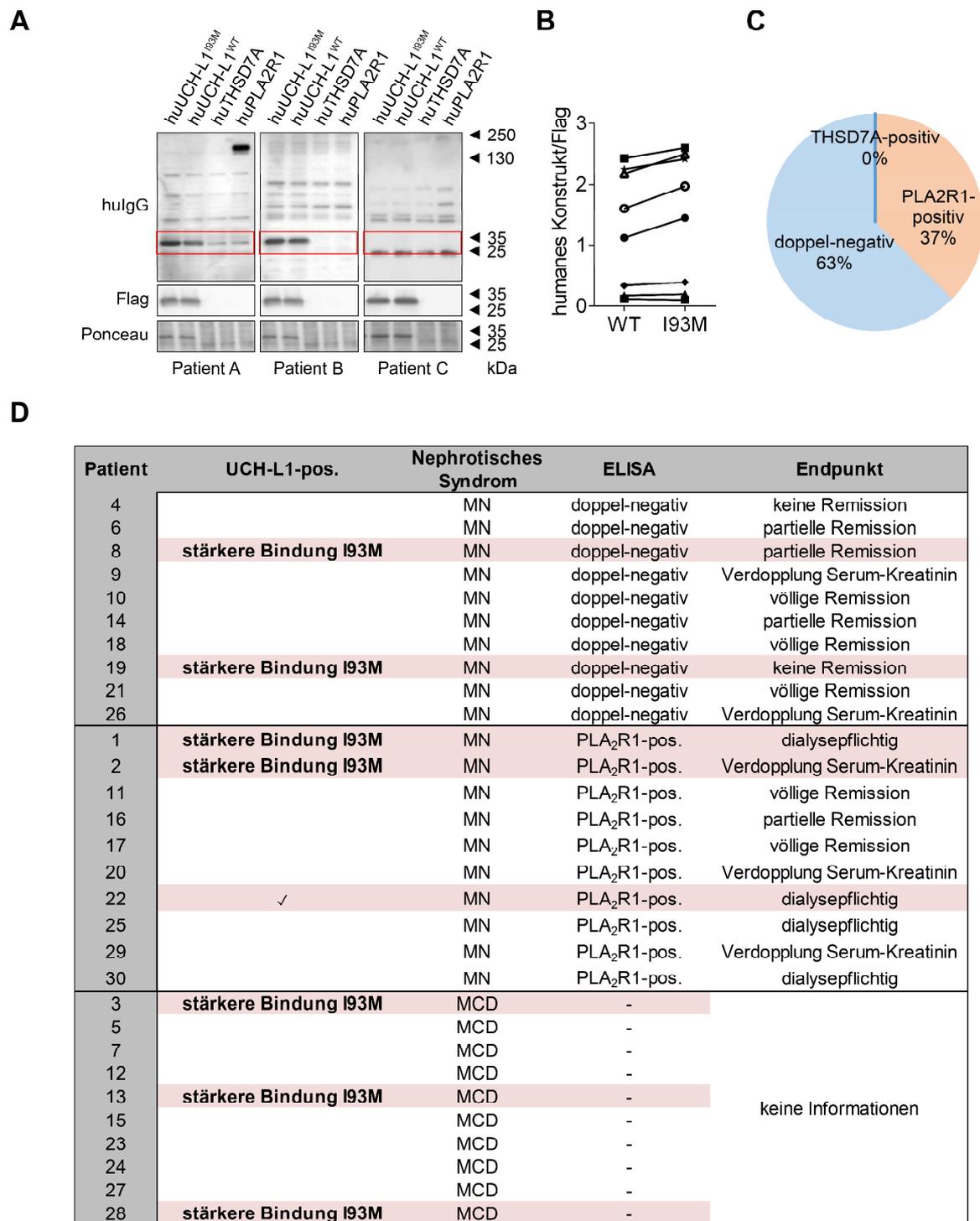


Abb. 3-18: Charakterisierung der Bindungsaffinität von UCH-L1-Autoantikörpern im nephrotischen Syndrom. (A): Repräsentative Western Blots unter nicht-reduzierenden Bedingungen gegen UCH-L1-pos. PLA₂R1-pos./THSD7A-neg. Serum (Patient A), UCH-L1-pos. doppel-neg. Serum (Patient B) sowie UCH-L1-neg. doppel-neg. Serum (Patient C). Eine Flag- und Ponceau-Färbung der Membran dienen als Expressionskontrolle (huIgG: humanes Immunglobulin). **(B):** Unter Berücksichtigung eines Cut-offs von 15 min Entwicklungszeit mit femto waren 8/30 Seren positiv für UCH-L1-Autoantikörper, die bis auf eine Ausnahme dysfunktionale UCH-L1^{I93M} mit einer höheren Affinität binden als das aktive UCH-L1^{WT}-Protein. **(C):** Antigenstatus der positiven UCH-L1-Seren. **(D):** Eine Entblindung der Seren zeigte, dass UCH-L1-Autoantikörper nicht spezifisch für die Membranöse Nephropathie (MN) sind, sondern auch bei Patienten mit Minimal Change Glomerulonephritis (MCD) auftreten und mit ähnlichen klinischen Verläufen (Endpunkt) assoziiert sind.

Antigenstatus und den klinischen Endpunkt (Abb. 3-18 D). Unter den zur Verfügung gestellten Seren befanden sich je 1/3 PLA₂R1-assoziierte und doppel-negative MN-Patienten sowie Patienten mit einer Minimal Change Glomerulonephritis (*minimal change disease*, MCD). Die UCH-L1-Autoantikörper-positiven Patienten (rosa hinterlegt) verteilen sich mit gleicher Häufigkeit auf alle drei Gruppen mit unterschiedlichsten Krankheitsverläufen, die in den Seren, die präferentiell I93M erkennen, tendenziell schlechter sind. Dabei ist zu berücksichtigen, dass von allen MCD-Patienten noch kein Langzeitverlauf (Endpunkt) vorliegt.

Um zu überprüfen, ob das Auftreten von UCH-L1-Autoantikörpern spezifisch für die in Abb. 3-18 D aufgeführten nephrotischen Syndrome ist, wurden 20 putative Kontrollseren von freiwilligen Spendern untersucht. Dabei liegen keine Informationen über mögliche Erkrankungen der Spender vor. Abbildung 3-19 A zeigt repräsentative Western Blots unter nicht-reduzierenden Bedingungen eines UCH-L1-positiven doppel-negativen Serums (Kontrolle A) sowie UCH-L1-negativen doppel-negativen Serums (Kontrolle B). Unter Berücksichtigung desselben Cut-offs wurden insgesamt vier Seren identifiziert, die positiv für UCH-L1-Autoantikörper sind. Eine Densitometrie der UCH-L1-Signalstärke war aus qualitativen Gründen nur für drei Seren möglich und zeigt eine entgegengesetzte Tendenz bezüglich der Bindungsaffinität (Abb. 3-19 B).

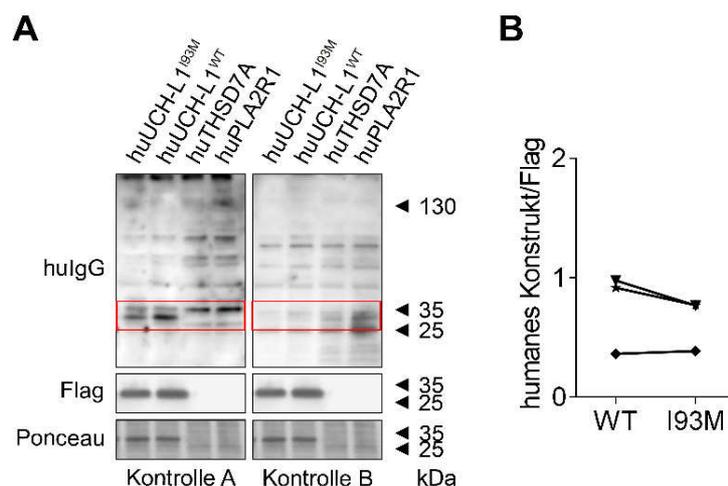


Abb. 3-19: Charakterisierung von UCH-L1-Autoantikörpern in Kontroll-Probanden. (A): Repräsentative Western Blots gegen UCH-L1-pos. doppel-neg. Serum (Kontrolle A) sowie UCH-L1-neg. doppel-neg. Serum (Kontrolle B). Eine Flag- und Ponceau-Färbung der Membran dienen als Expressionskontrolle (huIgG: humanes Immunglobulin). (B): Unter Berücksichtigung eines Cut-offs von 15 min Entwicklungszeit mit femto waren 4/20 Seren positiv für UCH-L1-Autoantikörper, die bis auf eine Ausnahme eine höhere Bindungsaffinität zum aktiven UCH-L1-Protein (WT) zeigen.

In dieser Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass UCH-L1-Autoantikörper in der Membranösen Nephropathie präsent sind, die darüber hinaus eine höhere Bindungsaffinität zum dysfunktionalen Protein (I93M) besitzen. Die im Serum von vermeintlich gesunden Kontrollen identifizierten UCH-L1-Autoantikörper weisen eine stärkere Bindung zum aktiven UCH-L1-Protein (WT) auf. Dennoch müssen die in der Kontrollgruppe erzielten Erkenntnisse auf Grund fehlender Krankenakten kritisch betrachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Die *toxic gain of function*-Hypothese

Glomeruläre Erkrankungen sind die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz. Trotz großer Fortschritte in der nephrologischen Forschung ist die Pathogenese für die Mehrzahl dieser Erkrankungen nicht ausreichend bekannt. Die Membranöse Nephropathie (MN) ist dabei ein Beispiel für eine sehr individuelle Erkrankung, deren klinischer Verlauf oft nur schwer vorhersehbar ist. Zielzelle der Autoimmunität in der MN sind Podozyten, denen für die funktionelle Integrität der Filtrationsbarriere eine zentrale Rolle zugewiesen wird. Es wird angenommen, dass für die Entstehung eines Podozytenschadens in der MN eine Autoantikörperbindung-induzierte Komplementaktivierung ursächlich ist (Kerjaschki *et al.*, 1989). Das Verständnis der MN zugrunde liegenden Pathomechanismen ist daher essenziell zur adäquaten klinischen Entscheidung, ob ein Patient ausreichend mit einer supportiven Therapie behandelt wird oder eine immunsuppressive Therapie benötigt. Weiterhin ist ein besseres Verständnis ausschlaggebend für die Entwicklung neuer kurativer Therapien. In der MN kommt es auf Grund immunologisch vermittelter Effekte sowie genetischer Dispositionen in glomerulären Proteinen zu einer Schädigung des Filters. Anders als andere glomeruläre Zellkomponenten, wie Mesangial- und Endothelzellen, können Podozyten ähnlich wie Neuronen als terminal ausdifferenzierte Zellen nicht mit Proliferation, sondern nur mit Hypertrophie auf Schädigungen reagieren (Marshall und Shankland, 2006; Meyer-Schwesinger *et al.*, 2009). Im Tiermodell der Passiven Heymann-Nephritis (PHN) konnte gezeigt werden, dass der Einbau des Membranangriffkomplexes C5b-9 in die podozytäre Membran mit einer Hochregulation der NADPH-Oxidase verbunden ist, die große Mengen freier Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) freisetzt (Neale *et al.*, 1993 und 1994). Diese hochreaktiven Moleküle schädigen zum einen im subepithelialen Raum Matrixkomponenten der glomerulären Basalmembran (GBM) (Neale *et al.*, 1993) aber auch intrazelluläre Proteine. Um einer Aggregation oxidativ-geschädigter Proteine entgegenzuwirken, induzieren sowohl Komplement als auch hohe ROS-Level den Abbau dieser Proteine über das Ubiquitin Proteasomale System (UPS) (Shringarpure *et al.*, 2001; Cybulsky, 2013). Beeken *et al.* konnten 2014 zeigen, dass es in verschiedenen nephrotischen Erkrankungen wie der Fokalen Segmentalen

