

**Untersuchungen des Einflusses von
Phosphorylierungen des Endozytose-Rezeptors
Megalin sowie von Diabetes und Hypoxie auf die
Funktion des proximalen Tubulus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Madlen Kunke

Kiel, April 2022

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Franziska Theilig
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2022

*„Forschung heißt heute, die Suche nach immer kleineren Nadeln
in immer größeren Heuhaufen.“*

(Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger)

Zusammenfassung

Der proximale Tubulus (PT) in der Niere stellt einen besonderen Abschnitt des Nephrons dar. Er übernimmt die Hauptlast der Reabsorption von Wasser, Salzen und die fast vollständige Rückgewinnung von Nährstoffen und Proteinen aus dem Primärharn. Zurecht wird er als „Arbeitspferd“ des Nephrons bezeichnet. Dabei erfolgt die Aufnahme von Proteinen hauptsächlich über die rezeptorvermittelte Endozytose. Störungen dieses Prozesses führen unter anderem zu Proteinurie – ein klinisches Merkmal vieler Nierenerkrankungen. Ein wichtiger Rezeptor für die Aufnahme von Proteinen ist Megalin. Megalin zeichnet sich durch viele Interaktionsmotive und posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, im C-Terminus aus. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Position Serin 4577 im C-Terminus einer Phosphorylierung durch den Kinasekomplex mTORC1 unterliegt. Im Zellkulturmodell führte die konstitutive Phosphorylierung an Serin 4577 zu einer Abnahme der Endozytose von Albumin. Dieser Effekt konnte nicht auf eine Änderung der zellulären Verteilung von Megalin in verschiedenen Endozytose-Vesikeln zurückgeführt werden. Ebenso zeigte sich kein Einfluss der Phosphorylierung von Serin 4577 auf den Phosphorylierungsstatus von der Aminosäure Serin 4616, die das Recycling von Megalin beeinflusst.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Beteiligung eines hypoxischen PT an der Entstehung und Progression der diabetischen Nephropathie (DN). Die DN ist das Resultat diabetischer Komplikationen und führt ohne rechtzeitige Behandlung zur terminalen Niereninsuffizienz. Mit Beginn des Diabetes kommt es in der Niere zu einer glomerulären Hyperfiltration und Mikroalbuminurie, wodurch der PT einer erhöhten Substratreabsorption, einem vermehrten Zellstress und Entzündungen sowie Hypoxie ausgesetzt ist. Hypoxie spielt bisher eine unklare Rolle in der Entstehung und Progression der DN. Mithilfe eines neuen konditionellen Mausmodells, das durch einen spezifischen *knockout* von von-Hippel-Lindau (*Vhl*) im PT (*Vhl*^{APT}) in Kombination mit einem Streptozotocin (STZ) induzierten Typ 1 Diabetes mellitus (*Vhl*^{APT}/STZ) charakterisiert ist, konnte der Beitrag von Hypoxie im PT näher untersucht werden. Es zeigte sich, dass der *knockout* von *Vhl* in Bezug auf die Morphologie des Glomerulus und Tubulus, auf tubuläre Transporter und auf den Metabolismus Kennzeichen der DN aufwies. Gleichzeitig verhinderte der frühzeitige *knockout* von *Vhl* in *Vhl*^{APT}/STZ die glomeruläre Hyperfiltration verglichen zu diabetischen Kontrollmäusen, was mit einer Reduktion von NOS1 und Natrium-Glukose-Transportern assoziiert war. Mittels RNA-Sequenzierungs-Analysen wurden Gene identifiziert, die im Zusammenhang mit der Abmilderung des Krankheitsverlaufs der DN in *Vhl*^{APT}/STZ stehen könnten. Unter den signifikant verändert exprimierten Genen wurden der Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter *Slc12a1*, die Leucin-Decarboxylase 1 *Ldc1* und

der Transkriptionsfaktor *Zbtb16* identifiziert. Das katalysierte Produkt von LDC1, Isopentylamin, führte zur Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs und ZBTB16 zur Hemmung der Autophagie. Die hier erhaltenen Daten demonstrieren, dass Hypoxie im PT ein Kennzeichen der DN ist und dass eine gezielte frühzeitige Nachahmung hypoxischer Bedingungen die DN in ihrer Entstehung und Progression abmildern könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Daten der vorliegenden Arbeit dazu beitragen, die – noch stetig unterschätzte – pathophysiologische Bedeutung des PT zu erhellen.

Summary

The proximal tubule (PT) of the kidney represents a special part of the nephron. The PT reabsorbs most of water, salts and nearly all of the nutrients and proteins from the primary filtrate. Therefore it is not surprising to call the PT “workhorse” of the nephron. The uptake of proteins occurs mainly via receptor mediated endocytosis and disturbances of this process lead e. g. to proteinuria, a clinical symptom of many kidney diseases. One of the most important receptors for protein uptake is megalin. The C-terminus of megalin is characterized by many interaction motifs and posttranslational modifications like phosphorylations. This thesis revealed that the position serine 4577 in C-terminus is phosphorylated by the kinase complex mTORC1. Using cell culture models the constitutive phosphorylation of serine 4577 lead to reduced endocytosis of albumin. This effect was not due to changes in intracellular distribution of megalin in various endocytic vesicles. The phosphorylation of serine 4577 had also no influence on the phosphorylation site serine 4616, a known site to influence megalin recycling.

Another aspect of this thesis was to elucidate the role of hypoxia in the PT in the development and progression of diabetic nephropathy (DN). DN is a result of diabetic complications. Without early treatment it leads to end-stage renal disease. With the onset of diabetes, glomerular hyperfiltration and microalbuminuria occur, which faces the PT to enhanced reabsorption, cell stress, inflammation and hypoxia. The explicit role of hypoxia in the development and progression of DN is currently unknown. By using a new conditional knockout mice model with specific knockout of von-Hippel-Lindau (*Vhl*) in the PT (*Vhl*^{APT}) in combination with streptozotocin (STZ) induced type 1 diabetes mellitus (*Vhl*^{APT}/STZ) the contribution of hypoxia in PT could be analyzed. PT-*Vhl*-knockout and DN share common alterations in glomerular and tubular morphology, tubular transport and metabolism. At the same time, *Vhl*-knockout prior STZ-induced diabetes in *Vhl*^{APT}/STZ prevented glomerular hyperfiltration compared to diabetic control mice. This was associated by a reduction of NOS1 and sodium-glucose transporters. RNA-sequencing analysis revealed genes, which may be responsible for the improvement of DN in *Vhl*^{APT}/STZ. Among the most significantly altered genes *Slc12a1*, coding for the sodium transporter NKCC2, *Ldc1*, coding for leucine decarboxylase 1 and the transcription factor *Zbtb16* were identified. The catalyzed product of LDC1, isopentylamine, increased cellular oxygen consumption rate and ZBTB16 reduced autophagy. These data demonstrate that PT hypoxia is a hallmark of DN and that targeting hypoxia prior onset of type 1 diabetes may ameliorate development and progression of DN.

Taken together, the data depicted in this thesis might help to shed light on the – until now underestimated – pathophysiological role of the PT.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | V |
| Summary | VII |
| Inhaltsverzeichnis | VIII |
| Abkürzungsverzeichnis | XII |
| Abbildungsverzeichnis | XVI |
| Tabellenverzeichnis | XVIII |
| | |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Kurzer Einblick in die Anatomie und Physiologie der Niere | 1 |
| 1.1.2 Tubuloglomerulärer Rückkopplungsmechanismus (TGF) | 3 |
| 1.1.3 Renin-Angiotensin-System (RAS) | 4 |
| 1.2 Struktur und Funktion des proximalen Tubulus | 5 |
| 1.2.1 Transportvorgänge am proximalen Tubulus | 6 |
| 1.2.1.1 NHE3 | 6 |
| 1.2.1.2 SGLT1 und SGLT2 | 7 |
| 1.2.1.3 GLUT1 und GLUT2 | 8 |
| 1.2.2 Proteinreabsorption am proximalen Tubulus | 8 |
| 1.2.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose | 8 |
| 1.2.2.2 Megalin | 9 |
| 1.3 Die Rolle des proximalen Tubulus in der diabetischen Nephropathie | 15 |
| 1.3.1 Diabetische Nephropathie | 15 |
| 1.3.2 Pathogenese und -physiologie der diabetischen Nephropathie | 17 |
| 1.3.3 Auswirkungen der Hyperglykämie auf den proximalen Tubulus | 17 |
| 1.3.3.1 Hyperreabsorption von Glukose | 17 |
| 1.3.3.2 Glomeruläre Filtrationsrate | 18 |
| 1.3.3.3 Albuminurie | 19 |
| 1.3.3.4 <i>Advanced Glycation End Products</i> | 20 |
| 1.3.3.5 Hypoxie | 21 |
| 1.4 Zielstellung | 23 |
| | |
| 2. Material | 25 |
| 2.1 Spezielle Geräte, Plastikwaren und allgemeine Laborverbrauchsmaterialien ... | 25 |
| 2.2 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und rekombinante Proteine | 27 |
| 2.3 Standard-Puffer und -Lösungen | 30 |
| 2.4 Kits | 30 |
| 2.5 Plasmide und rekombinante lentivirale Vektoren | 30 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.6 | Antikörper | 33 |
| 2.7 | Oligonukleotide | 35 |
| 2.8 | Bakterienstämme | 36 |
| 2.9 | Zelllinien | 37 |
| 3. | Methoden | 38 |
| 3.1 | Methoden der Bakterienkultur | 38 |
| 3.1.1 | <i>E. coli</i> | 38 |
| 3.1.2 | Glyzerin-Dauerkulturen | 38 |
| 3.1.3 | Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 38 |
| 3.1.4 | Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 39 |
| 3.2 | Methoden der Zellkultur | 40 |
| 3.2.1 | Allgemeine Zellkulturbedingungen | 40 |
| 3.2.2 | Oberflächenbeschichtung von Zellkulturgefäßen und Deckgläsern | 41 |
| 3.2.3 | Verwendete Zelllinien | 42 |
| 3.2.3.1 | HEK293-EBNA (<i>Human Embryonic Kidney</i>) | 42 |
| 3.2.3.2 | BN16 (<i>Brown Norway</i>) | 42 |
| 3.2.3.3 | MDCKII (<i>Madin Darby Canine Kidney</i>) | 43 |
| 3.2.3.4 | OK (<i>Opossum Kidney</i>) | 43 |
| 3.2.3.5 | TAL (<i>Thick Ascending Limb</i>) | 43 |
| 3.2.4 | Ermittlung der Zellzahl | 44 |
| 3.2.5 | Kryokonservierung von Zellen | 44 |
| 3.2.6 | Ansetzen von Zellkulturen aus eingefrorenen Zellen | 45 |
| 3.2.7 | Transfektion von Zellen mittels Kalzium-Phosphat | 45 |
| 3.2.8 | Transfektion von Zellen mittels Xfect™ | 46 |
| 3.2.9 | Transduktion von OK und TAL Zellen mittels lentiviraler Vektoren | 47 |
| 3.2.10 | Gen- <i>knockout</i> von BN16 Zellen mittels CRISPR/Cas9 | 49 |
| 3.2.11 | Isolation von Zellklonen mittels <i>limited dilution</i> | 50 |
| 3.2.12 | Immunzytochemie (ICC) | 50 |
| 3.2.13 | Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen | 51 |
| 3.2.14 | Bestimmung der Glykolyseaktivität von Zellen | 52 |
| 3.2.15 | Bestimmung der Zellproliferation | 53 |
| 3.3 | Gentechnische Methoden | 53 |
| 3.3.1 | Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 53 |
| 3.3.2 | Sequenzierung | 53 |
| 3.3.3 | Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA | 53 |
| 3.3.4 | RNA-Isolation | 54 |
| 3.3.5 | cDNA-Synthese | 54 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.6 | PCR | 55 |
| 3.3.7 | <i>Real-time</i> quantitative PCR (qPCR) | 56 |
| 3.3.8 | RNAscope® | 57 |
| 3.3.9 | Agarose-Gelelektrophorese | 58 |
| 3.3.10 | Verdauung von DNA mithilfe von Restriktionsenzymen | 58 |
| 3.4 | Proteinbiochemische Methoden | 59 |
| 3.4.1 | Isolation von GST- und His-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> Zellen | 59 |
| 3.4.2 | Proteinreinigung mittels Glutathion Agarose im <i>batch</i> -Verfahren | 61 |
| 3.4.3 | Proteinreinigung mittels Ni-NTA Agarose im <i>batch</i> -Verfahren | 62 |
| 3.4.4 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 63 |
| 3.4.5 | Dialyse | 63 |
| 3.4.6 | Herstellung von Zelllysaten | 63 |
| 3.4.7 | Zellkernfraktion von Zellen | 64 |
| 3.4.8 | Membranfraktion von Nieren und Zellen | 64 |
| 3.4.9 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 66 |
| 3.4.10 | Färbung von Proteingelen mit Coomassie® Brilliant Blue R-250 | 68 |
| 3.4.11 | Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot) | 69 |
| 3.4.12 | Ponceau S-Färbung | 69 |
| 3.4.13 | Immunologische Detektion von Proteinen | 70 |
| 3.4.14 | Immunpräzipitation (IP) | 70 |
| 3.5 | Immunhistologische Methoden | 71 |
| 3.5.1 | Anfertigung von Gefrierschnitten | 71 |
| 3.5.2 | Anfertigung von Paraffinschnitten | 71 |
| 3.5.3 | Immunhistochemie (IHC) kryokonservierter Gewebe | 71 |
| 3.5.4 | Immunhistochemie (IHC) paraffineingebetteter Gewebe | 72 |
| 3.5.5 | PV1 und ZBTB16 Färbung | 73 |
| 3.6 | Statistische Analysen und verwendete Programme | 73 |
| 3.6.1 | Statistik | 73 |
| 3.6.2 | Kolokalisation | 74 |
| 3.6.3 | Bioinformatische Analysen | 74 |
| 4. | Ergebnisse | 75 |
| 4.1 | Megalin | 75 |
| 4.1.1 | mTORC1 phosphoryliert Megalin an Serin 4577 | 76 |
| 4.1.2 | Einfluss der Phosphorylierung von Serin 4577 im C-Terminus von Megalin | 79 |
| 4.1.3 | <i>In vitro</i> Studien zur Interaktion zwischen Megalin und ARH/DAB2 | 82 |
| 4.1.4 | Etablierung einer stabilen BN16 <i>Megalin-knockout</i> Zelllinie | 87 |
| 4.2 | <i>Vhl-knockout</i> im proximalen Tubulus | 93 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.1 | NOS1 trägt zur glomerulären Hyperfiltration bei | 95 |
| 4.2.2 | VEGF-Rückfluss beeinflusst das Wachstum der Glomeruli | 96 |
| 4.2.3 | Glomeruläre und tubuläre Änderungen | 97 |
| 4.2.4 | Untersuchung von LDC1 und ZBTB16 | 98 |
| 4.2.4.1 | Funktionen von ZBTB16 im Zellkulturmodell | 102 |
| 5. | Diskussion | 117 |
| 5.1 | Einfluss von Phosphorylierungen im C-Terminus von Megalin | 117 |
| 5.1.1 | mTORC1 phosphoryliert und beeinflusst dadurch Megalin | 117 |
| 5.2 | Der proximale Tubulus im Fokus der Pathogenese der diabetischen Nephropathie | 121 |
| 5.2.1 | Das STZ-Mausmodell zur Studie der diabetischen Nephropathie | 122 |
| 5.2.2 | <i>Vhl-knockout</i> im proximalen Tubulus fördert und hemmt die Ausbildung der diabetischen Nephropathie | 124 |
| 5.2.3 | Tubulozentrisches Modell der diabetischen Nephropathie | 125 |
| 5.2.4 | Tubuloglomerulärer <i>crossstalk</i> | 128 |
| 5.2.5 | Leucin-Decarboxylase und ihr katalysiertes Produkt Isopentylamin | 130 |
| 5.2.6 | Funktionen von ZBTB16 | 132 |
| 5.2.6.1 | ZBTB16 reguliert NHE3 | 133 |
| 5.2.6.2 | ZBTB16 hemmt die Autophagie | 134 |
| 5.2.6.3 | ZBTB16 und Zellproliferation | 137 |
| 5.2.7 | Mechanismen einer HIF-1 α -bedingten Präkonditionierung | 138 |
| | Literaturverzeichnis | 142 |
| | Publikationen | 172 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 174 |
| | Danksagung | 175 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| ACE | <i>angiotensin converting enzyme</i> |
| ADH | antidiuretisches Hormon |
| AGE | <i>advanced glycation end products</i> |
| AK | Antikörper |
| AMPK | AMP-aktivierte Proteinkinase |
| Ang I/II | Angiotensin I/II |
| AP2 | Adaptorprotein 2 |
| Ap ^R | Ampicillin-Resistenz |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ARH | <i>autosomal recessive hypercholesterolemia</i> |
| AS | Aminosäure |
| AT ₁ | Angiotensin II Typ 1 Rezeptor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AZIN | ODC-Antizym Inhibitor |
| BN16 | <i>Brown Norway 16</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat, <i>cyclic adenosine monophosphate</i> |
| CDK | Cyclin-abhängige Kinasen, <i>cyclin-dependent kinases</i> |
| cDNA | komplementäre DNA; <i>complementary DNA</i> |
| CKD | <i>chronic kidney disease</i> |
| CPD | Zytoplasmadomäne |
| C-terminal | carboxylterminal |
| CUB | <i>complement components C1r/C1s, Uegf, Bmp1</i> |
| DAB2 | Disabled-2 |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| dest. | destilliert |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DN | diabetische Nephropathie |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure; <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| Dox | Doxycyclin |
| DT | distaler Tubulus |
| DTT | Dithioreithol |
| ECAR | extrazelluläre Ansäuerungsrate; <i>extracellular acidification rate</i> |

| | |
|------------------|--|
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | epidermaler Wachstumsfaktor; <i>epidermal growth factor</i> |
| ENaC | epithelialer Natriumkanal |
| EPO | Erythropoietin |
| et al. | und andere; <i>et alii</i> |
| EtOH | Ethanol |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FcRn-Rezeptor | neonataler Fc-Rezeptor für IgG |
| FKS | fötales Kälberserum |
| GBM | glomeruläre Basalmembran |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein; <i>green fluorescent protein</i> |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| GLUT1/2 | Glukosetransporter 1/2 |
| GSK3 | Glykogensynthase-Kinase 3 |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HEK | humane embryonale Nierenepithel Zelllinie; <i>human embryonic kidney</i> |
| HIF | Hypoxie-induzierbarer Faktor |
| His | Histidin |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase; <i>horseradish peroxidase</i> |
| Hyg ^R | Hygromycin-Resistenz |
| IB | Immunblot |
| ICAM1 | <i>intercellular adhesion molecule 1</i> |
| ICC | Immunzytochemie |
| Ig | Immunglobulin |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunpräzipitation |
| IPA | Isopentylamin |
| JGA | juxtaglomerulärer Apparat |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| KDM | Histon-Lysin-Demethylasen |
| LBD | Ligandenbindungsdomäne |
| LB-Medium | <i>lysogeny broth</i> -Medium |
| LC3 | <i>light chain 3</i> |
| LDC1 | Leucin-Decarboxylase 1 |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| LRP | <i>LDL receptor-related protein</i> |

| | |
|---|---|
| LV | lentiviral |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinasen |
| MCP1 | <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> |
| MCTF | Megalin C-terminales Fragment |
| MD | Macula Densa |
| MDCKI/II | <i>Madin Darby Canine Kidney I/II</i> |
| MICD | Megalin Intrazelluläre Domäne |
| MMR | Megalin Mini-Rezeptor |
| mRNA | Boten-RNA; <i>messenger RNA</i> |
| mTOR(C) | <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin (complex)</i> |
| MW | Molekülmasse; <i>molecular weight</i> |
| Na ⁺ /K ⁺ -ATPase | Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase |
| NCC | Natriumchlorid-Kotransporter |
| Neo ^R | Neomycin-Resistenz |
| NF-κB | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| NHE3 | Natrium-Protonen Austausch Isotyp 3; <i>sodium-hydrogen exchanger 3</i> |
| NKCC2 | Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter |
| NOS1 | Stickstoffmonoxid-Synthase 1; <i>nitric oxide synthase 1</i> |
| N-terminal | aminoterminal |
| OCR | Sauerstoffverbrauchsrate; <i>oxygen consumption rate</i> |
| ODC | Ornithindecaboxylase |
| ODλ | optische Dichte _{Wellenlänge in nm} |
| OK | <i>Opossum Kidney</i> |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung; <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCNA | <i>proliferating cell nuclear antigen</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion; <i>polymerase chain reaction</i> |
| PDL | Poly-D-Lysin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHD | Prolylhydroxylasen; <i>prolyl hydroxylase domain proteins</i> |
| PKA | Proteinkinase A |
| PLZF | <i>promyelocytic leukemia zinc finger</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PT | proximaler Tubulus |
| PTB-Domäne | Phospho-Tyrosin-Bindedomäne |
| PtdIns3K | <i>class III phosphatidylinositol 3 kinase</i> |
| PTEC | proximale Tubulusepithelzellen; <i>proximal tubule epithelial cells</i> |
| PTM | posttranslationale Modifikationen |

| | |
|-------------------|---|
| Puro ^R | Puromycin-Resistenz |
| qPCR | <i>Real-time</i> quantitative PCR |
| Rab | <i>ras-related in brain</i> |
| RAS | Renin-Angiotensin-System |
| Rheb | <i>ras homolog enriched in brain</i> |
| RIP | regulierte intramembranäre Proteolyse; <i>regulated intramembrane proteolysis</i> |
| rLV | rekombinante lentivirale Vektoren |
| RNA | Ribonukleinsäure; <i>ribonucleic acid</i> |
| RNA-Seq | RNA-Sequenzierungs-Analyse |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies; <i>reactive oxygen species</i> |
| rpm | Runden pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumlaurylsulfat; <i>sodiumdodecylsulfate</i> |
| SEM | Standardfehler; <i>standard error of the mean</i> |
| SGLT1/2 | Natrium-Glukose-Kotransporter 1/2; <i>sodium glucose cotransporter 1/2</i> |
| sgRNA | <i>single guide</i> RNA |
| T1Dm/T2Dm | Typ 1 Diabetes mellitus/ Typ 2 Diabetes mellitus |
| TAAR | <i>trace amine associated acid receptor</i> |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| TAL | dicker aufsteigender Ast (der Henle-Scheife); <i>thick ascending limb</i> |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung; <i>tris buffered saline</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TGF | tubuloglomerulärer Rückkopplungsmechanismus; <i>tubuloglomerular feedback</i> |
| TGFβ | <i>transforming growth factor β</i> |
| TMD | Transmembrandomäne |
| Tris | Tri(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TU/ml | <i>transducing unit</i> je Milliliter |
| ü. N. | über Nacht |
| UV | ultraviolett |
| VEGF | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VHL | von Hippel-Lindau |
| v/v | Volumenprozent (<i>volume/volume</i>) |
| WT | Wildtyp |
| w/v | Gewichtsprozent (<i>weight/volume</i>) |
| x g | x-fache Erdbeschleunigung |
| ZBTB16 | <i>zinc finger and BTB domain containing 16</i> |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------------|--|----|
| Abbildung 1-1: | Schematische Darstellung eines Nephrons mit Nierenkörperchen und Tubulusabschnitten. | 2 |
| Abbildung 1-2: | Schematische Struktur von Megalin. | 11 |
| Abbildung 3-1: | Schematische Darstellung der Transduktion von OK und TAL Zellen mit Lentiviren. | 48 |
| Abbildung 4-1: | Nachweis der Hemmung und Aktivierung der Kinaseaktivität von mTORC1. | 77 |
| Abbildung 4-2: | mTORC1 phosphoryliert Megalin an Serin 4577. | 78 |
| Abbildung 4-3: | Exemplarische konfokale Aufnahmen und Quantifizierung der Kolo-kalisation verschiedener Megalinkonstrukte mit unterschiedlichen subzellulären Markern. | 81 |
| Abbildung 4-4: | Die Phosphorylierung von Serin 4616 innerhalb des PPPSP-Motivs im C-Terminus von Megalin ist nicht von der Integrität der Phosphorylierungsstelle Serin 4577 abhängig. | 82 |
| Abbildung 4-5: | SDS-PAA-Gel ausgewählter Reinigungsfractionen des in <i>E. coli</i> exprimierten Fusionsproteins His-MMR SA nach Bindung an Ni-NTA Agarose und Reinigung im <i>batch</i> -Verfahren. | 84 |
| Abbildung 4-6: | SDS-PAA-Gel ausgewählter Reinigungsfractionen des in <i>E. coli</i> exprimierten Fusionsproteins GST-ARH nach Bindung an Glutathion Agarose und Reinigung im <i>batch</i> -Verfahren. | 85 |
| Abbildung 4-7: | Analyse der GST- und His-MMR-Proteine mittels SDS-PAA-Gel (A) und Western Blot (B) nach Dialyse. | 86 |
| Abbildung 4-8: | Transfektionseffizienz von BN16 Zellen mit Elektroporation. | 88 |
| Abbildung 4-9: | Verifizierung unterschiedlicher klonaler BN16 <i>Megalin-knockout</i> Zelllinien nach CRISPR/Cas9 Behandlung. | 89 |
| Abbildung 4-10: | Proteinbiochemische Analyse potentieller BN16 LRP2 KO Klone. | 90 |
| Abbildung 4-11: | Genomische Analyse potentieller BN16 LRP2 KO Klone. | 90 |
| Abbildung 4-12: | Ausschnitt der Basenpaar- und Aminosäuresequenz nach Sequenzierung und Sequenzanalyse dreier BN16 LRP2 KO Klone im Vergleich zum WT. | 92 |
| Abbildung 4-13: | Schematische Darstellung der Generierung von Kon, <i>Vhl</i> ^{ΔPT} , Kon/STZ und <i>Vhl</i> ^{ΔPT} /STZ. | 93 |
| Abbildung 4-14: | Renale Funktionsparameter und glomeruläre Filtrationsrate nach Induktion von Diabetes durch Streptozotocin. | 94 |
| Abbildung 4-15: | Natrium- und Glukosetransporter des proximalen und distalen Tubulus. | 94 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Abbildung 4-16: | Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase 1 (NOS1) im distalen Tubulus. | 95 |
| Abbildung 4-17: | VEGF-abhängige Induktion von endothelialen Fenestrae mit Diaphragma. | 97 |
| Abbildung 4-18: | Signifikant veränderte Genexpressionen zwischen Kon, <i>Vhl</i> ^{ΔPT} , Kon/STZ und <i>Vhl</i> ^{ΔPT} /STZ. | 98 |
| Abbildung 4-19: | Signifikant veränderte Genexpressionen zwischen Kon/STZ und <i>Vhl</i> ^{ΔPT} /STZ. | 99 |
| Abbildung 4-20: | Expression von <i>Ldc1</i> im Nierenkortex. | 100 |
| Abbildung 4-21: | Isopentylamin erhöht den Sauerstoffverbrauch (A) von OK Zellen und zeigt einen möglichen Effekt auf deren Glykolyseaktivität (B). | 101 |
| Abbildung 4-22: | Lokalisation von ZBTB16. | 102 |
| Abbildung 4-23: | Zeitreihe der Doxycyclin-abhängigen Induktion von ZBTB16 in OK LV und TAL LV Zellen. | 103 |
| Abbildung 4-24: | Doxycyclin-abhängige Induktion von EmGFP (A, C) und ZBTB16 (B, C) in lentiviral veränderten OK Zellen. | 104 |
| Abbildung 4-25: | Doxycyclin-abhängige Induktion von ZBTB16 in lentiviral veränderten TAL Zellen. | 105 |
| Abbildung 4-26: | Einfluss von ZBTB16 auf die Transporter NHE3 (A) und SGLT2 (B) in OK LV Zellen. | 107 |
| Abbildung 4-27: | Einfluss von ZBTB16 auf die Genexpression von <i>Slc9a3</i> /NHE3 (A) und <i>Slc5a2</i> /SGLT2 (B) in OK LV Zellen. | 108 |
| Abbildung 4-28: | Einfluss von ZBTB16 auf die Transporter NHE3 (A) und NKCC2 (B) in TAL LV Zellen. | 109 |
| Abbildung 4-29: | ZBTB16 führt zu keiner Veränderung des Sauerstoffverbrauchs in OK Zellen. | 110 |
| Abbildung 4-30: | ZBTB16 hemmt die Autophagie von OK LV Zellen. | 112 |
| Abbildung 4-31: | Einfluss von ZBTB16 auf die Zellproliferation von OK LV Zellen. | 113 |
| Abbildung 4-32: | ZBTB16 zeigt einen geringen Einfluss auf die Zellproliferation. | 114 |
| Abbildung 4-33: | Einfluss von ZBTB16 auf die Genexpression ausgewählter Gene in OK LV Zellen. | 115 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Tabelle 1-1: | Stadien der diabetischen Nephropathie und chronischen Niereninsuffizienz | 16 |
| Tabelle 2-1: | Zentrifugen mit entsprechenden Zentrifugengefäßen und Herstellern ... | 27 |
| Tabelle 2-2: | Produkte und deren Hersteller | 27 |
| Tabelle 2-3: | Proteine und deren Referenz | 29 |
| Tabelle 2-4: | Plasmide | 31 |
| Tabelle 2-5: | Rekombinante lentivirale Vektoren (rLV) der 3. Generation | 32 |
| Tabelle 2-6: | Primärantikörper | 33 |
| Tabelle 2-7: | Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper | 34 |
| Tabelle 2-8: | Oligonukleotide | 35 |
| Tabelle 2-9: | sgRNA-Oligonukleotide | 36 |
| Tabelle 2-10: | <i>E. coli</i> -Stämme | 36 |
| Tabelle 2-11: | Zelllinien | 37 |
| Tabelle 3-1: | Pipettierschema für den Verdau von genomischer DNA mit DNase I | 54 |
| Tabelle 3-2: | Pipettierschema für das Umschreiben von RNA in cDNA | 54 |
| Tabelle 3-3: | Pipettierschema für die PCR mit FIREPol-Polymerase | 55 |
| Tabelle 3-4: | PCR-Parameter für FIREPol-Polymerase | 55 |
| Tabelle 3-5: | Pipettierschema für die PCR mit Q5-Polymerase | 56 |
| Tabelle 3-6: | PCR-Parameter für Q5-Polymerase | 56 |
| Tabelle 3-7: | Pipettierschema für die PCR | 57 |
| Tabelle 3-8: | PCR-Parameter I | 57 |
| Tabelle 3-9: | PCR-Parameter II | 57 |
| Tabelle 3-10: | Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme zur Produktion von GST- und His-Fusionsproteinen und die dafür genutzte IPTG-Konzentration | 60 |
| Tabelle 3-11: | Zusammensetzung von SDS-PAA-Gelen für 10 ml | 68 |
| Tabelle 4-1: | Proteinbestimmung der Dialysate mittels BCA-Methode | 87 |

1. Einleitung

1.1 Kurzer Einblick in die Anatomie und Physiologie der Niere

Die Niere der *Eutheria* reinigt das Blut von Abfallprodukten des Stoffwechsels, ist wesentlich an der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts sowie des Säure-Basen-Gleichgewichts involviert. Zudem kontrolliert sie den Blutdruck und hat endokrine Funktionen. Die Niere kann makroskopisch in die Medulla (Mark), die der Form einer Pyramide gleicht, und den Kortex (Rinde), eine kontinuierliche Schicht, die das Mark umgibt, gegliedert werden. Nephrone stellen die individuellen Funktionseinheiten der Niere dar. Jedes Nephron setzt sich aus einem Nierenkörperchen und einem Nierenkanälchen (Tubulus) zusammen (Abb. 1-1). Ersteres besteht aus einem kapillären Gefäßknäuel – der Glomerulus. Dieser wird von der Bowman-Kapsel, die sich aus dem äußeren parietalen Blatt und dem inneren viszeralem Blatt zusammensetzt, umgeben. Das parietale Blatt besteht aus dünnem, einschichtigem Plattenepithel. Das viszerale Blatt liegt den Kapillaren direkt an und wird von spezialisierten Zellen, den Podozyten, gebildet. Oft werden die Podozyten auch dem Glomerulus zugeordnet. Der Glomerulus erhält das aus der afferenten Arteriole kommende Blut, welches er filtert und reinigt. Neben dem Kapillarknäuel (und den Podozyten) umfasst der Glomerulus zudem die glomeruläre Basalmembran (GBM) sowie den Aufhängeapparat (Mesangium). Das Mesangium hält den Glomerulus u. a. in seiner Struktur. Das Endothel der glomerulären Kapillaren ist mit Fenestrae (Fenstern) versehen. Diese sind ohne Diaphragma, was im Gegensatz zu anderen gefensterten Endothelien eine Besonderheit darstellt. Die GBM stellt durch die Verschmelzung der Basalmembran der Endothelzellen und der Podozyten das Bindeglied zwischen beiden dar. Die Podozyten decken fast vollständig die Harnseite der GBM durch ihre ineinandergreifenden, interdigitierenden Fußfortsätze ab. Es verbleiben nur schmale Filtrationsspalten, die von einem Schlitzdiaphragma überspannt sind. Innerhalb der extrazellulären Matrix zwischen den Kapillaren befindet sich das Mesangium, an dem die Kapillarschlingen befestigt sind. Die Filteraufgaben des Glomerulus werden durch das Zusammenspiel aus Kapillarendothel, GBM, Podozyten und Schlitzdiaphragma erreicht, nämlich Wasser und darin gelöste niedermolekulare Substanzen ungehindert in den Raum der Bowman-Kapsel passieren zu lassen. Blutzellen und Plasmaproteine hingegen werden zurückgehalten und gehen über den Primärharn nicht verloren. An die Bowman-Kapsel schließt sich die zweite Komponente des Nephrons, das Nierenkanälchen bzw. der Nierentubulus, an. Der Tubulus ist ebenfalls in verschiedene Abschnitte gegliedert. Dessen Hauptfunktion liegt in der Reabsorption von Nährstoffen, wie Glukose, Aminosäuren, Peptide und Proteine ebenso in der Rückgewinnung von Elektrolyten und Wasser sowie der Konzentration von Abfallprodukten. Dadurch entsteht aus dem Primär- der Sekundärharn.

Der erste, direkt der Bowman-Kapsel folgende Abschnitt umfasst den proximalen Tubulus (PT), gefolgt vom Intermediärtubulus, der sich in den distalen Tubulus (DT) fortsetzt. Daran schließt sich der Verbindungstubulus an, welcher mit mehreren Verbindungstubuli in das Sammelrohr mündet. Der *Pars recta* des PT (S3), der Intermediärtubulus und der *Pars recta* des DT wird zur Henle-Schleife zusammengefasst.

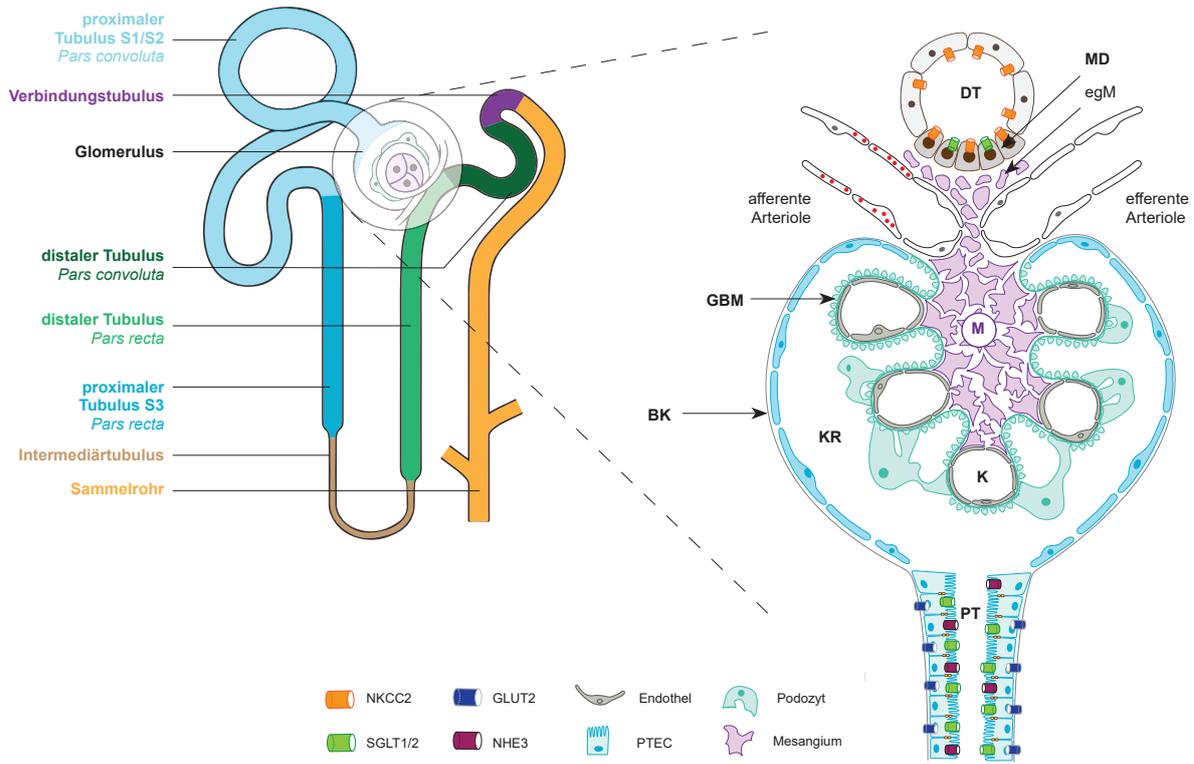


Abb. 1-1: Schematische Darstellung eines Nephrons mit Nierenkörperchen und Tubulusabschnitten (links). Einsetzbild (rechts): Nierenkörperchen mit Glomerulus, der von der Bowman-Kapsel (BK) umgeben ist und die glomeruläre Basalmembran (GBM, türkisfarbene Linie), die Kapillaren (K) mit fenestriertem Endothel, die Podozyten mit ihren Fußfortsätzen und das Mesangium (M) umfasst; an das Nierenkörperchen schließt sich der proximale Tubulus (PT) an, der die Transporter SGLT1/2, GLUT1/2 und NHE3 exprimiert. Oberhalb des Nierenkörperchens ist der juxtaglomeruläre Apparat vereinfacht dargestellt, der aus den Zellen der Macula Densa (MD, graue Zellen) in der Wand des Pars recta des distalen Tubulus (DT), den extraglomerulären Mesangiumszellen (egM) und den Renin-produzierenden Zellen (Zellen mit roten Punkten) in der Wand der afferenten Arteriole besteht. Die MD Zellen exprimieren SGLT1 und NKCC2. KR: Kapselraum, PTEC: proximale Tubulusepithelzelle. Eigene Darstellung in Anlehnung an Lüllmann-Rauch & Asan (Taschenlehrbuch Histologie, 5. Auflage, 2015, Thieme, Stuttgart, Deutschland) sowie Nihalani & Susztak, 2013.

Alle Tubulus-Segmente unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur worin ihre spezifische Funktion begründet liegt. Diese Struktur-Funktionsbeziehung wird für den PT im Kapitel 1.2 detailliert beschrieben. Auf alle anderen Tubulusabschnitte kann nicht ausführlich eingegangen werden, weshalb ein kurzer Überblick, beginnend mit dem Intermediärtubulus, genügen soll.

Der Intermediärtubulus ist durch flache Epithelzellen gekennzeichnet, wobei der absteigende Schenkel des Intermediärtubulus durch Aquaporin 1 gut und der aufsteigende Schenkel nicht wasserdurchlässig ist.

Das Epithel des DT ist kubisch und besitzt keinen Bürstensaum. Die Zellen des DT weisen den größten Reichtum an Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) und Mitochondrien aller Nephronsegmente auf. Zudem ist der DT durch *tight junctions* wasserundurchlässig und durch die Macula Densa (MD) charakterisiert. Das sind dicht aneinander gelagerte schlanke Zellen in der Wand des *Pars recta* des DT, wo es zur Berührung mit dem Gefäßpol seines Nierenkörperchens kommt. Diese Region wird auch juxtaglomerulärer Apparat genannt, der neben den MD Zellen zusätzlich Renin-produzierende Zellen in der Wand der afferenten Arteriole und extraglomeruläre Mesangiumzellen umfasst. Die Zellen der MD sind in der Lage mittels des Furosemid-sensitiven Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporters (NKCC2) die Natriumchloridkonzentration des Harns zu messen ebenso die von Glukose mittels des Natrium-Glukose-Kotransporters 1 (SGLT1). Beides sind wichtige Mechanismen des tubuloglomerulären Rückkopplungsmechanismus (siehe Kapitel 1.1.2). Eine weitere wichtige Aufgabe des DT ist die Aufrechterhaltung vieler homöostatischer Prozesse, die die Natriumchloridreabsorption, Kaliumsekretion sowie den Kalzium- und Magnesiumtransport beinhalten. Hierfür zeigt der DT eine Ausstattung mit entsprechenden Transportern, wie dem Natriumchlorid-Kotransporter (NCC), epithelialen Natriumkanal (ENaC) und NKCC2 (Subramanya & Ellison, 2014). Zudem ist der *Pars convoluta* des DT sensitiv gegenüber dem antidiuretischen Hormon (ADH, auch Vasopressin genannt). Als Reaktion auf Hormonschwankungen reguliert er die Rückgewinnung von Wasser und Natrium aus dem Urin (L. Cheng, Wu, Kortenoeven, Pisitkun, & Fenton, 2015; Kortenoeven, Pedersen, Rosenbaek, & Fenton, 2015).

Der sich an den DT anschließende Verbindungstubulus koppelt den DT an das Sammelrohr und ist letzterem in seiner Funktion sehr ähnlich. Das Sammelrohr weist zwei Zelltypen auf: Hauptzellen zur Harnkonzentrierung und Schaltzellen für den Säure-Basen-Haushalt. Verbindungstubulus und Sammelrohr sind wasserdicht, beide können aber Hormon-abhängig die Wasserdurchlässigkeit regulieren. Hier ist neben Vasopressin besonders das Hormon Aldosteron hervorzuheben. In diesen beiden Nephronsegmenten findet die finale Zusammensetzung des Endharns betreffend der auszuscheidenden Ionen und des Wassers statt, bevor er über den Ureter in die Harnblase gelangt.

1.1.2 Tubuloglomerulärer Rückkopplungsmechanismus (TGF)

Der tubuloglomeruläre Rückkopplungsmechanismus (TGF, *tubuloglomerular feedback*) regelt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) einzelner Nephrone durch die Änderung des Gefäßwiderstandes der Arteriole und dadurch den Blutfluss und -druck in den glomerulären

Kapillaren (A. E. Persson, Lai, Gao, Carlstrom, & Patzak, 2013). Der TGF ist ein „lokales“ negatives Rückkopplungssystem, bei dem der *Pars recta* des DT seinen eigenen Glomerulus reguliert. Als physiologische Gegenregulation schützt er vor einer Überladung des Tubulussystems des zugeordneten Nephrons. Die Regulation erfolgt an den Zellen der MD über zwei Achsen:

(1) MD-NKCC2-Adenosin-GFR

Im Falle einer zu hohen Salzkonzentration an der MD, kommt es zur Aktivierung von NKCC2 in den MD Zellen, die anschwellen. Die Folge ist ein Cl⁻-Einstrom und dadurch eine Depolarisierung der basolateralen Membran der MD Zellen. Es erfolgt die Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP), das zu Adenosin umgewandelt wird. Adenosin aktiviert den Adenosin-Rezeptor A1 in der glatten Muskulatur der afferenten Arteriole, wodurch es zur Vasokonstriktion und Erniedrigung der GFR kommt. Gleichzeitig kann Adenosin zur Aktivierung gleichnamigen A2 Rezeptors in der efferenten Arteriole zur Dilatation führen. Das hat eine Reduktion der Filtrations-Fraktion zur Folge. Das heißt, es wird weniger Blutplasma vom Glomerulus gefiltert und die GFR sinkt (Al-Mashhadi, Skott, Vanhoutte, & Hansen, 2009; Palmer & Schnermann, 2015; P. Persson, Hansell, & Palm, 2015; Schnermann, 2014).

(2) MD-SGLT1-NOS1-GFR

Die Zellen der MD sind weiterhin in der Lage Glukose im Harn mittels SGLT1 zu messen, worüber die Produktion von Stickstoffmonoxid reguliert wird. SGLT1 ist zwar weniger effektiv im Vergleich zu SGLT2, allerdings affiner für Glukose. Kommt es zu einer erhöhten Konzentration von Glukose im Harn wird dies in den MD Zellen detektiert und ist ein Zeichen, dass stromaufwärts gelegene Natrium- und Glukosetransporter ausgelastet sind und bereits eine Hyperreabsorption von Natrium und Glukose sowie, dem osmotischen Gradienten folgend, Flüssigkeit stattfindet (Vallon, 2020). Über SGLT1 wird die Stickstoffmonoxid-Synthase 1 (NOS1; *nitric oxide synthase 1* oder nNOS; *neuronal nitric oxide synthase*) aktiviert. NOS1 bildet vermehrt Stickstoffmonoxid, was in der Dilatation der afferenten Arteriole (mehr Blutvolumen) desselbigen Glomerulus und folglich in einer Erhöhung der GFR resultiert. Dadurch wird die Aufrechterhaltung des Harn-Natriums, der Flüssigkeitssekretion und der Volumenbalance erzielt, sonst würde es zur Blutdruckerhöhung kommen (Guyton, 1991; Vallon, 2020; Vallon & Thomson, 2020).

1.1.3 Renin-Angiotensin-System (RAS)

Ebenfalls zu erwähnen sei, dass eine zu geringe Natriumchloridkonzentration an den MD Zellen nicht nur zur Aktivierung der Achse MD-NKCC2-Adenosin sondern auch zur Freisetzung von Renin aus den Renin-produzierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparats führt

(Peti-Peterdi & Harris, 2010). Renin aktiviert im Anschluss das Renin-Angiotensin-System (RAS) in dem es selbst Angiotensinogen, das in der Leber produziert wird, zu Angiotensin I (Ang I) spaltet (Paul, Poyan Mehr, & Kreutz, 2006). Ang I wird enzymatisch durch *angiotensin converting enzyme* (ACE) in Angiotensin II (Ang II) umgewandelt, das vielerlei Funktionen ausübt. Seine größte Wirkung entfaltet Ang II durch die Bindung an den Ang II Typ 1 Rezeptor (AT_1), wodurch eine allgemeine Gefäßkonstriktion und somit eine Blutdruckerhöhung erzielt wird (Neubauer et al., 2018). Speziell an der efferenten Arteriole führt die Konstriktion zur Steigerung des intraglomerulären Drucks des Nephrons. Ang II führt u. a. auch zur Freisetzung des Hormons Aldosteron (Paul, Poyan Mehr, & Kreutz, 2006). Mutmaßliche Mediatoren der Signalweiterleitung von den MD Zellen zu den Renin-produzierenden Zellen sind Stickstoffmonoxid (Singh et al., 1996), Prostaglandine (Peti-Peterdi et al., 2003) und Adenosin/ATP (Bell et al., 2003; Komlosi et al., 2004). Prostaglandin E_2 und Stickstoffmonoxid stimulieren kurzfristig die Freisetzung von Renin (Friis et al., 2005; Kurtz & Wagner, 1998). Adenosin hemmt die Reninfreisetzung und führt zur Vasokonstriktion der afferenten Arteriole (Churchill & Churchill, 1985; Schnermann & Levine, 2003). Ebenfalls stimulieren auch ein niedriger renaler Perfusionsdruck die Sekretion von Renin (Peti-Peterdi & Harris, 2010). Auf detaillierte molekulare Mechanismen ebenso die diversen Effekte von Ang II und Aldosteron besonders im Zusammenhang mit der Kontrolle des Extrazellulärvolumens soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

1.2 Struktur und Funktion des proximalen Tubulus

Der PT schließt sich direkt an die Bowman-Kapsel an und kommt somit als erstes Tubulussegment mit dem Primärharn und all den darin befindlichen Stoffen, die die Filtrationsbarriere im Glomerulus passierten, in Kontakt. Er wird nicht umsonst als das Arbeitspferd des Nephrons genannt. Am PT werden etwa 70% des Natriumchlorids und Wassers und die Hauptmenge an Natriumhydrogencarbonat reabsorbiert. Zudem erfolgt am PT auch die Reabsorption nahezu aller Nährstoffe, wie Glukose und Aminosäuren (Curthoys & Moe, 2014). Auch die spezifische Rückgewinnung kleiner Proteine, wie Peptidhormone, Enzyme und niedermolekulare Plasmaproteine finden am PT statt (Polesel & Hall, 2019). Somit wird einem Verlust nützlicher Substanzen frühzeitig entgegengewirkt und die Feineinstellung des Endharns nachgeschalteten Tubulussegmenten überlassen.

Der PT lässt sich in drei morphologisch distinkte Abschnitte gliedern (Abb.1-1). Das Segment S1 und S2 bilden den *Pars convoluta* und das Segment S3 den *Pars recta*, der gleichzeitig einen Teil der Henle-Schleife darstellt (Schuh et al., 2018). Anhand besonderer morphologischer Strukturen der Epithelzellen des PT (PTEC; *proximal tubule epithelial cells*) lassen sich Funktionen und Aufgaben des PT sehr gut ableiten. Dazu zählt der apikale

Besatz der PTEC mit langen Mikrovilli, die in ihrer Gesamtheit einen Bürstensaum bilden. Gemeinsam mit basolateralen Einfaltungen wird eine Oberflächenvergrößerung zur Unterbringung verschiedenster Ionen- und Glukosetransporter erzielt. Ebenso zählt ein ausgeprägtes und stabiles Endozytose-Netzwerk zur Struktur-Funktionsbeziehung des PT. Dieses Netzwerk ist wichtig für die Internalisierung und Verstoffwechslung filtrierter Proteine, die an die Rezeptoren Megalin und Cubilin binden. Nicht zuletzt sind auch übermäßig viele Lysosomen und Mitochondrien in den PTEC zu nennen.

Die drei Segmente S1–S3 zeichnen sich individuell unterschiedlich hinsichtlich Zellmorphologie, mRNA- und Proteinexpression aus (Christensen, Wagner, & Kaissling, 2012; Lee, Chou, & Knepper, 2015; Limbutara, Chou, & Knepper, 2020; Weisz, 2021), was besonders die Expression verschiedener Transporter und Rezeptoren zwischen den Segmenten verdeutlicht (Christensen, Wagner, & Kaissling, 2012).

1.2.1 Transportvorgänge am proximalen Tubulus

Im PT gibt es eine Reihe verschiedener Natrium- und Glukosetransporter, die an apikaler und basolateraler Seite der PTEC lokalisiert sind. An apikaler Seite übernehmen vor allem der Natrium-Protonen Austausch Isotyp 3 (NHE3) und SGLT2 den Natriumtransport, weshalb der Fokus im Weiteren auf diesen beiden Transportern liegt. An der basolateralen Seite, also die Blutseite, gewährleisten die Na^+/K^+ -ATPase und der elektrogene $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (NBCe1; *electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1*) den Natriumtransport ins Blut (Horita et al., 2017). Wobei die Na^+/K^+ -ATPase stets die treibende Kraft für die Natriumreabsorption im PT darstellt, wodurch der Na^+ -Gradient erzeugt wird.

1.2.1.1 NHE3

NHE3 wird durch das Gen *Slc9A3* codiert und besitzt eine Molekülmasse von etwa 85 kDa. Es ist der wichtigste frühproximale Natriumtransporter und ist in der apikalen Membran der PTEC lokalisiert. Zudem ist er auch im absteigenden Teil des Intermediärtubulus und im *Pars recta* des DT zu finden. Als elektroneutraler Antiporter resorbiert er Na^+ -Ionen aus dem Lumen und gibt im Gegenzug intrazelluläre H^+ -Ionen ab. Dieser 1:1 Austausch ist meist mit einem $\text{Cl}^-/\text{Basen}^-$ Austausch gekoppelt (Curthoys & Moe, 2014; X. C. Li et al., 2019). Basen sind unter anderen Formiat, Oxalat oder HCO_3^- , die in das Lumen sezerniert und gegen Chlorid ausgetauscht werden. Aufgrund zusätzlicher elektrogener Transportmechanismen kommt es zu einem Lumen-negativen transepithelialen Potentials, das einen Teil des Chlorids über den parazellulären Weg ins Interstitium treibt. Durch die Reabsorption all

dieser im Primärfiltrat gelösten Substanzen erfolgt aus osmotischen Gründen die Reabsorption von Wasser. Neben dieser NHE3 vermittelten Natriumchlorid-Absorption, vermittelt der Transporter auch eine Ansäuerung des Urins, auf die nicht weiter eingegangen werden soll. Aufgrund der beschriebenen Funktionen sind *Nhe3-knockout* Mäuse hypovolämisch und hypotensiv, zeigen milde metabolische Azidose und eine verminderte renale Reabsorption von Natrium, Flüssigkeit und HCO_3^- (Schultheis et al., 1998).

