

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin

Institut für Neuroanatomie

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune

Beeinflusst eine systemische Inhibition der Aromatase in *Mus musculus* die glomeruläre Ultrastruktur und renale Funktion?

Dissertation

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

vorgelegt von:

Benjamin Tilman Bay

aus Calw

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 10.08.2020

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Lars Fester

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Markus Gödel

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2. Einleitung	7
2.1 <i>Die Niere</i>	8
2.1.1 Morphologie und Funktion	8
2.1.2 Histologie	9
2.1.3 Die Nierenkörperchen	9
2.2 <i>Die Blut-Harnschranke</i>	10
2.2.1 Das glomeruläre Endothel	11
2.2.2 Die glomeruläre Basalmembran	12
2.2.3 Der Podozyt	12
2.3 <i>Das Foot Process Effacement</i>	16
2.3.1 Einleitung	16
2.3.2 Phasen des Foot Process Effacement	17
2.3.3 Pathophysiologie des Foot Process Effacement	18
2.3.4 Relevanz des Foot Process Effacement	19
2.4 <i>Physiologie der glomerulären Filtration</i>	20
2.4.1 Mechanismen	20
2.4.2 Quantifizierung der renalen Funktion	21
2.5 <i>Estrogene</i>	22
2.5.1 Synthese	23
2.5.2 Wirkmechanismus der Estrogene	24
2.5.3 Die Aromatase	25
2.5.4 Aromatase Inhibitoren	26
2.5.5 Aromatase Knock Out Tiere	27
2.6 <i>Geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Niere</i>	27
3. Material und Methoden	30
3.1 <i>Material</i>	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	31
3.1.3 Lösungen	32
3.1.4 Reaktionskits	35
3.1.5 PCR Sonden	35

3.1.6 Versuchstiere	35
3.2 Methoden	36
3.2.1 Versuchsaufbau	36
3.2.2 Tierexperimentelle Methoden	38
3.2.3 Molekularbiologie	42
3.2.4 Histologie	44
3.2.5 Immunologie	46
3.2.6 Proteinbiochemie	48
3.2.7 Datenanalyse	50
4. Ergebnisse	51
4.1 <i>Aromatase Knock Out Maus</i>	51
4.1.1 Genotyp	51
4.1.2 Phänotyp	58
4.1.3. Aromatase Funktionsmessung	61
4.2 <i>Lichtmikroskopie der renalen Glomeruli</i>	62
4.3 <i>Ultrastruktur der renalen Glomeruli</i>	64
4.3.1 Normalverteilungsanalyse	65
4.3.2 Fußfortsatzbreite der weiblichen Tiere	66
4.3.3 Fußfortsatzbreite der männlichen Tiere	68
4.4 <i>Urin-Analysen</i>	70
4.4.1 Normalverteilungsanalyse	71
4.4.2 Albumin-Kreatinin Ratio der weiblichen Tiere	72
4.4.3 Albumin-Kreatinin Ratio der männlichen Tiere	74
5. Diskussion	75
5.1 <i>Die Aromatase Knock Out Maus</i>	75
5.1.1 Eindeutiger Geno- und Phänotyp bei aberranter Funktionsmessung	75
5.2. <i>Einfluss von Sexualhormonen auf die podozytäre Ultrastruktur</i>	75
5.2.1 Podozytäre Ultrastruktur im Mausmodell	75
5.2.2 Aromatase Hemmung führt zu einer veränderten Ultrastruktur der Niere	76
5.2.3 Ein Knock Out der Aromatase hat keinen einheitlichen Effekt auf die glomeruläre Ultrastruktur	79
5.2.4 17 β -Estradiol als renoprotektiver, oder Testosteron als renotoxischer Faktor?	80

5.2.5 Gonadales vs. podozytäres Estrogen	82
5.3 <i>Sexualhormone und die renale Funktion</i>	82
5.3.1 Kreatinin und Protein Werte im Mausmodell	82
5.3.2 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die selektive Permeabilität der Niere	84
6. Zusammenfassung	87
6.1. <i>Deutsch</i>	87
6.2. <i>Englisch</i>	88
7. Abkürzungsverzeichnis	89
8. Literaturverzeichnis	91
9. Danksagung	102
10. Lebenslauf	103
11. Eidesstattliche Versicherung	104

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Frauen zeigen im Rahmen von chronische renale Erkrankungen ein besseres Outcome im Vergleich zu männlichen Patienten. Ein endgültiges Verständnis bezüglich des pathophysiologischen Hintergrundes des sexuellen Dimorphismus fehlt bis dato. Ein diskutierter Faktor bezüglich des Outcomes bei renalen Erkrankungen ist die Rolle von zirkulierenden Sexualhormonen, unter anderem dem Hormon 17β -Estradiol. Für die Synthese von 17β -Estradiol ist das Enzym Aromatase als Katalysator des letzten Schrittes der Hormonsynthese unerlässlich.

Renale Erkrankungen zeigen sowohl morphologische als auch funktionelle Merkmale in ihrer Manifestation und Diagnose. Eine der typischen Veränderungen der renalen Struktur im Rahmen von Nierenerkrankungen ist eine ultrastrukturelle Veränderung der tertiären Fußfortsätze der Podozyten, der viszeralen Zelle des renalen Glomerulus. Ebenfalls kommt es im Rahmen von einigen renalen Erkrankungen regelhaft zum Selektivitätsverlust der renalen Filtrationsbarriere. Dies manifestiert sich als sogenannte Proteinurie, der Ausscheidung von Proteinen über den Harn. Eine direkte Korrelation der beiden Veränderungen (sowohl morphologisch als auch funktionell) ist nicht gegeben, jedoch sind eine Verbeiterung der Fußfortsätze und eine Proteinurie regelhaft in renalen Erkrankungen anzutreffen.

Die von uns bearbeitete Fragestellung lautet somit wie folgt: Kommt es nach einer Verminderung an zirkulierendem 17β -Estradiol durch systemische Hemmung der Aromatase zu einer Veränderung der podozytären Ultrastruktur und renalen Funktion in einem murinen Modell? Für die Betrachtung der Podozyten und Ermittlung der Fußfortsatzbreite als objektives Maß einer veränderten Ultrastruktur steht die Transmissionselektronenmikroskopie zur Verfügung. Die renale Funktion wurde durch uns mittels der Bestimmung von Proteinen und Kreatinin aus dem gesammelten Urin der Versuchstiere und dem daraus resultierenden Albumin-Kreatinin Quotient quantifiziert.

2. Einleitung

Nierenerkrankungen sind wegen ihrer hohen Prävalenz und volkswirtschaftlichen Bedeutung in der heutigen Gesellschaft von immenser Wichtigkeit. In den letzten Jahrzehnten wurde Evidenz generiert, dass Frauen bei renalen Erkrankungen ein besseres Outcome haben als Männer (Neugarten et al. 2000), welches auf einen möglichen Einfluss von geschlechtsspezifischen Steroiden auf die Niere hindeutet (Kummer et al. 2012).

Für die Synthese der Sexualsteroiden sind primär die Gonaden verantwortlich, jedoch konnte gezeigt werden, dass auch Zellen anderer Gewebearten, beispielsweise hippocampale Neurone, 17β -Estradiol *de novo* synthetisieren können (Prange-Kiel et al. 2003; Kretz et al. 2004).

Für die renale Funktion spielen Podozyten, eine Zelle der glomerulären Filtrationsschranke, eine essentielle Rolle (Scott & Quaggin 2015). In unserem Labor konnte nachgewiesen werden, dass Podozyten das Enzym Aromatase exprimieren, welches den letzten Syntheseschritt vom Testosteron zum 17β -Estradiol katalysiert (Fester et al. - Data unpublished). Bis dato war ein Nachweis von Aromatase in renalen Gewebe und im glomerulären Endothel, jedoch nicht spezifisch in Podozyten möglich gewesen (Dalla Valle et al. 2004; Prabhu et al. 2010). Zusätzlich konnten Kummer und Kollegen feststellen, dass in Podozyten Estrogen Rezeptoren exprimiert werden. Somit besitzt dieser Zelltyp die Möglichkeit selbst 17β -Estradiol zu produzieren, und ist über Estrogen Rezeptoren empfänglich für das sowohl lokal als auch systemisch synthetisierte 17β -Estradiol (Kummer et al. 2011).

Im Rahmen von renalen Erkrankungen kommt es regelhaft zur Entwicklung von laborchemischen und ultrastrukturellen Merkmalen - der Proteinurie und einer Abflachung der podozytären Fußfortsätze, dem sogenannten Foot Process Effacement. Bei der Proteinurie handelt es sich um eine Ausscheidung von Proteinen über den Harn, welches vor allem im Rahmen von nephrotischen Syndromen vorkommt (Hull & Goldsmith 2008). Neben diesem laborchemischen Parameter ist es möglich, durch eine Betrachtung der podozytären Ultrastruktur eine Veränderung der Architektur der Podozyten festzustellen, das bereits genannte Foot Process Effacement (Greka & Mundel 2012).

Die Zielsetzung dieser Promotion lautet, festzustellen, ob es durch Veränderungen der 17β -Estradiol Synthese zu einer Beeinflussung der renalen

Funktion im Sinne einer Proteinurie, und zu einer Abweichung der Ultrastruktur der Podozyten im Mausmodell kommt.

2.1 Die Niere

2.1.1 Morphologie und Funktion

Die menschliche Niere ist ein paariges Organ, welches für den Wasser-, Elektrolyt-, Säure-Basenhaushalt und die Blutdruckregulation unerlässlich ist. Neben diesen Funktionen zählen die Ausscheidung von wasserlöslichen Schadstoffen und die Bildung von Hormonen wie beispielsweise Erythropoetin, Angiotensin II und Calcitriol zu den Aufgaben der Niere. Die Hauptfunktion der Niere besteht jedoch in der Bildung von Urin. Pro Tag wird ca. 160-180 Liter (l) Primärharn von der Niere gebildet. Der Primärharn wird im renalen Tubulussystem konzentriert, wodurch die am Tag ausgeschiedene Menge von 1,5 l Sekundärharn entsteht.

Anatomisch ist die Niere im Retroperitonealraum gelegen, umgeben von retroperitonealem Fettgewebe und einer ventral gelegenen Faszia, der Gerota Faszia. Die Niere hat eine Größe von ca. 10-12 cm Länge und 5-6 cm Dicke. Am jeweils medialen Rand ist der Nierenhilus, die Eintrittspforte in die Niere, lokalisiert. Durch den Hilus treten die versorgenden Gefäße der Niere aus, bzw. in die Niere hinein. Auch verlässt der Harnleiter, welcher den von der Niere produzierten Harn transportiert, die Niere am Hilus.

Die arterielle Durchblutung wird durch die versorgende *Arteria renalis* direkt aus der Aorta gewährleistet, während der venöse Abfluss über die *Vena renalis* in die *Vena cava inferior* erfolgt. Die Innervation der Niere findet durch Äste des *Plexus coeliacus* über die *Nervi splanchnici* aus dem sympathischen Nervensystem statt. Sie verlaufen begleitend zu den arteriellen Gefäßen der Niere.

Der Abtransport des in der Niere gebildeten Harns, geschieht über ein Kelchsystem, welches beidseits in den Harnleiter, auch Ureter genannt, mündet. Dieser transportiert den entstandenen Urin weiter in die Harnblase, von wo er über die Harnröhre ausgeschieden wird.

2.1.2 Histologie

Histologisch ist die Niere in zwei Abschnitte unterteilt. Außen, unterhalb der Nierenkapsel gelegen, befindet sich der renale Cortex, zentral gelegen die Medulla.

Die funktionelle Einheit der Niere besteht aus dem sogenannten Nephron, welches wiederum in zwei Abschnitte eingeteilt werden kann. Das Nephron setzt sich zusammen aus dem Nierenkörperchen und einem langstreckigen Tubulussystem. Pro Niere gibt es ca. eine Millionen Nephrone, welche hauptsächlich im renalen Cortex lokalisiert sind. Im Nierenkörperchen findet die Filtration des Blutes statt. Der entstandene Primärharn wird über ein basal gelegenes Röhrchen, dem Tubulus, abtransportiert. Im Verlauf der langstreckigen Tubuli kommt es zur Rückresorption von frei-filtrierte Elektrolyten und Wassermolekülen, sodass am Ende der Tubuli der Endharn entsteht.

Der renale Cortex enthält neben den Nierenkörperchen auch Gefäße und die proximalen und distalen Tubuli. Die Tubuli bilden den Hauptteil des Cortex, mit wenig Interstitium zwischen den benachbarten Tubuli. Weiter setzen sich die Nierenkanälchen in die Medulla fort. Dort mündet der distale Tubulus in einen Verbindungstubulus zu den Sammelrohren, welche sich über die *Ductus papillares* zum renalen Kelchsystem vereinigen. Der dort gesammelte Urin wird über das Kelchsystem in die Harnleiter und schlussendlich in die Harnblase transportiert.

2.1.3 Die Nierenkörperchen

Das Nierenkörperchen, auch Malphigi-Körperchen, setzt sich aus zwei Abschnitten zusammen. Es wird nach außen hin von einer Kapsel, der sogenannten Bowman-Kapsel begrenzt. Innerhalb der Bowman-Kapsel stülpt sich ein Kapillarknäuel, der Glomerulus, ein.

Jeder einzelne Glomerulus hat ein eigenes zuführendes Gefäß, die *Arteriola afferens*, welche in das Nierenkörperchen hineinzieht. Über die *Arteriola afferens* wird arterielles Blut zur Filtration innerhalb des Glomerulus herantransportiert. Im Glomerulus findet die Filtration des Blutes über die Blut-Harn Schranke statt. Der Abtransport des Blutes nach der Filtration erfolgt über eine weitere Arteriole, die *Arteriola efferens*. Die *Arteriolae* sind die Widerstandsgefäße des Glomerulus.

Über den Tonus dieser Gefäße wird somit der Perfusionsdruck des Glomerulus erzeugt, welcher entscheidend für die renale Filtration ist.

Der Glomerulus setzt sich aus drei Zelltypen zusammen – Endothel, Mesangium-Zellen und Podozyten. Während die Mesangium-Zellen eine wichtige Stützfunktion im Nierenkörperchen ausüben, bilden das glomeruläre Endothel und die Podozyten zusammen die Blut-Harnschranke. Diese permselektive Membran wird durch eine Zwischenschicht aus Extrazellulärmatrix, der glomerulären Basalmembran (GBM), zwischen Endothel und Podozyten komplettiert.

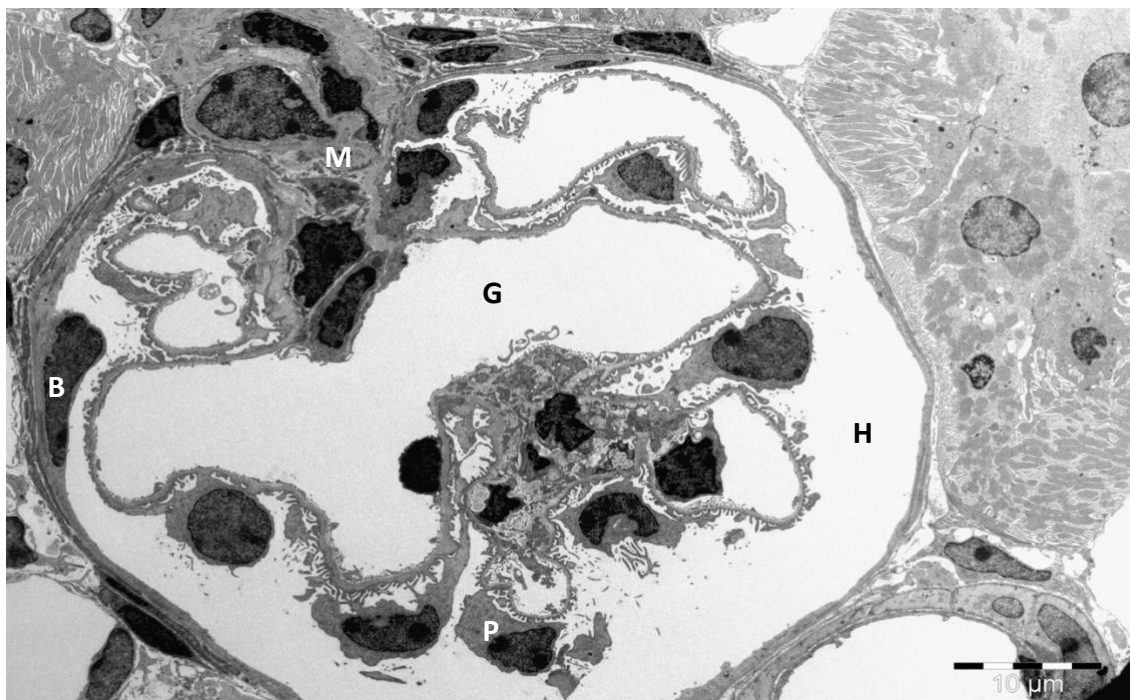


Abbildung 1: Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht eines renalen Glomerulus. B: Bowman Kapsel, G: Gefäßseite, H: Harnseite, M: Mesangium, P: Podozytäre Soma, Maßstab: 10 µm, Bildquelle: Prof. Dr. rer. nat Lars Fester, Benjamin Bay, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2.2 Die Blut-Harnschranke

Die selektive Filtration von Plasma ist für den menschlichen Organismus unerlässlich. Die Filtrationseinheit des Glomerulus besteht aus drei Komponenten, dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren, der glomerulären Basalmembran, sowie den viszerale Zellen der Niere, den Podozyten (Scott & Quaggin 2015; Huber & Benzing 2005; Benzing 2006). Kommt es zum Schaden von einem der drei genannten Bestandteile, verliert die

Filtrationseinheit ihre Selektivität, welches mit Konsequenzen für den gesamten Organismus verbunden ist. Im Rahmen von renalen Erkrankungen, kommt es regelhaft zur Beeinträchtigung der Blut-Harnschanke. Während der produzierte Endharn normalerweise frei von Proteinen ist, kommt es im Rahmen eines Funktionsverlustes der Filtrationseinheit zu einem typischen Kennzeichen – der Proteinurie (D'Amico & Bazzi 2003). Im Folgenden soll auf die Zusammensetzung der Blut-Harnschanke eingegangen werden.

2.2.1 Das glomeruläre Endothel

Die zuführende *Arteriola afferens* verzweigt sich direkt nach dem Eintritt in den Glomerulus zu einem filigranen Kapillarnetzwerk, welches aus dem glomerulären Endothel besteht. Das glomeruläre Endothel ist, im Vergleich zu einem Großteil des im Menschen vorkommenden Endothels, ein sogenanntes fenestriertes (gefenstertes) Endothel. Diese kleinen Öffnungen besitzen eine Breite von ca. 60-100 nm (Satchell & Braet 2009). Durch diese Lücken zwischen den flachen endothelialen Zellen, ist die Passage von kleinen Molekülen wie Glucose, Elektrolyten und Wasser möglich.

Zusätzlich zur Fenestrierung, weist das glomeruläre Endothel eine weitere Besonderheit auf. Auf der luminalen Seite befindet sich eine Molekülschicht, bestehend aus negativ geladenen Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen, welche zusammen als Glykokalix bezeichnet werden (Haraldsson et al. 2008). Diese Molekülschicht absorbiert zusätzlich noch Plasma Bestandteile. Die Kombination aus Glykokalix und den absorbierten Plasmabestandteilen wird als *Endothelial surface layer* bezeichnet (ESL), welche eine Dicke von ca. 300 nm beträgt (Rostgaard & Qvortrup 1997; Hjalmarsson et al. 2004).

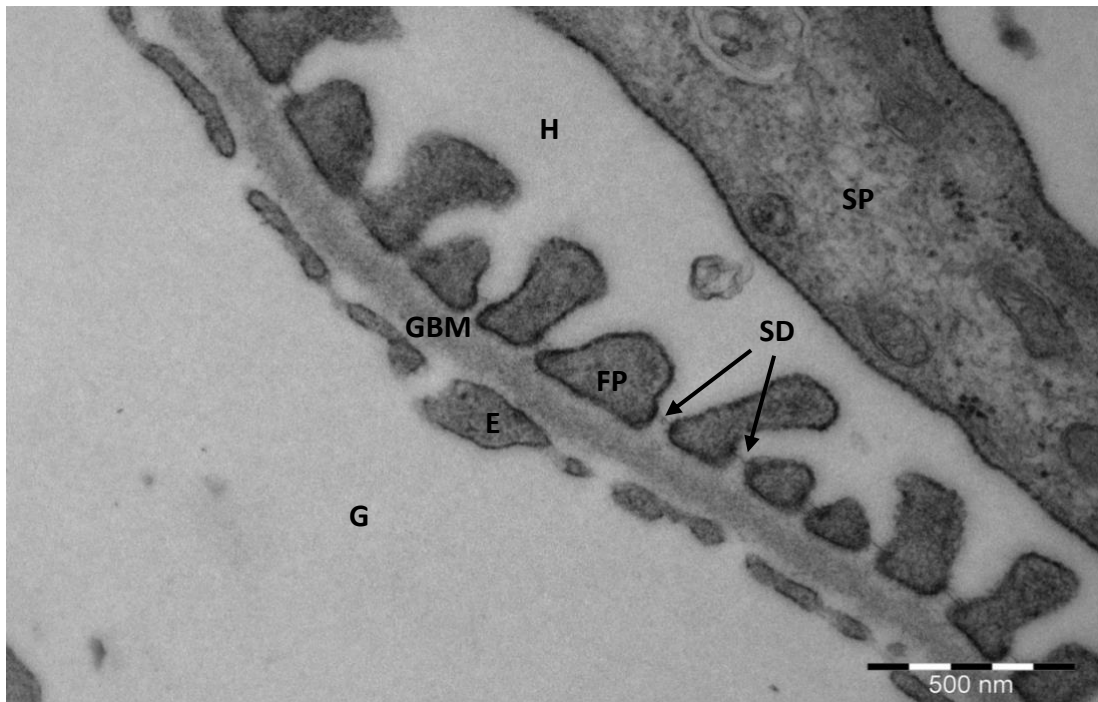


Abbildung 2: Physiologische Ultrastruktur der Blut-Harnschanke eines Glomerulus. E: fenestriertes Endothel, FP: tertiärer Fußfortsatz, G: Gefäßlumen, GBM: Glomeruläre Basalmembran, H: Harnseite, SD: Schlitzdiaphragma, SP: sekundärer Fußfortsatz, Maßstab: 500 nm, Bildquelle: Prof. Dr. rer. nat Lars Fester, Benjamin Bay, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2.2.2 Die glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran ist eine geteilte Extrazellulärmatrix zwischen dem Endothel, welches auf der Blutseite der Blut-Harnschanke liegt und dem Podozyten, welcher sich auf der Harnseite befindet (Miner 2012). Die GBM setzt sich aus drei Schichten zusammen. Auf der Blutseite gelegen, direkt dem Endothel angrenzend, befindet sich die *Lamina rara externa*. Zur Harnseite gelegen befindet sich die *Lamina rara interna*. Zwischen diesen beiden *Laminae* befindet sich die *Lamina densa* (Miner 2011).

2.2.3 Der Podozyt

Der Podozyt, auch die viszerale Zelle des Glomerulus genannt, ist der dritte Bestandteil der Blut-Harnschanke (Scott & Quaggin 2015). Entwicklungsgeschichtlich entstammen die Podozyten aus dem *mesenchymalen metanephrogenen Blastem* der Ureterknospe. In ihrer Entwicklung durchlaufen

Podozyten eine mesenchymal-epitheliale Transition, um ihre Funktion als epitheliale Zelle auszuüben (Horster et al. 1999).

Der Podozyt erfüllt zwei Hauptaufgaben im renalen Glomerulus. Diese besteht einerseits in der Synthese der glomerulären Basalmembran mit dem glomerulären Endothel, und andererseits in der Aufrechterhaltung der selektiven Permeabilität in Zusammenarbeit mit dem GBM und dem glomerulären Endothel. Bei der Aufrechterhaltung der Selektivität scheint der Fußfortsatz des Podozyten mit seinen Domänen eine entscheidende Rolle zu spielen (Greka & Mundel 2012).

2.2.3.a Architektur des Podozyten

Bei Podozyten handelt es sich um hoch differenzierte Zellen mit einer eingeschränkten Fähigkeit zur Regeneration (Lasagni et al. 2013). Podozyten können in drei funktionelle Abschnitte unterteilt werden. Der Zellkörper, als größter Anteil der Zelle, ist reich an rauem und glatten Endoplasmatischen Retikulum, weiteren Zellorganellen und Mitochondrien, welche den hohen Energiebedarf des Podozyten decken. Vom Zellkörper aus, erstrecken sich lange primäre Ausläufer in Richtung der glomerulären Kapillaren. Diese primären Ausläufer beherbergen kaum Organellen, jedoch ein dichtes Aktinzytoskelett (Mundel & Kriz 1995).

Podozyten stehen über ihr drittes Kompartiment, den podozytären Fußfortsätzen (FP), in ständigem Kontakt zur GBM. In den Fußfortsätzen lassen sich dynamische Aktinfilamente nachweisen, welche dem Podozyten eine kontraktile Fähigkeit geben. Der Podozyt ähnelt somit sowohl von der Struktur des Aktinzytoskelettes, als auch vom genetischen Profil einer glatten Muskelzelle (Saleem et al. 2008).

Die Fußfortsätze der Podozyten bedecken die gesamte Oberfläche der GBM. Hierbei liegen nie zwei FPs von einem Podozyten nebeneinander, sondern die FPs entstammen jeweils von unterschiedlichen Podozyten. Hierdurch ergibt sich das sogenannte interdigitierende Muster der podozytären Fußfortsätze (Mundel & Kriz 1995). Zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen bildet sich ein Spaltraum, welcher von einer Schlitzmembran überbrückt wird.

Podozyten bilden das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel, welches sich direkt an der glomerulären Basalmembran anliegt. Die Adhäsion des Podozyten findet ausschließlich über die Fußfortsätze statt, während der Zellkörper sich frei

flottierend auf der Harnseite des Bowman-Raumes befindet. Durch diese rein fokalen Adhäsionen, ist der Podozyt auf eine adäquate Bindung seiner Fußfortsätze an die GBM angewiesen (Kriz et al. 2013).

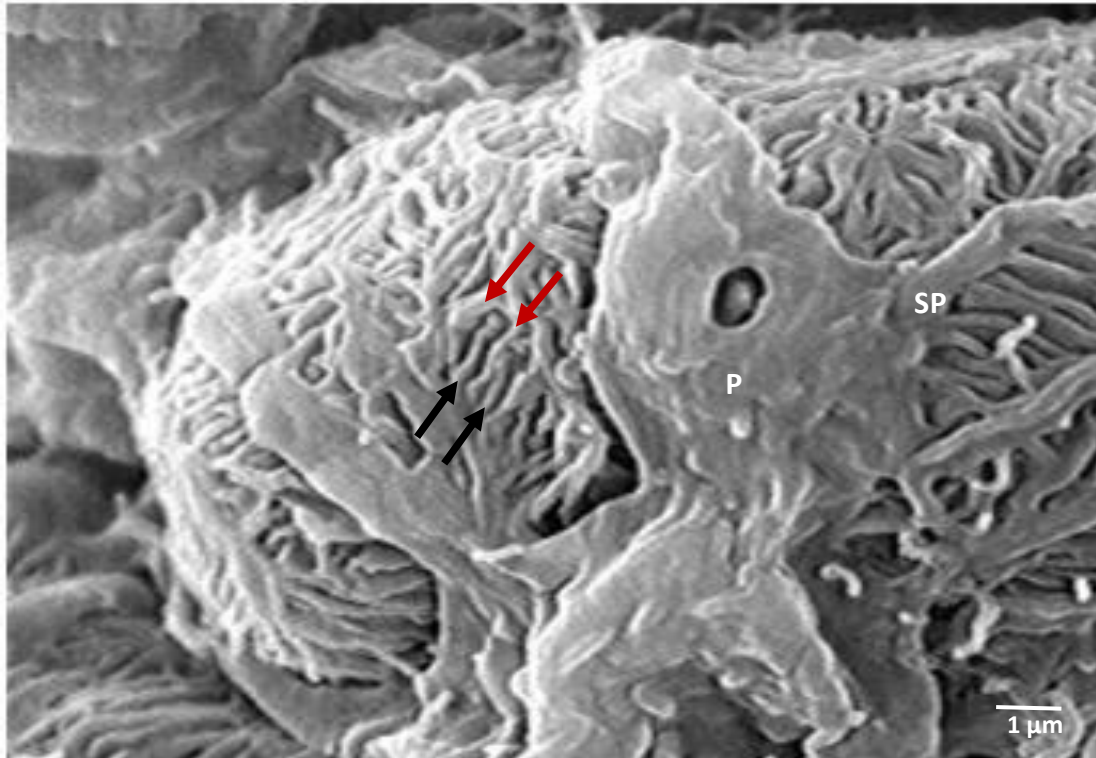


Abbildung 3: Raster-Elektronenmikroskopisches Bild eines physiologischen Glomerulus.
P: Podozytäres Soma, SP: sekundäre Fußfortsätze, Pfeile: interdigitierende tertiäre Fußfortsätze, Maßstab: 1 μm , Bildquelle: Prof. Dr. rer. nat Lars Fester, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2.2.3.b Teilungsfähigkeit

Im Falle eines Verlustes eines Podozyten kommt es zu einer Freilegung einer Strecke der GBM. Um eine freie Passage von Molekülen zu verhindern, ist die primäre Reaktion der restlichen Podozyten eine Hypertrophie, um die GBM wieder vollständig abzudecken (Wiggins et al. 2005). Bei einem ausgeprägten Verlust von Podozyten ist die Hypertrophie nicht mehr ausreichend und die Notwendigkeit einer Zellteilung besteht. In einigen renalen Erkrankungen wie beispielsweise der Minimal Change Disease (MCD – einer Erkrankung in welcher sich die Podozyten makroskopisch unauffällig, jedoch transmissionselektronenmikroskopisch mit einer Abflachung der Fußfortsätze zeigen), der Fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS – makroskopische

Sklerose in einigen Glomeruli, welche jedoch nur segmental betroffen sind) und der diabetischen Nephropathie konnte eine Hochregulation von Zellzyklusproteinen nachgewiesen werden (Srivastava et al. 2003).