Glomerulosklerose (FSGS), Diabetischen Nephropathie (DN) sowie der MN, aber nicht in der Minimal Change Glomerulonephritis (*minimal change disease*, MCD), zu einer Hochregulation des UPS kommt. Dennoch wurde in Nierengewebeschnitten von FSGS- und MN-Patienten eine massive Akkumulation und Aggregation polyubiquitiniertes Proteine vorwiegend im Podozyten beobachtet (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011). In dieser Studie wurde im PHN-Modell ebenfalls gezeigt, dass Ratten, die mit dem reversiblen 26S-Proteasom-Inhibitor MG-132 behandelt wurden, den gleichen akkumulativen Phänotyp wie in der MN und eine signifikant ausgeprägte Proteinurie zeigen. Trotz kompensatorischer Hochregulation des UPS liegt eine Störung des Proteinabbaus durch einen unbekanntem Mechanismus vor. Mit der Identifizierung des neuronalen deubiquitinierenden Enzyms Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1) in der Niere wurde ein möglicher Modulator der proteasomalen Aktivität entdeckt. Unter den in Beeken *et al.* gezeigten hochregulierten UPS-Komponenten befand sich auch UCH-L1. Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte UCH-L1 in der gesunden humanen und Ratten-Niere in tubulären Epithelzellen, Zellen des Sammelrohrs und Parietalzellen der Bowmanschen Kapsel, aber nicht in Podozyten lokalisiert werden (Shirato *et al.*, 2000; Diomed-Camassei *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde eine starke nukleäre und zytoplasmatische *de novo*-Expression von UCH-L1 besonders in den sekundären Fußfortsätzen geschädigter Podozyten in insgesamt 15 glomerulären Erkrankungen, unter anderem in der MN, beobachtet, die mit der Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen korrelierte (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2009). Hemmversuche der UCH-L1-Hydrolaseaktivität mit LDN57444 im Rattenmodell der MN resultierten in einer Reduktion des Polyubiquitin-Gehalts und weisen auf einen direkten inhibitorischen Effekt der UCH-L1-Aktivität auf das Proteasom hin (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011). Diese beobachtete negative Regulation des Proteinhaushaltes erinnert an neurodegenerative Erkrankungen, die sich durch Anhäufungen toxischer Proteinaggregate auszeichnen und den proteinabbauenden Apparat bis zum Kollabieren herausfordern. Tatsächlich wird UCH-L1 vor allem in neuronalem Gewebe im zentralen und peripheren Nervensystem sowie sensorischen und motorischen Neuronen exprimiert und ist vorwiegend zytoplasmatisch assoziiert (Wilson *et al.*, 1988; Day und Thompson, 2010). Dort reguliert UCH-L1 wahrscheinlich durch Bindung von Monoubiquitin und durch Spaltung von Ubiquitin-Vorläuferproteinen sowie ubiquitinierten Peptidresten, den zytosolischen Monoubiquitinpool und ist für die

Aufrechterhaltung der axonalen Funktion und Morphologie unverzichtbar (Saigoh *et al.*, 1999; Walters *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Sowohl genetisch determinierte als auch erworbene Fehlfunktionen von UCH-L1 sind mit den beiden häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen Parkinson (*Parkinson's disease*, PD) und Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD) assoziiert. Proteomanalysen haben gezeigt, dass UCH-L1 eines der am stärksten oxidativ-modifizierten Proteine im Hirn erkrankter AD- und PD-Patienten ist (Choi *et al.*, 2004). Durch Oxidation von Cystein (Cys¹⁵² und Cys²²⁰)- und Methionin (Met¹, Met⁶, Met¹², Met¹²⁴ und Met¹⁷⁹)-Resten sowie der Einführung von Carbonylgruppen in die funktionellen Gruppen von Prolin, Arginin, Lysin und Threonin kommt es zu einer Veränderung der Proteinstabilität (Castegna *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004; Butterfield *et al.*, 2006). Dies resultiert in einer Umverteilung der Helix-Faltblattstruktur, sodass der dicht gepackte hydrophobe Kern freigelegt und die Löslichkeit des Proteins herabgesetzt wird (Koharudin *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2011; Jenner, 2003; Setsuie und Wada, 2007). Oxidationsmittel wie Cyclopentenon-Prostaglandine (CyPGs) und 4-Hydroxynonenal (4-HNE) bewirken einen Verlust der UCH-L1-Sekundärstruktur und resultiert in aberranten Interaktionen mit anderen Proteinen (Kabuta *et al.*, 2008a). Das typische Bild neurodegenerativer Erkrankungen ist eine gestörte proteasomale Aktivität, gefolgt von der Bildung unlöslicher Proteinablagerungen wie neurofibrillären Tangles (aggregiertes Tau-Protein in AD) sowie Lewy-Körperchen (ausgefallenes α -Synuclein und Ubiquitin in PD) unter anderem infolge einer Fehlregulation von UCH-L1 (Liu *et al.*, 2002; Nussbaum, 2003; Gong *et al.*, 2006). 1998 konnten Leroy *et al.* zeigen, dass es neben der vorrangig sporadisch auftretenden PD auch eine genetisch determinierte Form gibt. Bei zwei an PD erkrankten Geschwistern einer deutschen Familie, in der ein verstärktes Auftreten von PD beobachtet wurde, wurde eine Punktmutation im vierten Exon des UCH-L1-Gens festgestellt, bei der es an Position 93 zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Methionin kam (Ile93Met bzw. I93M). Eine tierexperimentelle Studie demonstrierte, dass UCH-L1-defiziente Mäuse im Gegensatz zu UCH-L1^{I93M}-exprimierenden Mäusen, keine dopaminergen Neuronen verlieren. Dennoch wurde von Kabuta *et al.* (2008a) hypothetisiert, dass weder eine UCH-L1-Defizienz noch die in UCH-L1^{I93M}-Mäusen beobachtete reduzierte Hydrolaseaktivität ursächlich für die Parkinson-Erkrankung sind (Saigoh *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2003; Setsuie *et al.*, 2007). Da die Mehrzahl der PD-Erkrankungen sporadisch auftreten, vermuteten die Autoren einen durch oxidativen Stress

ausgelösten *toxic gain of function*-ähnlichen Shift des UCH-L1-Wildtypproteins, das in seinen Eigenschaften dem UCH-L1^{I93M}-Protein ähnelt. Auf Grund ihrer Nähe zum aktiven Zentrum und hydrophoben Kern bewirkt die I93M-Mutation eine Konformationsänderung durch den Verlust von α -Helices und geht mit einer verminderten Löslichkeit und reduzierten Hydrolaseaktivität des Proteins einher (Nishikawa *et al.*, 2003; Kabuta *et al.*, 2008a; Andersson *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass UCH-L1^{I93M} aberrante Interaktionen mit zahlreichen Proteinen, wie z.B. Tubulin eingeht und sowohl strukturell als auch funktionell dem oxidativ-modifizierten UCH-L1-Protein sehr ähnlich ist (Kabuta *et al.*, 2008a).

Viele Studien demonstrieren, dass Podozyten und Neuronen in wesentlichen zellulären Mechanismen wie Wachstum und Entwicklung übereinstimmen. Für podozytenspezifische Proteine wie Nephrin, Nephrin1, Synaptopodin und Podocin sind äquivalente neuronale Splicevarianten beschrieben, die spezifisch in den dendritischen Synapsen und nicht im Axon lokalisiert sind (Kobayashi *et al.*, 2004). Ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Differenzierung sowie Aufrechterhaltung der synaptischen Funktion zugeschrieben und Fehlregulationen sind mit neuronalen Schäden assoziiert (Saigoh *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2006; Sakurai *et al.*, 2006). Darüber hinaus weisen beide Zelltypen stark verzweigte Fußfortsätze auf, deren Integrität über ähnliche Mikrotubuli-assoziierte Proteine sowie zytoskelettale Transportmechanismen gesteuert wird (Sun *et al.*, 2014). Weitere Studien bestätigten, dass neuronenspezifische Proteine wie NSE (*Neuron-specific enolase*), Nestin, NeuN (*Neuron-specific nuclear protein*), S100 sowie UCH-L1 ebenfalls in der Niere und speziell im Podozyten exprimiert werden (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014).

Auf Grund der strukturellen und funktionellen Übereinstimmungen zwischen Podozyten und Neuronen sowie phänotypischen und biochemischen Ähnlichkeiten zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und der Membranösen Nephropathie, wurde die *toxic gain of function*-Hypothese des UCH-L1-Wildtypproteins zur Klärung der Proteinakkumulationen und proteasomalen Beeinträchtigung im Podozyten in der MN herangezogen. Um die biochemischen Funktionen von aktiver (WT) und dysfunktionaler (I93M) UCH-L1 in physiologischem Milieu zu untersuchen, erfolgte zunächst eine Grundcharakterisierung in unbehandelten UCH-L1-überexprimierenden

Linien um anschließend mögliche Regulationsmechanismen im experimentellen Tiermodell der MN zu analysieren.

4.2 UCH-L1 - mehr als nur ein Modulator der proteasomalen Aktivität

Dabei konnte bereits im naiven Tier gezeigt werden, dass nur UCH-L1^{I93M} den in der MN beobachteten akkumulativen Phänotyp im Podozyten hervorruft. Diese Ansammlung polyubiquitinerter Proteine korreliert mit einer deutlich beeinträchtigten proteasomalen Aktivität (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011). Erstaunlicherweise konnten keine Unterschiede im Gehalt K48-polyubiquitinerter Proteine festgestellt werden. Es wurde erwartet, dass die in den UCH-L1^{I93M}-Mäusen beobachtete proteasomale Defizienz wie in Radon *et al.* zu einer Akkumulation von Proteinen führt, die auf Grund der K48-spezifischen Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau vorhergesehen sind. Neue Studien konnten mittels quantitativer Proteomanalysen zeigen, dass die Ubiquitinierung eines Lysin 48-Restes kein Alleinstellungsmerkmal für den proteasomalen Abbau ist und ubiquitinierte K6, K11, K27, K29, K33 und auch in geringem Maße K63 weitere signalgebende Verknüpfungen sind. Darüber hinaus spielt die Art der Verzweigung (linear, einzeln- oder mehrfach-verzweigt, Mono- oder Multiubiquitinierung) nur eine untergeordnete Rolle (Xu *et al.*, 2009; Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2013; Ciechanover und Stanhill, 2014; Liu *et al.*, 2016). Da der verwendete Polyubiquitin-Antikörper alle ubiquitinierten Proteine unabhängig von der Spezifität des Lysin-Restes erkennt, repräsentiert der dargestellte Polyubiquitin-Gehalt zu einem gewissen Teil auch jene Proteine, die für die Degradation über das Proteasom bestimmt sind. Die Überexpression des aktiven UCH-L1-Proteins (WT) wirkt sich hingegen positiver auf die Proteostase im Podozyten aus. Dabei werden polyubiquitinierte Proteine auf Grund einer intakten proteasomalen Aktivität kontinuierlich abgebaut und zytoplasmatisches Monoubiquitin stabilisiert (Osaka *et al.*, 2003). Interessanterweise blieb die erwartete Reduktion des Monoubiquitin-Gehalts in den UCH-L1^{I93M}-überexprimierenden Tieren aus. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits in isolierten Glomeruli aus Mäusen mit einem podozytenspezifischen UCH-L1-*Knock-out* gezeigt (Radon *et al.*, 2018). In einem anderen Modell der MN führte die Hemmung der UCH-L1-Aktivität mit LDN57444 hingegen zu einer deutlichen Reduktion von monomerem Ubiquitin (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011). Auch in Neuronen ist der Gehalt an freiem Monoubiquitin in UCH-L1-defizienten Mäusen, wie

der *gad*-Maus oder *nm3419*-Maus, um bis zu 30 % reduziert (Saigoh *et al.*, 1999; Walters *et al.*, 2008). Diese Unterschiede weisen daher weniger auf einen gewebsspezifischen Effekt von UCH-L1 sondern eher auf eine Kompensation durch andere deubiquitinierende Enzyme hin.