1.2.1.2 SGLT1 und SGLT2

Die beiden Natrium-Glukose-Kotransporter 1 und 2 (SGLT1/2) sind apikal im PT lokalisiert. SGLT2, durch das Gen *Slc5a2* codiert, ist im frühen PT, SGLT1, durch *Slc5a1* codiert, im S3 des PT und den Zellen der MD exprimiert (siehe Kapitel 1.1.2). Während SGLT2 eine geringe Sensitivität gegenüber Glukose aufweist und dadurch die Massenreabsorption (~97%) im PT übernimmt, zeigt SGLT1 eine deutlich erhöhte Sensitivität und nimmt den Rest (~3%) auf (Gorboulev et al., 2012; Rieg et al., 2014). Ein weiterer Unterschied liegt im Ionen-Transport. SGLT2 nutzt ein Na^+ -Ion zur Reabsorption eines Moleküls Glukose. SGLT1 nimmt hier zwei Na^+ -Ionen. Da beide Kotransporter elektroneutral arbeiten, gelangen Cl^- -Ionen über Elektrodifusion in die Zellen. Das Ergebnis der Reabsorption von Glukose, Natrium und Chlorid ist eine Erhöhung des osmotischen Potentials und Wasser strömt passiv nach. Bei normalen Blutglukosekonzentrationen (~5,5 mM; Mather & Pollock, 2011) und normaler GFR ist die Transportkapazität von SGLT2 nicht gesättigt. Ein rascher Anstieg der Blutglukosekonzentration führt zur vermehrten Filtration von Glukose am Glomerulus und zur gesteigerten Aufnahme von Glukose über SGLT2. Kommt es zu einer weiteren Erhöhung von Glukose im Blut, ist der Transporter zwar ausgelastet, eine Erhöhung der SGLT2 Proteinsynthese kann jedoch zusätzlich die Reabsorption von Glukose bewerkstelligen. Bei einer noch weiteren Zunahme der Glukoselast, vor allem bei Diabetes, reicht die Kapazität von SGLT2 nicht mehr aus. Zum Teil kann die Überladung durch SGLT1 abgefangen werden. Irgendwann ist das SGLT1/2 System ausgelastet und es kommt zur Ausscheidung von Glukose mit dem Urin (Thomson & Vallon, 2021). Studien an Akita-Mäusen, die an Typ 1 Diabetes mellitus (T1Dm) leiden, und an db/db Mäusen, die an Typ 2 Diabetes mellitus (T2Dm) leiden, belegten die erhöhte Proteinexpression von SGLT2 im PT (Vallon et al., 2014; Vallon et al., 2013). Im Einklang damit führte ein selektiver SGLT2-Inhibitor in T1Dm- und T2Dm-Mäusen mit SGLT1-Verlust, zu einer Blockade der renalen Glukosereabsorption (Song et al., 2019). Ob dieser Mechanismus auch in Menschen mit Diabetes zutrifft, ist nicht sicher. Jedoch sprechen mehrere Studien dafür (Rahmoune et al., 2005; Wang et al., 2017).

1.2.1.3 GLUT1 und GLUT2

Bei GLUT1 und GLUT2 handelt es sich um Glukosetransporter, die in der basolateralen Membran lokalisiert sind und als Uniport Glukose aus den epithelialen Tubuluszellen in das Blut transportieren. Dabei zeigt GLUT1 eine hohe Affinität zu Glukose und ist besonders im S3 des PT, praktisch aber in jedem Nephronsegment exprimiert (Mather & Pollock, 2011). In den PTEC stellt er das Gegenstück zu SGLT1 dar. GLUT2 hingegen besitzt geringe Affinität, allerdings hohe Kapazität für Glukose. Er ist im S1 und S2 des PT lokalisiert und steht somit SGLT2 gegenüber.

1.2.2 Proteinreabsorption am proximalen Tubulus

Obwohl die glomeruläre Filtrationsbarriere weitestgehend undurchlässig für Makromoleküle wie Albumin ist, kommt es zu einem geringem Durchtritt solcher Moleküle. Auf die Filtrationsleistung der menschlichen Niere von 180 L/Tag bezogen, gelangen somit täglich einige Gramm an Albumin, zu der sich eine beachtliche Menge anderer kleinerer Proteine wie Lysozym, Vitamin-bindende Proteine, Immunglobulinfragmente etc., hinzuaddieren ins Primärfiltrat. An dieser Stelle zeigt sich eine weitere außerordentliche Rolle des PT neben der bereits beschriebenen Flüssigkeitsregulation und Ionenhomöostase. Nämlich die, der Rückgewinnung vorgenannter Substanzen und weiterer bioaktiver Moleküle, um den Verlust mit der Urinausscheidung zu verhindern. Hierfür sind zwei große Rezeptoren – Megalin und Cubilin – zuständig. Beide werden reichlich im Bürstensaum an der apikalen Oberfläche von PTEC exprimiert und ragen mit ihrer extrazellulären Domäne in das Tubuluslumen. Sie binden und internalisieren über 50 verschiedene Plasmaproteine, weshalb man sie auch als Multiliganden-Rezeptoren bezeichnet (Christensen, Birn, Storm, Weyer, & Nielsen, 2012; Eshbach & Weisz, 2017).

1.2.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Der PT reabsorbiert die am Glomerulus filtrierte Substanzen vor allem im S1 und S2 über den Prozess der rezeptorvermittelten Clathrin-abhängigen Endozytose. Daneben gibt es noch weitere Mechanismen, wie Stoffe über die Zellmembran ins Zellinnere gelangen können, beispielsweise die rezeptorvermittelte Clathrin-unabhängige Endozytose oder die *fluid phase* Endozytose, auf die nicht weiter eingegangen werden. PTEC exprimieren für die Rückgewinnung der Proteine aus dem Filtrat den hierfür wichtigen Multiliganden-Rezeptor Megalin, der an späterer Stelle ausführlich dargestellt wird. Kenntnisse über das endosomale Netzwerk in PTEC, dessen Organisation und Regulation ebenso die zugrunde liegenden

molekularen Mechanismen, beruhen vorwiegend auf Zellkulturmodellen renaler Epithelzelllinien wie *Madin Darby Canine Kidney I/II* (MDCKI/II) und *Opossum Kidney* (OK) Zellen sowie auf Mausmodellen. Der allgemeine Vorgang für *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptoren, zu denen Megalin gehört, lässt sich jedoch wie folgt beschreiben: Nach erfolgter Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor, wird der Ligand-Rezeptor-Komplex über sich ausbildende apikale Membraneinstülpungen an der Basis der Mikrovilli in *Clathrin-coated pits* (Clathrin-umhüllte Vertiefungen der Plasmamembran) aufgenommen. Es kommt zum Weitertransport des Rezeptor-Liganden-Komplexes in frühe Endosomen. Diese zeichnen sich durch einen sauren pH-Wert aus, was zur Dissoziation des Liganden vom Rezeptor führt (Weisz, 2003). Die frühen Endosomen reifen heran und ein Großteil bildet die Grundlage für die späten Endosomen (auch *multivesicular bodies* genannt) und ein geringer Part wird zu Recycling-Endosomen (Grant & Donaldson, 2009; Huotari & Helenius, 2011; Maxfield & McGraw, 2004). Der Ligand gelangt in späte Endosomen, die mit Lysosomen fusionieren und es kommt letztlich zur Degradation des Liganden (Christensen et al., 1999; Nykjaer et al., 1999; Welling & Weisz, 2010). Demgegenüber wird der Rezeptor recycelt und gelangt über einen „schnellen“ oder „langsamen“ Weg zurück an die apikale Membranoberfläche. Der „schnelle“ Weg beschreibt den Transport vom frühen Endosom direkt zurück an die Zelloberfläche via Rab4-positiver Recycling-Endosomen (Christensen, Birn, et al., 2012; Christensen, Birn, Verroust, & Moestrup, 1998; Huotari & Helenius, 2011). Der „langsame“ Weg führt von frühen Endosomen über Rab11-positiver Recycling-Endosomen zurück an die Zelloberfläche. *Ras-related in brain* (Rab)-Proteine sind GTPasen, die essenziell für die Regulation des intrazellulären Membrantransports zwischen den verschiedenen Kompartimenten sind. Ebenfalls ist es möglich, dass der Ligand der Abspaltung vom Rezeptor widersteht und gemeinsam mit dem Rezeptor zurück an die Zelloberfläche wandert und sezerniert wird (Morales et al., 2006). In Ausnahmefällen kann auch eine Transzytose des Liganden eintreten, d. h. er wird nicht abgebaut sondern auf basolateraler Seite der PTEC in das Interstitium bzw. den Blutstrom abgegeben (Christensen, Birn, Rippe, & Maunsbach, 2007; Marino, Lisi, Pinchera, Chiovato, & McCluskey, 2003; Park, 1988). Welche Faktoren über das Schicksal des Liganden entscheiden, ist unklar. Man geht jedoch davon aus, dass Interaktionen zwischen Rezeptoren und zytoplasmatischen Adaptorproteinen den Rezeptor-Liganden-Komplex in verschiedene Sortierwege leiten, aber auch posttranslationale Modifikationen (PTM) am Rezeptor können regulatorischen Einfluss haben (Willnow & Christ, 2017).

1.2.2.2 Megalin

Mit einer Molekülmasse von 600 kDa wird Megalin auch als *giant protein 330* (gp330) bezeichnet. Entsprechend seiner Struktur wird Megalin der Familie der LDL-Rezeptoren

zugeordnet. Mitglieder dieser Familie sind Typ 1 Membranproteine, die vorzugsweise an der Zelloberfläche agieren. Dort binden und internalisieren sie verschiedene bioaktive Moleküle, besonders aber Lipoproteine (Marzolo & Farfan, 2011; Nykjaer & Willnow, 2002). Bisher sind in Säugetieren neun Vertreter beschrieben LRP1–LRP9 (*LDL receptor-related proteins*). Hinter LRP2 verbirgt sich Megalin. Beide Bezeichnungen werden in der vorliegenden Arbeit gebraucht.

Megalins Lokalisation ist in Säugetieren vor allem auf spezialisierte Epithelien beschränkt wie die des Gehirns, des Darms, der Schilddrüse oder auch der Gallenblase (De, Kuwahara, & Saito, 2014). Die höchste Dichte an Megalin-Rezeptoren findet man allerdings im PT der Niere mit den höchsten Levels im S1 und S2 des PT (Christensen et al., 1995; Christensen, Verroust, & Nielsen, 2009). Entsprechend seiner Rolle als quantitativ wichtigster Endozytose-Rezeptor ist er dort an der Oberfläche des Bürstensaums, in endosomalen und Recycling-relevanten Zellkompartimenten zu finden (Chatelet, Brianti, Ronco, Roland, & Verroust, 1986; Christensen et al., 2009). Megalin besitzt eine Affinität für zahlreiche Liganden aus der Gruppe der Plasmaproteine wie Albumin und Globuline, aus der Gruppe der Lipoproteine, der Peptide, der Enzyme wie Lysoszym, der Vitamin-bindenden Proteine wie das Retinol-bindende und Vitamin D-bindende Protein, der Hormone wie Insulin und Ang II und der Hormon-bindenden Proteine. Ebenso bindet Megalin Medikamente und Toxine, aber auch Eisen in Form von Transferrin sowie (nephro-)toxische Substanzen, um nur einige Liganden zu nennen (Christensen & Birn, 2001; Christensen, Birn, et al., 2012; Marzolo & Farfan, 2011). Aufgrund des breiten Substratspektrums zeigen *Megalin-knockouts* diverse Phänotypen wie Mikroalbuminurie und Proteinurie, eine vermehrte Ausscheidung lysosomaler Proteine mit dem Urin, eine geringe Knochendichte und Rachitis (Nielsen et al., 2007; Nykjaer et al., 1999).

Aufbau und Struktur von Megalin

Die Struktur von Megalin ist in Abbildung 1-2 dargestellt. Megalin besteht aus einer großen Extrazellulärdomäne, die sich aus vier cysteinreichen *complement-type ligand binding repeats* (Ligandenbindungsdomäne) zusammensetzt. Mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) interagiert u. a. das Chaperon *receptor associated protein* (RAP), welches für die korrekte Proteinfaltung von Megalin im endoplasmatischen Retikulum wichtig ist (Bu & Marzolo, 2000). Die vier LBD sind durch β -Propeller-Domänen voneinander getrennt. Die β -Propeller-Domänen zeichnen sich durch die Aminosäuren YWTD, flankiert durch *epidermal growth factor* (EGF)-ähnliche Motive, aus. Die EGF-ähnlichen Motive werden als wichtig für die exakte Proteinfaltung und die Dissoziation der Liganden im sauren Milieu der Endosomen angesehen (Culi, Springer, & Mann, 2004; Jeon et al., 2001; Lighthouse, Zhang, Hsieh, Rosenquist, & Holdener, 2011). Darüber hinaus besitzt Megalin eine Transmembran-domäne (TMD), die den Rezeptor in cholesterin- und glykosphingolipidreiche Membran-

domänen zieht (Marzolo et al., 2003) und die auch als Substrat für den γ -Sekretase-Komplex dient (Biemesderfer, 2006; Zou et al., 2004). Sich direkt der TMD anschließend folgt die zytoplasmatische Domäne, auch C-Terminus genannt. Diese Domäne ist in der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse. Beinhaltet sie doch eine Reihe regulatorischer Sequenzen und Bindemotive, die Megalin in seiner Funktion und seinem intrazellulären Transport zwischen apikaler Plasmamembran und den Komponenten des Endozytoseapparats regulieren (Takeda, Yamazaki, & Farquhar, 2003).

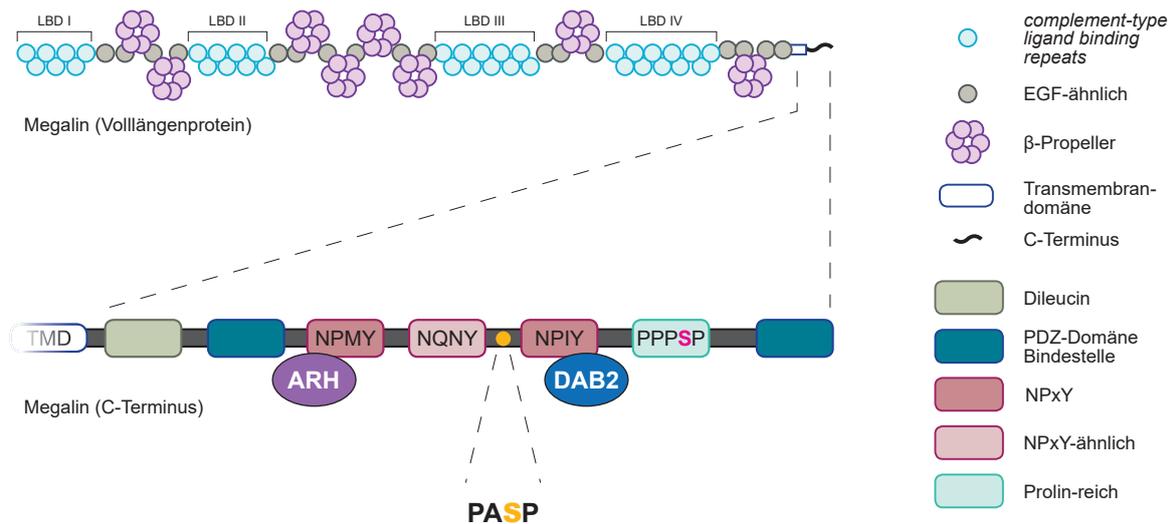


Abb. 1-2: Schematische Struktur von Megalin. Die extrazelluläre Domäne von Megalin weist insgesamt vier Ligandenbindungsdomänen (LBD I-IV) sowie EGF-ähnliche Motive und β -Propeller-Domänen auf. An die LBD schließt sich die Transmembrandomäne (TMD), gefolgt von der zytoplasmatischen Domäne (C-Terminus), an. Die Lokalisierung von Interaktionsmotiven im C-Terminus zeigt das Einsatzbild. Innerhalb dortiger relevanter Motive ist die AS-Sequenz von Megalin (Ratte) aufgeführt. Das Adaptorprotein ARH bindet am ersten NPxY-Motiv (NPMY), das Adaptorprotein DAB2 am zweiten NPxY-Motiv (NPIY). Zwischen einem NPxY-ähnlichen Motiv (NQNY) und dem zweiten NPxY-Motiv befindet sich die Phosphorylierungsstelle Serin 4577 (gelbes S) im PASP-Motiv, die Gegenstand der Untersuchung in dieser Arbeit ist. Innerhalb eines Prolinreichen Motivs liegt Serin 4616 (pinkes S in PPPSP), das durch die Kinase GSK3 phosphoryliert wird. Im C-Terminus von Megalin gibt es noch weitere Phosphorylierungsstellen, die in der Abbildung nicht dargestellt sind. Eigene Darstellung in Anlehnung an Willnow & Christ, 2017.

Interaktion von Megalin mit Adaptorproteinen des Endozytoseapparats

Im C-Terminus von Megalin befinden sich zwei hochkonservierte NPxY-Motive und ein dazwischen liegendes NPxY-ähnliches Motiv (Abb. 1-2). Am ersten NPxY-Motiv bindet das Adaptorprotein *autosomal recessive hypercholesterolemia* (ARH). ARH steuert die Effizienz des Recyclings von Megalin. Dabei interagiert die Phospho-Tyrosin-Bindedomäne (PTB-Domäne) von ARH mit dem NPxY-Motiv von Megalin. Zudem bindet ARH an Clathrin und den Clathrinadaptor Adaptorprotein 2 (AP2), wodurch die Kopplung an das Endozytose-Netzwerk gewährleistet und somit die Endozytose und der Transport von Megalin vorangetrieben wird (G. He et al., 2002; Mishra, Watkins, & Traub, 2002; M. Nagai et al., 2003). Shah et al. postulieren, dass der Komplex aus Megalin-ARH-AP2 über die Clathrin-

vermittelte Endozytose aufgenommen und zum frühen Endosom transportiert wird (Shah et al., 2013). Dort rekrutiert ARH das Motorprotein Dynein, wodurch der Transport von Megalin zu den Recycling-Endosomen entlang der Mikrotubuli stattfindet. Von da kehrt Megalin dann zurück an die Plasmamembran. In Abwesenheit von ARH gelangt Megalin direkt vom frühen Endosom an die Zelloberfläche *via* des „schnellen“ Recyclings über *connexin2/Rab35* zurück (De et al., 2014; Shah et al., 2013). Der ARH-abhängige Transport von Megalin spielt eine Rolle bei der γ -Sekretase-vermittelten Spaltung von Megalin im Bereich der TMD, wodurch ein C-terminales Fragment entsteht. Dieses Fragment agiert als Transkriptionsrepressor der mRNA von *Megalin* und *Nhe3* (Shah et al., 2013). Am zweiten NPxY-Motiv bindet die PTB-Domäne des Adaptorproteins Disabled-2 (DAB2) und fördert sowie erleichtert die Internalisierung von Megalin (Gallagher, Oleinikov, Fenske, & Newman, 2004; Oleinikov, Zhao, & Makker, 2000; Shah et al., 2013). Beide regulieren sich gegenseitig in ihrer Lokalisation in PTEC (De et al., 2014). DAB2 bindet zudem an das Motorprotein *nonmuscle myosin heavy chain IIA* (NMHC-IIA), das in Endozytoseprozessen involviert ist (Avraham et al., 1995; Hosaka et al. 2009). Auch konnte eine Interaktion von DAB2 mit der Proteinkinase B/Akt, die Teil der Endozytose-Maschinerie ist und eine Aufnahme von Albumin ermöglicht, nachgewiesen werden (Koral & Erkan, 2012). Analysen von *Dab2-knockout* Mäusen bestätigten die Funktion von DAB2, einerseits als endozytotisches Adaptorprotein, andererseits als wichtiger Interaktionspartner für Megalin. Der Verlust von DAB2 in diesen Mäusen äußerte sich in einem Defekt der PTEC hinsichtlich der Megalin-vermittelten Aminosäure- und Vitaminaufnahme (Morris, Tallquist, Rock, & Cooper, 2002).

Das erwähnte NPxY-ähnliche Motiv ist wichtig für den Transport von Megalin an die apikale Zelloberfläche (Takeda et al., 2003).

Weiterhin interagieren Adaptorproteine wie JIP1, JIP2, ANKRA, PDS-95, MegBP und GIPC mit dem C-Terminus von Megalin. Es wird vermutet, dass diese die Endozytose von Megalin erleichtern (De et al., 2014). Ihre spezifische Rolle ist dennoch nicht bekannt.

Interaktion von Megalin mit weiteren Proteinen

Neben der Interaktion von Megalin mit verschiedenen Adaptorproteinen des Endozytoseapparats, wechselwirkt der Rezeptor mit einer Vielzahl anderer Proteine, von denen einige kurz erläutert werden.

Der Rezeptor Cubilin wird mit Megalin im PT koexprimiert und besitzt keine Transmembran- und Zytoplasmadomäne (Christensen & Birn, 2001; Seetharam, Christensen, Moestrup, Hammond, & Verroust, 1997; Seetharam, Levine, Ramasamy, & Alpers, 1988). Er inseriert über seinen N-Terminus in der apikalen Membran von PTEC (Kristiansen et al., 1999).

Cubilin setzt sich u. a. aus acht EGF-Wiederholungen gefolgt von 27 CUB-Domänen (*complement components C1r/C1s, Uegf, Bmp1*) zusammen. Auch Cubilin agiert als Endozytose-Rezeptor und bindet zahlreiche Liganden, wobei das Ligandenspektrum von Cubilin bisher noch strittig diskutiert wird und inwiefern sich die Ligandenspezifitäten zwischen Megalin und Cubilin überlagern (Christensen, Birn, et al., 2012; Nielsen, Christensen, & Birn, 2016). Amsellem et al. konnten in Mäusen zeigen, dass Cubilin besonders essenziell für die Aufnahme von Albumin in PTEC ist und widerlegten die Ligandenspezifität von Cubilin u. a. für Transferrin (Amsellem et al., 2010). Davon abgesehen ist aufgrund der fehlenden Transmembran- und Zytoplasmadomäne von Cubilin ein zusätzlicher Rezeptor vonnöten, welcher die Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes und den weiteren intrazellulären Transport vermittelt. Lange Zeit galt Megalin als der einzige Vermittler (Christensen & Birn, 2001; Yammani, Seetharam, & Seetharam, 2001). Allerdings kann Cubilin mit Amnionless den funktionellen Komplex CUBAM bilden. Dieser Komplex transloziert an die Plasmamembran und arbeitet unabhängig von Megalin (Coudroy et al., 2005; Fyfe et al., 2004).

Der neonatale Fc-Rezeptor für IgG, kurz FcRn-Rezeptor, ist für die Weitergabe der passiven humoralen Immunantwort von der Mutter auf den Fötus verantwortlich und übernimmt verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Geweben (Roopenian & Akilesh, 2007). In der Niere lässt sich eine Lokalisation von FcRn in Podozyten und dem Bürstensaum der PTEC feststellen, wo FcRn an der Transzytose von Albumin beteiligt ist (Kobayashi et al., 2002; Tenten et al., 2013). Dabei erfolgt zunächst die Aufnahme von Albumin aus dem Filtrat über den Cubilin-Megalin-Rezeptor-Komplex. Im Anschluss wird Albumin den sauren endosomalen Kompartimenten übergeben, wo es von FcRn empfangen sowie weiterverarbeitet und -transportiert wird (Amsellem et al., 2010; Aseem et al., 2014; Birn et al., 2000; Storm et al., 2013; Tenten et al., 2013). Die funktionelle Interaktion von FcRn mit dem Cubilin-Megalin-Rezeptor-Komplex führt zu einem effizienten Zusammenwirken zwischen oberflächlichen und intrazellulären Rezeptoren um Albumin zu verwerten (Pyzik et al., 2019; Tenten et al., 2013).

Der Transporter NHE3 (siehe Kapitel 1.2.1.1) zirkuliert wie Megalin zwischen der apikalen Plasmamembran, den *coated pits* und den Endosomen. Beide sind in der Lage an der Plasmamembran miteinander zu interagieren. Diese Wechselwirkung ist für die rezeptorvermittelten Endozytose einiger Proteine Voraussetzung (Bobulescu & Moe, 2009). Der genaue Mechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Man geht davon aus, dass NHE3 und Megalin noch vor dem Beginn des Endozytoseprozesses in dichten Membranbereichen des Bürstensaums der PTEC, sogenannte *intermicrovillar microdomains*, zusammen kommen, um die adäquate Ansäuerung endosomaler Kompartimente vorzubereiten (Biemesderfer, DeGray, & Aronson, 2001; Biemesderfer, Nagy, DeGray, & Aronson, 1999). Die Senkung des pH-Wertes der frühen Endosomen gewährleistet eine Rezeptor-Liganden-Dissoziation

und somit das Recycling nicht nur der notwendigen Endozytose-Kompartimenten, sondern auch von Megalin (Bobulescu & Moe, 2009; Mellman, Fuchs, & Helenius, 1986; Mukherjee, Ghosh, & Maxfield, 1997). Für diese Vorstellung sprechen Versuche mit einer pharmakologischen Hemmung von NHE3 durch Ethylisopropylamilorid, die zu einer Alkalinisierung in den frühen Endosomen und zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der Endozytose von Albumin via Megalin führte (Gekle et al., 1999; Gekle, Freudinger, & Mildenerberger, 2001). Ebenfalls zeigten Untersuchungen, dass das von Megalin aufgenommene Albumin zu einer Erhöhung der Menge von NHE3 führt und das Zirkulieren an der Plasmamembran von NHE3 stimuliert (Klusic et al., 2003; Zhai et al., 2000).

Posttranslationale Modifikationen von Megalin

Die Expression und der intrazelluläre Transport von Megalin ist nicht nur von der Bindung anderer Moleküle an spezifische Motive im C-Terminus von Megalin abhängig, sondern auch von posttranslationalen Modifikationen (PTM). Hier sind vor allem Phosphorylierungen der zytoplasmatischen Domäne von Megalin hervorzuheben. Eine sehr prominente Phosphorylierungsstelle befindet sich in einem Prolin-reichen Bereich des C-Terminus (Yuseff et al., 2007). Die Aminosäure Serin im PPPSP-Motiv ist konstitutiv durch die Kinase Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert (Abb. 1-2). GSK3 bindet direkt an Megalin und phosphoryliert Serin unabhängig des Vorhandenseins der extrazellulären Domäne von Megalin. Versuche zeigten, dass die Phosphorylierung zu einer Drosselung des Recyclings von Megalin führt (Marzolo & Farfan, 2011; Yuseff et al., 2007). Jedoch scheint die Phosphorylierung des PPPSP-Motivs nicht als Katalysator für weitere Phosphorylierungen des C-Terminus zu dienen (Marzolo & Farfan, 2011).

Weiterhin treten zusätzliche Konsensusmotive für Phosphorylierungen durch die Kinasen PKC, PKA und CK-II auf, die das Recycling von Megalin ausgehend von den Endosomen kontrollieren (Yuseff et al., 2007). Zudem sind in Niedrig- und Hochdurchsatzscreenings etliche Phosphorylierungsstellen für Serin, Tyrosin und Threonin innerhalb des C-Terminus von Megalin identifiziert (www.phosphosite.org), deren Funktionen allerdings unbekannt sind.

Megalin als Transkriptionsfaktor

Megalin wird, wie auch andere LRPs, durch Metalloproteasen in der extrazellulären Domäne geschnitten, wodurch ein C-terminales Fragment entsteht – als MCTF (Megalin C-terminales Fragment) bezeichnet (Marzolo & Bu, 2009). MCTF wiederum unterliegt der „regulierten intramembranären Proteolyse“ (RIP; *regulated intramembrane proteolysis*) durch den γ -Sekretase-Komplex und es entsteht ein noch kleineres C-terminales Fragment – auch MICD (Megalin intrazelluläre Domäne) genannt – das in den Zellkern wandert. Dort wirkt es als negativer Transkriptionsregulator für die eigene Genexpression, aber auch für die anderer

Proteine in PTEC, wie beispielsweise *Nhe3* (Biemesderfer, 2006; Y. Li et al., 2008; Zou et al., 2004). Ob dieser Mechanismus auch *in vivo* für Megalin zutrifft, steht noch zur Debatte. In Studien mit transgenen Mäusen, die die MICD exprimierten, wurde kein Rückgang von Megalin und NHE3 auf Transkript- und Proteinebene festgestellt (Christ et al., 2010). Auch wurden keine Unterschiede im renalen Transkriptom im Vergleich zu den Kontrollmäusen beobachtet. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die MICD somit auch keinen Effekt auf den Endozytoseapparat in PTEC hat (Christ et al., 2010).

1.3 Die Rolle des proximalen Tubulus in der diabetischen Nephropathie

1.3.1 Diabetische Nephropathie

Die diabetische Nephropathie (DN) ist eine der häufigsten und gleichzeitig gefährlichsten Diabetes-Komplikationen mit weltweit rasant steigenden Inzidenzen (Alicic, Rooney, & Tuttle, 2017; Gilbertson et al., 2005). Ohne Einbeziehung der Dunkelziffer sind global aktuell etwa 425 Millionen Menschen von Diabetes betroffen (Chang et al., 2021). Werden keine Maßnahmen ergriffen, steigt die Zahl im Jahr 2045 auf etwa 642 Millionen, davon entwickeln 30–40% eine DN, also im Durchschnitt 225 Millionen Menschen (Cho et al., 2018; Guariguata et al., 2014; Packham et al., 2012). Von diesen 225 Millionen wiederum werden ein Drittel, also 75 Millionen, ein terminales Nierenversagen erleiden. Enorme Zahlen, die eine enorme Herausforderung für Gesellschaft und Wirtschaft darstellt.

Aber, was verbirgt sich hinter dieser Krankheit und wodurch ist sie charakterisiert? Zunächst entwickelt sich die DN nicht ohne Hyperglykämie (Faria, Gerritsen, Nguyen, Mihaila, & Masereeuw, 2021). Dabei ist das Risiko an einer DN zu erkranken bei Typ 1 Diabetes mellitus (T1Dm) und Typ 2 Diabetes mellitus (T2Dm) ähnlich hoch (Cooper, 1998; Hasslacher, Ritz, Wahl, & Michael, 1989). Beide Diabetes-Typen sind klinisch durch erhöhte Blutzuckerwerte aufgrund von Insulinmangel (T1Dm) und/oder Insulinresistenz (T2Dm) charakterisiert. Ohne medizinische Behandlung kommt es im Verlauf zu einer fortschreitenden Schädigung kleiner und großer Blutgefäße, sogenannte Mikro- bzw. Makroangiopathien. Diese vaskulären Veränderungen zusammen mit der Hyperglykämie führen zu Schäden am Glomerulus, am Tubulussystem sowie im Tubulointerstitium und letztlich zum progredienten Verlust der Nierenfunktion. Die DN folgt einem typischen Krankheitsverlauf, der je nach Gesichtspunkt in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden kann. Eine Übersicht gibt Tabelle 1-1 wieder. Im ersten Stadium verläuft die DN asymptomatisch und zeigt sich in einer glomerulären und tubulären Hypertrophie und in einer gesteigerten Nierenfunktion, was unter anderem in einer

glomerulären Hyperfiltration resultiert. Ebenfalls kommt es zum Beginn der Verdickung der GBM. Im Anschluss erfolgt eine Normalisierung der GFR. Gleichzeitig lassen sich vermehrt histologische Veränderungen der Nieren feststellen. Neben der deutlichen Verdickung der GBM kommt es zur Ausbreitung der Mesangiumzellen durch vermehrte Ansammlung extrazellulärer Matrix (EZM; Najafian & Mauer, 2012; Osterby & Gundersen, 1975). Nachfolgend tritt Mikroalbuminurie hinzu, wobei seit ein paar Jahren auch ein nicht-albuminurischer Verlauf bei T2Dm beobachtet wird (Alicic et al., 2017). Das Bild der nodulären Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson Läsion) charakterisiert ebenfalls diese dritte Phase. In der vierten Phase, der klinisch manifestierten Nephropathie, sinkt die GFR zunehmend, es zeigt sich ein deutlicher Eiweißverlust (Proteinurie) durch das anhaltende Ablösen der Podozytenfüßchen und damit einhergehend den vermehrten Verlust der Filtrationsfunktion des Glomerulus (Drummond, Mauer, & International Diabetic Nephropathy Study, 2002; Wolf, Chen, & Ziyadeh, 2005). Aber auch arterielle Hypertonie und eine ausgeprägte Glomerulosklerose prägen dieses Stadium. Die letzte Phase umschreibt die terminale Niereninsuffizienz, u. a. bedingt durch eine stark gesunkene GFR. Die Gesamtheit betrachtet lässt sich die DN als ein klinisches Syndrom charakterisieren, das initial durch eine erhöhte GFR, die kontinuierlich abnimmt, und zusätzlich durch Albuminurie, erhöhten Blutdruck sowie erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität gekennzeichnet ist (von Rappard, Wechselberger, Hopfer, & Werner, 2020). Die beschriebenen renalen histologischen Veränderungen zwischen T1Dm und T2Dm ähneln sich sehr, allerdings sind die des T2Dm deutlich heterogener und weniger gut vorhersagbar (Fioretto, Caramori, & Mauer, 2008).

Table 1-1: Stadien der diabetischen Nephropathie und chronischen Niereninsuffizienz (CKD; chronic kidney disease). Adaptiert nach Hader & Plum, 2002; Jerums, Panagiotopoulos, Premaratne, & MacIsaac, 2009; Mogensen, Christensen, & Vittinghus, 1983 und Tervaert et al., 2010.

| Stadium der Nephropathie | GFR (ml/min) | Klinische und histologische Befunde/Merkmale |
|---------------------------------------|--------------|---|
| I Renale Hypertrophie-/ Hyperfunktion | ≥ 90 | Hyperfiltration, Verdickung der GBM |
| II Latente Nephropathie | 60–89 | Normoalbuminurie, Expansion des Mesangiums |
| III Inzipiente Nephropathie | 30–59 | frühestes klinisches Nephropathie-stadium, Mikroalbuminurie, noduläre Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson Läsion) |
| IV Manifeste diabetische Nephropathie | 15–29 | Makroalbuminurie, fortgeschrittene Glomerulosklerose |
| V Terminale Niereninsuffizienz | < 15 | Terminale Niereninsuffizienz |

1.3.2 Pathogenese und -physiologie der diabetischen Nephropathie

Die Entstehung und das Voranschreiten der DN ist äußerst komplex, wenn man die unterschiedlichen Zelltypen innerhalb der Niere betrachtet und die diversen Funktionen dieses Organs. Hinzu kommen Faktoren wie die Lebensumstände, Vorerkrankungen, genetische Prädispositionen und weitere. Als ursächlich werden metabolische und hämodynamische Störungen gesehen, die miteinander überlappen, sich gegenseitig bedingen und beeinflussen, wodurch Ursachen und Folgen nicht klar voneinander trennbar sind.

Bisher ist unklar, ob der Glomerulus oder der Tubulus die wichtigere Rolle in der Entstehung und der Progression spielen. Basierend auf den klaren pathologischen Veränderungen des Glomerulus, wie die Verdickung der GBM, Ausbreitung des Mesangiums und die Glomerulosklerose, galt die DN lange Zeit als eine glomeruläre Krankheit und die Verletzungen der Nierentubuli wurden als Sekundäreffekte aufgrund glomerulärer Läsionen angesehen (Chang et al., 2021). Jüngst mehren sich die Belege, dass der PT deutlich relevanter als zuvor angenommen ist. Man schreibt ihm zunehmend die Rolle als Treiber oder gar Auslöser der DN zu (Bonventre, 2012; S. S. Kim, Kim, Lee, Kim, & Song, 2018; Zeni, Norden, Cancarini, & Unwin, 2017). Beispielsweise zeigt der PT bereits vor dem Einsetzen erster glomerulärer Umwandlungen metabolische und morphologische Veränderungen, wie den Verlust des Bürstensaums (Haraguchi, Kohara, Matsubayashi, Kitazawa, & Kitazawa, 2020; Thomson, Vallon, & Blantz, 2004; Vallon, 2003; Vallon, Richter, Blantz, Thomson, & Osswald, 1999). Zudem findet die Verdickung der proximal tubulären Basalmembran parallel zu den glomerulären Veränderungen statt, ist in frühen Stadien aber weniger auffällig (Tervaert et al., 2010).

Angesichts der neuen Erkenntnisse soll in dieser Arbeit der PT in den Fokus der Pathophysiologie und -genese der DN rücken ohne dabei die zentrale Rolle des Glomerulus in Frage zu stellen. Vielmehr scheint es eine gegenseitige Abhängigkeit und Beeinflussung zwischen Glomerulus und PT zu sein (S. J. Chen, Lv, Liu, & Tang, 2020).

1.3.3 Auswirkungen der Hyperglykämie auf den proximalen Tubulus

1.3.3.1 Hyperreabsorption von Glukose

Hyperglykämie leistet den größten Beitrag zur Schädigung des PT. Hohe Glukosekonzentrationen in PTEC resultieren sowohl aus einem erhöhten Glukosegehalt im Blutplasma/ Interstitium als auch aus dem Glukoseüberschuss im Tubuluslumen durch die erhöhte Filtration am Glomerulus (Zeni et al., 2017). Die PTEC sind somit beidseitig unphysiologischen Glukoselevels ausgesetzt und nicht in der Lage den Glukosetransport zu reduzieren

um sich vor glukotoxischen Auswirkungen zu schützen (Vallon & Komers, 2011; Zeni et al., 2017). Daher erhöhen PTEC die Aufnahme von Glukose vor allem *via* des Transporters SGLT2 und in geringerem Maße auch *via* SGLT1 und parallel dazu auch deren Expression (Rahmoune et al., 2005; Vallon, 2015; Vallon & Komers, 2011). Nach erfolgter Reabsorption ins Zellinnere wird Glukose über GLUT2 und GLUT1 durch die basolaterale Membran in den Blutstrom transportiert – die Hyperglykämie wird weiter unterstützt. Daneben fördert die Hypertrophie des PT, als Merkmal frühen Diabetes, diesen Prozess. Wobei sich nicht genau sagen lässt, ob zunächst der hypertrophe PT die Grundlage für den vermehrten Einbau der SGLTs und GLUTs aufgrund vermehrter Membranoberfläche bildet oder die erhöhte Aufnahme von Glukose in die PTEC die Hypertrophie einleitet (S. S. Kim, Kim, Lee, Kim, & Song, 2018). Ungeachtet dessen trieben diese Beobachtungen die Entwicklung einer neuen Substanzklasse an Medikamenten voran. Hierbei handelt es sich um SGLT2-Inhibitoren, wie Canaglifozin, Dapaglifozin und Empaglifozin. Diese greifen spezifisch am PT an, blockieren dort die Glukoseaufnahme und führen zur vermehrten Ausscheidung von Glukose im Urin und zur Senkung des Blutzuckerspiegels (S. S. Kim, Kim, Lee, Kim, & Song, 2018). Dabei wirken sie unabhängig von Insulin.

1.3.3.2 Glomeruläre Filtrationsrate

Die primäre tubuläre Hyperreabsorption von Glukose führt des Weiteren zum Anstieg der GFR. Eine erhöhte GFR, auch als glomeruläre Hyperfiltration bezeichnet, ist ein allgemein anerkanntes Kennzeichen in dem frühen Diabetes. Zudem wird die glomeruläre Hyperfiltration als wichtiger Faktor in der Initiierung und im Fortschreiten von Nierenschädigungen betrachtet (Zeni et al., 2017). Der Hauptmechanismus, der zur Hyperfiltration führt, ist die Inhibierung des TGF. Die vermehrte Reabsorption von Glukose über die SGLTs ist mit der von Natrium gekoppelt. Neben SGLTs wird auch zunehmend der Transporter NHE3 in die apikale Membran der PTEC eingebaut (Tonneijck et al., 2017). Die Aktivität der SGLTs und von NHE3 bewirkt eine reduzierte Natrium-, Kalium-, Chlorid- und Glukosekonzentration im distalen Tubulus. An der MD wird somit weniger dieser Substanzen „detektiert“ und es kommt zur Inhibierung des TGF (siehe Kapitel 1.1.2) und folglich zum Anstieg der GFR sowie zur Erhöhung des intraglomerulären Drucks desselben Nephrons (Anders, Davis, & Thurau, 2016; Chagnac et al., 2008; Muskiet, Smits, Morsink, & Diamant, 2014; Tonneijck et al., 2017; Vallon & Komers, 2011). Somit ist primär die Hyperreabsorption am PT und die dadurch bedingte Hemmung des TGF als Ursache der erhöhten GFR, die bei beginnendem Diabetes beobachtet wird, anzunehmen. An diesem Punkt erweisen sich SGLT2-Inhibitoren erneut als vielversprechend. Auch bewirkt die Erniedrigung der Natrium- und Chloridkonzentration an der MD die Aktivierung des RAS (siehe Kapitel 1.1.3). Eine sich daraus ergebende Konsequenz ist die erhöhte Ang II-Aktivität. Ang II ist nicht nur ein starker

Vasokonstriktor, der den intraglomerulären Druck erhöht sondern kann wie ein Zytokin wirken und zu hypertrophen PTEC, Inflammation, Apoptose und *via* des Proteins *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1) zu Fibrose führen (Chawla, Sharma, & Singh, 2010; Mezzano, Ruiz-Ortega, & Egido, 2001; Ruiz-Ortega, Lorenzo, Suzuki, Ruperez, & Egido, 2001). Vor der Entwicklung der SGLT2-Inhibitoren erfolgte die Standard-Behandlung der DN durch die Gabe von ACE-Hemmern oder AT₁-Antagonisten. Beide inhibieren das RAS, wodurch eine Blutdrucksenkung erzielt wird, zum Teil reduzieren sie auch eine Albuminurie (Chawla et al., 2010).

Die Resultate der Hyperfiltration unter Diabetes und des weiterhin hohen Blutglukosespiegels sind vielfältig und bisher nicht gänzlich verstanden. Einerseits filtriert die Niere noch mehr an Glukose, Fettsäuren, Proteinen und Aminosäuren in gleicher Zeit. Das führt u. a. zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und als Konsequenz dazu zu hypoxischen Bedingungen im PT. Aber auch Wachstumsfaktoren und Zytokine werden vermehrt filtriert – beides Impulsgeber für pathologische Signalwege, die zu Störungen des Energie- und Redoxstatus sowie zu Fibrose und Entzündungen führen (Forbes & Cooper, 2013). Andererseits führt der erhöhte hydrostatische Druck zu mechanischem Stress der Filtrationsbarriere. Diese nimmt dadurch Schaden, kann ihrer Filterfunktion nicht mehr nachkommen und dadurch werden mehr Proteine in den Primärharn filtriert (Chagnac, Zingerman, Rozen-Zvi, & Herman-Edelstein, 2019; Tonneijck et al., 2017).

1.3.3.3 Albuminurie

Die zunehmende Zerstörung der glomerulären Filtrationsbarriere führt zur charakteristischen Albuminurie in frühen Phasen der DN und ist Anzeichen eines fortschreitenden Krankheitsverlaufs. Vermehrt filtriertes Albumin wird über den Megalin-Cubilin-Rezeptor-Komplex der PTEC aufgenommen und in den Zellen zum Teil über den FcRn-Rezeptor transzytiert (Dickson, Wagner, Sandoval, & Molitoris, 2014). Als Reaktion auf die exzessive Proteinreabsorption und abnormaler Proteinakkumulation in Endolysosomen wird eine inflammatorische Kaskade in Gang gesetzt und die PTEC starten ein „Feuerwerk“ an proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin 8 und 18 sowie Chemokinen, wie MCP1, CCL5 (RANTES) ebenso Adhäsionsmoleküle, wie *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1), *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM), aber auch der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*) werden gebildet und abgegeben (S. J. Chen et al., 2020; Faria et al., 2021; Navarro-Gonzalez, Mora-Fernandez, Muros de Fuentes, & Garcia-Perez, 2011; Vallon, 2011; Zeni et al., 2017; Zoja et al., 1998). Die beschriebene proinflammatorische Antwort der PTEC lockt Mak-

rophagen und Lymphozyten an, was TGF β -abhängig das Fortschreiten tubulointerstitieller Fibrosen fördert (Faria et al., 2021). Doch auch ohne eine beginnende Glomerulopathie scheint der PT Ursprung für Albuminurie zu sein (S. S. Kim, Kim, Lee, Kim, & Song, 2018). Die GBM ist unter physiologischen Bedingungen nicht komplett impermeabel für Albumin (Comper, Haraldsson, & Deen, 2008). Das heißt, Albumin gelangt zu Teilen immer in das Primärfiltrat. Finden Störungen in der Albuminreabsorption über den Megalin-Cubilin-Rezeptor-Komplex, wie eine unzureichende Expression der Rezeptoren (Dickson et al., 2014; Tojo et al., 2001), mangelhafte Bindung und Internalisierung von Albumin, oder Einschränkungen in der Transzytose *via* FcRn (Dickson et al., 2014) von Albumin in PTEC, statt, trägt dies ebenso zur Albuminurie bei (Russo et al., 2009). Allerdings bedarf es deutlich mehr als „nur“ eine gestörte Endozytose am PT um den nephrotoxischen Bereich der Proteinurie zu erreichen. Vielmehr scheint es die Kombination aus erhöhter GFR, Defekten in der GBM (Comper et al., 2008) und reduzierter Reabsorption am PT zu sein (Comper et al., 2008; Dickson et al., 2014; S. S. Kim, Kim, Lee, Kim, & Song, 2018; Zeni et al., 2017). Durch modernere Techniken, wie die Multi-Photon-Mikroskopie, und die Generierung neuer Mausmodelle werden immer Details entdeckt, die gleichzeitig bestehende Dogmen in Frage stellen. Beispielsweise berichtet Mori et al. von einer erhöhten Albuminexkretion und -reabsorption in T1Dm *Megalin-knockout* Mäusen (Mori et al., 2017), wodurch Megalins Rolle in der Reabsorption von Albumin schwindet. Daher bleibt es spannend, wer die treibenden Kräfte hinter der Albuminurie sind.

1.3.3.4 *Advanced Glycation End Products*

Bedingt durch die anhaltende Hyperglykämie kommt es zu einer vermehrten Bildung von *advanced glycation end products* (AGE; Brownlee, 1995). AGE entstehen ubiquitär durch die nicht-enzymatische, irreversible Reaktion von Glukose mit freien Aminogruppen von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen unter mehrfachen Oxidationsschritten (Fujii et al., 2010; Pacher, Obrosova, Mabley, & Szabo, 2005). Hierzu zählen zum Beispiel glykiertes Albumin und glykiertes Hämoglobin A (HbA1c), die verlässliche Marker bei Patienten mit Diabetes sind (Peacock et al., 2008; Slyne, Slattery, McMorrow, & Ryan, 2015).

AGE wirken glykotoxisch, da sie Quervernetzungen zwischen einzelnen Peptidketten verursachen sowie Struktur und Funktion der EZM verändern. AGE können in direkter Weise die Produktion der EZM stimulieren und gleichzeitig ihre Degradation hemmen (Forbes, Cooper, Oldfield, & Thomas, 2003). Somit bringen AGE die Balance aus Auf- und Abbau durcheinander. Die vermehrte Verdickung der GBM und der tubulären Basalmembran ist eine Konsequenz vermehrter EZM-Akkumulation (Fioretto & Mauer, 2007). Allerdings ist die Verdickung der GBM nicht nur auf AGE zurückzuführen. Auch eine Deletion des von Hippel-Lindau(VHL)-Proteins kann dies begünstigen (Steenhard et al., 2010). Die Modi-

fizierung von Proteinen der EZM kann ebenfalls Matrix-Matrix- und Matrix-Zell-Interaktionen zerstören, wodurch Fibrosen gefördert werden (Forbes et al., 2003). In dem Zusammenhang tragen AGE auch zur Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Gewebe bei – die sogenannte Epithel-zu-Mesenchym-Transition. Tubulointerstitielle Fibrosen sind die Folge (Faria et al., 2021). Niedermolekulare AGE werden am Glomerulus filtriert und von den PTEC reabsorbiert und tragen zur tubulointerstitiellen Schädigung bei (Faria et al., 2021; Saito et al., 2005). Studien an PTEC demonstrierten eine vermehrte Bildung intrazellulärer ROS (Forbes et al., 2003; Yamagishi et al., 2003), eine Hochregulation von TGFβ (Yamagishi et al., 2003), die Aktivierung von NF-κB (Morcos et al., 2002), eine erhöhte Expression von Interleukin 8 und ICAM1 (Tang, Leung, Chan, Tsang, & Lai, 2006) nach Behandlung mit glykiertem Albumin.

1.3.3.5 Hypoxie

Um der hohen metabolischen Aktivität gerecht zu werden, muss die Niere mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden, was über den renalen Blutstrom erfolgt. Sauerstoff bildet die Grundlage für die Erzeugung von Energie in Form von ATP *via* oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien. Der meiste Sauerstoffverbrauch findet im Nierenkortex statt bedingt durch die dort ablaufende glomeruläre Filtration und proximal tubuläre Reabsorption. Sobald der Sauerstoffverbrauch die Sauerstoffverfügbarkeit übersteigt, stellt sich ein hypoxisches, also sauerstoffarmes, Milieu ein. Untersuchungen zu Folge werden 60% der Gesamtenergie der Niere für die Natrium-Reabsorption am PT aufgewendet. Davon entfallen $\frac{2}{3}$ auf die Na⁺/K⁺-ATPase (Chang et al., 2021). Glukose wird zwar über den energieunabhängigen Transporter SGLT2 im Kotransport mit Natrium in die PTEC aufgenommen, jedoch braucht es hierfür einen kontinuierlichen elektrochemischen Natriumgradienten. Die Aufrechterhaltung dieses Gradienten wird durch die Na⁺/K⁺-ATPase unter hohem Energieverbrauch bewerkstelligt (Chang et al., 2021). Daher führt eine vermehrte Glukose-Reabsorption bei DN unweigerlich zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch im PT um ATP zu generieren. Parallel dazu wird dies durch die stattfindende Hyperfiltration bei DN weiter gefördert und eine nachfolgende überlastungsbedingte Funktionsstörung der Mitochondrien bewirkt eine zusätzliche Verschärfung der Situation (Gilbert, 2017). Ein weiterer Faktor, der zur Hypoxie im PT beiträgt, ist eine erhöhte Glukoneogenese in diabetischen Nieren (Alsahli & Gerich, 2017; Meyer, Woerle, Dostou, Welle, & Gerich, 2004; Scheen, 2020). Dieser Prozess verbraucht ebenfalls sehr viel Sauerstoff und Energie. Zudem führt die vermehrte, aber zwingend notwendige, Produktion von ATP zur Generierung von ROS, die eine inflammatorische Signalkaskade provozieren, die wiederum in tubulointerstitieller Fibrose mündet (Faria et al., 2021). Eine chronische Hypoxie führt nach und nach zum Untergang der Nephrone mit dem Ergebnis der Niereninsuffizienz. Seit einiger Zeit rückt die Hypoxie vermehrt ins

Zentrum als Auslöser oder zumindest maßgeblicher Faktor in der Pathogenese der DN. Beispielsweise zeigten Versuche, dass sich Hypoxie bereits in frühen Stadien der Entstehung und des Fortschreitens einer experimentellen DN (Palm et al., 2004; Ries et al., 2003) ereignet und dass es zu einer Hochregulation von HIF-1 α in diabetischen Nieren von Ratten (Rosenberger et al., 2008) und von Menschen (Higgins et al., 2007) kam.

Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)

Die zelluläre Antwort auf hypoxische Bedingungen wird vorwiegend durch die Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) vermittelt. HIFs sind Heterodimere, die sich aus zwei Einheiten zusammensetzen – einer Sauerstoff-abhängigen HIF- α -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten HIF- β -Untereinheit. Gemeinsam bilden sie einen funktionellen Komplex, der als Transkriptionsfaktor agiert. Die Aktivität als Transkriptionsfaktor wird durch den Abbau bzw. die Stabilität von HIF- α bestimmt, wodurch eine überaus schnelle Reaktion auf Veränderungen des Sauerstoffgehalts stattfinden kann. Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF- α an zwei Prolyl-Stellen der sauerstoffabhängigen Domäne (ODD; *oxygen dependent domain*) durch spezifische Prolylhydroxylasen hydroxyliert. Hydroxyliertes HIF- α interagiert mit dem von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (VHL), welches die Substraterkennung innerhalb eines E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes übernimmt. HIF- α wird VHL-abhängig polyubiquitiniert und somit dem raschem proteasomalen Abbau zugeführt (Nangaku, 2006). Unter hypoxischen Bedingungen fehlt Sauerstoff als essenzielles Substrat für die Hydroxylierungsreaktion, wodurch HIF- α nicht abgebaut wird, sondern akkumuliert und in den Zellkern transloziert. Dort dimerisiert es mit HIF- β und rekrutiert die Koaktivatoren CBP/p300 (Haase, 2006). Es kommt zur Bindung dieses Komplexes an Hypoxie-responsive-Elemente der Promotorregionen entsprechender Gene, wodurch die Transkription durch die RNA-Polymerase II erfolgt. Insgesamt sind mehr als hundert Zielgene von HIF beschrieben, vor allem solche im Zusammenhang mit einer erhöhten Bereitstellung von Sauerstoff wie Erythropoietin (Epo), ein Hormon zur Stimulation der Produktion roter Blutkörperchen, und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sowie *platelet-derived growth factor* (PDGF), beide wichtig für die Angio- sowie Vaskulogenese (Nangaku & Eckardt, 2007; Shu et al., 2019). Aber auch Gene, die im Glukose- und Zellmetabolismus involviert sind, wie *Glut1*, *Pdk1* (Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1), werden durch HIF kontrolliert (Haase, 2006).

Insgesamt existieren drei Isoformen von HIF- α , namentlich HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α , die mit einer HIF- β -Untereinheit interagieren. HIF-1 α ist ubiquitär exprimiert, die anderen beiden sind gewebsspezifisch. In der Niere ist HIF-2 α in interstitiellen Zellen, Endothelzellen

und in den Zellen des Glomerulus prominent während in den Tubuluszellen HIF-1 α die dominante Form darstellt (Rosenberger et al., 2002; Schodel & Ratcliffe, 2019). Der Einfachheit wird nur von HIF-1 (Komplex aus HIF-1 α und HIF-1 β) gesprochen.

HIF-induzierte Reaktionen auf Sauerstoffmangel können schädlich aber auch protektiv sein (Catrina & Zheng, 2021). Zahlreiche Studien sowohl an Zellkultur- als auch an Tiermodellen und Patienten mit Diabetes konnten dies belegen. Die Gruppe um Friederich-Persson zeigte, dass Hypoxie in Ratten eine Nephropathie, unabhängig von oxidativen Stress und Hyperglykämie, induzieren konnte (Friederich-Persson et al., 2013). Die Reduktion von HIF-1 mittels des HIF-1 Inhibitors-YC-1, führte zur Reduktion u. a. der Hypertrophie der Glomeruli, der Ausbreitung des Mesangiums, der Akkumulation der EZM und auch der Albuminurie in T1Dm-Mäusen (Nayak et al., 2016). Im Umkehrschluss ist es ein Beleg für HIF-1 als Vermittler der Diabetes-induzierten Nierenschädigung. Trotz beschriebener negativer Effekte von HIF-1 wurden auch protektive Effekte beobachtet. Eine Stabilisierung von HIF-1 α mittels der Gabe von Kobaltchlorid schützte vor DN. Es wurde eine Normalisierung der GFR, eine Verbesserung der tubulären Transporteffizienz, eine reduzierte Proteinurie und weniger tubulointerstitielle Schäden festgestellt (Nordquist et al., 2015). Die Akkumulation von HIF-1 α milderte Funktionsstörungen in Mitochondrien und schränkte die Mitochondrien-abhängige Apoptose der Tubuluszellen diabetischer Mäuse ein (Jiang et al., 2020). Die Arbeitsgruppe um Tian konnte mittels einer Intervall-Hypoxie-Hyperoxie-Therapie (CIHH; *chronic intermittent hypobaric hypoxia*) an diabetischen Ratten protektive Effekte gegenüber den in der frühen DN stattfindenden Schädigungen, nachweisen. Dabei aktivierte CIHH den HIF-1 Signalweg (Tian et al., 2016).

1.4 Zielstellung

Der PT ist der Abschnitt des Nephrons, der zuallererst mit dem Primärfiltrat und der Vielzahl darin gelöster Substanzen konfrontiert wird. Seine Hauptaufgabe besteht darin, den Großteil dieser Stoffe zu reabsorbieren, um nicht nur einen unnötigen Verlust im Urin zu vermeiden, sondern auch die Homöostase aufrecht zu erhalten. Nur durch eine enorme Ausstattung der PTEC mit diversen Transportern, Rezeptoren und einem gewaltigen Endozytoseapparat kann er dieses Arbeitspensum bewältigen. Eine besondere Rolle spielt Megalin im PT als Rezeptor für die Endozytose vor allem von Proteinen. Die Arbeiten von Grahammer et al. (Grahammer et al., 2017) zeigten Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von Megalin in *mammalian/mechanistic target of rapamycin*(mTOR)-Kinase-defizienten Mäusen bei gleichzeitiger Blockade der Endozytose am PT. Daher lag ein Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation, den Einfluss von Phosphorylierungen, speziell der Phosphorylierung von Serin an Position 4577 im C-Terminus von Megalin, näher zu untersuchen (Abb. 1-2). Im Fokus

dieser Forschungen standen vor allem mögliche phosphorylierungsbedingte Modulationen der Megalin-abhängigen Endozytose.

Ein weiteres Hauptthema dieser Arbeit setzt sich mit der Beteiligung des PT bei der Entstehung der DN auseinander. Eine neuartige Klasse an Medikamenten, sogenannte SGLT2-Hemmer, zeigen eindrücklich protektive Effekte auf kardiovaskuläre und renale Endpunkte. Wie genau sie ihre Wirkung erzielen, ist bisher unklar. Doch sind hämodynamische Effekte wie auch die Reduktion von Hypoxie und von Entzündungen involviert (Heerspink et al., 2019; Lytvyn, Bjornstad, van Raalte, Heerspink, & Cherney, 2020; Thomson & Vallon, 2021). Die Tatsache, dass diese Medikamente spezifisch am SGLT2-Transporter angreifen, rückt den PT zunehmend in den Fokus verschiedener renaler Erkrankungen, wie die der DN. Die DN führt ohne rechtzeitige adäquate Behandlung zur Niereninsuffizienz. Der PT wird im Zusammenspiel mit Hypoxie, deren Effekt bislang kontrovers diskutiert wird, vermehrt als Initiator sowohl der Entstehung als auch der Progression der DN gesehen. Daher galt das Augenmerk dieser Arbeit den Beitrag proximal tubulärer Hypoxie zur DN näher zu bestimmen. Hierfür stand ein neues Mausmodell zur Verfügung. Dieses Modell weist einen konditionellen *knockout* von *Vhl* im PT auf und zusätzlich einen durch Streptozotocin-induzierten T1Dm. Dieses Modell ermöglicht es die Rolle von HIF-1 in der Ausbildung einer DN näher zu charakterisieren und die Auswirkungen von HIF-1 in Kombination mit T1Dm zu prüfen. Das hierdurch erworbene Wissen soll zum Verständnis der Pathogenese der DN beitragen, um verbesserte und neue Therapieansätze entwickeln zu können.

2. Material

2.1 Spezielle Geräte, Plastikwaren und allgemeine Laborverbrauchsmaterialien

Alle Standard-Verbrauchsmaterialien wurden von Eppendorf (Hamburg), BD Biosciences (Heidelberg), Sarstedt (Nümbrecht) und Thermo Scientific (München) bezogen.

Detektion von Immunblots und DNA-Gelen

Fusion SL; Vilber, Eberhardzell

Dialyse

Dialyseschlauch Fisherbrand™ Regenerated Cellulose Dialysis Tubing; Fisher Scientific, Schwerte

Elektroporation

Neon™ Transfection System, Transfektionsgerät; Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, München
E. coli Pulser®, Transformationsgerät; Bio-Rad Laboratories; München
Elektroporationsküvetten (1 mm Elektrodenabstand); Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Gelelektrophorese- und Western Blot-Kammern sowie Zubehör

Mini Protean® 3 Cell GEL Elektrophorese-System 525BR; Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot Cell; Bio-Rad, München
Wide Mini-Sub Cell GT; Bio-Rad, München
NC 45 Nitrozellulose-Membran, Porengröße: 0,45 µm; SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Whatman® Chromatographie-Papier, Flussrate: 190 mm/30 min; Sigma-Aldrich, Steinheim

Inkubatoren

CO₂-Brutschrank ICO; Memmert, Schwabach
B6200 Brutschrank; Heraeus-Christ, Osterode/Harz
Innova 4200 Schüttelinkubator; New Brunswick Scientific, USA
HybEZ™ II Hybridisierungsöfen; Advanced Cell Diagnostics Bio-Techne, UK

Mikroskope und dazugehörige Software

Abberior Facility Line, konfokales Fluoreszenzmikroskop mit STED, Software: Inspector Lightbox; Abberior, Göttingen
Leica TCS SP5, konfokales Fluoreszenzmikroskop, Software: LAS AF; Leica Mikrosysteme, Wetzlar

Axiovert 200M, Fluoreszenzmikroskop mit AxioCam MRm, Software: AxioVision SE64 Rel. 4.9; Carl Zeiss, Jena

Keyence BZ-X, Fluoreszenzmikroskop, Software: BZ-X800 Viewer; Keyence, Neu-Isenburg

Axiophot, Lichtmikroskop mit AxioCam, Software: AxioVision Rel 4.8; Carl Zeiss, Jena

Photometer

Libra S70 Double Beam Spektrophotometer; Biochrom, UK

NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer; Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Epoch Mikroplatten-Spektrophotometer mit Take3-Mikrovolumen-Platte; BioTek Instruments, USA

PLASTIBRAND® Einmal-Küvetten, 1,5 ml, Polystyrol, halbmikro; Carl Roth, Karlsruhe

Plattenlesegeräte

TECAN infinite 200 Pro multimode Mikroplattenleser; Tecan, Schweiz

Rotator/Schüttler

Überkopffrotator SB2, 20 rpm; Stuart, UK

Belly Button® Mini Orbitalschüttler; Ibi Scientific, USA

Duomax 1030 Orbitalschüttler; Heidolph, Schwabach

RM 5 Rollenmischer; Hecht-Assistent, Sondheim vor der Rhön

Schneidegeräte

Kryostat Leica CM1860 UV; Leica Mikrosysteme, Wetzlar

Mikrotom Leica RM2155; Leica Mikrosysteme, Wetzlar

Sonifikator

Sonifikator UP200S; Hielscher Ultrasonics, Teltow

Spannungsquellen

PowerPac Basic, Bio-Rad, München

PowerPac 200, Bio-Rad, München

Thermocycler

7500 Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Dreieich

T100™ Thermal Cycler; Bio-Rad, München

Zählkammer

Neubauer *improved*-Zählkammer; Hecht, Sondheim

Zentrifugen

In der Tabelle 2-1 sind alle verwendeten Zentrifugen mit den dazugehörigen Zentrifugen-gefäßen aufgelistet.

Tabelle 2-1: Zentrifugen mit entsprechenden Zentrifugengefäßen und Herstellern

| Zentrifuge | Zentrifugengefäße | Hersteller |
|---|--|-------------------------------|
| Digifuge GL | 10 bis 50 ml Falconröhrchen | Heraeus-Christ, Osterode/Harz |
| RC-5B Ultrazentrifuge | 50 bis 300 ml Reaktionsgefäße | Sorvall Instruments, USA |
| himac CT15RE Hochgeschwindig- keits-Mikrozentrifuge | 1,5 ml- und 2 ml-Eppendorf- reaktionsgefäße | VWR, Darmstadt |
| Sigma 2K15 | 1,5 ml- und 2 ml-Eppendorf- reaktionsgefäße | Sigma, Osterode am Harz |

2.2 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und rekombinante Proteine

Alle Standard-Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, über die Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und AppliChem (Darmstadt) bezogen. Herzustellende Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls sterilfiltriert oder autoklaviert.

Alle für diese Arbeit verwendeten speziellen Chemikalien, Reagenzien und Enzyme sind der Tabelle 2-2 zu entnehmen. Die Tabelle 2-3 gibt Proteine, die in *in vitro* Pull-Down Versuchen als Substrate dienen, wieder.

Tabelle 2-2: Produkte und deren Hersteller

| Produkt | Hersteller |
|---|------------------------|
| 100 bp DNA Ladder | Solis BioDyne, Estland |
| 1kb DNA Ladder | Solis BioDyne, Estland |
| 6x DNA Loading Dye Buffer Blue | Solis BioDyne, Estland |
| Agar für Bakteriologie | AppliChem, Darmstadt |
| alphaMEM mit Ultra-Glutamin, EBBS, Natriumpyruvat, Nukleosiden und NEAA (BE02-002F) | Lonza, Köln |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Ampicillin | AppliChem, Darmstadt |
| Agar für die Bakteriologie | AppliChem, Darmstadt |
| Antimycin A | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ammoniumperoxydisulphat (APS) | Roth, Karlsruhe |
| Coomassie® Brilliant Blue R 250 | SERVA Electrophoresis, Heidelberg |
| Complete EDTA-free Protease Inhibitor | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Corning® Matrigel® Matrix | Fisher Scientific, Schwerte |
| Cryomatrix Einbettmedium | Thermo Scientific, München |
| DAB Lösung | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DAB Reagenz | Vector Laboratories, USA |
| Diethylaminoethyl-(DEAE) Dextran | Roth, Karlsruhe |
| DMEM mit 4,5 g/L Glukose, L-Glutamin, Natriumpyruvat und 3,7 g/L NaHCO ₃ (P04-03590) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| DNAseI | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| dNTP-Mix | Promega, Walldorf |
| Doxycyclin | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| EGF murine rec. | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Einfriermedium für Zellen Bmbanker™ | Nippon Genetics Europe, Düren |
| FIREPol® DNA Polymerase | Solis BioDyne, Estland |
| Fötale Kälberserum (FKS) (P30-3302) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Fötale Kälberserum (FKS) tetracyclinfrei (P30-3602) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Geneticin (G-418) | Roth, Karlsruhe |
| Glukose-Oxidase | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Glutamin (Alanyl-L-Glutamin, 200mM) | Roth, Karlsruhe |
| Ham's F12 mit Glutamin und 1,176 g/L NaHCO ₃ (P04-15500) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| HisPur™ Ni-NTA Resin | Thermo Scientific, München |
| Hygromycin | Roth, Karlsruhe |
| Immobilon Western HRP Substrat | Merck, Darmstadt |
| Isopentylamin (Isoamylamin) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Roth, Karlsruhe |
| Kollagen Typ IV | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| L-Glutathion, reduziert | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| lysogeny broth (LB)-Medium | AppliChem, Darmstadt |

| | |
|--|--|
| M-MLV Reverse Transkriptase | Promega, Walldorf |
| M-MLV Reverse Transkriptase 5x Reaktionspuffer | Promega, Walldorf |
| Nonidet P-40 (NP-40) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa | Thermo Scientific, München |
| Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads | Thermo Scientific, München |
| Pierce™ Glutathione Agarose | Thermo Scientific, München |
| Poly-D-Lysin (PDL) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| peqGREEN DNA/RNA-Farbstoff | VWR, Darmstadt |
| Ponceau S | Roth, Karlsruhe |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific, München |
| Protein G Sepharose 4 Fast Flow | GE Healthcare, München |
| Q5 Polymerase | New England Biolabs, USA |
| Random Hexamer Primer | Thermo Scientific, München |
| Restriktionsenzyme | New England Biolabs, USA Thermo Scientific, München |
| Rotiphorese® Gel 40 (29:1) | Roth, Karlsruhe |
| Tetramethylethylenediamin (TEMED) | Roth, Karlsruhe |
| Trypsin 0,5%/EDTA 0,2 % (10x) ohne Kalzium und Magnesium | PAN-Biotech, Aidenbach |
| HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix | Solis BioDyne, Estland |
| Whatman® Chromatographie-Papier | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Xfect™ Transfection Reagent | Takara, Frankreich/Schweden |

Tabelle 2-3: Proteine und deren Referenz

| Protein | theoretisches MW [kDa] | Referenz |
|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| GST | ~ 26 | vorliegende Dissertation |
| GST-ARH | ~ 66 | vorliegende Dissertation |
| GST-Dab2 ₁₋₂₀₅ | ~ 56 | vorliegende Dissertation |
| His-MMR WT | ~ 24 | vorliegende Dissertation |
| His-MMR SA | ~ 24 | vorliegende Dissertation |
| His-MMR SD | ~ 24 | vorliegende Dissertation |

2.3 Standard-Puffer und -Lösungen

Blocklösung für Western Blot:

5% (w/v) Magermilchpulver in PBS

Blocklösung für Immunohistochemie/-zytochemie:

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

PBS:

137 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

10 mM Dinatriumhydrogenphosphat

2 mM Kaliumdihydrogenphosphat

pH 7,4

2.4 Kits

Agarose Gel Extraction Kit; Jena Bioscience, Jena

Cas9 2NLS Nuklease; Synthego, USA

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay; Promega, Walldorf

Extracellular Oxygen Consumption Assay; Abcam, Berlin

GeneJET Plasmid Miniprep Kit; Thermo Scientific, München

Gene Knockout Kit v2; Synthego, USA

Glycolysis Assay (Extracellular acidification); Abcam, Berlin

Neon™ Transfection System 10 µL Kit; Thermo Scientific, München

Nuclae Extract Kit, Abcam, Berlin

NucleoBond Xtra Midi; Machery-Nagel, Düren

NucleoSpin RNA/Protein, Mini Kit for RNA and protein purification; Machery-Nagel, Düren

RNAscope® 2.5 HD Reagent Kit; Advanced Cell Diagnostics Bio-Techne, UK

VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase; Vector Laboratories, USA

2.5 Plasmide und rekombinante lentivirale Vektoren

Alle für diese Arbeit verwendeten Plasmide sind der Tabelle 2-4 zu entnehmen. Rekombinante lentivirale Vektoren (rLV) sind in Tabelle 2-5 aufgelistet.

Tabelle 2-4: Plasmide; LBD: Ligandenbindungsdomäne, TMD: Transmembrandomäne, CPD: Zytoplasmadomäne, PTB: Phospho-Tyrosin-Bindedomäne, AS: Aminosäure

| Plasmid | relevante Eigenschaften | Referenz |
|--|--|--|
| pcDNA3-FLAG-Rheb-N153T | überaktive Mutante von Rheb (human) durch einen Aminosäureaustausch Asparagin153Threonin, mit N-terminalen Flag-tag in einem pcDNA3-Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Amp ^R | Fuyuhiko Tamanoi Addgene Plasmid #19997; Urano et al., 2007 |
| pcDNA3.1 his/myc | <i>E. coli</i> -Expressionsvektor mit CMV-Promotor, für C-terminale his/myc-Fusionsproteine, Amp ^R , Neo ^R | Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, München |
| pCMV6-AC-GFP | Expressionsvektor für GFP (<i>Aequorea victoria</i>) mit CMV-Promotor, Amp ^R | AG Hattermann-Koch |
| pET-6xHis/Megalin C-term_600bp WT = His-MMR WT | CPD des Wildtyp Megalinrezeptors (Ratte) mit N-terminalen His-tag in einem pET-Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R | vectorbuilder, USA |
| pET-6xHis/Megalin C-term_600bp SA = His-MMR SA | CPD des Megalin-rezeptors (Ratte) mit Aminosäureaustausch Serin4577Alanin und mit N-terminalen His-tag in einem pET-Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R | vectorbuilder, USA |
| pET-6xHis/Megalin C-term_600bp SD = His-MMR SD | CPD des Megalin-rezeptors (Ratte) mit Aminosäureaustausch Serin4577Aspartat und mit N-terminalen His-tag in einem pET-Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R | vectorbuilder, USA |
| pGEX4T-3 | <i>E. coli</i> -Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine, Amp ^R | GE Healthcare, München |
| pGEX4T1-GST-Dab2 ₁₋₂₀₅ | PTB-Domäne (AS 1–250) von Dab2 (Maus) mit N-terminalen GST-tag in einem pGEX-Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R | Mishra et al., 2002 |
| pGEX-2T-hLDLRAP1 | ARH Volllängenprotein (human) mit N-terminalen GST-tag in einem pGEX-Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R | vectorbuilder |
| MMR2/SPHisMyc-pCepPu WT = HisMyc-MMR2 WT | Fragment des Wildtyp Megalinrezeptors (Ratte) mit 2. LBD, TMD, CPD, N-terminalen His-Myc-tag sowie CMV-Promotor, Amp ^R , Puro ^R | AG Theilig, unveröffentlicht |

| | | |
|---|--|---|
| MMR2/SPHisMyc-pCepPu SA = HisMyc-MMR2 SA | Fragment des Megalinrezeptors (Ratte) mit Aminosäureaustausch Serin4577 Alanin und mit 2. LBD, TMD, CPD, N-terminalen His-Myc-tag sowie CMV-Promotor, Amp ^R , Puro ^R | AG Theilig, unveröffentlicht |
| MMR2/SPHisMyc-pCepPu SD = HisMyc-MMR2 SD | Fragment des Megalinrezeptors (Ratte) mit Aminosäureaustausch Serin4577 Aspartat und mit 2. LBD, TMD, CPD, N-terminalen His-Myc-tag sowie CMV-Promotor, Amp ^R , Puro ^R | AG Theilig, unveröffentlicht |
| TetO-FUW-PLZF | ZBTB16 in einem TetO-FUW lentiviralen Expressionsvektor, bei dem die transgene Expression mittels einer Tetracyclin-abhängigen Operatorsequenz und einem minimalen CMV Promotor kontrolliert wird, zur Produktion von rLV durch E. Di Valentin, Amp ^R | Rudolf Jaenisch/ Addgene Plasmid #61543; Cassady et al., 2014 |

Tabelle 2-5: Rekombinante lentivirale Vektoren (rLV) der 3. Generation; TU/ml = transducing unit je Milliliter

| rLV | relevante Eigenschaften | Titer [TU/ml] | Referenz |
|--------------------------------|--|-------------------------|--|
| EF1a TET3G = Inducer / +Ind | Transaktivatorprotein, welches durch Doxycyclingabe aufgrund einer Konformationsänderung aktiv und dadurch eine Bindung an die Operatorsequenz des TRE3G-Promotors ermöglicht wird, Hygro ^R | 3.18 x 110 ⁸ | E. Di Valentin, Universität Liège/ GIGA-Viral Vectors Platform |
| TRE3G EmGFP = +GFP | mit TRE3G-Promotor, an den das aktivierte Transaktivatorprotein bindet und die Transkription von GFP ermöglicht, Puro ^R | 6.94 x 110 ⁸ | |
| TRE3G hPLZF = +ZBTB16 | mit TRE3G-Promotor, an den das aktivierte Transaktivatorprotein bindet und die Transkription von ZBTB16 ermöglicht | 3.18 x 110 ⁸ | |

2.6 Antikörper

Alle für die immunologische Detektion genutzten Primärantikörper sind der Tabellen 2-6 zu entnehmen. Alle IgG Meerrettich-Peroxidase(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper aus Esel gegen Kaninchen, Maus, Meerschwein und Ratte wurden in einer Verdünnung von 1 zu 5000 eingesetzt und von Jackson ImmunoResearch Europe, UK bezogen. Alle genutzten IgG Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper sind in der Tabelle 2-7 gelistet.

Tabelle 2-6: Primärantikörper; Kat# = Katalognummer

| Primärantikörper | Eigenschaften | Referenz |
|---------------------------------|-------------------------|--|
| β-Aktin (C4) (Kat# sc-47778) | monoklonal, Maus | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| ARH (Kat# bs-6337R) | polyklonal, Kaninchen | Bioss Antibodies, USA |
| Clathrin (Kat# CBL188) | monoklonal, Maus | Merck Millipore, Darmstadt |
| c-Myc (Kat# MCA1929) | monoklonal, Ratte | Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen |
| c-Myc (9E10) (Kat# M4439) | monoklonal, Maus | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| EEA1 (Klon 14) (Kat# 610457) | monoklonal, Maus | BD Biosciences, Heidelberg |
| Flag (M2) (Kat# F1804) | monoklonal, Maus | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| GM130 (Kat# ab139860) | monoklonal, Kaninchen | Abcam, Berlin |
| GFP (D5.1) (Kat# 2956) | monoklonal, Kaninchen | Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main |
| GST (Kat# G1160) | monoklonal, Maus | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| LC3A/B (Kat# ab128025) | polyklonal, Kaninchen | Abcam, Berlin |
| Megalin | polyklonal, Meerschwein | Theilig et al., 2007 |
| NHE3 (Kat# SPC-400) | polyklonal, Kaninchen | StressMarq Biosciences Inc., USA |
| NKCC2 2.1 | polyklonal, Meerschwein | Schmitt, Klussmann, Kahl, Ellison, & Bachmann, 2003 |

| | | |
|---|-------------------------|--|
| nNOS/NOS1 (Kat# 160870) | polyklonal, Kaninchen | Cayman Chemical, USA |
| PCNA (Kat# 60097-1-Ig) | monoklonal, Maus | Proteintech, Planegg-Martinsried |
| Phospho-Megalin | polyklonal, Kaninchen | AG Theilig, unveröffentlicht |
| Phospho-S6 Ribosomales Protein (Ser235/236) (Kat# 2211) | polyklonal, Kaninchen | Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main |
| PV1/MECA-32 (Kat# ab27853) | monoklonal, Ratte | Abcam, Berlin |
| Rab11A (Kat# 71-5300) | polyklonal, Kaninchen | Thermo Fisher Scientific/ Invitrogen, München |
| S6 Ribosomales Protein (5G10) (Kat# 2217) | monoklonal, Kaninchen | Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main |
| SGLT2 | polyklonal, Meerschwein | AG Theilig, unveröffentlicht |
| ZBTB16/PLZF (5B3) (Kat# LS-B8737) | polyklonal, Kaninchen | LSBio, USA |
| ZBTB16/PLZF (Kat# HPA001499) | polyklonal, Kaninchen | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| ZO-1 (R40.76) (Kat# MABT11) | monoklonal, Ratte | Merck Millipore, Darmstadt |

Table 2-7: Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper, alle in Esel produziert mit Ausnahme Alexa 594

| Sekundärantikörper | Eigenschaften und Verdünnung | Referenz |
|------------------------|--|--|
| α -Kaninchen | Cy3-gekoppelter Antikörper, 1:250 | Jackson Immuno Research Europe, UK |
| α -Kaninchen | Cy2-gekoppelter Antikörper, 1:500 | |
| α -Kaninchen | Alexa 488-gekoppelter Antikörper, 1:500 | |
| α -Kaninchen | Cy5-gekoppelter Antikörper, 1:500 | |
| α -Maus | Cy5-gekoppelter Antikörper, 1:500 | |
| α -Meerschwein | Cy2-gekoppelter Antikörper, 1:500 | |
| α -Meerschwein | Cy3-gekoppelter Antikörper, 1:250 | |
| α -Ratte | Cy3-gekoppelter Antikörper, 1:250 | |
| Ziege- α -Ratte | Alexa 594-gekoppelter Antikörper, 1:500 | |

2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide/Primer sind in Tabelle 2-8 aufgeführt. Selbst designte Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim und Eurogentec, Belgien synthetisiert. Nach deren Lieferung erfolgte die Lösung der Primer in ddH₂O, sodass eine Konzentration von 100 µM resultierte. Danach wurde die Lösung 15 min bei 1400 rpm zentrifugiert sowie bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2-8: Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz 5' → 3' | Spezifizierung/ Verwendung |
|--------------------------------|------------------------|---|
| GAPDH for | GAATCCACCGGCGTCTTTAC | qPCR an OK Zellen |
| GAPDH rev | GTCTTCTGGGTAGCGGTGAT | |
| Slc7a7/γ ⁺ Lat1 for | GCCATCCCTGCTCTTCAATG | |
| Slc7a7/γ ⁺ Lat1 rev | AGGCAGAAGACAATGGGGAA | |
| Slc7a8/Lat2 for | TGGGCCTTGCTCTCATTGTA | |
| Slc7a8/Lat2 rev | TGGTTGGTGGGGTAGATCAC | |
| Lrp2/Megalin for | GGATTCAGGTCTGTGGGTGA | |
| Lrp2/Megalin rev | AAGGTGGGGATATAGGCACG | |
| Slc9a3/NHE3 for | TCTGGGGACTCTTGCTCTTG | |
| Slc9a3/NHE3 rev | AGGACAATGAGCAGAGCACT | |
| Notch1 for | CTCCTCTCCATGCAGCTGTA | |
| Notch1 rev | TGCATGGGAGTTGATCAGGT | |
| Slc5a2/SGLT2 for | AGACATCGTTGTCATCGCTGG | |
| Slc5a2/SGLT2 rev | CATATCATGCTCCTTCCAGCC | |
| TGFβ for | CTACCATGCCAACTTCTGCC | |
| TGFβ rev | CGGCCACATAGTAGACGAT | |
| Megalin Cterm rev | CTATACGTCGGAATCTTCTTT | Sequenzierung (Ratte) |
| CRISPR_LRP2_for | TGGATGCTGTTGCTGGCGATCG | PCR/Sequenzierung; bindet im Exon 1 von <i>Lrp2</i> (Megalin) |
| CRISPR_LRP2_rev | ATCCCTGCAGTCAACTTTTTGG | PCR/Sequenzierung; bindet im Exon 5 von <i>Lrp2</i> (Megalin) |

Die für CRISPR/Cas9 benutzten *single guide* RNAs (sgRNAs) wurden von der Firma Syntego synthetisiert und sind in Tabelle 2-9 aufgelistet. Die Lösung und Einstellung der Konzentration von 60 pmol/ μ l der sgRNAs erfolgte laut Herstellerangaben (siehe auch Kapitel 3.2.10).

Tabelle 2-9: sgRNA-Oligonukleotide

| sgRNA | Sequenz 5' → 3' | Spezifizierung/ Verwendung |
|--------|----------------------|---|
| sgRNA1 | GUUAUCCAGAAUGCGGCAG | binden im Exon 2 von <i>Lrp2</i> (Megalin) |
| sgRNA2 | UUAUCCAGAAUGCGGCAGU | |
| sgRNA3 | GGGAAUUUUCGCUGUGACAA | |

2.8 Bakterienstämme

Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 2-10 aufgeführt.

Tabelle 2-10: *E. coli*-Stämme

| <i>E. coli</i> -Stamm | relevante Eigenschaften und Referenz |
|-----------------------------|---|
| <i>E. coli</i> DH5 α | F-, Φ 80 Δ lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ ⁻ zur Proteinexpression, Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA; Referenz: Invitrogen™/Life Technologies |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , F'[proAB, lacI ^q Z Δ M15, Tn10, (Tet ^R)] zur Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA; Referenz: Agilent Technologies |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> zur Proteinexpression; Referenz: Sigma-Aldrich |

2.9 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2-11 und relevante Eigenschaften sind im Kapitel 3.2.3 aufgeführt.

Tabelle 2-11: Zelllinien

| Zelllinie | Referenz |
|---|---|
| HEK293-EBNA (<i>Human Embryonic Kidney</i>) | Thermo Fisher Scientific/ Invitrogen, München |
| BN16 (<i>Brown Norway</i>) | T. E. Willnow, Max-Delbrück- Centrum, Berlin |
| BN16 LRP2 KO | vorliegende Dissertation |
| MDCKII (<i>Madin Darby Canine Kidney</i>) | F. Jouret, CHU Liège, Belgien |
| OK (<i>Opossum Kidney</i>) | H. Murer, Universität Zürich, Schweiz |
| OK LV +Ind | vorliegende Dissertation |
| OK LV +Ind +GFP | vorliegende Dissertation |
| OK LV +Ind +ZBTB16 | vorliegende Dissertation |
| TAL (<i>Thick Ascending Limb</i>) | N. R. Ferreri, New York Medical College, USA; Eng et al., 2007 |
| TAL LV +Ind | vorliegende Dissertation |
| TAL LV +Ind +GFP | vorliegende Dissertation |
| TAL LV +Ind +ZBTB16 | vorliegende Dissertation |

3. Methoden

3.1 Methoden der Bakterienkultur

3.1.1 *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde kommerziell erhältliches LB-Medium verwendet. Dieses wurde mit destilliertem Wasser hergestellt, auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und autoklaviert.

Für die Herstellung von Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar ergänzt. Vor der Verwendung des Kulturmediums wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

3.1.2 Glyzerin-Dauerkulturen

Aus einer Übernachtskultur wurden 2 ml abzentrifugiert (5000 rpm, RT, 5 min) und das Pellet in 0,5 ml frischem LB-Medium aufgenommen. Im Anschluss wurde diese Bakterien-suspension in einem Kryo-Röhrchen mit 0,5 ml sterilem 50%igem Glyzerin gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Glyzerinkultur wurde mit Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zu Beginn wurde eine Übernachtskultur (180 rpm, 37 °C) durch die Animpfung von 25 ml LB-Medium mit einer zuvor frisch auf einer LB-Platte ausgestrichenen *E. coli*-Einzelkolonie hergestellt. Den darauffolgenden Tag wurden 500 ml LB-Medium mit 20 ml der Übernachtskultur angeimpft und solange bei 180 rpm, 37 °C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht wurde (ca. 1–2 h). Im Anschluss wurde die Kultur für 30 min auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml 0,1 M CaCl₂ gelöst. Die Zellsuspension wurde durch die Zugabe von 0,1 M CaCl₂ auf 250 ml aufgefüllt, für 1 h auf Eis inkubiert und schließlich zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min). Das resultierende Pellet wurde in 20 ml 0,1 M CaCl₂ gelöst und 3 ml Glyzerin hinzugegeben. Dieses Gemisch an kompetenten *E. coli* Zellen wurde zu 650 µl in 1,5 ml

Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Hitzeschock)

Zunächst wurde das SOC-Medium auf 37 °C erwärmt. Für die Transformation wurden 20 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 300–500 ng DNA in einem Eppendorfreaktionsgefäß vorsichtig gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock im Thermomixer für 1 min bei 42 °C. Die Zellen wurden 2 min auf Eis abgekühlt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 300 µl vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde der Zellansatz abzentrifugiert (5000 rpm, RT, 5 min), das erhaltene Pellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium:

2% (w/v) Trypton
20 mM Glukose
0,5% (w/v) Hefeextrakt
10 mM Natriumchlorid
2,5 mM Kaliumchlorid
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Magnesiumsulfat
pH 6,8

3.1.4 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

320 ml LB-Medium wurden mit einer Vorkultur im Verhältnis 1:100 beimpft. Es folgte eine Inkubation für etwa 3 h bei 37 °C und 180 rpm bis eine OD₆₀₀ von 0,5–0,8 erreicht wurde. Anschließend wurde die Flüssigkultur 30 min auf Eis abgekühlt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 4000 x g, 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und pelletiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit 320 ml kaltem sterilem dest. Wasser und es wurde erneut zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min). Dieser Waschschriff wurde zunächst mit 160 ml kaltem dest. Wasser wiederholt und abschließend mit 8 ml 10%igem Glycerin. Das erhaltene Pellet wurde in 1,6 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu je 50 µl aufgeteilt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen (Elektroporation)

Zunächst wurde SOC-Medium auf 37 °C erwärmt und Elektroporationsküvetten auf Eis gekühlt. Die vorbereiteten elektrokompenten Zellen (50 µl Aliquots) wurden auf Eis aufgetaut. Der zu transformierende DNA-Ansatz wurde zusammen mit den Zellen in die vorgekühlte Küvette gegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Vor der Transformation mittels eines elektrischen Pulses (1,5 mm Küvette: 25 µF, 400 Ω und 2,5 kV) wurde sichergestellt, dass die Küvetten trocken sind und sich in richtiger Orientierung im Küvettenhalter befinden. Anschließend folgte der elektrische Puls. Unverzüglich danach wurden die Zellen in 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz von je 20 µl, 200 µl auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Der Rest des 1 ml Zellgemisches wurde abzentrifugiert (5000 rpm, RT, 5 min), das erhaltene Pellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium:

- 2% (w/v) Trypton
- 0,5% (w/v) Hefeextrakt
- 20 mM Glukose
- 10 mM Natriumchlorid
- 2,5 mM Kaliumchlorid
- 10 mM Magnesiumchlorid
- 10 mM Magnesiumsulfat

3.2 Methoden der Zellkultur

3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Verbrauchsmaterialien, wie Zellkulturplatten, -flaschen und -schalen, sowie serologische Pipetten, Pipettenspitzen, Falkonröhrchen und Pasteurpipetten wurden von den Firmen Sarstedt, Greiner bio-one, Corning und Eppendorf bezogen.

Alle verwendeten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchte von 95% kultiviert. In Abhängigkeit verschiedener Zelllinien dienten unterschiedliche Vollmedien als Wachstumsmedium. Eine Beschreibung der verwendeten Zelllinien, die Zusammensetzung der dazugehörigen Vollmedien sowie Kulturhinweise gibt Kapitel 2.9 und Kapitel 3.2.3 wieder.

Alle Zelllinien wurden in 25 cm² (T25) oder 75 cm² (T75) Kulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden 1–2 Mal pro Woche entsprechend ihres Proliferationsverhaltens in unterschiedlichen Konzentrationen passagiert. Für die Subkultivierung wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Nach dem Abnehmen des PBS wurden für T25 2 ml und für T75 4 ml 1-fach Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Sobald sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes ablösten, wurde die Reaktion mit äquivalenten Volumen an Vollmedium abgestoppt. Die Suspension mit den abgelösten Zellen wurde in Falconröhrchen überführt und zentrifugiert (900 rpm, RT, 4 min). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in einem geeigneten Volumen an Vollmedium resuspendiert und die entsprechende Verdünnung in neue Kulturflaschen ausgebracht.

1-fach Trypsin/EDTA:

0,05% Trypsin/0,02% EDTA in PBS

3.2.2 Oberflächenbeschichtung von Zellkulturgefäßen und Deckgläsern

Die Beschichtung der Flächen von Zellkulturgefäßen erfolgte unter sterilen Bedingungen. OK Zellen wurden überwiegend in PDL(Poly-D-Lysin)- und TAL Zellen überwiegend in Kollagen IV-beschichteten Flaschen kultiviert. Sollten Deckgläser mit PDL oder Kollagen IV beschichtet werden, wurden diese zunächst entfettet und autoklaviert. In Ausnahmefällen wurden Deckgläser auch mit Matrigel beschichtet.

Poly-D-Lysin (PDL)

Um zu vermeiden, dass sich einige Zelllinien vom Untergrund der verwendeten Zellkulturgefäße ablösen, wurden die entsprechenden Oberflächen mit 0,002%igen PDL bis zur vollständigen, gleichmäßigen Benetzung überschichtet und 20-30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das PDL abgenommen und 3-mal mit dH₂O gespült. Sobald die beschichteten Materialien unter der Sterilwerkbank getrocknet waren, wurden sie lichtgeschützt bei RT gelagert. Deckgläser wurden standardmäßig mit PDL beschichtet unabhängig der darauf zu kultivierenden Zelllinien.

Kollagen IV

Kollagen IV eignet sich besonders für die Kultur epithelialer Zelllinien und fördert deren Differenzierung. Kollagen IV wurde auf Eis aufgetaut, kurz gemischt und eine Arbeitslösung, die bei 4 °C aufbewahrt wurde, von 10 µg/ml und 50 µg/ml mit PBS hergestellt. Zellkulturgefäße wurden in einer Kollagen IV-Konzentration von 1-2 µg/cm² beschichtet. Dabei wurde das entsprechende Volumen an Arbeitslösung auf die Oberflächen der Zellkulturgefäße gegeben, 1 h bei RT inkubiert, anschließend 2-mal mit dH₂O gewaschen und entweder sofort verwendet oder luftdicht verpackt und bei 4 °C gelagert.

Matrigel

Matrigel eignet sich ebenso wie Kollagen IV für die Kultur epithelialer Zelllinien und fördert deren Differenzierung. Matrigel wurde auf Eis aufgetaut, kurz gemischt und 1:50 mit kaltem PBS verdünnt. Das Gel wurde auf der entsprechenden Oberfläche gleichmäßig verteilt und der Überschuss abgenommen. Auf der Oberfläche verbleibendes Matrigel wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf den frisch beschichteten Materialien ausgesät.

3.2.3 Verwendete Zelllinien

3.2.3.1 HEK293-EBNA (*Human Embryonic Kidney*)

HEK293-EBNA ist eine humane, embryonale Nierenepithelzelllinie, die von der parentalen Zelllinie HEK293 abstammt und stabil das Epstein Barr Virus (EBV) EBNA-1 Gen von pCMV/EBNA exprimiert. Diese Zelllinie wächst als adhärenente Einzelschicht ohne die Fähigkeit eine Zellpolarität auszubilden. Sie eignet sich besonders für die Produktion von Proteinen und ist weniger zur Studie transzellulärer Transportvorgänge geeignet.

Zusammensetzung des Vollmediums:

DMEM high glucose (PAN Biotech; P04-03590) versetzt mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml G418

3.2.3.2 BN16 (*Brown Norway*)

Bei BN16 handelt es sich um eine spontan entwickelte Dottersackkarzinomzelllinie aus der Ratte und wächst als adhärenente Einzelschicht.

Zusammensetzung des Vollmediums:

DMEM high glucose (PAN Biotech; P04-03590) versetzt mit 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus der bereits vorhandenen BN16-Zelllinie eine neue Zelllinie mittels CRISPR/Cas9 etabliert, deren Erzeugung im Kapitel 3.2.10 und 4.1.4 beschrieben ist: **BN16 LRP2 KO**. Hierbei steht LRP2 für Megalin und KO für *knockout*.

3.2.3.3 MDCKII (*Madin Darby Canine Kidney*)

Die MDCKII-Zelllinie ist ein Subklon der MDCK-Zelllinie, die aus dem Sammelrohr der Niere eines Cockerspaniels stammt und starke epitheliale Eigenschaften und somit Zellpolarität aufweist. Die Zellen wachsen als geschlossene, adhärente Einzelschicht.

Zusammensetzung des Vollmediums:

Alpha MEM (LONZA; BE02-002F) versetzt mit 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

3.2.3.4 OK (*Opossum Kidney*)

Diese Zellen stammen einer Nierenepithelzelllinie aus Opossum ab und eignen sich besonders als Modellsystem für den proximalen Tubulus der Niere sowie für transportierende Epithelien. OK Zellen wachsen als geschlossene, adhärente Einzelschicht und wurden standardmäßig auf PDL kultiviert.

Zusammensetzung des Vollmediums:

1:1 Mix aus DMEM high glucose (PAN Biotech; P04-03590) und Ham's F-12 (PAN Biotech; P04-15500) versetzt mit 10% FKS, 2 mM Glutamin, 5 mM HEPES, 1,5 g/L Na₂CO₃, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus der bereits vorhandenen OK-Zelllinie folgende neue Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion etabliert, die im Kapitel 3.2.9 und 4.2.4.1 beschrieben ist: **OK LV +Ind** sowie **OK LV +Ind +GFP** und **OK LV +Ind +ZBTB16**. Dabei steht LV für lentiviral. Die Zusammensetzung des Vollmediums zur Zellkultivierung entspricht der des o. g. OK-Vollmediums unter Verwendung von tetracyclinfreiem FKS (= LV Vollmedium).

3.2.3.5 TAL (*Thick Ascending Limb*)

TAL Zellen leiten sich von Nierenepithelzellen aus der Ratte ab und eignen sich besonders als Modellsystem für den medullären Anteil des geraden aufsteigenden Astes des distalen Tubulus der Niere und für transportierende Epithelien. Diese Zelllinie wächst als geschlossene, adhärente Einzelschicht und wurde standardmäßig auf Kollagen IV kultiviert.

Zusammensetzung des Vollmediums:

1:1 Mix aus DMEM high glucose (PAN Biotech; P04-03590) und Ham's F-12 (PAN Biotech;

P04-15500) versetzt mit 10% FKS, 2 mM Glutamin, 20 ng/ml EGF, 1,5 g/L Na₂CO₃, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus der bereits vorhandenen TAL-Zelllinie folgende neue Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion etabliert, die im Kapitel 3.2.9 und 4.2.4.1 beschrieben ist: **TAL LV +Ind** sowie **TAL LV +Ind +GFP** und **TAL LV +Ind +ZBTB16**. Dabei steht LV für lentiviral. Die Zusammensetzung des Vollmediums zur Zellkultivierung entspricht der des o. g. TAL-Vollmediums unter Verwendung von tetracyclinfreiem FKS (= LV Vollmedium).

3.2.4 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahlen wurden mittels einer Neubauer *improved*-Zählkammer bestimmt, die eine Volumengröße von 0,1 µl pro Zählfeld besitzt. 10 µl der Zellsuspension wurde mit 10 µl Trypanblau gemischt. Auf beiden Seiten des Mittelstegs wurden 10 µl dieser Zellsuspension luftblasenfrei aufgetragen. Die äußersten vier Zählfelder wurden gezählt. Die Ermittlung der Zellzahl/ml erfolgte anhand der Formel:

(Zellzahl in allen vier Zählfeldern : 4) x 2 x 10 000 = Zellzahl/ml

3.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung der Zellen wurden diese eingefroren. Die abtrypsinierten Zellen (5×10^5 – 2×10^7 Zellen) wurden für 4 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde entweder in 1 ml kommerziell erhältlichem serumfreien Einfriermedium (Bambanker) gelöst oder in 0,5 ml Vollmedium resuspendiert und gleiches Volumen an Einfriermedium dazu gegeben. Die Zellsuspension wurde in sterile Kryoröhrchen gegeben und zunächst für 24 h bei -20 °C eingefroren und anschließend für 24–48 h bei -80 °C gelagert. Zum Schluss wurden die Zellen für eine Langzeitlagerung in einen -140 °C Tiefkühlschrank überführt.

Einfriermedium:

80% (v/v) fötales Kälberserum, 20% (v/v) DMSO

3.2.6 Ansetzen von Zellkulturen aus eingefrorenen Zellen

In eine T25 Kulturflasche wurden 3 ml vorgewärmtes Vollmedium vorgelegt. Die in dem Kryoröhrchen befindlichen Zellen wurden möglichst schnell im 37 °C Wasserbad angetaut und sofort in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Vollmedium gegeben. Anschließend wurde zentrifugiert (900 rpm, RT, 4 min). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 2 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde abschließend in die vorbereitete T25 Kulturflasche überführt.

3.2.7 Transfektion von Zellen mittels Kalzium-Phosphat

Die folgende Methodenbeschreibung wurde ausschließlich für die Zelllinie HEK293-EBNA benutzt und ist für diese optimiert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen dahingehend ausgesät, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von etwa 60–80% aufwiesen. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen wurde etwa 90–120 min vor der Transfektion das Vollmedium durch Hungermedium (entspricht Vollmedium ohne FKS) ersetzt. Es wurden zwei 15 ml Falkonröhrchen – A und B – vorbereitet. In das Falkonröhrchen A wurde 2-fach HEBS pipettiert. In das Falkonröhrchen B wurde zuerst DNA gefolgt von TE-Puffer und CaCl_2 -Lösung gegeben und kurz gemischt. Während mittels einer langen Injektionskanüle Luftblasen im 2-fach HEBS des Falkonröhrchens A erzeugt wurden, wurde der Mix aus B tropfenweise hinzugefügt. Um die Bildung des DNA-Kalzium-Phosphat-Komplexes zu ermöglichen, wurde der Transfektionsansatz 20–40 min bei RT inkubiert und anschließend für 2–4 s gevortext, tropfenweise auf das Zellkulturmedium der Zellen gegeben und mittels leichtem Schwenken gleichmäßig in dem Zellkulturmedium verteilt. Nach 36–48 h der Zellkultivierung wurde das Medium gewechselt. 48–72 h post Transfektion wurden die Zellen mittels gewünschter Methode analysiert.

Sobald die Lösungen neu angesetzt oder länger nicht benutzt wurden, erfolgte stets ein Test für die optimale Dauer der Bildung des DNA-Kalzium-Phosphat-Komplexes mittels einer Transfektion mit GFP.

Beispiel für 6 cm Zellkulturschale

Röhrchen A: 250 μl 2-fach HEBS

Röhrchen B: 6 μg DNA, auf 250 μl Gesamtvolumen mit TE-Puffer auffüllen, 25 μl CaCl_2 -Lösung

Beispiel für T75 Kulturflasche

Röhrchen A: 500 µl 2-fach HEBS

Röhrchen B: 12 µg DNA, auf 500 µl Gesamtvolumen mit TE-Puffer auffüllen, 50 µl CaCl₂-Lösung

2-fach HEBS Puffer:

274 mM Natriumchlorid
10 mM Kaliumchlorid
1,4 mM Dinatriumhydrogenphosphat
10 mM Dextrose
42 mM HEPES
pH 7,2

CaCl₂-Lösung:

2,5 M Kalziumchlorid in 10 mM HEPES
pH 7,2

1-fach TE-Puffer:

5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
2 ml 250 mM EDTA (pH 8,0)
auf 500 ml Gesamtvolumen ergänzt mit pH 7,3

3.2.8 Transfektion von Zellen mittels Xfect™

MDCKII Zellen wurden mithilfe des Transfektionsreagenz Xfect™ (Takara) entsprechend der Herstellervorgaben transient transfiziert. Das Reagenz erleichtert die Aufnahme der gewünschten DNA in die Zellen unter anderem durch Bildung kompakter DNA-Nanopartikel-Komplexe. Für Kolokalisationsstudien, die eine Transfektion mit Megalin Mini-Rezeptor 2(MMR2)-Konstrukten erforderten, wurden 6-well Platten verwendet. In jeder Vertiefung lag ein PDL-beschichtetes Deckglas. Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen dahingehend ausgebracht, dass zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 60–80% erreicht war. MDCKII Zellen wurden stets über Nacht (ü. N.) mit dem Transfektionsansatz, der 6 µg DNA enthielt, inkubiert. 48–72 h post Transfektion wurden die Zellen immunhistochemisch (siehe 3.2.12) analysiert. Bis zur Analyse wurden sie 4–5-mal am Tag für 10 min, RT auf einen Orbitalschüttler bei 1 Hz zur Verbesserung der Differenzierung gestellt.

3.2.9 Transduktion von OK und TAL Zellen mittels lentiviraler Vektoren

Für die Transduktion von OK und TAL Zellen wurden rekombinante replikationsresistente lentivirale Vektoren benutzt. Diese wurden von Dr. Emmanuel Di Valentin (Universität Liège, GIGA-Viral Vectors Platform) mittels des ViraSafe™ Lentivirus Packaging Systems von Pantropic generiert. Die Infektion mit den hergestellten Lentiviren erfolgte nacheinander und nicht als Doppeltransduktion. Das heißt, es wurde zunächst eine stabile Zelllinie, die nur EF1a TET3G in das Genom integrierte, hergestellt und wird im Weiteren als „*Inducer*“ bzw. „+Ind“ bezeichnet. Der Vektor EF1a TET3G kodiert zusätzlich für die Resistenz gegenüber Hygromycin. Anschließend wurde die Zelllinie +Ind durch eine zweite Transduktion mit TRE3G EmGFP bzw. TRE3G hPLZF verändert. Erstere doppeltransduzierte Zelllinie wird im Weiteren als „+Ind +GFP“ bezeichnet und diente als Fluoreszenz-Transduktionskontrolle. Letztere Zelllinie wird als „+Ind +ZBTB16“ bezeichnet. *EmGfp* und *Zbtb16* stehen unter der Kontrolle des TRE3G-Promotors. Am TRE3G-Promotor findet die Initiation der Transkription von *EmGfp* und *Zbtb16*, sobald das sogenannte Transaktivatorprotein (+Ind) aktiv ist und daran binden kann, statt. Durch die Gabe von Doxycyclin (Dox) – ein Tetracyclin-Analoga – kommt es zur Aktivierung von +Ind und nachfolgend zur Überexpression der beiden Zielgene *EmGfp* und *Zbtb16*.