Bis vor einigen Jahren überwog die Meinung, dass es sich bei Podozyten um ausdifferenzierte Zellen ohne die Möglichkeit einer mitotischen Zellteilung, ähnlich wie Neurone, handelt (Mundel & Shankland 2002). Die Unfähigkeit, eine Zellteilung zu durchlaufen, liegt dem hochkomplexen Aktinzytoskelett zu Grunde. Zur Zellteilung ist es notwendig, dass sich intrazellulär ein Aktin-Ring ausbildet, welcher die Zelle schlussendlich teilt (Heng & Koh 2010). In Zellen wie Neuronen und Podozyten, welche auf einen kontraktile und dynamischen Auf- und Abbau des Zytoskeletts für die Ausübung ihrer Funktion angewiesen sind, ist die Gewährleistung eines solchen Aktin-Ringes nicht möglich, und somit die Zellteilung verhindert (Lasagni et al. 2013).

Der Versuch dieser post-mitotischen Zellen eine Zellteilung zu durchlaufen, ist jedoch, wie bereits beschrieben, nicht mit einer adäquaten podozytären Funktion vereinbar. Es kommt zu einer sogenannten „mitotischen Katastrophe“ mit dem Kollaps der podozytären Struktur und der Loslösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran (Lasagni et al. 2013; Liapis et al. 2013).

2.2.3.c Fußfortsätze

Der podozytäre Fußfortsatz kann in drei Domänen eingeteilt werden, in eine basale Domäne, die Schlitzmembrandomäne und eine apikale Domäne, welche allesamt einen essentiellen Anteil an der Funktion des Podozyten tragen (Greka & Mundel 2012).

Die basale Membrandomäne verbindet den Podozyten mit der GBM, und sorgt somit für die Verankerung der Zelle (Pavenstädt et al. 2003). Dieser Anteil ist über Transmembrandomänen mit der Kollagen-reichen GBM verbunden und sorgt somit für die Adhäsion des Podozyten an der GBM. Die Transmembrandomänen sind ein Heterodimer bestehend aus Integrinen (Adler 1992).

Der oberste Anteil des Fußfortsatzes ist die apikale Membran Domäne. Die Membran dieses Abschnittes des Podozyten ist reich an Podocalyxin (Kerjaschki et al. 1984). Durch das Podocalyxin, einem Sialoglykoprotein mit negativ

geladenen Sialinsäuren und Sulfaten, kommt es zur Entstehung einer stark negativen Oberflächenladung der Membran.

Zwischen der apikalen und der basalen Membrandomäne, befindet sich das Schlitzdiaphragma. Die Fußfortsätze der Podozyten haben keinen direkten Kontakt, sondern es bildet sich ein Spalt zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen aus. In diesen Spalt ragt das Schlitzdiaphragma, ausgehend von den FPs, hervor (Reiser et al. 2000). Das Schlitzdiaphragma stellt eine zentrale Schaltstelle der podozytären Funktion dar. Eine gestörte Schlitzdiaphragma Zusammensetzung, geht meist mit dem Verlust der glomerulären Selektivität einher (Grahammer et al. 2016). Grahammer und Mitarbeitern ist es durch Nutzung von Kryo-Elektronenmikroskopie gelungen darzustellen, dass Nephrin und Nephl, zwei Proteine der Schlitzdiaphragma Domäne, ein kompartimentierten Zwischenraum inmitten der podozytären Fußfortsätze erzeugen (Grahammer et al. 2016). Die Kompartimentierung, welche etagenförmig angelegt ist, erzeugt eine mehrschichtige Siebfunktion (Grahammer et al. 2016; Assady et al. 2017).

2.2.3.d Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett bildet das Rückgrat des Podozyten. Es sind alle Bestandteile eines typischen eukaryotischen Zytoskeletts vorhanden. Hierzu zählen Intermediärfilamente (IF), Mikrotubuli (MT) und Aktinfilamente (AF) (Faul 2014). Während IF und MT im Soma und den primären Ausläufern des Podozyten lokalisiert sind, befinden sich die AF hauptsächlich in den Fußfortsätzen (Vasmant et al. 1984).

Die Aktinfilamente des Fußfortsatzes bilden eine kontraktile Einheit, welche sich dynamisch an die äußeren Umstände des Podozyten anpassen kann. Das Zytoskelett des Podozyten befindet sich somit im ständigen Umbau, welcher von Regulatorproteinen gesteuert wird (Faul et al. 2007).

2.3 Das Foot Process Effacement

2.3.1 Einleitung

Die drei genannten Domänen sind essentiell für die Funktion jedes einzelnen Podozyten. Kommt es zu einem Schaden einer der Domänen, so führt dies zu

einer Veränderung des Aktinzytoskelettes, welches sich in einem morphologischen Korrelat, dem sogenannten Foot Process Effacement (FPE) widerspiegelt (Greka & Mundel 2012). Eine Effacement ist bei nephrotischen Erkrankungen der Niere regelhaft anzutreffen. Die nephrotischen Erkrankungen subsummieren Pathologien welche mit einem Nierenschaden und einer begleitenden Proteinurie vergesellschaftet sind (Greka & Mundel 2012). Bei einem Effacement kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskelettes vom kontraktilen Phänotyp, zu einer dichtgepackten basalen Aktinmatte (Shirato et al. 1996; Kriz et al. 2013).

Im Rahmen des Effacement flachen sich die normalerweise filigranen podozytären Fußfortsätze ab, und bedecken die glomeruläre Basalmembran flächenhaft. Die erstmalige Beschreibung des FPE fand 1957 durch die elektronenmikroskopische Analyse von renalem Gewebe aus Patienten mit einem nephrotischem Syndrom statt (Farquhar et al. 1957). Das FPE beschreibt somit den Verlust der klassischen interdigitierenden Struktur der tertiären Fußfortsätze des Podozyten. Die ultrastrukturelle Veränderung des Effacements mit dem begleitenden Verlust der Funktion des Schlitzdiaphragmas geht meist mit einer Proteinurie, und somit mit einem Verlust der selektiven Permeabilität der Niere, einher (Greka & Mundel 2012). Ob die Reorganisation jedoch kausal für die Entstehung der Pathologie ist, oder ob es sich dabei um eine Adaptation des Podozyten handelt, ist bis heute unklar (Kriz et al. 2013). Im klinischen Alltag ist ein FPE eines der typischen elektronenmikroskopischen Zeichen von glomerulären Erkrankungen wie der Fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), der IgA-Nephropathie, der Minimal Change Disease (MCD) und der diabetischen Nephropathie (Pagtalunan et al. 1997; D'Agati 2003; van den Berg et al. 2004).

2.3.2 Phasen des Foot Process Effacement

Kriz beschreibt das FPE als zweiphasigen Prozess (Kriz et al. 2013). In der ersten Phase kommt es zur irregulären Retraktion der interdigitierenden Fußfortsätze mit Verbreiterung der Fußfortsatzarchitektur. Gleichzeitig kommt es zum Verlust des typischen Aufbaus des Schlitzdiaphragmas. Anstelle des Schlitzdiaphragmas bilden sich *Tight Junction* ähnliche Verbindungen zwischen benachbarten Podozyten aus.

In der zweiten Phase des FPE, kommt es zu einer kompletten Retraktion der Fußfortsätze in die primären Ausläufer des podozytären Zellkörpers. Bei der Komplettierung des finalen Stadiums des FPE liegt das Soma der GBM direkt an. Durch diese direkte Adhäsion kommt es zu einem Verlust des subpodozytären Raumes, welcher sich normalerweise zwischen dem podozytären Zellkörper und der GBM befindet. Im Vergleich zur primären Phase des FPE, welches sich durch eine dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts kennzeichnet, ist die zweite Phase mit der Ausbildung der basalen Aktinmatte eine stabilisierende Phase. Die Verdichtung des Aktins als basale Matte ist in humanen renalen Erkrankungen, wie der MCD, der membranösen Nephropathie und der IgA-Nephropathie ebenso zu finden wie in experimentellen Modellen des FPE (Shirato 2002; Kriz et al. 2013).

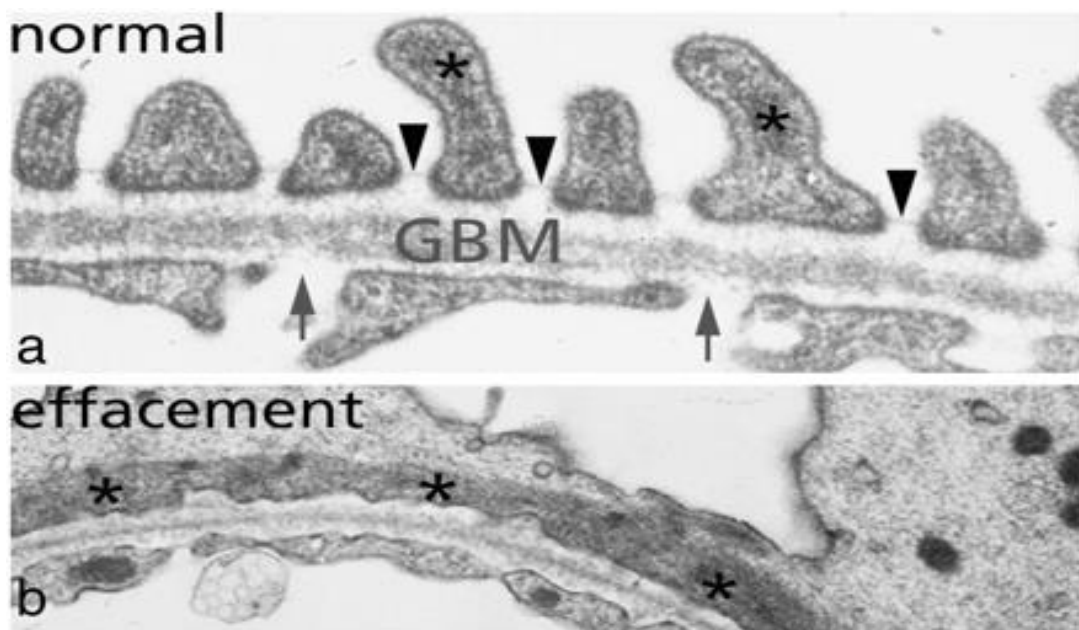


Abbildung 4: Physiologische Filtrationsbarriere (a) im Vergleich zu ausgeprägtem Effacement mit Abflachung der podozytären Fußfortsätze (b), (Pfeile: endotheliale Fenestration, *: podozytäre Fußfortsätze, GBM: Glomeruläre Basalmembran), Bildquelle: Mathieson et al. 2010

2.3.3 Pathophysiologie des Foot Process Effacement

Im Rahmen des FPE kommt es zu einer aktiven Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Diese Reorganisation ist mit verschiedensten Abwandlungen der physiologischen podozytären Struktur assoziiert. Diese Veränderungen können in allen podozytären Kompartimenten auftreten und schlussendlich ein

FPE zur Folge haben.

Eine der ersten Erklärungstheorien für die Entstehung eines FPE wurde bei Erkrankten mit dem kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ entdeckt. Bei der Untersuchung dieser Patienten konnte festgestellt werden, dass bei ihnen ein essentielles Protein zur Bildung des Schlitzdiaphragmas durch eine hereditäre Mutation fehlfunktionierte. Bei diesem Protein handelt es sich um Nephrin (Kestilä et al. 1998). Durch die Aberration der molekularen Struktur von Nephrin kommt es zu einer Veränderung der Schlitzdiaphragma Domäne, und hierdurch zu einem Effacement (Tryggvason et al. 2006). Zu einem Effacement kann es nicht nur bei einer veränderten Struktur von Nephrin kommen, sondern ebenfalls durch Veränderungen weiterer Schlitzmembran Proteine wie NEPH-1 und CD2AP (Shih et al. 1999; Grahammer et al. 2016).

Neben dem Schlitzdiaphragma bedingten Effacement, gibt es noch zahlreiche weitere Mechanismen, welche mit der Entstehung eines Effacements assoziiert sind, wie beispielsweise eine gestörte Interaktion zwischen GBM und dem podozytären Fußfortsatz, eine gestörte negative Oberflächenladung der Podozyten, eine Funktionsstörung des Aktinzytoskelettes und eine veränderte Calcium Homöostase des Podozyten (Greka & Mundel 2012).

2.3.4 Relevanz des Foot Process Effacement

Bis vor einigen Jahren wurde davon ausgegangen, dass das FPE eine Proteinurie bedingt, und somit die ultrastrukturelle Aberration des podozytären Fußfortsatzes kausal für den Proteinverlust über die Blut-Harnschanke ist (Greka & Mundel 2012). Diese zeitliche Reihenfolge, primär das Effacement und sekundär die Proteinurie, konnte jedoch nie in diesem zeitlichen Zusammenhang gezeigt werden.

Auch beschreiben einige Autoren, dass das Ausmaß des Effacements nicht direkt mit der Menge an ausgeschiedenen Proteinen zu korrelieren ist, während andere dieser These widersprechen (van den Berg et al. 2004; Tewari et al. 2015).

Kriz postulierte in einer 2013 erschienen Arbeit eine neue, ebenso noch nicht bewiesene These, in welcher der Podozyt seine Ultrastruktur als Reaktion auf eine bestehende Proteinurie verändert. Kriz interpretiert somit das Effacement

als Versuch des Podozyten die Proteinurie durch Verbreiterung der Fußfortsätze und Stabilisierung des Aktinzytoskelettes zu beenden (Kriz et al. 2013)

Obwohl keine direkte Korrelation des Ausmaßes des Effacement mit der Menge an ausgeschiedenem Protein besteht, tritt eine Veränderung der podozytären Fußfortsätze in der Regel mit einer Proteinurie auf (Greka & Mundel 2012).

Das Effacement ist eine Reaktion auf eine verringerte Anzahl von Podozyten im Glomerulus. Neben der kompensatorischen Reaktion der Hypertrophie sorgt die Verbreiterung der Fußfortsätze dafür, dass freiliegende glomeruläre Basalmembran wieder durch Podozyten abgedeckt wird (Kriz et al. 2013). Diese Verbreiterung ist jedoch ein für den Podozyten unphysiologischer Zustand, welcher die Podozyten wiederum anfällig für eine Ablösung von der GBM macht. Falls es im Rahmen von glomerulären Erkrankung zu einem ausgeprägten Verlust an Podozyten kommt, ist dies mit dem Zugrundegehen des Glomerulus assoziiert, da die Regenerationsfähigkeit des Podozyten stark limitiert ist (Kriz & LeHir 2005; Kriz & Lemley 2017). Eine verringerte Anzahl an renalen Glomeruli geht auf Dauer mit dem Verlust der renalen Funktion und Teils mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie einher.

2.4 Physiologie der glomerulären Filtration

2.4.1 Mechanismen

Eine der wichtigsten Eigenschaften der renalen Filtration und Ausscheidung ist die sogenannte selektive Permeabilität, auch Permselektivität genannt. Hiermit wird beschrieben, dass einige im Plasma vorkommende Stoffe frei, andere jedoch selektiv filtriert werden. Beispielsweise können Elektrolyte, Glucose und Wassermoleküle die Blutharnschanke frei passieren, um dann im Tubulussystem rückresorbiert zu werden.

Ein Molekülgruppe welche die Blutharnschanke nicht frei passieren kann, sind die Plasmaproteine. Dazu zählen neben Albumin, dem Protein mit der höchsten Konzentration im Plasma, auch noch weitere Proteine wie *Alpha*-, *Beta*- und *Gamma*-Globuline. Plasmaproteine haben mannigfaltige Funktionen, wie beispielsweise die Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes (Albumin), Aufgaben in der Immunabwehr (Immunglobuline), der Gerinnung (Fibrinogen) und Transportaufgaben (Thyroxin-bindendes Globulin, Transcortin). Im Rahmen der Entstehung des Primärharnes kommt es bei einer gesunden Niere mit intakter

Blutharnschanke zu keinem Verlust von Proteinen in den Endharn. Pro Tag wird somit neben den 180 l filtrierten Plasmas auch 10-16 kg an Proteinen filtriert.

Für die Rückhaltung von Proteinen wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedenste Theorien aufgestellt. Neben der Ansicht, dass die glomeruläre Selektivität hauptsächlich über Poren in der GBM gewährleistet wird, welche Moleküle einer bestimmten Größe zurückhält, gibt es seit einigen Jahren eine rivalisierende Theorie, die weitere Eigenschaften der Filtrationsbarriere erklären könnten – das sogenannte Elektrokinetische Modell. Die Vertreter des „Zwei-Poren“ Modells definieren die Filtrationsbarriere als passiven Filter, welcher durch die Größe der Poren in der Filtrationsbarriere die Passage von Molekülen reguliert (Rippe & Haraldsson 1994).

Im elektrokinetischen Modell wird die Filtrationsbarriere als aktiv betrachtet, da durch verschiedene Mechanismen (negative geladene Glykokalix des Endothels und der GBM, Ionenströme über die Filtrationsbarriere) ein elektrisches Feld entsteht. Hierdurch wird die Passage von größeren Makromolekülen wie Albumin größtenteils verhindert. Aktiv wird die Filtrationsbarriere dann, wenn vereinzelte Albumin Moleküle in die Barriere eindringen. Durch das bestehende elektrische Feld kommt es zur Elektrophorese und Zurückführung des negativ geladenen Albumin Moleküls auf die Blutseite der Filtrationsbarriere (Saritas et al. 2015). Während die genauen Mechanismen hinter der glomerulären Permselectivität weiterhin Fragen aufwerfen, kann mit Sicherheit gesagt werden, dass die Filtrationsbarriere einer gesunden Niere hocheffektiv bei der Filtration der verschiedenen Plasmamoleküle ist.

2.4.2 Quantifizierung der renalen Funktion

Die renale Funktion ist eine der regelhaft ermittelten Parameter in der klinischen Routine. Hierzu stehen verschiedenste Messgrößen zur Verfügung. Neben der glomerulären Filtrationsleistung (GFR), welche über das Plasma Kreatinin unter Nutzung verschiedener Formeln eingeschätzt werden kann, ist die Ermittlung einer Proteinurie einer der Parameter, welcher bei renalen Erkrankungen verändert sein kann. Hierbei ist die Blutharnschanke nicht wie im physiologischen Zustand selektiv permeabel, sondern es kommt zu einem Übertritt von Proteinen in den Harn. Dies hat zur Folge, dass neben dem Verlust von Albumin, welches zu einem verminderten onkotischen Druck führt, es auch

zum Verlust von Immunglobulinen und antikoagulatorischen Proteinen wie Antithrombin kommt. Diese Konstellation ist vor allem bei nephrotischen Syndromen zu beobachten. Der Kreatininwert und damit auch die GFR kann hierbei nur leicht erhöht oder gänzlich unbeeinträchtigt sein. Die Messung von Proteinen im Harn kann prinzipiell semiquantitativ durch Teststreifen geschehen, oder präziser durch die Bestimmung der Menge an Protein in einem 24 Stunden Sammelurin. Da die Sammlung von Urin jedoch höchst aufwändig und ebenfalls fehleranfällig ist, wird in den letzten Jahren in der klinischen Praxis vermehrt die sogenannte Albumin-Kreatinin Ratio eingesetzt, um eine vorliegende Proteinurie und die damit assoziierten renalen Erkrankungen zu identifizieren und zu quantifizieren (Lambers Heerspink et al. 2010). Populationsbezogene Studien konnten zeigen, dass auch eine Mikroalbuminurie (Ausscheidung von 300-500 mg Albumin/Tag) bereits mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und schlussendlich auch mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist (Klausen et al. 2004). Die frühzeitige Erkennung einer Proteinurie ist somit essentiell um adäquate therapeutische Schritte einleiten zu können.

2.5 Estrogene

Estrogene sind Sexualhormone welche aus der Klasse der Steroidhormone stammen. Neben dem Vorkommen im weiblichen Körper, in welchem Estrogene für die Ausprägung der weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich sind, werden auch im männlichen Organismus kleinere Mengen an Estrogen synthetisiert. Während Estrogene bis vor einigen Jahrzehnten hauptsächlich als Hormone des Reproduktionssystems galten, ist es heutzutage ersichtlich, dass die Hormone mannigfaltige Funktionen im Organismus erfüllen. Neben der Funktion in den Geschlechts- und Reproduktionsorganen, in welchen Estrogen die Spermatogenese, das Endometrium des Uterus und die Reifung des Brustgewebes beeinflusst, entfaltet sich die Wirkung des Hormons auch im kardiovaskulären System, den Nieren und dem Gehirn (Mendelsohn & Karas 1999; Neugarten et al. 2000; Kretz et al. 2004).

Die Freisetzung und Synthese von Estrogen unterliegt der Kontrolle der hypothalamisch-hypophysär-gonadalen Achse. Freisetzung des Peptidhormons GnRH aus dem Hypothalamus vermittelt die Synthese von luteinisierendem- (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH) in der Hypophyse. Während LH die

Androgen Synthese forciert, stimuliert FSH die Estrogen Synthese. Der größte Teil der Estrogene wird in den Geschlechtsorganen, wie den Ovarien und den Hoden, synthetisiert. Vor allem in den Theka- und Granulosazellen des heranreifenden ovariellen Follikels findet unter Beeinflussung von LH/FSH eine ausgeprägte zyklische Produktion von Estrogenen statt. Jedoch findet die Synthese von Estrogen auch in weiteren Gewebsarten wie dem Fettgewebe und Neuronen statt (Nilsson et al. 2001; Prange-Kiel et al. 2006). In unserem Institut ist es gelungen erstmals immunhistochemisch nachzuweisen, dass die viszeralen Zellen des Glomerulus, die Podozyten, ebenfalls das Enzym Aromatase synthetisieren, und somit die Möglichkeit zur Estrogen Synthese intrinsisch in diesem Zelltyp vorhanden ist (Fester et al. - Data unpublished).

2.5.1 Synthese

Als Substrat zur Produktion aller Sexualhormone wird Cholesterin benötigt. Da der erste Syntheseschritt der Steroidhormone im Mitochondrium stattfindet, muss das Cholesterin über die Membran des Mitochondriums transportiert werden. Dies geschieht über das Trägerprotein StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein). Der Transport über die mitochondriale Membran ist einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Steroidhormonsynthese. Mitochondrial lokalisiert befindet sich das erste der Cytochrom-P450 Enzyme, welches Cholesterin zu Pregnenolon metabolisiert. Das synthetisierte Pregnenolon wird nun in das Zytoplasma hinaustransportiert, wo sich die weiteren Enzyme der Steroidhormonsynthese am glatten endoplasmatischen Retikulum befinden. Pregnenolon wird weiter zu 17α -Hydroxy-Pregnenolon und folgend in Dehydroepiandrosteron (DHEA) überführt. Dies geschieht über die 17α -Hydroxylase und die $17,20$ -Lyase. DHEA wird weiter von der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase, einem Enzym welches nicht den CYP450 Enzymen angehört, in Androstendion umgewandelt. Auch der nächste Schritt, wird nicht von einem CYP450 Enzym katalysiert, sondern durch die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Androstendion wird hierbei reduziert und zu Testosteron umgewandelt. Das letzte Enzym der Estrogen Synthese, die Aromatase, wandelt das Testosteron schließlich in 17β -Estradiol um. Bei diesem letzten biochemischen Vorgang kommt es zur Formung eines Phenol-A Ringes, welcher charakteristisch für die Molekülgruppe der Estrogene ist.

Neben dem hauptsächlichen Vertreter der Estrogene, dem 17β -Estradiol (E2), werden auch noch Estron (E1) und Estriol (E3) synthetisiert. Estron ist hierbei durch eine, 17β -Estradiol durch zwei und Estriol durch drei Hydroxyl-Gruppen gekennzeichnet. Während 17β -Estradiol bei der reproduktionsfähigen Frau zwischen Menarche und Menopause den Hauptanteil der Estrogene ausmacht, kommt es bei postmenopausalen Frauen zu einer vermehrten Synthese von E1 und bei schwangeren Frauen zu einer vermehrten Synthese von E3.

Das 17β -Estradiol ist das Estrogen, welches den stärksten agonistischen Effekt auf die ERs hat. Aufgrund dieser biologischen Relevanz, wird sich diese Arbeit ausschließlich auf das 17β -Estradiol (E2) beziehen.

2.5.2 Wirkmechanismus der Estrogene

Estrogene üben ihre Wirkung hauptsächlich über entsprechende Rezeptoren, die Estrogen Rezeptoren, aus. Von diesen Rezeptoren sind zwei Subtypen, Estrogen Rezeptor-Alpha ($ER\alpha$) und Estrogen Rezeptor-Beta ($ER\beta$), bekannt. Der erste ER, $ER\alpha$, wurde 1986 das erste Mal kloniert (Green et al. 1986; Greene et al. 1986). Die Klonierung des $ER\beta$ folgte kurz vor der Jahrtausendwende (Kuiper et al. 1996). Beide dieser Rezeptoren haben eine hohe Bindungsaffinität für Estrogene, jedoch variieren sie stark in ihrer Gewebsexpression und der biologischen Auswirkung.

ERs gehören zur Gruppe der Liganden aktivierten nukleären Rezeptoren, welche hormonempfindliche Bereiche des Genoms binden. Ohne Bindung von einem Liganden liegt der Estrogen Rezeptor zytoplasmatisch gebunden an Hitzeschockproteine (HSP) vor (Pratt et al. 2004). Bei Bindung des Liganden kommt es zur Dissoziation des Rezeptors von den HSPs. Zur Wirkungsentfaltung dimerisiert der Estrogen Rezeptor mit einem weiteren Transkriptionsfaktor in einem Homo- ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$), oder Heterodimer ($\alpha\beta$) und bindet an sogenannten Estrogen Response Elements (ERE) (Klinge 2001). Durch die Bindung an diese hormonempfindlichen Bereiche kommt es zur Beeinflussung der Transkription von weiteren Genen (Nilsson et al. 2001).

Die beschriebenen Wirkmechanismen der ERs beziehen sich auf eine Beeinflussung der Transkription, welche sich auf genomischer Ebene abspielt. Diese Effekte sind jedoch verzögert, da neben der Bindung des Liganden an den Rezeptor, die Transkription, Translation und posttranslationale Modifikation der

beeinflussten genomischen Anteile durchgeführt werden muss. Experimentell konnten jedoch rapide zelluläre Effekte direkt nach Applikation von 17β -Estradiol ermittelt werden (Marino et al. 2006). Die Applikation von 17β -Estradiol beeinflusst Kinasen, Phosphatasen und Ionenströme über Zellmembran, welche einen direkten und rapide einsetzenden Effekt auf die Zelle haben (Aronica et al. 1994; Improta-Brears et al. 1999; Björnström & Sjöberg 2005). Trotz intensiver Forschungsbemühungen bleibt es bis dato unklar ob dies ein direkter Effekt des 17β -Estradiol auf die genannten Elemente ist, oder ob dieser Effekt über Estrogen-Rezeptoren vermittelt wird (Björnström & Sjöberg 2005).

2.5.3 Die Aromatase

Der letzte Schritt der Biosynthese von 17β -Estradiol wird durch das Cytochrom-P450 Enzym Aromatase (CYP19A1) katalysiert. Die Gruppe der Cytochrom-P450 Enzyme wird durch das Vorhandensein einer Häm-Gruppe charakterisiert. Durch das Enzym erfolgt die Aromatisierung von Androgen wie Testosteron und Androstendion zu 17β -Estradiol. Die Aromatase ist am endoplasmatischen Retikulum von Estrogen produzierenden Zellen lokalisiert. Zur adäquaten katalytischen Aktivität des Enzyms ist eine Ko-Lokalisation mit einer NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase unerlässlich. Kodiert wird das Enzym durch das CYP19A1 Gen, welches in Menschen auf dem Chromosom 15q21.2 lokalisiert ist (Chen et al. 1988). Das Gen besteht aus 10 Exonen, von welchen die Exone II-X translatiert werden (Harada et al. 1990).