Die bisherigen Studien zeigen deutlich, dass UCH-L1 ein kritischer Effektor der proteasomalen Aktivität ist. Im Gegensatz zur Ubiquitin C-terminalen Hydrolase-L5 (UCH-L5), die über das Adhäsionsmolekül Adrm1 (*adhesion regulating molecule 1*) mit dem 26S- und 19S-Komplex ko-immunopräzipitiert wurde, konnte für UCH-L1 bis dato keine Interaktion mit dem Proteasom nachgewiesen werden (Yao *et al.*, 2006). Die *in vitro*-Versuche zeigen nun, dass sowohl aktive (WT) als auch dysfunktionale (I93M) UCH-L1 mit dem katalytisch wirksamen 20S-Komplex interagieren, aber nur UCH-L1^{I93M} dessen Aktivität über einen unbekanntem Mechanismus negativ moduliert. Demnach scheint das aktive UCH-L1-Protein, ebenso wie UCH-L5 in Neuronen, ein positiver Regulator der Substratdegradation durch das Proteasom zu sein (Tai *et al.*, 2010). Diese Erkenntnisse spiegeln sich auch in den Ergebnissen wider, die in der experimentellen Anti-Podozyten-Nephritis (APN) erzielt wurden. Nur die Überexpression des dysfunktionalen Proteins zieht eine glomeruläre Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen nach sich, die vor allem stark podozytär ist und wie in Meyer-Schwesinger *et al.*, 2011 dichte und größere Aggregate bildet. In Hirnen von PD-Erkrankten wurde gezeigt, dass solche abgelagerten Einschlusskörperchen neben ungefalteten Proteinen und α -Synuclein auch Ubiquitin beherbergen (Ross und Poirier, 2004). Die Ablagerung polyubiquitinerter Proteine wird in der MN zudem von erhöhten ROS-Leveln begünstigt. Immunfluoreszenzfärbungen von PLA₂R1-positiven MN-Patienten konnten zeigen, dass die Expression der Superoxid Dismutase 2 (SOD2) als Sensor für oxidativen Stress korrelativ mit der UCH-L1-Expression ansteigt. Dabei beeinflussen die gebildeten Sauerstoffradikale die proteasomalen Komponenten unterschiedlich stark. Es wurde gezeigt, dass der ATP- und Ubiquitin-abhängige Weg über das 26S-Proteasom wesentlich sensitiver auf ROS reagiert als die 20S katalytische Untereinheit (Reinheckel *et al.*, 1998 und 2000). Zusätzlich erfolgt eine direkte Hemmung der Ubiquitin-aktivierenden, -konjugierenden und -ligierenden Komponenten E1, E2 und E3. Für die Aktivität dieser Enzyme sind Cystein-Reste im aktiven Zentrum maßgeblich. Die Oxidation von Thiol-Gruppen durch ROS führen zur Inaktivierung der Enzyme, sodass das Substrat nicht ubiquitiniert und der 19S-

Untereinheit des 26S-Standardproteasoms zugeführt werden kann (Shang und Taylor, 1995; Shang *et al.*, 1997; Jahngen-Hodge *et al.*, 1997). Daher wird angenommen, dass oxidativ-geschädigte Proteine ATP- und Ubiquitin-unabhängig durch das 20S-Proteasom abgebaut werden (Shringarpure *et al.*, 2001). Da UCH-L1^{I93M} *in vitro* mit dem 20S-Proteasom wechselwirkt und die proteolytische Effizienz herabsetzt, könnte auch dieser Abbauweg gestört sein und zur Aggregation von oxidativ-geschädigten Proteinen führen. Immunfluoreszenzfärbungen gegen die proteolytischen Untereinheiten $\beta 5$ und LMP7 haben gezeigt, dass UCH-L1 mit beiden Proteinen koloalisiert, eine Interaktion ist bisher aber noch nicht beschrieben. Interessanterweise zeigen UCH-L1^{I93M}-überexprimierende Mäuse in der APN aber eine tendenziell erhöhte proteasomale Aktivität. Bei der Auswertung der APN-Ergebnisse ist generell zu berücksichtigen, dass sich der Podozytenschaden auch auf umliegendes Gewebe wie Endothel und Mesangium auswirkt. Um die Integrität der Filterbarriere aufrechtzuerhalten, stehen besonders diese Zellverbände multidirektional miteinander in Verbindung (Schlöndorff und Banas, 2009). Da für die Versuche Glomeruli-Gesamtlysate eingesetzt wurden, sind die in der APN beobachteten Effekte nicht ausschließlich podozytenspezifisch. Von daher wurde wenn möglich immer eine verifizierende Immunfluoreszenz mitgeführt. Beide UCH-L1-überexprimierende Linien zeigen im Western Blot eine starke Hochregulation der katalytisch aktiven Untereinheiten des Standard ($\beta 5$)- und Immunoproteasoms (LMP7), die in der Immunfluoreszenz gegen LMP7 aber noch stärker in Endothel- und Mesangialzellen beobachtet wurde. Das ist nicht verwunderlich, da die proteolytischen Aktivitäten in den glomerulären Zellen entsprechend der zellulären Anforderungen sehr unterschiedlich verteilt sind. So wurden in den Endothel- und Parietalzellen der Bowmanschen Kapsel eine verstärkte Expression des Immunoproteasoms detektiert, während Podozyten den höchsten Gehalt an Standardproteasom zeigen (Meyer-Schwesinger, 2019). Daher weisen beide UCH-L1-Proteine in den Podozyten naiver Mäuse auch nur Unterschiede in der $\beta 5$ -Expression aber nicht im LMP7-Gehalt auf. Die in der APN beobachtete starke Hochregulation des Immunoproteasoms in den Podozyten UCH-L1-überexprimierender Mäuse resultiert aus einer Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine wie Interferon-Alpha (IFN- α), Interferon-Beta (IFN- β), Interferon-Gamma (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor (TNF), die während einer Erkrankung oder Entzündung synthetisiert werden (Driscoll *et al.*, 1993; Aki *et al.*, 1994). Da das zur Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität verwendete Substrat

sowohl vom Standard- als auch Immunproteasom umgesetzt wird, sind die ermittelten Aktivitäten auf Grund der vielfältigen Expressionsmuster der katalytischen Untereinheiten nicht podozytenspezifisch.

Unter den polyubiquitinierten Aggregaten befinden sich nicht nur Proteine, die wegen ihrer spezifischen Ubiquitinierung oder Halbwertszeit ausschließlich Proteasom-spezifische Substrate sind. Auf Grund der Struktur des Proteasoms können nur ungefaltete Proteine die Öffnung des Multiproteinkomplexes passieren. Demnach existieren für lang-lebige Proteine sowie Organellen zusätzliche Abbaumechanismen wie das lysosomale/autophagosomale System. Es wurde gezeigt, dass ein genetisch bedingter Verlust der proteasomalen Aktivität in *Drosophila* durch gesteigerte Autophagie ausgeglichen werden kann (Pandey *et al.*, 2007). Diese Hochregulation der Autophagie-Funktion bei proteasomaler Beeinträchtigung weist auf einen kompensatorischen Mechanismus hin (Korolchuk *et al.*, 2010). Interessanterweise zeigten naive UCH-L1^{I93M}-überexprimierende Mäuse mit einer proteasomalen Defizienz keine Regulation in der Expression relevanter Autophagie-Marker wie Beclin-1 (*Atg6*) oder LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*). Demgegenüber werden aber lysosomale Proteine wie Limp2 (*lysosomal integral membrane protein-2*) und Lamp2 (*lysosome-associated membrane protein 2*) verstärkt exprimiert. Limp2 ist ein Transmembranrezeptor in Lysosomen und späten Endosomen und vermittelt den Transport von Stoffwechsellzymen in das Lysosom. Fehlfunktionen von Limp2 begünstigen die Akkumulation von fehlgefaltetem α -Synuclein im Gehirn, da dieses durch Fettablagerungen im Lysosom nicht degradiert werden kann (Rothaug *et al.*, 2014). Beeken *et al.* konnten eine kompensatorische Hochregulation des lysosomalen/autophagosomalen Systems in der APN beobachten, indem die Limp2-Expression mit zunehmender Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität im Podozyten hochreguliert wurde. *In vivo*-Studien haben gezeigt, dass UCH-L1 die Funktion eines weiteren lysosomalen Proteins beeinflusst. Es wurde nachgewiesen, dass UCH-L1 mit Lamp2 sowie mit den Chaperonen Hsp90 (*heat shock protein 90*) und Hsc70 (*heat shock cognate protein 70*) interagiert (Kabuta *et al.*, 2008b). Diese bilden einen essenziellen Rezeptorkomplex in der Chaperon-vermittelten Autophagie (*chaperone-mediated autophagy*, CMA), der den lysosomalen Abbau von größtenteils un- oder fehlgefalteten Proteinen induziert, um eine toxische Aggregation zu vermeiden (Agarraberes *et al.*, 2001). Über diesen Abbauweg erfolgt

ebenfalls die Degradation von α -Synuclein im Gehirn (Cuervo *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnten Kabuta *et al.* (2008b) *in vitro* zeigen, dass das dysfunktionale UCH-L1^{I93M}-Protein über den hydrophoben Kern eine wesentlich stärkere Bindung mit Lamp2, Hsp90 sowie Hsc70 eingeht als UCH-L1^{WT} und dass diese aberrante Interaktion zu einer Hemmung des CMA-Weges und nachweislich zur Akkumulation von α -Synuclein führt. Das lässt vermuten, dass UCH-L1^{I93M} im Podozyten, neben der proteasomalen Effizienz auch lysosomale Aktivitäten beeinträchtigt, sodass die Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen begünstigt wird. Weitere Untersuchungen zur lysosomalen Aktivität sind dafür notwendig. Die verstärkte Expression von Lamp2 in UCH-L1^{I93M} lässt demnach ebenfalls eine kompensatorische Regulation vermuten. UCH-L1^{WT}-überexprimierende Tiere weisen hingegen auf eine verstärkte Bildung von Autophagosomen hin. Dabei wird zytosolisches LC3-I lipidiert und das entstandene aktivierte LC3-II zu den wachsenden Autophagovesikeln rekrutiert, wo es dauerhaft in die Membran eingebaut wird (Tanida und Waguri, 2010). LC3 dient jedoch nur als Marker für das Vorhandensein von Autophagosomen und ist nicht repräsentativ für die Aktivität der Autophagie (Klionsky *et al.*, 2008). Da Beclin-1 als wichtiger Induktor der Autophagie nicht reguliert ist, scheint keine erhöhte Nachfrage im Podozyten zu bestehen. Demnach ist es ebenfalls möglich, dass Autophagosomen zwar hergestellt aber auf Grund der intakten proteasomalen Aktivität nicht genutzt werden oder eine Unterbrechung der Fusion mit Lysosomen besteht, was zu einem erniedrigten autophagosomalen Flux und damit einem erhöhten Gehalt an LC3-II führt.

4.3 Dysfunktionale UCH-L1^{I93M} als Mediator des Podozytenschadens

Da es sich bei der Membranösen Nephropathie um eine Erkrankung handelt, die mit einem hohen Verlust von Proteinen über den Urin verbunden ist, ist es unabkömmlich, die Integrität des glomerulären Filters insbesondere der Schlitzmembran zu untersuchen. Hier sollte sowohl im naiven Tier als auch im Erkrankungsmodell die Überexpression des jeweiligen UCH-L1-Proteins auf die Homöostase und Struktur von podozytenspezifischen Proteinen analysiert werden.

Interessanterweise zeigten die UCH-L1^{I93M}-Mäuse weder morphologische Veränderungen noch Unterschiede in der Expression podozytenspezifischer Proteine. Die Überexpression des aktiven UCH-L1^{WT}-Proteins hingegen geht mit einer milden

Proteinurie einher. Diese ist zwar nicht mit einer krankhaften Proteinurie vergleichbar, weist aber auf eine leichte Störung der glomerulären Filtrationsbarriere hin und kann verschiedene Gründe haben. Zum einen zeigt das Coomassie-Gel für beide UCH-L1-Linien eine Durchlässigkeit von niedermolekularen Substanzen an, die jedoch in den UCH-L1^{WT}-Mäusen stärker ausgeprägt ist. Dies verweist auf eine mögliche Störung des proximalen Tubulus. Dieser Abschnitt des Nephrons ist verantwortlich für die Resorption von zum Beispiel Proteinen, Aminosäuren oder Glucose aus dem filtrierten Primärharn. Dies erfolgt entweder über Endozytose-Rezeptoren wie Megalin/Cubulin oder im Bürstensaum ansässige Peptidasen, die Proteine hydrolysieren und die Spaltprodukte anschließend apikal aufgenommen werden können (Nakhoul und Batuman, 2011). Eine niedermolekulare Proteinurie (*low molecular weight proteinuria*, LMWP) ist definiert als der Verlust von einem oder mehr niedermolekularen Proteinen wie β 2-Mikroglobulin (12 kDa), α 1-Mikroglobulin (30 kDa), Retinol-Bindeprotein (21 kDa) oder Urin-Protein 1 (20 kDa) (Peterson *et al.*, 1969; Bernard *et al.*, 1982 und 1989; Yu *et al.*, 1983; Norden *et al.*, 2000). Dennoch ist ein tubulärer Schaden als Ursache für die beobachtete Mikroalbuminurie und den Verlust niedermolekularer Proteine unwahrscheinlich. Als eine weitere mögliche Ursache der Proteinurie könnte die deutliche Reduktion des α -Aktinin-4-Gehalts betrachtet werden. Dieses Protein ist Teil des komplexen und dynamischen Zytoskeletts und vernetzt Aktinfilamente mit den Mikrotubuli in den Podozytenfußfortsätzen (Drenckhahn und Franke, 1988; Gordon *et al.*, 2000). Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass α -Aktinin-4 zwar an den Podozytenfußfortsätzen lokalisiert ist, aber insgesamt deutlich weniger exprimiert wird als in den Kontrollen und UCH-L1^{I93M}-Tieren. Darüber hinaus gehört α -Aktinin-4 zusammen mit weiteren Zellkontakten und Adhäsionsmolekülen zum Nephrin-Multiproteinkomplex (Lehtonen *et al.*, 2005). Der verminderte Gehalt an α -Aktinin-4 kann auf Grund dieser Interaktion weitreichende Auswirkungen auf das Nephrin-Signalling und auf die Zelladhäsion haben. Gegebenenfalls kann dieser Effekt auch den in der Immunfluoreszenz beobachteten hohen zytoplasmatischen Gehalt von Nephrin in diesen Tieren erklären. Es ist unklar, ob Nephrin im Zytoplasma akkumuliert weil es nicht an die basale Fußfortsatzmembran gebracht werden kann oder ob eine Internalisierung von Nephrin erfolgt. Ob tatsächlich weniger Schlitzmembran gebildet wird, können nur ultrastrukturelle Untersuchungen mittels STED (*Stimulated Emission Depletion*)- und Elektronenmikroskopie klären. Die transkriptionelle Hochregulation von Nephrin könnte eine mögliche Reaktion auf die milde Proteinurie sein um

ausreichend Schlitzmembran zur Verfügung zu stellen. Dies wird durch eine verstärkte Expression des *Wilms Tumor-1 (WT-1)*-Gens unterstützt, das für einen podozytenspezifischen Transkriptionsfaktor kodiert, der die Expression von Nephrin kontrolliert und unverzichtbar in ausdifferenzierten Podozyten ist. Demnach könnte das ein kompensatorischer Mechanismus sein, um einer möglichen Entdifferenzierung des Podozyten entgegenzuwirken, wie sie bei verstärkter UCH-L1-Expression beschrieben ist (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2008).