Zunächst wurden Zellen mit niedrigster Passage aufgetaut. Einen Tag vor Transduktion wurden die Zellen in einer PDL-beschichteten 24-well Platte ausplattiert, sodass sie eine Konfluenz von etwa 50–70% zum Transduktionszeitpunkt aufwiesen. Ein well diente als Negativkontrolle und ein anderes als Positivkontrolle hinsichtlich der späteren Antibiotikaselektion mittels Hygromycin. Ein drittes well diente der Transduktion mit dem *Inducer*. Für die Transduktion wurde das Virus langsam auf Eis aufgetaut und in Eppendorfreaktionsgefäßen wurden folgende Transduktionsansätze hergestellt:

- | | | | |
|---|---|---|--|
| ① | 490 µl LV Vollmedium 10 µl DEAE-Dextran (6 µg/ml) Negativkontrolle | ② | 490 µl LV Vollmedium 10 µl DEAE-Dextran (6 µg/ml) Positivkontrolle |
| ③ | 7 µl <i>Inducer</i> 483 µl LV Vollmedium 10 µl DEAE-Dextran (6 µg/ml) | | |

Ansatz 1 und 2 enthielten keine Viruspartikel und dienten für die o.g. Antibiotikaselektion mittels Hygromycin. Die Zellen wurden für 8 h unter Standardkulturbedingungen mit den jeweiligen Transduktionsansätzen kultiviert. Danach wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und in frischem LV Vollmedium weiterkultiviert. Etwa 36 h später wurden die Zellen

entsprechend Kapitel 3.2.1 abgelöst und auf eine 6-well Platte überführt (Abb. 3-1). Der Negativkontrolle wurde kein Hygromycin, den beiden anderen wurde Hygromycin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt und die Zellen über 10 Tage selektiert. Täglich erfolgte die visuelle Kontrolle der Toxizitätswirkung von Hygromycin anhand der Negativ- und Positivkontrolle und alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Nach etwa 7–8 Tagen konnten keine vitalen Zellen in der Positivkontrolle (ohne *Inducer*, mit Hygromycin) festgestellt werden. Nach der Selektion wurde ein Teil der generierten Zelllinie „+Ind“ für eine zweite Transduktion mit den ZBTB16- und GFP-Lentiviren analog zu erster Transduktion verwendet. Der übrige Teil wurde auf eine T25 Kulturflasche überführt, expandiert und kryokonserviert. Diese Zelllinie diente zudem als Referenz in Versuchen. Einen schematischen Überblick des Transduktionsablaufes zeigt Abbildung 3-1.

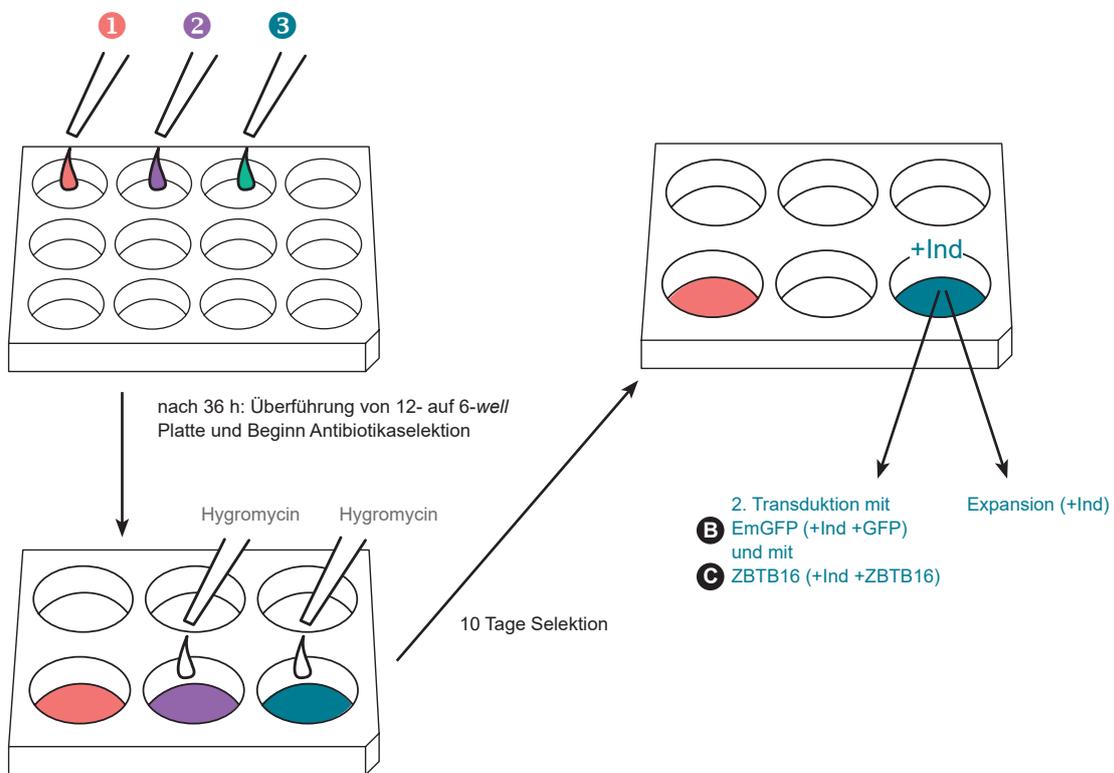


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Transduktion von OK und TAL Zellen mit Lentiviren.

Für die zweite Transduktion der Zelllinie „+Ind“ mit TRE3G EmGFP („+Ind +GFP“) bzw. TRE3G hPLZF („+Ind +ZBTB16“) wurde generell genauso verfahren wie bei der ersten. Unterschiede hierbei waren die Transduktionsansätze:

- | | |
|--|--|
| <p>A 490 µl LV Vollmedium 10 µl DEAE-Dextran (6 µg/ml) Kontrolle</p> | <p>B 7 µl EmGFP 483 µl LV Vollmedium 10 µl DEAE-Dextran (6 µg/ml) wird zu +Ind +GFP</p> |
| <p>C 7 µl ZBTB16 483 µl LV Vollmedium 10 µl DEAE-Dextran (6 µg/ml) wird zu +Ind +ZBTB16</p> | |

Nach erfolgter Transduktion wurden die Zellen unter wiederholter Hygromycingabe weiter kultiviert und zunächst auf eine 6-*well* Platte überführt, gefolgt von einer T25 und T75 Kulturflasche. Hierbei wurde dem LV Vollmedium bei jeder Subkultivierung Hygromycin zugegeben, bei einem Mediumwechsel nicht. Vor der Kryokonservierung der Zelllinien wurde die Induktion der Zielgene *Zbtb16* und *Gfp* durch Zugabe von Dox in das Zellkulturmedium auf immunzytochemischer und proteinbiochemischer Ebene überprüft.

3.2.10 Gen-*knockout* von BN16 Zellen mittels CRISPR/Cas9

Zur Erzeugung von BN16-Megalin-*knockout* (BN16 LRP2 KO) Zelllinien wurde das Gene Knockout Kit v2 von Synthego benutzt. Dieses beinhaltet drei spezifisch gegen *Megalin* (Ratte) gerichtete *single guide*(sg)RNAs, die laut Herstellerangaben gelöst und auf eine Konzentration von 60 pmol/µl eingestellt wurden. Die Transfektion erfolgte mittels des Neon Transfektion Systems von Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, welches über einen elektrischen Puls (Elektroporation) arbeitet.

Für die Elektroporation von BN16 Zellen mit dem Ribonukleoprotein (RNP)-Cas-Komplex wurde eine Kombination aus dem Protokoll von Synthego und dem Protokoll von Neon genutzt und wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt.

Zunächst wurden Zellen mit niedrigster Passage aufgetaut. 1–2 Tage vor Transfektion wurden BN16 Zellen dahingehend ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70–80% aufwiesen. Für die Transfektion wurde in eine 24-*well* Platte 0,5 ml/*well* BN16-Vollmedium ohne Antibiotika vorgelegt und bei 37 °C im Brutschrank vorgewärmt. BN16 Zellen wurden entsprechend Kapitel 3.2.1 abtrypsiniert und mittels Neubauer *improved*-Zählkammer (siehe 3.2.4) gezählt. 150 000 BN16 Zellen wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert (4 min, RT, 900 rpm). Das Pellet wurde 1-mal mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 2,5 µl Puffer R gelöst. Die Elektroden-Küvette des Neon-Transfektionsgerätes wurde mit 3 ml Puffer E (für 10 µl Tips) befüllt. Die in Puffer R

gelösten 150 000 Zellen wurden zu folgendem Reaktionsansatz gegeben. Der Reaktionsansatz wurde zuvor für 10–60 min bei RT in einem Eppendorfreaktionsgefäß inkubiert, um die Bildung des RNP-Cas-Komplexes zu gewährleisten:

Reaktionsansatz:

6 µl Puffer R

0,5 µl sgRNA1 (60 pmol/µl)

0,5 µl sgRNA2 (60 pmol/µl)

0,5 µl sgRNA3 (60 pmol/µl)

0,5 µl Cas-Enzym

zuletzt Zugabe 2,5 µl Zellen (150 000)

Dieser Zell-Ansatz wurde einem Stromstoß mit einer Pulsstärke: 1100, einer Pulslänge: 40 und einer Pulsanzahl: 1 unterzogen. Diese drei elektrischen Parameter mussten zuvor mittels GFP ermittelt werden (siehe Ergebnisse Kapitel 4.1.4). Die Zellen wurden unverzüglich in die 24-*well* Platte mit vorgewärmtem Medium gegeben, darin resuspendiert und ü. N. unter Standardkulturbedingungen inkubiert. 24 h nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit BN16-Vollmedium mit Antibiotika. Sobald die Zellen in der 24-*well* Platte konfluent waren, wurde eine *limited dilution* (siehe 3.2.11) durchgeführt um *single*-Klone zu erhalten.

3.2.11 Isolation von Zellklonen mittels *limited dilution*

Um einzelne Zellklone zu isolieren wurde die Methode der *limited dilution* (Grenzverdünnung) angewandt. Hierfür wurden die Zellen abgelöst und eine Konzentration von 5 Zellen/ml Vollmedium eingestellt. Davon wurden in jede Vertiefung einer 96-*well* Platte 200 µl pipettiert, sodass sich statistisch 1 Zelle in einem *well* befindet. Nach 16–24 h Kultivierung der Platte wurde jedes *well* lichtmikroskopisch untersucht und nur die *wells* weiterkultiviert und zu einer monoklonale Zelllinie expandiert, die tatsächlich 1–2 Zellen enthielten.

3.2.12 Immunzytochemie (ICC)

Zur Analyse von Zellen und deren Eigenschaften diente die Immunzytochemie (ICC) in Form von Immunfluoreszenz. Hierfür wurden Zellen, wenn nicht anders angegeben, auf PDL beschichteten Deckgläsern in einer 6- oder 12-*well* Platte ausgesät, kultiviert und entsprechender Versuchsbedingungen behandelt. Bevor die Zellen fixiert wurden, wurden sie 2-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser vorsichtig aus der *well* Platte mittels einer Pinzette herausgenommen und auf einem Streifen Parafilm, der auf einem Objektträger

platziert war, transferiert. Wie auch bei der Immunhistochemie (siehe 3.5.3 und 3.5.4) erfolgten alle weiteren Schritte in einer geschlossenen, dunklen Feuchtigkeitskammer und auf einem Schüttler um eine gleichmäßige Benetzung zu gewährleisten. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% PFA in PBS, RT, 10 min. Die Zellen wurden danach 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei RT mit einer 0,5%iger Triton X-100 in PBS Lösung. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit PBS wurden die Zellen 1 h bei RT in einer Blocklösung inkubiert. Nach Abnahme der Blocklösung wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Primärantikörper für 1 h bei RT und anschließend bei 4 °C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst für 20 min bei RT äquilibriert und 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen bevor der fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper für 2 h bei RT auf die Zellen gegeben wurde. Nach Inkubation des Sekundärantikörpers wurden die Zellen 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Entweder es schloss sich eine weitere Inkubation mit einem zweiten Primärantikörper (Doppelfärbung) oder einem dritten Primärantikörper (Dreifachfärbung) mit entsprechend kompatiblen Sekundärantikörpern unter gleichen Bedingungen an oder eine abschließende Zellkernfärbung. Hierfür wurde eine DAPI-Stamm-lösung (1mg/ml DAPI in PBS) im Verhältnis 1:10 000 in PBS verdünnt und die Zellen für 10 min bei RT damit inkubiert. Nach der Zellkernfärbung wurden die Zellen kurz mit PBS gespült und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten in ca. 10 µl eines 1:1 Mixes aus Glycerin und PBS eingedeckt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Präparate bei 4 °C dunkel gelagert.

3.2.13 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen

Zur Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR) von OK und TAL Zellen wurde das Extracellular Oxygen Consumption Assay Kit von Abcam entsprechend der Herstellerangaben angewendet. Vor Anwendung des Kits wurden die Kultivierungsbedingungen von OK und TAL Zellen dahingehend geändert, dass die Differenzierung der Zellen zu einem noch physiologischeren Phänotyp vorangetrieben wurde. Hierfür wurden die Zellen folgender Vorbehandlung unterzogen:

- 0 h/Tag 0: Aussaat von 40 000 Zellen/*well* in einer 96-*well* Platte in Vollmedium und Kultivierung unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte).
- 24 h später/Tag 1: Die Zellplatte wurden auf einen Orbitalschüttler überführt und bei 1 Hz bis zur Sauerstoffverbrauchsmessung weiter kultiviert.
- 48 h später/Tag 2: Die Zellen wurden 1-mal mit PBS gewaschen und in 70 µl Niedrigglukose-Medium (DMEM [GIBCO; A1443001] versetzt mit 1 g/L Glukose, 3,7 g/L Natriumbikarbonat, 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und

100 µg/ml Streptomycin) ohne und mit 1 µg/ml Doxycyclin im Medium weiterkultiviert.

72 h später/Tag 3: Die Zellen wurden 1-mal mit PBS gewaschen und in 70 µl Niedrigglukose-Medium ohne Doxycyclin weiterkultiviert.

96 h später/Tag 4: Die Zellen wurden 1-mal mit PBS gewaschen und in 70 µl glukosefreiem Medium (DMEM [GIBCO; A1443001] versetzt mit 2,2 g/L Natriumbikarbonat, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) für 24 h weiterkultiviert.

120 h später/Tag 5: Durchführung der Sauerstoffverbrauchsmessung: Mittels eines Plattenlesegerätes wurde die Fluoreszenz des im Puffermedium enthaltenen Farbstoffs, der eine Anregungs- und Emissionswellenlänge von 380 nm bzw. 650 nm besitzt, gemessen. Die Fluoreszenz des Farbstoffs ist durch vorhandenen Sauerstoff unterdrückt (*quenching*). Durch die mitochondriale Atmung kommt es zur Reduktion des Sauerstoffs im Puffermedium, wodurch das *quenching* des Fluoreszenzfarbstoffs reduziert wird und das Fluoreszenzsignal steigt. Die Messung erfolgte in Vollmedium und als Doppelbestimmung bei 37 °C, alle 90 s für 4 h. Als Positivkontrolle diente das Enzym Glukoseoxidase, als Negativkontrolle Antimycin. Alle Messwerte wurden mittels einer Leerprobe gegengerechnet.

Die Auswertung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte durch die Ermittlung des Anstiegs „*m*“ im linearen Bereich des Graphen durch Berechnung der Regressionsgerade.

3.2.14 Bestimmung der Glykolyseaktivität von Zellen

Zur Bestimmung der Glykolyseaktivität von OK und TAL Zellen wurde das Glycolysis Assay (Extracellular Acidification) Kit von Abcam entsprechend der Herstellerangaben angewendet. Hierbei wird die extrazelluläre Ansäuerungsrate (*extracellular acidification rate*, ECAR) im Medium gemessen, die vor allem durch eine Laktatproduktion der Zellen geschieht. Vor Anwendung des Kits wurden OK und TAL Zellen wie unter 3.2.13 beschrieben kultiviert und 2–3 h vor der Messung erfolgte eine Kultivierung ohne CO₂. Mittels eines Plattenlesegerätes wurde die Fluoreszenz des im Glykolyse-Reagenz enthaltenen Farbstoffs, der eine Anregungs- und Emissionswellenlänge von 380 nm bzw. 615 nm besitzt, gemessen. Der Fluoreszenzfarbstoff ist pH-sensitiv und zeigt mit zunehmender Ansäuerung des Puffermediums eine Zunahme der Emission. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung bei 37 °C, alle 90 s für 4 h. Als Positivkontrolle diente das Enzym Glukoseoxidase, als Negativkontrolle Oxamidsäure. Alle Messwerte wurden mittels einer Leerprobe gegengerechnet.

Die Auswertung der Glykolyseaktivität erfolgte durch die Ermittlung des Anstiegs „*m*“ im linearen Bereich des Graphen durch Berechnung der Regressionsgeraden.

3.2.15 Bestimmung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit von OK Zellen wurde das Kit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay von Promega entsprechend der Herstellerangaben verwendet. In einer 96-well Platte wurden 1×10^4 OK LV Zellen ohne und mit 5 µg/ml Doxycyclin ausgebracht. 24 h später erfolgte die Zugabe von 100 µl Reagenz. Nach 90-minütiger Inkubation der Zellen erfolgte die Messung. Jede Probe wurde als Duplikat gemessen.

3.3 Gentechnische Methoden

3.3.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mithilfe des NucleoBond Xtra Midi Kits und des GeneJET Plasmid Miniprep Kits wurde Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterienkulturen isoliert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte laut Herstellerangaben.

3.3.2 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg und der Firma Genewiz, Leipzig mit entsprechenden Primern (Oligonukleotiden) durchgeführt.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop® ND-1000 kann auf schnelle Weise die DNA-Konzentration gemessen werden. Dabei erfolgt die photometrische Detektion der UV-Absorption bei 260 nm. Als Nullwert dienen stets 2 µl des Lösungsmittels der DNA-Probe. Da es zu einer Überlagerung der Absorptionsspektren von DNA und Proteinen kommt, wird zusätzlich das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm berechnet. Eine DNA-Lösung mit Quotient von etwa 1,8 gilt als rein. Die Messung von RNA erfolgte mit dem Gerät Epoch. Auch hier diente das Lösungsmittel der RNA-Probe als Nullwert und eine RNA-Lösung mit Quotient von etwa 2,0 gilt als rein.

3.3.4 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA wurde das Kit NucleoSpin RNA/Protein von Macherey-Nagel verwendet. Dieses wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten konfluente T25 Kulturflaschen, was einer Zellzahl von etwa $3,5\text{--}5 \times 10^6$ Zellen entspricht. Vom erhaltenen Eluat wurde die Konzentration der RNA bestimmt (siehe 3.3.3) und die RNA bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Um Verunreinigungen der RNA durch genomische DNA zu verhindern, wurde ein DNA-Verdau mittels des Kits von Sigma-Aldrich mit DNase I laut Herstellerangaben durchgeführt und ist Tabelle 3-1 zu entnehmen. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Stop-Reagenz ($1,5\text{ }\mu\text{l}$) hinzugefügt und bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlphase erfolgte das sofortige Umschreiben des gesamten Ansatzes ($16,5\text{ }\mu\text{l}$) mit der darin enthaltenen isolierten RNA in cDNA (siehe 3.3.5).

Tabelle 3-1: Pipettierschema für den Verdau von genomischer DNA mit DNase I

| Komponente | Volumen im Ansatz |
|-----------------------------|--|
| RNA | 1 μg |
| 10x DNase I-Reaktionspuffer | 1,5 μl |
| DNase I | 1,5 μl |
| ddH ₂ O | auf 15 μl Gesamtvolumen ergänzt |

3.3.5 cDNA-Synthese

Die gesamte, im Kapitel 3.3.4 beschriebene, isolierte RNA ($\sim 1\text{ }\mu\text{g}$), wurde entsprechend der Tabelle 3-2 in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 3-2: Pipettierschema für das Umschreiben von RNA in cDNA

| Komponente | Volumen im Ansatz |
|--|--|
| gesamter RNA-Ansatz aus Punkt 3.3.4 | 16,5 μl |
| 5x M-MLV Reverse Transkriptase-Reaktionspuffer | 6,0 μl |
| 10 mM dNTP-Mix | 1,5 μl |
| Random Hexamer Primer | 1,5 μl |
| M-MLV Reverse Transkriptase | 1,6 μl |
| ddH ₂ O | auf 30 μl Gesamtvolumen ergänzt |

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler wie folgt inkubiert: 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.6 PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie der FIREPol-DNA-Polymerase durchgeführt. In Ausnahmefällen wurde die Q5-Polymerase verwendet. Letztere verfügt über eine 3'→5' Exonukleaseaktivität (*proofreading*), weswegen sie im Vergleich zur FIREPol-Polymerase eine geringere Fehlerrate in der Synthese des DNA-Gegenstranges aufweist. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O eingesetzt. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.9). Wurden die PCR-Produkte sequenziert, erfolgte deren Reinigung Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience) laut Herstellangaben.

PCR mit FIREPol-Polymerase

Es wurden 15 µl Ansätze verwendet, deren Zusammensetzung der Tabelle 3-3 zu entnehmen ist. Des Weiteren sind in Tabelle 3-4 die entsprechenden PCR-Parameter aufgeführt.

Tabelle 3-3: Pipettierschema für die PCR mit FIREPol-Polymerase

| Komponente | Volumen im Ansatz |
|---------------------------------|---------------------------------|
| template-DNA (1 µg/µl) | 1,0 µl |
| 25 mM MgCl ₂ | 1,2 µl |
| 10x FIREPol-Reaktionspuffer B | 1,5 µl |
| 10 µM Primer _{for} | 0,375 µl |
| 10 µM Primer _{rev} | 0,375 µl |
| dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid) | 0,5 µl |
| FIREPol-DNA-Polymerase (5 U/µl) | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | auf 15 µl Gesamtvolumen ergänzt |

Tabelle 3-4: PCR-Parameter für FIREPol-Polymerase

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|------------------------|------------|-------|------------|
| initiale Denaturierung | 95 °C | 5 min | 1 |
| Denaturierung | 95 °C | 20 s | 35 |
| Annealing | 52 °C | 30 s | |
| Elongation | 70 °C | 30 s | |
| finale Elongation | 70 °C | 7 min | 1 |

PCR mit Q5-Polymerase

Es wurden 50 µl Ansätze verwendet, deren Zusammensetzung der Tabelle 3-5 zu entnehmen ist. Des Weiteren sind in Tabelle 3-6 die entsprechenden PCR-Parameter aufgeführt.

Tabelle 3-5: Pipettierschema für die PCR mit Q5-Polymerase

| Komponente | Volumen im Ansatz |
|-----------------------------|---------------------------------|
| template-DNA (1 ng/µl) | 1,5 µl |
| 5x Q5 Reaktionspuffer | 10,0 µl |
| 5x Q5 High GC Enhancer | 10,0 µl |
| 10 µM Primer _{for} | 2,5 µl |
| 10 µM Primer _{rev} | 2,5 µl |
| dNTP-Mix | 1,0 µl |
| Q5-DNA-Polymerase (2 U/µl) | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | auf 50 µl Gesamtvolumen ergänzt |

Tabelle 3-6: PCR-Parameter für Q5-Polymerase

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|------------------------|------------|-------|------------|
| initiale Denaturierung | 98 °C | 3 min | 1 |
| Denaturierung | 98 °C | 10 s | 35 |
| Annealing | 55 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 18 s | |
| finale Elongation | 72 °C | 5 min | 1 |

3.3.7 Real-time quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System durchgeführt. Hierbei wurden 20 µl Ansätze verwendet, deren Zusammensetzung der Tabelle 3-7 zu entnehmen ist. Des Weiteren sind in Tabelle 3-8 die entsprechenden PCR-Parameter aufgeführt, wobei die *annealing* Temperatur primerspezifisch war und in der Tabelle 3-9 ersichtlich ist (Sequenzen der Oligonukleotide siehe Tabelle 2-8). Jede Probe wurde als Duplikat analysiert. Als Negativkontrolle wurde stets ddH₂O an Stelle von cDNA benutzt. Die Normalisierung der qPCR erfolgte mittels des *housekeeping* Gens *Gapdh*. Die Änderung der Genexpressionslevel wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechnet.

Tabelle 3-7: Pipettierschema für die PCR

| Komponente | Volumen im Ansatz |
|---|---------------------------------|
| cDNA | 2,0 µl |
| 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus | 4,0 µl |
| 10 µM Primer _{for} | 0,3 µl |
| 10 µM Primer _{rev} | 0,3 µl |
| ddH ₂ O | auf 20 µl Gesamtvolumen ergänzt |

Tabelle 3-8: PCR-Parameter I

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklenzahl |
|------------------------|---------------------|--------|------------|
| initiale Denaturierung | 95 °C | 12 min | 1 |
| Denaturierung | 95 °C | 15 s | 40 |
| Annealing | 59 °C, 62 °C, 63 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 30 s | |
| finale Elongation | 72 °C | 5 min | 1 |

Tabelle 3-9: PCR-Parameter II

| Gen | Amplikonlänge | <i>annealing</i> Temperatur |
|------------------------|---------------|-----------------------------|
| <i>Gapdh</i> | 271 bp | 63 °C |
| <i>Slc7a7</i> (γ+Lat1) | 200 bp | 62 °C |
| <i>Slc7a8</i> (Lat2) | 189 bp | 59 °C |
| <i>Lrp2</i> (Megalin) | 266 bp | 62 °C |
| <i>Slc9a3</i> (NHE3) | 241 bp | 62 °C |
| <i>Notch1</i> | 170 bp | 59 °C |
| <i>Slc5a2</i> (SGLT2) | 120 bp | 63 °C |
| <i>Tgfb</i> | 168 bp | 63 °C |

3.3.8 RNAscope®

RNAscope ist eine Technik um einzelne RNA-Moleküle mittels *in situ* Hybridisierung in Zellen zu visualisieren. Hierfür wurde das RNAscope® System von Advanced Cell Diagnostics Bio-Techne verwendet. 5 µm Paraffinschnitte wurden laut Herstellerangaben mit RNAscope® 2.5 HD Reagent Kit red und der RNAscope® Sonde Mm Ldc1 (Katalognummer 684121), die gegen *Ldc1*-RNA-Moleküle gerichtet ist, gefärbt. Nach mehreren Schritten der Signalamplifikation, Hintergrundreduktion und Färbung wurden die Schnitte vorübergehend in PBS gelagert bevor sie immunhistochemisch (siehe 3.5.3 und 3.5.4) mit Megalin gefärbt und mikroskopisch ausgewertet wurden.

3.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Um Nukleinsäuren der Größe nach zu trennen, zu identifizieren und zu isolieren, wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Die Agarosekonzentration wurde entsprechend der zu untersuchenden Fragmentgrößen eingestellt. Im Allgemeinen betrug der Agarosegehalt 1% (w/v) in 1-fach TAE-Puffer. Zur Herstellung des Gels wurde die benötigte Menge an Agarose abgewogen, in adäquates Puffer-Volumen gegeben und bis zum vollständigen Lösen aufgekocht. Die flüssige Agarose wurde mit 0,06 µl/ml peqGREEN versetzt, zügig in einen mit Probenkamm versehenen Gelträger gegossen und nach vollständiger Polymerisation in die Elektrophoresekammer gesetzt. Das Gel wurde mit 1-fachem TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Vor dem Probenauftrag erfolgte die Zugabe von 6-fachen DNA-Ladepuffer zu jeder Probe. Um einen Rückschluss auf die Größe der aufgetragenen Nukleinsäuren zu ziehen, wurde zusätzlich ein geeigneter Größenstandard mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 7–10 Volt je cm Elektrodenabstand und wurde erst beendet, wenn die Bromphenolblaulauffront des Ladepuffers sich kurz vor Ende des Gelrands befand. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mittels Fusion SL dokumentiert.

1-fach TAE-Puffer:

40 mM Tris
0,1% Eisessig
1 mM EDTA
pH 8,0

3.3.10 Verdauung von DNA mithilfe von Restriktionsenzymen

Für Transfektionen (siehe 3.2.7 und 3.2.8) wurden die entsprechenden Plasmide aus *E. coli* isoliert (siehe 3.3.1) und anhand ihres Restriktionsmusters geprüft. Für die Kontrollverdaue wurden 10 µl Ansätze genutzt, die sich aus 1 µg DNA, 1/10 Volumen 10-fachen Restriktionspuffer und 1 µl (10 U) Restriktionsendonuklease zusammensetzten. Der sich daraus ergebende Teil ddH₂O wurde stets als erstes vorgelegt, die Enzymzugabe erfolgte zum Schluss. Dieser Restriktionsansatz wurde 2 h bei 37 °C im Thermomixer inkubiert, sofern die Endonuklease keine anderen Bedingungen verlangte. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Gemisch entweder bei -20 °C gelagert oder das Enzym im Thermomixer hitzeinaktiviert. Die Dauer und Temperatur der Hitzeinaktivierung war dabei enzyspezifisch. Mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.3.9) wurde die Restriktion überprüft.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Isolation von GST- und His-Fusionsproteinen aus *E. coli* Zellen

Nach erfolgter Transformation von Plasmiden mittels Elektroporation oder Hitzeschock in *E. coli* wurden zunächst 5–10 Einzelklone anhand einer Proteinexpression in kleinem Maßstab („Mini-Expression“) analysiert. Im weiteren Schritt wurde eine Proteinexpression in großem Maßstab („Maxi-Expression“) mit dem entsprechend als positiv identifizierten Klon durchgeführt.

„Mini-Expression“

Eine 3 ml Vorkultur je Klon wurde angeimpft und diese über Nacht bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Hauptkulturen im Verhältnis 1:10 mit der Vorkultur angeimpft und solange bei 37 °C, 180 rpm inkubiert bis sich eine OD₆₀₀ von 0,6–0,8 einstellte (ca. 1–2 h). Durch Zugabe der entsprechende Menge an IPTG (siehe Tabelle 3-10) wurde die Expression der Fusionsproteine induziert. Eine 4–5-stündige Inkubation bei 37 °C und 180 rpm folgte. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min), die Pellets in 900 µl kaltem PBS inklusive Protease-IH aufgenommen, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Sonifikationsrunden à 5 s und 70% Amplitude. Nach Zugabe von 100 µl 10%igem Triton X-100 in PBS wurden die Ansätze für 40–60 min auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (13 000 rpm, 4 °C, 15 min). Die Überstände wurden in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Sowohl Pellet (= unlösliche Fraktion) als auch Protein-Rohextrakt (= lösliche Fraktion) wurden für weitere Analysen mittels SDS-PAGE und Western Blot in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Nach erfolgter Analyse und Identifikation positiver Klone erfolgte eine Zeitreihe der IPTG-Induktion um ein optimales Verhältnis aus Induktionsdauer und maximaler Proteinsynthese zu ermitteln. Hierbei wurde eine 5 ml Vorkultur mit dem positiv identifizierten Klon angeimpft und diese über Nacht bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde eine 50 ml Hauptkultur im Verhältnis 1:10 mit der Vorkultur angeimpft und solange bei 37 °C, 180 rpm inkubiert bis sich eine OD₆₀₀ von 0,6–0,8 einstellte (ca. 1–2 h). Durch Zugabe der entsprechende Menge an IPTG (siehe Tabelle 3-10) wurde die Expression der Fusionsproteine induziert. Es folgte eine 5-stündige Inkubation bei 37 °C, 180 rpm und nach jeweils 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h wurden 5 ml von der Hauptkultur abgenommen und damit eine IPTG-Zeitreihe bestimmt. Anschließend wurden die Proben bei 5000 rpm, 4 °C, 10 min abzentrifugiert und die Pellets wie unter o. g. „Mini-Expression“ beschrieben aufgearbeitet. Folgte kein sofortiger Zellaufschluss der pelletierten Zellen, wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

„Maxi-Expression“

Mittels einer 100 ml LB_{Amp}-Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Klons wurde eine 1000 ml Hauptkultur im Verhältnis 1:10 angeimpft. Diese wurde solange bei 37 °C, 180 rpm inkubiert bis sich eine OD₆₀₀ von 0,6–0,8 einstellte (ca. 3–4 h). Durch Zugabe der entsprechenden Menge an IPTG (siehe Tabelle 3-10) wurde die Expression der Fusionsproteine induziert. Eine weitere Inkubation bei 37 °C und 180 rpm folgte. Hierbei richtete sich die Induktionsdauer nach der zuvor empirisch ermittelten Dauer mittels der IPTG-Zeitreihe. Anschließend wurde die gesamte Kultur bei 5000 rpm, 4 °C, 10 min abzentrifugiert. Folgte kein sofortiger Zellaufschluss der pelletierten Zellen, wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zellaufschluss der „Maxi-Expression“

Um die Degradation des zu isolierenden Zielproteins während des Zellaufschlusses zu verhindern wurde stets auf Eis und mit vorgekühlten Arbeits- bzw. Reaktionsgefäßen und Lösungen gearbeitet.

Das Pellet wurde in 10 ml kaltem PBS inklusive Protease-IH aufgenommen, in ein 50 ml Falkonröhrchen überführt, und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten drei Sonifikationsrunden entsprechend dem u. g. Schema. Nach Zugabe von 1 ml 10%igem Triton X-100 in PBS wurden die Ansätze für 40–60 min auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (13 000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Sowohl Pellet (= unlösliche Fraktion) als auch Protein-Rohextrakt (= lösliche Fraktion) wurden für weitere Analysen mittels SDS-PAGE und Western Blot in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Sonifikationsschema:

1. Runde: 10 s à 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% und 80% Amplitude, zwischen jeder Amplitudenstufe erfolgte eine Pause von 2 min auf Eis
2. Runde: 10 s à 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% und 80% Amplitude, zwischen jeder Amplitudenstufe erfolgte eine Pause von 2 min auf Eis
3. Runde: 10 s à 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% und 100% Amplitude, zwischen jeder Amplitudenstufe erfolgte eine Pause von 2 min auf Eis

Tabelle 3-10: Verwendete *E. coli*-Stämme zur Produktion von GST- und His-Fusionsproteinen und die dafür genutzte IPTG-Konzentration

| Fusionsprotein | verwendeter <i>E. coli</i> -Stamm | IPTG-Konzentration |
|----------------|-----------------------------------|--------------------|
| GST | DH5α | 0,1 mM |
| His | BL21(DE3) | 1 mM |

3.4.2 Proteinreinigung mittels Glutathion Agarose im *batch*-Verfahren

Alle für die Proteinreinigung benötigten Reagenzien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 4 °C gekühlt. Während der gesamten Reinigungszeit wurde bei 4 °C gearbeitet.

Etwa 1 ml einer 50%igen Suspension (*bead slurry*; gleiches Volumenverhältnis von Kügelchen und Lösungsmittel) von Glutathion Agarose Kügelchen wurde 2-mal mit 5 ml Equilibrierungspuffer gewaschen (700 x g, 4 °C, 2 min) um Rückstände der Aufbewahrungslösung zu entfernen. Anschließend wurden 10 ml des unter 3.4.1 hergestellten Protein-Rohextrakts zu den Glutathion Agarose Kügelchen gegeben und bei 4 °C, ü. N. auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe zentrifugiert (700 x g, 4 °C, 2 min). Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Das Kügelchen-Pelett wurde 4–5-mal mit 5 ml kaltem Equilibrierungspuffer gewaschen (700 x g, 4 °C, 2 min). Hierbei wurde der erste, zweite und letzte Waschschrift aufbewahrt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Kügelchen-Pelett in 500 µl Elutionspuffer resuspendiert und für 5 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und danach zentrifugiert (700 x g, 4 °C, 2 min). Dieser Schritt wurde noch sechs Mal wiederholt. Alle Eluate wurden aufbewahrt. Alle aufgehobenen Fraktionen wurden bis zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Regeneration und Aufbewahrung der Glutathion Agarose Kügelchen erfolgte laut Herstellerangaben.

Equilibrierungspuffer:

PBS
1% Triton X-100

Elutionspuffer:

50 mM Tris
150 mM Natriumchlorid
10 mM reduziertes Glutathion
pH 8,0

zu Equilibrierungs- und Elutionspuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch zugegeben:

1/25 (v/v) 25-fach Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
10 mM Natriumpyrophosphat
100 mM Natriumfluorid
1 mM Natriumorthovanadat

3.4.3 Proteinreinigung mittels Ni-NTA Agarose im *batch*-Verfahren

Alle für die Proteinreinigung benötigten Reagenzien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 4 °C gekühlt. Während der gesamten Reinigungszeit wurde bei 4 °C gearbeitet.

Etwa 1 ml einer 50%igen Suspension (*bead slurry*; gleiches Volumenverhältnis von Kügelchen und Lösungsmittel) von Ni-NTA Agarose Kügelchen wurden 2-mal mit 1 ml Equilibrierungspuffer gewaschen (700 x g, 4 °C, 2 min) um Rückstände der Aufbewahrungslösung zu entfernen. Anschließend wurden 5 ml des unter 3.4.1 hergestellten Protein-Rohextrakts mit 5 ml Equilibrierungspuffer gemischt. Das Gemisch wurde zu den Ni-NTA Agarose Kügelchen gegeben und bei 4 °C, ü. N. auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Proben zentrifugiert (700 x g, 4 °C, 2 min). Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Das Kügelchen-Pelett wurde 4–5-mal mit 1 ml kaltem Waschpuffer gewaschen (700 x g, 4 °C, 2 min). Hierbei wurde der erste, zweite und letzte Waschschrift aufbewahrt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Kügelchen-Pelett in 500 µl Elutionspuffer resuspendiert und für 5 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und danach zentrifugiert (700 x g, 4 °C, 2 min). Dieser Schritt wurde noch sechs Mal wiederholt. Alle Eluate wurden aufbewahrt. Alle aufgehobenen Fraktionen wurden bis zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Regeneration und Aufbewahrung der Ni-NTA Agarose Kügelchen erfolgte laut Herstellerangaben.

Equilibrierungspuffer:

PBS
163 mM Natriumchlorid
10 mM Imidazol
pH 7,7

Waschpuffer:

PBS
20 mM Imidazol
pH 7,7

Elutionspuffer:

PBS
250 mM Imidazol
pH 7,7

zu Equilibrierungs-, Wasch- und Elutionspuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch zugegeben:
1/25 (v/v) 25-fach Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
10 mM Natriumpyrophosphat
100 mM Natriumfluorid
1 mM Natriumorthovanadat

3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts einer Probe erfolgte mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits entsprechend der Herstellerangaben. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung.

3.4.5 Dialyse

Zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen von Proteinlösungen wurde ein Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 3500 Da verwendet. Vor dem Befüllen des Dialyseschlauches, mit den unter 3.4.2 und 3.4.3 gewonnenen und zum Teil vereinigten Proteineluaten, wurde dieser 20 min in dH₂O inkubiert und anschließend mit dH₂O gespült. Proteinvolumen von 1–2 ml wurden zunächst für 4 h und bei 4 °C unter ständigem Rühren gegen 1000 ml PBS dialysiert. Danach erfolgte eine weitere Dialyse gegen 2000 ml PBS ü. N. unter gleichen Bedingungen. Das Dialysat wurde in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.6 Herstellung von Zelllysaten

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Je nach Größe des Kulturgefäßes wurden die Zellen von 6-well Platte in 0,25 ml, von 6 cm Kulturschalen sowie T25 Kulturflaschen in 0,5 ml und von T75 Kulturschalen in 1 ml Co-IP- oder RIPA-Lysepuffer auf Eis lysiert. Mittels eines Zellschabers erfolgte das Ablösen der Zellen. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe 3-mal für 3 Sekunden sonifiziert (60% Amplitude). Zwischen jeder Sonifikationsrunde wurde die Probe für eine Minute auf Eis inkubiert. Falls die Probe noch sehr viskös war, wurde der Sonifikationsschritt wiederholt. Danach erfolgte die Inkubation des Zellextraktes für 30–60 min auf Eis, gefolgt von einer Zentrifugation (15 000 rpm, 4 °C, 30 min). Das Zelllysate wurde als Überstand abgenommen

und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.4.4). Sowohl Zellpellet als auch -lysat wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Co-IP-Lysepuffer:

20 mM Tris-HCl
2 mM EDTA
1% NP-40
pH 7,4

RIPA-Lysepuffer:

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM Natriumchlorid
1 mM EDTA
1% NP-40
0,25% Natriumdeoxycholat

zu Co-IP- und RIPA-Lysepuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch zugegeben:

1/25 (v/v) 25-fach Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
10 mM Natriumpyrophosphat
100 mM Natriumfluorid
1 mM Natriumorthovanadat

Sofern die Lysate in Versuchen mit Ni-NTA Agarose Kügelchen verwendet werden sollten, wurde auf die Zugabe von EDTA in Co-IP- und RIPA-Lysepuffer verzichtet.

3.4.7 Zellkernfraktion von Zellen

Alle Arbeitsschritte zur Aufarbeitung von Zellen für Analysen mittels SDS-PAGE und Western Blot erfolgten mit dem Nuclear Extract Kit laut Herstellerangaben. Für die Gewinnung des Zytoplasmas, der löslichen Zellkernfraktion und der unlöslichen Zellkernfraktion wurden bei konfluenten T25 Kulturflaschen von jedem Puffer 400 µl eingesetzt.

3.4.8 Membranfraktion von Nieren und Zellen

Alle Arbeitsschritte zur Aufarbeitung von Nierengewebe und Zellen für Analysen mittels SDS-PAGE und Western Blot erfolgten bei 4 °C.

Gefrorene halbe Nieren wurden in einem vorgekühlten Mörser mit Flüssigstickstoff solange zerkleinert bis ein feines Pulver entstand und aller Flüssigstickstoff evaporierte. Anschließend wurden 500 µl Sucrose-Puffer hinzugefügt. Durch die fortan bestehende Kälte des Mörsers führte dies zur Frierung des Sucrose-Puffers. Mittels Pistill wurde erneut gemörsert bis der Sucrose-Puffer wieder in eine flüssige Phase überging. Diese Sucrose-Suspension wurde unverzüglich in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das Mörsergefäß wurde mit 500 µl Sucrose-Puffer gespült um verbleibende Gewebereste aufzunehmen und dem gleichen Eppendorfreaktionsgefäß hinzugefügt. Die Suspension wurde 3-mal für 3 Sekunden sonifiziert (60% Amplitude). Zwischen jeder Sonifikationsrunde wurde die Probe für eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (3500 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand, der alle Zellbestandteile außer die Zellkerne enthielt, wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (15 000 rpm, 4 °C, 60 min). Der resultierende Überstand, der vorwiegend kleine vesikuläre Zellbestandteile enthielt, wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das übrige Pellet, welches vor allem Membranbestandteile enthielt, wurde in 200 µl Sucrose-Puffer resuspendiert und 2-mal für 3 Sekunden (60% Amplitude) sonifiziert mit einer Pause von einer Minute auf Eis. Dieses Lysat entspricht der Membranfraktion. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Membranfraktion bestimmt. Alle Zellfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Analyse der Membranfraktion wurde diese auf Eis aufgetaut und kurz 1-mal (3 s, 60% Amplitude) sonifiziert.

Sollte eine Membranfraktion mit Zellen stattfinden, so wurden die Zellen zunächst 1-mal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml kaltem PBS mittels Zellschaber abgekratzt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (900 rpm, RT, 4 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem Sucrose-Puffer gelöst und 3-mal für 3 Sekunden (60% Amplitude) mit einer 1-minütigen Pause auf Eis zwischen jedem Zyklus sonifiziert und anschließend zentrifugiert (3500 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (15 000 rpm, 4 °C, 60 min). Der erhaltene Überstand wurde erneut in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen an Sucrose-Puffer resuspendiert und 2-mal für 3 Sekunden sonifiziert mit einer Pause von einer Minute auf Eis. Dieses Lysat entspricht der Membranfraktion. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Membranfraktion bestimmt. Alle Zellfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert. Zur Analyse der Membranfraktion wurde diese auf Eis aufgetaut und kurz 1-mal (3 s, 60% Amplitude) sonifiziert.

Sucrose-Puffer:

25 mM Saccharose (Sucrose)
10 mM Triethanolamin (TEA)
pH 7,5

zu Sucrose-Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch zugegeben:

1/25 (v/v) 25-fach Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
10 mM Natriumpyrophosphat
100 mM Natriumfluorid
1 mM Natriumorthovanadat

3.4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer apparenten Molekülmasse im elektrischen Feld erfolgte durch ein denaturierendes diskontinuierliches Elektrophoresesystem nach Laemmli (1970). Dabei wurden die Proteinproben mit den Detergenzien Natriumlaurylsulfat (SDS, sodiumdodecylsulfate) und Mercaptoethanol versetzt. Proben werden durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert, SDS lagert sich an die Proteine an und überdeckt deren Eigenladung, Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken. Es resultieren negativ geladene Protein-SDS-Komplexe, die ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis aufweisen und im elektrischen Feld wandern.

Standardmäßig wurden 10%ige und 12%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet (siehe Tab. 3-11), die stets frisch hergestellt wurden. Vor dem Zusammensetzen der Gießapparatur wurden alle dafür notwendigen Teile (Kamm, *Spacer*, Rahmen, Glasplatten) mit 70%igem (v/v) Ethanol gereinigt, des Weiteren mit dest. Wasser abgespült und getrocknet. Es folgte das Gießen des Trenngels, welches mit 1 ml 100%igem Isopropanol zur Glättung der Gelkante überschichtet wurde. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol vollständig entfernt. Anschließend wurde das Trenngel mit Sammelgel überschichtet und der Probenkamm vorsichtig luftblasenfrei in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt. Nach Abschluss der Polymerisation des Sammelgels wurde das Laufmittelreservoir der Elektrophoreseapparatur mit SDS-Laufpuffer gefüllt und der Kamm aus dem Gel entfernt. Die Probenaschen wurden nacheinander mit SDS-Laufpuffer gespült. Es folgte das Befüllen der Taschen mit entsprechender Menge an Proteinprobe. Zuvor wurden die Proben von Zelllysaten mit 5-fachem SDS-Probenpuffer zu 1-facher Endkonzentration versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend für 15 s zentrifugiert (13 000 rpm, RT). Bei Proben von Zelllysaten mit Agarose Kügelchen wurde der Überstand auf das Gel geladen. Proben von Zellpellets wurden zunächst 10 min (13 000 rpm, 4 °C) zentrifugiert

und der Restüberstand entfernt. Die Pellets wurden mit 60 µl 5-fachem SDS-Probenpuffer versetzt und gevortext. Dann wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt und erneut gevortext und für 5 s sonifiziert (70% Amplitude). Vor dem Probenauftrag erfolgte eine kurze Zentrifugation für 15 s (13 000 rpm, RT). Wenn nicht anders angegeben, wurde als Proteinstandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder verwendet. Innerhalb des Sammelgels erfolgte der Gellauf bei 80 V. Beim Eintritt der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die standardmäßige Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde beendet, sobald die Lauffront den Trenngelsockel erreichte.

Anschließend erfolgte entweder die Färbung der Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAA-Gel) mit Coomassie® Brilliant Blue R 250 (siehe 3.4.10) oder der Proteintransfer auf eine NC 45 Nitrozellulose-Membran mittels Elektrotransfer (siehe 3.4.11).

SDS-Laufpuffer:

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

10% Ammoniumpersulfat (APS):

10% (w/v) APS in ddH₂O

10% Sodiumdodecylsulfat (SDS):

10% (w/v) SDS in ddH₂O

5-fach SDS-Probenpuffer (für 8 ml):

1 ml 500 mM Tris (pH 6,8)
0,8 ml 20% (w/v) SDS
0,8 ml Glyzerin
0,4 ml β-Mercaptoethanol
0,4 ml 1% (w/v) Bromphenolblau
4,6 ml ddH₂O

Tabelle 3-11: Zusammensetzung von SDS-PAA-Gelen für 10 ml; PAA: Polyacrylamid

| Komponente | Trenngel | | | | | Sammelgel |
|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|---------|-----------|
| | 6% | 8% | 10% | 12% | 15% | 4% |
| H ₂ O | 5,8 ml | 5,3 ml | 4,8 ml | 4,3 ml | 3,55 ml | 7,5 ml |
| 40% PAA (Rotiphorese) | 1,5 ml | 2 ml | 2,5 ml | 3 ml | 3,5 ml | 1,0 ml |
| TRIS 1,5 M; pH 8,8 mit HCl | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | — |
| TRIS 0,5 M; pH 6,8 mit HCl | — | — | — | — | — | 1,3 ml |
| 10% SDS | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 10% APS | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 100 µl |

3.4.10 Färbung von Proteingelen mit Coomassie® Brilliant Blue R-250

Um Proteinbanden detektieren zu können, wurde das Gel 30–60 min in Coomassie-Färbelösung schwenkend inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Entfärbung 3–4 h (je nach gewünschtem Kontrast) unter ständiger Benetzung. Dabei wurde die Entfärbelösung zwei bis drei Mal gewechselt. Das Gel wurde ü. N. in dH₂O belassen. Bevor die Dokumentation des Gels mit einem Flachbettscanner erfolgte, wurde es mit dH₂O gespült. Zur längeren Aufbewahrung des Gels wurde dieses in Klarsichtfolie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Färbelösung:

0,25% (w/v) Coomassie® Brilliantblau R-250

10% (v/v) Essigsäure

50% (v/v) Methanol

Der Farbstoff wurde zuerst im Methanol-Essig-Gemisch gelöst und danach mit dest. Wasser aufgefüllt.

Entfärbelösung:

10% (v/v) Essigsäure

40% (v/v) Methanol

3.4.11 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Um einen spezifischen Nachweis von Proteinen durchzuführen, wurden diese nach der Auftrennung in einem SDS-PAA-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Für diese Arbeit wurde ausschließlich das „Tank-Blot“-System verwendet.

„Tank-Blot“-System

Schaumstoffschwämme, Nitrozellulose-Membran, Whatman Filterpapiere sowie das SDS-PAA-Gel wurden zunächst in Transferpuffer inkubiert. Auf eine Schaumstofflage wurden nacheinander zwei Lagen Filterpapier, die Membran gefolgt von dem SDS-PAA-Gel und zwei weiteren Lagen Filterpapier und Schaumstoff, gelegt. Der Stapel wurde zusammen mit einem Eis-Kühlakku in die Transferkassette eingespannt und in der Halterung der Blot-Kammer fixiert. Die Kammer wurde mit 4 °C kaltem Transferpuffer befüllt. Der Blot wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Um einer zu starken Wärmeentwicklung entgegen zu wirken, wurde die gesamte Apparatur in eine mit Eis befüllte Styroporbox gestellt und das Eis gegebenenfalls gewechselt. Je nach Molekülmasse der zu untersuchenden Proteine erfolgte der Blot zwischen 1–4 h.

Transferpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
10% (v/v) Methanol

3.4.12 Ponceau S-Färbung

Für eine schnelle Detektion und zur Visualisierung der Effizienz des Proteintransfers wurde die Nitrozellulose-Membran 10 min in Ponceau S gefärbt. Der überflüssige Farbstoff wurde mit dH₂O abgewaschen. Danach wurde die Membran gescannt und im Anschluss zur immunologischen Detektion (siehe 3.4.13) verwendet.

Ponceau S-Färbelösung:

1% (w/v) Ponceau S
10% (v/v) Essigsäure

3.4.13 Immunologische Detektion von Proteinen

Bei den für die immunologische Detektion verwendeten Sekundärantikörpern handelte es sich um Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelte, polyklonale Antikörper. Durch den Umsatz eines Derivats von Luminol durch das Enzym-Konjugat ist es möglich Proteine anhand auftretender Chemilumineszenz zu detektieren. Dabei bindet der Sekundärantikörper an die Fc-Region des Primärantikörpers. Letzterer ist spezifisch für die untersuchten Proteine.

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran (siehe 3.4.11) wurde die Membran 2 h bei RT unter kontinuierlicher Benetzung in Blocklösung inkubiert, wodurch unspezifische Proteinbindungsstellen überdeckt wurden. Im Anschluss wurde die Membran mit Primärantikörper in Blocklösung in entsprechender Verdünnung unter kontinuierlichem Schwenken ü. N. bei 4 °C inkubiert, gefolgt von 3-maligem Waschen von je 10 min in TBS-T. Danach wurde die Membran für 2 h bei RT mit sekundärem Antikörper in Blocklösung inkubiert und anschließend erneut 3-mal 10 min in TBS-T gewaschen.

Die beiden zur Detektion der Chemilumineszenz genutzten Lösungen A und B wurden laut Herstellerangaben im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und für 5 min auf die Membran gegeben. Die Membran wurde luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschlagen, die überschüssige A/B-Lösung entfernt und das Chemilumineszenzsignal mit dem Gerät Fusion SL detektiert und dokumentiert.

TBS:

150 mM Natriumchlorid
7,5 mM Tris-Base
45 mM Tris-HCl
pH 7,4

TBS-T (Tris-buffered saline-Tween®20):

0,05% (v/v) Tween®20 in TBS

3.4.14 Immunpräzipitation (IP)

Für die IP wurden magnetische Protein A/G Sepharose Kügelchen laut Herstellerangaben verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden 600 µg der unter 3.4.6 hergestellten Zellysate mit 30 µl 50%iger (gleiches Volumenverhältnis von Kügelchen und Lösungsmittel) Kügelchen-Suspension und 1,5 µl c-Myc-Antikörper (1 mg/ml, 9E10/Maus) eingesetzt. Die

Ansätze wurden auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit Co-IP- oder RIPA-Lysepuffer aufgefüllt und auf einem Überkopfschüttler ü. N. bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Probenüberstände abgenommen und das Kügelchen-Pelett 4-mal mit 900 µl kaltem Lysepuffer gewaschen. Alle Fraktionen wurden für spätere Analysen aufgehoben. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und das Kügelchen-Pelett in 40 µl 5-fach SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Bis zur weiteren Analyse wurden alle Proben bei -20 °C gelagert.