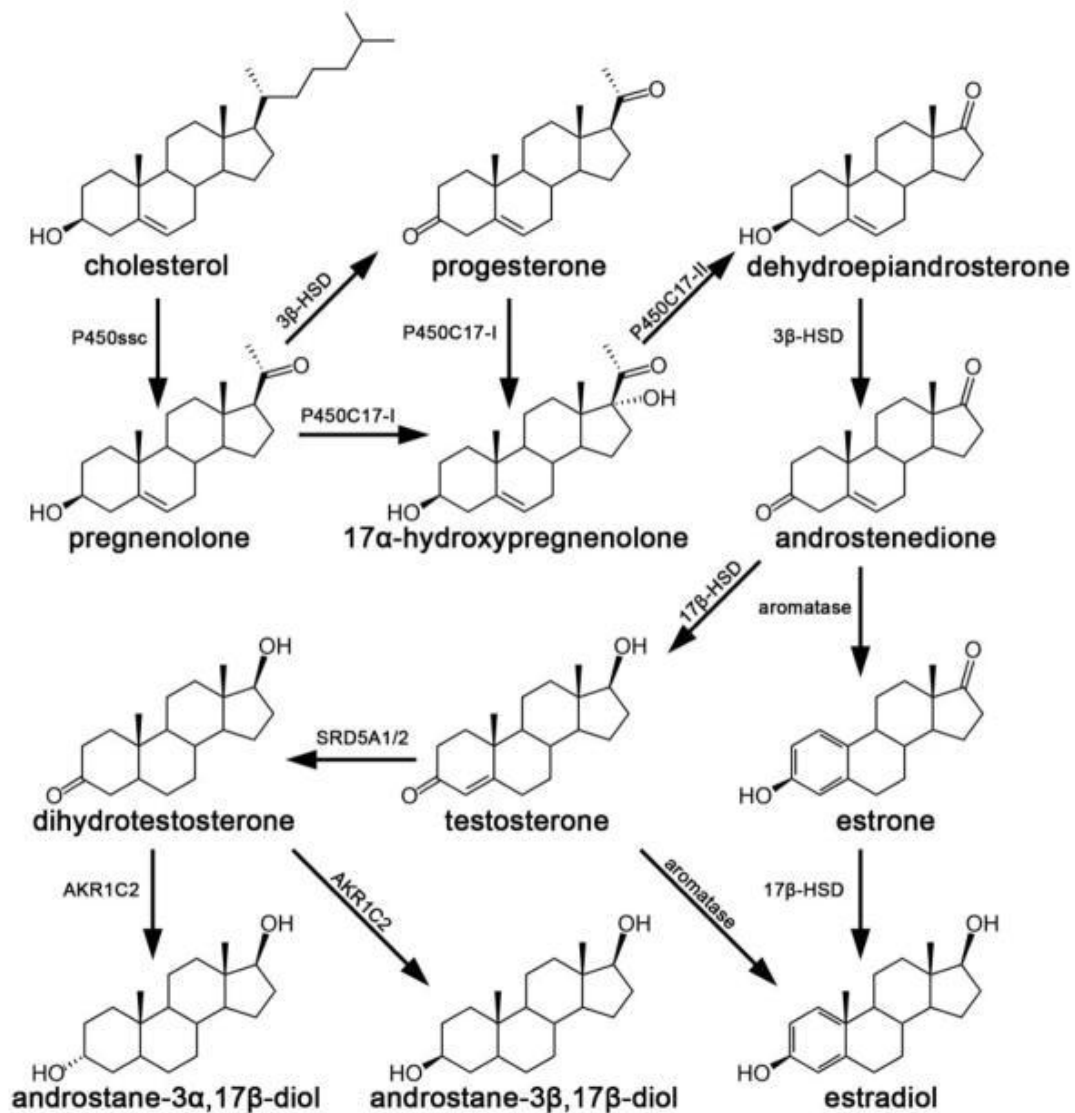


Abbildung 5: Syntheseschritte der Sexualhormone. Bildquelle: McHenry et al. 2014

2.5.4 Aromatase Inhibitoren

Die Entwicklung von Aromatase Inhibitoren (AI) wurde hauptsächlich Aufgrund der Nutzung als therapeutische Option bei Estrogen positiven Mamma Karzinomen vorangetrieben. Ein weiterer Aspekt war die Nutzung von AIs als Kontrazeptivum. Die bis dato effektivsten AI stellen die Inhibitoren der 3. Generation dar. Hierbei handelt es sich um die Medikamente Vorozol, Anastrozol und Letrozol (Chumsri et al. 2011). Bei den 3. Generations Aromatase Inhibitoren handelt es sich um spezifische nicht-steroidale Inhibitoren, welche reversibel an die Häm-Gruppe der Aromatase binden und somit eine Aufnahme von Androgenen in das aktive Zentrum des Enzyms verhindern. Diese fortschrittlichen AI zeigen eine hohe Effektivität bereits bei geringen Dosen,

wobei hier Letrozol als der effektivste Vertreter der AI gilt (Geisler et al. 2002). Im Rahmen der Therapie von Mamma Karzinomen mit einem positiven Rezeptorstatus für Estrogene werden die Aromatase Inhibitoren regelhaft angewandt (Wöckel et al. 2018). Neben der Anwendung in der Humanmedizin stellt die Applikation von Aromatase ein etabliertes Modell zur Schaffung einer reduzierten Konzentration von zirkulierenden Estrogenen im Tiermodell dar (Kauffman et al. 2015).

2.5.5 Aromatase Knock Out Tiere

Neben der Inhibition der Aromatase besteht ebenfalls das Modell der Aromatase Knock Out Maus (ArKO) zur Reduktion zirkulierender Estrogene. Hierbei wird durch Rekombination ein Teil des genetischen Materials, welches für die Aromatase codiert entfernt, und die Aromatase somit funktionslos. Die Erstbeschreibung eines etablierten Aromatase Knock Out Mausmodells gelang im Jahre 1998 (Fisher et al. 1998). In den generierten Knock Out (KO) Tieren wurde das Exon 9 der codierenden Sequenz für das Enzym Aromatase flankiert und entfernt. Die Arbeitsgruppe konnte in den KO Tieren den Genotyp eindeutig bestimmen und weiterhin deutlich reduzierte zirkulierende 17β -Estradiol Konzentrationen sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren nachweisen. Die KO Tiere zeigten neben dem Genotyp mit fehlender Expression der Aromatase einen ausgeprägten Phänotyp. Insbesondere weibliche Mäuse zeigten sich mit einer veränderten Fettverteilung und einem höheren Gewicht (Jones et al. 2000). Makroskopisch imponierten bei den weiblichen KO Mäusen unterentwickelte Uteri. Neben der makroskopischen Auffälligkeit konnte histologisch gezeigt werden, dass in den Ovarien der KO Mäuse keine Graafschen Follikel und *Corpora lutea* entwickelt waren (Fisher et al. 1998). Aufgrund der fehlenden Entwicklung der tertiären Follikel und somit dem fehlenden Eisprung, sind weibliche ArKO Mäuse infertil und zeigen deutlich erniedrigte Progesteron Spiegel im Vergleich zu den Wildtyp Kontrollen.

2.6 Geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Niere

In verschiedenen Studien konnte ein geschlechtsspezifischer Effekt auf die Niere nachgewiesen werden. Hierbei scheint das weibliche Geschlecht einen

renoprotektiven Effekt im Rahmen von renalen Erkrankungen zu haben. In einer Metaanalyse von Neugarten und Mitarbeitern konnte die Evidenz für einen potentiellen renoprotektiven Effekt des weiblichen Geschlechts quantifiziert werden (Neugarten et al. 2000). Die Metaanalyse beruht auf Datenanalysen aus 68 Studien mit insgesamt 11.345 Teilnehmern. In der Metaanalyse zeigt es sich, dass Frauen mit nicht-diabetischen renalen Erkrankungen, wie beispielsweise bei der polyzystischen Nierenerkrankung, der membranösen Nephropathie und der IgA Nephropathie im Vergleich zu entsprechenden männlichen Patienten einen vergleichsweise langsamen Progress der Erkrankung aufwiesen (Neugarten et al. 2000). Auch bei diabetisch bedingten renalen Erkrankungen, wie eine durch Diabetes Mellitus Typ I verursachte Nephropathie, scheinen Frauen einen mildereren Verlauf zu haben (Sibley et al. 2006). Neue Daten auf Grundlage der „Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium Study“ untermauern die These des renoprotektiven Effektes des weiblichen Geschlechts weiter, da die Mortalität bei Frauen mit einer chronischen Nierenerkrankung niedriger ist als bei Männern (Nitsch et al. 2013).

Eine der Problematiken der Metaanalyse von Neugarten bestand darin, dass es nicht festzustellen war, ob es sich bei den Patientinnen um prä- oder postmenopausale Frauen handelte. Die Arbeitsgruppe um Kummer nahm dies zum Anlass, anhand der Daten der amerikanischen Nierendatenbank (US Renal Data System), eine altersabhängige Verteilung der Nierenerkrankungen nach Geschlecht aufzustellen (Kummer et al. 2012). Die Autoren konnten feststellen, dass der renoprotektive Effekt des weiblichen Geschlechts sich hauptsächlich zwischen Menarche und Menopause manifestiert. In diesem Zeitraum ist die Plasma Konzentration der Geschlechtshormone am höchsten (Overlie et al. 1999).

Ein sexueller Dimorphismus in der renalen Funktion ist auch bei gesunden Patienten festzustellen. Aus physiologischer Sicht kommt es zum Nachlassen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit zunehmendem Lebensalter. Jedoch ist die Ausprägung der abnehmenden Funktionsleistung der Niere vom Geschlecht abhängig. In einer Studie von Berg und Kollegen konnte nachgewiesen werden, dass die Abnahme der GFR bei gesunden Frauen langsamer voranschreitet als bei gesunden männlichen Vergleichsprobanden (Kummer et al. 2012; Berg 2006).

Auch im Tiermodell zeigt sich ein Unterschied bezüglich des Schweregrades von renalen Erkrankungen im Geschlechtervergleich. Sandberg zeigt in einer 2008 erschienen Studie, dass nach einer operativ induzierten Hypertension in Ratten (einseitige Nephrektomie mit kontralateralem Banding der *Arteria renalis*) das weibliche Geschlecht einen protektiven Faktor auf die Progression des renalen Schadens zeigt. Männliche Ratten zeigten einen ausgeprägten renalen Schaden, welcher sich unter anderem durch eine Proteinurie und einen glomerulären und tubulären Schaden äußerte. In weiblichen Ratten konnte durch eine Ovariectomie der renoprotektive Effekt des weiblichen Geschlechts abgeschwächt werden. Durch Gabe von 17β -Estradiol konnten jedoch die Auswirkungen der Ovariectomie rückgängig gemacht werden. Dieser experimentelle Ansatz zeigt, dass auch Geschlechtshormone, und nicht ausschließlich Faktoren wie der Blutdruck, eine Rolle des sexuellen Dimorphismus bei renalen Erkrankungen spielen (Sandberg 2008).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

2-Dodecanylsuccinic acid anhydride SERVA

2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol SERVA

Aqua destillata BRAUN

Blei(II)-Citrat MERCK

Carprofen ZOETIS

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) SIGMA

Di-Natrium-hydrogenphosphat-dihydrat MERCK

Di-Natrium-hydrogenphosphat-heptahydrat MERCK

Ethanol (unvergällt) SIGMA-ALDRICH

Ethanol (vergällt) SIGMA-ALDRICH

Ethylenglykol MERCK

Glutardialdehyd MERCK

Glycidether 100 SERVA

Isofluran DRÄGER

Letrozol NOVARTIS

Methylnadic anhydride SERVA

Natrium-dihydrogenphosphat-monohydrat MERCK

Natriumhydroxid (NaOH) MERCK

Natriumtetraborat MERCK

Nuklease freies Wasser GIBCO

Osmiumtetroxid ROTH

Paraformaldehyd ROTH

Paraformaldehyd ROTH

Pikrinsäure MERCK

Polyvinylpyrrolidone SIGMA

Propylene oxide SERVA

Pyronin MERCK

Saccharose (D+) ROTH

Salzsäure (HCL) MERCK

Toluidinblau KRAFT

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat MERCK

Uranylacetat MERCK
Ursotamin PFIZER
Xylarium PHARMA-PARTNER

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Accu Jet BRAND
Aluminiumfolie LAGER UKE
Axio Scan.Z1 ZEISS
Chirurgisches Besteck F.S.T.
Cutfix Scalpel BRAUN
Deckgläser 21x26mm MARIENFELD
Diamantmesser DIATOME
Einmalkanülen BRAUN
Einmalpipette ALPHALABS
Einmalspritzen BRAUN
Elektronenmikroskop MC 100 PHILIPS
EM Kupfer Grid GLIDER GRID
Erlenmeyerkolben SCHOTT DURAN
Feinpinzette DUMONT
Filterpapier SCHLEICHER & SCHÜLL
Gelkapseln PLANO
H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader BIOTEK
Handschuhe ANSELL
Heizplatte MEDAX
Inkubator MEMMERT
Kosmetiktücher TAPIRA
Kühlschrank, 4°C LIEBHERR
Laborflaschen SCHOTT DURAN
Lichtmikroskop CH40 OLYMPUS
Messzylinder HIRSCHMANN DURAN
MicroAmp® Fast Optical 96-Wellplatte THERMO FISHER SCIENTIFIC
Microtom Supercut 2050 CAMBRIDGE INSTRUMENTS
Mikroskop Stemi DV4 ZEISS
Mikrowelle SHARP

Nanodrop® DENOVI
Objektträger Assistent KARL HECHT
Perfusionspumpe Masterflex L/S COLE PARMER
Petrischale FALCON
pH Meter KNICK
Pipetten EPPENDORF
Pipettenspitzen EPPENDORF
Präparationsklinge PILLING
Precellys Evolution Homogenizer BERTIN INSTRUMENTS
QIAshredder spin columns QIAGEN
Rühr-Heizer HEIDOLPH
Schraubverschlussgläschen SCHOTT
Sekundenkleber UHU
Silikonunterlage AGAR SCIENTIFIC LTD
StepOnePlus Real-Time PCR System APPLIED BIOSYSTEMS
Tube EPPENDORF
Ultramikrotom REICHERT-JUNG
Vibratom VT1000S LEICA
Wage SARTORIUS
Zellstofftücher LAGER UKE

3.1.3 Lösungen

Bleicitrat nach Reynolds

Blei(II)-Citrat 1,33g

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 1,76 g

Aqua destillata 30 ml

NaOH 1N 7ml

Mit AD auf 50 ml

pH 7,4 einstellen

Finale Narkose

Ketamin (Ursotamin) 12 mg/ml

Xylazin (Xylarium) 1,6 mg/ml

Applikationsvolumen von 15 ml/kg/KG zur finalen Narkose (Dosis von Ketamin 180 mg/kg/KG und Xylazin 24 mg/kg/KG)

Glutardialdehyd (1%)

- 12 ml Phosphatpuffer (0,1 M pH 7,4)
- 12 ml *Aqua destillata*
- 1 ml 25%iger Glutardialdehyd Lösung

Glycidether Mischung

Stammlösung A:

- 77 ml Glycid Ether 100
- 125 ml 2-Dodecanylsuccinic acid anhydride

Stammlösung B:

- 100 ml Glycid ether 100
- 89 ml Methylnadic anhydride

Gebrauchslösung:

4 Teile Lösung A + 6 Teile Lösung B plus 2% Akzelerator (2,4,6 – Trisphenol)

Kryoprotektive Lösung

- 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)
- 30 g Saccharose
- 1 g PVP
- 30 ml Ethylenglykol
- Mit *Aqua destillata* auf 100 ml

Letrozol im Tierversuch

Für die Stammlösung wurde folgender Ansatz gewählt: 10.000 μg Letrozol wurden mit 350,51 μl DMSO gelöst. Die verabreichte Konzentration Letrozol pro Tier betrug 0,4 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht / Tag. Die Lösung wurde zur Applikation jeweils frisch angesetzt und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Eine 25 Gramm schwere Maus erhielt somit 10 μg gelöstes Letrozol / Tag. Hierfür wurden 56,08 μg Letrozol/DMSO Gemisch in 19760 μl 0,9 % NaCl/H₂O gelöst.

Pro Tag wurden davon 125 μ l intraperitoneal (i.p.) pro Maus (25 g) appliziert. Die DMSO Menge pro Maus pro Tag betrug 0,35 μ g (0,00056 %). Die LD50 i.p. für DMSO bei einer 25 Gramm Maus liegt bei 62,5 mg. Hierdurch konnten Schädigungen/Wechselwirkungen von DMSO ausgeschlossen werden.

Osmium

- 2%iges Osmiumtetroxid in 100 ml *Aqua destillata* lösen
- 5,52g Natrium-dihydrogen-phosphat Monohydrat und 42,88g di-Natrium-hydrogen-phosphat Heptahydrat in 1000 ml *Aqua destillata* lösen
- 6,846 g Saccharose in 100 ml Puffer lösen
- Osmiumlösung und Saccharose-Pufferlösung 1:1 mischen

Perfusions-/Fixierlösung

- 40 g Paraformaldehyd in 342 ml *Aqua destillata*
- 10 ml gesättigte Pikrinsäure
- 3,2 ml 25% Glutardialdehyd
- Mit 0,2 M Phosphatpuffer auf 1000 ml

Phosphatpuffer (0,1 M)

Für 500 ml:

A: NaH_2PO_4 2,76 g in 100 ml *Aqua destillata*

B: Na_2HPO_4 16,02 g in 435 ml *Aqua destillata*

90 ml A + 410 ml B

pH auf 7,4 einstellen

Toluidinblau

1%ige Borax Lösung:

5 g Natriumtetraborat in 500 ml *Aqua destillata* lösen

Pyronin Lösung 1%ig:

5 g Pyronin in 500 ml *Aqua destillata* lösen

Gebrauchsfertige Toluidin Lösung:

1 Teil Pyronin Lösung in 9 Teile Toluidin Lösung zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung

Uranylacetat 1%

Uranylacetat 0,5 g in *Aqua destillata* 50 ml

3.1.4 Reaktionskits

Albumin ELISA (#ab108792) ABCAM

Aromatase Activity Assay Kit (#K983) BIOVISION

Kreatinin Assay Kit (#ab204537) ABCAM

Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1641) THERMO FISHER
SCIENTIFIC

Microsome Isolations Kit (#K249) BIOVISION

RNeasy Mini Kit (#74106) QIAGEN

TaqMan Gene Expression Assay (#4331182) THERMO FISHER SCIENTIFIC

TaqMan Universal PCR Master Mix (#4304437) THERMO FISHER
SCIENTIFIC

3.1.5 PCR Sonden

Aromatase, Cyp19a1 (cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1),
Exon 1 und 2 (Mm01178450_m1) THERMO FISHER SCIENTIFIC

Aromatase, Cyp19a1 (cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1),
Exon 3 und 4 (Mm00484049_m1) THERMO FISHER

Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) (Mm00446968_m1)
THERMO FISHER SCIENTIFIC

3.1.6 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Studien wurden Mäuse (*Mus musculus*) der Linie C57BL/6J von Charles River Deutschland verwendet. Zusätzlich erfolgte die Generierung und Züchtung von genetisch veränderten Aromatase Knock Out Tieren auf Basis der C57BL/6N Maus-Linie, die zur besseren Vergleichbarkeit mit den Wildtypen auf die C57BL/6J Linie rück-gekreuzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau bestand aus insgesamt 10 Gruppen, davon 6 Behandlungsgruppen mit einer medikamentösen ± chirurgischen Intervention und 4 Gruppen mit genetisch veränderten Aromatase Knock Out Tieren. Die Bezeichnung ArKO ++ steht für die Wildtyp/Kontrolltiere mit erhaltener genetischer Information für die Aromatase, während ArKO dd den homozygoten Knock Out für Aromatase bezeichnet.

Männliche Tiere

DMSO: intraperitoneale Applikation für 10 Tage

Letrozol: intraperitoneale Applikation für 10 Tage

ArKO ++

ArKO dd

Weibliche Tiere

DMSO: intraperitoneale Applikation für 10 Tage

Letrozol: intraperitoneale Applikation für 10 Tage

OVX+DMSO: Ovariectomie (OVX), gefolgt von intraperitonealer DMSO Applikation für 10 Tage

OVX+Letrozol: Ovariectomie, gefolgt von intraperitonealer Letrozol Applikation für 10 Tage

ArKO ++

ArKO dd

Durch die Zusammensetzung der Gruppen, ergaben sich drei Versuchsaufbauten, welche im Folgenden beschrieben sind.

Aromatase Knock Out Tiere

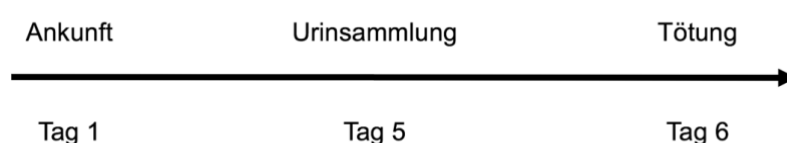


Abbildung 6: Darstellung des Versuchsablaufs der Gruppe der ArKO Tiere

In den ArKO Tieren erfolgte vor Tötung der Tiere das einmalige sammeln von Urin am 5. Tag.

DMSO/Letrozol Applikation

In dieser Gruppe erfolgte eine zweimalige Urinsammlung, eine vor und eine nach Behandlung mit DMSO/Letrozol. Die Sammlung des Urins erfolgte nach oben genanntem Schema. Die primäre Messung zur Ermittlung eines Ausgangswertes, und die zweite zur Dokumentation eines möglichen Effektes der applizierten Substanzen. Der Ablauf der Applikation der Medikamente ist unter Punkt 2.2.4.d beschrieben. Nach Sammlung des Urins erfolgte die Tötung der Tiere und Entnahme der Nieren zur weiteren histologischen Aufarbeitung.

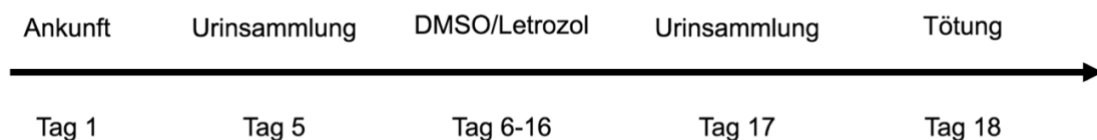


Abbildung 7: Darstellung des Versuchsablaufs der Gruppe der DMSO/Letrozol Tiere

Ovarektomie + DMSO/Letrozol Applikation

Ankunft im Alter von neun Wochen. Nach einer Eingewöhnungsphase von 4 Tagen fand die erste Urinsammlung statt. Am folgenden Tag erfolgte die beidseitige Ovarektomie, gefolgt von einer Erholungsphase über 14 Tage und einer erneuten Urinsammlung nach der Erholungsphase. Nach einer Behandlungsphase mit DMSO/Letrozol von 10 Tagen erfolgte eine finale Urinsammlung, welche von der Tötung und Perfusion des Tieres gefolgt wurde. Bei den Tieren der OVX+DMSO/Letrozol Gruppe wurde somit insgesamt dreimal eine Urinsammlung durchgeführt. Die Sammlung des Urins erfolgte nach dem bereits genannten Schema. Die erste Messung zur Ermittlung eines Ausgangswertes, die zweite um einen potentiellen Effekt nach Ovarektomie zu detektieren, und die dritte zur Ermittlung des Summeneffektes von Letrozol und der Ovarektomie. Der Ablauf der Ovarektomie und Applikation der Medikamente ist unter Punkt 2.2.4.e und Punkt 2.2.4.d beschrieben. Nach Sammlung des Urins erfolgte die Tötung der Tiere und Entnahme der Nieren zur weiteren histologischen Aufarbeitung.

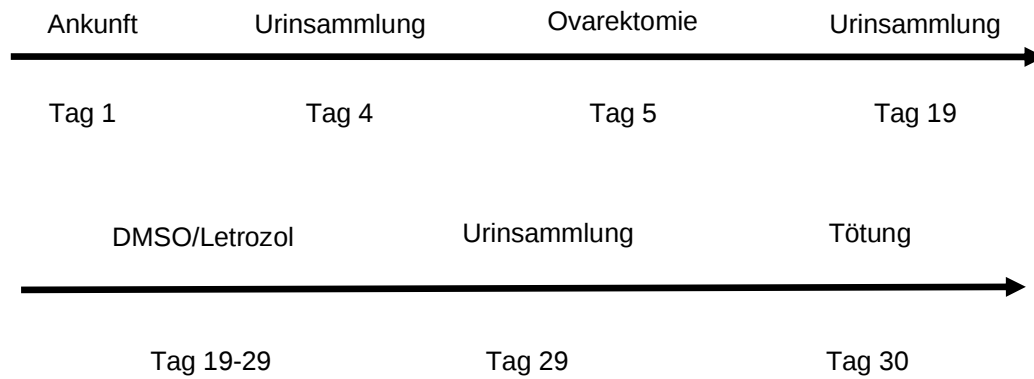


Abbildung 8: Darstellung des Versuchsablaufs der Gruppe der Ovarektomie+DMSO/Letrozol Tiere

3.2.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.2.a Tierversuchsanträge

ArKO tm1d (Aro-tm1d-E05)

Tierversuchsantragsnummer: G13/139

DMSO/Letrozol in C57BL6/J

Tierversuchsantragsnummer: G15/054 (Postmortal konnten dankeswerterweise die bereits perfundierten Nieren aus dem genannten Antrag für die vorliegende Arbeit genutzt werden, da sie sonst verworfen worden wären.)

Ovarektomie+DMSO/Letrozol in C57BL6/J

Tierversuchsantragsnummer: G15/080

3.2.2.b Haltung der Tiere

Die Haltung der Tiere erfolgte in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter einem 12 Stunden Tag/Nacht-Wechsel mit Zugang zu Wasser und Futter ad libitum. Maximal 6 Tiere wurden pro Käfig gehalten.

3.2.2.c Generierung der Aromatase Knock Out Tiere

Für die Generierung der ArKO Maus danke ich Frau PD Dr. rer. nat. Evita Mohr. Als Basis für die Generierung der Knock Out Tiere wurden Blastozysten mit

Klonen embryonaler Stammzellen (ES) mit modifiziertem Aromatase Genlocus (Knockout first) von EUCOMM (International Knockout Mouse Consortium) erworben. Im Gegensatz zu der etablierten Aromatase Knock Out Maus von Fisher und Kollegen wurde hier nicht das Exon 9 sondern das Exon 2 durch ein Cre/lox Rekombinationssystem entfernt (Fisher et al. 1998). Die erzeugten Blastozysten wurden scheinträchtigen weiblichen Mäusen unter Narkose in den Uterus injiziert. Primär wurde in diesen Zellen ein Genkonstrukt aus einem eingefügten FRT Site LacZ Gen zur Identifikation der genetisch veränderten Zellen, zusammen mit einer loxP Site zur weiteren Rekombination erstellt. Bei dem von den loxP Sites flankierten Exons handelt es sich in unserem Fall um das zweite Exon des Aromatase Gens. Durch eine weitere Kreuzung mit Cre positiven Tieren, kommt es zu einer Expression der Rekombinase Cre in den Nachkommen. Durch die Rekombinase wurden die loxP Sites und das dazwischenliegende Exon exzidiert. Da die embryonalen Stammzellen aus C57BL/6N Mäusen stammen, welche eine hohe Spontanmutationsrate aufweisen, wurde dieser Hintergrund durch mehrfaches Rückkreuzen mit C57BL/6J eliminiert. Die weiter genutzten Mäuse der ArKO Linie basieren auf einen Grundstock an Tieren mit C57BL/6J Hintergrund.

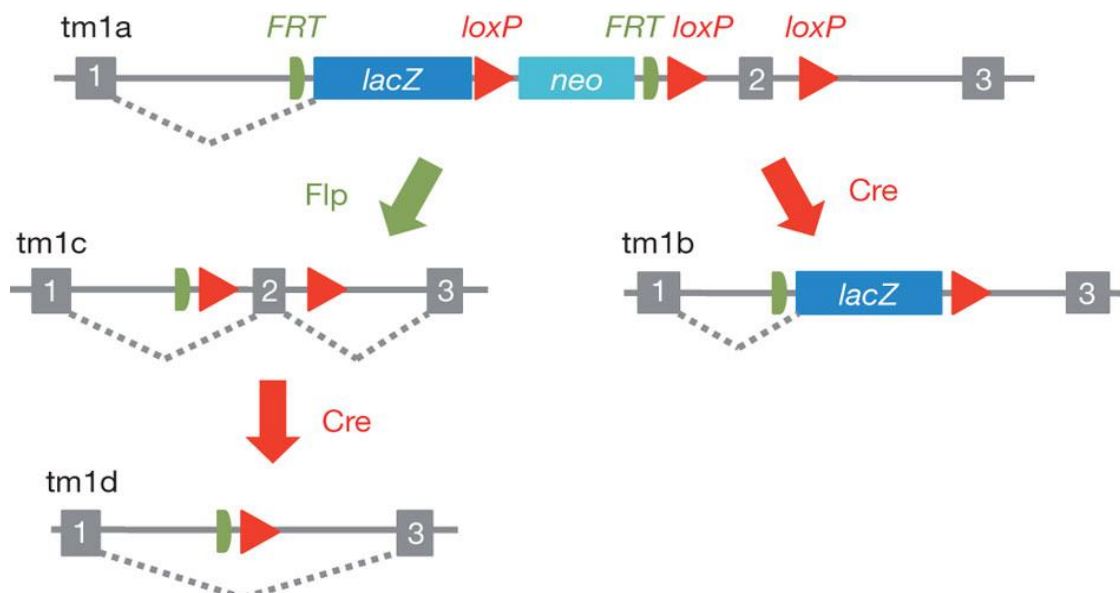


Abbildung 9: Beispielfhaft dargestellte Erstellung von homozygoten Aromatase KO Mäusen. tm1a Tieren mit gefloxtem Exon 2 des Aromatase Gens wird über Paarung mit Cre-Mäusen das gefloxt Gen exzidiert. Hierdurch Entstehung der homozygoten Aromatase Knock Out der Linie tm1d, Bildquelle: Skarnes et al. 2011

In dieser Arbeit wurden ausschließlich ArKO Mäuse der Linie tm1d genutzt. Bei dieser Linie ist sowohl das eingefügte lacZ, als auch das initial gefloخته Exon 2 des Aromatase Gens entfernt. Bei den Tieren mit der Bezeichnung ArKO dd handelt es sich um die KO Tiere, bei ArKO ++ um die Wildtypkontrollen mit unveränderter Aromatase.

3.2.2.d Applikation von DMSO/Letrozol

Insgesamt erfolgte in 6 von 10 Gruppen eine Applikation von DMSO bzw. Letrozol durch intraperitoneale Applikation. Die Injektion der Lösung erfolgte für 10 Tage zur jeweils gleichen Uhrzeit. Die Tiere wurden einzeln entnommen und mit einer Hand im Nackenbereich fixiert. Injektion der Lösung erfolgte in den linken unteren Quadranten des Abdomens zur Vermeidung einer Verletzung der inneren Organe.

Während 3 Gruppen (männlich DMSO, weiblich DMSO, weiblich OVX+DMSO) DMSO durch Injektion verabreicht bekamen, erhielten weitere 3 Gruppen (männlich Letrozol, weiblich Letrozol, weiblich OVX+Letrozol) eine intraperitoneale Injektion von Letrozol. DMSO stellt in diesem Versuch das Lösungsmittel und Vehikel für das Letrozol dar. Eine Beeinflussung der renalen Funktion durch DMSO ist nicht bekannt (Muther & Bennett 1980; Rijtema et al. 1999).

3.2.2.e Ovariectomie

Nach Eingewöhnung der Tiere für 4 Tage erfolgte die Ovariectomie unter einer inhalativen Narkose durch Isofluran. Diese Methode wurde zuvor mit dem örtlichen Tierschutzbeauftragten der FTH am UKE Hamburg besprochen, der beim Eingriff zugegen war. Zur Einleitung der Narkose wurde hierzu kurzzeitig 5%iges Isofluran genutzt. Zur Narkoseaufrechterhaltung erfolgt die weitere Inhalation unter 3%igem Isofluran bis Minute 15, danach folgte eine weitere Reduktion auf 2% bis zum Ende des Eingriffes.