In der APN konnte hingegen eindrucksvoll gezeigt werden, dass nur dysfunktionale UCH-L1^{I93M} einen schweren Podozytenschaden induziert. Der Schaden ist vollkommen, wenn ein Podozyt seine Verankerung in der glomerulären Basalmembran löst und im Bowmanschen Kapselraum verloren geht (Kriz *et al.*, 1998). Der Podozytenverlust konnte in mehreren unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden. Die PAS-Färbung zeigte deutlich weniger aufliegende Kerne, geschwollene Podozyten sowie eine Vakuolisierung des Podozyten-Zytoplasmas, wie es auch in der MN beschrieben wird (Toth und Takebayashi, 1992). Ursächlich dafür ist, dass Podozyten, deren benachbarte Zellen sich abgelöst haben, versuchen, lokal filtrierte Proteine aus der Umgebung zusätzlich aufzunehmen. Dies führt zu einer Überladung des lysosomalen Systems und anschließender Entleerung der Vesikel in das Zytoplasma (Shirato *et al.*, 1996). Die durchgeführte p57-Zählung bestätigt den Verlust von Podozyten in UCH-L1^{I93M}-Mäusen, der sich ebenfalls in dem stark reduzierten Nephrin-Gehalt widerspiegelt. Störungen der Nephrinhomöostase resultieren in schwerwiegender Proteinurie. Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im Nephrin-Gen (*NPHS1*) sind mit dem kongenitalen nephrotischen Syndrom vom Finnischen Typ (CNF) assoziiert. Dieser genetische Defekt ist bereits *in utero* manifestiert und führt bei betroffenen Kindern zu einer massiven Proteinurie und terminaler Niereninsuffizienz (Ahvenainen *et al.*, 1956). Der Nieren-Phänotyp untersuchter globaler *Knock-out*-Mäuse (Nephrin *-/-*) stimmte mit dem klinischen Bild betroffener *NPHS1*-Patienten überein und äußerte sich in stark abgeflachten sekundären Podozytenfußfortsätzen, die nicht in der Lage waren eine Schlitzmembran auszubilden (Putala *et al.*, 2001). Ein maßgeblicher Vorgang für morphologische Veränderung ist die durch die Podozytenschädigung ausgelöste Umverteilung von zytoskelettalen und Schlitzmembran-assoziierten Proteinen (Sun *et al.*, 2014). Um freie Bereiche zu überbrücken und das interdigitierende Muster wiederherzustellen, verschmelzen die Fußfortsätze benachbarter Podozyten miteinander (*foot process effacement*) (Kriz

et al., 1998). Der Verlust des engmaschigen Schlitzmembranmusters konnte ebenfalls sehr eindrucksvoll ausschließlich in den UCH-L1^{193M}-Mäusen mit Hilfe der STED-Technologie gezeigt werden und geht mit einer schweren Proteinurie einher. Da sich UCH-L1^{WT}-Mäuse bei allen Untersuchungen hinsichtlich der Podozytenintegrität nicht oder nur wenig von den Kontrollen unterscheiden, wird deutlich, dass nur UCH-L1^{193M} den MN-Phänotyp hervorruft und die *toxic gain of function*-Hypothese realistisch ist.

4.4 Aktive UCH-L1 wirkt antioxidativ

Das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies in MN-Patienten konnte in dieser Arbeit indirekt gezeigt werden, in der APN in den UCH-L1^{193M}-Tieren hingegen weniger. Interessanterweise wiesen die UCH-L1^{WT}-Mäuse im experimentellen Tiermodell sowohl weniger ATPB- als auch einen geringeren MnSOD-Gehalt auf im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das lässt den Schluss zu, dass die Podozyten durch die Überexpression des UCH-L1-Wildtypproteins weniger Stressabwehr leisten müssen. Es wird hypothetisiert, dass UCH-L1 in Neuronen eine antioxidative Wirkung besitzt (Ross und Poirier, 2004; Gong *et al.*, 2006). Da die synaptischen Membranen einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren aufweisen, sind sie sehr anfällig für Lipidoxidationsreaktionen (Imre *et al.*, 1994). Die weitreichende zytoplasmatische Verteilung von UCH-L1 stützt diese Hypothese. Es wird vermutet, dass UCH-L1 am Cystein¹⁵²-Rest reversibel oxidiert wird und als eine Art Redoxpuffer mit reaktiven Sauerstoffspezies einen Chelatkomplex bildet und somit die zelluläre Funktion aufrechterhält (Finkel, 2003; Choi *et al.*, 2004). Versuche mit UCH-L1-defizienten Neuroblastomzellen (N2a) in desoxygeniertem und glukosefreiem Medium zeigten eine höhere Induktion des Zelltodes im Vergleich zu den Kontrollen (Shen *et al.*, 2006). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass nur aktives UCH-L1-Protein (WT) in der Lage ist diesen protektiven Effekt im Podozyten auszuüben. Die UCH-L1^{193M}-überexprimierenden Tiere zeigen im Western Blot keine deutliche Stressantwort. In den Immunfluoreszenzen gegen SOD1 wird jedoch deutlich, dass die Tiere, die das dysfunktionale Protein exprimieren, die Stressabwehr deutlich höher regulieren als die Kontrollen und UCH-L1^{WT}-Mäuse. Dies könnte wieder ein maskierender Effekt in den Kontrollen ausgehend von anderen glomerulären Zellen sein. In zukünftigen Ansätzen gilt es mit Hilfe von beispielsweise massenspektrometrischen Analysen zu klären, ob UCH-L1 in der MN tatsächlich oxidativ modifiziert wird.

4.5 Ein neuer Biomarker für die MN?

Auf der Suche nach weiteren endogenen Antigenen wurden 2010 von Prunotto *et al.* Autoantikörper gegen die Superoxid Dismutase 2 (SOD2) und Aldose-Reduktase (AR) sowie auch erstmals gegen UCH-L1 in Patienten mit MN beschrieben. Interessanterweise konnten die Autoren zeigen, dass sowohl SOD2 als auch AR im Rahmen der Erkrankung *de novo* exprimiert wurden, ähnlich wie es für UCH-L1 beschrieben ist (Meyer-Schwesinger *et al.*, 2009). Des Weiteren sind SOD2 und AR mit oxidativem Stress assoziiert. Während SOD2 in den Mitochondrien als antioxidatives Enzym Superoxid-Anionen bindet, ist AR Teil des Polyolwegs zur Umwandlung von Glucose zu Fructose. Diese Reaktion spielt vor allem bei Diabetes mellitus eine wichtige Rolle und führt durch eine Hemmung von intrazellulären Antioxidantien zur Akkumulation von ROS (Tang *et al.*, 2012).

In einem translationalen Ansatz sollte nun erstmals überprüft werden, ob Autoantikörper von Patienten mit einem nephrotischen Syndrom und insbesondere mit MN, das dysfunktionale UCH-L1^{I93M}-Protein bevorzugt erkennen. Die positiven Seren konnten zu gleichen Teilen PLA₂R1-positiven sowie doppel-negativen MN-Patienten als auch Patienten mit Minimal Change Glomerulonephritis (*minimal change disease*, MCD) zugeordnet werden. Interessanterweise handelt es sich bei der MCD um keine Autoantikörper-vermittelte Erkrankung. Zumindest bei einem Teil der Patienten wird ein zirkulierender Pathogenitätsfaktor im Blut vermutet (Vivarelli *et al.*, 2017). Darüber hinaus konnte im Vergleich zur MN und FSGS in den MCD-Biopsien keine Hochregulation des UPS und keine UCH-L1-*de novo*-Expression beobachtet werden (Beeken *et al.*, 2014). Das ebenfalls zirkulierende UCH-L1-Autoantikörper in Kontrollgruppen festgestellt wurden, zeigt, dass das Auftreten zunächst kein MN-spezifischer Effekt ist. Allerdings gilt es zu berücksichtigen, dass erstens die Krankengeschichten der Kontrollen nicht bekannt sind, und zweitens, UCH-L1 mit verschiedenen Karzinomen z.B. in der Lunge, Brust oder Ovarien assoziiert ist (Jin *et al.*, 2013; Goto *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2018). Demnach ist das Vorhandensein von UCH-L1-Autoantikörpern zunächst kein nierenpathogenes Merkmal. Das sich die Patientenkohorten und Kontrollen aber in der Bindungsaffinität der beiden UCH-L1-Proteine unterscheiden, könnte von Bedeutung sein. Da zu den MCD-Patienten keine Informationen zum Krankheitsverlauf vorliegen, ist eine aussagekräftige Korrelation mit klinischen Parametern zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Die übrigen UCH-L1-positiven Patienten, die darüber hinaus eine höhere Affinität zum dysfunktionalen

UCH-L1-Protein zeigen, weisen tendenziell eine schlechtere Progression auf. Größere Kohortenstudien sind notwendig um dysfunktionale UCH-L1 bzw. Autoantikörper gegen dysfunktionale UCH-L1 als möglichen prognostischen Marker zu etablieren.

Die neurologische Forschung hat bereits therapeutische Konzepte entwickelt, die darauf aus sind, entweder die UCH-L1-Aktivität in Neuronen zu ersetzen oder spezifische Blocker herzustellen, die eine Oxidation von Cys¹⁵² durch ROS unterbinden (Graham und Liu, 2017).

4.6 Fazit

Die in der Literatur zusammengetragenen Daten sowie in dieser Arbeit unternommenen Versuche verdeutlichen, dass die schwache Hydrolase- und vorhergesagte Ligase-Aktivität von UCH-L1 nicht die Hauptfunktionen des Enzyms repräsentieren. Auf Grund der inhibitorischen Effekte, die in verschiedenen Erkrankungen in Anwesenheit von UCH-L1 beschrieben wurden, scheint UCH-L1 die zelluläre Homöostase nicht primär als deubiquitinierendes Enzym sondern durch direkte Interaktion mit Molekülen oder Proteinen wie α -Synuclein oder proteasomalen Untereinheiten zu beeinflussen. Die Analysen von UCH-L1 in zwei verschiedenen Aktivitätszuständen konnten zeigen, dass aktive UCH-L1 (WT) einen positiven Effekt auf die Zell- und Proteinhomöostase hat, während nur das dysfunktionale Protein (I93M) mit der krankhaften Ablagerung von polyubiquitinierten Proteinen assoziiert ist. Diese Ergebnisse stützen die aufgestellte Hypothese, dass hochregulierte aktive UCH-L1 (WT) im Rahmen der Erkrankung modifiziert wird und den Podozytenschaden begünstigt. Darüber hinaus hat sich das I93M-Modell als sehr geeignet erwiesen, um mechanistische Studien zur aberranten Wirkung von UCH-L1 in der MN durchzuführen. Die Identifizierung von UCH-L1-Autoantikörpern gegen das dysfunktionale Protein stellen einen vielversprechenden Ansatz als möglichen Progressionsmarker dar und charakterisieren UCH-L1 als mögliches sekundäres Antigen in der MN. Darüber hinaus verdeutlichen die gewonnenen Erkenntnisse wie sensitiv, komplex und einander bedingend die proteinabbauenden Systeme der Zelle sind.

Literaturverzeichnis

Agarraberes F. A., Dice J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation, *J Cell Sci*, **114**: (13), 2491-2499.

Ahvenainen E. K., Hallman N., Hjelt L. (1956). Nephrotic syndrome in newborn and young infants, *Ann Paediatr Fenn*, **2**: (3), 227-41.

Aki M., Shimbara N., Takashina M., Akiyama K., Kagawa S., Tamura T., Tanahashi N., Yoshimura T., Tanaka K., Ichihara A. (1994). Interferon-Gamma Induces Different Subunit Organizations and Functional Diversity of Proteasomes, *J Biochem*, **115**: (2), 257-269.