3.5 Immunhistologische Methoden

3.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Vor Beginn der Arbeiten wurde das Kryostat auf -20 °C gestellt und alle für die Präparation benötigten Werkzeuge in die Kryostatkammer zur Vorkühlung gelegt. Die bei -80 °C gelagerten Nieren wurden innerhalb der Kryostatkammer für 20 min äquilibriert und mittels Cryomatrix-Einbettmedium auf der Objektplatte fixiert. Die angefertigten 5 µm dicken Gefrierschnitte wurden auf Objektträger fixiert und nicht länger als 14 Tage bei -20 °C gelagert.

3.5.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

In Paraffinblöcke eingebettete Nieren wurden mit dem Mikrotom in einer Dicke von 2–5 µm geschnitten. Die Schnitte wurden in 40–50 °C warmes Wasserbad überführt, schwimmend gestreckt und auf Objektträger positioniert. Die Schnitte wurden ü. N. in einem 37 °C Wärmeschrank getrocknet oder für 60 min bei 60 °C inkubiert. Die Paraffinschnitte wurden in geeigneten Behältnissen bis zur weiteren Verarbeitung dunkel und bei RT gelagert.

3.5.3 Immunhistochemie (IHC) kryokonservierter Gewebe

Die bei -20 °C gelagerten Gefrierschnitte wurden zunächst 20 min bei RT äquilibriert. Alle sich daran anschließenden Schritte erfolgten in einer geschlossenen, dunklen Feuchtigkeitskammer unter Verwendung eines Schüttlers um eine gleichmäßige Benetzung zu gewährleisten. Nach erfolgter Äquilibration wurden die Schnitte zunächst 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen und im Anschluss 30 min bei RT in 0,5%igem Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschen für 5 min mit PBS wurde mittels eines Fettstiftes eine hydrophobe Barriere um die Schnitte gesetzt. Um unspezifische Bindungsreaktionen zu mindern wurden die Gefrierschnitte 1 h bei RT in einer Blocklösung inkubiert. Nach Ab-

nahme der Blocklösung wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Primärantikörper für 1 h bei RT und anschließend bei 4 °C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst für 20 min bei RT äquilibriert und 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen bevor der Sekundärantikörper für 2 h bei RT auf die Schnitte gegeben wurde. Nach Inkubation des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Präparate mit einem 1:1 Mix aus Glycerin und PBS eingedeckt.

3.5.4 Immunhistochemie (IHC) paraffineingebetteter Gewebe

Für die Entfernung des Einbettmediums müssen die Gewebeschnitte vor der Färbung entparaffiniert und anschließend rehydriert werden, gefolgt von einer Antigen-Demaskierung

Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Entparaffinierung und Rehydrierung wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt: 3-mal in Xylol für je 10 min, 2-mal in 100%igem Ethanol für je 5 min, 2-mal in 96%igem Ethanol für je 5 min, 1-mal in 80%igem Ethanol für 5 min, 1-mal in 70%igem Ethanol für 5 min, abschließend 1-mal waschen mit PBS und kurzfristige Lagerung in PBS bis zur Antigen-Demaskierung.

Antigen-Demaskierung

Zur Demaskierung der Antigene wurde eine Hitzebehandlung angewandt. Hierfür wurde ein handelsüblicher Schnellkochtopf (Sicomatic-T von Silit) verwendet, der mit etwa 1000 ml dH₂O befüllt wurde. In das Wasser wurde ein Gefäß mit den darin befindlichen, mittig in Färbegestellen positionierten entparaffinierten Schnitten, platziert. Das Gefäß wurde mit ausreichend Zitratpuffer gefüllt, sodass alle Objektträger mit Flüssigkeit bedeckt waren. Der Kochtopf wurde verschlossen und dessen Regler am Griff auf Stufe 2 gestellt. Die Heizplatte wurde auf Maximum eingestellt. Sobald der gelbe Ring am Ventil des Kochtopfs erschien, wurde die Heizplatte auf Minimum gestellt und der Kochtopf weitere 6 min auf der Heizplatte gelassen. Zur gefahrlosen Öffnung des Kochtopfes erfolgte das sofortige Abkühlen des Topfes unter kaltem fließenden Wasser. Die Schnitte wurden noch 5–10 min in dem warmen Zitratpuffer belassen und abschließend 3-mal in PBS gewaschen bevor sie für eine weitere Behandlung benutzt wurden.

Zitratpuffer:

10 mM Zitronensäure Monohydrat
pH 6,0

Die Gewebeproben wurden im Anschluss wie unter 3.5.3 beschrieben zunächst in Blocklösung inkubiert gefolgt von der Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper.

3.5.5 PV1 und ZBTB16 Färbung

2 µm (PV1, auch als MECA-32 bezeichnet) und 5 µm (ZBTB16, auch als PLZF bezeichnet) Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und Antigen-demaskiert (siehe 3.5.4). Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde mit 3% H₂O₂ in Methanol für 10 min bei RT gestoppt. Die Schnitte wurden in Blocklösung (RT, 1 h) inkubiert und anschließend mit PV1 (Verdünnung 1:50) als Primärantikörper inkubiert (4 °C, ü. N.). Um eine Signalverstärkung zu erreichen, wurden die Schnitte am nächsten Tag nach 3-maligen Waschen in PBS mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor 594 (Ziege-Anti-Ratte, Verdünnung 1:500) für 1,5 h, RT inkubiert, in PBS gewaschen und mit einem zweiten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Esel-Anti-Ziege, Verdünnung 1:50) für 2 h, RT behandelt. Nach 3-maligen Waschen in PBS wurden die Schnitte in einer Diaminobenzidin(DAB)-Lösung inkubiert. DAB dient dabei als Substrat für die Peroxidase. Die Farbreaktion (Braunfärbung) wurde unter einem Lichtmikroskop beobachtet. Nach 10 min Inkubation bei RT zeigte sich eine deutliche Braunfärbung und die Reaktion wurde durch mehrfaches Spülen mit ddH₂O gestoppt. Für die immunologische Detektion von ZBTB16 wurden die Schnitte mit ZBTB16 von LSBio als Primärantikörper inkubiert (4 °C, ü. N) gefolgt von der Anwendung des VECTASTAIN ABC-HRP Kits laut Herstellerangaben. Die Schnitte wurden anschließend für 50 s, RT mit DAB-Reagenz des gleichen Herstellers inkubiert. Bildaufnahmen beider Färbungen wurden mittels Lichtmikroskop durchgeführt.

DAB-Lösung:

0,03% H₂O₂ in DAB-Lösung (Sigma)

3.6 Statistische Analysen und verwendete Programme

3.6.1 Statistik

Die statistische Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm Graph-Pad Prism5. Als statistisch signifikant wurden P-Werte < 0,05 angesehen und in der entsprechenden Abbildung vermerkt. Angegeben wurde jeweils der Standardfehler des arithmetrischen Mittelwerts (SEM) von n-Experimenten. Die Berechnung statistischer Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten Mann-Whitney-Test (Wilcoxon-Rangsummentest) für nicht-parametrische Daten durchgeführt. Wurden mehr als

zwei Gruppen verglichen, erfolgte die Datenüberprüfung mittels Kruskal-Wallis-Test und nachfolgendem post-hoc Dunn's-Test.

3.6.2 Kolokalisation

Die Auswertung der Kolokalisationen zwischen Megalin und verschiedenen Organellen des intrazellulären Transports in MDCKII Zellen erfolgte mit dem *coloc 2 plugin* von ImageJ anhand konfokaler Bildaufnahmen. Für die Quantifizierung der Kolokalisation wurden Zellen mittels eines ROI (*region of interest*) markiert und der Manders Koeffizient benutzt, der die Werte von 0 bis 1 annehmen kann, wobei Werte von $\geq 0,5$ auf eine reale Kolokalisation hinweisen (Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2011). Die Werte können direkt als prozentuale Anteile betrachtet werden. Das heisst, 0 entspricht einer Kolokalisation von 0% und 1 einer Kolokalisation von 100% (Bolte & Cordelieres, 2006). Der Manders Koeffizient setzt sich aus M1 und M2 zusammen. In der vorliegenden Dissertation wurde der Manders Koeffizient M1, der den Anteil an grünen Pixeln der Megalinbilder mit den roten Pixeln korrespondierender Markerproteinbilder (Clathrin, EEA1, RAB11, GM130) überlagerte, benutzt. M2 beschreibt den umgekehrten Fall. Die Schwellenwerte wurden mittels des Algorithmus von Costes, integriert im *coloc 2 plugin*, bestimmt. Nur wenn die Intensitäten sowohl grüner als auch roter Pixel oberhalb des Schwellenwertes lagen, wurde diese auch als tatsächlich kolokalisiert betrachtet und in die Auswertung einbezogen.

3.6.3 Bioinformatische Analysen

ApE

Diese Software wurde zur Erstellung von Plasmid- und Vektorkarten genutzt. Des Weiteren diente das Programm zur Auswertung von Sequenziererergebnissen, der Analyse von Restriktionsschnittstellen sowie der Untersuchung des Leserasters und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

ImageJ

Diese Software wurde für densitometrische Auswertungen, Kolokalisationen und zur Bildbearbeitung benutzt.

4. Ergebnisse

Der proximale Tubulus (PT) der Niere wird oft auch als „Arbeitspferd“ des Nephrons bezeichnet. Er übernimmt die Reabsorption von etwa 60–70% des Wassers und Natriumchlorids und bewerkstelligt nahezu die gesamte Rückgewinnung von Proteinen und anderen Nährstoffen aus dem Primärharn. Störungen dieses Prozesses führen zum Verlust genannter Substanzen und zu tubulärer Proteinurie oder *low-molecular-weight*(LMW)-Proteinurie, ein klinisches Zeichen vieler Nierenerkrankungen. Megalin als der wichtigste Endozytose-Rezeptor im PT spielt eine zentrale Rolle in diesem Prozess. Aus diesem Grund soll im ersten Teil dieses Kapitels der Schwerpunkt auf Megalin liegen. Im zweiten Teil sollen die Folgen eines *Vhl-knockouts* im PT im Mittelpunkt stehen.

4.1 Megalin

Im Fokus dieses Teilprojekts stand der C-Terminus von Megalin. Dieser weist viele regulatorische Bereiche auf, die in Wechselwirkung mit anderen Proteinen treten und dadurch Megalin beeinflussen. Dadurch wird eine reibungslose Endozytose und ein nachfolgend geordneter intrazellulärer Transport sichergestellt. Durch Modifikationen kritischer Motive, beispielsweise anhand von Phosphorylierungen, können Feineinstellungen vorgenommen werden um auf veränderte Stoffwechselbedingungen zu reagieren. Hierbei interessierte besonders die Phosphorylierung des C-Terminus von Megalin an Serin 4577. Megalin zählt mit 4660 Aminosäuren (AS) und einer Molekülmasse von etwa 600 kDa zu einem sehr großen Protein. Dadurch sind nicht nur genetische Manipulationen sondern auch Transfektionen und Expressionen in Zellkulturmodellen nicht trivial. Aus diesem Grund wurden verschiedene, bereits erstellte, Megalin Mini-Rezeptor(MMR)-Konstrukte verwendet. Um den Einfluss der Phosphorylierung des C-Terminus von Megalin an Serin 4577 näher untersuchen zu können, standen drei Mini-Rezeptoren zur Verfügung, die die Funktion und das zelluläre Verhalten von Megalin nachahmen. Die Mini-Rezeptoren setzen sich alle aus der 2. Ligandenbindungsdomäne (LBD), die namensgebend für die Nummer 2 in MMR2 ist, der Transmembrandomäne (TMD) und der Zytoplasmadomäne (CPD) bzw. dem C-Terminus von Megalin zusammen (siehe auch Abb. 1-2). Einzig die AS Serin an Position 4577 unterscheidet sich zwischen den Konstrukten und wurde gegen Alanin, kurz MMR2 SA, und gegen Aspartat, entspricht MMR2 SD, ausgetauscht. Dabei stellt MMR2 WT den Wildtyp, der durch Kinasen und Phosphatasen an Serin 4577 durch die Zelle reguliert werden kann, dar. MMR2 SA ist eine phosphorylierungsdefiziente Serin-Mutante. MMR2 SD imitiert phosphoryliertes Serin. Zusätzlich befindet sich am N-Terminus ein 6xHis-Myc-tag. Die Arbeit mit diesen drei MMR2, die als Expressionsplasmide zur Verfügung standen, hat unter anderem den Vorteil Megalin einfacher zu transfizieren, zu exprimieren und via tag zu detektieren.

4.1.1 mTORC1 phosphoryliert Megalin an Serin 4577

Der Komplex mTORC1 setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: Der Kinase mTOR, dem Stabilisator mLST8 und dem Gerüstprotein Raptor. Ein *knockout* von *Raptor* führt zu einer Funktionsstörung dieses Komplexes vor allem die Kinaseaktivität betreffend. Phosphoproteomische Analysen von *Raptor-knockout* Mäusen anhand von Nierenrinden ergaben eine Abnahme der Phosphorylierung von Megalin an Serin 4577 (Grahammer et al., 2017). Dies lässt vermuten, dass mTORC1 für diese Phosphorylierung verantwortlich ist. Um eine maßgebliche Beteiligung von mTORC1 an der Phosphorylierung von Serin 4577 zu bestätigen, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, die eine spezifische Aktivierung und Hemmung von mTORC1 sicherstellen sollten. Dafür wurden HEK293-EBNA Zellen mit dem Expressionsplasmid FLAG-Rheb-N153T transfiziert. *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) ist ein Aktivator von mTORC1 und Rheb-N153T eine hyperaktive Variante von Rheb (Urano et al., 2007). Als spezifischer Inhibitor von mTORC1 wurde der Wirkstoff Rapamycin eingesetzt. Der Leervektor pcDNA3.1 his/myc wurde als Kontrolle verwendet. 3 h vor der Zelllyse mittels RIPA-Lysepuffer wurde Rapamycin in einer Konzentration von 100 nM in das Zellkulturmedium gegeben. Inkubationszeiten und Konzentrationen in diesem Bereich bewirken die spezifische Hemmung von mTORC1 (Foster & Toschi, 2009) und entsprechen gängigen Protokollen wie in den Veröffentlichungen von Sarbassov et al. (Sarbassov et al., 2006) oder Urano et al. (Urano et al., 2007). Um die Aktivität von mTORC1 zu bestimmen wurde die Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins mittels Western Blot untersucht. Der aktive mTORC1-Komplex phosphoryliert die Kinase S6, diese wiederum phosphoryliert das S6 ribosomale Protein – somit ein indirektes Zielpotein von mTORC1 (Hutchinson et al., 2011; Jefferies et al., 1997; Laplante & Sabatini, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Rapamycin zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins im Vergleich zur Kontrolle führte (Abb. 4-1; A, 1. Feld von oben, Spur 2 sowie B). Hingegen zeigte die Transfektion mit Rheb-N153T eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung des Proteins (Abb. 4-1; A, 1. Feld von oben, Spur 3 sowie B) im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse lassen sich auf eine geminderte bzw. gesteigerte Kinaseaktivität von mTORC1 zurückführen. Dies steht sowohl im Einklang mit der Literatur (Hutchinson et al., 2011; Urano et al., 2007) als auch für korrekte Versuchsbedingungen für Folgeexperimente.

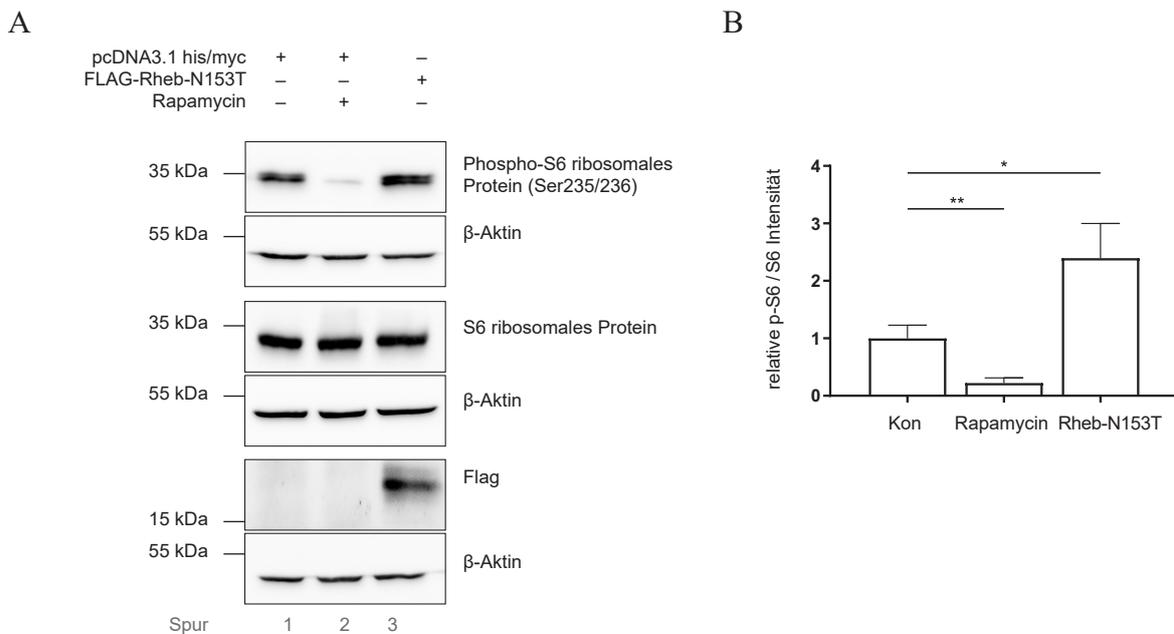
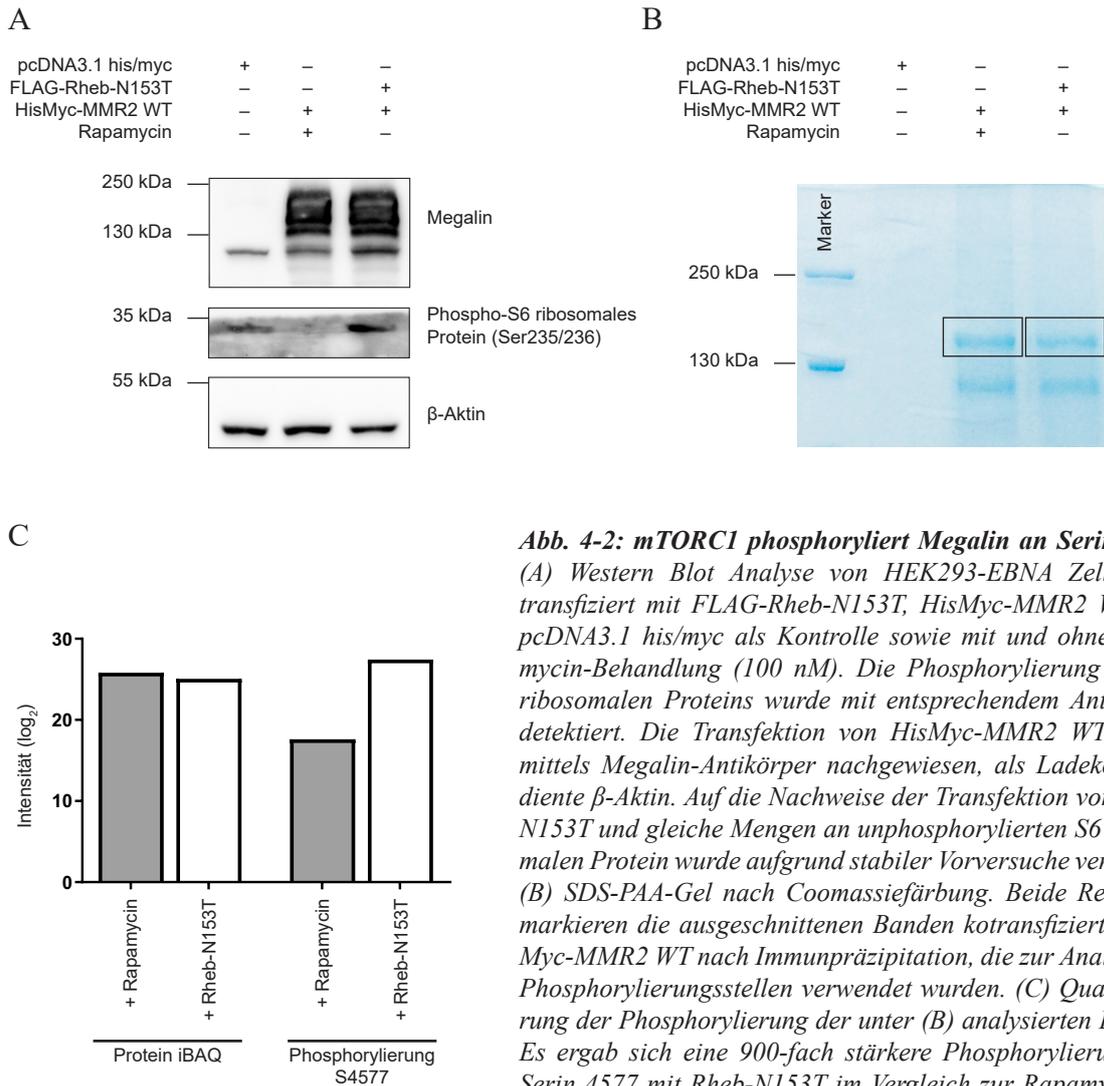


Abb. 4-1: Nachweis der Hemmung und Aktivierung der Kinaseaktivität von mTORC1. (A) Exemplarische Western Blot Analyse von HEK293-EBNA Zellen transfiziert mit FLAG-Rheb-N153T bzw. pcDNA3.1 his/myc als Kontrolle (Kon) sowie mit/ohne Rapamycin (100 nM) behandelt. Die Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins wurde mit entsprechendem Antikörper detektiert. Die Transfektion von Rheb-N153T wurde mittels Flag-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Rapamycin führte zu einer reduzierten Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins während Rheb-N153T zu einer Erhöhung führte. (B) Quantifizierung des Quotienten aus Phospho-S6 ribosomalen Protein (p-S6) und S6 ribosomalen Protein (S6). Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; $n = 6$; * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$; Kruskal-Wallis/Dunn's.

Nach erfolgreicher Etablierung der Versuchsbedingungen erfolgte im zweiten Schritt die Untersuchung der Phosphorylierung von Megalin. Ziel war es, mittels phosphoproteomischer Analysen die Phosphorylierung von Serin 4577 im C-Terminus von Megalin durch mTORC1 zu prüfen. HEK293-EBNA Zellen wurden wie im zuvor erläuterten Vorversuch behandelt. Statt RIPA-Lysepuffer wurde Co-IP-Lysepuffer verwendet. Zusätzlich dazu erfolgte die Kotransfektion des his/myc-tag Megalin Mini-Rezeptors 2 (HisMyc-MMR2 WT). Um die Phosphorylierung von Megalin zu untersuchen, wurde HisMyc-MMR2 WT mittels eines an magnetische Sepharose-Kügelchen gekoppelten c-Myc-Antikörpers für 4 h bei 4 °C aus dem Zelllysat immunpräzipitiert. Die erfolgreiche Transfektion und Expression von Megalin wurde mittels Western Blot durch die Untersuchung der Zelllysate sichergestellt (Abb. 4-2; A, 1. Feld von oben). Zudem wurde die Hemmung (mittels Rapamycin) bzw. Aktivierung (mittels Rheb) der Kinaseaktivität von mTORC1 durch den immunologischen Nachweis des Phospho-S6 ribosomalen Proteins gezeigt (Abb. 4-2; A, 2. Feld von oben). Das gesamte Volumen der Eluate der Immunpräzipitation wurde mittels Coomassiefärbung eines SDS-PAA-Gels untersucht (Abb. 4-2; B). Beide Proteinbanden im Bereich von 150 kDa wurden ausgeschnitten, schockgefroren und zur phosphoproteomischen Analyse an die Proteomics Facility des CECAD Forschungszentrums in Köln geschickt. Die aus Köln erhaltenen

Ergebnisse zeigten, dass die Intensität der Megalin-Phosphorylierungsstelle Serin 4577 in der Rapamycin-behandelten Probe zirka 900-fach geringer als in der Rheb Probe war (Abb. 4-2; C). Die Gesamtproteinlevels, ausgedrückt als iBAQ (*intensity-based absolut quantification*), waren nahezu gleich. Die Resultate belegen, dass eine Inhibition von mTORC1 zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von Serin 4577 im C-Terminus von Megalin führt und bestätigt phosphoproteomische Analysen *Raptor*-defizienter Mäuse (Grahammer et al., 2017).



4.1.2 Einfluss der Phosphorylierung von Serin 4577 im C-Terminus von Megalin

Ob mTORC1 Megalin an Serin 4577 direkt oder indirekt, z. B. durch die Aktivierung anderer Kinasen, phosphoryliert, lässt sich mit den Versuchen des Kapitels 4.1.1 nicht eindeutig klären. Allerdings stellt sich die Frage, welchen Effekt die Phosphorylierung auf die Aktivität von Megalin besitzt. Megalin ist der quantitativ wichtigste Endozytose-Rezeptor im PT der Niere und daher ausschlaggebend für die Rückresorption filtrierter Proteine aus dem Primärharn (Eshbach & Weisz, 2017). Phosphorylierungen können neue Erkennungsstellen für Proteine der Endozytosemaschinerie schaffen oder auch das Gegenteil bewirken, sie können ein bereits existierendes Signalmotiv neu definieren um intrazelluläre Transportwege von Rezeptoren und/oder Liganden zu optimieren oder zu inhibieren. Daher war es naheliegend die Endozytosefunktion zwischen den drei Megalinkonstrukten MMR2 WT, MMR2 SA und MMR2 SD zu vergleichen. Tatsächlich führte die Mutation von Serin 4577 zu Aspartat (SD) zu einer signifikant verminderten Aufnahme von Alexa-555 markierten Albumin in MDCKII Zellen. Die Mutation von Serin 4577 zu Alanin (SA) zeigte keine signifikante Änderung im Vergleich zum Wildtyp (Versuche von F. Theilig, AG Theilig). Um die Gründe dieser Beobachtungen besser verstehen zu können, wurde die intrazelluläre Lokalisation und Verteilung der Megalinmutanten in MDCKII Zellen untersucht. MDCKII Zellen sind eine etablierte Zelllinie zur Analyse von Endozytosevorgängen und intrazellulären Vesikeltransport und bringen somit Erkenntnisse zu Umsatzrate und Sortierverhalten von Megalin innerhalb der Zelle. Zur Studie der intrazellulären Verteilung der Megalinmutanten wurden MDCKII Zellen mit HisMyc-MMR2 WT, HisMyc-MMR2 SA und HisMyc-MMR2 SD transfiziert und immunzytochemisch mit Antikörpern gegen die Proteine Clathrin/EEA1/RAB11 für den Endozytoseapparat bzw. das Protein GM130 (*golgi matrix*) für den Golgi-Apparat sowie für Megalin und ZO-1 (*zonula occludens*) dreifach gefärbt. Clathrin stellt einen Marker für Clathrin-umhüllte Vesikel dar, EEA1 (*early endosome-associated protein*) für frühe Endosomen und RAB11 (*ras-related in brain*) markiert Recycling-Endosomen. Für die Kollokalisationsanalysen wurden MDCKII Zellen zunächst mit dem Primärantikörper Megalin und dem Sekundärantikörper Cy2, gefolgt von dem Primärantikörper Clathrin/EEA1/RAB11 oder GM130 und dem Sekundärantikörper Cy3, gefolgt von dem Primärantikörper ZO-1 und dem Sekundärantikörper Cy5 inkubiert (Abb. 4-3; A–D). Alle Proben wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop von Leica und der Software ImageJ ausgewertet, mit der auch die Kollokalisation anhand des Manders Koeffizienten M1 bestimmt wurde. Die Auswertungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Kollokalisation zwischen den Megalinmutanten mit den Markern Clathrin, EEA1, RAB11 und GM130 (Abb. 4-3; E–H). Das heißt, die Phosphorylierung von Serin 4577 scheint keinen ausschlaggebenden Effekt auf die Verweildauer von Megalin in verschiedenen Zellkompartimenten von MDCKII

Zellen zu haben. Ungeachtet des Phosphorylierungsstatus von Megalin ließen sich Unterschiede in den Kolokalisations-Koeffizienten M1 feststellen. M1-Werte größer 0,5 bzw. 50% werden als signifikant kolokalisierend betrachtet, Werte darunter als ungenügende Kolokalisation angesehen (Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2011). Die stärkste Kolokalisation von Megalin mit etwa 70% ließ sich mit Recycling-Endosomen (Abb. 4-3; G/ RAB11) feststellen. Vergleichbares zeigte sich mit Clathrin-Vesikeln mit etwa 68% (Abb. 4-3; E/ Clathrin). Die Kolokalisation von 55% von Megalin mit frühen Endosomen fiel deutlich geringer aus und lag im Grenzbereich zwischen tatsächlicher und zufälliger Kolokalisation (Abb. 4-3; F/ EEA1). Noch deutlicher trat dieser Effekt mit dem Golgi-Apparat auf, bei dem M1 im Mittel bei 39% lag (Abb. 4-3; H/ GM130). Weil Werte kleiner 0,5 bzw. 50% als nicht signifikante Kolokalisation gelten (Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2011), wurde es bei einem Versuch belassen und keine Versuchswiederholungen mit GM130 durchgeführt. Die Gesamtheit dieser Beobachtungen deckt sich mit verschiedenen Veröffentlichungen (Mattila, Raghavan, Rbaibi, Baty, & Weisz, 2014; M. Nagai, Meerloo, Takeda, & Farquhar, 2003; Perez Bay et al., 2016; Shah, Baterina, Taupin, & Farquhar, 2013).

Innerhalb des C-Terminus von Megalin existieren neben Serin 4577 weitere potentielle Phosphorylierungsstellen. Eine sehr prominente und mehrfach beschriebene Position stellt Serin 4616 (phosphosite.org) innerhalb des PPPSP-Motivs dar, die durch die Kinase GSK3 phosphoryliert wird und zu Änderungen im Recyclingprozess von Megalin führt (siehe auch Abb. 1-2; Yuseff, Farfan, Bu, & Marzolo, 2007). Phosphorylierungen können sich gegenseitig beeinflussen und dadurch das *trafficking* und *sorting* des Rezeptors verändern. Um einen Effekt der Phosphorylierung von Serin 4577 auf das PPPSP-Motiv zu ermitteln, wurden HEK293-EBNA Zellen mit den Megalinkonstrukten HisMyc-MMR2 WT, HisMyc-MMR2 SA und HisMyc-MMR2 SD transfiziert (Abb. 4-4; A). pcDNA3.1 his/myc wurde als Kontrolle eingesetzt. Alle Megalinkonstrukte wurden mittels c-Myc-Antikörper immunpräzipitiert und mit dem Phospho-Megalin-Antikörper, der spezifisch die Phosphorylierung von Serin 4616 erkennt, im Western Blot detektiert (Abb. 4-4; A, 1. Feld von oben). Gleiche Mengen an präzipitiertem Megalin wurden nachgewiesen (Abb. 4-4; A, 2. Feld von oben). Die Phosphorylierung des PPPSP-Motivs zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Megalinmutanten MMR2 SA und MMR2 SD im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4-4; B). Das würde bedeuten, dass der Phosphorylierungsstatus von Serin 4577 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Serin 4616 hat.

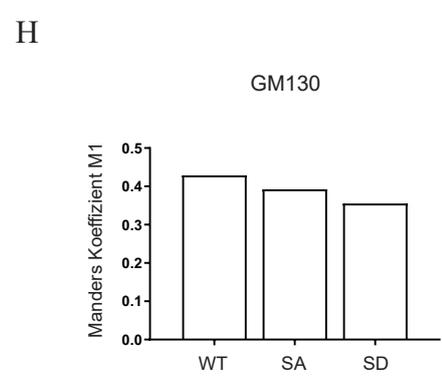
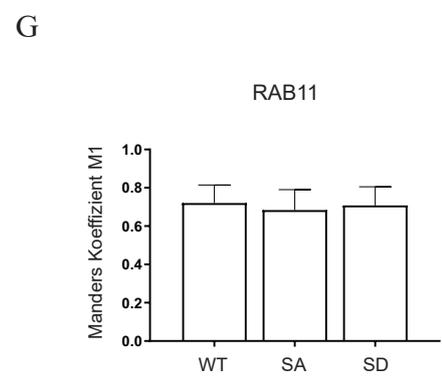
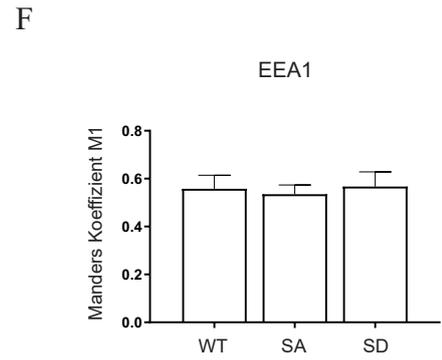
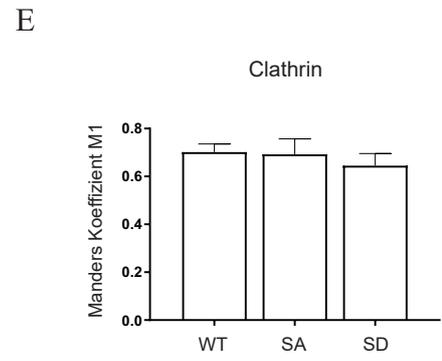
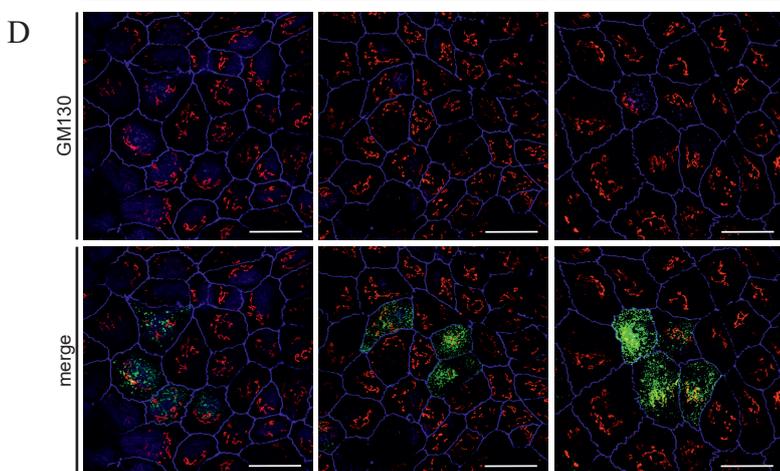
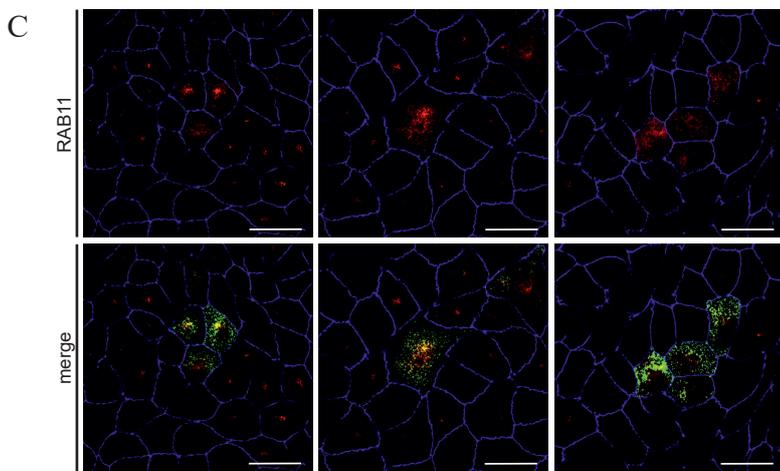
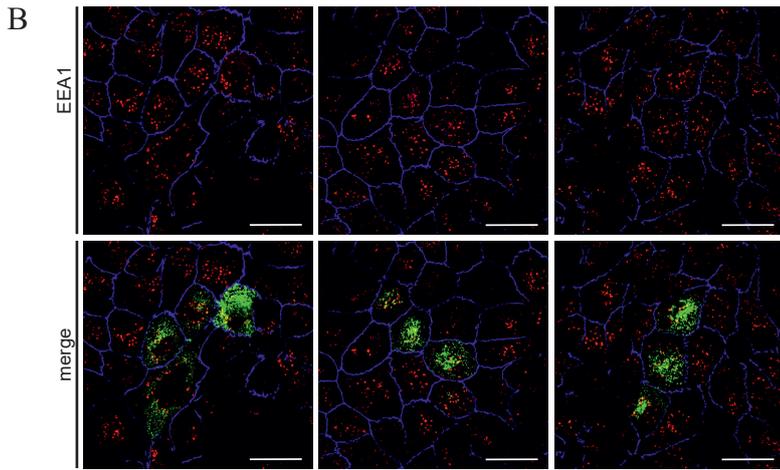
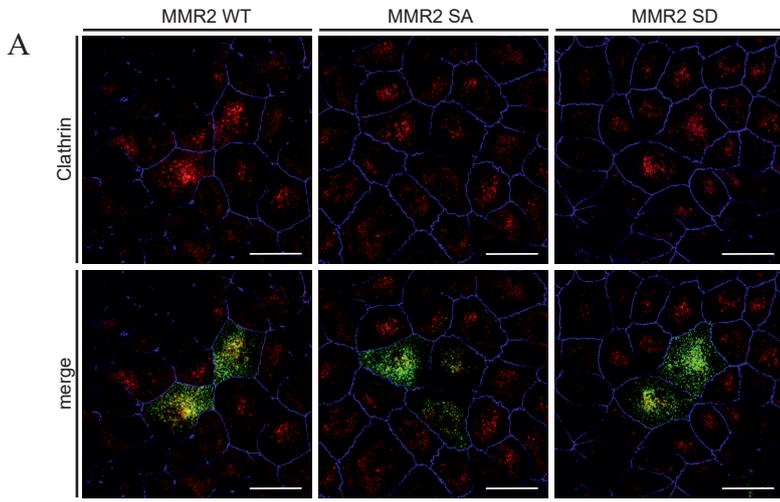


Abb. 4-3: Exemplarische konfokale Aufnahmen und Quantifizierung der Kolo-kalisation verschiedener Megalinkonstrukte mit unterschiedlichen subzellulären Markern. (A–D) Repräsentative dreifach gefärbte Immunfluoreszenzaufnahmen von MDCKII Zellen transfiziert mit MMR2 WT, SA und SD (grün) und Komar-kierung der Marker (rot) für Clathrin (A), EEA1 (B), RAB11 (C) und GM130 (D). Zur Visualisierung der Zell-grenzen erfolgte die Immunfärbung von ZO-1 (blau). (E–H) Quantifizierungen der Kolo-kalisationen (Manders Koeffizient M1) der Megalinkonstrukte mit Clathrin (E), EEA1 (F), RAB11 (G) und GM130 (H). Maßstab = 20 μ m. E–G: n = 4 (30–40 Zellen/Experiment), H: n = 1 (30–40 Zellen/Experiment). Kruskal-Wallis/Dunn's.

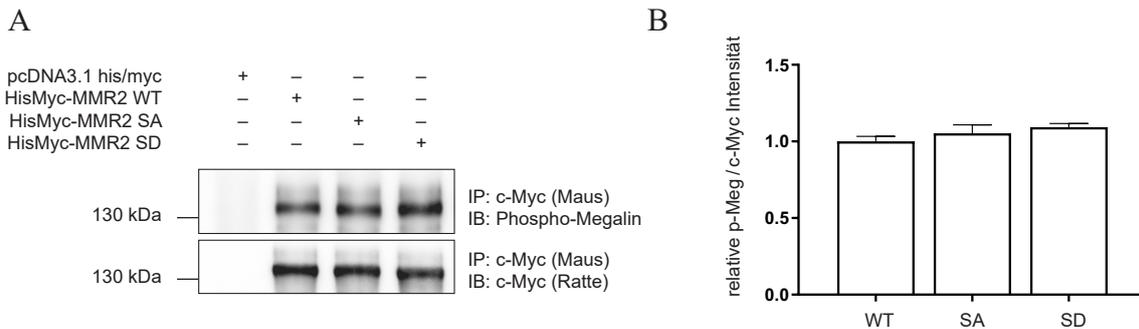


Abb. 4-4: Die Phosphorylierung von Serin 4616 innerhalb des PPPSP-Motivs im C-Terminus von Megalin ist nicht von der Integrität der Phosphorylierungsstelle Serin 4577 abhängig. (A) Repräsentativer Western Blot von HEK293-EBNA Zellen transfiziert mit MMR2 WT, SA bzw. SD. Die Zellen wurden lysiert und die MMR2 Konstrukte mittels c-Myc-Antikörper immunpräzipitiert. (B) Quantifizierung des Quotienten aus Phospho-Megalin (p-Meg) und c-Myc. IP = Immunpräzipitation, IB = Immunblot; n = 4. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; n = 4; *P < 0,05; Kruskal-Wallis/Dunn's

4.1.3 *In vitro* Studien zur Interaktion zwischen Megalin und ARH/DAB2

Der C-Terminus von Megalin beinhaltet, neben dem bereits erwähnten PPPSP-Motiv, viele weitere Domänen über die der Transport und die Funktion von Megalin reguliert werden. Eine zentrale Rolle spielen vor allem zwei NPxY-Motive (siehe auch Abb. 1-2). Das erste NPxY-Motiv wechselwirkt mit der PTB-Domäne des Adaptorproteins ARH und das zweite NPxY-Motiv mit der PTB-Domäne von DAB2, ebenfalls ein Adaptorprotein. Sowohl ARH als auch DAB2 sind von besonderer Bedeutung hinsichtlich der Internalisierung ebenso des Transports von Megalin. ARH koppelt Megalin an Dynein und führt zum gerichteten Transport Megalins vom frühen Endosom zum Recycling-Endosom (Shah et al., 2013). Kommt es zu keiner Interaktion zwischen ARH und Megalin, wird Megalin direkt zurück an die Zelloberfläche transportiert. DAB2 fördert die Endozytose von Megalin (J. Nagai et al., 2005) u. a. durch Bindung an die Motorproteine Myosin VI (Hasson, 2003) und NMHC-IIA (Hosaka et al., 2009). Studien zur Interaktion von Megalin mit ARH bzw. mit DAB2 sollten Aufschluss über einen möglichen Einfluss des Phosphorylierungsstatus von Serin 4577 bringen. Hierfür sollte auf die Methode von Pull-Down Versuchen zurückgegriffen werden. Für diese Experimente wurden bakterielle Expressionsplasmide zur Produktion rekombinanter Fusionsproteine in *E. coli* benutzt. Die Proteine wurden gereinigt, um *in vitro* Protein-

Protein-Interaktionen zu untersuchen. Die drei Megalin Mini-Rezeptoren WT, SA und SD lagen nach der Reinigung als His-Fusionsproteine, bestehend aus dem His-*tag* und der zyttoplasmatischen Domäne, aber ohne die Ligandenbindungs- und Transmembrandomäne, vor. Sie werden im Weiteren als His-MMR WT, His-MMR SA und His-MMR SD bezeichnet. ARH und DAB2 lagen nach der Reinigung als GST-Fusionsproteine vor. GST alleine diente als Kontrolle für spätere Pull-Down Versuche. Aufgrund der Größe von DAB2 und der damit verbundenen schwierigen Expression in *E. coli* wurde nicht das Volllängenprotein sondern eine verkürzte Form, die die AS 1–205 und somit auch die PTB-Domäne umfasst, benutzt (Mishra et al., 2002). ARH wurde als Volllängenprotein verwendet. Beide Fusionsproteine werden im Folgenden als GST-ARH und GST-DAB2_{1–205} benannt.

Expression und Reinigung der GST- und His-Fusionsproteine

Für die Expression und Reinigung unbekannter Proteine wurde stets nach demselben Schema verfahren, um eine bestmögliche Ausbeute an Protein zu erzielen: (1) Transformation der Plasmide in *E. coli*, (2) Analyse der erfolgreichen Transformation anhand von 5–10 Klonen durch eine Mini-Expression induziert mit IPTG, (3) Durchführung einer Zeitreihe zur Festlegung der Proteinexpressionsdauer nach IPTG-Induktion, (4) Expression des Proteins im großem Maßstab mit 1000 ml Bakterienkultur, (5) Proteinreinigung/-isolation mittels Glutathion- oder Ni-NTA Agarose Kügelchen. An dieser Stelle sollen nicht alle Ergebnisse dieses Vorgangs ausführlich dargestellt werden.

Nach erfolgter Transformation der Expressionsplasmide für His-MMR WT, His-MMR SA und His-MMR SD in *E. coli* zeigte die Mini-Expression das Vorliegen aller drei His-Proteine in der löslichen zyttoplasmatischen Fraktion (Protein-Rohextrakt) von *E. coli*. Die beste Proteinausbeute konnte bei einer Kultivierungsdauer mit 1 mM IPTG zwischen 3 h und 4 h festgestellt werden. Für die Reinigung wurden die im Protein-Rohextrakt befindlichen His-MMR-Proteine an Ni-NTA Agarose Kügelchen gebunden, durch Waschen gereinigt und mit Imidazol mehrfach eluiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAA-Gel und ist exemplarisch für His-MMR SA in Abbildung 4-5 dargestellt. Spur 11 und 12 in Abbildung 4-5 dienten zur Kontrolle, Spur 12 zeigte die Induktion der Proteinsynthese von His-MMR SA bei etwa 28 kDa durch Gabe von IPTG. In den Eluaten 1, 2 und 3 wurde die stärkste Proteinausbeute beobachtet, weswegen diese drei Fraktionen miteinander vereinigt wurden (Abb. 4-5; Spuren 5–7). Alle His-MMR-Proteine besitzen eine rechnerische Molekülmasse von 24 kDa, zeigten allerdings eine Migration im SDS-PAA-Gel bei etwa 28 kDa. Die Gründe hierin sind unbekannt, allerdings sind diese Abweichung im Laufverhalten von Proteinen nicht außergewöhnlich (Chi, Yu, & Chang, 2002; Matsumoto, Haniu, & Komori, 2019; Mizushima & Yoshimori, 2007; Tiwari, Kaila, & Guptasarma, 2019). Weiterhin wurden geringe Verunreinigungen im Bereich von 50 kDa und 70 kDa festgestellt (Abb. 4-5; Spur 5–8). Zur Entfernung des Imidazols wurden alle Eluate abschließend einer Dialyse unterzogen.

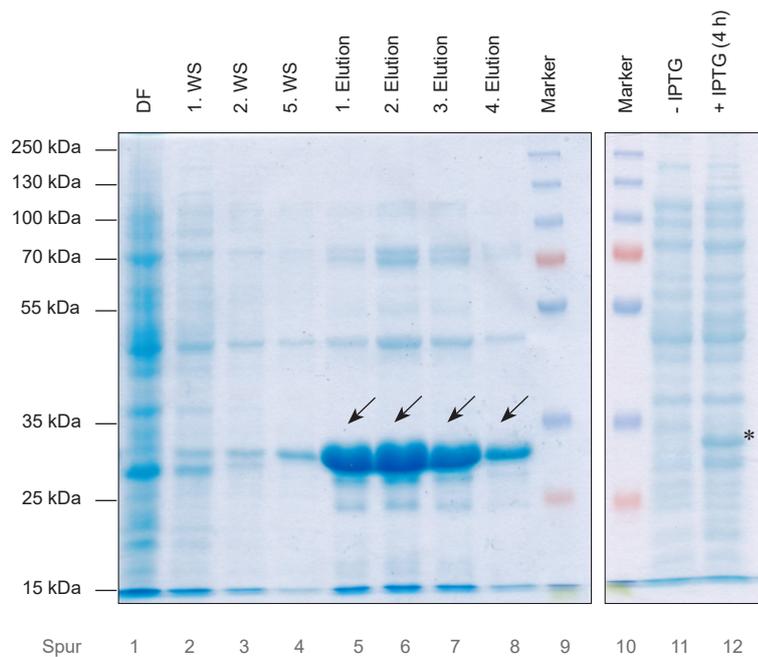


Abb. 4-5: SDS-PAA-Gel ausgewählter Reinigungsfraktionen des in *E. coli* exprimierten Fusionsproteins His-MMR SA nach Bindung an Ni-NTA Agarose und Reinigung im batch-Verfahren. Es wurden gleiche Volumina von Durchfluss (DF), Waschsritten (WS), Elutionen sowie Rohextrakt (Spur 11, 12) aufgetragen. Der Rohextrakt der IPTG-induzierten Kultur (+IPTG, Spur 12) zeigte im Vergleich zum Rohextrakt der nicht IPTG-induzierten Kultur (-IPTG, Spur 11) eine Überexpression von Proteinen mit einer Molekülmasse von etwa 28 kDa (*). His-MMR SA konnte nach erfolgreicher Elution mit 250 mM Imidazol in allen vier Eluatien identifiziert werden (schwarze Pfeile). Die Proteine His-MMR WT und His-MMR SD wurden nach demselben Schema wie His-MMR SA gereinigt.

Die Proteinexpression und -reinigung für GST, GST-ARH und GST-DAB2₁₋₂₀₅ wurde in ähnlicher Weise wie für die der His-MMR-Proteine durchgeführt. GST, GST-ARH als auch GST-DAB2₁₋₂₀₅ wurden in ausreichender Menge ebenfalls in der löslichen zytoplasmatischen Fraktion (Protein-Rohextrakt) von *E. coli* vorgefunden. Die optimale Induktionsdauer mit 0,1 mM IPTG lag bei allen drei GST-Proteinen zwischen 2 h und 4 h Stunden. Die GST-Proteine wurden an Glutathion Agarose Kügelchen gebunden, durch Waschen gereinigt und mit reduziertem Glutathion mehrfach eluiert. Anhand von SDS-PAA-Gelen wurden die Reinigungen analysiert. Exemplarisch ist dies für GST-ARH in Abbildung 4-6 gezeigt. Für GST-ARH und GST-DAB2₁₋₂₀₅ wurden die stärksten Proteinbanden in den Eluatien 1–3 vorgefunden, die jeweils vereinigt wurden (Abb. 4-6; Spur 5–7). Für GST traf dies für die Eluate 1–4 zu, die ebenfalls vereinigt wurden (ohne Abbildung). Zur Entfernung des Glutathions wurden alle GST-Eluate dialysiert.

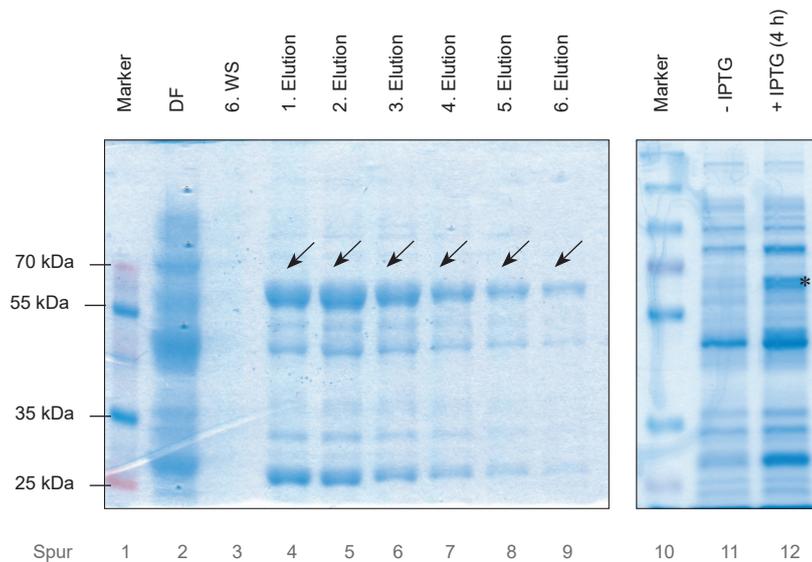


Abb. 4-6 SDS-PAA-Gel ausgewählter Reinigungsfraktionen des in *E. coli* exprimierten Fusionsproteins GST-ARH nach Bindung an Glutathion Agarose und Reinigung im batch-Verfahren. Es wurden gleiche Volumina von Durchfluss (DF), Waschschrift (WS), Elutionen sowie Rohextrakt (Spur 11, 12) aufgetragen. Der Rohextrakt der IPTG-induzierten Kultur (+IPTG, Spur 12) zeigte im Vergleich zum Rohextrakt der nicht IPTG-induzierten Kultur (-IPTG, Spur 11) eine Überexpression von Proteinen mit einer Molekülmasse von etwa 66 kDa (*). GST-ARH konnte nach erfolgter Elution mit 10 mM reduziertem Glutathion in allen sechs Eluatenspuren identifiziert werden (schwarze Pfeile). Die Proteine GST und GST-DAB2₁₋₂₀₅ wurden nach demselben Schema wie GST-ARH gereinigt.