Nach Initiierung der Narkose und Überprüfung der Zwischenzehenreflexe wurde dorsomedian das Fell für den operativen Zugang rasiert. Die Maus wurde auf einer Unterlage mit einem leicht lösbaren Klebeband fixiert. Es wurde ein etwa 1 cm langer Schnitt durch Haut und Unterhaut mit einer scharfen kleinen Schere

vorgenommen, anschließend die ventrale Muskulatur mit einer Pinzette gegriffen und mit dem Peritoneum angehoben und ein zweiter 1 cm langer Schnitt in gleicher Orientierung gesetzt. Die Ovarien konnten hiernach kaudal vom *Corpus adiposum renalis* lokalisiert werden. Mit einem resorbierbaren Faden wurde das Ovar, das einen Durchmesser von 2 mm hat, nach Mobilisierung der aufliegenden *Bursa ovarica* umgriffen und mit der zuführenden *Arteria ovarica* abgeklemmt, und weiter mit einer kleinen Schere abgesetzt. Diese Prozedur wurde auf beiden Seiten durchgeführt. Peritoneum und Bauchwandmuskulatur wurden mit einem resorbierbaren Faden genäht. Das Fell wurde mit Klammern für Kleintiere verschlossen. Um in der Aufwachphase eine postoperative Hypothermie vorzubeugen, wurden die OVX Tiere auf einen Wärmetisch gelegt. Die postoperative Behandlung mit Schmerzmitteln erfolgte nach Empfehlung der GV-SOLAS. Den Tieren wurde schon während der Operation ein nicht-steroidales Analgetikum Carprofen 5 mg/kg/KG injiziert, um das Auftreten von Schmerzen nach Abklingen der Betäubung zu verhindern. Über die nächsten fünf Tage wurde diese Substanz ebenfalls s.c. injiziert, um evtl. auftretenden Wundschmerz zu lindern. Postoperativ wurde den Tieren eine Erholungsphase von 14 Tagen garantiert. Nach dieser Phase wurde mit der intraperitonealen Applikation von DMSO/Letrozol begonnen.

3.2.2.f Uringewinnung

Zur Sammlung von Urin wurden die Mäuse einzeln in Auffangvorrichtungen gesetzt. Unter Zugang von Wasser und Nahrung ad libitum verblieben die Tiere für 3 Stunden in der Vorrichtung. Nach 3 Stunden erfolgte die Überführung in einen normalen Käfig. Der aufgefangene Urin wurde durch Pipettieren entnommen und in Eppendorf Tubes überführt.

3.2.2.g Perfusion und Organentnahme

Tötung der Tiere erfolgte mittels einer finalen intraperitonealen Anästhesie durch Ketamin und Xylazin (Dosis von Ketamin 180 mg/kg/KG und Xylazin 24 mg/kg/KG). Nach Aussetzen der Atmung und Sistieren der Schutzreflexe, erfolgte die Fixierung der Maus auf einer Platte. Säuberung der Haut erfolgte mit 70%igem Ethanol. Die Präparation begann mit dem Aufsuchen des Xiphoids und

dem Auftrennen der Kutis in Längsrichtung unterhalb des Xiphoids in Richtung der Symphyse. Eröffnung des Peritoneums erfolgt auf gleiche Weise. Zur Stabilisierung des Thorax, erfolgt die Fixierung des Xiphoids mittels einer gebogenen Klemme. Einschneiden des Zwerchfells zur Erzeugung eines Pneumothorax. Freipräparation des Herzens von Perikard und setzen einer 2mm langen Inzision in den linken Ventrikel und hierdurch intraventrikuläre Platzierung der Perfusionskanüle, welche durch eine zweite Klemme fixiert wurde. Nach Sicherung der Perfusionskanüle wurde zur Gewährleistung eines Abflusses das rechte Atrium eröffnet. Die Perfusion über das entlüftete Perfusionssystem erfolgte für 5 Minuten mit gekühltem 0,1 M PB, gefolgt von weiteren 10 Minuten Perfusion mit gekühlter 4% PFA, 0,15% Pikrinsäure, 0,05% bzw. 2,5% Glutardialdehyd Perfusionslösung.

Nach erfolgreicher Perfusion erfolgte die Entnahme der Nieren durch Freilegen aus dem Retroperitoneum und Abtrennung des Hilus. Vierteilung der Nieren und Überführung in die Perfusionslösung zur weiteren Fixierung für 48 h bei 4°C. Zusätzlich zu den Nieren wurde bei allen Tieren das Gehirn und bei den weiblichen Tieren zusätzlich die Ovarien entnommen und ebenfalls in der erwähnten Perfusionslösung aufbewahrt.

3.2.3 Molekularbiologie

3.2.3.a RNA Isolation

Zur Quantifizierung der DNA Menge in dem entnommenen Gewebe wurde die RNA mittels eines RNeasy Mini Kits und QIAshredder spin columns extrahiert. Zur Homogenisierung wurde das Gewebe (Ovar, Cortex, Niere) mit 200 µl RLT Puffer in ein Precellys Lyse Kit überführt und mittels eines Precellys Evolution Homogenizer aufbereitet. Hiernach wurde das Lysat in QIAshredder spin columns überführt und weiter nach dem Herstellerprotokoll des RNeasy Mini Kits zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neue Mikrozentrifugen-Tube überführt und das RNeasy Mini Kit Protokoll ab Schritt 7 weitergeführt, wobei in unserem Versuchsaufbau 350 µl anstelle von 700 µl RW1 Puffer in QIAshredder spin columns genutzt wurde. Nach diesem Schritt wurde der DNA Verdau begonnen und die RNA Extraktion nach dem Protokoll fortgeführt. Die RNA Konzentration wurde mittels des Nanodrop Spectrophotometers ermittelt. Die Proben wurde auf 500 ng für die cDNA Synthese normalisiert.

3.2.3.b cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wurde mittels eines Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit für eine Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. 500 ng RNA pro Probe wurden hierbei verwendet.

3.2.3.c Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (TaqMan®)

Die hergestellte cDNA (siehe 2.2.3.b) wurde direkt in der qPCR Reaktion weiterverarbeitet. Vom Hersteller wird empfohlen 1-1,5 µl cDNA zu nutzen. In unserem Falle wurden 1,5 µl genutzt. Die qPCR wurde Anhand der erstellten cDNA aus Ovarien, Cortex und Nieren von Aromatase KO Tieren (sowohl der homozygoten KO als auch deren Wildtyp Kontrolle) durchgeführt. Hierzu wurden mausspezifische TaqMan Primer der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet (siehe 2.3.5). Zur Ermittlung der Expression der Aromatase wurden Primer für die Exone 1 und 2 und Primer für die Exone 3 und 4 genutzt. Zusätzlich diente als endogene Kontrolle die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT), welche sich durch eine stetige Expression in unserem Zielgewebe (Cortex, Niere, Ovar) auszeichnet. Der qPCR Ansatz wurde in 96 Well-Platten laut Herstellerangaben vorbereitet.

Reagenzien	20 µl Ansatz in [µl]
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x (Applied Biosystems, #4304437)	10
TaqMan Gene Expression Assay (FAM), 20x (Applied Biosystems, #4331182)	1
cDNA Produkt	1.5
Nuklease freies Wasser (gibco, #10977035)	7.5

Tabelle 1: Probenansatz für die Real-time PCR (TaqMan®)

Die qPCR wurde mittels des StepOnePlus Real-Time PCR Systems durchgeführt. Nach Vorbereitung der Well-Platten und Überführung in das PCR System wurde dieser auf 50°C aufgeheizt und diese Temperatur für 2 Minuten gehalten. Danach Steigerung der Temperatur auf 95°C und halten der Temperatur für 10 Minuten. Nach dieser Startphase Durchführung der zyklischen

Replikation für insgesamt 40 Zyklen. Diese bestanden aus jeweils 15 Sekunden bei 95°C gefolgt von einer Phase bei 60°C für 60 Sekunden. Danach Wiederholung des genannten Zyklus.

3.2.4 Histologie

3.2.4.a Vibratomschnitte

Nach Lagerung der perfundierten Nieren in Perfusionslösung für 48h, erfolgte der Zuschnitt des Gewebes in Serienschnitte mittels eines Vibratoms. Anfertigung der Schnitte erfolgte in 50 µm Dicke. Auffangen und Überführung der Vibratom Schnitte in Kryoprotektionslösung.

3.2.4.b Kunstharz (Epoxydharz) Einbettung

Die Vorbereitung der Schnitte zur Einbettung in Kunstharz erfolgte nach folgendem Schema:

Entnahme der Vibratomschnitte aus der Kryoprotektionslösung

Waschen in 0,1M PB für 5 Minuten

Waschen in 0,1M PB für 5 Minuten

Waschen in 0,1M PB für 5 Minuten

Fixierung durch 1% Glutardialdehyd für 10 Minuten

Waschen in *Aqua destillata* für 5 Minuten

Waschen in *Aqua destillata* für 5 Minuten

Waschen in *Aqua destillata* für 5 Minuten

Fixierung in 1% Osmium Tetroxid für 20 Minuten

Waschen in 35%, 50%, 70%, 96%, 100%, 100%, 100% Ethanol (unvergällt) für je 10 Minuten

Überführung in Propylene Oxide für 10 Minuten

Überführung in Propylene Oxide für 10 Minuten

Überführung in Propylene Oxide/Glycidether Gebrauchslösung (1:3) über Nacht.

Entnahme der Schnitte nach Fixierung über Nacht und Betrachtung mittels eines Binokulars. Identifikation der Nierenglomeruli und Entfernung von

überschüssigem Gewebe durch ein Skalpell. Flacheinbettung erfolgte in einem Tropfen gebrauchsfertigen Epoxydharz unter einer zugeschnittenen Plastikfolie. Aushärtung erfolgte über Nacht bei 69°C. Hiernach auftragen von Epoxydharz gefüllten Kapseln auf die ausgehärteten Gewebeschnitte. Aushärtung der Kapseln erfolgte bei 69°C für 48 Stunden.

3.2.4.c Semidünnschnitte

Betrachtung der ausgehärteten Blöcke erfolgte unter einem Binokular. Zurechtschleifen der Blöcke und Abtragung von überschüssigem Material mittels einer Klinge. Erstellung von Semidünnschnitten mit einer standardmäßigen Schnittdicke von 1 μm an einem Leica Ultramicrotom. Färbung der Semidünnschnitte durch Toluidinblau und Überführung der Schnitte auf Objektträger.

3.2.4.d Ultradünnschnitte

Die Erstellung der Ultradünnschnitte fand an einem Leica Ultramicrotom statt. Die Schnitte wurden seriell, mit einer Dicke von 50 nm, erstellt, in einem Wasserbad aufgefangen und auf ein Kupfergrid aufgezogen. Es erfolgte die Kontrastierung zur elektronenmikroskopischen Betrachtung durch 1%iges Uranylacetat für 30 Minuten unter Abdunkelung, gefolgt vom Abwaschen des Uranylacetats durch *Aqua destillata*. Hiernach Kontrastierung durch Bleicitrat für 3 Minuten gefolgt vom Abwaschen durch *Aqua destillata*.

3.2.4.e Lichtmikroskopie

Nach Betrachtung der Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitte, erfolgte die grobmorphologische Betrachtung des Gewebes mit 20x Objektiv. Aufnahmen der Semidünnschnitte wurden durch ein Axioscan Z1 Mikroskop angefertigt. Die Auswertung erfolgte durch subjektive Betrachtung von morphologischen Veränderungen. Besonders von Interesse waren hierbei die glomeruläre Struktur und Größe.

3.2.4.f Elektronenmikroskopie

Die Analyse der Ultradünnschnitte fand durch ein Philips MC 100 Elektronenmikroskop statt. Nach Betrachtung der groben Morphologie und Unversehrtheit der Schnitte, wurden die Glomeruli der Schnitte aufgesucht. Primär erfolgte eine Übersichtsaufnahme des Glomerulus in 500-700-facher Vergrößerung. Weiter wurde nun systematisch die Basalmembran der Glomeruli mit einer 2950-fachen Vergrößerung fotografiert. Sowohl die Aufnahme, als auch die Auswertung der Bilder erfolgten verblindet.

3.2.4.g Ermittlung der Fußfortsatzbreite

Die Ermittlung der Fußfortsatzbreite (FPW) erfolgte nach einem Standardprotokoll (van den Berg et al. 2004; Deegens et al. 2008). Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte mittels der Software ImageJ 1.50. Anpassung des Scale Bars zur adäquaten Längenbestimmung auf den Aufnahmen. Verfolgen von freiliegender GBM mit dem Freehand Tool mit gleichzeitiger Vermessung der Streckenlänge. Es folgte die Zählung der Anzahl der Fußfortsätze auf der gemessenen Länge GBM. Um für die zufällige Variation des Schnittwinkels zur langen Achse des Podozyten bei der Anfertigung der elektronmikroskopischen Präparate zu korrigieren, wurde das Ergebnis der $\sum \text{GBM Länge} / \sum \text{Anzahl der Fußfortsätze}$ mit dem Faktor $\pi/4$ multipliziert (Gundersen et al. 1980; van den Berg et al. 2004; Deegens et al. 2008). Zur repräsentativen Ermittlung der FPW eines Tieres erfolgte die Betrachtung der durchschnittlichen Fußfortsatzbreite in 4 Glomeruli pro Tier und einer Gesamtstrecke von 1000 μm glomerulärer Basalmembran. Insgesamt wurden im Mittel 70 Messungen mit jeweils einer Länge von ca. 15 μm Basalmembran in jedem Versuchstier ausgewertet.

3.2.5 Immunologie

3.2.5.a Albumin ELISA

Für die Albumin Bestimmung im Urin wurde ein quantitativer Sandwich ELISA von Abcam genutzt. Die Visualisierung der Menge an Albumin pro Probe findet hierbei über eine enzymatische Streptavidin-Peroxidase Reaktion statt. Zur Vorbereitung der Urinproben wurden diese bei 800 Umdrehungen für 10 Minuten

zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entnommen und 50-fach verdünnt. Zur Erstellung einer Standardreihe wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Albumin Konzentration von 200 bis 0 *ng/ml* erstellt. 50 μ l des Standards wurden jeweils in die Well-Platte pipettiert. Es folgte die Applikation von 50 μ l hergestellter Lösung in die Mikrotiterplatte und eine zweistündige Inkubation. Anschließend erfolgte ein 5-faches Waschen mittels jeweils 200 μ l Wasch-Puffer pro Kavität. Hierauf Applikation von 50 μ l biotinyliertem Albumin Antikörper in einer Verdünnung von 1:100. Nach 60-minütiger Inkubation und abermaligem 5-fachem Waschen wurden je 50 μ l Streptavidin-Peroxidase Konjugat in einer Verdünnung von 1:100 in die Vertiefungen gegeben, für 30 Minuten inkubiert und erneut 5-mal gewaschen. Für die endgültige Reaktion erfolgte die Zugabe von 50 μ l chromogenem Substrat für 15 Minuten, gefolgt von der Applikation von 50 μ l Stopp-Lösung. Die Absorptionsmessung erfolgte in einem BIOTEK Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader bei 450 *nm* Wellenlänge.

3.2.5.b Kreatinin Assay

Zur Bestimmung der quantitativen Menge von Kreatinin wurde ein kolorimetrisches Kreatinin Assay Kit (Abcam) genutzt, welches auf die Jaffé Reaktion basiert ist. Eine Standard Reihe wurde mit mitgelieferter Standard Lösung in Konzentrationen von 20-0,3126 *mg/dl* erstellt. Der gewonnene Urin wurde unverdünnt weiter genutzt.

Pro Kavität des ELISAs wurde 50 μ l Lösung hinein pipettiert. Für die Standardreihe 50 μ l der verdünnten Standard Lösung, für die Messung der Kreatinin Konzentrationen 50 μ l der verdünnten Urinproben, für alle leeren Kavitäten 50 μ l ddH₂O. Zur Induktion der Farbreaktion erfolgte der Zusatz von 50 μ l Kreatinin Detection Reagent. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Eine Nullmessung des BIOTEK Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Readers erfolgte gegen die mit ddH₂O gefüllten Kavitäten. Die Messung der kolorimetrischen Reaktion erfolgt bei einer Wellenlänge von 490 *nm*.

3.2.6 Proteinbiochemie

Zur Funktionsmessung der Aromatase in den ArKO Tieren wurden Ovarien von zwei weiblichen homozygoten KO Tieren entnommen und mittels einer fluorometrischen Reaktion die Aktivität der Aromatase bestimmt. Die Ovarien stellen das Gewebe mit der höchsten Konzentration an Aromatase dar und sind somit das optimale Gewebe um einen Nachweis der Aromatase durchzuführen.

3.2.6.a Homogenisierung

Nach Entnahme der Ovarien wurden diese mittels des „Microsome Isolation Kits“(BIOVISION) verarbeitet. Hierzu wurden die Ovarien in das „Microsome Isolations Kit“ hinzugegeben und 500 μ l Lyse Flüssigkeit pro Gramm feuchten Gewebes hinzugegeben. Hiernach erfolgte die Homogenisierung der Ovarien in einem „Precellys Evolution Homogenisator“ für je 3x30 Sekunden bei einer Frequenz von 6.400/min mit 30 Sekunden Pause zwischen den einzelnen Zyklen.

3.2.6.b Isolation der Mikrosomen

Da die Aromatase ein Enzym ist welches am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, wurden folgend die Mikrosomen des homogenisierten Gewebes isoliert.

Nach der Homogenisierung wurde das Homogenisat mit 10.000 G für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Hiernach erfolgte die Aspiration der flottierenden oberen Flüssigkeit und überführen in ein neues Eppendorf Tube. Es folgte eine nochmalige Zentrifugation für 20 Minuten mit 20.000 G bei 4°C. Zuletzt Entnahme des schimmernden hell-beigen Mikrosomen Anteils und verwerfen des Überstandes. Danach wurde das entnommenen Pellet mit dem vom Hersteller bereitgestellten Homogenisierungspuffer des „Microsome Isolation Kits“ (500 μ l Homogenisierungspuffer pro ml Pellet Volumen) gewaschen.

3.2.6.c Aromatase Enzym Assay

Nach Homogenisierung und Isolation der Mikrosomen erfolgte die eigentliche Funktionsmessung der Aromatase. Die Funktionsmessung fand auf Basis einer fluorometrischen Reaktion statt (Aromatase (CYP19A) Activity AssayKit

Biovision). Neben der Ermittlung der physiologischen Aktivität wird hierbei die Messung des Umsatzes nach Inhibition der Aromatase durch einen Aromatase Inhibitor (Letrozol) durchgeführt.

Nach Vorbereitung der Proben mittels einer erneuten Zentrifugation der isolierten Mikrosomen mit 15.000 G für 15 Minuten erfolgte die eigentliche Funktionsmessung. Die Standardkurve und die Vorbereitung der Proben erfolgten nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde 50 μl an Probenvolumen pro Kavität für die eigentliche Testung genutzt und schlussendlich die Kavität mit Aromatase Assay Puffer auf ein Endvolumen von 70 μl befüllt. Als Positivkontrolle fand der Vergleich mit einer humanen rekombinanten Aromatase statt. Ebenfalls wurde neben der unbeeinflussten Funktionsmessung eine Messung mit Zugabe eines Aromatase Inhibitors (Letrozol) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Volumens pro Kavität sah wie folgt aus:

	Probe (μl)	Probe+ Inhibitor (μl)	Hintergrund (μl)	Positivkontrolle (μl)	Positivkontrolle+ Inhibitor (μl)
Probenvolumen	48	48	-	-	-
Aromatase Assay Puffer	20	-	70	45	25
NADPH Generating System	2	2	-	-	-
rekombinante humane Aromatase	-	-	-	25	25
Letrozol 5 μM Lösung (5X)	-	20 μl	-	-	20

Tabelle 2: Probenansatz für den Aromatase Aktivitäts Assay

Nach Vorbereitung der Well-Platten erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 488/527 nm für 60 Minuten bei 37°C in einem BIOTEK Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader.

3.2.7 Datenanalyse

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Microsoft Excel 2017, SPSS 26 und Graphpad Prism 6. Alle erhobenen Daten wurden je nach Kennzeichnung als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (MW $\pm$ SEM), oder als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ SD) dargestellt. Die Prüfung auf Normalverteilung fand Anhand eines Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Testes statt. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen im Bezug auf die Fußfortsatzbreite und den Albumin-Kreatinin Quotienten wurden anhand eines gemischten Modells (mixed model) berechnet und die Daten wurden vor der statistischen Testung durch Logarithmierung transformiert. Bei Durchführung der gemischten Modell Analyse wurde im Rahmen der ultrastrukturellen Analyse (Beurteilung der Fußfortsatzbreite) die DMSO behandelte Gruppe als Referenzgruppe genutzt. In der statistischen Analyse der Albumin-Kreatinin Quotienten diente die Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung als Referenzgruppe. Zur statistischen Analyse der Gewichte der Aromatase Knock Out Tiere wurde ein einfacher t-Test durchgeführt.

Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und mit einem ★ markiert. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★ ★ ★ $p \leq 0,001$ (höchst signifikant), ★ ★ $p \leq 0,01$ (hoch signifikant), ★ $p \leq 0,05$ (signifikant). n.s. = nicht signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Aromatase Knock Out Maus

4.1.1 Genotyp

Der Genotyp wurde mittels einer Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) aus dem Ovar, der Niere und dem Cortex der erzeugten Tiere nachgewiesen. In den Abb. 10-12 sind Sonden für die qPCR gewählt worden, welches das 1. und 2. Exon des Aromatase Gens flankieren. Zur endogenen Kontrolle fand der Vergleich mit der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT) statt. In den Abb. 13-15 ist der Nachweis des 3. und 4. Exon der Aromatase zu sehen (Ovar, Niere und Cortex), ebenfalls im Vergleich zur Expression mit HPRT. Zur Objektivierung sind zusätzlich zu den Graphiken die Cycle Threshold Werte (C_t) als relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der qPCR-Reaktion angegeben. Der C_t -Wert spiegelt den Beginn des exponentiellen Wachstums einer Kurve wieder. Ein kleinerer Wert C_t Wert zeigt hierbei eine höhere Konzentration an Produkt an.

4.1.1.a Exon 1 und 2

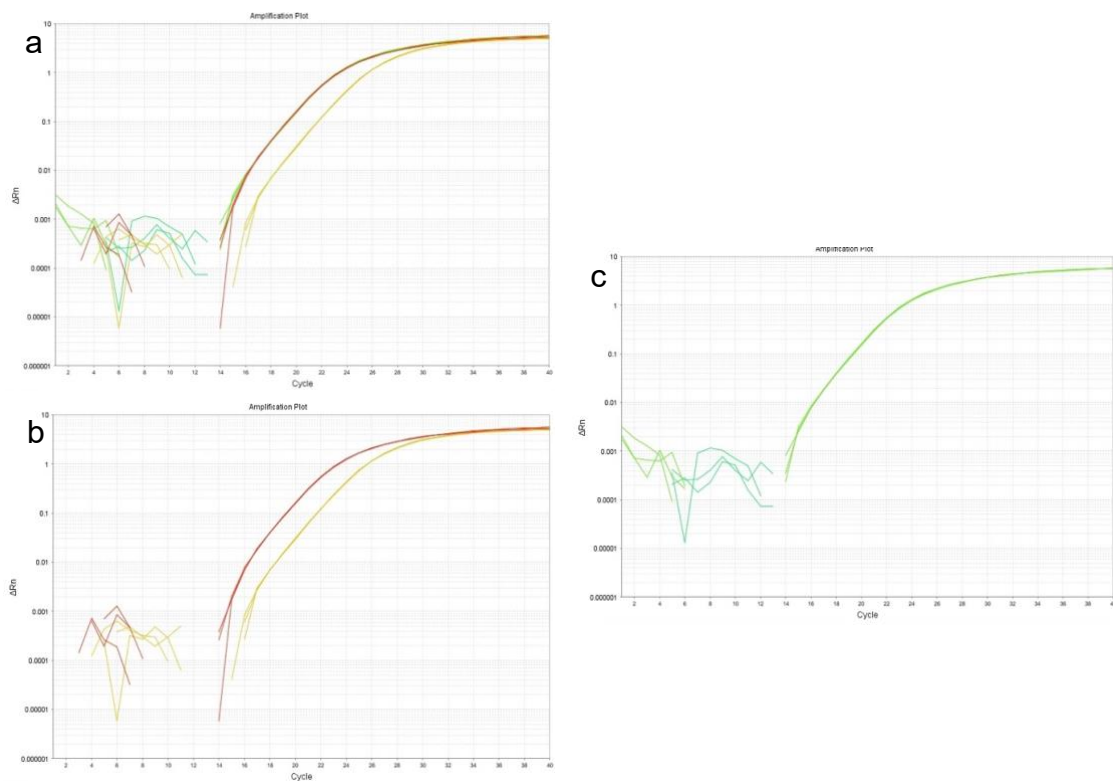


Abbildung 10: Darstellung der qPCR, TaqMan Primer flankieren Exon 1 und 2 des Aromatase Gens aus dem Ovar der Aromatase KO Tiere. In a und b stellt die rote Kurve die endogene HPRT Kontrolle und die gelbe Kurve die Aromatase dar. In c ist die HPRT Kontrolle (grün) zu sehen, jedoch keinerlei Aromatase Expression. a: KO und WT Tiere, b: Wildtyp, c: homozygoter KO. x-Achse: Anzahl der PCR Zyklen, y-Achse: ΔRn .

In Abb. 10 fällt in den Wildtyp und den homozygoten KO Tieren auf das eine ähnliche Menge an HPRT nachgewiesen werden kann (grüne und rote Kurve). Ebenfalls nachweisbar ist in Bild b der Abb. 10 eine Expression der Aromatase (gelbe Kurve), welche in Bild c gänzlich fehlt. In der homozygoten KO Maus kam es aufgrund des fehlenden 2. Exons somit zu einem fehlerhaften Ablauf der PCR und somit fehlendem qPCR Produkt (MW $\pm$ SD - HPRT Ovar - C_t ArKO ++: 19,32 $\pm$ 0,01, ArKO dd: 19,36 $\pm$ 0,02, Aromatase Ovar - C_t ArKO ++: 21,73 $\pm$ 0,01, ArKO dd: keine Messung möglich).

Gewebe, Maus Mutante	Gen	
	HPRT (C _t)	Aromatase Exon 1_2 (C _t)
Ovar, ArKO ++	19,32±0,01	19,36±0,02
Ovar, ArKO dd	21,73±0,01	-/-

Tabelle 3: Darstellung qPCR auf Exon 1 und 2 des Aromatase Gens aus dem Ovar der Aromatase KO Tiere. Endogene Kontrolle mit Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Cycle Threshold Werte (C_t - MW±SD) als relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der qPCR-Reaktion.

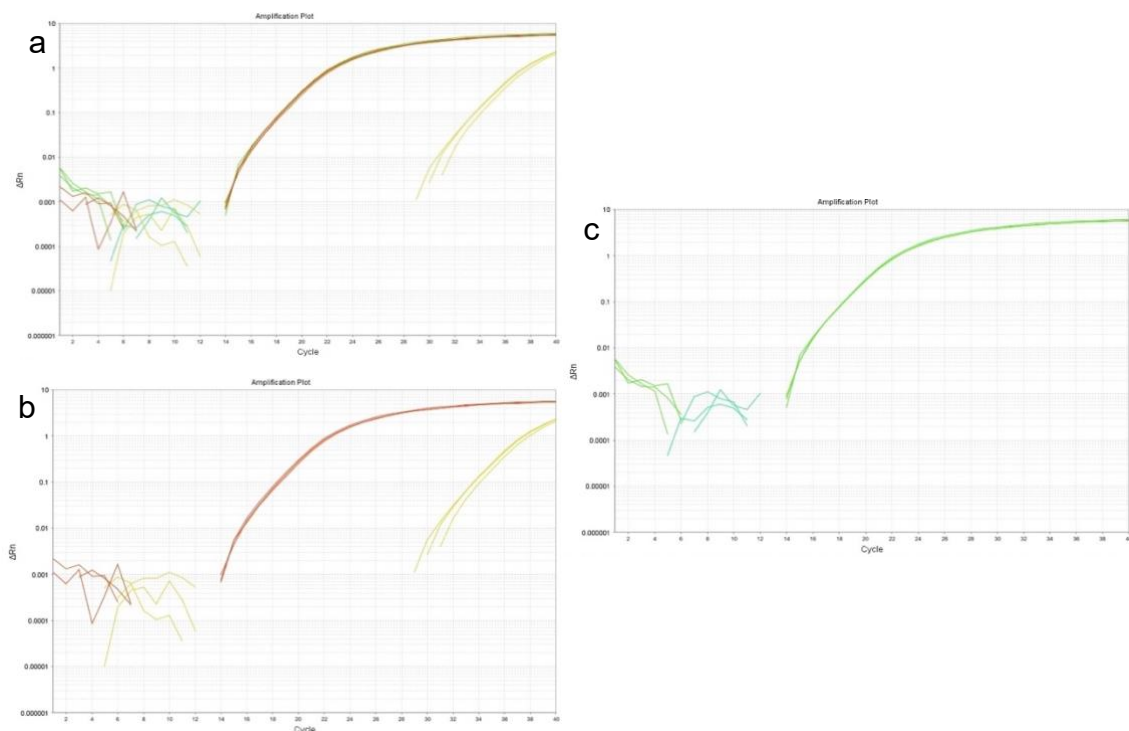


Abbildung 11: Darstellung der qPCR, TaqMan Primer flankieren Exon 1 und 2 des Aromatase Gens aus dem Cortex der Aromatase KO Tiere. In a und b stellt die rote Kurve die endogene HPRT Kontrolle und die gelbe Kurve die Aromatase dar. In c ist die HPRT Kontrolle (grün) zu sehen, jedoch keinerlei Aromatase Expression. A: KO und WT Tiere, b: Wildtyp, c: homozygoter KO. X-Achse: Anzahl der PCR Zyklen, y-Achse: ΔR_n .