Andersson F. I., Werrell E. F., McMorran L., Crone W. J. K., Das C., Hsu S. T. D., Jackson S. E. (2011). The Effect of Parkinson's-Disease-Associated Mutations on the Deubiquitinating Enzyme UCH-L1, *J Mol Biol*, **407**: (2), 261-272.

Andrews P. M. (1981). Investigations of Cytoplasmic Contractile and Cytoskeletal Elements in the Kidney Glomerulus, *Kidney Int*, **20**: (5), 549-562.

Augert A., Vindrieux D., Girard C. A., Le Calve B., Gras B., Ferrand M., Bouchet B. P., Puisieux A., de Launoit Y., Simonnet H., Lambeau G., Bernard D. (2013). PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress, *Free Radic Biol Med*, **65**, 969-977.

Ballestrem C., Hinz B., Imhof B. A., Wehrle-Haller B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential alpha-V beta 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior, *Journal of Cell Biology*, **155**: (7), 1319-1332.

Beck L. H., Jr., Bonegio R. G., Lambeau G., Beck D. M., Powell D. W., Cummins T. D., Klein J. B., Salant D. J. (2009). M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy, *N Engl J Med*, **361**: (1), 11-21.

Beck L. H., Jr., Salant D. J. (2014). Membranous nephropathy: from models to man, *J Clin Invest*, **124**: (6), 2307-14.

Beeken M., Lindenmeyer M. T., Blattner S. M., Radon V., Oh J., Meyer T. N., Hildebrand D., Schluter H., Reinicke A. T., Knop J. H., Vivekanandan-Giri A., Munster S., Sachs M., Wiech T., Pennathur S., Cohen C. D., Kretzler M., Stahl R. A. K., Meyer-Schwesinger C. (2014). Alterations in the Ubiquitin Proteasome System in Persistent but Not Reversible Proteinuric Diseases, *J Am Soc Nephrol*, **25**: (11), 2511-2525.

Benzing T. (2004). Signaling at the slit diaphragm, *J Am Soc Nephrol*, **15**: (6), 1382-1391.

Bernard A. M., Lauwerys R. R., Noel A., Vandeleene B., Lambert A. (1989). Urine protein 1: a sex-dependent marker of tubular or glomerular dysfunction, *Clin Chem*, **35**: (10), 2141-2.

Bernard A. M., Moreau D., Lauwerys R. (1982). Comparison of retinol-binding protein and beta 2-microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria, *Clin Chim Acta*, **126**: (1), 1-7.

Bilguvar K., Tyagi N. K., Ozkara C., Tuysuz B., Bakircioglu M., Choi M., Delil S., Caglayan A. O., Baranoski J. F., Erturk O., Yalcinkaya C., Karacorlu M., Dincer A., Johnson M. H., Mane S., Chandra S. S., Louvi A., Boggon T. J., Lifton R. P., Horwich A. L., Gunel M. (2013). Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: (9), 3489-94.

Bishop P., Rubin P., Thomson A. R., Rocca D., Henley J. M. (2014). The Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) C Terminus Plays a Key Role in Protein Stability, but Its Farnesylation Is Not Required for Membrane Association in Primary Neurons, *Journal of Biological Chemistry*, **289**: (52), 36140-36149.

Border W. A., Ward H. J., Kamil E. S., Cohen A. H. (1982). Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen, *J Clin Invest*, **69**: (2), 451-61.

Boudreaux D. A., Maiti T. K., Davies C. W., Das C. (2010). Ubiquitin vinyl methyl ester binding orients the misaligned active site of the ubiquitin hydrolase UCHL1 into productive conformation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: (20), 9117-22.

Boute N., Gribouval O., Roselli S., Benessy F., Lee H., Fuchshuber A., Dahan K., Gubler M. C., Naudet P., Antignac C. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome, *Nat Genet*, **24**: (4), 349-354.

Butterfield D. A., Gnjec A., Poon H. F., Castegna A., Pierce W. M., Klein J. B., Martins R. N. (2006). Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer's disease: An initial assessment, *J Alzheimers Dis*, **10**: (4), 391-397.

Byers H. R., Etoh T., Vink J., Franklin N., Gattoni-Celli S., Mihm M. C., Jr. (1992). Actin organization and cell migration of melanoma cells relate to differential expression of integrins and actin-associated proteins, *J Dermatol*, **19**: (11), 847-52.

Cartier A. E., Djakovic S. N., Salehi A., Wilson S. M., Masliah E., Patrick G. N. (2009). Regulation of synaptic structure by ubiquitin C-terminal hydrolase L1, *J Neurosci*, **29**: (24), 7857-68.

Castegna A., Aksenov M., Aksenova M., Thongboonkerd V., Klein J. B., Pierce W. M., Booze R., Markesbery W. R., Butterfield D. A. (2002). Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part 1: Creatine kinase bb, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1, *Free Radical Bio Med*, **33**: (4), 562-571.

- Cerundolo V., Kelly A., Elliott T., Trowsdale J., Townsend A.** (1995). Genes Encoded in the Major Histocompatibility Complex Affecting the Generation of Peptides for Tap Transport, *Eur J Immunol*, **25**: (2), 554-562.
- Chang R. L. S., Deen W. M., Robertson C. R., Brenner B. M.** (1975). Permselectivity of Glomerular Capillary Wall .3. Restricted Transport of Polyanions, *Kidney Int*, **8**: (4), 212-218.
- Chau V., Tobias J. W., Bachmair A., Marriott D., Ecker D. J., Gonda D. K., Varshavsky A.** (1989). A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysine in a Targeted Short-Lived Protein, *Science*, **243**: (4898), 1576-1583.
- Chen F. J., Sugiura Y., Myers K. G., Liu Y., Lin W. C.** (2010). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 is required for maintaining the structure and function of the neuromuscular junction, *P Natl Acad Sci USA*, **107**: (4), 1636-1641.
- Chen L., Shinde U., Ortolan T. G., Madura K.** (2001). Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly, *Embo Rep*, **2**: (10), 933-938.
- Choi J., Levey A. I., Weintraub S. T., Rees H. D., Gearing M., Chin L. S., Li L.** (2004). Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases, *J Biol Chem*, **279**: (13), 13256-64.
- Ciechanover A., Orian A., Schwartz A. L.** (2000). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications, *J Cell Biochem Suppl*, **34**, 40-51.
- Ciechanover A., Stanhill A.** (2014). The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome, *Bba-Mol Cell Res*, **1843**: (1), 86-96.
- Cortes P., Mendez M., Riser B. L., Guerin C. J., Rodriguez-Barbero A., Hassett C., Yee J.** (2000). F-actin fiber distribution in glomerular cells: Structural and functional implications, *Kidney Int*, **58**: (6), 2452-2461.
- Couser W. G., Baker P. J., Adler S.** (1985). Complement and the Direct Mediation of Immune Glomerular Injury - a New Perspective, *Kidney Int*, **28**: (6), 879-890.
- Cuervo A. M., Stefanis L., Fredenburg R., Lansbury P. T., Sulzer D.** (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy, *Science*, **305**: (5688), 1292-1295.
- Cybulsky A. V.** (2013). The intersecting roles of endoplasmic reticulum stress, ubiquitin-proteasome system, and autophagy in the pathogenesis of proteinuric kidney disease, *Kidney Int*, **84**: (1), 25-33.
- Cybulsky A. V., Quigg R. J., Salant D. J.** (2005). Experimental membranous nephropathy redux, *Am J Physiol-Renal*, **289**: (4), F660-F671.
- Day I. N. M., Thompson R. J.** (2010). UCHL1 (PGP 9.5): Neuronal biomarker and ubiquitin system protein, *Prog Neurobiol*, **90**: (3), 327-362.

- Debiec H., Guignonis V., Mougnot B., Decobert F., Haymann J. P., Bensman A., Deschenes G., Ronco P. M.** (2002). Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies, *N Engl J Med*, **346**: (26), 2053-60.
- Debiec H., Lefeu F., Kemper M. J., Niaudet P., Deschenes G., Remuzzi G., Ulinski T., Ronco P.** (2011). Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin, *N Engl J Med*, **364**: (22), 2101-10.
- Debigare R., Price S. R.** (2003). Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system, and renal diseases, *Am J Physiol Renal Physiol*, **285**: (1), F1-8.
- Dedhar S., Jewell K., Rojiani M., Gray V.** (1992). The Receptor for the Basement-Membrane Glycoprotein Entactin Is the Integrin Alpha-3 Beta-1, *Journal of Biological Chemistry*, **267**: (26), 18908-18914.
- Diomedi-Camassei F., Rava L., Lerut E., Callea F., Van Damme B.** (2005). Protein gene product 9.5 and ubiquitin are expressed in metabolically active epithelial cells of normal and pathologic human kidney, *Nephrol Dial Transpl*, **20**: (12), 2714-2719.
- Donoviel D. B., Freed D. D., Vogel H., Potter D. G., Hawkins E., Barrish J. P., Mathur B. N., Turner C. A., Geske R., Montgomery C. A., Starbuck M., Brandt M., Gupta A., Ramirez-Solis R., Zambrowicz B. P., Powell D. R.** (2001). Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN, *Mol Cell Biol*, **21**: (14), 4829-4836.
- Drenckhahn D., Franke R. P.** (1988). Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man, *Lab Invest*, **59**: (5), 673-82.
- Driscoll J., Brown M. G., Finley D., Monaco J. J.** (1993). Mhc-Linked Lmp Gene-Products Specifically Alter Peptidase Activities of the Proteasome, *Nature*, **365**: (6443), 262-264.
- Farquhar M. G., Saito A., Kerjaschki D., Orlando R. A.** (1995). The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP, *J Am Soc Nephrol*, **6**: (1), 35-47.
- Finkel T.** (2003). Oxidant signals and oxidative stress, *Curr Opin Cell Biol*, **15**: (2), 247-254.
- Franch H. A.** (2002). Pathways of proteolysis affecting renal cell growth, *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **11**: (4), 445-50.
- Fujigaki Y., Nagase M., Honda N.** (1993). Intraglomerular basement membrane translocation of immune complex (IC) in the development of passive in situ IC nephritis of rats, *Am J Pathol*, **142**: (3), 831-42.
- Funakoshi M., Xi L., Velichutina I., Hochstrasser M., Kobayashi H.** (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability, *J Cell Sci*, **117**: (26), 6447-6454.

- Furukawa T., Ohno S., Oguchi H., Hora K., Tokunaga S., Furuta S.** (1991). Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution, *Kidney Int*, **40**: (4), 621-4.
- Gagliardini E., Conti S., Benigni A., Remuzzi G., Remuzzi A.** (2010). Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit, *J Am Soc Nephrol*, **21**: (12), 2081-9.
- Garg P., Verma R., Nihalani D., Johnstone D. B., Holzman L. B.** (2007). Neph1 cooperates with Nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization, *Mol Cell Biol*, **27**: (24), 8698-8712.
- Glassock R. J.** (2009). Human idiopathic membranous nephropathy--a mystery solved?, *N Engl J Med*, **361**: (1), 81-3.
- Gong B., Cao Z., Zheng P., Vitolo O. V., Liu S., Staniszewski A., Moolman D., Zhang H., Shelanski M., Arancio O.** (2006). Ubiquitin hydrolase Uch-L1 rescues beta-amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory, *Cell*, **126**: (4), 775-88.
- Gordon A. M., Homsher E., Regnier M.** (2000). Regulation of contraction in striated muscle, *Physiol Rev*, **80**: (2), 853-924.
- Goto Y., Zeng L., Yeom C. J., Zhu Y., Morinibu A., Shinomiya K., Kobayashi M., Hirota K., Itasaka S., Yoshimura M., Tanimoto K., Torii M., Sowa T., Menju T., Sonobe M., Kakeya H., Toi M., Date H., Hammond E. M., Hiraoka M., Harada H.** (2015). UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1alpha, *Nat Commun*, **6**, 6153.
- Graham S. H., Liu H.** (2017). Life and death in the trash heap: The ubiquitin proteasome pathway and UCHL1 in brain aging, neurodegenerative disease and cerebral Ischemia, *Ageing Res Rev*, **34**, 30-38.
- Grahammer F., Schell C., Huber T. B.** (2013). The podocyte slit diaphragm-from a thin grey line to a complex signalling hub, *Nature Reviews Nephrology*, **9**: (10), 587-598.
- Grahammer F., Wigge C., Schell C., Kretz O., Patrakka J., Schneider S., Klose M., Arnold S. J., Habermann A., Brauniger R., Rinschen M. M., Volker L., Bregenzner A., Rubbenstroth D., Boerries M., Kerjaschki D., Miner J. H., Walz G., Benzing T., Fornoni A., Frangakis A. S., Huber T. B.** (2016). A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes, *Jci Insight*, **1**: (9).
- Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D., Huber R.** (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature*, **386**: (6624), 463-71.
- Heinemeyer W., Fischer M., Krimmer T., Stachon U., Wolf D. H.** (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing, *Journal of Biological Chemistry*, **272**: (40), 25200-25209.
- Hershko A., Ciechanover A.** (1998). The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-79.