Um gleiche Proteinmengen sowohl der His-MMR-Proteine als auch der GST-Proteine für Pull-Down Experimente einzusetzen, wurden alle Eluate nach Dialyse gemeinsam in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abb. 4-7; A, Spur 9–14). Anhand einer BSA-Verdünnungsreihe (Abb. 4-7; A, Spur 1–7) wurde die Konzentration der Proteine in Kombination mit den Ergebnissen einer BCA-Messung (Tab. 4-1) bestimmt. Es wurden folgende Proteinkonzentrationen abgeschätzt:

| | | | |
|-----------------------------|-----------|-------------|-----------|
| GST: | 12 µg/µl | His-MMR WT: | 0,6 µg/µl |
| GST-ARH: | 0,2 µg/µl | His-MMR SA: | 0,6 µg/µl |
| GST-DAB2 ₁₋₂₀₅ : | 1 µg/µl | His-MMR SD: | 0,6 µg/µl |

Um festzustellen, dass es sich bei den gereinigten Proteinen auch wirklich um GST- und His-MMR-Proteine handelt, wurde ein Western Blot mit gleichem Probenauftrag wie im SDS-PAA-Gel der Abbildung 4-7; A durchgeführt. GST-Proteine wurden mit einem GST-Antikörper, His-MMR-Proteine mit einem Megalin-Antikörper detektiert (Abb. 4-7; B). Die Reinigung von GST, GST-ARH und GST-DAB2₁₋₂₀₅ sowie aller drei His-MMRs konnte bestätigt werden (Abb. 4-7; B, schwarze Pfeile). Gleichzeitig wurden Verunreinigungen in den Dialysaten von GST-ARH und GST-DAB2₁₋₂₀₅ erkannt, die sich besonders auf Abbauprodukte derselbigen Proteine zurückführen ließen (Abb. 4-7; B, Spur 2, 3, Stern*). Trotz Nutzung von Proteaseinhibitoren und Arbeiten auf Eis konnte dies nicht vollständig unterbunden

werden. Für GST scheinen Multiproteinkomplexe, die durch die Interaktion mehrerer GST-Monomere zustanden kamen, für die Signale im Bereich zwischen 55 kDa und 70 kDa verantwortlich (Abb. 4-7; B, Spur 1, Raute#). Die Interaktion konnte durch die Denaturierung der Proben durch Hitze und SDS vermutlich nicht vollständig aufgelöst werden. Die beobachteten Verunreinigungen in den Dialysaten der His-MMR-Proteine im Bereich von 50 kDa und 70 kDa konnten nicht auf dieselbigen zurückgeführt werden. In diesen Bereichen wurden keine Signale mit dem Megalin-Antikörper festgestellt (Abb. 4-7; B, Spur 4–6). Für erste Pull-Down Versuche genügte die Reinheit der Proteine. Leider konnte bis zur Fertigstellung dieser Arbeit kein Pull-Down Protokoll zur Studie der Interaktion der His-MMR-Proteine mit den GST-Proteine etabliert werden.

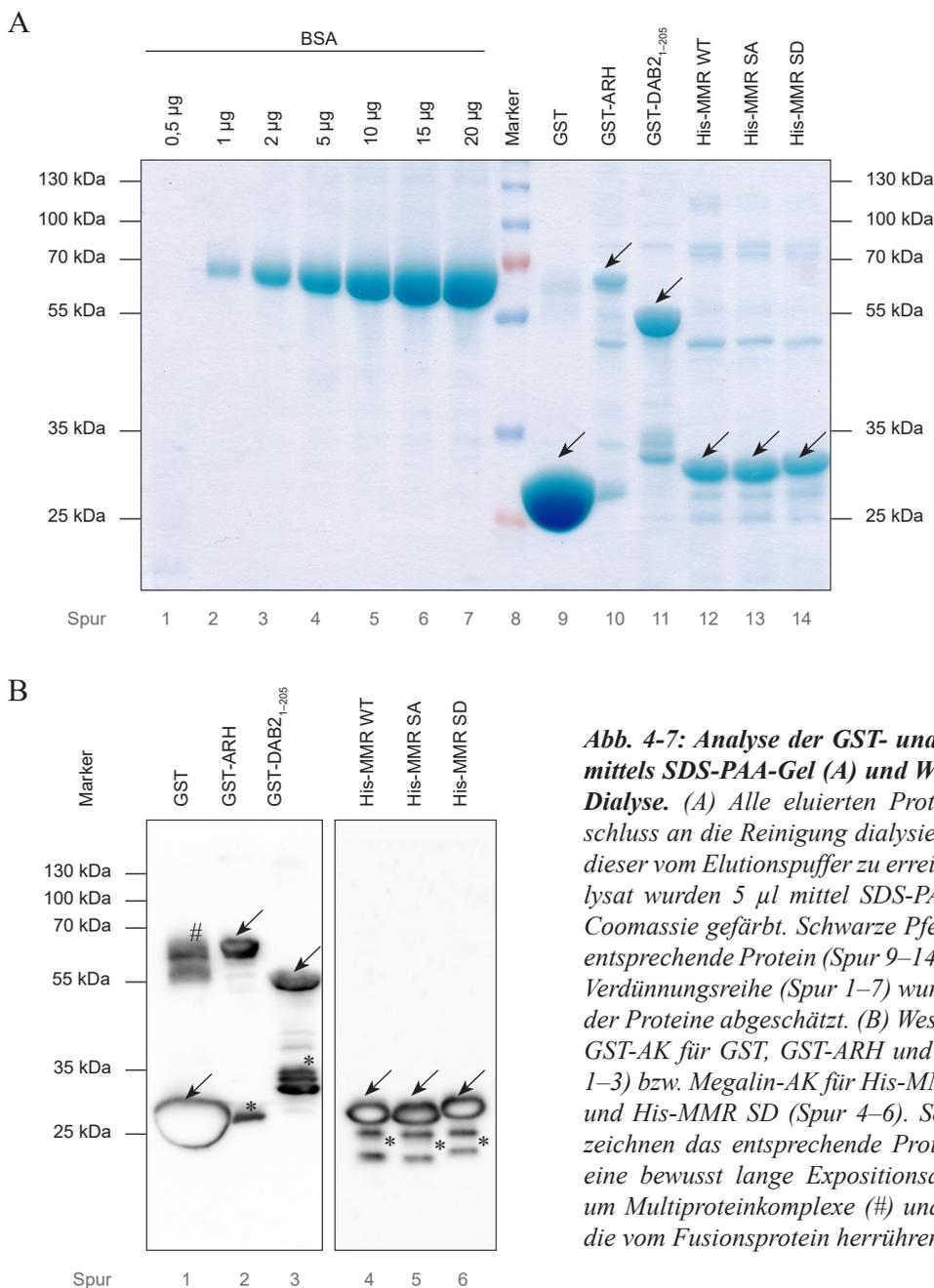


Abb. 4-7: Analyse der GST- und His-MMR-Proteine mittels SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) nach Dialyse. (A) Alle eluierten Proteine wurden im Anschluss an die Reinigung dialysiert, um eine Trennung dieser vom Elutionspuffer zu erreichen. Von jedem Dialysat wurden 5 µl mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Schwarze Pfeile kennzeichnen das entsprechende Protein (Spur 9–14). Mithilfe einer BSA-Verdünnungsreihe (Spur 1–7) wurde die Konzentration der Proteine abgeschätzt. (B) Western Blot Analyse mit GST-AK für GST, GST-ARH und GST-DAB₂₁₋₂₀₅ (Spur 1–3) bzw. Megalin-AK für His-MMR WT, His-MMR SA und His-MMR SD (Spur 4–6). Schwarze Pfeile kennzeichnen das entsprechende Protein. Hierbei erfolgte eine bewusst lange Expositionsdauer der Detektion, um Multiproteinkomplexe (#) und Abbauprodukte (*), die vom Fusionsprotein herrühren, zu erkennen.

Table 4-1: Proteinbestimmung der Dialysate mittels BCA-Methode

| Protein | Proteinkonzentration [µg/µl] | Protein | Proteinkonzentration [µg/µl] |
|---------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|
| GST | 10,2 | His-MMR2 WT | 1,6 |
| GST-ARH | 1,0 | His-MMR2 SA | 1,7 |
| GST-DAB2 ₁₋₂₀₅ | 2,4 | His-MMR2 SD | 1,6 |

4.1.4 Etablierung einer stabilen BN16 *Megalin-knockout* Zelllinie

Die Gruppe um Biemesderfer (Biemesderfer, 2006; Li, Cong, & Biemesderfer, 2008; Zou et al., 2004), aber auch um Gomes (Gomes et al., 2020), identifizierten Megalin als möglichen Genregulator. Megalin unterliegt dem Prozess RIP, bei dem durch die Aktivität mehrerer Proteasen ein kleines C-terminales Megalin-Fragment entsteht, dass in den Zellkern wandert und dort als Transkriptionsfaktor agieren könnte. Allerdings fehlen bisher ausreichend stimmige Daten, um diese Beobachtungen sicher zu stützen. Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten in HEK293-EBNA Zellen anhand von Western Blot Analysen ähnliche Effekte zeigen – eine Prozessierung des C-Terminus von Megalin zu einem kleinen Fragment von etwa 34 kDa. Zusätzlich dazu schien es einen Unterschied in den Fragmentgrößen des C-Terminus zwischen den HisMyc-MMR2-Konstrukten zu geben. Die Megalinmutante SA zeigte ein schnelleres Laufverhalten in SDS-PAA-Gelen als WT und SD. Da es schwierig ist mittels transienter Transfektion der drei HisMyc-MMR2-Konstrukte reproduzierbare und gleichmäßige Ergebnisse zu erzielen, sollten Zelllinien etabliert werden, die diese Mini-Rezeptor-Konstrukte stabil exprimieren. Versuche an MDCKII Zellen, die kein endogenes Megalin aufweisen, mittels Xfect-Transfektion und anschließender Selektion durch Puromycin schlugen fehl. Aus diesem Grund wurde die Transfektion über Elektroporation durchgeführt, die sich ebenfalls als nicht erfolgreich erwies. Daher wurden BN16 Zellen, die allerdings im Gegensatz zu MDCKII Zellen endogenes Megalin besitzen, benutzt. Zunächst erfolgte der *knockout* von *Megalin* in BN16 Zellen mittels CRISPR/Cas9 Technik. Nach Etablierung der *knockout*-Zelllinie sollte diese im Anschluss mit den HisMyc-MMR2-Konstrukten retransfiziert werden, um damit u. a. Untersuchungen zu RIP durchzuführen.

Zur Etablierung einer stabilen *Megalin-knockout* Zelllinie wurden BN16 Zellen mittels Elektroporation und einem äquimolaren Mix aus drei *single guide*(sg)RNAs transfiziert. Für eine erfolgreiche Transfektion mussten zunächst die Elektroporationsparameter aus Pulsstärke, -länge und -anzahl des auszuführenden Stromstoßes festgelegt werden, um ein optimales Verhältnis aus Transfektionseffizienz und Zellvitalität von BN16 Zellen zu erreichen. Hierfür stand das Programm „Optimierungsprotokoll“ am Gerät Neon Transfektion zur Verfügung, welches 24 verschiedene Kombinationen aus diesen drei Stromstoß-Parametern durchführt. Anhand der Transfektion des GFP-Expressionsplasmids pCMV6-AC-GFP in BN16 zeigte

sich eine deutliche Imbalance aus Transfektionseffizienz und Zellvitalität. Das heißt, bei guter Zellvitalität war die Transfektionsrate von GFP äußerst gering und *vice versa*, wie repräsentativ an zwei Einstellungen in Abbildung 4-8 zu sehen. Zu Lasten der Zellvitalität wurde mit den Parametern aus Pulsstärke 1100, Pulslänge 40 und Pulsanzahl 1 weitergearbeitet, da sich hier die beste Transfektionsrate mit etwa 1–5% zeigte (Abb. 4-8; C1 und C2).

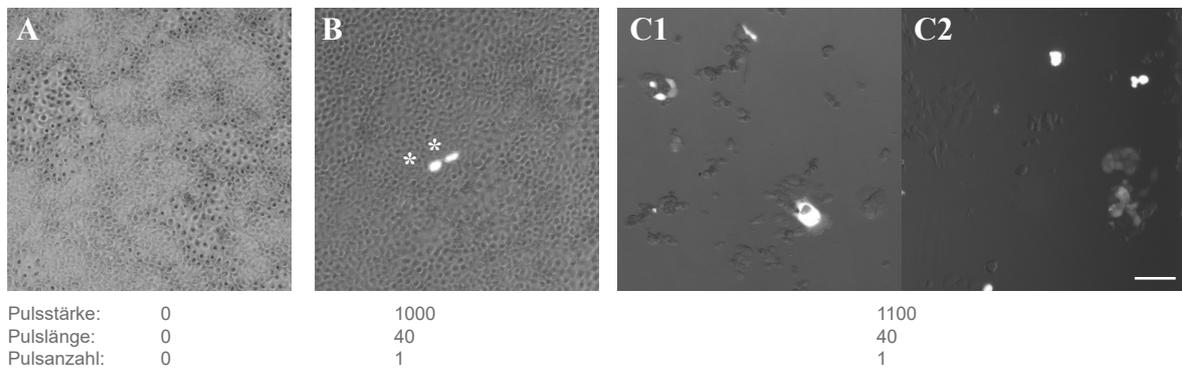


Abb. 4-8: Transfektionseffizienz von BN16 Zellen mit Elektroporation. Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen mit Durchlicht 72 h nach der Transfektion mit GFP mittels Elektroporation zeigten eine sehr gute Zellvitalität bei einem Stromstoß zusammengesetzt aus 1000/40/1 bei gleichzeitig sehr schwacher Transfektionseffizienz (B), die sich in einer sehr geringen Anzahl GFP-positiver (B, *) Zellen zeigte. Die höchste Transfektionsrate konnte bei einem Stromstoß aus 1100/40/1 (C1 und C2) gesehen werden, bei gleichzeitig deutlich schlechter Zellvitalität im Vergleich zur Kontrolle ohne Stromstoß (A). Maßstab = 25 µm.

Die Erzeugung des *Megalin-knockouts* erfolgte durch eine *multi-guide* Strategie bei der ein äquimolarer Mix aus drei sgRNAs benutzt wurde. Die Nutzung mehrerer sgRNAs erhöht die Wahrscheinlichkeit eines effizienten *knockouts*. Alle drei sgRNAs binden spezifisch an Exon 2 von *Megalin*, wodurch gleichzeitig mehrere Doppelstrangbrüche in diesem Bereich erzielt werden und zu Deletionen führen. Letztere resultieren im *knockout* von *Megalin* in BN16 Zellen, im weiteren BN16 LRP2 KO genannt. Nach Durchführung der Transfektion, unter den oben ermittelten Stromstoßeinstellungen, und Expansion der Zellen erfolgte die Einzelzellklonierung (*limited dilution*). Aufgrund der Ergebnisse des Vortests, der eine sehr geringe Transfektionseffizienz mit BN16 Zellen zeigte, wurden 3 x 96-well Platten mit Einzelzellen bestückt. In 122 wells wuchsen Zellen aus, die über eine 12- auf eine 6-well Platte expandiert wurden. Parallel dazu erfolgte eine erste Analyse mittels Immunfluoreszenz. Dabei stellte sich heraus, dass 100 der potentiellen BN16 LRP2 KO Zelllinien keinen *Megalin-knockout* zeigten, was aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz zu erwarten war. 15 Klone zeigten einen nicht vollständigen *Megalin-knockout*, repräsentativ für die Klone 2A2 und 3C1 in Abb. 4-9; A gezeigt, und wurden verworfen. Anhand dieser „Mosaik-knockout“ Zelllinien lässt sich sehr gut der Unterschied zwischen Zellen mit endogenem *Megalin* (distinkte rote Punkte im Zytoplasma) und Zellen ohne *Megalin* erkennen. Sieben Klone wiesen einen scheinbar kompletten *knockout* von *Megalin* auf (Abb. 4-9; B).

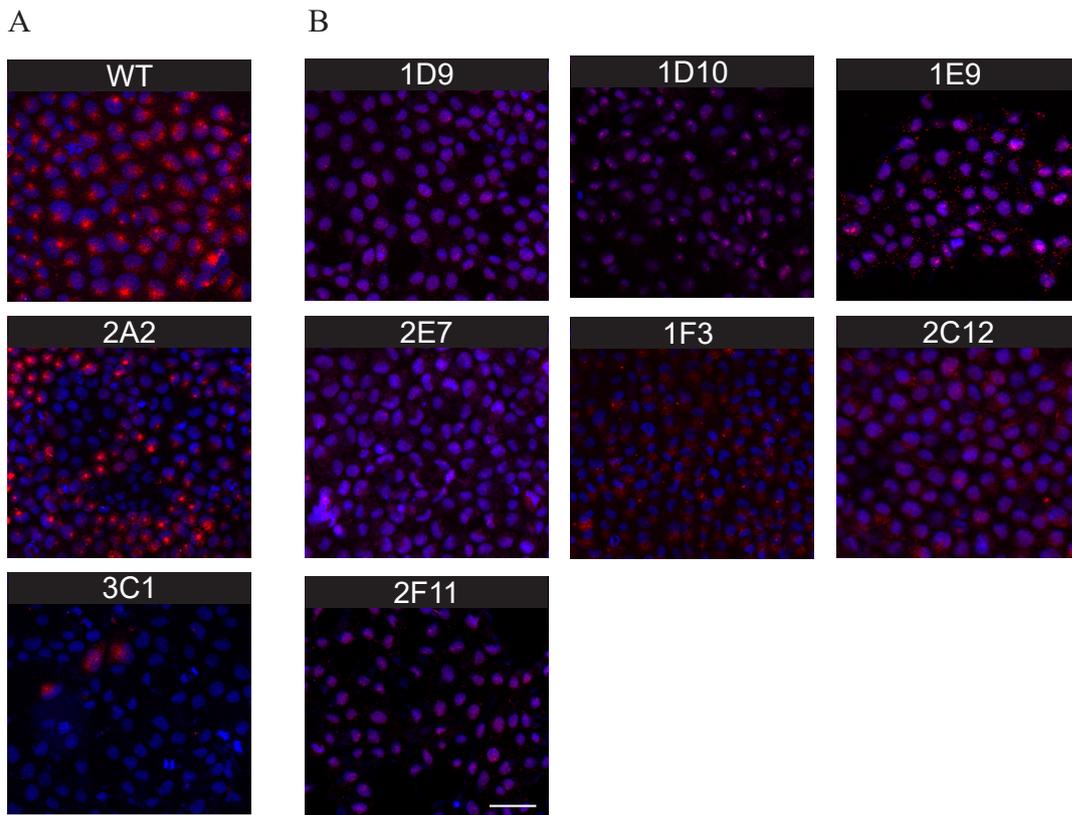


Abb. 4-9: Verifizierung unterschiedlicher klonaler BN16 Megalin-knockout Zelllinien nach CRISPR/Cas9 Behandlung. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen immunzytochemischer Färbungen an BN16 LRP2 KO, die Zelllinien mit einem nicht vollständigen (Mosaik) (A) und einem vollständigen (B) knockout von Megalin zeigen. Endogenes Megalin wurde mit Megalin-AK (rot) nachgewiesen und die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Nicht mit CRISPR/Cas9 behandelte BN16 Zellen (WT) dienten als Kontrolle des Nachweises von endogenem Megalin. Maßstab = 50 μ m.

Diese sieben Klone – 1D9, 1D10, 1E9, 2C12, 2E7, 1F3 und 2F11 – wurden in Kultur gehalten und mittels Western Blot analysiert (Abb. 4-10). Die Klone 1F3 sowie 2C12 wiesen weiterhin endogenes Megalin auf, was durch die Verwendung des Megalin-Antikörpers geprüft wurde (Abb. 4-10; Spur 6, 7). Diese Klone wurden verworfen. Die BN16 Wildtyp (WT) Zelllinie diente als Positivkontrolle. Von allen anderen Klonen wurde RNA in cDNA umgeschrieben und diese mittels PCR unter Verwendung der Q5-Polymerase und den Primern CRISPR_LRP2_for, der in Exon 1 von *Lrp2* bindet, sowie CRISPR_LRP2_rev, der im Exon 5 von *Lrp2* bindet, und einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4-11). Die erwartete Größe des Amplikons von BN16 WT lag bei 496 bp (Abb. 4-11; Spur 1). Man konnte im Vergleich zum WT bei Klon 1D9 ein kleineres Fragment, was auf eine Deletion hinwies, erkennen (Abb. 4-11; Spur 2). Bei Klon 1E9 und Klon 2F11 zeigten sich jeweils zwei Banden (Abb. 4-11; Spur 4, 6). Die Klone 1D10 und 2E7 zeigten keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4-11; Spur 3, 5).

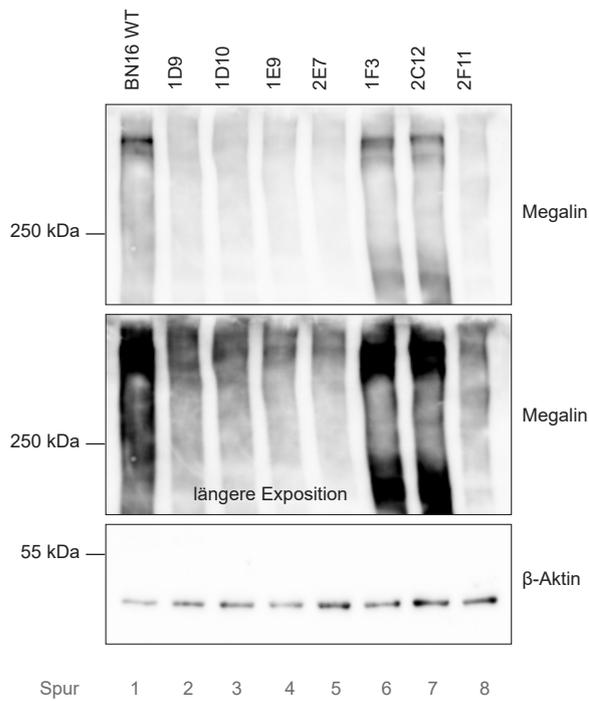


Abb. 4-10: Proteinbiochemische Analyse potentieller BN16 LRP2 KO Klone. BN16 WT und die Klone 1D9, 1D10, 1E9, 2E7, 1F3, 2C12 sowie 2F11 wurden mit einem 6%igen SDS-PAA-Gel/4 h Western Blot zum Nachweis von endogenem Megalin und mit einem 10%igen SDS-PAA-Gel/2 h Western Blot zum Nachweis von Aktin aufgetrennt/geblottet. Die Klone 1F3 und 2C12 zeigten Banden im Bereich von 600 kDa wie auch BN16 Wildtyp (WT, Positivkontrolle) und wurden nicht weiter analysiert. Die Detektion erfolgte mit Megalin-AK. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Es erfolgte zusätzlich eine bewusst lange Expositionsdauer der Detektion, um geringe Proteinlevels an endogenem Megalin erkennen zu können (2. Feld von oben).

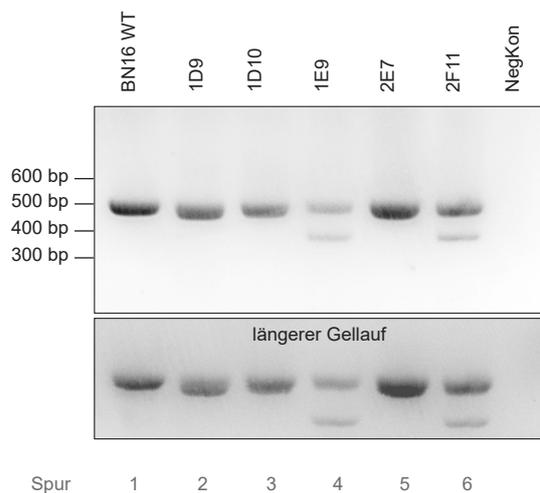


Abb. 4-11: Genomische Analyse potentieller BN16 LRP2 KO Klone. Der erste Genbereich (Exon 1–5) von Megalin wurde für die unter Abb. 4-10 identifizierten LRP2-knockout Klone 1D9, 1D10, 1E9, 2E7 und 2F11 mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte mit einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. BN16 WT diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle (NegKon) wurde ddH_2O im PCR-Ansatz verwendet.

Weiteren Aufschluss brachte eine Sanger-Sequenzierung, für die die PCR-Produkte zuvor mittels Agarose Gel Extraction Kit gereinigt wurden. Die Sequenzen zeigten, dass die Klone 1D9, 1D10, 2E7 und 2F11 Indel-Mutationen im Bereich der Doppelstrangbrüche (Abb. 4-12; A, gelbe Markierung) von sgRNA1, sgRNA2 und sgRNA3 im Exon 2 aufwiesen. Solche Mutationen führen zur Verschiebung des Leserahmens und oft zu frühzeitigen Stop-Codons, wie bei 1D9 und 1D10 (Abb. 4-12; B, rote Sterne*), was im *nonsense-mediated decay* endet. Die Mutationen bei 2F11 resultieren in einer vollkommen anderen AS-Sequenz, die wiederum ein fehlgefaltetes Protein und eventuell dessen Abbau nach sich zieht, was die erfolglose Detektion mit dem Megalin-Antikörper im Western Blot und in der Immunfluoreszenz erklären könnte. Auch sind später entstehende Stop-Codons nach Exon 5 denkbar. Für Klon 2E7 zeigte die Sequenz viele Deletionen im Exon 1, wodurch der Leserahmen verschoben wurde. Die daraus resultierende Aminosäuresequenz war, ähnlich zu Klon 2F11,

eine vollkommen andere (der Übersicht wegen ist nicht Klon 2E7 nicht Abb. 4-12). Ein Ausschnitt des Alignments der Sequenziererergebnisse von BN16 WT und der Klone 1D9, 1D10 und 2F11 mit der Referenz-Sequenz von Megalin/Ratte (rat_NM_030827.2) ist in Abbildung 4-12 dargestellt. Überraschenderweise wies Klon 1E9 keine Änderungen auf und entsprach dem Wildtyp (nicht in Abb. 4-12).

Fasst man die Analysen zusammen, so konnte der *knockout* von *Megalin* für die Klone 1D9, 1D10, 2E7 und 2F11 sowohl auf genomischer Ebene mittels PCR und Sequenzierung als auch auf Proteinebene anhand Immunzytochemie und Western Blot bestätigt werden. Mit dem Klon 1D9 wurde eine Retransfektion von HisMyc-MMR2 WT, HisMyc-MMR2 SA und HisMyc-MMR2 SD unter den gleichen Elektroporationsbedingungen wie für den zuvor beschriebenen *Megalin-knockout* durchgeführt. Drei Tage später erfolgte eine Selektion mit Puromycin und im Anschluss die *limited dilution*, bei der zwar Einzelzellen isoliert, aber nur 2–3 expandiert werden konnten. Diese wenigen Klone wurden immunzytochemisch *via* Fluoreszenz durch die Nutzung des Megalin-Antikörpers geprüft (ohne Abbildung) und zeigten keine positiven Signale für HisMyc-MMR2 (ohne Abbildung). Mit den parallel dazu weiter kultivierten, retransfizierten drei Zelllinien wurde auf gleiche Weise die Transfektionseffizienz geprüft. Diese war, trotz Antibiotikaselektion zu gering, als dass weitere *limited dilution* Ansätze zum Erfolg geführt hätten. Daher wurde ein anderer Versuchsansatz gewählt bei dem ein Expressionsplasmid, der für eine Zeozin-Resistenz kodiert, mit den HisMyc-MMR2-Konstrukten kotransfiziert wurde. Die Überlebensrate nach Elektroporation und Zeozin-Selektion sank mit zunehmender Kultivierungsdauer. Die Gründe, warum eine Retransfektion *via* Elektroporation erfolglos blieb, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht herausgefunden werden. Ein möglicher Ansatz wäre eine Transduktion mit Lentiviren, ähnlich wie für die OK und TAL Zellen im Kapitel 4.2.4.1 beschrieben. Nichtsdestotrotz standen insgesamt vier monoklonale BN16 *Megalin-knockout* Zelllinien für Versuche, die den Einfluss von endogenem Megalin untersuchen, zur Verfügung. Gegenwärtig finden mit diesen BN16 LRP2 KO Zelllinien Experimente durch Y. Anan (AG Theilig) statt, die mögliche Veränderung in der Expression von FcRn und in der Flüssigkeitssaufnahme (*fluid phase*) über Makropinozytose in Abhängigkeit der An- und Abwesenheit von Megalin untersuchen.

A

| | | | | |
|-------|---|--------------------------|------------|--------|
| Zelle | Exon 1 | sgRNA1 G↓C sgRNA2 C↓A | sgRNA3 A↓C | Exon 2 |
| 1 | ATGGAGCGGGCGGCGGCGTGGATGCTGTGCTGCGCATCGCTGCCTGCCTGGAGCCAGTCAGTAGCCAAAGATATGGCGGCACTGGGAAATTTTCGCTGTGCAACAATGGATACTGTATCCCTGCCGTCC | | | |
| | AS-Sequenz: W M L L L A I | | | |
| 2 | ~~~~~TGGATGCTGTTGCTGGCGATCGCTGCCTGCCTGGAGCCAGTCAGTAGCCAAAGATGGCGCACTGGGAAATTTTCGCTGTGCAACAATGGATACTGTATCCCTGCCGTCC | | | |
| 3 | ~~~~~TGGATGCTGTTGCTGGCGATCGCTGCCTGCCTGGAGCCAGTCAGTAGCCAAAGATGGGAAATTTTCGCTGTGCAACAATGGATACTGTATCCCTGCCGTCC | | | |
| 4 | ~~~~~TGGATGCTGTTGCTGGCGATTTGGCCTGCCTGGAGCCAGTCAGTAGCCAAAGATGGGAAATTTTCGCTGTGCAACAATGGATACTGTATCCCTGCCGTCC | | | |
| 5 | ~~~~~TGTGCTGCTGGCGATCGCTGCCTGCCTGGAGCCAGTCAGTAGCCAAAGATGGCGCACTGGGAAATTTTCGCTGTGCAACAATGGATACTGTATCCCTGCCGTCC | | | |

Zeile 1: Megalin genomische Sequenz rat_NM_030827.2

Zeile 2: BN16 WT sequenziert, Zeile 3: BN16 1D9, Zeile 4: BN16 1D10, Zeile 5: BN16 2F11

B

| | |
|------|--|
| WT | WMLLLAIACLEPVSSQECGNGFRCDNGYCIPASWRCDGTRDCLDDTDEIGCPPRSCESGLFLCPAEGTCIPSSWVWCDEKDK |
| 1D9 | WMLLLAIWACLEPVSSQECGKWEF*LQWILYPCVLEV*WDQRLF*HR*NWLSSQVLRIRPFVSC*GDLHP*LLGV*RG*G |
| 1D10 | WMLLLAIACLEPVSSQVGFQWILYPCVLEV*WDQRLF*HR*NWLSSQVLRIRPFVSC*GDLHP*LLGV*RG*GLFGRCRRTAKLCWDH |
| 2F11 | LAIACPDVPSSQECGMGIFAVTMDTVSLRPGVMPETVWMTQMKLAVLPGPANQAFSCVLLRGPASLAPGCVTRIRI |

Abb. 4-12: Ausschnitt der Basenpaar- und Aminosäuresequenz nach Sequenzierung und Sequenzanalyse dreier BN16 LRP2 KO Klone im Vergleich zum WT. (A) Die Megalin-Amplifikate der BN16 LRP2 KO Klone 1D9, 1D10 und 2F11 wurden nach Sanger sequenziert und mit der genomischen Sequenz von Megalin (Ratte rat_NM_030827.2) verglichen (Zeile 1). Innerhalb dieser Sequenz sind Markierungen für das Exon 1 (blau gerahmt), das Exon 2 (rot gerahmt), die Bindesequenz des Sequenzier Primers CRISPR LRP2_for (violett eingefärbt) sowie die Sequenzen des Doppelstrangbruchs (gelb eingefärbt) der drei benutzten sgRNAs mit der Position des Doppelstrangbruchs (durch ↓ markiert) dargestellt. Die Sequenzierung von BN16 WT Zellen (Zeile 2) diente als Kontrolle und das erhaltene Sequenzierungsergebnis entsprach rat_NM_030827.2. Die Sequenzen von Zeile 3 entsprechen Klon 1D9, die von Zeile 4 Klon 1D10 und die von Zeile 5 Klon 2F11. Alle drei Klone zeigten Indel-Mutationen (rot eingefärbt) besonders im Bereich der Doppelstrangbrüche. (B) Auswirkungen der Indel-Mutationen aus (A) auf die AS-Sequenz: Klon 1D9 und 1D10 wiesen frühzeitige Stop-Codons (rote Sterne*) auf, während die Sequenzänderungen von Klon 2F11 zu einer komplett anderen AS-Abfolge führten. AS = Aminosäure, WT = Wildtyp.

4.2 *Vhl*-knockout im proximalen Tubulus

Die diabetische Nephropathie (DN) zählt zu den Hauptursachen einer terminalen Niereninsuffizienz und zeigt einen fortschreitenden Krankheitsverlauf, der durch verschiedene histologische und metabolische Veränderungen in frühe und späte Stadien eingeteilt werden kann. Initial kommt es bei der DN zu Hyperfiltration und Mikroalbuminurie, die den PT einem erhöhten Arbeitspensum, vermehrten Zellstress, Entzündungen und Hypoxie aussetzt. Letzteres stellt einen entscheidenden Faktor bei der Entstehung und des Anhaltens der DN dar. Um die Rolle von Hypoxie im PT bei der Ausbildung der DN besser verstehen zu können, wurde ein neues Mausmodell etabliert. Hierfür wurden Mäuse mit einem *Vhl*-knockout im S1 und S2 des PT generiert, indem *Vhl*^{fllox}-Mäuse, die als Kontrollgruppe Kon dienten, mit *Sglt2*^{cre}-Mäusen gekreuzt wurden und im weiteren als *Vhl*^{APT} bezeichnet werden. Der *knockout* von *Vhl* führt zur Stabilisierung von HIF-1 α , wodurch im weiteren Verlauf der Sinalkaskade ein hypoxisches Milieu im PT nachgeahmt wird. Drei Monate nach Geburt wurde einem Teil der Kontrollgruppe Kon und der *Vhl*-knockout-Gruppe *Vhl*^{APT} Diabetes mellitus Typ 1 mittels Streptozotocin (STZ) induziert. Dadurch wurden die beiden Mausgruppen Kon/STZ und *Vhl*^{APT}/STZ generiert. Alle Gruppen wurden über 10 Wochen nach STZ-Behandlung beobachtet bevor die Analyse der Tiere stattfand. Dieser Zeitraum entspricht der frühen Phase der DN. Abbildung 4-13 zeigt einen kurzen Überblick über die Generierung der vier Mausgruppen. Diese Arbeiten fanden in der Schweiz statt und wurden von F. Theilig durchgeführt. Alle späteren Analysen wurden am Anatomischen Institut der CAU Kiel in der Arbeitsgruppe Theilig bewerkstelligt. An allen vier Mausgruppen wurden immunhistochemische Färbungen, Western Blots und morphometrische Analysen durchgeführt (AG Theilig). Zum besseren Verständnis werden die dabei gewonnene Daten in diesem Kapitel 4.2 kurz präsentiert, auf deren Ergebnisse meine Überlegungen und durchgeführten Versuche aufbauten.

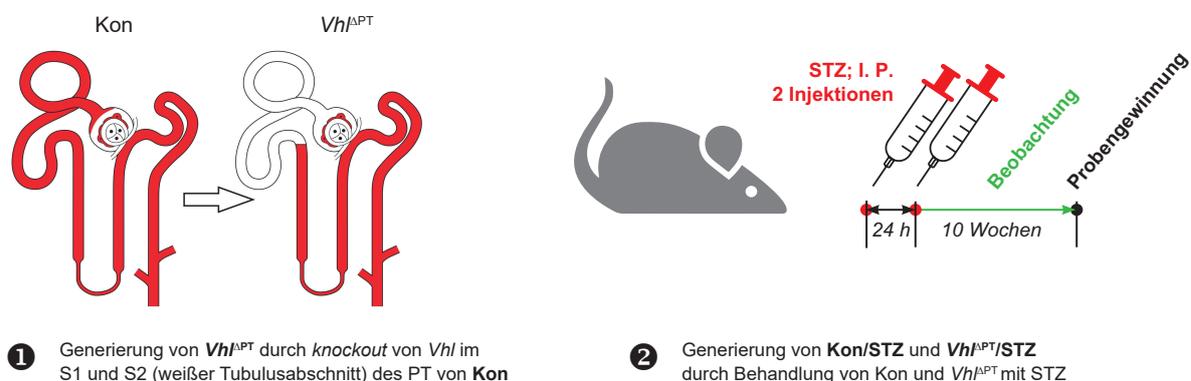


Abb. 4-13: Schematische Darstellung der Generierung von Kon, *Vhl*^{APT}, Kon/STZ und *Vhl*^{APT}/STZ. Die Deletion des Gens *Vhl* im S1 und S2 des proximalen Tubulus (PT) wurde durch die Nutzung des Natrium-Glukose-Kotransporter 2 (SGLT2)-Promotors, der spezifisch für diesen Tubulusabschnitt ist, erzielt. Im Anschluss wurde Diabetes durch zweifache Injektion von Streptozotocin (STZ) induziert und die Mäuse für 10 Wochen beobachtet, bevor die Analyse der Tiere stattfand. I. P. = Intraperitoneal.

Die Untersuchung renaler Funktionsparameter (Abb. 4-14; A–C, AG Theilig) ergab u. a. eine erhöhte Ausscheidung von Glukose, Natrium und Phosphat mit dem Urin in beiden diabetischen Mausgruppen Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$ im Bezug zur Kontrollgruppe (Kon). Weiterhin zeigte sich eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in Kon/STZ (Abb. 4-14; D). Ein Anstieg der GFR ist ein Indikator für eine glomeruläre Hyperfiltration, die kennzeichnend für die frühen Stadien der DN ist und daher in Kon/STZ erwartungsgemäß war. In $Vhl^{\Delta PT}$ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$ wurde keine erhöhte GFR festgestellt.

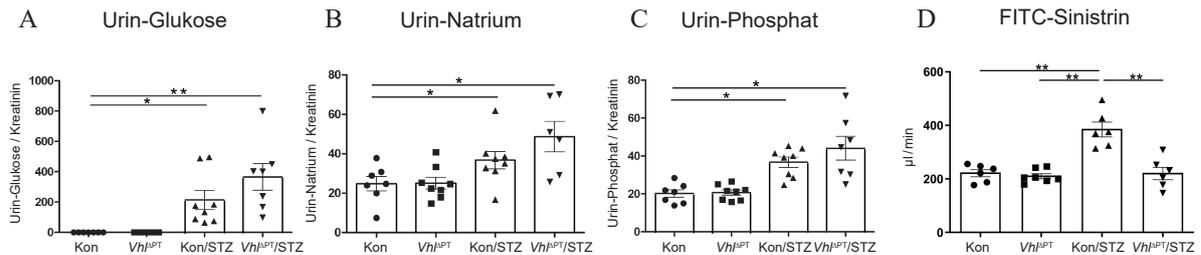


Abb. 4-14: Renale Funktionsparameter und glomeruläre Filtrationsrate nach Induktion von Diabetes durch Streptozotocin. (A–C) Renale Funktionsparameter von Glukose (A), Natrium (B) und Phosphat (C) im Urin von Kontrollgruppe (Kon) sowie $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$. (D) Glomeruläre Filtrationsrate bestimmt durch kinetische Messungen von FITC-Sinistrin im Plasma der Kontrollgruppe (Kon) sowie $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; $n = 6-7$ pro Gruppe; * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$, Kruskal-Wallis/Dunn's, AG Theilig.

Um den Ursachen erhöhter Stoffausscheidung und GFR näher auf den Grund zu gehen, wurden die Expressionen proximaler und distaler Glukose- und Natriumtransporter anhand von Paraffinschnitten und immunhistochemischer Färbungen als auch durch Western Blot Analysen untersucht (AG Theilig). SGLT2, ein wichtiger Transporter im Zusammenhang mit Diabetes, zeigte keine signifikanten Veränderungen (Abb. 4-15; A). In den beiden STZ-behandelten diabetischen Gruppen Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$ ergaben sich signifikant erhöhte Proteinmengen von GLUT1 (nicht signifikant bei $Vhl^{\Delta PT}/STZ$), NHE3 und NKCC2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe Kon (Abb. 4-15; B–D). Jedoch fiel der Anstieg der Proteinexpression in $Vhl^{\Delta PT}/STZ$ im Vergleich zu Kon/STZ bei allen drei Transportern deutlich geringer aus. Die vermehrte Transporter-Expression in Kon/STZ ist mit einer vermehrten Rückresorption an Glukose, Natrium, Kalium und Chlorid verbunden, wodurch weniger dieser Substanzen die Macula Densa (MD) erreichen. Entsprechend dieser Ergebnisse lässt sich ein eingeschränkter tubuloglomerulärer Rückkopplungsmechanismus ableiten, der zur Erhöhung der GFR in Kon/STZ (Abb. 4-14; D) geführt haben könnte.

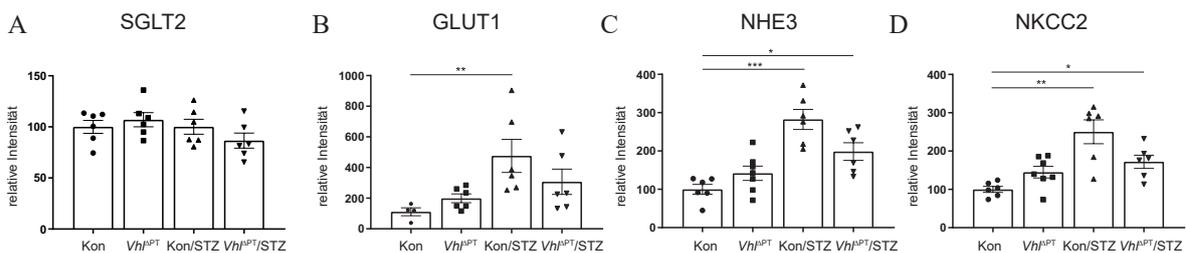


Abb. 4-15: Natrium- und Glukosetransporter des proximalen und distalen Tubulus. Quantifizierung densitometrischer Western Blot Auswertungen von SGLT2 (A), GLUT1 (B), NHE3 (C) und NKCC2 (D) der Kontrollgruppe (Kon) sowie $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; $n = 5-7$ pro Gruppe; * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$, Kruskal-Wallis/Dunn's, AG Theilig.

4.2.1 NOS1 trägt zur glomerulären Hyperfiltration bei

Ein weiterer Faktor, der zur Steigerung der GFR beiträgt, stellt die Stickstoffmonoxid-Synthase 1 (NOS1; *nitric oxide synthase 1/ nNOS; neuronal nitric oxide synthase*) in den Zellen der Macula Densa (MD) dar. Eine Expressions- und Aktivitätssteigerung von NOS1 korreliert positiv mit der GFR (J. Zhang et al., 2019; Vallon & Thomson, 2020). Daher war es naheliegend, die Expression von NOS1 zu untersuchen, wofür immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen an Kryostatschnitten durchgeführt und die Anzahl NOS1-positiver MD Zellen je Glomerulus ausgezählt wurden. In Abbildung 4-16; A kann man sehr gut die NOS1-positiven MD Zellen (gelb) im *Pars recta* des distalen Tubulus (DT) sehen. Nach der Quantifizierung konnte ein signifikanter Anstieg NOS1-positiver MD Zellen in Kon/STZ verglichen zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 4-16; B).

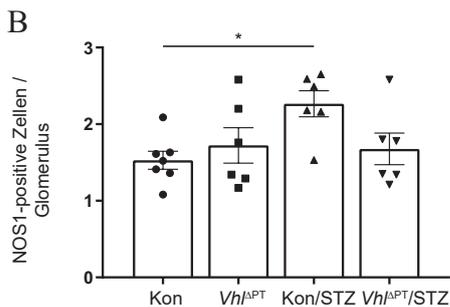
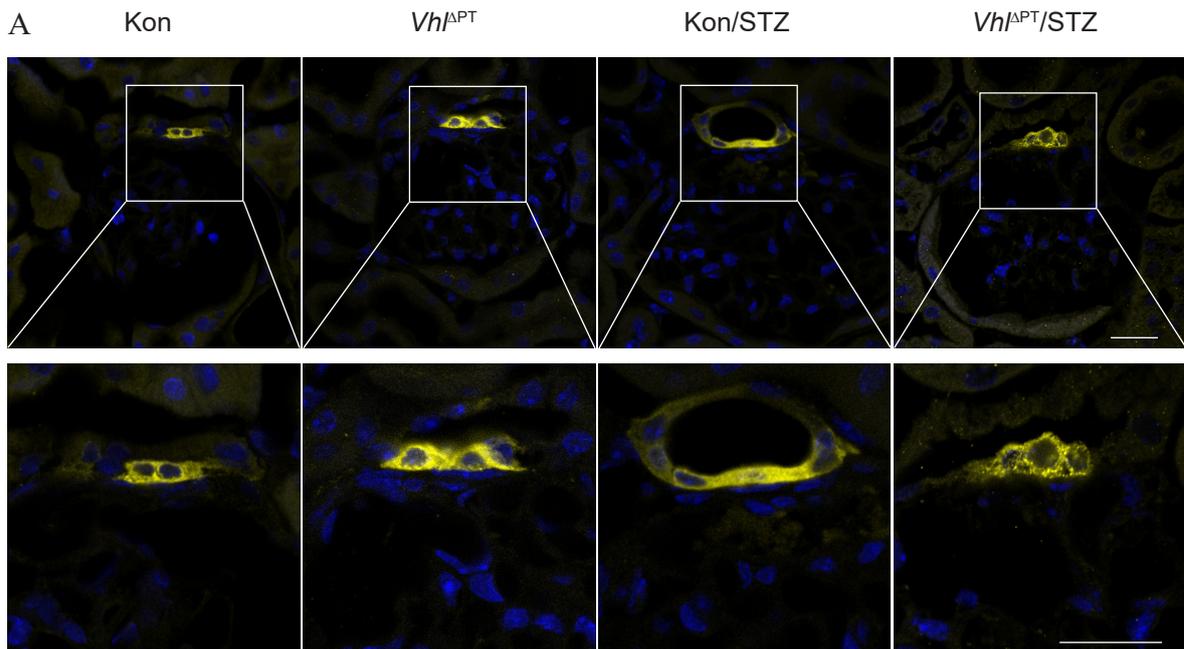
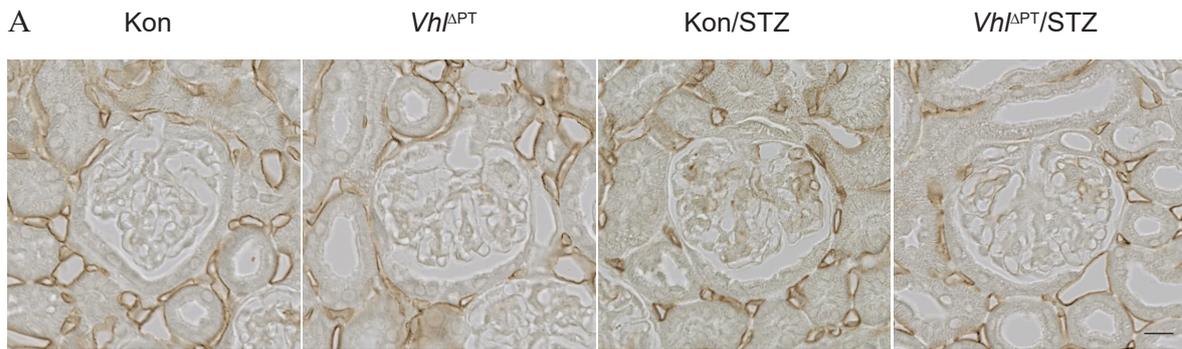


Abb. 4-16: Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase 1 (NOS1) im distalen Tubulus. (A) Repräsentative konfokale Aufnahmen immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen an Kryostatschnitten von Mäusen der Kontrollgruppe (Kon) sowie $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$. NOS1 (gelb) wurde mit nNOS-AK und die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab = 20 μ m. (B) Semi-quantitative Analyse der Anzahl NOS1-positiver Zellen je Glomerulus der Kontrollgruppe (Kon) sowie $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; $n = 6-7$ pro Gruppe; * $P < 0,01$, Kruskal-Wallis/Dunn's.

Zudem sei angemerkt, dass es in *Vhl*^{APT}/STZ zu einer Reduktion der NOS1-Expression in Richtung der Kontrollgruppe kam, wie auch schon bei der Untersuchung der Transporter GLUT1, NHE3 und NKCC2 beobachtet (Abb. 4-15; B–D). Somit trägt nicht nur eine vermehrte Transporter- sondern auch eine vermehrte NOS1-Expression zur Steigerung der GFR in Kon/STZ bei.

4.2.2 VEGF-Rückfluss beeinflusst das Wachstum der Glomeruli

Unabhängig von der GFR wurde die Rückfiltration von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untersucht. Damit ist der Fluss von VEGF von den Podozyten, die VEGF-Produzenten im Glomerulus, in die Endothelzellen der glomerulären Kapillaren gemeint. VEGF ist direktes Zielgen von HIF und spielt u. a. eine Rolle im Wachstum der Glomeruli. Weil man die VEGF-Levels schwer bestimmen kann, bedient man sich der endothelialen Fenestrae als Marker für die lokale Bioaktivität von VEGF (Satchell & Braet, 2009). Die Morphologie des Endothels repräsentiert sozusagen indirekt vorherrschende VEGF-Konzentrationen. Hohe Konzentration an VEGF induzieren im Glomerulus Fenestrae ohne Diaphragma, geringe Konzentrationen Fenestrae mit Diaphragma (Kuppe et al., 2018). Diaphragmen lassen sich mit entsprechenden Antikörpern nachweisen, was auf immunhistochemischer Ebene mit dem PV1-Antikörper (auch als MECA-32 bezeichnet) erfolgte. In den beiden Diabetes-Gruppen Kon/STZ und *Vhl*^{APT}/STZ kam es zum Anstieg von Fenestrae mit Diaphragma (Abb. 4-17). Dieser war bei Kon/STZ signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe Kon und zur Gruppe *Vhl*^{APT}. Die Ergebnisse signalisieren, dass der Rückfluss von VEGF in beiden Diabetes-Gruppen geringer als in Kon war. Auch in diesem Fall sei darauf hingewiesen, dass der vorherige *knockout* von *Vhl* vor STZ-Behandlung (*Vhl*^{APT}/STZ) zu einem weniger starken Effekt führte als in Kon/STZ.



B

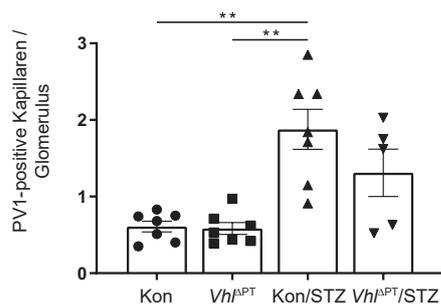


Abb. 4-17: VEGF-abhängige Induktion von endothelialen Fenestralen mit Diaphragma. (A) Repräsentative Aufnahmen immunohistochemischer Färbungen an Paraffinschnitten von Mäusen der Kontrollgruppe (Kon) sowie $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$. Endotheliale Fenestralen mit Diaphragma wurden mit PV1-AK gefärbt, ein indirekter Marker für VEGF. Maßstab = 20 μm . (B) Semi-quantitative Analyse der Anzahl PV1-positiver Kapillaren je Glomerulus der Kontrollgruppe (Kon) sowie $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; $n = 5-7$ pro Gruppe; $**P < 0,01$, Kruskal-Wallis/Dunn's.