In Abb. 11 ist zum Vergleich die Expression im Cortex und in Abb. 12 in der Niere der ArKO Tiere gezeigt. Es fällt auf dass sowohl in der Niere als auch dem Cortex deutlich weniger Aromatase exprimiert wird als in den Ovarien (MW±SD – HPRT Cortex – C_t ArKO ++: 18,5±0,07, ArKO dd: 18,39±0,02, Aromatase Cortex – C_t ArKO ++: 33,82±0,17, ArKO dd: keine Messung möglich // HPRT Niere – C_t ArKO ++: 19,71±0,03, ArKO dd: 19,02±0,02, Aromatase Niere – C_t ArKO ++: 35,13±0,15, ArKO dd: keine Messung möglich). Ebenfalls zu sehen ist, verglichen mit der Darstellung der Kurven in Abb 10 (mit Darstellung der

Aromatase Expression im Ovar von ArKO Tieren), der fehlende Nachweis an Aromatase in den homozygoten KO Tieren (siehe Bild c in Abb 11 und 12).

Gewebe, Maus Mutante	Gen	
	HPRT (C _t)	Aromatase Exon 1_2 (C _t)
Cortex, ArKO ++	18,5±0,07	33,82±0,17
Cortex, ArKO dd	18,39±0,02	-/-
Niere, ArKO ++	19,71±0,03	35,13±0,15
Niere, ArKO dd	19,02±0,02	-/-

Tabelle 4: Darstellung qPCR auf Exon 1 und 2 des Aromatase Gens aus dem Cortex und der Niere der Aromatase KO Tiere. Endogene Kontrolle mit Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Cycle Threshold Werte (C_t - MW±SD) als relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der qPCR-Reaktion.

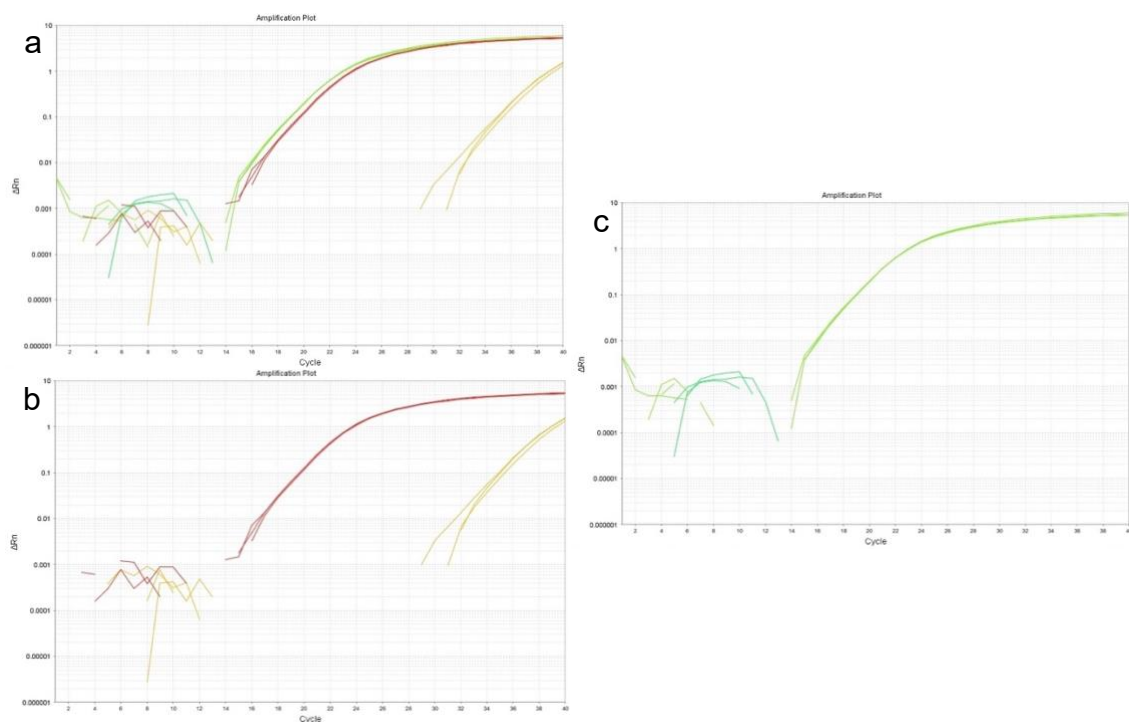


Abbildung 12: Darstellung der qPCR, TaqMan Primer flankieren Exon 1 und 2 des Aromatase Gens aus der Niere der Aromatase KO Tiere. In a und b stellt die rote Kurve die endogene HPRT Kontrolle und die gelbe Kurve die Aromatase dar. In c ist die HRPT Kontrolle (grün) zu sehen, jedoch keinerlei Aromatase Expression. a: KO und WT Tiere, b: Wildtyp, c: homozygoter KO. x-Achse: Anzahl der PCR Zyklen, y-Achse: ΔR_n .

4.1.1.b Exon 3 und 4

Als nächsten Schritt wurde nach der qPCR auf das Exon 1 und 2 des Aromatase Gens nun eine qPCR auf das Exon 3 und 4 durchgeführt. Wie in der qPCR auf das Exon 1 und 2 des Aromatase Gens bereits dargestellt, wird in Abb. 10-12 das Vorhandensein der Exone 3 und 4 und zusätzlich als endogene Kontrolle die HRPT nachgewiesen.

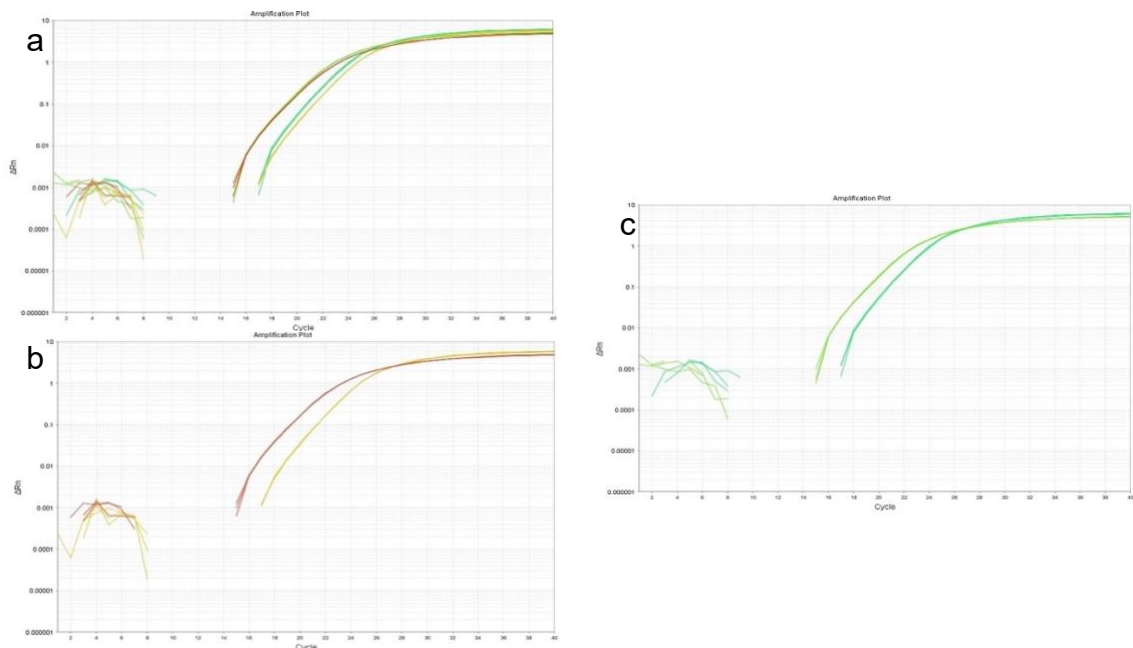


Abbildung 13: Darstellung der qPCR, TaqMan Primer flankieren Exon 3 und 4 des Aromatase Gens aus dem Ovar der Aromatase KO Tiere. In a und b stellt die rote und Kurve die endogene HPRT Kontrolle, die gelbe und türkise Kurve die Aromatase dar. In c ist die HRPT Kontrolle (grün) zu sehen und die Aromatase Expression in türkis. a: KO und WT Tiere, b: Wildtyp, c: homozygoter KO. x-Achse: Anzahl der PCR Zyklen, y-Achse: ΔRn .

In Abb. 13 in Bild c ist im Vergleich zu den qPCR Graphiken für Exon 1 und 2 zu sehen, dass auch in der homozygoten KO Maus ein PCR Produkt für das 3. und 4. Exon der Aromatase nachgewiesen werden kann. Dies ist darauf zurückzuführen das in unseren KO Tieren nur das 3. Exon des Aromatase Gens entfernt wurde (MW $\pm$ SD - HPRT Ovar - C_t ArKO ++: 24,58 $\pm$ 0,01, ArKO dd: 24,1 $\pm$ 0,04, Aromatase Ovar - C_t ArKO ++: 25,57 $\pm$ 0,02, ArKO dd: 24,93 $\pm$ 0,05).

Gewebe, Maus Mutante	Gen	
	HPRT (C _t)	Aromatase Exon 3_4 (C _t)
Ovar, ArKO ++	24,58±0,01	25,57±0,02
Ovar, ArKO dd	24,1±0,04	24,93±0,05

Tabelle 5: Darstellung qPCR auf Exon 3 und 4 des Aromatase Gens aus dem Ovar der Aromatase KO Tiere. Endogene Kontrolle mit Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Cycle Threshold Werte (C_t - MW±SD) als relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der qPCR-Reaktion.

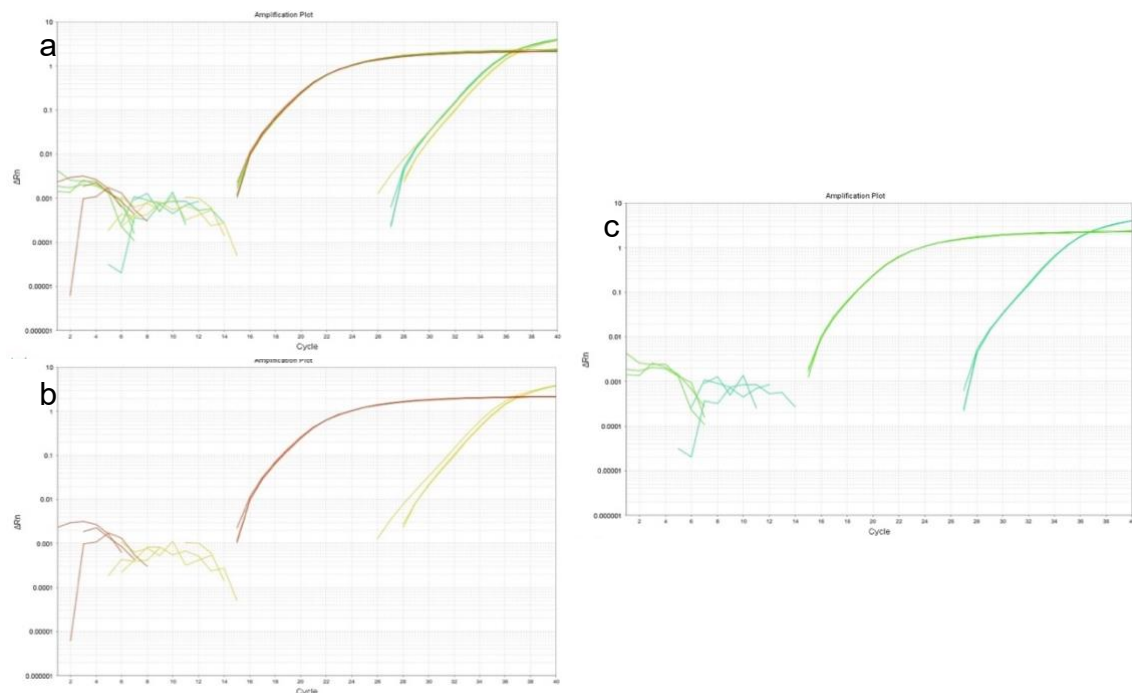


Abbildung 14: Darstellung der qPCR, TaqMan Primer flankieren Exon 3 und 4 des Aromatase Gens aus dem Cortex der Aromatase KO Tiere. In a und b stellt die rote und Kurve die endogene HPRT Kontrolle, die gelbe und türkise Kurve die Aromatase dar. In c ist die HPRT Kontrolle (grün) zu sehen und die Aromatase Expression in türkis. a: KO und WT Tiere, b: Wildtyp, c: homozygoter KO. x-Achse: Anzahl der PCR Zyklen, y-Achse: ΔR_n .

Neben dem Ovar war der Nachweis für die Aromatase auch im Cortex der homozygoten KO Tiere möglich (MW±SD - HPRT Cortex - C_t ArKO ++: 26,72±0,07, ArKO dd: 26,27±0,1, Aromatase Cortex - C_t ArKO ++: 35,97±0,14, ArKO dd: 35,56±0,02).

Gewebe, Maus Mutante	Gen	
	HPRT (C _t)	Aromatase Exon 3_4 (C _t)
Cortex, ArKO ++	26,72±0,07	35,97±0,14
Cortex, ArKO dd	26,27±0,1	35,56±0,02
Niere, ArKO ++	28,29±0,17	37,86±0,14
Niere, ArKO dd	27,37±0,14	-/-

Tabelle 6: Darstellung qPCR auf Exon 3 und 4 des Aromatase Gens aus dem Niere der Aromatase KO Tiere Endogene Kontrolle mit Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT). Cycle Threshold Werte (C_t - MW±SD) als relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der qPCR-Reaktion.

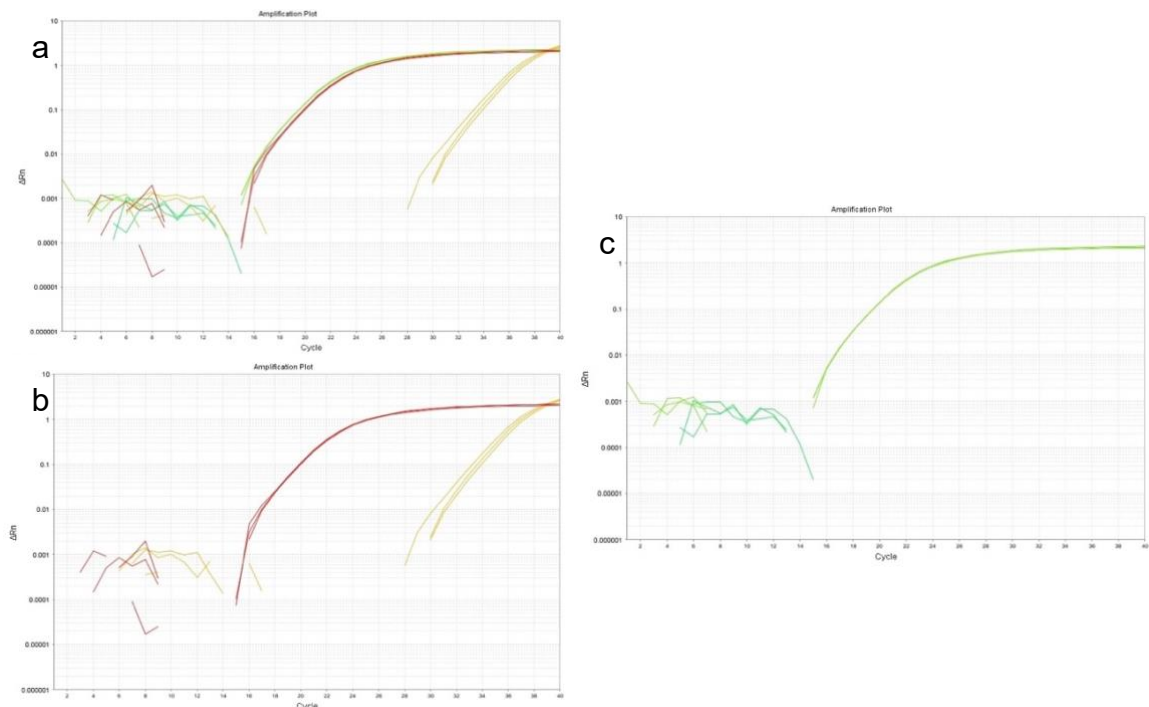


Abbildung 15: Darstellung qPCR, TaqMan Primer flankieren Exon 3 und 4 des Aromatase Gens aus dem Niere der Aromatase KO Tiere. In a und b stellt die rote und die grüne Kurve die endogene HPRT Kontrolle, gelb die Aromatase dar. In c ist die HRPT Kontrolle (grün) zu sehen und eine nicht-vorhandene Aromatase Expression. a: KO und WT Tiere, b: Wildtyp, c: homozygoter KO. x-Achse: Anzahl der PCR Zyklen, y-Achse: ΔR_n .

Überraschenderweise zeigt sich in Abb. 15 (Aromatase Nachweis in der Niere der ArKO Tiere) kein Produkt in der qPCR auf das 3. und 4. Exon der Aromatase (MW±SD - HPRT Niere - C_t ArKO ++: 28,29±0,17, ArKO dd: 27,37±0,14, Aromatase Niere - C_t ArKO ++: 37,86±0,14, ArKO dd: keine Messung möglich).

4.1.1.c Zusammenfassung Genotyp

Wir konnten durch die qPCR den Nachweis des sicheren Fehlens des 2. Exons des Aromatase Gens in den homozygoten ArKO Tieren feststellen. Die Entfernung des 2. Exons resultiert in einem Stopp der Translation der Aromatase mRNA. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Aromatase Protein nicht gebildet wird.

4.1.2 Phänotyp

Die generierten ArKO Tiere welchen einen Knock Out Exon 2 des Aromatase Gens aufwiesen zeigten ebenfalls den von Fisher et al. beschriebenen Phänotyp der ArKO Exon 9 Knock Out (Fisher et al. 1998). Des Weiteren weisen Tiere mit homozygotem KO der Aromatase eine Gewichtszunahme auf, welches vor allem bei den weiblichen Tieren zu beobachten ist. In Abbildung 16 und 17 ist die Gewichtszunahme in den von uns erzeugten KO Tieren zu sehen. Abbildung 16 zeigt die unterschiedlichen Gewichte der unterschiedlich alten Aromatase Knock Out Mäuse. Hierbei erfolgte auch die Berechnung einer Normalisierungskurve. In Abbildung 17 dargestellt sind die normalisierten Körpergewichte der Aromatase Knock Out Tiere, getrennt zwischen Geschlechtern und Wildtyp und homozygotem Knock Out (MW±SEM männliche ArKO ++: 31,93±1,14 g, männliche ArKO dd: 31,66±0,73 g, weibliche ArKO ++: 25,22±1,03 g, weibliche ArKO dd: 30,53±1,11 g). Zwischen den weiblichen Tieren mit (n=19) und den Tieren ohne Knock Out (n=19) zeigte sich ein signifikanter Gewichtsunterschied in dem durchgeführten einfachen t-Test ($p < 0,000001$). Im Vergleich hierzu zeigte sich der Gewichtsunterschied zwischen den männlichen Wildtyp Kontroll-Tieren (n=12) zu den KO Tieren (n=12) nicht signifikant. Abbildung 16 zeigt die durchgeführte Normalisierung der Körpergewichte zwischen den verschiedenen Genotypen und Geschlechter der Aromatase Knock Out Maus. Die hierbei ausgewerteten Gewichte zeigten sich normalverteilt nach Testung mittels Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk ($p = 0,2$ für Kolmogorov-Smirnov, und $p = 0,661$ für Shapiro-Wilk), sodass keine Transformation nach $\ln(\text{Gewicht})$ durchgeführt wurde.

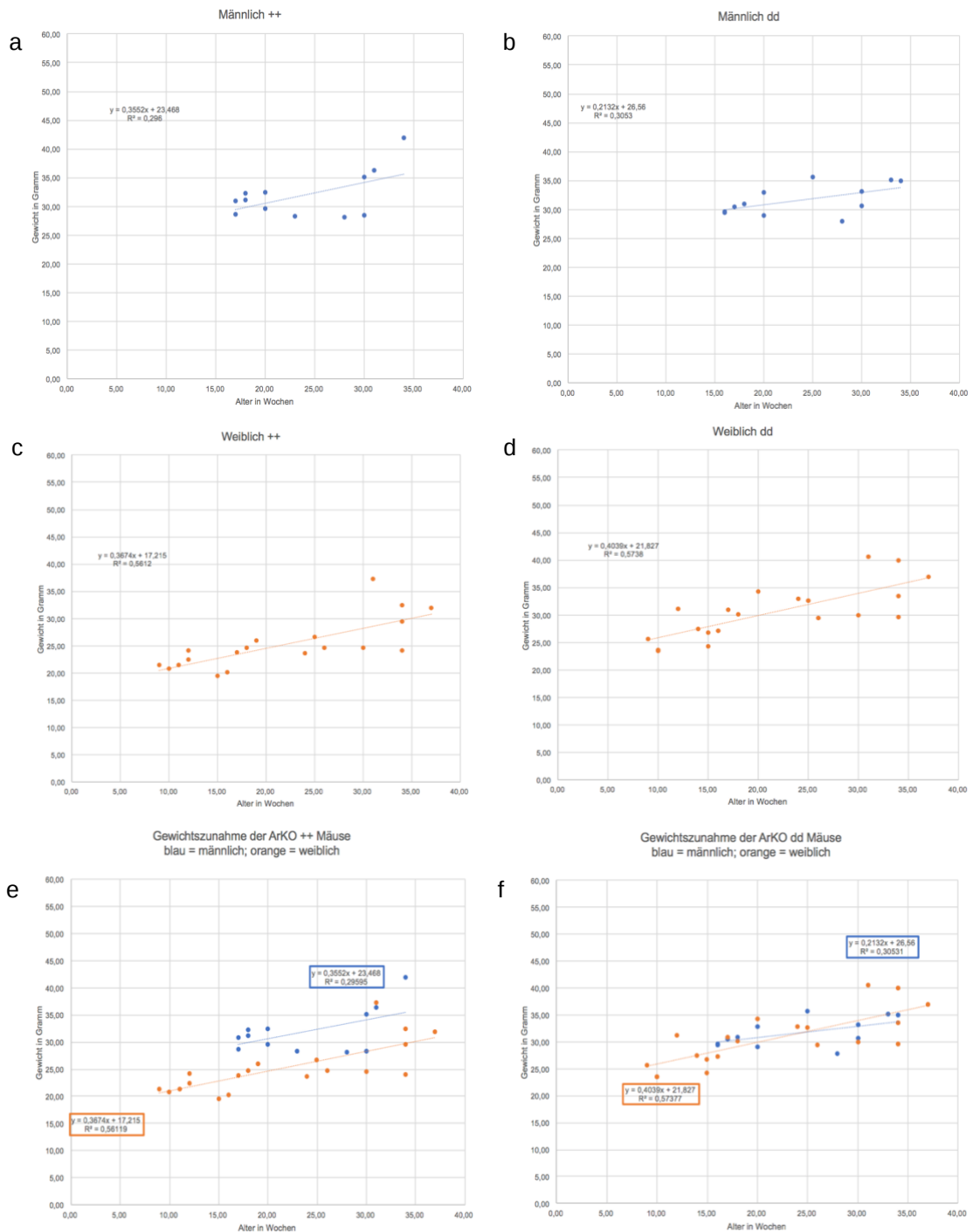


Abbildung 16: Darstellung der Körpergewichte über das Altersspektrum der Aromatase Knock Out Tiere. a: männliche Aromatase ++ Wildtyp Tiere, b: männliche Aromatase dd Knock Out Tiere, c: weibliche Aromatase ++ Wildtyp Tiere, d: weibliche Aromatase dd Knock Out Tiere, e: Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Aromatase ++ Wildtyp Tieren, f: Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Aromatase d/d Knock Out Tieren. x-Achse: Tieralter in Wochen, y-Achse: Körpergewicht in Gramm.

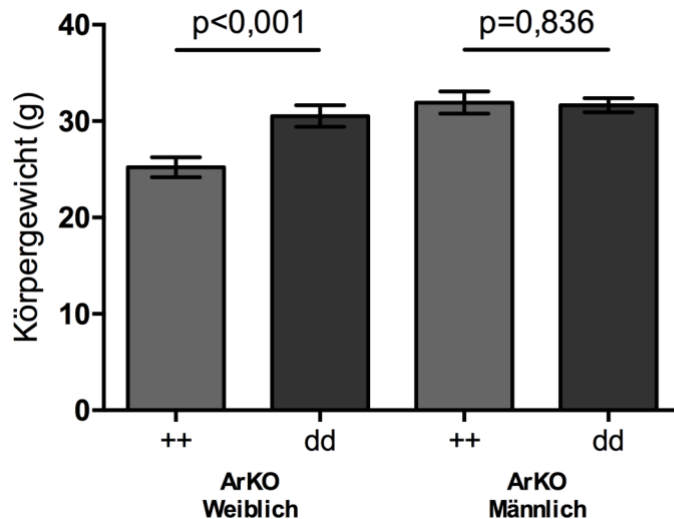


Abbildung 17: Darstellung der an das Alter der Tiere normalisierte Körpergewicht im Vergleich zwischen homozygoten Aromatase KO Tieren (dd) und deren Wildtyp Kontrollen (++).

Des Weiteren zeigte sich bei den weiblichen KO Tieren ein makroskopischer Unterschied des Uterus mit ausgeprägter Involution im Vergleich zu den Wildtyp Kontrollen (Abb. 18).

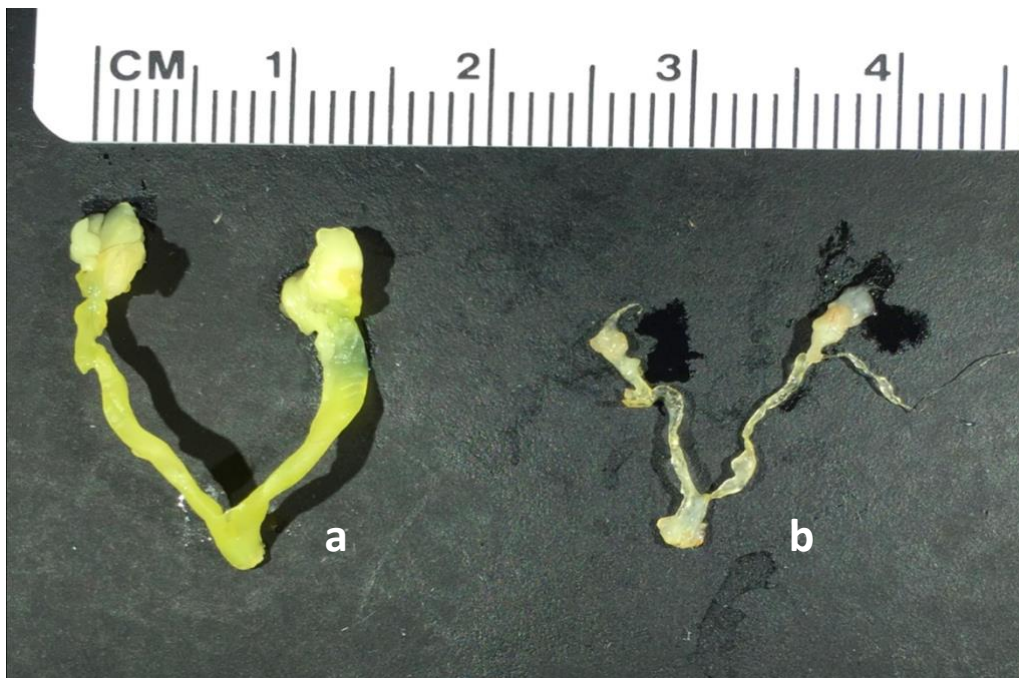


Abbildung 18: Post mortem entnommener Uterus im Vergleich zwischen einer Aromatase Knock Out Maus und deren Wildtyp-Kontrolle. a: ArKO ++, b: ArKO dd, Bildquelle: Prof. Dr. rer. nat Lars Fester, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

4.1.3. Aromatase Funktionsmessung

Die Funktionsmessung fand Anhand der aufgereinigten Mikrosomen aus dem Ovar von ArKO Wildtyp (++) und den entsprechenden homozygoten KO (dd) Tieren statt. Insgesamt wurde diese Testung an 6 Wildtyp und 6 homozygoten KO Tieren, mit drei Wiederholungen durchgeführt. Dieser Test diente der reinen Analyse, um zu überprüfen, ob es noch Aromatase Enzym Aktivität in den ArKO Mäusen gibt. Auf eine Quantifizierung musste aus Gründen der geringen Stichprobengröße verzichtet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt. Als Kontrollwert wurde die Aktivität einer humanen rekombinanten Aromatase genutzt (Positivkontrolle 3,575 $\mu\text{U}/\text{mg}$, Positivkontrolle+Letrozol 2,914 $\mu\text{U}/\text{mg}$). Alle Proben wurden neben der Testung auf die endogene Aktivität auch auf die Aktivität nach dem Zusatz eines Aromatase Inhibitors (Letrozol) getestet (-18,5% Abnahme an Aktivität in der Positivkontrolle).

In der Wildtyp Kontrolle war eine regelhafte Aromatase Aktivität nachzuweisen (ArKO ++ Aromatase Aktivität 1,552 $\mu\text{U}/\text{mg}$), und die Aromatase Aktivität zeigte sich nach Applikation mit Letrozol vermindert (ArKO ++ Aromatase Aktivität+Letrozol 1,251 $\mu\text{U}/\text{mg}$, -19,4%). In den homozygoten Aromatase Knock Out Tieren mit fehlendem zweiten Exon des Aromatase Gens und dem bereits dargelegten nachgewiesenen Geno- und Phänotyp für einen Knock Out der Aromatase zeigte sich ebenfalls eine Aromatase Aktivität (ArKO dd Aromatase Aktivität 1,611 $\mu\text{U}/\text{mg}$). Die in den homozygoten KO Tieren nachgewiesene Aktivität ließ sich hierbei nur geringfügig durch die Applikation von Letrozol beeinflussen (ArKO dd Aromatase Aktivität+Letrozol 1,571 $\mu\text{U}/\text{mg}$, -2,5%).