- Heymann W., Hackel D. B., Harwood S., Wilson S. G., Hunter J. L.** (1959). Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions, *Proc Soc Exp Biol Med*, **100**: (4), 660-4.
- Hochstrasser M.** (2000). Biochemistry - All in the ubiquitin family, *Science*, **289**: (5479), 563-564.
- Hofstra J. M., Beck L. H., Jr., Beck D. M., Wetzels J. F., Salant D. J.** (2011). Anti-phospholipase A(2) receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy, *Clin J Am Soc Nephrol*, **6**: (6), 1286-91.
- Hogan S. L., Muller K. E., Jennette J. C., Falk R. J.** (1995). A review of therapeutic studies of idiopathic membranous glomerulopathy, *Am J Kidney Dis*, **25**: (6), 862-75.
- Holzman L. B., St John P. L., Kovari I. A., Verma R., Holthofer H., Abrahamson D. R.** (1999). Nephritin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell - Rapid Communication, *Kidney Int*, **56**: (4), 1481-1491.
- Hoxha E., Beck L. H., Jr., Wiech T., Tomas N. M., Probst C., Mindorf S., Meyer-Schwesinger C., Zahner G., Stahl P. R., Schopper R., Panzer U., Harendza S., Helmchen U., Salant D. J., Stahl R. A.** (2017). An Indirect Immunofluorescence Method Facilitates Detection of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Specific Antibodies in Membranous Nephropathy, *J Am Soc Nephrol*, **28**: (2), 520-531.
- Hoxha E., Harendza S., Zahner G., Panzer U., Steinmetz O., Fechner K., Helmchen U., Stahl R. A.** (2011). An immunofluorescence test for phospholipase-A(2)-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis, *Nephrol Dial Transplant*, **26**: (8), 2526-32.
- Huber T. B., Simons M., Hartleben B., Sernetz L., Schmidts M., Gundlach E., Saleem M. A., Walz G., Benzing T.** (2003). Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains, *Hum Mol Genet*, **12**: (24), 3397-3405.
- Imre S. G., Fekete I., Farkas T.** (1994). Increased Proportion of Docosahexanoic Acid and High Lipid-Peroxidation Capacity in Erythrocytes of Stroke Patients, *Stroke*, **25**: (12), 2416-2420.
- Ito K., Ger Y. C., Kawamura S.** (1986). Actin Filament Alterations in Glomerular Epithelial-Cells of Adriamycin-Induced Nephrotic Rats, *Acta Pathol Japon*, **36**: (2), 253-260.
- Jahngen-Hodge J., Obin M. S., Gong X., Shang F., Nowell T. R., Gong J. X., Abasi H., Blumberg J., Taylor A.** (1997). Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress, *J Biol Chem*, **272**: (45), 28218-28226.
- Jenner P.** (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease, *Ann Neurol*, **53**, S26-S36.
- Jin C., Yu W., Lou X., Zhou F., Han X., Zhao N., Lin B.** (2013). UCHL1 Is a Putative Tumor Suppressor in Ovarian Cancer Cells and Contributes to Cisplatin Resistance, *J Cancer*, **4**: (8), 662-70.

- Johnson R. J., Couser W. G.** (1990). Hepatitis B infection and renal disease: clinical, immunopathogenetic and therapeutic considerations, *Kidney Int*, **37**: (2), 663-76.
- Kabuta T., Furuta A., Aoki S., Furuta K., Wada K.** (2008b). Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy, *J Biol Chem*, **283**: (35), 23731-23738.
- Kabuta T., Setsuie R., Mitsui T., Kinugawa A., Sakurai M., Aoki S., Uchida K., Wada K.** (2008a). Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1, *Hum. Mol. Genet.*, **17**: (10), 1482-96.
- Kamata K., Baird L. G., Erikson M. E., Collins A. B., McCluskey R. T.** (1985). Characterization of Antigens and Antibody Specificities Involved in Heymann Nephritis, *J Immunol*, **135**: (4), 2400-2408.
- Kaplan J. M., Kim S. H., North K. N., Rennke H., Correia L. A., Tong H. Q., Mathis B. J., Rodriguez-Perez J. C., Allen P. G., Beggs A. H., Pollak M. R.** (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis, *Nat Genet*, **24**: (3), 251-6.
- Kerjaschki D.** (2001). Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis, *Journal of Clinical Investigation*, **108**: (11), 1583-1587.
- Kerjaschki D., Farquhar M. G.** (1982). The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**: (18), 5557-61.
- Kerjaschki D., Miettinen A., Farquhar M. G.** (1987). Initial Events in the Formation of Immune Deposits in Passive Heymann Nephritis - Gp330-Anti-Gp330 Immune-Complexes Form in Epithelial Coated Pits and Rapidly Become Attached to the Glomerular-Basement-Membrane, *J Exp Med*, **166**: (1), 109-128.
- Kerjaschki D., Schulze M., Binder S., Kain R., Ojha P. P., Susani M., Horvat R., Baker P. J., Couser W. G.** (1989). Transcellular transport and membrane insertion of the C5b-9 membrane attack complex of complement by glomerular epithelial cells in experimental membranous nephropathy, *J Immunol*, **143**: (2), 546-52.
- Kerjaschki D., Sharkey D. J., Farquhar M. G.** (1984). Identification and Characterization of Podocalyxin - the Major Sialoprotein of the Renal Glomerular Epithelial-Cell, *Journal of Cell Biology*, **98**: (4), 1591-1596.
- Kestilä M., Lenkkeri U., Mannikko M., Lamerdin J., McCready P., Putaala H., Ruotsalainen V., Morita T., Nissinen M., Herva R., Kashtan C. E., Peltonen L., Holmberg C., Olsen A., Tryggvason K.** (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome, *Mol Cell*, **1**: (4), 575-582.
- Kim H. J., Kim H. J., Jeong J. E., Baek J. Y., Jeong J., Kim S., Kim Y. M., Kim Y., Nam J. H., Huh S. H., Seo J., Jin B. K., Lee K. J.** (2014). N-terminal truncated UCH-L1 prevents Parkinson's disease associated damage, *Plos One*, **9**: (6), e99654.

- Kitching A. R., Hutton H. L.** (2016). The Players: Cells Involved in Glomerular Disease, *Clin J Am Soc Nephrol*, **11**: (9), 1664-74.
- Klionsky D. J., Abeliovich H., Agostinis P., Agrawal D. K., Aliev G., [...] et al.** (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes, *Autophagy*, **4**: (2), 151-175.
- Kobayashi N., Gao S. Y., Chen J., Saito K., Miyawaki K., Li C. Y., Pan L., Saito S., Terashita T., Matsuda S.** (2004). Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons?, *Anat Sci Int*, **79**: (1), 1-10.
- Koharudin L. M., Liu H., Di Maio R., Kodali R. B., Graham S. H., Gronenborn A. M.** (2010). Cyclopentenone prostaglandin-induced unfolding and aggregation of the Parkinson disease-associated UCH-L1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: (15), 6835-40.
- Korolchuk V. I., Menzies F. M., Rubinsztein D. C.** (2010). Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems, *Febs Lett*, **584**: (7), 1393-1398.
- Kravtsova-Ivantsiv Y., Sommer T., Ciechanover A.** (2013). The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore, *Angew Chem Int Ed Engl*, **52**: (1), 192-8.
- Kriz W., Gretz N., Lemley K. V.** (1998). Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit?, *Kidney Int*, **54**: (3), 687-697.
- Krüger E., Kloetzel P. M.** (2012). Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme, *Curr Opin Immunol*, **24**: (1), 77-83.
- Kyhse-Andersen J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods*, **10**: (3-4), 203-9.
- Kyratzi E., Pavlaki M., Stefanis L.** (2008). The S18Y polymorphic variant of UCH-L1 confers an antioxidant function to neuronal cells, *Hum Mol Genet*, **17**: (14), 2160-71.
- Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**: (5259), 680-5.
- Lamb C. A., Dooley H. C., Tooze S. A.** (2013). Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation, *Bioessays*, **35**: (1), 34-45.
- Lansbury P. T., Jr.** (2006). Improving synaptic function in a mouse model of AD, *Cell*, **126**: (4), 655-7.
- Larsen C. N., Krantz B. A., Wilkinson K. D.** (1998). Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases, *Biochemistry-U S A*, **37**: (10), 3358-68.

- Lehtonen S., Ryan J. J., Kudlicka K., Iino N., Zhou H., Farquhar M. G.** (2005). Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: (28), 9814-9.
- Lim K. H., Ramakrishna S., Baek K. H.** (2013). Molecular mechanisms and functions of cytokine-inducible deubiquitinating enzymes, *Cytokine Growth F R*, **24**: (5), 427-431.
- Lim K. L., Dawson V. L., Dawson T. M.** (2006). Parkin-mediated lysine 63-linked polyubiquitination: a link to protein inclusions formation in Parkinson's and other conformational diseases?, *Neurobiol Aging*, **27**: (4), 524-9.
- Liu W. J., Ye L., Huang W. F., Guo L. J., Xu Z. G., Wu H. L., Yang C., Liu H. F.** (2016). p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation, *Cell Mol Biol Lett*, **21**.
- Liu Y. C., Fallon L., Lashuel H. A., Liu Z. H., Lansbury P. T.** (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility, *Cell*, **111**: (2), 209-218.
- Liu Y., Wu H., Wu J., Wang S., Liu Y., Zhao Z., Zhang X., Li R., Guo M., Zhang Z.** (2008). Detection of UCH-L1 expression by pre-embedding immunoelectron microscopy with colloidal gold labeling in diseased glomeruli, *Ultrastruct Pathol*, **32**: (1), 5-9.
- Lohmann F., Sachs M., Meyer T. N., Sievert H., Lindenmeyer M. T., Wiech T., Cohen C. D., Balabanov S., Stahl R. A., Meyer-Schwesinger C.** (2014). UCH-L1 induces podocyte hypertrophy in membranous nephropathy by protein accumulation, *Biochim Biophys Acta*, **1842**: (7), 945-58.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, **193**: (1), 265-75.
- Luo J. P., Megee S., Dobrinski I.** (2009). Asymmetric Distribution of UCH-L1 in Spermatogonia Is Associated With Maintenance and Differentiation of Spermatogonial Stem Cells, *J Cell Physiol*, **220**: (2), 460-468.
- Luo Y. H., He J. F., Yang C. L., Orange M., Ren X. C., Blair N., Tan T., Yang J. M., Zhu H.** (2018). UCH-L1 promotes invasion of breast cancer cells through activating Akt signaling pathway, *J Cell Biochem*, **119**: (1), 691-700.
- Majeski A. E., Dice J. F.** (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy, *Int J Biochem Cell B*, **36**: (12), 2435-2444.
- Marshall C. B., Shankland S. J.** (2006). Cell cycle and glomerular disease: a minireview, *Nephron Exp Nephrol*, **102**: (2), e39-48.

- Matsui K., Breiteneder-Geleff S., Soleiman A., Kowalski H., Kerjaschki D.** (1999). Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes, *Nephrol Dial Transpl*, **14**, 9-11.
- Meyer-Schwesinger C.** (2019). The ubiquitin-proteasome system in kidney physiology and disease, *Nat Rev Nephrol*, **15**: (7), 393-411.
- Meyer-Schwesinger C., Dehde S., Klug P., Becker J. U., Mathey S., Arefi K., Balabanov S., Venz S., Endlich K. H., Pekna M., Gessner J. E., Thaiss F., Meyer T. N.** (2011). Nephrotic syndrome and subepithelial deposits in a mouse model of immune-mediated anti-podocyte glomerulonephritis, *J Immunol*, **187**: (6), 3218-29.
- Meyer-Schwesinger C., Meyer T. N., Munster S., Klug P., Saleem M., Helmchen U., Stahl R. A.** (2009). 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*, **217**: (3), 452-64.
- Meyer-Schwesinger C., Meyer T. N., Sievert H., Hoxha E., Sachs M., Klupp E. M., Munster S., Balabanov S., Carrier L., Helmchen U., Thaiss F., Stahl R. A.** (2011). Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 activity induces polyubiquitin accumulation in podocytes and increases proteinuria in rat membranous nephropathy, *Am J Pathol*, **178**: (5), 2044-57.
- Michov, B.** (1995). Elektrophorese: Theorie und Praxis, *Walter de Gruyter*, Berlin
- Miner J. H.** (1999). Renal basement membrane components, *Kidney Int*, **56**: (6), 2016-24.
- Miyoshi Y., Nakayama S., Torikoshi Y., Tanaka S., Ishihara H., Taguchi T., Tamaki Y., Noguchi S.** (2006). High expression of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 and -L3 mRNA predicts early recurrence in patients with invasive breast cancer, *Cancer Sci*, **97**: (6), 523-529.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-73.
- Mundel P., Heid H. W., Mundel T. M., Kruger M., Reiser J., Kriz W.** (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes, *J Cell Biol*, **139**: (1), 193-204.
- Munger, K.A., Kost C.K., Brenner B.M., Maddox D.A.** (2011). The renal circulations and glomerular ultrafiltration. *Brenner and Rector's The Kidney*, Elsevier, Inc. Philadelphia, **Vol. 1**: 95–137.
- Nakhoul N., Batuman V.** (2011). Role of Proximal Tubules in the Pathogenesis of Kidney Disease, *Contrib Nephrol*, **169**, 37-50.
- Nangaku M., Shankland S. J., Couser W. G.** (2005). Cellular response to injury in membranous nephropathy, *J Am Soc Nephrol*, **16**: (5), 1195-1204.
- Neale T. J., Ojha P. P., Exner M., Poczewski H., Ruger B., Witztum J. L., Davis P., Kerjaschki D.** (1994). Proteinuria in Passive Heymann Nephritis Is Associated with Lipid-Peroxidation and Formation of Adducts on Type-Iv Collagen, *J Clin Invest*, **94**: (4), 1577-1584.