4.2.3 Glomeruläre und tubuläre Änderungen

Um mehr über die grundlegenden Mechanismen bisheriger Beobachtungen zu erfahren, wurden von allen vier Mausgruppen RNA-Sequenzierungs-Analysen (RNA-Seq) der Nierenkortex durchgeführt. Die erhaltenen Gen-Daten wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten gruppiert und signifikant veränderte Genexpressionen zwischen den Mausgruppen in unterschiedlichen Kombinationen miteinander verglichen (F. Theilig, AG Theilig, Abb. 4-18; A, B). Abbildung 4-18; A zeigt Gene, die zwischen allen Mausgruppen verändert exprimiert sind und im starken Zusammenhang mit dem Glomerulus und dessen Morphologie sowie Funktion stehen. In Abbildung 4-18; B sind Gene dargestellt, die vor allem die Morphologie und Funktion des Epithels betreffen und zwischen allen vier Gruppen unterschiedlich stark exprimiert sind. Vergleicht man in einfacher Art und Weise die Farbskalen zwischen $Vhl^{\Delta PT}$, Kon/STZ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$, so sieht man die stärksten Genveränderungen in Kon/STZ, repräsentiert durch starke Rot- bzw. Blaufärbungen im Vergleich zur Kontrollgruppe Kon. Dabei gibt die Farbe Rot eine Erhöhung und die Farbe Blau eine Erniedrigung der Genexpression wieder. Die Farbänderungen der Gruppe $Vhl^{\Delta PT}$ ist im Vergleich zu Kon/STZ noch mal schwächer. Die Farbveränderung in $Vhl^{\Delta PT}/STZ$ ist die schwächste. Daraus lässt sich einerseits ableiten, dass die Deletion von Vhl im PT ($Vhl^{\Delta PT}$ und $Vhl^{\Delta PT}/STZ$) zu Änderungen in der Genexpression führt, die ähnlich zu denen der Diabetes-Gruppe (Kon/STZ) sind. Andererseits sind diese Änderungen mit vorherigen *knockout* und anschließender STZ-Behandlung ($Vhl^{\Delta PT}/STZ$) deutlich schwächer in Richtung Kon/STZ bzw. rücken

stärker in Richtung Kontrollgruppe Kon. Die Genexpression bzw. die Transkriptmenge von *Hif-1α* ist durch die Deletion von *Vhl* in *Vhl^{ΔPT}* und *Vhl^{ΔPT}/STZ* erwartungsgemäß erhöht im Vergleich zur Kontrolle Kon (Abb. 4-18; A, blauer Pfeil). Im Vergleich dazu zeigt die Diabetes-Kontrollgruppe Kon/STZ eine noch stärkere Genexpression von *Hif-1α*. Interessanterweise führte der frühzeitige *knockout* von *Vhl* und die anschließende STZ-Behandlung (*Vhl^{ΔPT}/STZ*) zu keiner weiteren Erhöhung der Genexpression von *Hif-1α* sondern blieb in etwa auf dem Niveau von *Vhl^{ΔPT}*.

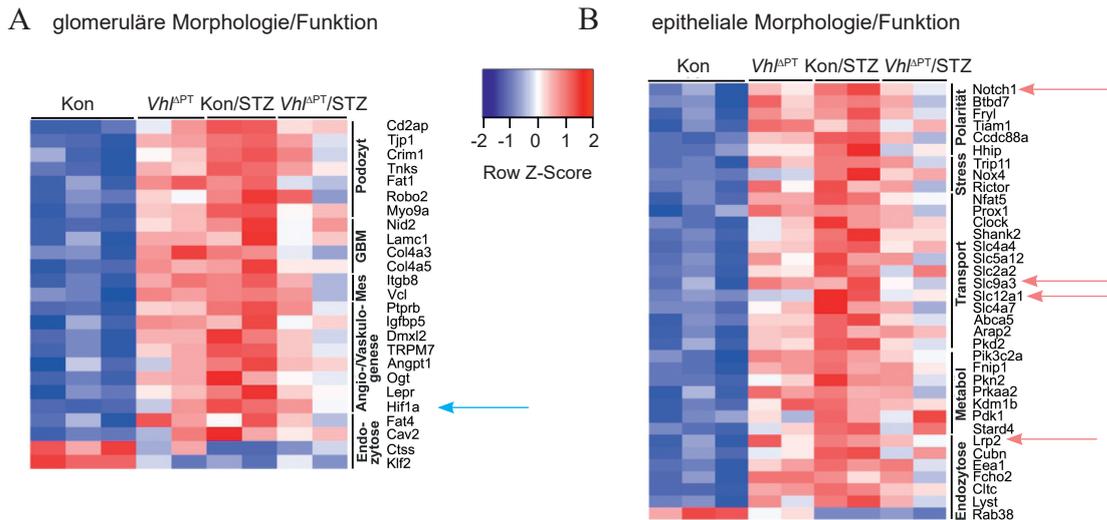


Abb. 4-18: Signifikant veränderte Genexpressionen zwischen Kon, *Vhl^{ΔPT}*, Kon/STZ und *Vhl^{ΔPT}/STZ*. (A, B) Heatmap signifikant veränderter Genexpressionen zwischen den Gruppen *Vhl^{ΔPT}*, Kon/STZ und *Vhl^{ΔPT}/STZ* im Vergleich zu Kon basierend auf den Filterkriterien DESeq P-Werte $\leq 0,05$, x-fache Veränderung $\geq 1,5$. (A) Gene sortiert nach ihrer bekannten Funktion im Glomerulus für Podozyten, glomeruläre Basalmembran (GBM), Mesangiumzellen (Mes), Anglo- und Vaskulogenese sowie Endozytose. Pfeil (blau): *Hif-1α*, Erläuterungen siehe Text. (B) Gene sortiert nach ihrer bekannten Funktion im Tubulus für Polarität, Stress, Transport, Metabolismus und Endozytose. Pfeile (pink): siehe Erläuterungen im Text von Kapitel 4.2.4.1 (e).

4.2.4 Untersuchung von LDC1 und ZBTB16

Der Schwerpunkt in dieser Arbeit galt dem detaillierten Vergleich der Genexpression zwischen den beiden Gruppen Kon/STZ und *Vhl^{ΔPT}/STZ* (Abb. 4-19). Wie die Ergebnisse der Untersuchung der Transporter, der NOS1-Expression und der VEGF-Rückfiltration darlegten, zeigte sich stets eine weniger starke Auswirkung im STZ-Mausmodell, wenn zuvor ein *Vhl-knockout* im PT stattfand. Das deutet auf eine Art Präkonditionierung hin, bei der die Stabilisierung von HIF-1α – durch eine Reduktion von *Vhl* – vor partiellen Auswirkungen des Diabetes schützen. Daher könnten die, zwischen diesen beiden Gruppen Kon/STZ und *Vhl^{ΔPT}/STZ*, unterschiedlich stark regulierten Gene relevant für diese vermutete Präkonditionierung sein. Die RNA-Seq ergab, dass sechs Gene zwischen Kon/STZ und *Vhl^{ΔPT}/STZ* signifikant verändert exprimiert waren (Abb. 4-19). Die Genexpressionen von *Ugt2b37*, *Gm853/Ldc1* und

Ceacam2 waren im Vergleich zur Diabetes-Kontrollgruppe in der Diabetes-*Vhl-knockout*-Gruppe hochreguliert, während die Genexpressionen von *Slc12a1*, *Zbtb16/Plzf* und *Abca13* herunterreguliert waren. Es stellte sich die Frage, ob diese Gene maßgeblich am milderen Diabetesverlauf beteiligt sind. Die verringerte Expression von *Slc12a1*, für den Transporter NKCC2 kodierend, bestätigte zuvor erhaltene Ergebnisse auf Proteinebene (Abb. 4-15; D, AG Theilig).

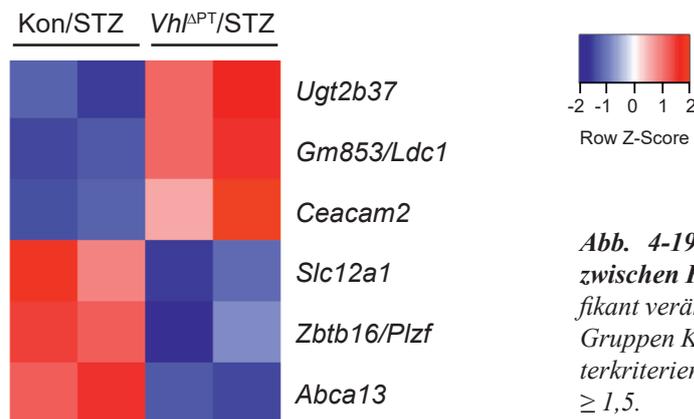


Abb. 4-19: Signifikant veränderte Genexpressionen zwischen Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ. (A) Heatmap signifikant veränderter Genexpressionen zwischen den beiden Gruppen Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ basierend auf den Filterkriterien DESeq P-Werte $\leq 0,05$, x-fache Veränderung $\geq 1,5$.

Der Fokus lag im Weiteren auf *Ldc1* und *Zbtb16*. *Ldc1* kodiert für die Leucin-Decarboxylase 1 und ist besonders in den Nieren männlicher Mäuse exprimiert (Lambertos, Ramos-Molina, Cerezo, Lopez-Contreras, & Penafiel, 2018). Durch die Technik der *in situ* Hybridisierung konnte die Lokalisation von *Ldc1* besonders auf den PT und in geringerem Maße auch auf die distalen Bereiche des Nephrons eingegrenzt werden (Abb. 4-20; A, rote Punkte). Die Identifizierung des PT erfolgte durch eine Kofärbung mit Megalin (Abb. 4-20; A, grün). Die Quantifizierung erfolgte durch das Auszählen der mRNA-Signale pro Zelle anhand konfokaler Bildaufnahmen (Abb. 4-20; B). Die Ergebnisse deckten sich mit denen der RNA-Seq, die auf eine signifikante Reduktion von *Ldc1* in Kon/STZ im Vergleich zu *Vhl*^{ΔPT}/STZ deuteten. Gleichzeitig konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression von *Ldc1* bei Kon/STZ verglichen zu Kon und bei Kon/STZ verglichen zu *Vhl*^{ΔPT} festgestellt werden.

Bisher gibt es kaum weitreichende Daten über die physiologische Relevanz von LDC1. Das Enzym zählt zur Gruppe der Ornithin-Decarboxylasen und katalysiert die Decarboxylierung von L-Leucin zu Isopentylamin (IPA)/Isoamylamin, ein aliphatisches Monoamin mit bisher unbekannter Funktion in Säugern. Jedoch aktiviert Isopentylamin den *trace amine-associated* Rezeptor 3 (TAAR3), was zum Anstieg intrazellulärer cAMP-Levels führt (Ferrero et al., 2012). Dies steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Insulinsekretion durch β -Zellen des Pankreas in Mäusen (Cripps et al., 2020; SahutoGlu, 2020). Auf diesen Erkenntnissen basierend, wurden Untersuchungen des Zellmetabolismus durchgeführt. Dieser lässt sich durch Messungen der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR), die mit der mitochondrialen Atmung

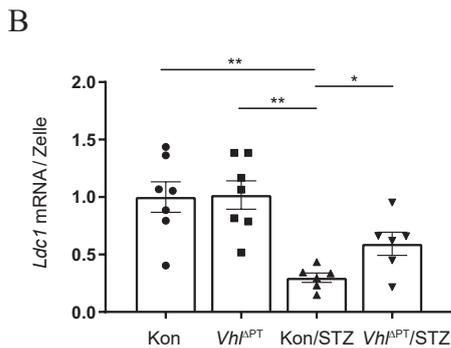
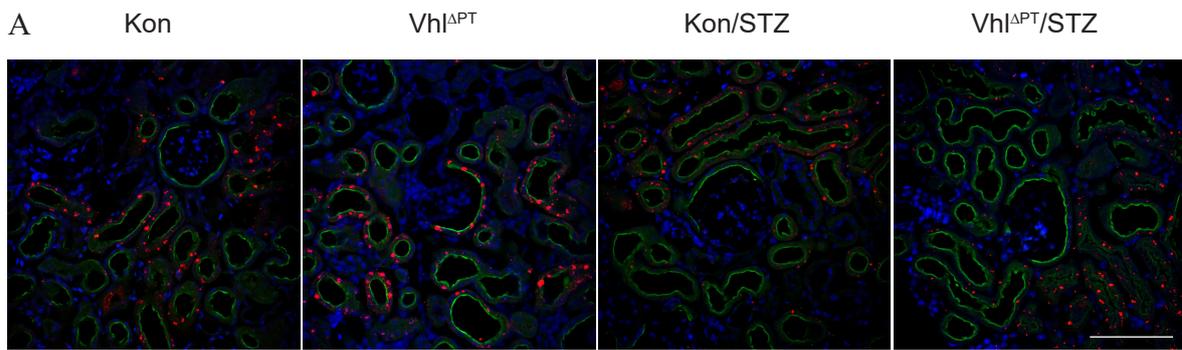


Abb. 4-20: Expression von *Ldc1* im Nierenkortex. (A) Repräsentative konfokale Aufnahmen der *in situ* Hybridisierung und anschließender immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten von Mäusen der Kontrollgruppe (Kon) sowie *Vhl*^{ΔPT}, Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ. Es wurde eine Sonde gegen *Ldc1*-mRNA (rot) verwendet. Die Komarkierungen erfolgten mit Megalin (grün) mittels Megalin-AK sowie DAPI zur Visualisierung der Zellkerne (blau). Maßstab = 100 μ m. (B) Quantitative Analyse der Anzahl an *Ldc1*-mRNA Molekülen je Zelle der Kontrollgruppe (Kon) sowie *Vhl*^{ΔPT}, Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; n = 5–7; *P < 0,05 **P < 0,01; Kruskal-Wallis/Dunn's.

korreliert, und durch Messungen der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR), die mit der Glykolyserate korreliert, charakterisieren. Es wurden OK Zellen, entsprechend Punkt 3.2.13, vorbehandelt und die Messung der OCR in Gegenwart von 1 mM IPA, wie von Ferrero et al. eingesetzt (Ferrero et al., 2012), durchgeführt. Die OCR stieg mit IPA signifikant an, durch einen repräsentativen Graph in Abbildung 4-21; A links illustriert. Das sind erstmalig neue Erkenntnisse zu einer möglichen Funktion von LDC1 und dem Produkt IPA. Die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs könnte proximalen Tubuluszellen durch vermehrte Generierung von ATP helfen, dem erhöhten Energiebedarf unter diabetischen Bedingungen gerecht zu werden. Inwiefern IPA in die dafür verantwortlichen zellulären Signal- und Steuerungsmechanismen eingreift, kann nur spekuliert werden. In ähnlicher Weise wurde der Einfluss von IPA auf die Laktatbildung in OK Zellen mittels ECAR-Messung geprüft. Eine erhöhte Produktion von Laktat ist ein Indiz für eine erhöhte Glykolyse. Beide Graphen glichen sich nach etwa 100 Minuten an (Abb. 4-21; B links). Dabei war der deutliche anfängliche Abfall in der Glykolyserate von OK Zellen ohne IPA unklar. Sowohl die Positivkontrolle mit Glukoseoxidase, als auch die Negativkontrolle mit Oxamidsäure zeigten erwartete Werte (nicht in der Abbildung). Die durchgeführten Versuche ließen, trotz mehrfacher Optimierungen, keine definitiven Aussagen zu. Die Laktatproduktion von OK Zellen scheint zu gering zu sein, als dass die angewandte Messmethode sensitiv genug ist. Versuche unter Nutzung der noch sensitiveren *Seahorse* Technologie könnten hier Aufschluss bringen.

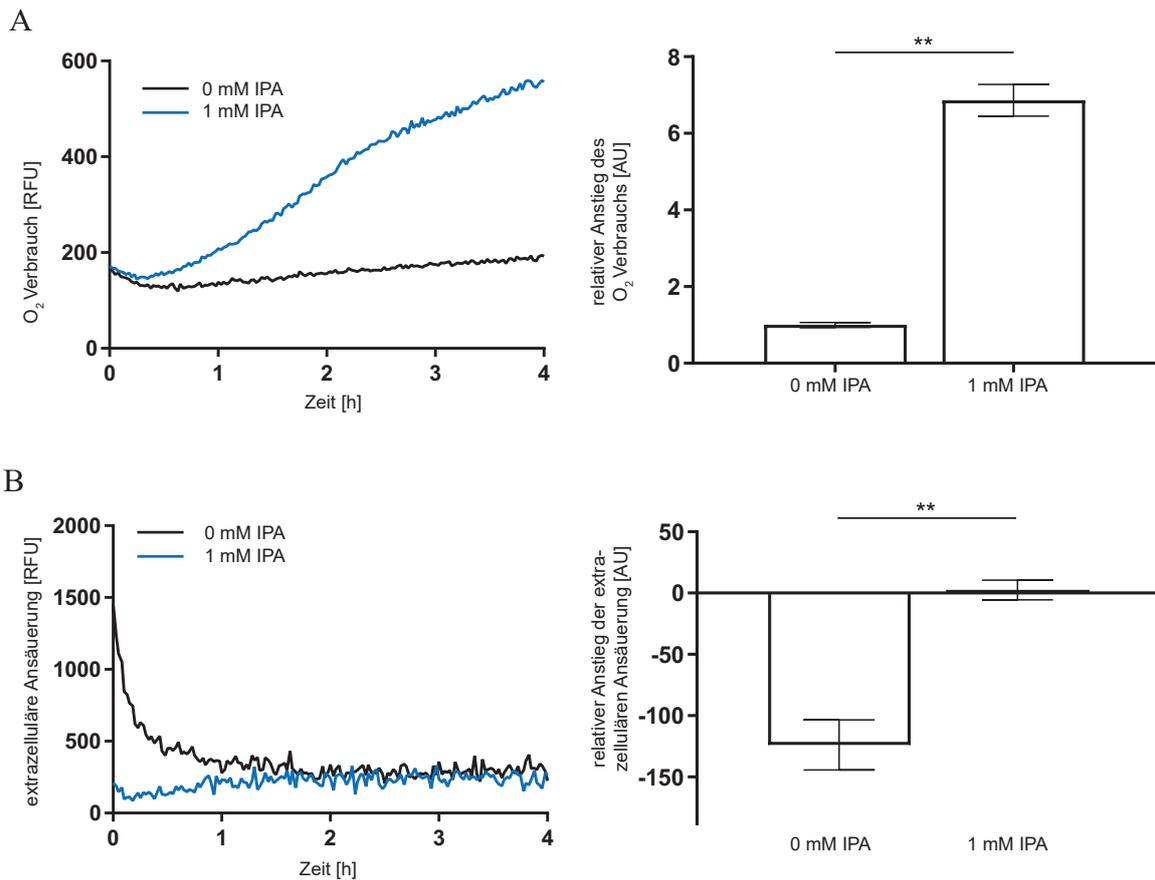


Abb. 4-21: Isopentylamin erhöht den Sauerstoffverbrauch (A) von OK Zellen und zeigt einen möglichen Effekt auf deren Glykolyseaktivität (B). (A) Die Messung des Sauerstoffverbrauchs (repräsentativer Graph links) und (B) der Glykolyseaktivität (repräsentativer Graph links) von OK Zellen wurde in Echtzeit und in Gegenwart von 1 mM Isopentylamin (IPA, blau) durchgeführt. Die Quantifizierung beider Messungen (rechts) erfolgte durch die Bestimmung der Anstiege „m“ der Graphen. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; $n = 5-6$; $**P < 0,01$; Mann-Whitney. RFU: relativ fluorescence units; AU: arbitrary units.

Wie bereits erwähnt, stand auch das Gen *zinc finger and BTB domain containing 16* (*Zbtb16*) im Mittelpunkt, dessen Genexpression in *Vhl*^{APT}/STZ-Mäusen signifikant schwächer war als in der Gruppe Kon/STZ (Abb. 4-19). *Zbtb16*, auch unter *PLZF* (*promyelocytic leukemia zinc finger*) bekannt, kodiert für einen Transkriptionsfaktor und ist an einer Fülle an physiologischen Prozessen wie der Hämatopoese (Maeda, 2016), der Stammzellerneuerung (Liu, Lee, Lim, & Shyh-Chang, 2016), der Spermatogenese (Costoya et al., 2004), der Entwicklung der Extremitäten (Barna, Hawe, Niswander, & Pandolfi, 2000; Liska et al., 2009) oder auch der Regulation des Metabolismus (Chen et al., 2014; Plaisier et al., 2012) involviert. Die Lokalisation beschränkt sich dabei besonders auf den Zellkern ZBTB16-exprimierender Zellen, wo ZBTB16 mit weiteren Molekülen interagiert und große Multiproteinkomplexe bildet, um die Rolle als vornehmlich transkriptioneller Genrepressor zu übernehmen. Immunhistochemische Färbungen aller vier Mausgruppen demonstrierten ein vermehrtes Vorhandensein von ZBTB16 in den Zellkernen der Glomeruli und den epithelialen Zellen entlang des distalen Nephrons vor allem in *Vhl*^{APT} und Kon/STZ (Abb. 4-22; A). Die densitometrische

Auswertung von Kernfraktionen (Abb. 4-22; B, AG Theilig) zeigte eine signifikante Abnahme der Proteinlevels von ZBTB16 bei Vhl^{APT}/STZ im Vergleich zu Kon/STZ und steht im Einklang mit den Ergebnissen der RNA-Seq. Zudem konnte man die stärksten Proteinlevels von ZBTB16 in Vhl^{APT} erkennen, die signifikant höher im Vergleich zu Kon waren. Dieser Unterschied wurde mittels der RNA-Seq nicht festgestellt. In diesem Fall muss ZBTB16 auf Proteinebene reguliert sein.

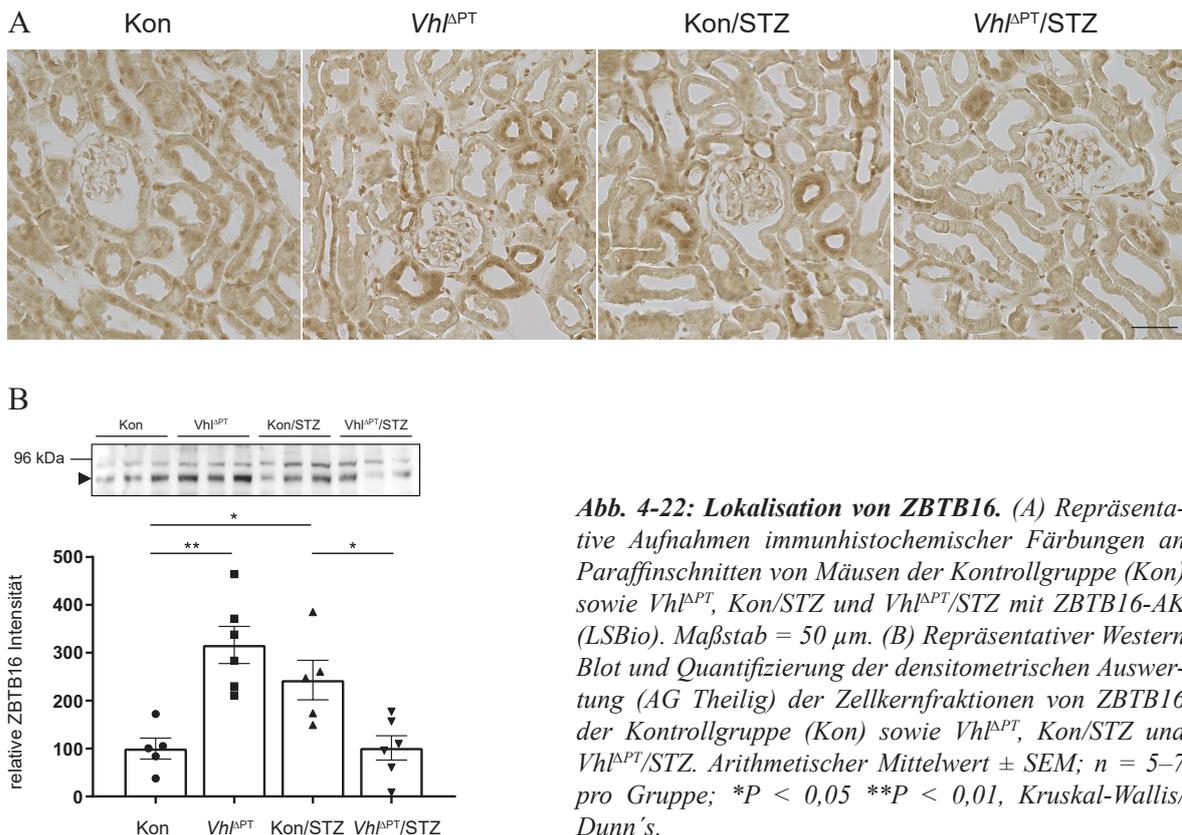


Abb. 4-22: Lokalisation von ZBTB16. (A) Repräsentative Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen an Paraffinschnitten von Mäusen der Kontrollgruppe (Kon) sowie Vhl^{APT} , Kon/STZ und Vhl^{APT}/STZ mit ZBTB16-AK (LSBio). Maßstab = 50 μ m. (B) Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der densitometrischen Auswertung (AG Theilig) der Zellkernfraktionen von ZBTB16 der Kontrollgruppe (Kon) sowie Vhl^{APT} , Kon/STZ und Vhl^{APT}/STZ . Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; n = 5–7 pro Gruppe; *P < 0,05 **P < 0,01, Kruskal-Wallis/Dunn's.

4.2.4.1 Funktionen von ZBTB16 im Zellkulturmodell

Um die vielen Facetten von ZBTB16 umfangreich untersuchen zu können, wurden stabile ZBTB16-exprimierende OK und TAL Zelllinien (als OK LV und TAL LV bezeichnet) hergestellt (siehe 3.2.9). Hierbei diente EmGFP als Reportergen bzw. die beiden Zelllinien OK LV +Ind +GFP \pm Dox sowie TAL LV +Ind +GFP \pm Dox im späteren Verlauf der Versuche als Kontrolle. Angaben zu Dauer der Doxycyclinbehandlung und Doxycyclinkonzentration schwanken in der Literatur stark. Übliche Inkubationen mit Doxycyclin (Dox) reichen von 24–72 h und die Konzentrationen von 0,01 μ g/ml bis 10 μ g/ml Dox. Um zunächst sicherzustellen, dass dieses System funktioniert, wurde sich für eine Dox-Konzentration von 5 μ g/ml entschieden und eine Zeitreihe der Inkubation mit Dox von 24–96 h durchgeführt. Die Analyse der Induktion der ZBTB16-Expression wurde anhand von Membranfraktionen von OK LV

und TAL LV mittels Western Blot durchgeführt (Abb. 4-23). Sofern nicht explizit erwähnt, erfolgte die Dox-Gabe sobald die Zellen Konfluenz erreichten. Zur Verhinderung zunehmender Instabilität von Dox und der damit verbundenen herabgesetzten Aktivität, wurde alle 24 h das Medium \pm Dox gewechselt. Die Induktion von ZBTB16 konnte bei OK LV und TAL LV nach 24 h deutlich gesehen werden und ZBTB16 blieb über eine Gesamtkubationsdauer von 96 h deutlich detektierbar (Abb. 4-23). Für OK LV zeigte die Detektion mit Aktin als Ladekontrolle Schwankungen in den untersuchten Proteinmengen. Daher ergaben sich, wie in Abbildung 4-23; A zu erkennen, schwächere Proteinbanden von ZBTB16 bei 48 h (Spur 6) aufgrund geringerer Gesamtproteinmengen beim Beladen des SDS-PAA-Gels. Bei einer Inkubationsdauer von 96 h konnte in OK LV und TAL LV eine geringe Abnahme an ZBTB16 erkannt werden (Abb. 4-23; A und B, Spur 9).

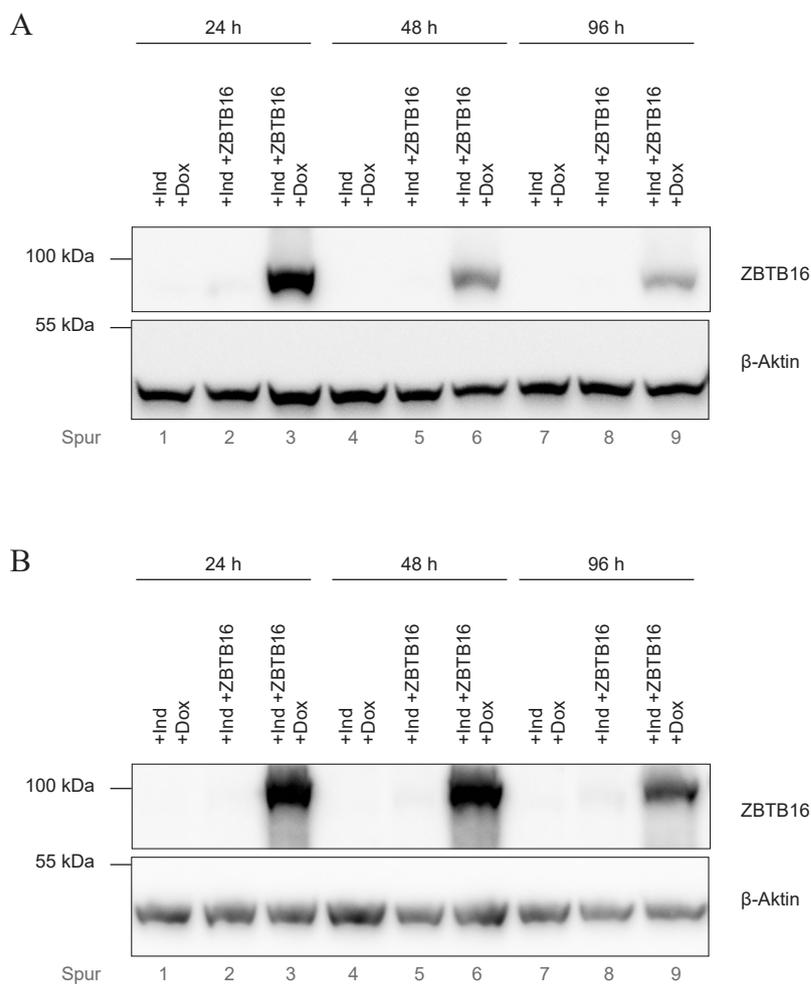


Abb. 4-23: Zeitreihe der Doxycyclin-abhängigen Induktion von ZBTB16 in OK LV und TAL LV Zellen. Western Blot Analysen von OK LV (A) und TAL LV (B) Zellen, die für 24 h, 48 h und 96 h vor der Aufarbeitung für die Membranfraktionen mit 5 μ g/ml Doxycyclin (+Dox) inkubiert wurden. ZBTB16 wurde mit ZBTB16-AK (Sigma) erwartungsgemäß bei +Ind +ZBTB16 +Dox sowohl in OK LV (A) als auch TAL LV (B) nachgewiesen, β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Obwohl die Inkubation mit Dox für 24 h ausreichend für die Expression von ZBTB16 war, wurde sich für eine Dauer von etwa 48 h entschieden. Dadurch konnte garantiert werden, dass die durch ZBTB16 induzierten Signalwege, besonders die „langsameren“, stabil in den Zellen ablaufen und zu untersuchende ZBTB16-Zielgene sicher auf Proteinebene detektierbar waren.

Nach Festlegung einer Dox-Inkubationsdauer von 48 h und einer Dox-Konzentration von 5 µg/ml wurden die OK LV und TAL LV Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 4-24 und 4-25). Es zeigte sich bei OK LV +Ind +ZBTB16 +Dox eine Transduktions-effizienz von etwa 60–70% (Abb. 4-24). ZBTB16 war distinkt vor allem im Zellkern und diffus im Zytoplasma exprimiert (Abb. 4-24; B, +Ind +ZBTB16 +Dox, rechts). Dieses typische Expressionsmuster im Zellkern ist mehrfach beschrieben und deutet auf aktives ZBTB16 hin (Bernardo, Yelo, Gimeno, Campillo, & Parrado, 2007; Ruthardt et al., 1998). Allerdings wiesen auch OK LV +Ind +ZBTB16 ohne Dox eine Hintergrundexpression (*leakiness*) von ZBTB16 auf, wenn auch nur zu etwa 2% (Abb. 4-24; B, +Ind +ZBTB16, links). Die Kontrollzelllinie OK LV +Ind +GFP zeigte erwartungsgemäß nach Dox-Gabe eine homogene Expression von EmGFP im Zytoplasma (Abb. 4-24; A, rechts). Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz konnten, wie im Vorversuch der Zeitreihe, mit der Methode des Western Blots bestätigt werden (Abb. 4-24; C). ZBTB16 wurde erwartungsgemäß nur in der Dox-behandelten Zelllinie +Ind +ZBTB16 +Dox detektiert (Abb. 4-24; C, oberstes Feld, Spur 4) ebenso GFP nur in der Dox-behandelten Zelllinie +Ind +GFP +Dox (Abb. 4-24; C, mittleres Feld, Spur 2).

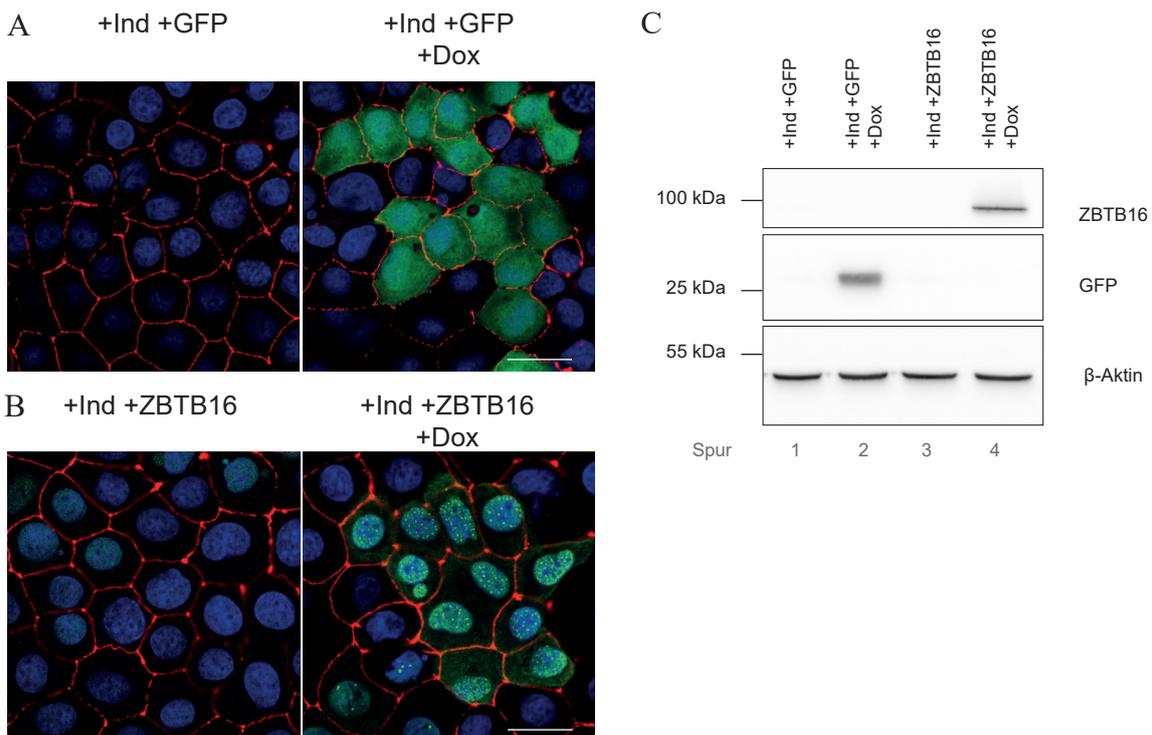


Abb. 4-24: Doxycyclin-abhängige Induktion von EmGFP (A, C) und ZBTB16 (B, C) in lentiviral veränderten OK Zellen. (A) Repräsentative konfokale Aufnahmen immunzytochemisch aufgearbeiteter OK LV Zellen, die auf Matrigel kultiviert wurden und durch Behandlung mit 5 µg/ml Doxycyclin für 48 h vor Fixierung eine Überexpression von EmGFP (+Ind +GFP +Dox; grün) im Zytoplasma zeigten. (B) Repräsentative konfokale Aufnahmen immunzytochemisch aufgearbeiteter OK Zellen, die durch Behandlung mit 5 µg/ml Doxycyclin für 48 h vor Fixierung eine Überexpression von ZBTB16 (+Ind +ZBTB16 +Dox; grün) besonders im Zellkern zeigten. Hierfür wurde der ZBTB16-AK (Sigma) verwendet. Die Darstellung der Zellgrenzen (rot) in (A) und (B) erfolgte mittels ZO-1-AK, die der Zellkerne (blau) mittels DAPI. Maßstab = 10 µm. (C) Western Blot Analysen von Membranfraktionen der unter (A) und (B) dargestellten OK LV Zellen. EmGFP wurde mit GFP-AK, und ZBTB16 mit ZBTB16-AK (Sigma) nachgewiesen, β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Gleiche Ergebnisse konnten auch mit der lentiviral veränderten TAL LV Zelllinie erzielt werden. Wie in Abbildung 4-25; A ersichtlich, führte die Induktion durch Dox zu einer starken Expression von ZBTB16 im Zellkern und in geringerem Maße im Zytoplasma (Abb. 4-25; A, +Ind +ZBTB16 +Dox, rechts). Die Transduktionseffizienz war dabei ähnlich der der OK LV +Ind +ZBTB16 +Dox. Auch hier zeigten vereinzelte TAL LV Zellen *leakiness* von ZBTB16 (Abb. 4-25; A, +Ind +ZBTB16, links). Die Induktion von ZBTB16 durch Dox konnte ebenfalls in der Membranfraktion mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 4-25; B).

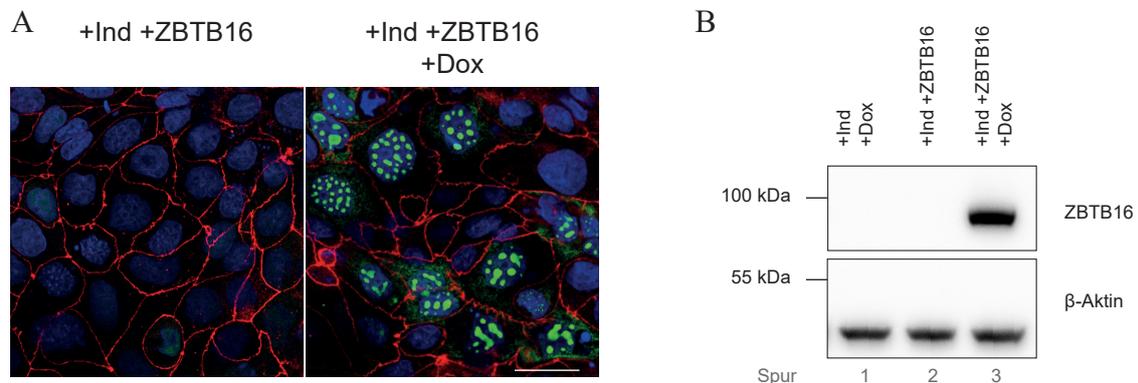


Abb. 4-25: Doxycyclin-abhängige Induktion von ZBTB16 in lentiviral veränderten TAL Zellen. (A) Repräsentative konfokale Aufnahmen immunzytochemisch aufgearbeiteter TAL LV Zellen, die auf Matrigel kultiviert wurden und durch Behandlung mit 5 µg/ml Doxycyclin für 48 h vor Fixierung eine Überexpression von ZBTB16 (+Ind +ZBTB16 +Dox; grün) besonders im Zellkern zeigten. Hierfür wurde der ZBTB16-AK (Sigma) verwendet. Die Darstellung der Zellgrenzen (rot) erfolgte mittels ZO-1-AK, die der Zellkerne (blau) mittels DAPI. Maßstab = 10 µm. (B) Western Blot Analysen von Membranfraktionen der unter (A) dargestellten TAL LV Zellen. ZBTB16 wurde mit ZBTB16-AK (Sigma) nachgewiesen, β-Aktin diente als Ladekontrolle.

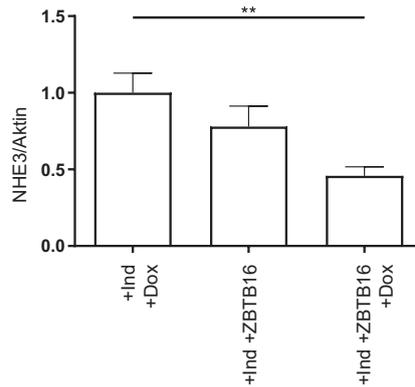
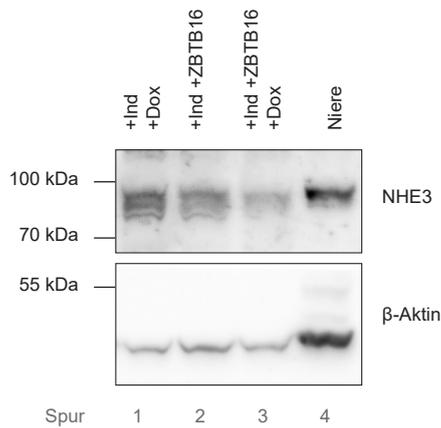
Den Ergebnissen entsprechend wurden sowohl die OK LV als auch die TAL LV Zelllinien als ein geeignetes induzierbares Zellkultursystem für ZBTB16 verifiziert und wurden für nachfolgend erläuterte Versuche verwendet, um die Funktion von ZBTB16 weiter zu charakterisieren. Um die Expression von ZBTB16 zu erzielen, wurden, wenn nicht anders angegeben, die Zellen vor der Analyse für etwa 48 h mit 5 µg/ml Dox behandelt.

Zahlreiche Veröffentlichungen belegen, dass ZBTB16 eine Rolle im zellulären Energiestatus (Cheng, Pablico, Lee, Chang, & Yu, 2020; Plaisier et al., 2012; Seda et al., 2017), in der Autophagie (T. Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2017) und im Zellmetabolismus (Seda et al., 2017; Skolnikova et al., 2020) spielt. Aus diesem Grund wurden im lentiviralen Zellkulturmodell (a) Transporter analysiert, (b) die Zellatmung gemessen, (c) die Autophagie und (d) Zellproliferation studiert sowie (e) ausgewählte Gene auf Transkriptionsebene untersucht.

(a) ZBTB16 und Natrium- und Glukosetransporter

Die zu Beginn des Kapitels 4.2 beschriebenen Untersuchungen typischer Diabetes-regulierter Transporter anhand immunhistochemischer Färbungen und Western Blot Analysen ergab für SGLT2, im S1 und S2 des PT exprimiert, keine signifikanten Veränderungen zwischen allen vier Mausgruppen (Abb. 4-15; A). Dahingegen zeigte sich eine signifikante Erhöhung von NHE3 und NKCC2 in den beiden diabetischen Gruppen Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ verglichen mit der Kontrollgruppe Kon (Abb. 4-15; C und D). NHE3 ist sowohl in proximalen als auch im distalen Nierentubulus exprimiert, NKCC2 im *Pars recta* des distalen Tubulus. Es stellte sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor ZBTB16 in die Regulation der Expression dieser drei genannten Transporter eingreift. Hierzu wurden die etablierten lentiviralen OK LV und TAL LV Zelllinien zur Klärung dieser Frage benutzt. OK Zellen repräsentieren am besten die Physiologie des PT und eignen sich daher gut für Untersuchungen der beiden Transporter SGLT2 und NHE3. OK LV +Ind, die als Kontrolle dienten, und OK LV +Ind +ZBTB16 wurden mit Dox behandelt. Im Anschluss wurden Membranfraktionen gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Aufgrund bekannter Schwierigkeiten im Umgang mit OK Zellen in Hinblick auf die Antigen-Erkennung durch verfügbare Antikörper ebenso bekannter Abweichungen im Laufverhalten der Proteine durch posttranslationale Modifikationen, vor allem Glykosilierungen, wurde als Positivkontrolle eine Membranfraktion einer Mausniere mitgeführt. Wie in Abbildung 4-26; A zu erkennen, konnte NHE3 in allen Membranfraktionen aller Versuchsgruppen, wenn auch mit geringerer apparenter Molekülmasse im Vergleich zu murinen NHE3, detektiert werden. Dabei wurde ein signifikant negativer Einfluss von ZBTB16 auf NHE3 festgestellt. Inwiefern ZBTB16 auf SGLT2 einwirkt, wurde in gleicher Weise mittels Western Blot untersucht (Abb. 4-26; B). Es konnte mit dem vorhandenen SGLT2-Antikörper keine spezifischen SGLT2-Proteine in OK Zellen detektiert werden. Eine deutliche Erhöhung der Proteinmengen und der Anti-körper-Konzentration führte dabei zu keiner Verbesserung, weswegen sich keine Aussage über den Einfluss von ZBTB16 auf SGLT2 treffen ließ.

A



B

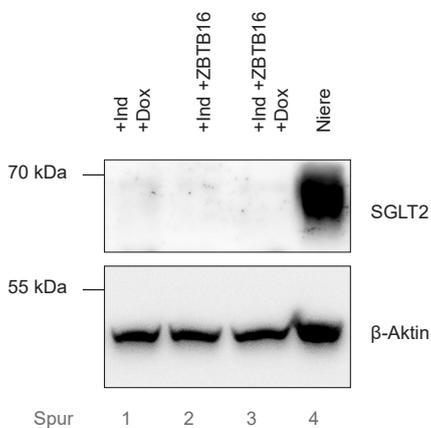


Abb. 4-26: Einfluss von ZBTB16 auf die Transporter NHE3 (A) und SGLT2 (B) in OK LV Zellen. OK LV +Ind und OK LV +Ind +ZBTB16 wurden für 48 h mit 5 µg/ml Doxycyclin (+Dox) behandelt bevor die Zellaufarbeitung für die Membranfraktion stattfand und diese mittels Western Blot untersucht wurde. Die Membranfraktion einer Mausniere (Spur 4) diente als Positivkontrolle für die Signal-Detektion beider Transporter mittels entsprechender Antikörper. Die Zelllinie OK LV +Ind +Dox diente als Referenz und β-Aktin als Ladekontrolle. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot für NHE3 (A; links) und SGLT2 (B). Die Quantifizierung der densitometrischen Auswertung relativ zu β-Aktin erfolgte nur für NHE3 (A; rechts). Arithmetischer Mittelwert ± SEM; n = 9; **P < 0,01; Kruskal-Wallis/Dunn's. Auf eine Quantifizierung von SGLT2 wurde verzichtet.

Aus diesem Grund wurde eine qPCR durchgeführt und auf Transkriptebene neben *Slc5a2* (kodiert für SGLT2) zusätzlich *Slc9a3* (kodiert für NHE3) untersucht (Abb. 4-27). Der dafür genutzte Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green lagert sich in doppelsträngige DNA und somit auch in nicht-spezifische PCR-Produkte ein, was zu Amplifikations- bzw. Fluoreszenzartefakten führt. Deshalb wurden zuvor die entsprechenden PCR-Parameter ermittelt, die zu einer spezifischen Amplifikation der DNA führen. Hierfür wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sind in Abbildung 4-27 jeweils links der Diagramme dargestellt. Auf mRNA-Ebene wurde eine signifikante Abnahme der Genexpression von OK LV +Ind +ZBTB16 +Dox im Vergleich zur Kontrollzelllinie OK LV +Ind +GFP +Dox bei dem Transporter *Slc9a3* (NHE3) festgestellt. Dieser lag prozentual gesehen allerdings nur bei etwa 8%. Dennoch steht das Ergebnis nicht im Widerspruch mit den Ergebnissen auf Proteinebene (Abb. 4-26; A). Die Untersuchung von *Slc5a2* (SGLT2) zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4-27, B). Somit agiert ZBTB16 als (transkriptioneller) Repressor betreffend *Slc9a3* bzw. NHE3, beeinflusst die Genregulation von *Slc5a2* in OK LV Zellen allerdings nicht.

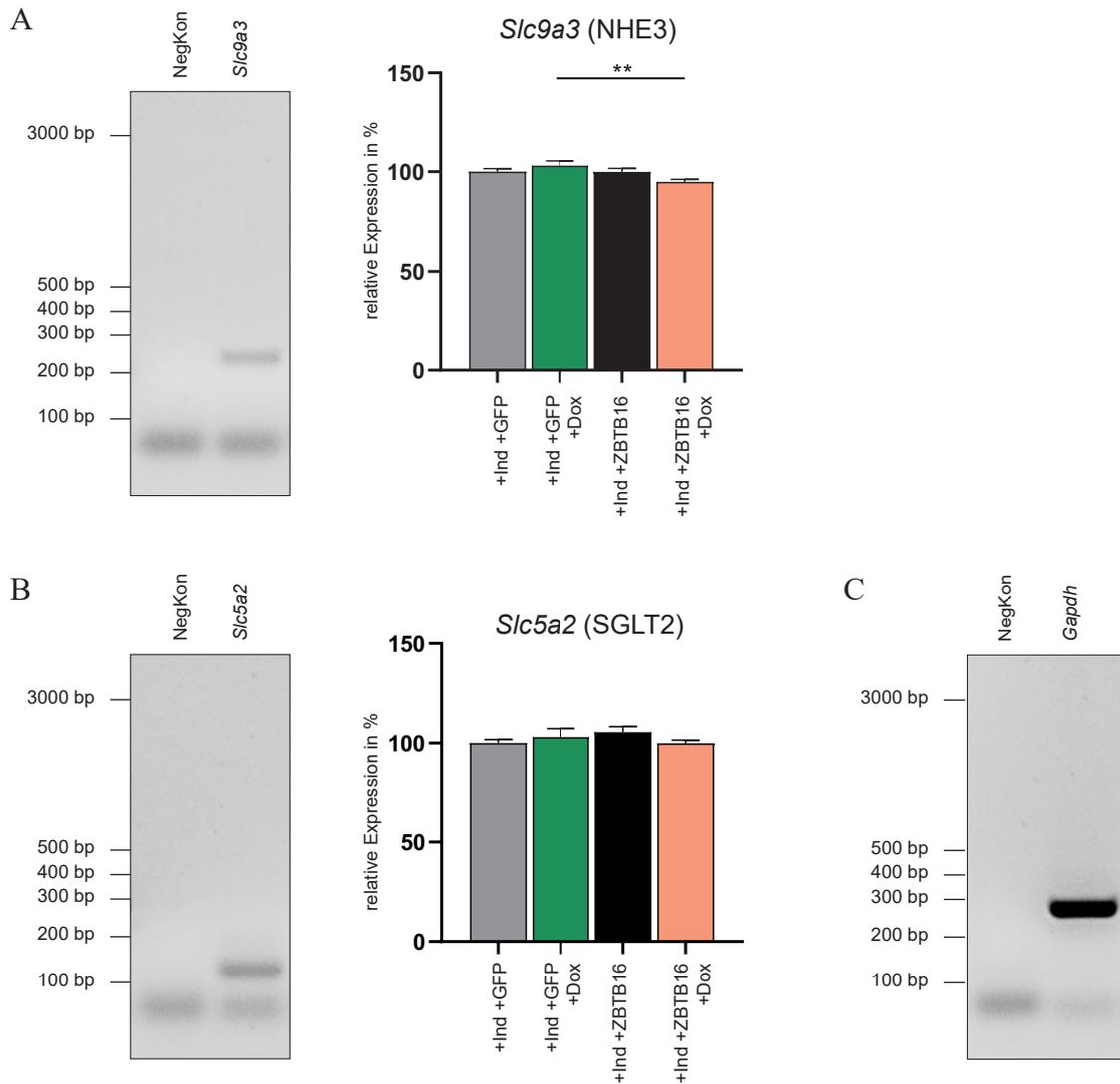


Abb. 4-27: Einfluss von ZBTB16 auf die Genexpression von Slc9a3/NHE3 (A) und Slc5a2/SGLT2 (B) in OKLV Zellen. OKLV +Ind +GFP und OKLV +Ind +ZBTB16 wurden für 48 h mit 5 µg/ml Doxycyclin (+Dox) behandelt. RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relativen Transkriptmengen von Slc9a3 (A) und Slc5a2 (B) wurden mittels qPCR bestimmt und gegen Gapdh (C) normalisiert (Diagramme rechts). Zuvor wurde die spezifische Amplifikation jedes Gens mittels DNA-Agarosegelen sichergestellt (links). Arithmetischer Mittelwert ± SEM; n = 9; **P < 0,01; Kruskal-Wallis/Dunn's. NegKon = Negativkontrolle.

Ebenso wurden TAL LV Zellen mittels Western Blot auf einen möglichen regulatorischen Zusammenhang zwischen ZBTB16 und der beiden Transporter NHE3 und NKCC2 untersucht. Es konnten distinkte Proteinbanden von NHE3 mit TAL LV Zellen detektiert werden, die allerdings ein deutlich anderes Laufverhalten im SDS-PAA-Gel zeigten verglichen zur murinen Niere als Positivkontrolle (Abb. 4-28; A). Ob diese Signale spezifisch sind, ist daher fraglich. NKCC2 konnte in den Membranfraktionen der TAL LV Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 4-28; B), obwohl sie ein oft genutztes Modell für Untersuchungen des distalen Tubulus darstellen. Vermutlich war die Proteinexpression des Transporters zu

gering, als dass dieser mit dem verfügbaren NKCC2-Antikörper detektierbar war. Durch die Untersuchungen von *Slc12a1* (kodiert für NKCC2) mittels qPCR konnten keine ausreichenden Transkriptmengen in TAL LV Zellen detektiert werden (ohne Abbildung), was die Ergebnisse auf Proteinebene erklären könnte.