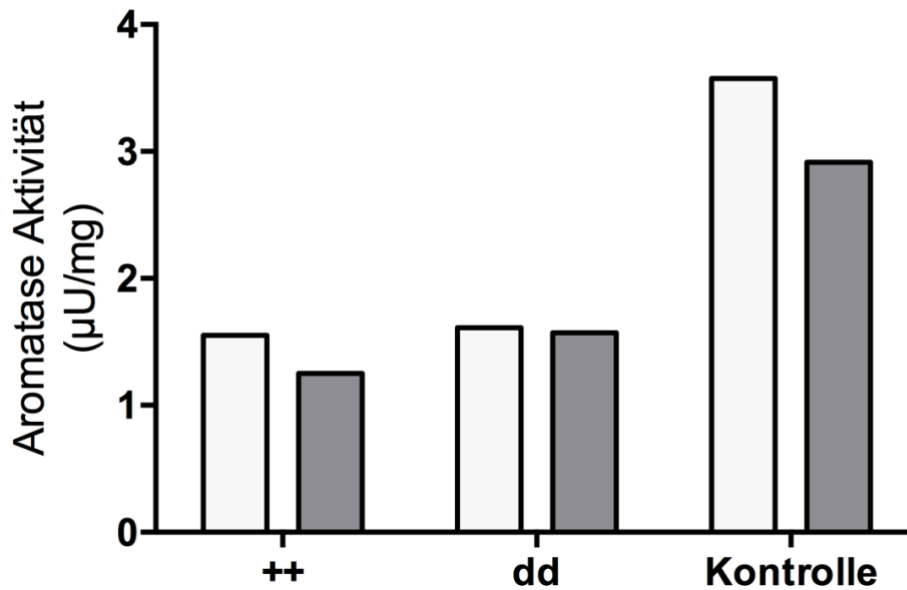


Abbildung 19: Aromatase Aktivität in Ovarien von weiblichen tm1d ArKO ++ (Wildtyp) und dd (homozygoten ArKO Knock Out) Tieren. Weiße Balken symbolisieren die Aktivität vor Applikation von Letrozol, in grau dargestellt die Aktivität nach Applikation des Aromatase Inhibitors Letrozol.

4.2 Lichtmikroskopie der renalen Glomeruli

Neben der Betrachtung der Ultrastruktur per Elektronenmikroskopie wurde an erstellten Semidünnschnitten eine mikroskopische Betrachtung der glomerulären Struktur durchgeführt. Hierdurch war es möglich, sich bereits einen Überblick über die renale Morphologie zu verschaffen.

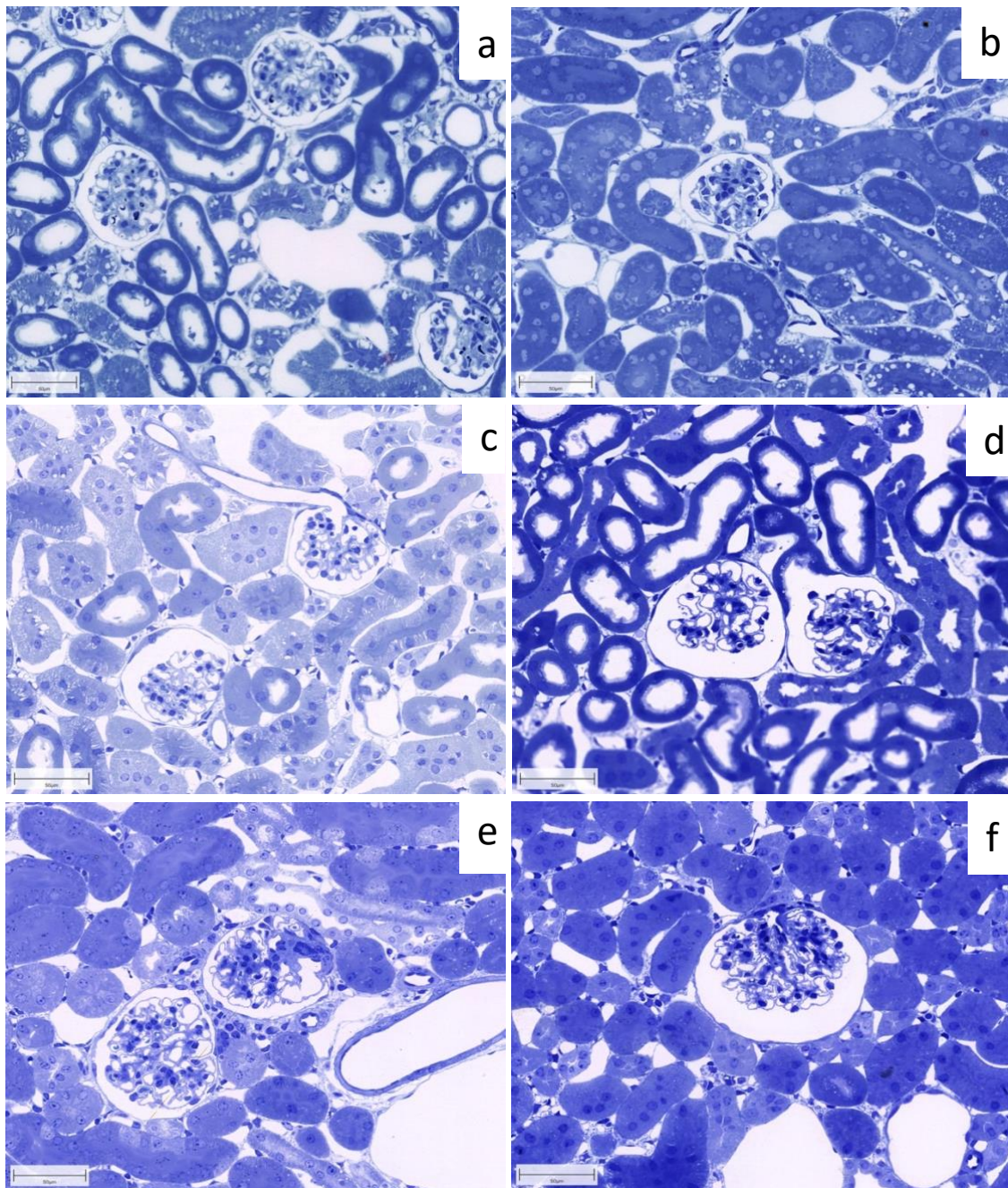


Abbildung 20: Toluidinblau gefärbte Lichtmikroskopische Bilder renaler Glomeruli der weiblichen Versuchsgruppen im Semidünnschnitt. a: DMSO, b: Letrozol, c: OVX+DMSO, d: OVX+Letrozol, e: ArKO ++ weiblich, f: ArKO dd weiblich, Maßstab: 50 µm, Bildquelle: Benjamin Bay, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Abb. 20 zeigt die weiblichen Versuchsgruppen und deren mikroskopische Struktur. Hierbei ist ebenfalls keine morphologische Auffälligkeit zu dokumentieren gewesen.

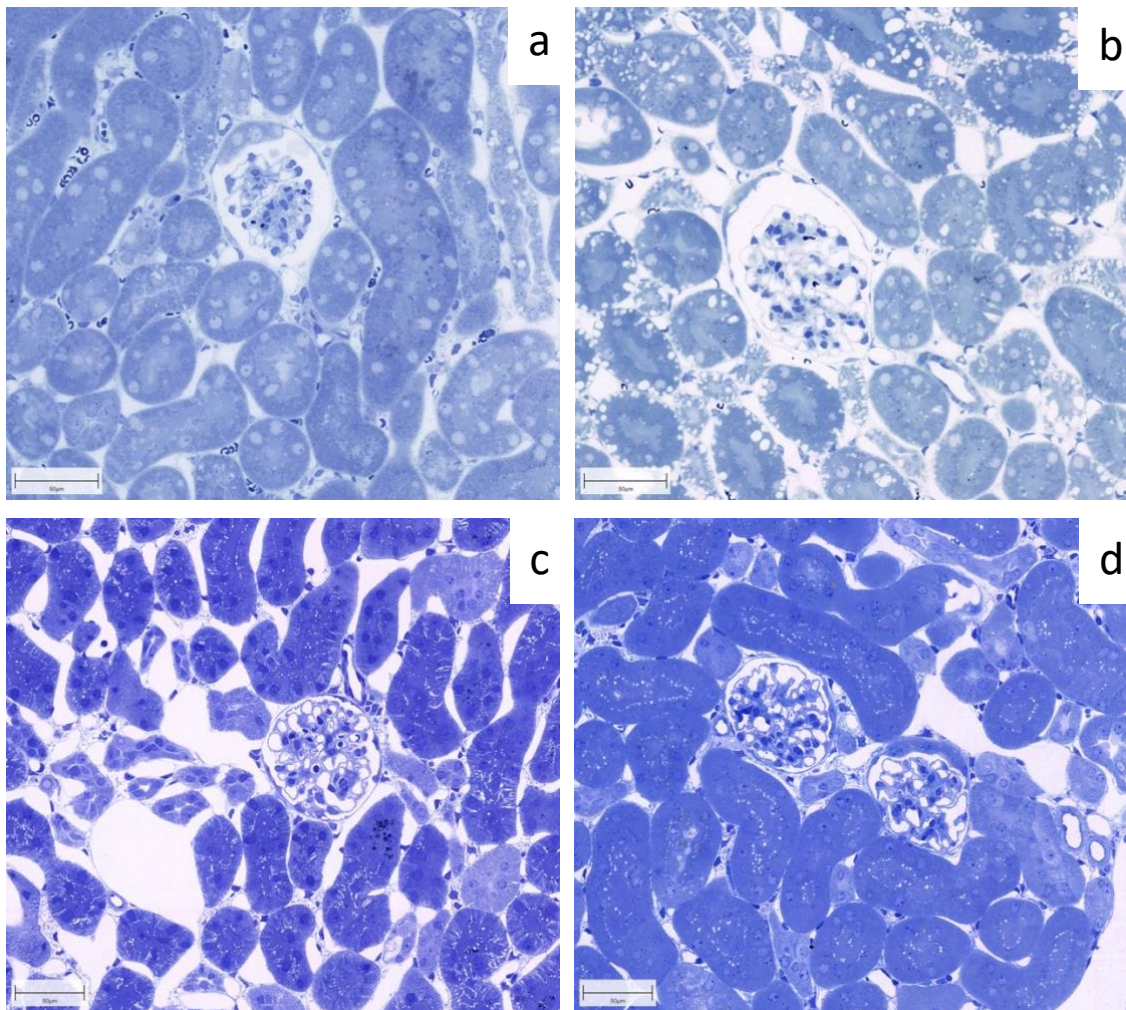


Abbildung 21: Toluidinblau gefärbte Lichtmikroskopische Bilder renaler Glomeruli der männlichen Versuchsgruppen im Semidünnschnitt. a: DMSO, b: Letrozol, c: ArKO ++, d: ArKO dd, Maßstab: 50 μm , Bildquelle: Benjamin Bay, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Wie in Abb. 21 zu sehen, welche Beispielfaßt die mikroskopische Struktur der männlichen Versuchsgruppen zeigt, ist keine mikroskopische Veränderung der renalen Morphologie zu erkennen.

4.3 Ultrastruktur der renalen Glomeruli

Da in der Literatur dokumentiert ist, dass Frauen ein besseres Outcome bei renalen Erkrankungen haben und experimentell Daten für eine Auswirkung von Sexualhormonen auf die Niere besteht, war unsere Hypothese, dass eine Hemmung der Aromatase und dadurch verminderte zirkulierende Spiegel an Estradiol in Mäusen zu einer veränderten Ultrastruktur im Sinne einer Fußfortsatzverbreiterung der Podozyten in der

Transmissionselektronenmikroskopie führt. Die elektronenmikroskopische Betrachtung fand an Ultradünnschnitten von renalem Gewebe statt. Pro Tier wurde hierbei insgesamt 1000 μm der glomerulären Basalmembran aus insgesamt 4 Glomeruli betrachtet. Wie bereits beschrieben erfolgte dies durch im Mittel 70 Messungen pro Versuchstier mit jeweils einer Länge von ca. 15 μm Basalmembran pro Einzelmessung.

4.3.1 Normalverteilungsanalyse

Die ausgewerteten Ergebnisse der Fußfortsatzbreiten zeigten sich in allen Gruppen, auch nach Transformation durch Logarithmierung $\ln(\text{FPW})$, als nicht normalverteilt nach Testung mittels Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk ($p \leq 0,0001$ für beide Normalverteilungstests). Betrachtet man alle Datenpunkte in einer Grafik, so zeigt sich eine Linksverschiebung. Optimal für die Berechnung wäre die ausgeglichene Verteilung der Datenpunkte, entsprechend einer Gauß-Verteilung, die ein $p \geq 0,05$ in der Testung durch Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk zeigen soll. Ist dieses nicht der Fall, lassen sich die Datenpunkte, die hier verglichen werden sollen, logarithmieren. Die Transformation durch Logarithmierung $\ln(\text{FPW})$ führte zu einer relativen Rechtsverschiebung, jedoch weiterhin nicht zu einer Normalverteilung der Ergebnisse der Fußfortsatzbreite ($p \leq 0,0001$ für Shapiro-Wilk und $p \leq 0,0001$ für Kolmogorov-Smirnov). Aufgrund der relativen Rechtsverschiebung der Daten nach Transformation durch Logarithmierung beziehen sich die Signifikanzen auf die transformierten Daten. Zur besseren Übersichtlichkeit und Verständnis sind die in den Abbildungen aufgeführten Datenmittelwerte jedoch unlogarithmiert dargestellt.

4.3.2 Fußfortsatzbreite der weiblichen Tiere

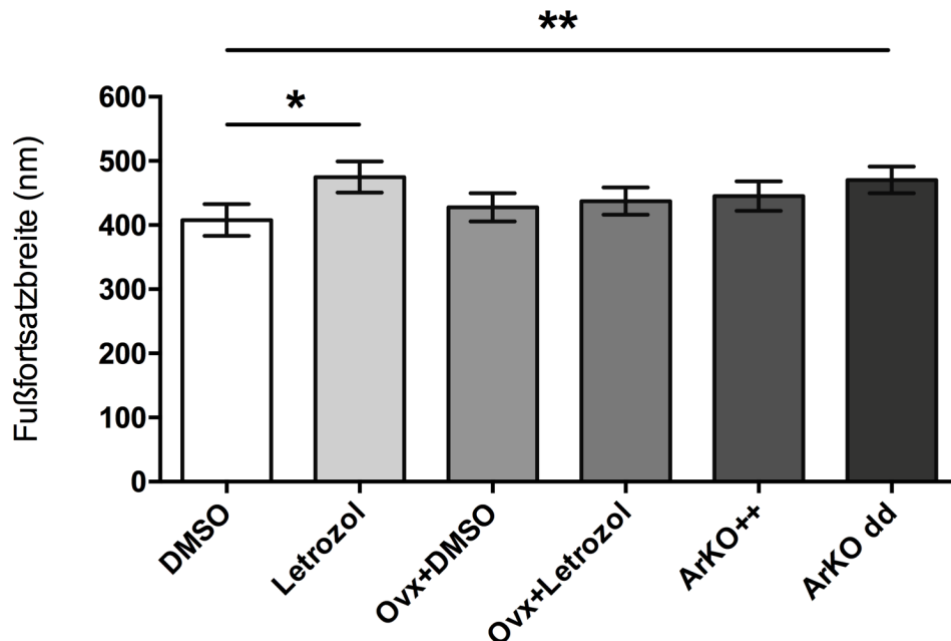


Abbildung 22: In weiblichen Versuchsgruppen Vergleich der Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Fußfortsatzbreite aus jeweils 4 Glomeruli mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★ $p \leq 0,05$ = signifikant, ★ ★ $p \leq 0,01$ = hoch signifikant.

Abbildung 22 zeigt die quantitative Bestimmung der Fußfortsatzbreite aller weiblichen Versuchstiere. Hier im direkten Vergleich zwischen den Tieren der DMSO Gruppe ($n=3$) der Behandlungsgruppe mit Letrozol ($n=3$), der OVX+DMSO Tiere ($n=4$) und der OVX+Letrozol Tiere ($n=4$). Wie bereits beschrieben erfolgte zur repräsentativen Ermittlung der FPW eines Tieres die Betrachtung der durchschnittlichen Fußfortsatzbreite in 4 Glomeruli pro Tier und einer Gesamtstrecke von $1000 \mu\text{m}$ glomerulärer Basalmembran. Insgesamt wurden im Mittel 70 Messungen mit jeweils einer Länge von ca. $15 \mu\text{m}$ Basalmembran in jedem Versuchstier ausgewertet.

Zusätzlich erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der genetisch veränderten Aromatase-defizienten Tiere. Hier im Sinne eines Vergleichs zwischen den Wildtyp Tieren mit der Bezeichnung ++ ($n=4$) und der homozygoten Knock Out Maus mit der Bezeichnung dd ($n=5$).

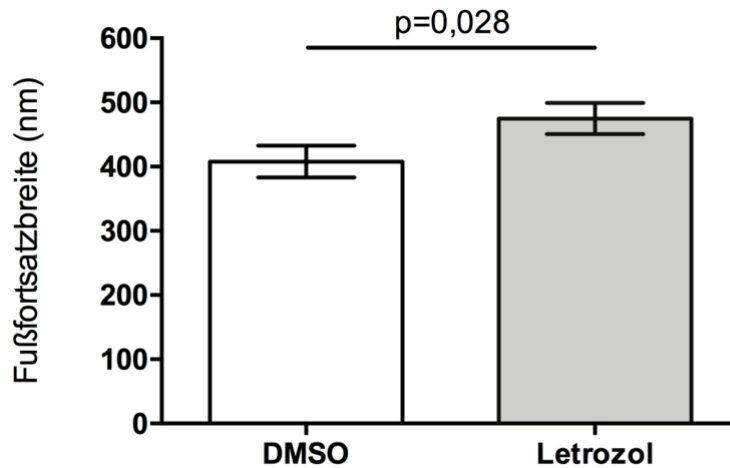


Abbildung 23: In weiblichen Versuchsgruppen Vergleich der Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Fußfortsatzbreite aus jeweils 4 Glomeruli nach Behandlung mittels DMSO bzw. Letrozol mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

Wie in Abb. 23 dargestellt, ist der Mittelwert (MW) mit der Standardabweichung (SD) der Fußfortsatzbreite der mit Letrozol behandelten im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche mit DMSO behandelt wurde signifikant erhöht (FPW MW $\pm$ SD: DMSO 407,85 $\pm$ 24,71 nm, Letrozol 474,90 $\pm$ 24,38 nm // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung ln(FPW) MW $\pm$ SD: DMSO 5,98 $\pm$ 0,047, Letrozol 6,1 $\pm$ 0,05, p=0,028). Um zu ermitteln ob durch die Entfernung der weiblichen Gonaden ein möglicher Effekt auf die renale Ultrastruktur potenziert werden kann, wurde eine Ovariectomie der Tiere durchgeführt und die Tiere zusätzlich mit DMSO bzw. Letrozol behandelt. Anschließend wurde ebenfalls die Ultrastruktur elektronenmikroskopisch betrachtet. Im Vergleich zwischen der DMSO behandelten Referenzgruppe und den Gruppen mit der operativen und medikamentösen Intervention zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Fußfortsatzbreite (FPW MW $\pm$ SD: OVX+DMSO 427,87 $\pm$ 22,13 nm, OVX+Letrozol 437,31 $\pm$ 21,26 nm // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung ln(FPW) MW $\pm$ SD: OVX+DMSO 6,033 $\pm$ 0,04, OVX+Letrozol 6,040 $\pm$ 0,04).

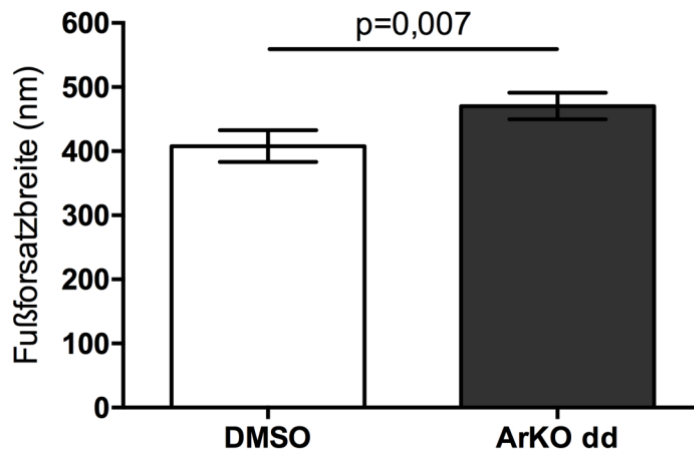


Abbildung 24: In weiblichen Versuchsgruppen Vergleich der Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Fußfortsatzbreite aus jeweils 4 Glomeruli der DMSO behandelten Tieren und den Aromatase KO Tieren mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

Als weitere Option zur Verminderung zirkulierender Sexualhormone nutzten wir Aromatase defiziente Tiere. Die Fußfortsätze der ArKO dd Tiere zeigten sich im Vergleich zur den Referenz Tieren mit durchgeführter DMSO Behandlung signifikant verbreitert (FPW $MW \pm SD$: ArKO dd $470,42 \pm 20,76$ nm // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung $\ln(FPW)$ $MW \pm SD$: ArKO dd $6,128 \pm 0,04$, $p=0,007$). Im Vergleich zu den Wildtyp ArKO Tieren gab es keine signifikante Verbreiterung der Fußfortsatzbreite (FPW $MW \pm SD$: ArKO ++ $445,1 \pm 22,94$ nm // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung $\ln(FPW)$ $MW \pm SD$: ArKO ++ $6,06 \pm 0,04$). In den weiteren untersuchten Gruppen weiblicher Tiere, wie in Abbildung 22 zu sehen, wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden ($p \geq 0,05$).

4.3.3 Fußfortsatzbreite der männlichen Tiere

Neben den weiblichen Tieren wurden zur Ermittlung eines möglichen sexuellen Dimorphismus auch männliche Tiere betrachtet. Das methodische Vorgehen deckte sich mit dem Vorgehen für die weiblichen Gruppen.

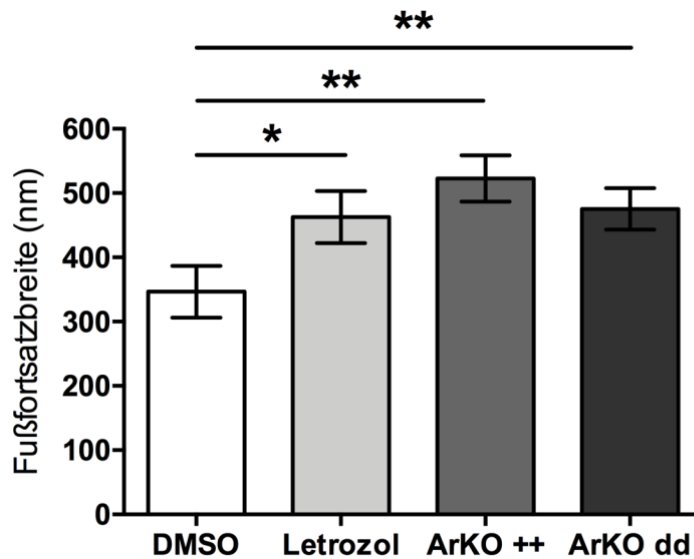


Abbildung 25 In männlichen Versuchsgruppen Vergleich der Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Fußfortsatzbreite aus jeweils 4 Glomeruli mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★ $p \leq 0,05$ = signifikant, ★ ★ $p \leq 0,01$ = hoch signifikant.

In Abb. 25 ist die gesamte Population der männlichen Versuchstiere bestehend aus der Gruppe der DMSO behandelten ($n=3$), der Letrozol behandelten ($n=3$), der ArKO ++ ($n=4$) und der ArKO dd ($n=5$) Tiere mit deren entsprechender Fußfortsatzbreite dargestellt.

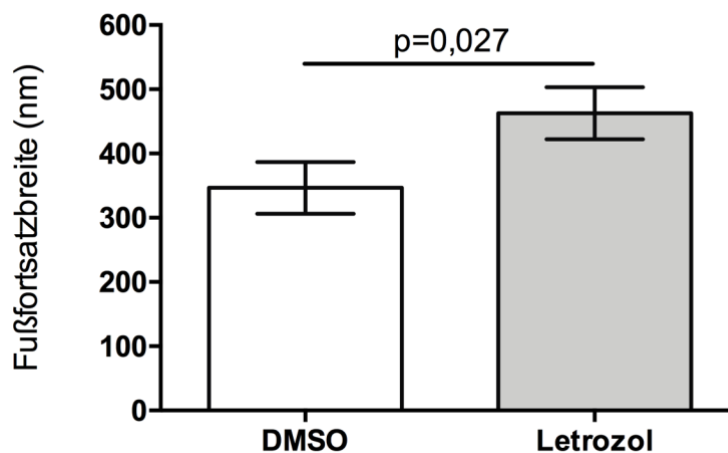


Abbildung 26: In männlichen Versuchsgruppen Vergleich der Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Fußfortsatzbreite aus jeweils 4 Glomeruli nach Behandlung mittels DMSO/Letrozol mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

Abbildung 26 veranschaulicht das der Mittelwert (MW) der Fußfortsatzbreite der mit Letrozol behandelten Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe welche mit

DMSO behandelt wurde signifikant erhöht ist (FPW $MW \pm SD$ DMSO $346,64 \pm 40,225$ nm, Letrozol $462,67 \pm 40,34$ nm // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung $\ln(FPW)$ $MW \pm SD$ DMSO $5,816 \pm 0,057$, Letrozol $6,075 \pm 0,07$; $p=0,027$).

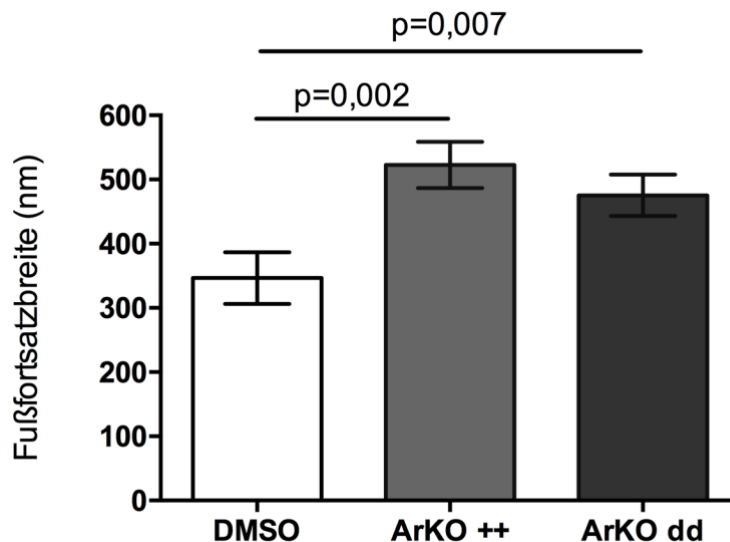


Abbildung 27: In männlichen Versuchsgruppen Vergleich der Mittelwerte der quantitativen Bestimmung der Fußfortsatzbreite aus jeweils 4 Glomeruli im Vergleich zwischen den DMSO behandelten Wildtyp Tieren, den Aromatase KO Wildtyp Kontrollen (ArKO ++) und den homozygoten KO Tieren (ArKO dd) mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

Im Vergleich zu den DMSO behandelten Tieren zeigte sich die Fußfortsatzbreite sowohl der ArKO Wildtyp (FPW $MW \pm SD$ DMSO $346,64 \pm 40,225$ nm, ArKO ++ $522,72 \pm 36,0$ nm // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung $\ln(FPW)$ $MW \pm SD$ DMSO $5,816 \pm 0,057$, ArKO ++ $6,194 \pm 0,06$; $p=0,002$), als auch der homozygoten Knock Out Tiere (FPW $MW \pm SD$ DMSO $346,64 \pm 40,225$ nm, ArKO dd $475,41 \pm 32,21$ nm // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung $\ln(FPW)$ $MW \pm SD$ DMSO $5,816 \pm 0,057$, ArKO dd $6,116 \pm 0,06$; $p=0,007$) signifikant verbreitert.

4.4 Urin-Analysen

Neben der strukturellen Aberration kommt es im Rahmen von renalen Erkrankungen auch zum Verlust der selektiven Permeabilität der Niere. Ein Proteinverlust der Niere ist somit eines der typischen Merkmale eines renalen Schadens. Aufgrund dessen fand eine Sammlung von Urin von den behandelten

Tieren statt. Neben der Analyse auf Proteine fand zusätzlich eine Bestimmung des Kreatininwertes im Urin statt, um schlussendlich die sogenannte Albumin-Kreatinin Ratio (ACR) zu bilden. Durch diesen Quotienten wird das Maß der Proteinurie objektiviert und somit das Ausmaß des renalen Schadens besser beurteilbar.

Urin wurde je nach Gruppe zu einem (männliche und weibliche ArKO Tiere), an zweien (männliche und weibliche Tiere mit DMSO/Letrozol Behandlung) oder an drei Zeitpunkten (weibliche Tiere mit Ovariectomie und DMSO/Letrozol Behandlung) gesammelt. Die Zeitpunkte wurden hierbei so gewählt, um zwischen den verschiedenen Interventionen (operative und/oder medikamentöse Intervention) unterscheiden zu können.