- Neale T. J., Ullrich R., Ojha P., Poczewski H., Verhoeven A. J., Kerjaschki D.** (1993). Reactive Oxygen Species and Neutrophil Respiratory Burst Cytochrome B558 Are Produced by Kidney Glomerular Cells in Passive Heymann Nephritis, *P Natl Acad Sci USA*, **90**: (8), 3645-3649.
- Nijman S. M. B., Luna-Vargas M. P. A., Velds A., Brummelkamp T. R., Dirac A. M. G., Sixma T. K., Bernards R.** (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes, *Cell*, **123**: (5), 773-786.
- Nishikawa K., Li H., Kawamura R., Osaka H., Wang Y. L., Hara Y., Hirokawa T., Manago Y., Amano T., Noda M., Aoki S., Wada K.** (2003). Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants, *Biochem Biophys Res Commun*, **304**: (1), 176-83.
- Norden A. G., Scheinman S. J., Deschodt-Lanckman M. M., Lapsley M., Nortier J. L., Thakker R. V., Unwin R. J., Wrong O.** (2000). Tubular proteinuria defined by a study of Dent's (CLCN5 mutation) and other tubular diseases, *Kidney Int*, **57**: (1), 240-9.
- Nussbaum R. L.** (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease (vol 348, pg 1356, 2003), *New Engl J Med*, **348**: (25), 2588-2588.
- Osaka H., Wang Y. L., Takada K., Takizawa S., Setsuie R., Li H., Sato Y., Nishikawa K., Sun Y. J., Sakurai M., Harada T., Hara Y., Kimura I., Chiba S., Namikawa K., Kiyama H., Noda M., Aoki S., Wada K.** (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron, *Hum Mol Genet*, **12**: (16), 1945-58.
- Pandey U. B., Nie Z. P., Batlevi Y., McCray B. A., Ritson G. P., Nedelsky N. B., Schwartz S. L., DiProspero N. A., Knight M. A., Schuldiner O., Padmanabhan R., Hild M., Berry D. L., Garza D., Hubbert C. C., Yao T. P., Baehrecke E. H., Taylor J. P.** (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS, *Nature*, **447**: (7146), 859-863.
- Pavenstädt H., Kriz W., Kretzler M.** (2003). Cell biology of the glomerular podocyte, *Physiol Rev*, **83**: (1), 253-307
- Perico L., Conti S., Benigni A., Remuzzi G.** (2016). Podocyte-actin dynamics in health and disease, *Nat Rev Nephrol*, **12**: (11), 692-710.
- Peterson P. A., Evrin P. E., Berggard I.** (1969). Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of beta-2-macroglobulin, albumin, and total protein, *J Clin Invest*, **48**: (7), 1189-98.
- Pickart C. M.** (2001). Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-33.
- Ponticelli C.** (2007). Membranous nephropathy, *J Nephrol*, **20**: (3), 268-87.

- Prunotto M., Carnevali M. L., Candiano G., Murtas C., Bruschi M., Corradini E., Trivelli A., Magnasco A., Petretto A., Santucci L., Mattei S., Gatti R., Scolari F., Kador P., Allegri L., Ghiggeri G. M.** (2010). Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2, *J Am Soc Nephrol*, **21**: (3), 507-19.
- Puelles V. G., Hoy W. E., Hughson M. D., Diouf B., Douglas-Denton R. N., Bertram J. F.** (2011). Glomerular number and size variability and risk for kidney disease, *Curr Opin Nephrol Hy*, **20**: (1), 7-15.
- Putala H., Soininen R., Kilpelainen P., Wartiovaara J., Tryggvason K.** (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death, *Hum Mol Genet*, **10**: (1), 1-8.
- Raats C. J. I., van den Born J., Bakker M. A. H., Oppers-Walgreen B., Pisa B. J. M., Dijkman H. B. P. M., Assmann K. J. M., Berden J. H. M.** (2000). Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies, *Am J Pathol*, **156**: (5), 1749-1765.
- Radon V., Czesla M., Reichelt J., Fehlert J., Hammel A., Rosendahl A., Knop J. H., Wiech T., Wenzel U. O., Sachs M., Reinicke A. T., Stahl R. A. K., Meyer-Schwesinger C.** (2018). Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 is required for regulated protein degradation through the ubiquitin proteasome system in kidney, *Kidney Int*, **93**: (1), 110-127.
- Rechsteiner M., Rogers S. W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem Sci*, **21**: (7), 267-71.
- Regele H. M., Fillipovic E., Langer B., Poczewki H., Kraxberger I., Bittner R. E., Kerjaschki D.** (2000). Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis, *J Am Soc Nephrol*, **11**: (3), 403-412.
- Reinheckel T., Sitte N., Ullrich O., Kuckelkorn U., Davies K. J. A., Grune T.** (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress, *Biochem J*, **335**, 637-642.
- Reinheckel T., Ullrich O., Sitte N., Grune T.** (2000). Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress, *Arch Biochem Biophys*, **377**: (1), 65-68.
- Reinicke A. T., Laban K., Sachs M., Kraus V., Walden M., Damme M., Sachs W., Reichelt J., Schweizer M., Janiesch P. C., Duncan K. E., Saftig P., Rinschen M. M., Morellini F., Meyer-Schwesinger C.** (2019). Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) loss causes neurodegeneration by altering protein turnover in the first postnatal weeks, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **116**: (16), 7963-7972.
- Reiser J., Kriz W., Kretzler M., Mundel P.** (2000). The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction, *J Am Soc Nephrol*, **11**: (1), 1-8.
- Rodewald R., Karnovsky M. J.** (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse, *J Cell Biol*, **60**: (2), 423-33.

- Ronco P., Debiec H.** (2005). Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: from Heymann nephritis to alloimmunization, *J Am Soc Nephrol*, **16**: (5), 1205-13.
- Ronco P., Debiec H.** (2007). Podocyte antigens and glomerular disease, *Nephron Exp Nephrol*, **107**: (2), e41-6.
- Roselli S., Gribouval O., Boute N., Sich M., Benessy F., Attie T., Gubler M. C., Antignac C.** (2002). Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area, *Am J Pathol*, **160**: (1), 131-139.
- Roselli S., Heidet L., Sich M., Henger A., Kretzler M., Gubler M. C., Antignac C.** (2004). Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice, *Mol Cell Biol*, **24**: (2), 550-560.
- Ross C. A., Poirier M. A.** (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat Med*, **10**: (7), S10-S17.
- Rothaug M., Zunke F., Mazzulli J. R., Schweizer M., Altmeppen H., Lullmann-Rauch R., Kallemeijn W. W., Gaspar P., Aerts J. M., Glatzel M., Saftig P., Krainc D., Schwake M., Blanz J.** (2014). LIMP-2 expression is critical for beta-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**: (43), 15573-8.
- Saigoh K., Wang Y. L., Suh J. G., Yamanishi T., Sakai Y., Kiyosawa H., Harada T., Ichihara N., Wakana S., Kikuchi T., Wada K.** (1999). Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice, *Nat Genet*, **23**: (1), 47-51.
- Sakurai M., Ayukawa K., Setsuie R., Nishikawa K., Hara Y., Ohashi H., Nishimoto M., Abe T., Kudo Y., Sekiguchi M., Sato Y., Aoki S., Noda M., Wada K.** (2006). Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation, *J Cell Sci*, **119**: (1), 162-171.
- Sampogna R. V., Al-Awqati Q.** (2012). Taking a bite: endocytosis in the maintenance of the slit diaphragm, *J Clin Invest*, **122**: (12), 4330-4333.
- Sauer B., Henderson N.** (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: (14), 5166-70.
- Schlöndorff D., Banas B.** (2009). The mesangial cell revisited: no cell is an island, *J Am Soc Nephrol*, **20**: (6), 1179-87.
- Schmiedeke T. M., Stockl F. W., Weber R., Sugisaki Y., Batsford S. R., Vogt A.** (1989). Histones have high affinity for the glomerular basement membrane. Relevance for immune complex formation in lupus nephritis, *J Exp Med*, **169**: (6), 1879-94.

- Schmieder S., Nagai M., Orlando R. A., Takeda T., Farquhar M. G.** (2004). Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells, *J Am Soc Nephrol*, **15**: (9), 2289-98.
- Schnabel E., Anderson J. M., Farquhar M. G.** (1990). The Tight Junction Protein Zo-1 Is Concentrated Along Slit Diaphragms of the Glomerular Epithelium, *J Cell Biol*, **111**: (3), 1255-1263.
- Schwarz K., Simons M. S., Reiser J., Saleem M. A., Faul C., Kriz W., Shaw A. S., Holzman L. B., Mundel P.** (2001). Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin, *J Clin Invest*, **108**: (11), 1621-1629.
- Segeer K., Wanner C.** (2014). Niere und ableitende Harnwege, *Springer*, Berlin
- Sekiguchi S., Kwon J., Yoshida E., Hamasaki H., Ichinose S., Hideshima M., Kuraoka M., Takahashi A., Ishii Y., Kyuwa S., Wada K., Yoshikawa Y.** (2006). Localization of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in mouse ova and its function in the plasma membrane to block polyspermy, *Am J Pathol*, **169**: (5), 1722-1729.
- Sellin L., Huber T. B., Gerke P., Quack I., Pavenstadt H., Walz G.** (2002). NEPH1 defines a novel family of podocin-interacting proteins, *Faseb J*, **17**: (1), 115-7
- Sethi S., Madden B. J., Debiec H., Charlesworth M. C., Gross L., Ravindran A., Hummel A. M., Specks U., Fervenza F. C., Ronco P.** (2019). Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy, *J Am Soc Nephrol*, **30**: (6), 1123-1136.
- Setsuie R., Wada K.** (2007). The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases, *Neurochem Int*, **51**: (2-4), 105-111.
- Setsuie R., Wang Y. L., Mochizuki H., Osaka H., Hayakawa H., Ichihara N., Li H., Furuta A., Sano Y., Sun Y. J., Kwon J., Kabuta T., Yoshimi K., Aoki S., Mizuno Y., Noda M., Wada K.** (2007). Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant, *Neurochem Int*, **50**: (1), 119-29.
- Shabek N., Ciechanover A.** (2010). Degradation of ubiquitin The fate of the cellular reaper, *Cell Cycle*, **9**: (3), 523-530.
- Shang F., Gong X., Taylor A.** (1997). Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress - Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated, *J Biol Chem*, **272**: (37), 23086-23093.
- Shang F., Taylor A.** (1995). Oxidative Stress and Recovery from Oxidative Stress Are Associated with Altered Ubiquitin-Conjugating and Proteolytic Activities in Bovine Lens Epithelial-Cells, *Biochem J*, **307**, 297-303.
- Shankland S. J.** (2006). The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis, *Kidney Int*, **69**: (12), 2131-47.