4.4.1 Normalverteilungsanalyse

Zur Beurteilung der Normalverteilung erfolgte eine Analyse der erhobenen Daten mittels einer Testung nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk. Die ausgewerteten Albumin-Kreatinin Quotienten zeigten sich in allen Gruppen nicht normalverteilt nach Testung mittels Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk ($p=0,001$ für Kolmogorov-Smirnov, $p\leq 0,0001$ für Shapiro-Wilk). Betrachtet man alle Datenpunkte in einer Grafik, so zeigt sich eine Linksverschiebung. Optimal für die Berechnung wäre die ausgeglichene Verteilung der Datenpunkte, entsprechend einer Gauß-Verteilung, die ein $p\geq 0,05$ in der Testung durch Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk zeigen soll. Ist dieses nicht der Fall, lassen sich die Datenpunkte, die hier verglichen werden sollen, logarithmieren. Nach Transformation durch Logarithmierung nach $\ln(\text{ACR})$ kam es zur Herstellung einer Normalverteilung durch Rechtsverschiebung der Werte in der Testung mittels des Shapiro-Wilk ($p=0,467$ für Shapiro-Wilk und $p=0,049$ für Kolmogorov-Smirnov). Aufgrund der Normalverteilung der Daten nach Durchführung der Transformation beziehen sich die Signifikanzen auf die transformierten Daten. Zur besseren Übersichtlichkeit und Verständnis sind die in den Abbildungen aufgeführten Daten jedoch als nicht-logarithmiert dargestellt.

4.4.2 Albumin-Kreatinin Ratio der weiblichen Tiere

In der weiblichen Versuchsgruppe erfolgte der Vergleich zwischen 8 Behandlungsgruppen. Die Gruppe der Kontrolltiere (n=19), den DMSO behandelten Tieren (n=6), den Letrozol Tieren (n=5), Ovariectomie Mäuse ohne medikamentöse Behandlung (n=8), Ovariectomie+DMSO Behandlung (n=4), Ovariectomie+Letrozol Behandlung (n=4), den ArKO Wildtyp (++) Mäusen (n=2) und zuletzt den homozygoten ArKO Tieren (dd n=3). In der gemischten Modell Analyse diente die Gruppe der Kontrolltiere als Referenzgruppe.

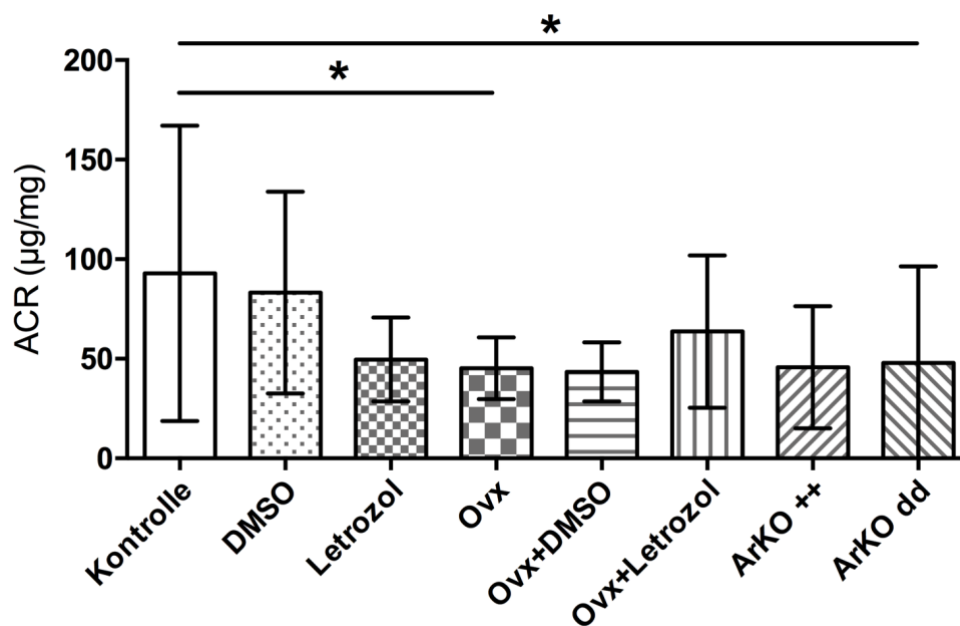


Abbildung 28: In weiblichen Versuchsgruppen Vergleich des Albumin-Kreatinin Quotienten (ACR). Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★ $p \leq 0,05$ = signifikant.

In Abbildung 28 sind die entsprechenden Behandlungsgruppen und deren ermittelten Albumin-Kreatinin Quotienten aufgeführt. Bereits Anhand dieser Darstellung ist die große Streuung der ACR Werte über die Gruppen sichtbar. Insbesondere die Kontrolltiere und die Gruppe der ArKO dd Tiere zeigen ebenfalls eine hohe Standardabweichung (ACR MW $\pm$ SD: Kontrolle 92,97 $\pm$ 74,14 μ g/mg, DMSO 83,29 $\pm$ 50,63 μ g/mg, Letrozol 49,66 $\pm$ 21,05 μ g/mg, OVX 45,32 $\pm$ 15,51 μ g/mg, OVX+DMSO 43,44 $\pm$ 14,84 μ g/mg, OVX+Letrozol 63,7 $\pm$ 38,21 μ g/mg, ArKO ++ 45,8 $\pm$ 30,69 μ g/mg, ArKO dd 47,9 $\pm$ 48,5 μ g/mg // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung ln(ACR) MW $\pm$ SD: Kontrolle

4,34±0,57, DMSO 4,23±0,74, Letrozol 3,82±0,47, OVX 3,76±0,35, OVX+DMSO 3,73±0,33, OVX+Letrozol 4,03±0,55, ArKO ++ 3,7±0,73, ArKO dd 3,43±1,22).

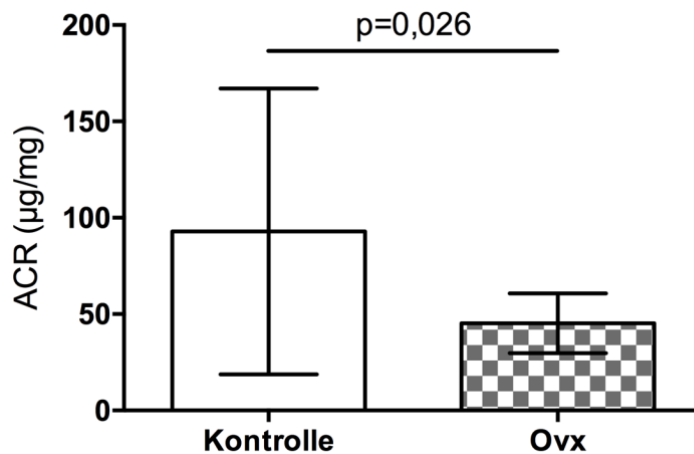


Abbildung 29: In weiblichen Tieren Vergleich des Albumin-Kreatinin Quotienten (ACR) zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der ovariectomierten Tiere. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★ $p \leq 0,05$ = signifikant.

Im Vergleich zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und den ovariectomierten Tieren ohne medikamentöse Behandlung konnte in der gemischten Modell Analyse ein signifikanter Unterschied der Albumin-Kreatinin Quotienten nachgewiesen werden (ACR MW±SD: OVX 45,32±15,51 µg/mg // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung $\ln(\text{ACR})$ MW±SD: OVX 3,76±0,35; $p=0,026$).

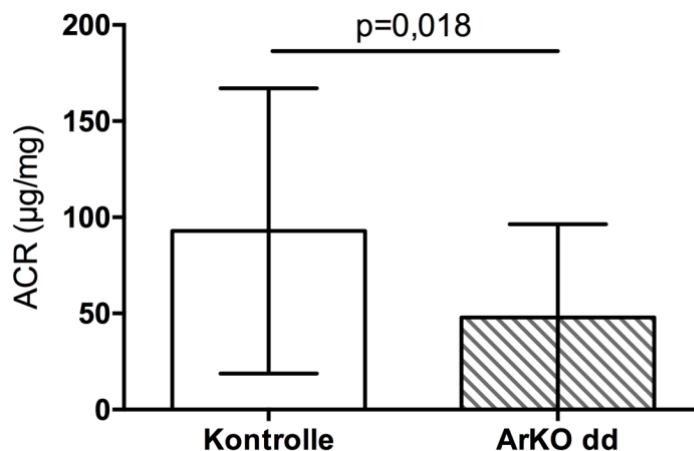


Abbildung 30: In weiblichen Tieren Vergleich des Albumin-Kreatinin Quotienten (ACR) zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der ArKO dd Tiere. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanz: ★ $p \leq 0,05$ = signifikant.

Ein signifikanter Unterschied konnte ebenfalls zwischen der Kontrollgruppe und den homozygoten ArKO Knockout (dd) Tieren ermittelt werden (ACR MW±SD: ArKO dd 47,9±48,5 µg/mg // transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung ln(ACR) MW±SD: ArKO dd 3,43±1,22; p=0,018).

4.4.3 Albumin-Kreatinin Ratio der männlichen Tiere

In männlichen Tieren erfolgte die Etablierung von 5 Versuchsgruppen. Die Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung/Intervention (n=15), die DMSO behandelten Tiere (n=8), die Letrozol behandelten Tiere (n=8), die ArKO Wildtyp (++) Tiere (n=3) und die entsprechenden homozygoten ArKO (dd) Mäuse (n=3). Im Vergleich zur Referenzgruppe (Kontrolltiere ohne Behandlung) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Albumin-Kreatinin Quotienten über die beschriebenen Gruppen in der durchgeführten gemischten Modell Analyse (ACR MW±SD: Kontrolle 154,21±61,43 µg/mg, DMSO 155,51±74,1 µg/mg, Letrozol 123,08±37,74 µg/mg, ArKO ++ 113,17±22,9 µg/mg, ArKO dd 177,57±116,2 µg/mg). Auch nach Transformation der Daten nach ln(ACR) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (transformierte Werte nach Überprüfung der Normalverteilung ln(ACR) MW±SD: Kontrolle 4,98±0,34, DMSO 4,96±0,49, Letrozol 4,77±0,32, ArKO ++ 4,72±0,2, ArKO dd 4,99±0,79).

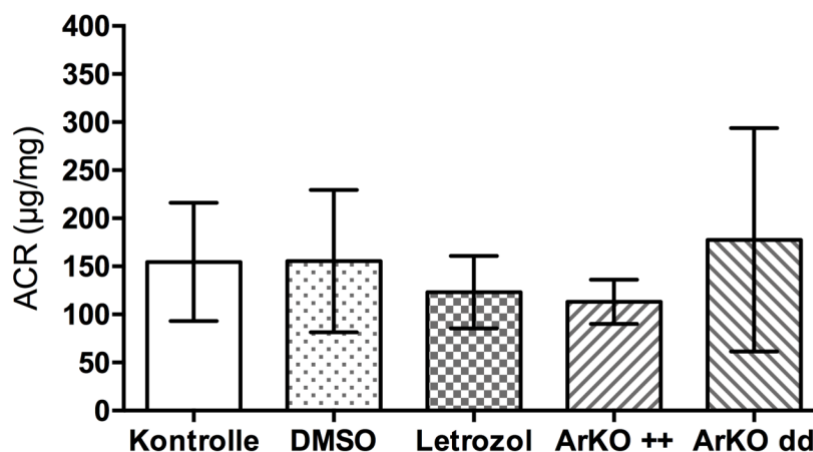


Abbildung 31: In männlichen Versuchsgruppen Vergleich des Albumin-Kreatinin Quotienten (ACR) zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen.

5. Diskussion

5.1 Die Aromatase Knock Out Maus

5.1.1 Eindeutiger Geno- und Phänotyp bei aberranter Funktionsmessung

Die erstmalig von Fisher et al. beschriebene Aromatase Knock Out Maus wurde durch Entfernung des 9. Exons erzeugt (Fisher et al. 1998). Wie im Methodenteil unter Punkt 2.2.2.c beschrieben wurde die in der vorliegenden Arbeit genutzte ArKO Maus durch die Entfernung des 2. Exons der codierenden Sequenz für Aromatase erzeugt. In der von uns durchgeführten Genotypisierung zeigten die KO Mäuse einen homozygoten Genotyp mit fehlendem 2. Exon. Ebenfalls wiesen die Tiere den beschriebenen Phänotyp mit erhöhtem Gewicht und einem makroskopisch unterentwickelten Uterus in weiblichen Tieren auf. In Diskrepanz zum Geno- und Phänotyp steht jedoch die von uns durchgeführte Funktionsmessung mit Nachweis einer enzymatischen Aktivität der Aromatase in homozygoten Knock Out Tieren.

Eine Theorie für die persistierende Aktivität des Enzyms ist, dass es durch die Entfernung des 2. Exon nicht zu einer Funktionslosigkeit der Aromatase, sondern zu einer Loslösung aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum gekommen ist. Der c-terminale Anteil (Teile des 2. Exon) der codierenden Sequenz ist für die Verankerung im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich. Unter der Annahme, dass es bei einer Änderung des Leserahmens zum Frame 3 kommt, könnte es ab dem 3. Exon durch ein weiteres Startcodon zu einer Translation des restlichen Proteins kommen. Somit könnte in unserem Fall potentiell ein strukturell deplatziertes Enzym vorliegen, welches jedoch zumindest teilweise funktionsfähig erscheint. Der Enzym-Aktivitätstest spricht hierfür. Eine sichere Interpretation der ultrastrukturellen Daten und der renalen Funktionsmessung im Sinne der Bestimmung des Albumin-Kreatinin Quotienten in Bezug auf einen möglichen Effekt der Aromatase Inhibition ist anhand der von uns erzeugten Aromatase Knock Out Tiere somit nicht adäquat möglich.

5.2. Einfluss von Sexualhormonen auf die podozytäre Ultrastruktur

5.2.1 Podozytäre Ultrastruktur im Mausmodell

In der Literatur gibt es nur wenige Daten zur physiologischen Fußfortsatzbreite des in dieser Arbeit genutzten C57BL/6 Maus-Stammes, und diese Daten zeigten

ebenfalls kein einheitliches Bild. Einen klaren Referenzwert für unsere gewählten Gruppen konnten wir nicht ausfindig machen. Eine Auflistung der in der Literatur beschriebenen Fußfortsatzbreiten ist folgend dargestellt. Hierbei wurden die Fußfortsatzbreiten aus verschiedenen Arbeiten mit Tieren mit einem C57BL/6 Hintergrund dargestellt. Die beschriebenen Werte dienen rein zur Veranschaulichung.

Autoren	Mausstamm	Tieralter	Fußfortsatzbreite (nm)
Bechtel et al. 2013	ps34fl/fl Mäuse mit C57BL/6 mixed Hintergrund	1,3 und 9 Wochen	250
Elimam et al. 2016	iPLA2 KO Mäuse mit einem C57BL/6 Hintergrund	12-16 Monate	400
Kaufman et al. 2017	RE1α flox/flox basierend auf C57BL/6 und Cre Hintergrund	?	300
Song et al. 2018	C57BL/6 Mäuse	14 Wochen	450
Cybulsky et al. 2018	KO Mäuse basierend auf einem C57BL/6 Hintergrund	13 Monate	300

Tabelle 7: Darstellung der podozytären Fußfortsatzbreiten in der Literatur in Mausstämmen mit einem C57BL/6 Hintergrund.

Die vorliegende Arbeit stellt die erste ultrastrukturelle Untersuchung von renalen Glomeruli bei Tieren unter einer medikamentösen Aromatase Inhibition, bzw. genetischem Knock Out der Aromatase dar. Ebenfalls erfolgt in dieser Arbeit erstmalig die geschlechtsgetrennte Betrachtung der podozytären Fußfortsatzbreite statt. Die Ergebnisse der von uns bestimmten Fußfortsatzbreiten liegen im Vergleich zu denen in der Literatur beschrieben FPW in ähnlichen Dimensionen.

5.2.2 Aromatase Hemmung führt zu einer veränderten Ultrastruktur der Niere

Wir konnten zeigen, dass es sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren unter einer Letrozol Therapie zu einer signifikanten Verbreiterung der podozytären Fußfortsätze im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrollgruppe

kam. Für die Entstehung dieser Fußfortsatzverbreiterung gibt es verschiedene Erklärungstheorien, welche folgend beschrieben werden.

5.2.2.a 17 β -Estradiol und Apoptose

Die Verbreiterung der Fußfortsätze, auch „Foot Process Effacement“ genannt, ist wie bereits in der Einleitung beschrieben eine Reaktion der Podozyten auf einen Stressor. Regelhaft ist das FPE mit einer Apoptose von Podozyten vergesellschaftet, was zu einer Freilegung von GBM und zu einer kompensatorischen Verbreiterung der vitalen podozytären Fußfortsätze führt (Kriz et al. 2013). Der Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Apoptose von Podozyten, konnte von Kummer et al. nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass kultivierte Podozyten eine verringerte Neigung zu Apoptose unter einer Kombination von Protaminsulfat (PAN) und 17 β -Estradiol Behandlung im Vergleich zu einer reinen PAN Applikation zeigten. PAN ist ein in der nephrologischen Forschung regelhaft eingesetztes Agens um einen glomerulären Schaden durch Apoptose von Podozyten zu induzieren. Das Sexualhormon hat somit einen protektiven Faktor auf eine durch PAN induzierte Apoptose (Kummer et al. 2011).

Doublier et al. konnten ähnliche Ergebnisse bei einer TNF α /TGF β induzierten Apoptose in Podozyten zeigen. Durch eine zusätzliche Supplementation von 17 β -Estradiol kam es zu einer verringerten Induktion der Apoptose durch TNF α /TGF β (Doublier et al. 2011). Kummer und Doublier nutzten zur Feststellung eines Effektes von 17 β -Estradiol auf Podozyten ein Modell, in welchem primär ein podozytärer Schaden gesetzt wurde um danach den Effekt von 17 β -Estradiol auf die Regeneration der Podozyten zu testen. In unserem Modell wurde kein Schaden gesetzt, sondern einzig eine Hemmung der Sexualhormonsynthese durchgeführt.

Es ist unwahrscheinlich, dass bei der von uns gewählten Behandlungsdauer mit Letrozol über 7 Tage bereits die protektive Wirkung gegen apoptotische Prozesse in Podozyten durch Inhibition der 17 β -Estradiol Synthese verloren gegangen ist. Eine Beeinflussung der Apoptose als Kausalität für die von uns dokumentierte Verbreiterung der Fußfortsätze in unseren Versuchstieren durch Applikation von Letrozol ist somit fraglich und sollte mit weiteren Studien nachuntersucht werden.

5.2.2.b 17 β -Estradiol und Aktin assoziierte Proteine

Das „Effacement“ der podozytären Fußfortsätze ist mit einer ausgeprägten Reorganisation des Aktinzytoskelettes assoziiert. Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben gibt es zahlreiche Parallelen zwischen Neuronen und Podozyten. Eine dieser Gemeinsamkeiten ist eine vergleichbare Expression von Aktin-assoziierten Proteinen. In neuronalem Gewebe wurde bereits eine Abhängigkeit des Aktinzytoskeletts von 17 β -Estradiol bzw. der Aromatase nachgewiesen. Beispielsweise konnten Kretz und Mitarbeiter zeigen, dass eine Behandlung von Mäusen mittels Letrozol zu einer Veränderung der Spinedichte führt (Kretz et al. 2004). Der Spineapparat ist ein Bereich von Neuronen, welcher mit einem ausgeprägten Aktinzytoskelett assoziiert ist (Deller et al. 2000). Die Beeinflussung des Aktinzytoskeletts in Neuronen findet über Veränderungen der Aktivität zweier Aktinzytoskelett assoziierter Proteine, Cofilin und Synaptopodin, statt (Deller et al. 2000; Penzes & Rafalovich 2012). Neben der neuronalen Expression von Cofilin und Synaptopodin, werden die beiden genannten Proteine auch in Podozyten exprimiert (Asanuma et al. 2006; Ashworth et al. 2010). Asanuma und Kollegen konnte die tragende Rolle von Synaptopodin in Podozyten nachweisen. In Synaptopodin Knock Out Mäusen war, nach Setzung eines glomerulären Schadens durch Lipopolysaccharid, eine verspätete Anpassung der Niere an den Stressor zu dokumentieren. Dies äußerte sich durch eine prolongierte Proteinurie der KO Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Ebenso zeigte sich bei einem durch PAN erzeugten „Effacement“, eine verzögerte Reorganisation des Aktinzytoskelettes der Podozyten in KO Mäusen nach Applikation von Heparin. Bei Wildtyp Mäusen kommt es durch das Heparin zu einer raschen Wiederherstellung der physiologischen podozytären Fußfortsatzarchitektur (Asanuma et al. 2005).

Faul und Mitarbeiter konnten die Signifikanz von Synaptopodin weiter untermauern. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass der antiproteinurische Effekt von Cyclosporin, einem Calcineurin Inhibitor, im Rahmen von proteinurischen Erkrankungen wie einer MCD und einem FSGS über den verminderten Abbau von Synaptopodin vermittelt wird (Faul et al. 2008). Cyclosporin stellt eines der wichtigsten Medikamente in der Therapie von nephrotischen Erkrankungen mit einem ausgedehnten Proteinverlust dar. Die Wichtigkeit von Synaptopodin als

unerlässliches Aktin-assoziiertes Protein wurde durch diese Erkenntnisse bestätigt.

In unserem Institut konnte die Abhängigkeit von Synaptopodin in Zusammenhang von Estrogenen und Aromatase in Neuronen demonstriert werden (Fester et al. 2013; Fester et al. 2017). Auch gelang in unserem Institut der erstmalige immunhistochemische Nachweis der Aromatase perinukleär in Podozyten (Fester et al. - Data unpublished). Ob es eine ähnliche Interaktion zwischen der Aromatase bzw. Sexualhormonen mit Synaptopodin auch in Podozyten gibt, ist bis dato noch nicht bekannt. Eine Hemmung der Aromatase, wie in unserem Modell geschehen, könnte die Verbreiterung der Fußfortsätze in unseren Versuchstieren erklären.

5.2.3 Ein Knock Out der Aromatase hat keinen einheitlichen Effekt auf die glomeruläre Ultrastruktur

Auch in den genetisch veränderten Knock Out Tieren ist eine signifikante Verbreiterung des Fußfortsätze im Vergleich zu der DMSO behandelten Referenzgruppe nachweisbar gewesen. Jedoch ist zu beobachten das eine ebenfalls signifikante Verbeiterung der Fußfortsätze im Vergleich mit den ArKO Wildtyp Tieren zu dokumentieren ist. In der männlichen Versuchsgruppe ist die Fußfortsatzbreite in den homozygoten KO Tieren geringer als in der Wildtyp Vergleichsgruppe.

Insgesamt ist zu schließen das es in der Gruppe der ArKO Wildtyp und KO Tiere in beiden Geschlechtern kein homogenes Bild der Fußfortsatzverbreiterung festgestellt werden kann. Wie bereits im ersten Teil der Diskussion beschrieben zeigen die von uns erzeugten KO Tiere einen Genotyp mit dem Verlust des 2. Exons des Aromatase Gens und einen eindeutigen Phänotyp bei einer erhaltenen Restfunktion der Aromatase. Die enzymatische Restaktivität könnte somit zu erhaltenen Spiegeln an zirkulierendem 17β -Estradiol geführt haben. Eine Messung der Hormonspiegel wurde von uns nicht durchgeführt. Im Falle einer auch nur teilweise erhaltenen Aromatase Funktion und der somit vorhandenen Spiegel an 17β -Estradiol, würde dies den potentiellen Effekt des 17β -Estradiols auf die Ultrastruktur verfälschen. Potentiell greifen bei den homozygoten KO Tieren Kompensationsmechanismen um das Produkt der fehlenden Aromatase zu nivellieren. Eine valide Aussage über einen möglichen

Effekt eines Aromatase Knock Outs auf die renale Ultrastruktur ist Aufgrund dieser Unsicherheiten nicht möglich.

5.2.4 17 β -Estradiol als renoprotektiver, oder Testosteron als renotoxischer Faktor?

Die deutlichste Veränderung hinsichtlich der Ultrastruktur sehen wir in unserem experimentellen Ansatz in Letrozol behandelten männlichen Mäusen. Durch die Hemmung der Aromatase in männlichen Tieren wird die bereits basal niedrige Syntheserate an 17 β -Estradiol mit einer hohen Effektivität gestoppt. Die Inhibition der Aromatase führt zu einer effektiven Verminderung der zirkulierenden Estrogene durch Hemmung des letzten Schrittes der Aromatase Synthese. Bei Letrozol handelt es sich um den potentesten Vertreter der Aromatase Inhibitoren, welcher eine Reduktion der zirkulierenden 17 β -Estradiol Spiegel um 87% bewirkt (Geisler et al. 2002).

Neugarten und Kollegen konnten zeigen, dass das männliche Geschlecht mit einem schlechteren Outcome bei chronischen renalen Erkrankungen assoziiert ist (Neugarten et al. 2000; Silbiger & Neugarten 2008). Eine der Theorien, weshalb bei chronischen renalen Erkrankungen ein sexueller Dimorphismus vorliegt, wird durch den möglichen renoprotektiven Wirkung des weiblichen Sexualhormons 17 β -Estradiol erklärt.

Neben der renoprotektiven Auswirkung der weiblichen Geschlechtshormone wird in der Literatur die potentielle Nephrotoxizität von Testosteron diskutiert (Doublier et al. 2011). Neben der Expression der Estrogen Rezeptoren α und β , exprimieren Podozyten ebenfalls Androgen Rezeptoren, welche sie empfänglich für Testosteron macht (Kummer et al. 2011).

Die Arbeitsgruppe um Doublier konnte zeigen, dass durch Zugabe von Testosteron zu kultivierten Podozyten eine Apoptose ausgelöst werden kann. Dieser Effekt konnte durch Applikation von 17 β -Estradiol jedoch nivelliert werden. Der Effekt des 17 β -Estradiols scheint in dem Modell von Doublier und Kollegen. über Estrogen Rezeptoren vermittelt zu sein, da bei Applikation von ICI 182780, einem Estrogenrezeptor-Antagonist, der Rescue Effekt des Estradiols nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Testosteron und 17 β -Estradiol scheinen somit Gegenspieler in ihrer Wirkung auf die Niere zu sein.

Der antagonisierende Effekt der beiden Sexualhormone konnte ebenso von Sandberg gezeigt werden. In der Arbeit wurde durch chirurgische Intervention eine Hypertension erzeugt, welche einen glomerulären Schaden zur Folge hatte. Männliche Tiere zeigten ein deutlich größeres Ausmaß des glomerulären Schadens im Vergleich zu den weiblichen Versuchstieren. Der glomeruläre Schaden konnte durch eine Orchiektomie, einer Entfernung der männlichen Gonaden, und somit einer verminderten Zirkulation an Testosteron reduziert werden. Testosteron scheint somit einen Einfluss auf die Entstehung eines renalen Schadens, bzw. auf die regenerationsfähige Aktivität des Glomerulus zu haben. Ebenso konnte der protektive Effekt des weiblichen Geschlechts durch eine Ovariectomie nivelliert werden. Eine Ovariectomie gefolgt von einer Gabe von 17β -Estradiol kehrte diesen Trend wieder um (Sandberg 2008).

In unserem experimentellen Modell sollte es parallel zur Senkung der 17β -Estradiol Spiegel durch Letrozol, zu einem Anstieg der Androgen Spiegel kommen. Diese Korrelation unter Aromatase Inhibition konnte in der Literatur bereits gezeigt werden (Loves et al. 2008). Der Anstieg der Androgene ist dadurch zu erklären, dass die Aromatase normalerweise Androgene wie Testosteron und Androstendion, zu 17β -Estradiol aromatisiert. Durch die kompetitive Blockade der Aromatase mittels Letrozol, kommt es somit zu einer Akkumulation von Androgenen.

Die von uns beobachtete Verbreiterung der Fußfortsätze könnte somit sowohl durch die Verringerung der 17β -Estradiol Spiegel, als auch durch die vermehrte Akkumulation von Testosteron und Androstendion im Sinne einer Renotoxizität erklärt werden. Eine weitere Hypothese zur Erklärung des Hormoneffektes könnte eine Disbalance des physiologischen Verhältnisses von 17β -Estradiol zu Testosteron sein, welche sich in einer beeinflussten renalen Regeneration äußert. Möglicherweise ist zur renoprotektiven Wirkung von 17β -Estradiol nur eine geringe Menge an dem Sexualhormon notwendig. Die in männlichen Tieren bereits basal niedrigere Syntheserate an Estrogen sollte durch Applikation des Letrozol nochmals deutlich erniedrigt werden. Ein deutlicher Anstieg der Androgene durch Hemmung der Aromatase in männlichen Tieren, ist bei der physiologisch geringen Syntheserate an Estrogen nicht zu erwarten. Jedoch könnte das gestörte Verhältnis zwischen den Geschlechtshormonen ursächlich für die Fußfortsatzverbreiterung in unseren Versuchstieren sein.

Ob Estrogen eher renoprotektiv sind, Testosteron renotoxisch, oder ob das Verhältnis der beiden Hormone zueinander die entscheidende Rolle spielt, ist bis dato ungeklärt.

5.2.5 Gonadales vs. podozytäres Estrogen

Neben der Frage ob es durch die Hemmung der Aromatase und dadurch veränderter Konzentration an zirkulierender Geschlechtshormone zu einer ultrastrukturellen Veränderung kommt, ist die Frage zu stellen, ob hierbei die lokale Hemmung der Aromatase (in Podozyten) oder die systemische Inhibition (in den Geschlechts- und weiteren hormonaktiven Organen) kausal für die veränderte Morphologie ist. Wie bereits beschrieben exprimieren die viszerale Zellen des Glomerulus die Aromatase (Fester et al. - unpublished). Eine systemische Hemmung per Letrozol würde somit auch einen Effekt auf die podozytär exprimierte Aromatase haben.

Wir gehen am ehesten davon aus, dass der Effekt des Letrozols hierbei auf der Beeinflussung der lokalen podozytären Estrogen Synthese beruht. Diese Annahme basiert darauf, dass in weiblichen Tieren, welche eine Kombination aus DMSO Behandlung und einer Ovariectomie erhielten, keine signifikante Verbreiterung der FPW im Vergleich zu rein DMSO behandelten Tieren zu dokumentieren war. Im Falle einer systemischen Ursache der Fußfortsatzverbreiterung, hätte die Entfernung der Gonaden (der hormonaktivsten Gewebe im Organismus) zu einer relevanten Veränderung führen sollen. Ebenfalls kam es nicht zu einem additiven Effekt im Rahmen der Kombination aus Ovariectomie und Letrozol Applikation. Diese Evidenz unterstützt somit die These, dass das podozytär synthetisierte 17β -Estradiol, bzw. die lokale Beeinflussung der Aromatase Funktion durch Letrozol kausal für die von uns nachgewiesene Fußfortsatzverbreiterung ist.

5.3 Sexualhormone und die renale Funktion

5.3.1 Kreatinin und Protein Werte im Mausmodell

Die selektive Permeabilität der Niere gewährleistet, dass keine Proteine die Blutharnschranke überschreiten, und es somit zu keinem Verlust dieser essentiellen Moleküle über den Harn kommt. Bei einem Verlust der Selektivität durch einen

glomerulären Schaden, kommt es zu einer sogenannten Proteinurie. Hiermit wird das Ausscheiden von Proteinen über den Harn beschrieben. Im klinischen Alltag wird meist das Protein Albumin gemessen, weshalb der Begriff der Albuminurie als Synonym verwendet wird. Sobald die Albuminurie 300 mg/Tag überschreitet, bezeichnet man dies als Makroalbuminurie. Darunterliegende Werte werden als Mikroalbuminurie bezeichnet.

Das Vorkommen einer Makroalbuminurie ist meist mit einem nephrotischen Syndrom und seinen Komplikationen vergesellschaftet. Aber auch die Mikroalbuminurie ist von klinischer und prognostischer Relevanz. Das chronische Ausscheiden von kleinen Mengen an Albumin ist mit einer erhöhten Mortalität und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Die Feststellung einer Mikroalbuminurie ist im klinischen Alltag somit von immenser Wichtigkeit (Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium et al. 2010). In Mäusen und speziell C57BL/6 Mäusen scheint eine gewisse Albuminurie regelhaft vorhanden zu sein. Long und Kollegen konnten in weiblichen C57BL/6 Mäusen mit einem Alter von 13 Wochen eine Ausscheidung von 5-10 μ g Albumin pro 18 Stunden nachweisen (Long et al. 2013).

Einmalige Messungen einer Albuminurie, oder des Serum Kreatinins, können jedoch keine zuverlässige Aussage über die eigentliche Proteinurie und Funktion der Niere treffen. Vor allem die Albuminurie unterliegt tageszeitlichen Schwankungen. Der Goldstandard zur Messung einer Albuminurie ist der 24 Stunden Sammelurin. Da dieser in der Klinik einem enormen Aufwand mit sich zieht und zusätzlich anfällig für Fehler beim Sammeln des Urins ist, hat sich zunehmend die Nutzung der Albumin-Kreatinin Ratio (ACR) zur Beurteilung der Nierenfunktion anhand einer einmaligen Urinsammlung durchgesetzt. Hierbei wird in einer Urin Probe der Kreatinin- und der Albuminwert bestimmt. Diese werden in einen Quotienten gesetzt, welcher repräsentativ für den täglichen Proteinverlust und damit für die renale Selektivität steht. Neben der Nutzung der ACR im klinischen Alltag wird auch im experimentellen Bereich die ACR regelmäßig zur Objektivierung einer Proteinurie bestimmt (Levey et al. 2003). Durch die Erstellung des Quotienten kann die tageszeitliche Variation der Albuminausscheidung über den Urin herausgerechnet und somit die Menge von ausgeschiedenem Protein normalisiert werden.

Folgend dargestellt eine tabellarische Auflistung der in der Literatur beschriebenen ACR Werte in Mausmodellen mit einem C57BL/6-Hintergrund.

Autoren	Mausstamm	Geschlecht	Tieralter (Monate)	ACR ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Tsaih et al. 2010	C57BL/6	männlich	12	13,2
Tsaih et al. 2010	C57BL/6	männlich	18	59,6
Tsaih et al. 2010	C57BL/6	weiblich	12	5,12
Tsaih et al. 2010	C57BL/6	weiblich	18	142
Long et al. 2013	C57BL/6	männlich	4,5	80
Long et al. 2013	C57BL/6	männlich	2,25	70
Long et al. 2013	C57BL/6	weiblich	4,5	20
Long et al. 2013	C57BL/6	weiblich	2,25	25

Tabelle 8: Darstellung der in der Literatur beschriebenen Albumin-Kreatinin Quotienten in Mausstämmen mit einem Bl6 Hintergrund.

Die Arbeitsgruppe von Tsaih führt eine Analyse der Albumin-Kreatinin Quotienten an 30 verschiedenen Mausstämmen durch, darunter auch der von uns genutzte Stamm C57BL/6. Bei den C57BL/6 Tieren zeigte sich im zeitlichen Verlauf (Messungen im Alter von 12, 18 und 24 Monaten), eine ausgeprägte Variabilität des ACR von dem Ausgangswert (Tsaih et al. 2010). Die weiteren in der Literatur beschriebenen ACR spiegeln die große physiologische Breite der Menge an glomerulär ausgeschiedenem Albumin ebenfalls wieder.

In unserem experimentellen Ansatz zeigten sich ebenfalls starke Variationen sowohl zwischen den einzelnen Versuchstieren, als auch den Versuchsgruppen.

5.3.2 Einfluss von 17β -Estradiol auf die selektive Permeabilität der Niere

In der bereits erwähnten Arbeit von Long und Mitarbeitern, wurde neben weiblichen Mäusen auch männliche Tiere untersucht. Die Männchen scheiden die doppelte Menge an Albumin aus im Vergleich zu den Tieren der weiblichen

Vergleichsgruppe. Diese Werte sind, auf das Gewicht bezogen, vergleichbar mit einer menschlichen Mikroalbuminurie (Long et al. 2013).

In unseren Versuchsgruppen ergab sich kein kohärentes Bild der ermittelten ACR. Insbesondere kam es zu keiner vermehrten Ausscheidung von Albumin im Vergleich der Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung zur Interventionsgruppe mit Letrozol. Bei dieser Gruppe zeigte sich, wie bereits beschrieben, in der ultrastrukturellen Analyse eine Verbreiterung der podozytären Fußfortsätze. Die Verbreiterung der Fußfortsätze ist regelhaft mit einer bestehenden Proteinurie vergesellschaftet. Eine direkte Korrelation im Sinne von einer signifikanten Ausscheidung an Proteinen über den Urin in Tieren welche ebenfalls eine signifikante Verbreiterung der podozytären Fußfortsätze aufwiesen konnte nicht ermittelt werden.

Eine signifikante Veränderung der ACR im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnte in weiblichen ovariectomierten Tieren und den weiblichen ArKO dd Tieren festgestellt werden. Der ermittelte Effekt konnte eine verringerte Ausscheidung an Proteinen über den Urin in den Interventionsgruppen (Ovariectomie/ArKO dd) feststellen. Hierbei ist jedoch insbesondere im Bezug auf die Gruppe der Aromatase KO Tiere zu erwähnen, dass in dieser Gruppe eine ausgeprägte hohe Streubreite der ermittelten Albumin-Kreatinin Quotienten festzustellen war. Im Mittelwert lag der ermittelte ACR bei $47,9 \mu\text{g}/\text{mg}$ bei einer Standardabweichung von $48,5 \mu\text{g}/\text{mg}$. Dies entspricht einer Abweichung von mehr als 100% des Mittelwertes, welches die Validität der Ergebnisse unklar lässt.

In der Literatur ist ein Effekt von 17β -Estradiol auf eine bereits bestehende Proteinurie jedoch von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Mankhey und Kollegen konnten zeigen, dass bei Streptozotocin induzierten diabetischen Mäusen mit einer Ovariectomie und nach 17β -Estradiol Applikation, weniger Protein ausgeschieden wurde, als bei der Vergleichsgruppe, welche nur ovariectomiert wurde (Mankhey 2004). Das 17β -Estradiol scheint hier einen Rescue Effekt zu haben. Eine Verminderung einer bestehenden Proteinurie konnte auch in klinischen Studien gezeigt werden, welche den Effekt einer Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen mit einem Diabetes und einer arteriellen Hypertension untersucht haben. Durch eine Hormonersatztherapie für 14 Wochen (Estradiol + Norgestrel) kam es zu einer Verringerung der bestehenden Proteinurie und einer verbesserten Kreatinin

Clearance, einem Surrogatparameter für die renale Funktion (Szekacs et al. 2000).

Zum Einfluss von 17β -Estradiol auf eine Proteinurie gibt es jedoch ebenso Daten, welche eine Verschlechterung der Proteinurie nach Estrogen Applikation zeigen. In der Arbeit von Oestreicher und Mitarbeitern hatte die Applikation von 17β -Estradiol einen adversen Effekt auf die Proteinurie in Ratten mit einem durch niedrige NO und hohe Angiotensin II Spiegel induzierten renalen Schaden. Durch eine Ovariectomie war es möglich, die Proteinurie zu verringern, während eine Kombination aus Ovariectomie und 17β -Estradiol Gabe die Proteinurie vergrößerte (Oestreicher et al. 2006). Der Effekt von 17β -Estradiol scheint somit in Abhängigkeit der Art des glomerulären Schadens, diskrepante Auswirkungen auf die glomeruläre Selektivität zu haben.

Wie bereits bei den Arbeiten zur Auswirkung von 17β -Estradiol auf die Ultrastruktur und die Apoptose, wurde bei den Publikationen in Bezug auf eine Proteinurie und deren Beeinflussung durch veränderte Hormonspiegel primär ein renaler Schaden induziert, und die Proteinurie im Verlauf ermittelt. In dem von uns durchgeführten experimentellen Ansatz, wurde der Niere kein Schaden zugefügt, was wiederum die nicht signifikanten Ergebnisse erklären könnte.

6. Zusammenfassung

6.1. Deutsch

Renale Erkrankungen unterliegen einem Dimorphismus, in welchem Frauen einen renoprotektiven Faktor tragen, welcher zu einem besseren Outcome des weiblichen Geschlechtes führt. Das Sexualhormon 17β -Estradiol ist eines der potentiellen Faktoren in der Entstehung des sexuellen Dimorphismus.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Mausmodell eine Beeinflussung der 17β -Estradiol Spiegel durch Inhibition des für die Estradiol Synthese unerlässlichen Enzyms Aromatase erwirkt. Dies wurde durch Applikation des Aromatasehemmers Letrozol erreicht, und in weiteren Gruppen zusätzlich mit einer Ovariectomie kombiniert. Hierüber hinaus nutzten wir genetisch veränderte Aromatase Knock Out Tiere.

Zur Ermittlung einer Proteinurie erfolgte eine Urinsammlung und zur Objektivierung der ausgeschiedenen Proteinmenge die Bestimmung der Albumin-Kreatinin Ratio (ACR). Ebenfalls führten wir eine transmissionselektronenmikroskopische Begutachtung der postmortem entnommenen Nieren zur Detektion von ultrastrukturellen Aberrationen durch.

Wir konnten zeigen, dass es in beiden Geschlechtern zu einer signifikanten Veränderung der Ultrastruktur mit einer Verbreiterung der podozytären Fußfortsätze nach Applikation von Letrozol kam. Dies zeigte sich ebenfalls im Vergleich zwischen den Knock Out Tieren und der Kontrollgruppe des jeweiligen Geschlechts. Die Auswirkung des Aromatase Knock Outs kann anhand unserer Daten jedoch nicht endgültig beurteilt werden, da trotz eines typischen Geno- und Phänotyps sich eine Restfunktion der Aromatase in den homozygoten Knock Out Tieren nachweisen ließ.

In der Proteinanalyse zeigte sich ein heterogenes Bild des ACR. In weiblichen Mäusen mit medikamentöser sowie operativer Intervention und in ArKO Wildtyp Mäusen dokumentierten wir, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Therapie, eine signifikant niedrigere ACR.

Ob die nachgewiesene aberrante Morphologie in den Tieren eine Senkung der 17β -Estradiol Spiegel zu Grunde liegt, oder ob es aufgrund einer erhöhten Konzentration von Testosteron im Rahmen der Aromatase Inhibition zur Verbreiterung der Fußfortsätze kam, bedarf weiterer Forschungsbemühungen.

6.2. Englisch

Renal diseases underly a sexual dimorphism, in which the female gender is associated with a better outcome in renal diseases. One of the possible contributing factors is a hypothesized renoprotective mechanism of 17β -Estradiol. In the presented study we investigated whether an inhibition of aromatase, the enzyme which catalyzes the last step of the 17β -Estradiol synthesis, would lead to an ultrastructural aberration and change of the permselectivity of the renal filtration barrier in an experimental setting using a murine model.

The inhibition of aromatase was achieved using the potent aromatase inhibitor Letrozole, in some groups combined with a surgical removal of the ovary glands. We also made use of genetically altered Aromatase Knock Out mice. To assess a possible alteration of the renal permselectivity the urine of the treated mice was collected and the albumin-creatinine ratio (ACR) was calculated to objectify a loss of protein via the glomerular filtration barrier. Post mortem the kidneys of the mice were collected and analyzed using a transmission electron microscope to assess ultrastructural changes.

We were able to show that the Letrozol treated groups of both sexes had a significantly increased foot process width. An increased foot process width was also documented inbetween the control group and the Aromatase Knock Out mice in both sexes. However, we were also able to show that in spite of proven genotype, the Knock Out mice showed a remnant activity of the aromatase. An interpretation of our data in regard to the effect of the Aromatase Knock Out on the ultrastructure and permselectivity is therefore not possible.

In the urine analysis, a heterogeneous distribution of the ACR was documented. In female mice with a surgical removal of the ovary glands and in Knock Out wildtype mice there was a significantly lower ACR in comparison to the untreated control mice was registered.

The question, whether the observed structural aberration registered during electron microscopy is due to the decreased levels of 17β -Estradiol, or due to an increase in circulating testosterone remains unanswered and requires further investigation.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb. - Abbildung
AI - Aromatase Inhibitor
ACR - Albumin-Kreatinin Ratio
AF - Aktinfilamente
ArKO - Aromatase Knock Out
ca. - circa
C_t - Cycle Threshold
Dest. - destilliert
DHEA - Dehydroepiandrosteron
dl - Deziliter
DMSO - Dimethylsulfoxid
E1 - Estron
E2 - Estradiol
E3 - Estriol
ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERE - Estrogen Response Elements
ER α - Estrogen Rezeptor-Alpha
ER β - Estrogen Rezeptor-Beta
ESL - Endothelial surface layer
etc. - et cetera
FP - Foot Process
FPE - Foot Process Effacement
FPW - Foot Process Width
FSGS - Fokal segmentale Glomerulosklerose
FSH - Follikelstimulierendes Hormon
G - Erdbeschleunigung
GBM - Glomeruläre Basalmembran
GnRH - Gonadotropin releasing Hormone
Hitzeschockproteine - HSP
HPRT - Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IF - Intermediär Filamente
IgA - Immunglobulin A
i.p. - intraperitoneal

KG - Körpergewicht
kg - Kilogramm
KO - Knock Out
LH - Luteinisierendes Hormon
l - Liter
MCD - Minimal Change Disease
ml - Milliliter
mM - Millimolar
MT - Mikrotubuli
MW - Mittelwert
ng - Nanogramm
nm - Nanometer
OVX - Ovariectomie
pMol - Picomol
qPCR - Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion
s.c. - Subkutan
SD - Standardabweichung
SEM - Standardfehler
StAR - Steroidogenic Acute Regulatory Protein
z.B. - zum Beispiel
 μ l - Mikroliter
 μ m - Mikrometer
 μ M - Mikromolar

8. Literaturverzeichnis

- Adler, S., 1992. Integrin receptors in the glomerulus: potential role in glomerular injury. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 262(5), pp.F697–F704.
- Aronica, S.M., Kraus, W.L. & Katzenellenbogen, B.S., 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), pp.8517–8521.
- Asanuma, K. et al., 2006. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nature Cell Biology*, 8(5), pp.485–491.
- Asanuma, K. et al., 2005. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), pp.1188–1198.
- Ashworth, S. et al., 2010. Cofilin-1 inactivation leads to proteinuria--studies in zebrafish, mice and humans. J. Z. Rappoport, ed. *PloS one*, 5(9), p.e12626.
- Assady, S. et al., 2017. New Insights into Podocyte Biology in Glomerular Health and Disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 28(6), pp.1707–1715.
- Bechtel, W. et al., 2013. Vps34 deficiency reveals the importance of endocytosis for podocyte homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 24(5), pp.727–743.
- Benzing, T., 2006. Therapie der fokal segmentalen Glomerulosklerose. *Der Nephrologe*, 1(3), pp.173–177.
- Berg, U.B., 2006. Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(9), pp.2577–2582.

- Björnström, L. & Sjöberg, M., 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), pp.833–842.
- Chen, S.A. et al., 1988. Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)*, 7(1), pp.27–38.
- Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium et al., 2010. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 375(9731), pp.2073–2081.
- Chumsri, S. et al., 2011. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 125(1-2), pp.13–22.
- Cybulsky, A.V. et al., 2018. Ste20-like kinase, SLK, a novel mediator of podocyte integrity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 315(1), pp.F186–F198.
- D'Agati, V., 2003. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Seminars in Nephrology*, 23(2), pp.117–134.
- D'Amico, G. & Bazzi, C., 2003. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, 63(3), pp.809–825.
- Dalla Valle, L. et al., 2004. Expression of cytochrome P450scc mRNA and protein in the rat kidney from birth to adulthood. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 88(1), pp.79–89.
- Deegens, J.K.J. et al., 2008. Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 74(12), pp.1568–1576.
- Deller, T., Mundel, P. & Frotscher, M., 2000. Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus*, 10(5), pp.569–581.

- Doublier, S. et al., 2011. Testosterone and 17 β -estradiol have opposite effects on podocyte apoptosis that precedes glomerulosclerosis in female estrogen receptor knockout mice. *Kidney International*, 79(4), pp.404–413.
- Elimam, H. et al., 2016. Genetic Ablation of Calcium-independent Phospholipase A2 γ Induces Glomerular Injury in Mice. *The Journal of biological chemistry*, 291(28), pp.14468–14482.
- Farquhar, M.G., Vernier, R.L. & Good, R.A., 1957. An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine*, 106(5), pp.649–660.
- Faul, C., 2014. The Podocyte Cytoskeleton: Key to a Functioning Glomerulus in Health and Disease. In *Podocytopathy*. Karger Publishers, pp. 22–53.
- Faul, C. et al., 2007. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends in cell biology*, 17(9), pp.428–437.
- Faul, C. et al., 2008. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nature medicine*, 14(9), pp.931–938.
- Fester, L. et al., 2013. Estradiol responsiveness of synaptopodin in hippocampal neurons is mediated by estrogen receptor β . 138, pp.455–461.
- Fester, L. et al., 2017. Synaptopodin is regulated by aromatase activity. *Journal of Neurochemistry*, 140(1), pp.126–139.
- Fisher, C.R. et al., 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), pp.6965–6970.
- Geisler, J. et al., 2002. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(3), pp.751–757.

- Grahammer, F. et al., 2016. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI insight*, 1(9).
- Green, S. et al., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058), pp.134–139.
- Greene, G.L. et al., 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 231(4742), pp.1150–1154.
- Greka, A. & Mundel, P., 2012. Cell biology and pathology of podocytes. *Annual Review of Physiology*, 74(1), pp.299–323.
- Gundersen, H.J., Seefeldt, T. & Osterby, R., 1980. Glomerular epithelial foot processes in normal man and rats. Distribution of true width and its intra- and inter-individual variation. *Cell and Tissue Research*, 205(1), pp.147–155.
- Harada, N. et al., 1990. Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 166(1), pp.365–372.
- Haraldsson, B., Nyström, J. & Deen, W.M., 2008. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological reviews*, 88(2), pp.451–487.
- Heng, Y.-W. & Koh, C.-G., 2010. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), pp.1622–1633.
- Hjalmarsson, C., Johansson, B.R. & Haraldsson, B., 2004. Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries. *Microvascular research*, 67(1), pp.9–17.
- Horster, M.F., Braun, G.S. & Huber, S.M., 1999. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiological reviews*, 79(4), pp.1157–1191.
- Huber, T.B. & Benzing, T., 2005. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 14(3), pp.211–216.

- Hull, R.P. & Goldsmith, D.J.A., 2008. Nephrotic syndrome in adults. *BMJ (Clinical research ed.)*, 336(7654), pp.1185–1189.
- Improta-Brears, T. et al., 1999. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), pp.4686–4691.
- Jones, M.E. et al., 2000. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), pp.12735–12740.
- Kauffman, A.S. et al., 2015. A Novel Letrozole Model Recapitulates Both the Reproductive and Metabolic Phenotypes of Polycystic Ovary Syndrome in Female Mice. *Biology of reproduction*, 93(3), p.69.
- Kaufman, D.R. et al., 2017. Deletion of inositol-requiring enzyme-1 α in podocytes disrupts glomerular capillary integrity and autophagy. R. Gilmore, ed. *Molecular biology of the cell*, 28(12), pp.1636–1651.
- Kerjaschki, D., Sharkey, D.J. & Farquhar, M.G., 1984. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *The Journal of cell biology*, 98(4), pp.1591–1596.
- Kestilä, M. et al., 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular cell*, 1(4), pp.575–582.
- Klausen, K. et al., 2004. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation*, 110(1), pp.32–35.
- Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research*, 29(14), pp.2905–2919.
- Kretz, O. et al., 2004. Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *Journal of Neuroscience*, 24(26), pp.5913–5921.
- Kriz, W. & LeHir, M., 2005. Pathways to nephron loss starting from glomerular

diseases-insights from animal models. *Kidney International*, 67(2), pp.404–419.

Kriz, W. & Lemley, K.V., 2017. Mechanical challenges to the glomerular filtration barrier: adaptations and pathway to sclerosis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 32(3), pp.405–417.

Kriz, W. et al., 2013. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *American journal of physiology. Renal physiology*, 304(4), pp.F333–47.

Kuiper, G.G. et al., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), pp.5925–5930.

Kummer, S. et al., 2011. Estrogen receptor alpha expression in podocytes mediates protection against apoptosis in-vitro and in-vivo. S. E. Dryer, ed. *PloS one*, 6(11), p.e27457.

Kummer, S. et al., 2012. The influence of gender and sexual hormones on incidence and outcome of chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 27(8), pp.1213–1219.

Lambers Heerspink, H.J. et al., 2010. Comparison of different measures of urinary protein excretion for prediction of renal events. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(8), pp.1355–1360.

Lasagni, L. et al., 2013. Podocyte mitosis - a catastrophe. *Current molecular medicine*, 13(1), pp.13–23.

Levey, A.S. et al., 2003. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine*, 139(2), pp.137–147.

Liapis, H., Romagnani, P. & Anders, H.-J., 2013. New insights into the pathology of podocyte loss: mitotic catastrophe. *The American journal of pathology*, 183(5), pp.1364–1374.

Long, D.A. et al., 2013. Albuminuria is associated with too few glomeruli and too

- much testosterone. *Kidney International*, 83(6), pp.1118–1129.
- Loves, S., Ruinemans-Koerts, J. & de Boer, H., 2008. Letrozole once a week normalizes serum testosterone in obesity-related male hypogonadism. *European journal of endocrinology*, 158(5), pp.741–747.
- Mankhey, R.W., 2004. 17 -Estradiol replacement improves renal function and pathology associated with diabetic nephropathy. *AJP: Renal Physiology*, 288(2), pp.F399–F405.
- Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P., 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current genomics*, 7(8), pp.497–508.
- Mathieson, P.W., 2010. Podocyte actin in health, disease and treatment. *Nephrology Dialysis ...*, 25(6), pp.1772–1773.
- McHenry, J. et al., 2014. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(1), pp.42–57.
- Mendelsohn, M.E. & Karas, R.H., 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. F. H. Epstein, ed. *The New England journal of medicine*, 340(23), pp.1801–1811.
- Miner, J.H., 2011. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 26(9), pp.1413–1417.
- Miner, J.H., 2012. The glomerular basement membrane. *Experimental cell research*, 318(9), pp.973–978.
- Mundel, P. & Kriz, W., 1995. Structure and function of podocytes: an update. *Anatomy and embryology*, 192(5), pp.385–397.
- Mundel, P. & Shankland, S.J., 2002. Podocyte biology and response to injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(12), pp.3005–3015.
- Muther, R.S. & Bennett, W.M., 1980. Effects of Dimethyl Sulfoxide on Renal Function in Man. *JAMA*, 244(18), pp.2081–2083.

- Neugarten, J., Acharya, A. & Silbiger, S.R., 2000. Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(2), pp.319–329.
- Nilsson, S. et al., 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*, 81(4), pp.1535–1565.
- Nitsch, D. et al., 2013. Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: a meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 346(jan29 1), pp.f324–f324.
- Oestreicher, E.M. et al., 2006. Estradiol increases proteinuria and angiotensin II type 1 receptor in kidneys of rats receiving L-NAME and angiotensin II. *Kidney International*, 70(10), pp.1759–1768.
- Overlie, I. et al., 1999. The endocrine transition around menopause--a five years prospective study with profiles of gonadotropines, estrogens, androgens and SHBG among healthy women. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 78(7), pp.642–647.
- Pagtalunan, M.E. et al., 1997. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 99(2), pp.342–348.
- Pavenstädt, H., Kriz, W. & Kretzler, M., 2003. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiological reviews*, 83(1), pp.253–307.
- Penzes, P. & Rafalovich, I., 2012. Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Advances in experimental medicine and biology*, 970(Chapter 4), pp.81–95.
- Prabhu, A. et al., 2010. Expression of aromatase, androgen and estrogen receptors in peripheral target tissues in diabetes. *Steroids*, 75(11), pp.779–787.
- Prange-Kiel, J. et al., 2006. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 16(5), pp.464–471.
- Prange-Kiel, J. et al., 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in

- hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13(2), pp.226–234.
- Pratt, W.B. et al., 2004. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays in biochemistry*, 40, pp.41–58.
- Reiser, J. et al., 2000. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(1), pp.1–8.
- Rijtema, M. et al., 1999. The effects of dimethyl sulfoxide on renal function of the newborn rabbit. *Biology of the neonate*, 76(6), pp.355–361.
- Rippe, B. & Haraldsson, B., 1994. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiological reviews*, 74(1), pp.163–219.
- Rostgaard, J. & Qvortrup, K., 1997. Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvascular research*, 53(1), pp.1–13.
- Saleem, M.A. et al., 2008. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 295(4), pp.F959–70.
- Sandberg, K., 2008. Mechanisms underlying sex differences in progressive renal disease. *Gender medicine*, 5(1), pp.10–23.
- Saritas, T., Kuppe, C. & Moeller, M.J., 2015. Progress and controversies in unraveling the glomerular filtration mechanism. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 24(3), pp.208–216.
- Satchell, S.C. & Braet, F., 2009. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296(5), pp.F947–56.
- Scott, R.P. & Quaggin, S.E., 2015. Review series: The cell biology of renal filtration. *The Journal of cell biology*, 209(2), pp.199–210.
- Shih, N.Y. et al., 1999. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-

- associated protein. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5438), pp.312–315.
- Shirato, I., 2002. Podocyte process effacement in vivo. *Microscopy research and technique*, 57(4), pp.241–246.
- Shirato, I. et al., 1996. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *The American journal of pathology*, 148(4), pp.1283–1296.
- Sibley, S.D. et al., 2006. Gender and elevated albumin excretion in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) cohort: role of central obesity. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 47(2), pp.223–232.
- Silbiger, S. & Neugarten, J., 2008. Gender and human chronic renal disease. *Gender medicine*, 5, pp.S3–S10.
- Skarnes, W.C. et al., 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, 474(7351), pp.337–342.
- Song, G. et al., 2018. Astragaloside IV ameliorates early diabetic nephropathy by inhibition of MEK1/2-ERK1/2-RSK2 signaling in streptozotocin-induced diabetic mice:. *Journal of International Medical Research*, 46(7), pp.2883–2897.
- Srivastava, T. et al., 2003. Cell-cycle regulatory proteins in podocyte cell in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney International*, 63(4), pp.1374–1381.
- Szekacs, B. et al., 2000. Postmenopausal hormone replacement improves proteinuria and impaired creatinine clearance in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 107(8), pp.1017–1021.
- Tewari, R. et al., 2015. Correlation of proteinuria with podocyte foot process effacement in IgA nephropathy: an ultrastructural study. *Ultrastructural pathology*, 39(2), pp.147–151.

- Tryggvason, K., Patrakka, J. & Wartiovaara, J., 2006. Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *The New England journal of medicine*, 354(13), pp.1387–1401.
- Tsaih, S.-W. et al., 2010. Genetic analysis of albuminuria in aging mice and concordance with loci for human diabetic nephropathy found in a genome-wide association scan. *Kidney International*, 77(3), pp.201–210.
- van den Berg, J.G. et al., 2004. Podocyte foot process effacement is not correlated with the level of proteinuria in human glomerulopathies. *Kidney International*, 66(5), pp.1901–1906.
- Vasmant, D., Maurice, M. & Feldmann, G., 1984. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *The Anatomical record*, 210(1), pp.17–24.
- Wiggins, J.E. et al., 2005. Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(10), pp.2953–2966.
- Wöckel, A. et al., 2018. Interdisciplinary Screening, Diagnosis, Therapy and Follow-up of Breast Cancer. Guideline of the DGGG and the DKG (S3-Level, AWMF Registry Number 032/045OL, December 2017) - Part 2 with Recommendations for the Therapy of Primary, Recurrent and Advanced Breast Cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 78(11), pp.1056–1088.

9. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune für die Möglichkeit meine Promotion am Institut für Neuroanatomie durchführen zu können und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Lars Fester für die Betreuung der Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Ideen haben diese Arbeit möglich gemacht und kontinuierlich vorangetrieben.

Besonderer Dank geht an Frau Barbara Holstermann, welche mir in allen elektronenmikroskopischen Fragen zur Seite stand und einen großen Anteil an der Entstehung der vorliegenden Arbeit hatte.

Danke an Tobias, Paris und Philipp für moralische und fachliche Unterstützung und die schönen Zeiten innerhalb und außerhalb des Instituts.

Ebenfalls wäre die Komplettierung der Arbeit nicht ohne meine Eltern und meine Schwester möglich gewesen. Regelmäßiges Nachfragen führte zu einem motivationssteigernden Effekt.

Und danke Annika – für alles.

10. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg den 10.08.2020