- Shen H., Sikorska M., LeBlanc J., Walker P. R., Liu Q. Y.** (2006). Oxidative stress regulated expression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1: Role in cell survival, *Apoptosis*, **11**: (6), 1049-1059.
- Shirato I., Asanuma K., Takeda Y., Hayashi K., Tomino Y.** (2000). Protein gene product 9.5 is selectively localized in parietal epithelial cells of Bowman's capsule in the rat kidney, *J Am Soc Nephrol*, **11**: (12), 2381-2386.
- Shirato I., Hosser H., Kimura K., Sakai T., Tomino Y., Kriz W.** (1996). The development of focal segmental glomerulosclerosis in Masugi nephritis is based on progressive podocyte damage, *Virchows Arch*, **429**: (4-5), 255-273.
- Shringarpure R., Grune T., Davies K. J. A.** (2001). Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells, *Cell Mol Life Sci*, **58**: (10), 1442-1450.
- Sosna J., Voigt S., Mathieu S., Kabelitz D., Trad A., Janssen O., Meyer-Schwesinger C., Schutze S., Adam D.** (2013). The proteases HtrA2/Omi and UCH-L1 regulate TNF-induced necroptosis, *Cell Commun Signal*, **11**, 76.
- Sowa M. E., Bennett E. J., Gygi S. P., Harper J. W.** (2009). Defining the Human Deubiquitinating Enzyme Interaction Landscape, *Cell*, **138**: (2), 389-403.
- Stadtmueller B. M., Hill C. P.** (2011). Proteasome Activators, *Mol Cell*, **41**: (1), 8-19.
- Suleiman H. Y., Roth R., Jain S., Heuser J. E., Shaw A. S., Miner J. H.** (2017). Injury-induced actin cytoskeleton reorganization in podocytes revealed by super-resolution microscopy, *JCI Insight*, **2**: (16).
- Sun Y., Zhang H. X., Hu R. M., Sun J. Y., Mao X., Zhao Z. H., Chen Q., Zhang Z. G.** (2014). The Expression and Significance of Neuronal Iconic Proteins in Podocytes, *Plos One*, **9**: (4).
- Tai H. C., Besche H., Goldberg A. L., Schuman E. M.** (2010). Characterization of the Brain 26S Proteasome and its Interacting Proteins, *Front Mol Neurosci*, **3**.
- Tang W. H., Martin K. A., Hwa J.** (2012). Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus, *Front Pharmacol*, **3**.
- Tanida I., Waguri S.** (2010). Measurement of Autophagy in Cells and Tissues, *Methods Mol Biol*, **648**, 193-214.
- Tezel E., Hibi K., Nagasaka T., Nakao A.** (2000). PGP9.5 as a prognostic factor in pancreatic cancer, *Clin Cancer Res*, **6**: (12), 4764-4767.
- Thai T. H., Calado D. P., Casola S., Ansel K. M., Xiao C., Xue Y., Murphy A., Frendewey D., Valenzuela D., Kutok J. L., Schmidt-Suppran M., Rajewsky N., Yancopoulos G., Rao A., Rajewsky K.** (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155, *Science*, **316**: (5824), 604-8.

- Thomson S. C., Blantz R. C.** (2010). A New Role for Charge of the Glomerular Capillary Membrane, *J Am Soc Nephrol*, **21**: (12), 2011-2013.
- Thrower J. S., Hoffman L., Rechsteiner M., Pickart C. M.** (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *Embo J*, **19**: (1), 94-102.
- Tomas N. M., Beck L. H., Jr., Meyer-Schwesinger C., Seitz-Polski B., Ma H., Zahner G., Dolla G., Hoxha E., Helmchen U., Dabert-Gay A. S., Debayle D., Merchant M., Klein J., Salant D. J., Stahl R. A. K., Lambeau G.** (2014). Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy, *N Engl J Med*, **371**: (24), 2277-2287.
- Tomas N. M., Hoxha E., Reinicke A. T., Fester L., Helmchen U., Gerth J., Bachmann F., Budde K., Koch-Nolte F., Zahner G., Rune G., Lambeau G., Meyer-Schwesinger C., Stahl R. A.** (2016). Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy, *J Clin Invest*, **126**: (7), 2519-32.
- Tooze S. A., Abada A., Elazar Z.** (2014). Endocytosis and Autophagy: Exploitation or Cooperation?, *Csh Perspect Biol*, **6**: (5).
- Toth T., Takebayashi S.** (1992). Glomerular podocyte vacuolation in idiopathic membranous glomerulonephritis, *Nephron*, **61**: (1), 16-20.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**: (9), 4350-4.
- Vasmant D., Maurice M., Feldmann G.** (1984). Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat, *Anat Rec*, **210**: (1), 17-24.
- Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W. H., Yates J. R., Koonin E. V., Deshaies R. J.** (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome, *Science*, **298**: (5593), 611-615.
- Virnau P., Mirny L. A., Kardar M.** (2006). Intricate knots in proteins: Function and evolution, *Plos Comput Biol*, **2**: (9), 1074-1079.
- Vivarelli M., Massella L., Ruggiero B., Emma F.** (2017). Minimal Change Disease, *Clin J Am Soc Nephro*, **12**: (2), 332-345.
- von Kopylow K., Kirchhoff C., Jezek D., Schulze W., Feig C., Primig M., Steinkraus V., Spiess A. N.** (2010). Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach, *Hum Reprod*, **25**: (5), 1104-1112.
- Wada H., Kito K., Caskey L. S., Yeh E. T., Kamitani T.** (1998). Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3, *Biochem Biophys Res Commun*, **251**: (3), 688-92.

Walters B. J., Campbell S. L., Chen P. C., Taylor A. P., Schroeder D. G., Dobrunz L. E., Artavanis-Tsakonas K., Ploegh H. L., Wilson J. A., Cox G. A., Wilson S. M. (2008). Differential effects of Usp14 and Uch-L1 on the ubiquitin proteasome system and synaptic activity, *Mol Cell Neurosci*, **39**: (4), 539-548.

Wasserstein A. G. (1997). Membranous glomerulonephritis, *J Am Soc Nephrol*, **8**: (4), 664-74.

Weins A., Schwarz K., Faul C., Barisoni L., Linke W. A., Mundel P. (2001). Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein, *J Cell Biol*, **155**: (3), 393-404.

Whiteside C. I., Cameron R., Munk S., Levy J. (1993). Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis, *Am J Pathol*, **142**: (5), 1641-53.

Wilkinson C. R. M., Seeger M., Hartmann-Petersen R., Stone M., Wallace M., Semple C., Gordon C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains, *Nat Cell Biol*, **3**: (10), 939-943.

Wilkinson K. D., Lee K., Deshpande S., Duerksen-hughes P., Boss J. M., Pohl J. (1989). The Neuron-Specific Protein Pgp-9.5 Is a Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase, *Science*, **246**: (4930), 670-673.

Wilson P. O. G., Barber P. C., Hamid Q. A., Power B. F., Dhillon A. P., Rode J., Day I. N. M., Thompson R. J., Polak J. M. (1988). The Immunolocalization of Protein Gene-Product 9.5 Using Rabbit Polyclonal and Mouse Monoclonal-Antibodies, *Brit J Exp Pathol*, **69**: (1), 91-104.

Xie Z. P., Klionsky D. J. (2007). Autophagosome formation: Core machinery and adaptations, *Nat Cell Biol*, **9**: (10), 1102-1109.

Xu P., Duong D. M., Seyfried N. T., Cheng D. M., Xie Y., Robert J., Rush J., Hochstrasser M., Finley D., Peng J. (2009). Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation, *Cell*, **137**: (1), 133-145.

Yamazaki T., Hibi K., Takase T., Tezel E., Nakayama H., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nagasaka T., Nakao A. (2002). PGP9.5 as a marker for invasive colorectal cancer, *Clin Cancer Res*, **8**: (1), 192-195.

Yao T. T., Song L., Xu W., DeMartino G. N., Florens L., Swanson S. K., Washburn M. P., Conaway R. C., Conaway J. W., Cohen R. E. (2006). Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1, *Nat Cell Biol*, **8**: (9), 994-U92.

Yaoita E., Yao J., Yoshida Y., Morioka T., Nameta M., Takata T., Kamiie J., Fujinaka H., Oite T., Yamamoto T. (2002). Up-regulation of connexin43 in glomerular podocytes in response to injury, *Am J Pathol*, **161**: (5), 1597-1606.

Yasuda T., Nihira T., Ren Y. R., Cao X. Q., Wada K., Setsuie R., Kabuta T., Wada K., Hattori N., Mizuno Y., Mochizuki H. (2009). Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse model of Parkinson's disease, *J Neurochem*, **108**: (4), 932-44.

Yu H., Yanagisawa Y., Forbes M. A., Cooper E. H., Crockson R. A., MacLennan I. C. (1983). Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function, *J Clin Pathol*, **36**: (3), 253-9.

Zambrowicz B. P., Imamoto A., Fiering S., Herzenberg L. A., Kerr W. G., Soriano P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: (8), 3789-94.

Veröffentlichungen

Reinicke A. T., Raczkowski F., Muhlig M., Schmucker P., Lischke T., Reichelt J., Schneider E., Zielinski S., Sachs M., Jurack E., Tolosa E., Kurts C., Mittrucker H. W., Meyer-Schwesinger C. (2019). **Deubiquitinating Enzyme UCH-L1 Promotes Dendritic Cell Antigen Cross-Presentation by Favoring Recycling of MHC Class I Molecules**, *J Immunol*, **203**: (7), 1730-1742.

Reinicke A. T., Laban K., Sachs M., Kraus V., Walden M., Damme M., Sachs W., Reichelt J., Schweizer M., Janiesch P. C., Duncan K. E., Saftig P., Rinschen M. M., Morellini F., Meyer-Schwesinger C. (2019). **Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) loss causes neurodegeneration by altering protein turnover in the first postnatal weeks**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **116**: (16), 7963-7972.

Radon V., Czesla M., Reichelt J., Fehlert J., Hammel A., Rosendahl A., Knop J. H., Wiech T., Wenzel U. O., Sachs M., Reinicke A. T., Stahl R. A. K., Meyer-Schwesinger C. (2018). **Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 is required for regulated protein degradation through the ubiquitin proteasome system in kidney**, *Kidney Int*, **93**: (1), 110-127.

Vorträge

Enzymatic inactive Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) promotes antibody-mediated podocyte injury

American Society of Nephrology (ASN), Kidney Week 2019 vom 05.-10.11.2019 in Washington (USA)

Impact of toxic gain of function of Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) on podocyte integrity

Jahreskongress der Gesellschaft für Nephrologie (DGfN), 27.-30.09.2018 in Berlin

Poster

Reichelt J, Pohl S, Zahner G, Sachs M, Krüger E, Meyer-Schwesinger C

Enzymatic inactive Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) effects podocyte integrity by promoting injury during experimental immune-mediated disease

Jahreskongress der Gesellschaft für Nephrologie (DGfN), 10.-13.10.2019 in Düsseldorf

Reichelt J, Pohl S, Zahner G, Hoxha E, Stahl RAK, Meyer-Schwesinger C

Impact of toxic gain of function of Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) on podocyte integrity

American Society of Nephrology (ASN), Kidney Week 2018 vom 23.-28.10.2018 in San Diego (USA)

Reichelt J, Reinicke AT, Fehlert J, Sachs M, Knop JH, Zahner G, Meyer-Schwesinger C

Altered hydrolysis function of Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) by oxidative modification affects protein homeostasis in podocytes

American Society of Nephrology (ASN), Kidney Week 2017 vom 31.10.-05.11.2017 in New Orleans (USA) sowie Jahreskongress der Gesellschaft für Nephrologie (DGfN), 14.-17.09.2017 in Mannheim

Reichelt J, Reinicke AT, Sachs M, Knop JH, Beeken M, Meyer-Schwesinger C

Enzymatic active and inactive Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) exert differential effects in podocytes

Jahreskongress der Gesellschaft für Nephrologie (DGfN), 10.-13.09.2016 in Berlin

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich stets zu dieser Arbeit motiviert haben. Der größte Dank geht an meine Betreuerin und gute Kollegin Frau **Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger**. Sie hat mich stets unterstützt und war immer verständnisvoll – sowohl im Berufs- als auch im Privatleben. Danke für deine Kritik und anregenden Diskussionen. Ich danke dir vielmals, dass ich Teil deines Labors sein darf.

Danke an **Prof. Dr. Julia Kehr** für die Bereitschaft zur Betreuung und Unterstützung meiner Promotion.

Ein weiterer Dank geht an **PD Dr. Gunther Zahner**, der die Targetvektoren konstruiert sowie **PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer**, die die UCH-L1-überexprimierenden Tiere generiert hat.

Ein großer Dank geht an Frau **Prof. Dr. Elke Krüger** für die Etablierung der Ko-Immunopräzipitationsexperimente und für die tolle Kooperation.

Herzlichen Dank auch an **Dr. Antonio Virgilio Failla** und **Sinah Skuza**, die die schönen STED-Aufnahmen ermöglicht haben.

Der größte Dank geht an unser tolles Labor, das mir jeden Tag mit Witz und Charme begegnet. Besonders möchte ich **Marlies Sachs** und **Stephanie Zielinski** für stetige Unterstützung und Motivation danken.

Lieben Dank an meine Familie und Freunde, die mich zwar oft belehrt aber auch oft genug von Misserfolgen abgelenkt haben. Meine tiefe Dankbarkeit gilt meinem Lebenspartner, der mir stets mit Liebe, Verständnis und Unterstützung begegnet ist.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Hamburg, den 30.09.2019

Julia Reichelt