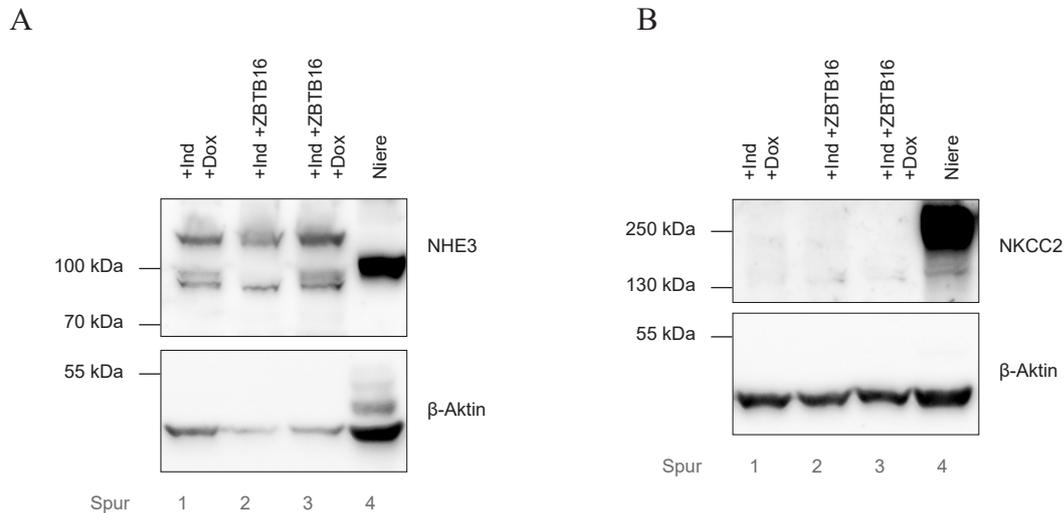


Abb. 4-28: Einfluss von ZBTB16 auf die Transporter NHE3 (A) und NKCC2 (B) in TAL LV Zellen. TAL LV +Ind und TAL LV +Ind +ZBTB16 wurden für 48 h mit 5 μ g/ml Doxycyclin (+Dox) behandelt bevor die Zellaufarbeitung für die Membranfraktion stattfand und diese mittels Western Blot untersucht wurde. Die Membranfraktion einer Mausniere (Spur 4) diente als Positivkontrolle für die Signal-Detektion beider Transporter mittels entsprechender Antikörper. Das SDS-PAA-Gel der Proben für NKCC2 wurde für 3 h geblottet. Die Zelllinie TAL LV +Ind +Dox diente als Referenz und β -Aktin als Ladekontrolle. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot für NHE3 (A) und NKCC2 (B). $n = 11$. Auf eine Quantifizierung wurde verzichtet.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, führte die Überexpression von ZBTB16 in OK LV Zellen zu einer Reduktion des Transporters NHE3. Ob ZBTB16 einen Effekt auf die Proteinsynthese und -stabilität der Transporter NKCC2 und SGLT2 hat, konnte nicht geklärt werden. Eine direkte Beteiligung von ZBTB16 an der Regulation von NHE3, SGLT2 und NKCC2 ist bisher nicht beschrieben.

Anmerkungen zur Auswertung anschließender Versuche: Zu Beginn der Arbeit mit den lentiviral veränderten OK und TAL Zellen dienten die einfach transduzierten Zelllinien +Ind +Dox als Referenz. Im Laufe der Dissertation wurde der Fokus auf die OK LV Zelllinien gelegt und die Zelllinie +Ind +GFP \pm Dox als Referenz benutzt, weil diese, wie auch +Ind +ZBTB16 \pm Dox, zwei Mal mit Lentiviren transduziert ist. Die Bevorzugung der OK LV Zellen lag darin begründet, dass der *knockout* von *Vhl* im S1 und S2 des PT erzielt wurde und mögliche Auswirkungen primär dort erwartet wurden. OK Zellen repräsentieren am besten die Eigenschaften des PT. In einigen Zelllinien wird von Effekten von Dox auf Mitochondrien und dadurch bedingte Änderungen im Zellmetabolismus berichtet

(Ahler et al., 2013; Brattsand, 2020; Luger et al., 2018; Moullan et al., 2015). Diesbezüglich wurden stets alle vier OK LV Zelllinien gemeinsam für Experimente verwendet. Zur Interpretation der Ergebnisse war es hilfreich uninduzierte und induzierte Zelllinien zu betrachten, um einen möglichen, wenn auch sehr geringen, Einfluss von Dox auszuschließen. Jedoch war nur der Vergleich und die Auswertung der Dox-behandelten Zelllinien (OK LV +Ind +GFP +Dox und OK LV +Ind +ZBTB16 +Dox) relevant.

(b) ZBTB16 und Zellatmung

Bei der DN unterliegt der PT nicht nur hyperglykämischen Bedingungen, sondern ist auch einer Nährstoffüberladung durch die Hyperfiltration des Glomerulus ausgesetzt. Zur Aufrechterhaltung der tubuloglomerulären Balance, kommt es zu einer gesteigerten Reabsorption am PT. Die gesteigerte Reabsorption bedingt wiederum einen erhöhten Sauerstoffverbrauch um damit Energie in Form von ATP in Mitochondrien zu bilden. Kommt es zu einem Ungleichgewicht aus Sauerstoffverfügbarkeit und -verbrauch, kann dies zu hypoxischen Bedingungen im PT führen (Layton, Vallon, & Edwards, 2015; Vallon, 2011) – ein Kennzeichen der DN. In diesem Zusammenhang stehen verschiedene Studien mit ZBTB16. In braunem Fettgewebe reguliert ZBTB16 die Anzahl und Aktivität von Mitochondrien und damit verbunden den Sauerstoffverbrauch (Plaisier et al., 2012). Ebenso beeinflusst ZBTB16 die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch das Entkoppeln der mitochondrialen Atmungskette in natürlichen Killerzellen des Bluts (Kim, Kumar, Chang, & Pyaram, 2017; Kumar et al., 2019). Aus diesem Grund wurden Untersuchungen des Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit von ZBTB16 an OK LV Zellen durchgeführt. OK LV Zellen wurden, wie

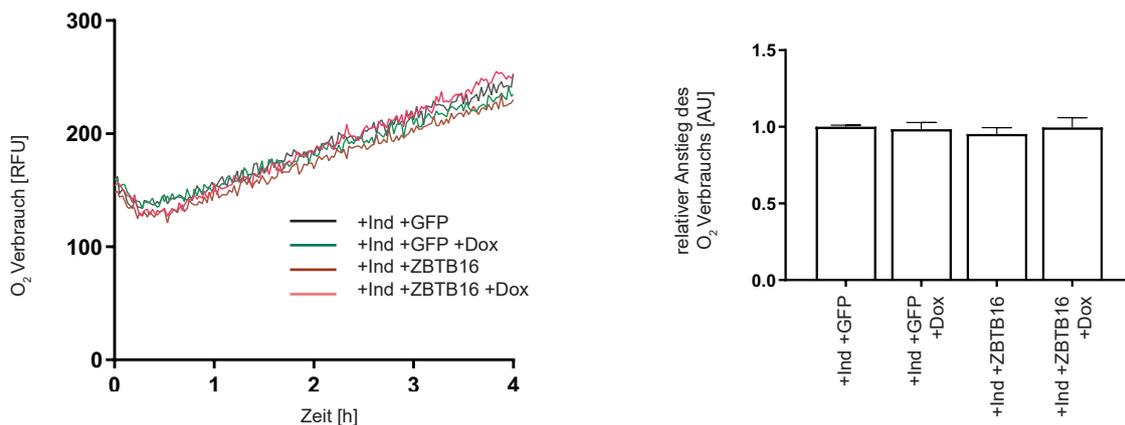


Abb. 4-29: ZBTB16 führt zu keiner Veränderung des Sauerstoffverbrauchs in OK Zellen. OK LV +Ind +GFP und OK LV +Ind +ZBTB16 wurden 72 h vor der Messung des Sauerstoffverbrauchs für 24 h mit Doxycyclin (+Dox) behandelt, um die Expression von GFP bzw. ZBTB16 zu induzieren. Der Sauerstoffverbrauch (repräsentativer Graph links) wurde in Echtzeit ermittelt. Die Quantifizierung (rechts) erfolgte durch die Bestimmung der Anstiege „m“ der Graphen. RFU: relativ fluorescence units; AU: arbitrary units. Arithmetischer Mittelwert ± SEM; n = 5–6. Kruskal-Wallis/Dunn's.

unter Punkt 3.2.13 beschrieben, kultiviert. Die Zelllinien OK LV +Ind +GFP ± Dox dienten als Kontrolle. Die Überexpression von ZBTB16 in OK LV +Ind +ZBTB16 +Dox führte zu keiner signifikanten Veränderung der Sauerstoffverbrauchsrate (Abb. 4-29). Gleiche Resultate wurden mit TAL LV Zellen, die weniger im Fokus dieser Untersuchung standen, erhalten (ohne Abbildung). Folglich hat ZBTB16 in OK (und TAL) Zellen keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch.

Aufgrund der neuen Erkenntnisse aus den Versuchen des Kapitels 4.2.4 (Abbildung 4-21; A), dass das durch LDC1 gebildete IPA zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs führt, wurde eine Wechselwirkung zwischen IPA und ZBTB16 untersucht. Es stand die Frage im Raum, ob die Induktion der Proteinexpression von ZBTB16 den Effekt von IPA aufhebt oder gar erhöht. Hierzu wurden erneute OCR-Messungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt allerdings in An- bzw. Abwesenheit von 1 mM IPA während der Messung. IPA erhöhte wie auch in den Versuchen mit OK Wildtypzellen (Abb. 4-21; A) in allen vier OK LV Zelllinien den Sauerstoffverbrauch in gleichem Maße (ohne Abbildung). Es ist daher von keiner Abhängigkeit zwischen ZBTB16 und IPA auszugehen.

(c) ZBTB16 und Autophagie

In Zellen, die unter oxidativen Stress stehen oder sich in einer Energiemangel-Situation befinden, erfolgt vermehrt Autophagie. Autophagie stellt einen wichtigen Prozess im Erhalt der intrazellulären Homöostase dar (Kumar et al., 2019). Sie dient vorwiegend der Beseitigung geschädigter Proteine oder gesamter Organellen. Anfallende Abbauprodukte, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und Lipide werden u. a. zur Energiegewinnung genutzt. Publikationen belegen einen reprimierenden Effekt von ZBTB16 auf die Autophagie (Abdelrahman, Hamilton, Vasefi, & Ferguson, 2018; T. Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2017), den es näher zu untersuchen galt. Ein weit verbreiteter biologischer Marker zur Identifikation der Autophagie ist das Protein LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), das Bestandteil der Membran von Autophagosomen ist. Genauer betrachtet wird während des Autophagieprozesses zytosolisches LC3I an Phosphatidylethanolamin konjugiert und es entsteht LC3II. LC3II wird dann in die Membran der Autophagosomen eingebaut (Pugsley, 2017; Tanida, Ueno, & Kominami, 2008). Die Menge an LC3II korreliert stark mit der Anzahl an Autophagosomen und stellt daher einen guten Indikator der Autophagosomenformation und somit der Autophagie dar (Kabeya et al., 2000). Um herauszufinden, ob ZBTB16 die Autophagie beeinflusst, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Als Proben dienten OK LV +Ind +GFP/+ZBTB16 Zellen, die 48 h vor Aufarbeitung mittels Nuclear Extract Kit mit 5 µg/ml Dox behandelt wurden. Die resultierende zytoplasmatische Fraktion wurde zur Untersuchung der Autophagie mittels LC3A/B-Antikörper, die lösliche Kernfraktion zur Untersuchung der Zellproliferation (siehe Punkt d) benutzt. Die Auswertung erfolgte anhand der densitometrischen Messung der Proteinbanden im Bereich von

14 kDa, die LC3II entsprechen (Abb. 4-30; A, Pfeilkopf). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Autophagosomenbildung bei Überexpression von ZBTB16 im Vergleich zur Dox-behandelten Kontrolle +Ind +GFP +Dox (Abb. 4-30; A, Spur 2 und 4 sowie B). Somit konnten bestehende Daten verschiedener Publikationen bestätigt werden.

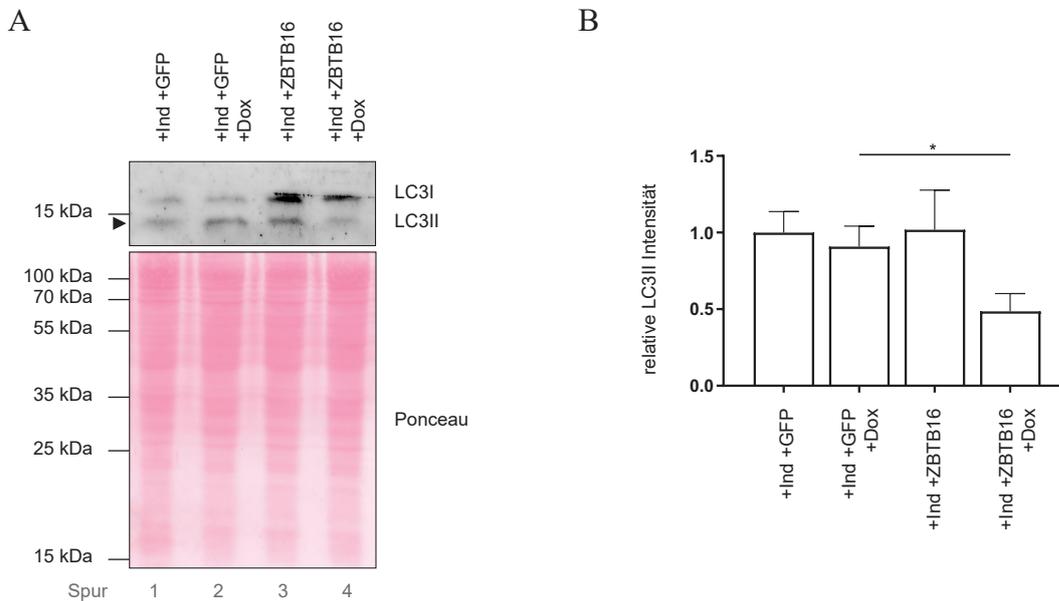


Abb. 4-30: ZBTB16 hemmt die Autophagie von OK LV Zellen. OK LV +Ind +GFP und OK LV +Ind +ZBTB16 wurden für 48 h mit 5 µg/ml Doxycyclin (+Dox) behandelt bevor die Zellaufarbeitung für die zytoplasmatische Fraktion stattfand und diese mittels Western Blot untersucht wurde. (A) Exemplarischer Western Blot der Detektion von LC3I und LC3II mit dem LC3A/B-AK. Die Ponceau-Färbung des Western Blots (unteres Feld) zeigte gleiche Mengen an Zytoplasmaproteinen. Der Nachweis der Induktion von ZBTB16 durch Doxycyclin erfolgte in der löslichen Zellkernfraktion gleicher Proben (siehe Abb. 4-31). (B) Quantifizierung der densitometrischen Auswertung von LC3II. Arithmetischer Mittelwert ± SEM; n = 6; *P < 0,05; Kruskal-Wallis/Dunn's.

(d) ZBTB16 und Zellproliferation

Für ZBTB16 sind abhängig von der Zelllinie konträre Einflüsse auf die Zellproliferation beschrieben. Beispielsweise erhöht ZBTB16 die Proliferation einiger Krebszelllinien des Kolons, der Niere und der Lunge als auch von HEK293 Zellen (Choi et al., 2014). In hämatopoetischen Zellen und Melanomzellen hingegen führt die Aktivität des Transkriptionsfaktor zur Verminderung (He et al., 2020; McConnell et al., 2003). Daher wurde die Auswirkung der Überexpression von ZBTB16 auf die Proliferationsrate von OK LV Zellen untersucht. Bereits während der Versuchsdurchführung der OCR-Messung (siehe Punkt „(b) ZBTB16 und Zellatmung“) zeigte sich in den ersten 12 h nach Aussäen der Zellen in eine 96-well Platte eine mutmaßlich erhöhte Zelldichte der OK LV +Ind +ZBTB16. Zur Vermeidung eines subjektiven Faktors durch eine Auswertung mittels Neubauer-Zählkammer, wurde die Proliferation auf zwei andere Arten bestimmt: Western Blot

und CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Für erstere Methode wurden die unter Punkt „(c) ZBTB16 und Autophagie“ gewonnen löslichen Zellkernfraktionen benutzt. Die Proteinbanden wurden mit dem PCNA(*proliferating cell nuclear antigen*)-Antikörper, ein Proliferationsmarker, detektiert (Abb. 4-31; A, 2. Feld von oben). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate von OK LV +Ind +ZBTB16 +Dox im Vergleich zur Kontrollzelllinie OK LV +Ind +GFP +Dox festgestellt werden (Abb. 4-31; B). Allerdings zeigte sich eine höhere proliferative Basalaktivität bei +Ind +ZBTB16 ohne Dox verglichen zu +Ind +GFP ohne Dox ebenso ein scheinbar förderlicher Effekt von Dox auf die Zellproliferation beider Zelllinien.

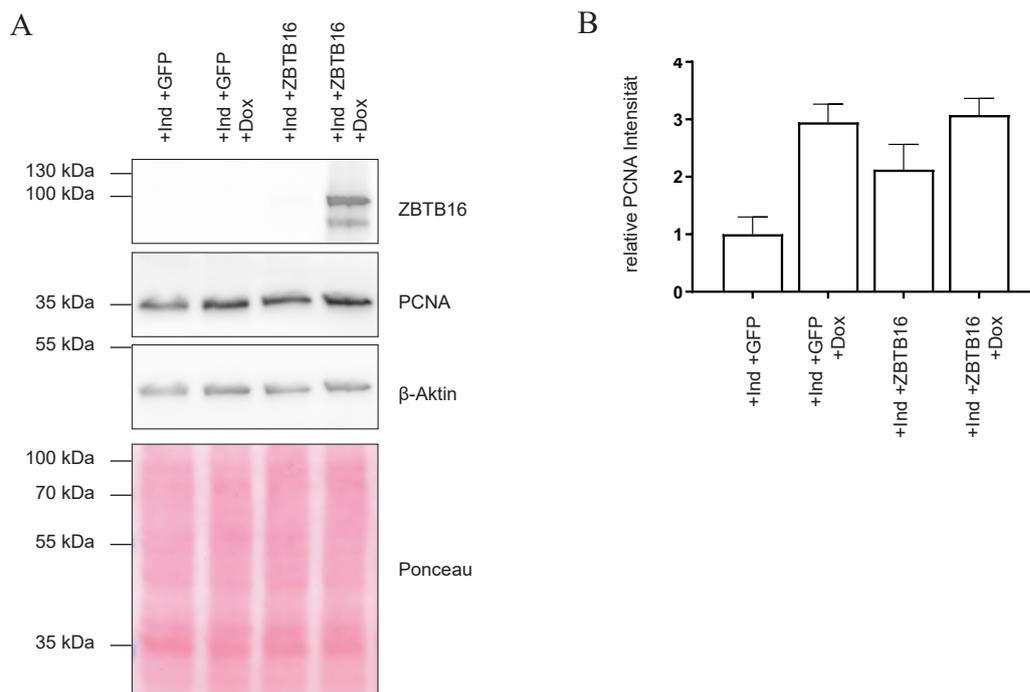


Abb. 4-31: Einfluss von ZBTB16 auf die Zellproliferation von OK LV Zellen. OK LV +Ind +GFP und OK LV +Ind +ZBTB16 wurden für 48 h mit 5 µg/ml Doxycyclin (+Dox) behandelt bevor die Zellaufarbeitung für die lösliche Zellkernfraktion stattfand und diese mittels Western Blot untersucht wurde. (A) Exemplarische Western Blot Analyse der Detektion der abgebildeten Proteine mit den entsprechenden Antikörpern. ZBTB16 diente als Nachweis der Induktion durch Doxycyclin. Die Ponceau-Färbung des Western-Blots (unterstes Feld) zeigte gleiche Mengen an Zellkernproteinen, β-Aktin diente als zusätzliche Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der densitometrischen Auswertung von PCNA. Arithmetischer Mittelwert ± SEM; n = 4. Kruskal-Wallis/Dunn's.

Die mittels CellTiter-Blue® erhobenen Daten erbrachten ähnliche Ergebnisse. Da es sich bei dieser Methode um eine Endpunktmessung handelt, wurden OK LV Zellen entsprechend Punkt 3.2.15 für vier Messtage ausgesät und alle 24 h gemessen. Dox wurde sofort beim Ausbringen der Zellen in das Zellkulturmedium gegeben und nach 48 h wurden die Zellen ohne Dox für weitere 48 h kultiviert. Aufgrund methodenbedingter starker Messunterschiede zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen wurde innerhalb eines Versuches auf OK

LV +Ind +GFP normiert. Die Aktivität von ZBTB16 führte zu einem geringen, nicht signifikanten, Anstieg in der Proliferation von OK Zellen. Erkennbar ist dies in Abbildung 4-32 durch den Vergleich des Graphen +Ind +GFP +Dox (grün) mit dem Graphen +Ind +ZBTB16 +Dox (pink). Hiermit werden die Ergebnisse aus den Western Blot Analysen bestätigt, die ebenfalls keinen signifikanten Effekt von ZBTB16 ergaben. Gleichfalls wurde auch hier eine initial erhöhte Zellzahl bei der ersten Messung nach 24 h bei +Ind +ZBTB16 (Abb. 4-32, schwarzer Graph im Vergrößerungskreis) im Vergleich zu +Ind +GFP (Abb. 4-32, grauer Graph im Vergrößerungskreis) festgestellt. Jedoch zeigte sich eine Diskrepanz zwischen Western Blot und CellTiter: Die Inkubation mit Dox zeigte im Western Blot eine Erhöhung der Proliferation innerhalb der Zelllinie +Ind +GFP bzw. +Ind +ZBTB16. Die Auswertung mittels CellTiter zeigte eine Erniedrigung. Dies könnte in den unterschiedlichen Zeitpunkten der Dox-Gabe begründet sein.

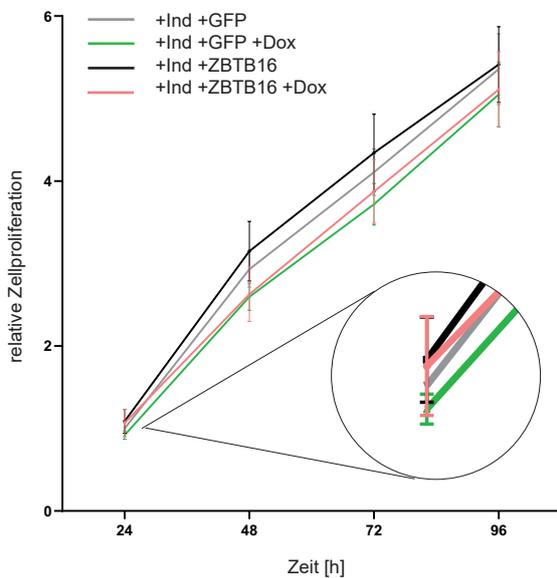
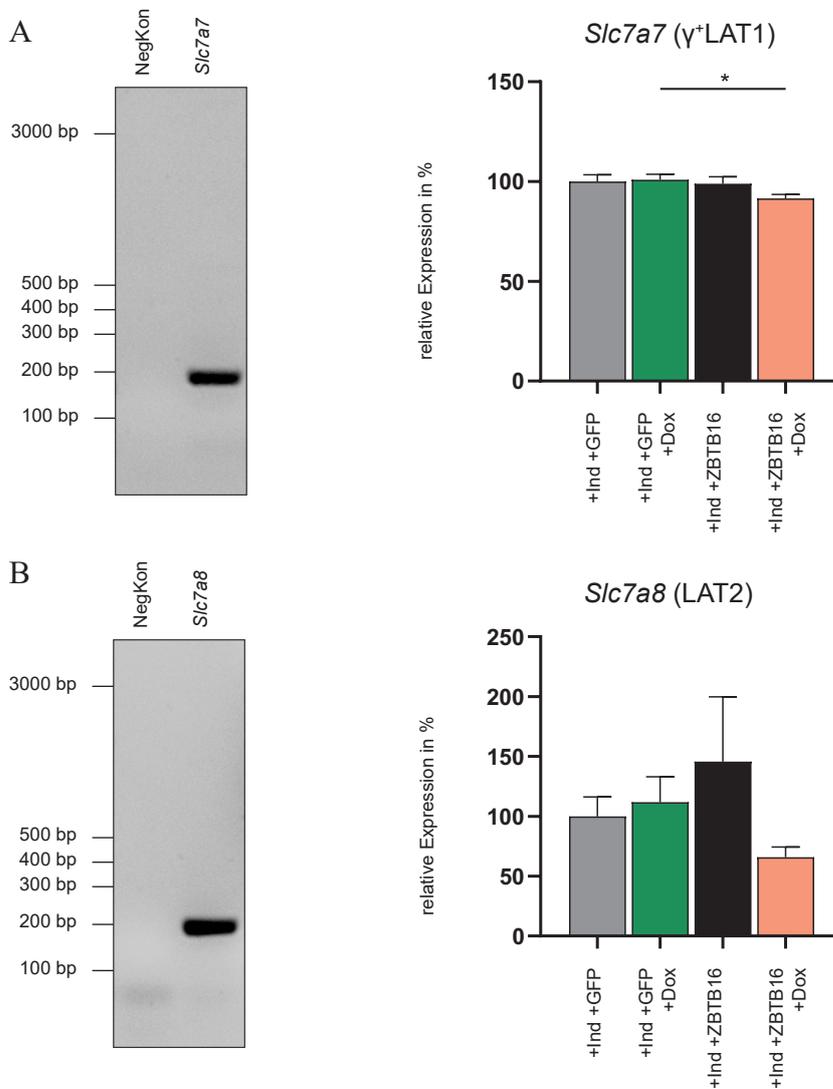


Abb. 4-32: ZBTB16 zeigt einen geringen Einfluss auf die Zellproliferation. 1×10^4 Zellen von OK LV +Ind +GFP und OK LV +Ind +ZBTB16 wurden ohne und mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin (+Dox) ausgebracht. 24 h später erfolgte die erste Messung der Zellproliferation. 48 h später erfolgte die zweite Messung und die Weiterkultivierung der Zellen ohne Doxycyclin. Es wurde eine dritte (72 h) und vierte (96 h) Messung durchgeführt. Die Vergrößerung im Kreis zeigt die Messpunkte nach 24 h (näheres siehe Text). Die Normierung wurde innerhalb eines jeden der sechs Versuche gegen +Ind +GFP durchgeführt. Arithmetischer Mittelwert \pm SEM; $n = 6$. Kruskal-Wallis/Dunn's.

(e) ZBTB16 und die Genregulation von *Slc7a7*, *Slc7a8*, *Notch1*, *Tgfb* und *Lrp2*

Von ausgewählten Genen, die durch die RNA-Seq identifiziert wurden und zwischen den Mausgruppen unterschiedlich reguliert waren (Abb. 4-18; B, pinke Pfeile) und von weiteren Genen, die im Zusammenhang mit DN stehen, wurden die Transkriptionslevel mittels qPCR bestimmt. Zuvor erfolgte die Verifikation der spezifischen Amplifikation mittels eines DNA-Agarosegels, wie für *Slc5a2* (SGLT2) und *Slc9a3* (NHE3) beschrieben (siehe Abb. 4-27). Die entsprechenden DNA-Agarosegele sind jeweils links neben dem dazugehörigen Diagramm in Abbildung 4-33 zu sehen. Bei den untersuchten Genen handelte es sich um die beiden Aminosäuretransporter *Slc7a7*, kodiert für γ^+ LAT1, und *Slc7a8*, kodiert für LAT2. Ebenso wurden *Lrp2*, kodiert für den Rezeptor Megalin, und *Notch1* sowie *Tgfb* untersucht. Alle diese Gene sind für die Funktion des renalen Epithels relevant und zeigten in der RNA-Seq in allen drei Mausgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe Kon eine höhere (zum Teil

signifikante) Genexpression. Mithilfe dieses Versuches wurde ein Effekt von ZBTB16 auf die Transkription der genannten Gene geklärt. Die Auswertung der qPCR ergab für den Aminosäuretransporter *Slc7a7* eine signifikante Reduktion der Transkriptionslevel durch ZBTB16 (Abb. 4-33; A). Jedoch war die Reduktion im Vergleich zu OK LV +Ind +GFP +Dox prozentual betrachtet bei nur etwa 8%. Für *Slc7a8* und *Lrp2* konnte ebenfalls, verglichen zur Kontrollgruppe +Ind +GFP +Dox, eine Reduktion gesehen werden, die aufgrund des starken Standardfehlers nicht signifikant war (Abb. 4-33; B, C). ZBTB16 beeinflusste die Transkriptionslevel von *Notch1* nicht (Abb. 4-33; D). Bei *Tgfb β* konnte eine geringe, nicht signifikante, Zunahme bei Überexpression von ZBTB16 gesehen werden im Vergleich zu +Ind +GFP +Dox (Abb. 4-33; E).



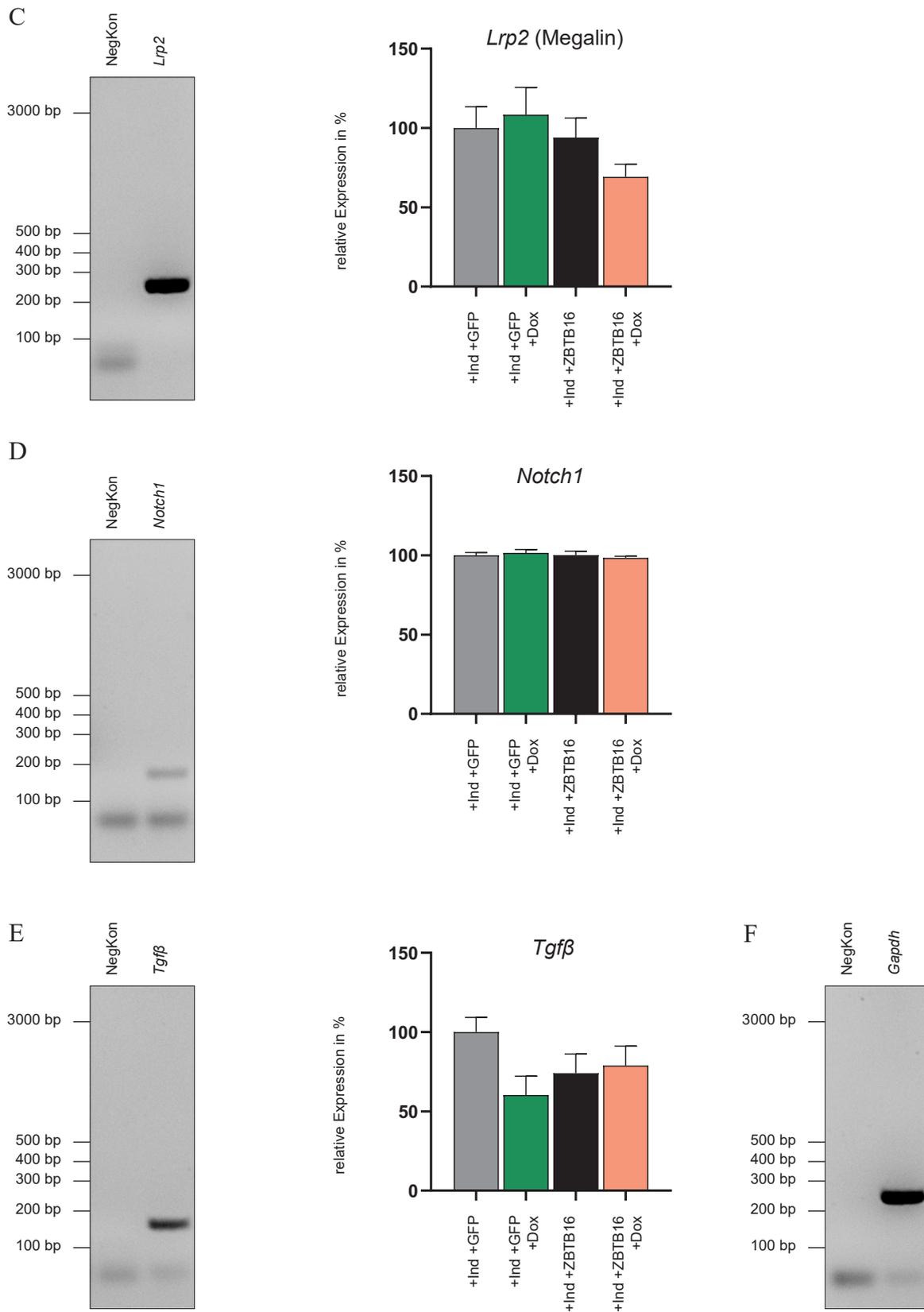


Abb. 4-33: Einfluss von ZBTB16 auf die Genexpression ausgewählter Gene in OK LV Zellen. OK LV +Ind +GFP und OK LV +Ind +ZBTB16 wurden für 48 h mit 5 µg/ml Doxycyclin (+Dox) behandelt. RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relativen Transkriptmengen von *Slc7a7* (A), *Slc7a7* (B), *Lrp2* (C), *Notch1* (D) und *Tgfb* (E) wurden mittels qRT-PCR bestimmt und gegen *Gapdh* (F) normalisiert (Diagramme rechts). Zuvor wurde die spezifische Amplifikation jedes Gens mittels DNA-Agarosegels sichergestellt (links). Arithmetischer Mittelwert ± SEM; n = 9; *P < 0,05; Kruskal-Wallis/Dunn's. NegKon = Negativkontrolle.

5. Diskussion

Der proximale Tubulus (PT) ist der Nephronabschnitt, der zuallererst mit dem Primärharn und allen darin befindlichen Substraten, die vom Glomerulus filtriert wurden, in Kontakt kommt. Am PT findet nahezu die gesamte Reabsorption von Wasser, Salzen und die fast vollständige Rückgewinnung von Nährstoffen und Proteinen aus dem Primärharn statt. Letzterer Prozess erfolgt über Endozytose. Ein überaus wichtiger Rezeptor für die Endozytose am PT stellt Megalin dar, dessen funktionelle Änderung in Abhängigkeit von Phosphorylierungen untersucht wurde. Die hierzu erhaltenen Forschungsergebnisse werden zu Beginn dieses Kapitels besprochen. Der PT steht zudem in großem Zusammenhang mit Diabetes und diabetischen Folgeerkrankungen, besonders die der diabetischen Nephropathie (DN). Die DN zeigt einen progredienten Verlauf und führt ohne Behandlung zur terminalen Niereninsuffizienz. Inwiefern der PT eine Rolle im Krankheitsbild der DN spielt, wird im Kapitel 5.2 diskutiert.

5.1 Einfluss von Phosphorylierungen im C-Terminus von Megalin

Der PT ist nicht nur für die Reabsorption von Salzen und Wasser zuständig, sondern auch für die nahezu gesamte Rückgewinnung von Proteinen aus dem Filtrat. Diese Rückgewinnung erfolgt vorwiegend über eine rezeptorvermittelte Clathrin-abhängige Endozytose. Der hierfür bedeutendste Rezeptor ist Megalin im Bürstensaum der proximalen Tubulusepithelzellen (PTEC). Viele Arbeiten konnten zeigen, dass der C-Terminus von Megalin regulatorische Eigenschaften durch das Vorhandensein verschiedener Bindungs- und Interaktionsmotive für andere Proteine aufweist. Durch Änderungen, beispielsweise posttranslationale Modifikationen (PTM), innerhalb oder nahe solcher Motive können Modulationen der Endozytose-Eigenschaften von Megalin stattfinden. Phosphorylierungen im C-Terminus von Megalin zählen zu PTM und waren ein Fokus dieser Dissertation.

5.1.1 mTORC1 phosphoryliert und beeinflusst dadurch Megalin

Der mTORC1 (*mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1*)-Komplex zählt zu den Schlüsselkomplexen, wenn es um Zellmetabolismus und Autophagie geht. Trotz des breiten Wissens über mTORC1 ist seine Funktion speziell im Tubulussystem und der renalen Homöostase erst in den letzten Jahren durch *knockout*-Mausmodelle aufgeklärt worden. Insbesondere in den PTEC ist mTORC1 vor allem für die geregelte Endozytose und den intrazellulären Transport wichtig (Grahammer et al., 2017). Mittels Rapamycin lässt sich

der Komplex funktionell reversibel stilllegen, sodass er nicht mehr in der Lage ist, Zielproteine zu phosphorylieren. Neben der chemischen Hemmung führen auch Inaktivierungen einzelner Proteine innerhalb des mTORC1-Komplexes zum gleichen Ergebnis. Die Gruppe um Grahammer et al. (Grahammer et al., 2017) forschte an Mäusen mit konditionellem *knockout* von *Raptor* in den renalen Tubulusepithelzellen entlang des Nephrons, um die Aktivität von mTORC1 zu unterbinden. Es wurde u. a. eine reduzierte rezeptorvermittelte Endozytose festgestellt. Dies wurde auf (1) eine Reduktion des intrazellulären Transports von Megalin und Cubilin bei unveränderten Proteinmengen beider Rezeptoren und auf (2) eine Störung des Endozytoseapparats, wie die reduzierte Bildung von Clathrin-Vesikeln, zurückgeführt. Gleichzeitige Analysen des renalen Phosphorylierungsprofils ergaben eine reduzierte Phosphorylierung von Megalin an Position Serin 4577 innerhalb des PASP-Motivs im C-Terminus, was Megalin als Zielprotein von mTORC1 suggeriert. Durch die Nutzung von Rapamycin und Rheb, ein mTORC1-Aktivator, konnte in der hier vorliegenden Dissertation die Phosphorylierung von Megalin durch mTORC1 bestätigt werden. Es stellt sich die Frage, ob die Phosphorylierung direkt, durch die im mTORC1-Komplex befindliche Kinase mTOR, oder indirekt über eine andere Kinase stattfindet. Bisher sind Phosphorylierungen von PASP-Motiven durch mTORC1 nicht beschrieben. Allerdings zeigten Analysen, dass mTOR bevorzugt Serin (S) (= Position 0) mit einem nachfolgenden Prolin (P) (= Position +1) phosphoryliert (Hsu et al., 2011). Dies würde zu dem PAS(= 0)P(= +1)-Motiv von Megalin passen und für mTORC1 als Kinasekomplex sprechen. Doch weisen auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) ähnliche Konsensus-Motive wie die des PASP-Motivs auf (Fernandes & Allbritton, 2009; Roux & Blenis, 2004; Rust & Thompson, 2011). Daher könnten beide durch mTORC1 aktiviert werden und anschließend Serin 4577 im C-Terminus von Megalin phosphorylieren. Eine Regulation der CDK durch mTORC1 ist eher unwahrscheinlich, da CDK im Zellzyklus-Kontrollsystem eine Rolle spielen. mTORC1 ist in diesen Prozessen weniger relevant. Im Vergleich dazu interferieren mTOR-Signalwege mit denen von MAPK-Signalwegen (Carracedo et al., 2008; Dai, Bercury, & Macklin, 2014; Kuger, Flentje, & Djuzenova, 2015). *In vitro* Phosphorylierungsversuche wären eine Möglichkeit um herauszufinden, ob mTORC1 Serin 4577 direkt phosphoryliert. Für solche Versuche braucht man zwei Hauptkomponenten: Die Kinase und das entsprechende zu testende Zielprotein. Die Kinase mTOR, die katalytische Untereinheit des mTORC1-Komplexes, versieht man mit einem *tag*. Dieses Konstrukt wird in HEK293-EBNA Zellen transfiziert und anschließend über den *tag* immunpräzipitiert. Dabei muss sichergestellt sein, dass alle Komponenten des mTORC1-Komplexes während der Phosphorylierungsreaktion anwesend sind. Insgesamt sind es fünf: mTOR, Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*), PRAS40 (*proline-rich AKT substrate 40 kDa*) und Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*), wobei nicht ganz sicher ist, inwiefern alle zur Funktion des mTORC1-Komplexes notwendig sind (Laplane & Sabatini, 2009). Als Zielproteine könnten die gereinigte Protei-

ne der drei Megalin Mini-Rezeptorkonstrukte (His-MMR) dienen, die in dieser Arbeit hergestellt wurden. Die Kinasereaktion erfolgt *in vitro* unter Zugabe von radioaktiven γ -³²P-ATP zu dem Gemisch aus immunpräzipitiertem mTORC1 und Mini-Megalin Wildtyp-Protein (His-MMR WT). Findet eine Phosphorylierung von Serin 4577 statt, die mittels Autoradiogramm detektierbar ist, wäre das ein *in vitro* Beweis für Megalin als Substrat von mTORC1.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die durch Grahamer et al. gezeigte Abnahme der Phosphorylierung von Megalin an Serin 4577 in den *Raptor-knockout* Mäusen im Zusammenhang mit der beobachteten Abnahme der Endozytose steht (Grahammer et al., 2017). Aufgrund der Reduktion des intrazellulären Transports von Megalin bei unveränderten Proteinmengen von Megalin (Grahammer et al., 2017) scheint daher die Regulation auf posttranslationaler Ebene, beispielsweise durch die in dieser Arbeit bestätigte Phosphorylierung von Serin 4577, denkbar. Welchen Einfluss die Phosphorylierung von Serin 4577 auf Megalin hat, wurde mittels MMR2, die eine Mutation von Serin an Position 4577 aufwies, im Weiteren untersucht. Dabei stellt die Mutation von Serin zu Alanin (SA) eine phosphorylierungsdefiziente und die von Serin zu Aspartat (SD) eine konstitutiv phosphorylierte Megalinvariante dar. Versuche in unserem Labor zeigten, dass die Transfektion von SD eine signifikante Reduktion der Aufnahme von Albumin in MDCKII Zellen bewirkte (AG Theilig, unveröffentlicht). Die Ergebnisse deuten auf eine reprimierende Rolle der Phosphorylierung an S4577 bezüglich der Endozytosefunktion von Megalin hin. Die Mutation zu Alanin (phosphorylierungsdefizient) zeigte kaum Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp S4577 (AG Theilig, unveröffentlicht). Das spricht dafür, dass der Wildtyp unter diesen Versuchsbedingungen an der Position S4577 zum Großteil unphosphoryliert vorlag. Die Versuche im Zellkulturmodell liefern somit keine Erklärung für die von Grahamer et al. gezeigte Hemmung der Endozytose.

Inwiefern die Phosphorylierung von Serin 4577 den Ablauf der Endozytose durch Megalin in MDCKII Zellen beeinflusst, wurde in weiteren Experimenten untersucht. Grundlage waren unterschiedliche Hypothesen wie die Phosphorylierung an Serin 4577 Einfluss nehmen kann. Denkbar sind, dass phosphorylierungsabhängig die Effizienz des Recyclings von Megalin verändert wird, Megalin in andere intrazelluläre Kompartimente dirigiert wird oder in einem der Kompartimente länger als üblich verweilt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung von Serin 4616 innerhalb eines PPPSP-Motivs im C-Terminus durch die Kinase GSK3 das Recycling von Megalin hemmt (Yuseff et al., 2007). Mittels Kollokalisationsstudien wurde in dieser Arbeit versucht, einige der Hypothesen zu prüfen. Die Auswertung ergab keine Veränderungen von Megalin in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus an Serin 4577 in Bezug auf seine intrazelluläre Verteilung bzw. Lokalisation in Clathrin-Vesikeln, frühen Endosomen, Recycling-Endosomen und im Golgi-Apparat. Jedoch sollte beachtet werden, dass die Kollokalisationsanalysen an MDCKII Zellen, die

48–72 h nach Transfektion mit den MMR2 fixiert wurden, stattfanden. Die Zellen befanden sich somit im Gleichgewichtszustand (*steady state*). Die Verteilung von Megalin im *steady state* zeigte, dass Megalin am meisten mit Recycling-Endosomen assoziiert ist. Ähnliche Verteilungsmuster von Megalin wurden auch in LLC-PK1, eine porcine Nierenepithelzelllinie (Silva-Aguiar et al., 2022), und MDCK Zellen (Gravotta et al., 2019; Mattila et al., 2014; Perez Bay et al., 2016) beobachtet. In MCDK Zellen, die fast identisch mit MDCKII Zellen sind, ist Megalin ein schnell-recycelnder Rezeptor (15 min) mit einer langen Lebensdauer bei einer Halbwertszeit von 4,8 h (Gravotta et al., 2019; Perez Bay et al., 2016). Andere Publikationen identifizierten ein 80%iges Recycling von Megalin nach etwa 20 min oder aber nahezu kein Recycling nach 25 min (Cui et al., 2010; Perez Bay et al., 2016; Shah et al., 2013; Vicinanza et al., 2011). Diese großen Unterschiede sind anscheinend zelltyp- und methodenbedingt.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Abnahme der Megalin-abhängigen Endozytose in MDCKII Zellen durch Veränderungen der Bindungseigenschaften mit Proteinen des Endozytoseapparats bedingt war. Ein Anfügen einer Phosphatgruppe in kritischen, konservierten Bereichen von Proteinen zieht oft strukturelle Änderungen nach sich, die neue Bindungsaffinitäten für weitere modifizierende und/oder regulatorische Proteine schafft oder bestehende Bindungsaffinitäten zerstört (Hunter, 2007). Mit modifizierenden Proteinen sind z. B. Acetylrasen, Ubiquitinasen, weitere Kinasen oder auch Phosphatasen gemeint. Innerhalb des C-Terminus sind bereits etliche solcher PTM festgestellt (phosphosite.org). Viele davon liegen in unmittelbarer Nähe von Serin 4577. PTM können dazu führen, dass Megalin in seinem zellulären Transportverhalten reguliert wird, wie von Yuseff et al. am PPPSP-Motiv von Megalin demonstriert (Yuseff et al., 2007). In diesem Zusammenhang sollte eine phosphorylierungsabhängige Interaktion von Megalin mit den beiden Adaptorproteinen DAB2 und ARH untersucht werden. Beide Adaptoren wechselwirken mit dem C-Terminus von Megalin und beeinflussen dessen intrazellulären Transport. DAB2 fördert die Internalisierung von Megalin und bindet an das Motorprotein NMHC-IIA, welches an Endozytoseprozessen beteiligt ist (Avraham et al., 1995; Gallagher et al., 2004; Oleinikov et al., 2000). ARH steuert die Effizienz des Recyclings von Megalin und ist an der Weitergabe von Megalin vom frühen Endosom zum Recycling-Endosom involviert. Ohne ARH findet ein rascher Transport von Megalin direkt an die Zelloberfläche statt (De et al., 2014; Shah et al., 2013). Änderungen im Bindungsverhalten zwischen DAB2/ARH und Megalin könnten Teilmechanismen für die Hemmung der Endozytose von Albumin in MDCKII Zellen, aber auch für die beschriebenen Beobachtungen von Grahammer et al. liefern (Grahammer et al., 2017). Zur Studie der Wechselwirkung des C-Terminus von Megalin in Abhängigkeit der Phosphorylierung von Serin 4577 bieten sich Pull-Down-Versuche an. Vorarbeiten für solche Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits mit der Reinigung von allen drei Megalinproteinen (His-MMR WT, His-MMR SA, His-MMR SD) sowie von DAB2 und ARH realisiert.

Für die erwähnte Phosphorylierungsstelle Serin 4616 innerhalb eines PPPSP im C-Terminus von Megalin konnte bereits eine Funktion ermittelt werden. Eine Phosphorylierung von Serin 4616 durch die Kinase GSK3 hemmt das Recycling von Megalin (Yuseff et al., 2007). Aus diesem Grund wurde eine Abhängigkeit zwischen der Phosphorylierung von Serin 4577 und Serin 4616 untersucht. Ein Effekt des Phosphorylierungsstatus von Serin 4577 auf die Phosphorylierung von Serin 4616 von Megalin konnte ausgeschlossen werden, was mittels eines Phospho-spezifischen Antikörpers geprüft wurde.

Inwiefern sich die Mutationen von Serin 4577 detailliert auf die Endozytosefunktion und die intrazellulären Recyclingprozesse von Megalin auswirken, konnte in dieser Arbeit leider nicht aufgeklärt werden. Dass sie aber einen Effekt auf Megalin haben, zeigte sich in Änderungen der Aufnahme von Albumin in MDCKII Zellen. Die konstitutive Phosphorylierung von Serin 4577, durch MMR2 SD repräsentiert, könnte einen gegenregulatorischen Mechanismus darstellen, der die Zellen vor einer intrazellulären Überladung mit Albumin schützt. Es ist davon auszugehen, dass der Phosphorylierungsstatus von Serin 4577 eine Möglichkeit hinsichtlich der Feinregulation von Megalin darstellt. Deshalb sollte dem auch weiter nachgegangen werden.

5.2 Der proximale Tubulus im Fokus der Pathogenese der diabetischen Nephropathie

Eine unmittelbare Folge der Diabetes-bedingten Hyperglykämie ist die vermehrte Filtration von Glukose an den Glomeruli der Niere. Dadurch ist der PT erhöhten Mengen an Glukose ausgesetzt, wodurch es zur Erhöhung der Kapazität der Glukosereabsorption kommt. Dies geschieht durch eine Hochregulation der Natrium- und Glukosetransporter. Parallel dazu erfolgt eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate, die eine weitere Steigerung der Transportaktivität am PT und dessen Hypertrophie bedingt. Beides stellen Zeichen einer frühen DN dar. Die stark gesteigerte Reabsorption der Substanzen im PT ist nur durch einen erhöhten Energie- und damit Sauerstoffbedarf möglich – im Tubulus kommt es zu einem vermehrt hypoxischen Milieu und macht den PT anfällig gegenüber Stress. Renale Hypoxie ist ebenfalls ein oft beobachtetes Merkmal der DN. Somit spielt der PT eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der DN, die durch die Wirkung von SGLT2-Inhibitoren zusätzlich verdeutlicht wird. Diese Medikamente wirken spezifisch am PT und zeigen kardiovaskuläre und renoprotektive Effekte. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher unbekannt. Um den Beitrag proximal tubulärer Hypoxie zur Entstehung und Progression der DN näher zu identifizieren, wurde ein neues genetisches Mausmodell erzeugt. Mit diesem Modell war es

einerseits möglich Zusammenhänge zwischen Hypoxie im PT und Diabetes aufzudecken, andererseits den Einfluss der Hypoxie im PT bei der Entwicklung der DN zu bestimmen.

5.2.1 Das STZ-Mausmodell zur Studie der diabetischen Nephropathie

Es gibt eine Reihe muriner Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus (T1Dm, T2Dm) Modelle zur Studie des Diabetes und diabetischer Komplikationen, wie die DN. Tiermodelle der DN sollten eine fortschreitende Albuminurie, einen Abfall renaler Funktionen ebenso die charakteristischen Zeichen histologischer Veränderungen in den Glomeruli und dem Tubulointerstitium, wie in der humanen DN vorkommend, aufweisen (Kitada, Ogura, & Koya, 2016). Ein murines Modell, das all diese Eigenschaften in hohem Maße zeigt und die Entstehung und Progression der DN im Menschen exakt simuliert, gibt es bisher nicht. Besonders das Studium der späten Stadien der humanen DN, die durch Glomerulosklerose sowie tubulointerstitieller Fibrosen charakterisiert sind und in der Niereninsuffizienz münden, ist in diesen Modellen limitiert. Dennoch sind die verfügbaren murinen Modelle nützlich, um die DN, besonders die frühen Phasen, zu studieren und dadurch das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen zu verbessern. Die am meisten genutzten Modelle zur Studie der DN *in vivo* sind das Streptozotocin (STZ)-Mausmodell und das Akita-Mausmodell. Beide dienen als Krankheitsmodell des T1Dm (absoluter Insulinmangel). Zur Untersuchung von T2Dm (Insulinresistenz) ist das verbreitetste Mausmodell das der db/db Mäuse. Db/db Mäuse weisen einen Gendefekt im Leptinrezeptor auf. Dieses Mausmodell wird an späterer Stelle ausführlicher beschrieben.

Das in dieser Arbeit benutzte STZ-Mausmodell wird durch die 2-malige Injektion von STZ erzeugt und resultiert in T1Dm. STZ führt ca. zwei Wochen nach STZ-Behandlung zu einer persistierenden Hyperglykämie (Breyer et al., 2005; Tesch & Nikolic-Paterson, 2006). Dabei kann T1Dm nach dem sogenannten *high glucose* oder *low glucose* Modell induziert werden. Wir nutzten erstere Methode, bei der die Verabreichung von ein bis zwei höheren Dosen an STZ direkt toxisch auf die β -Zellen wirkt und dies schnell zu erhöhten Blutzuckerspiegeln führt (Furman, 2021; King, 2012; Tesch & Nikolic-Paterson, 2006). Ein allgemeiner Nachteil der chemischen Methode liegt in einer nicht auszuschließenden toxischen Wirkung von STZ auf andere Gewebe (King, 2012; Krause et al., 2009; Tesch & Nikolic-Paterson, 2006). Ein weiterer Nachteil von STZ-Mäusen ist, dass diese seltener Bluthochdruck, der oft als Begleiterscheinung einer DN beim Menschen auftritt, entwickeln (Gurley et al., 2006; Kitada et al., 2016). Bei einem Tier in unserer diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ konnte bis zum Tierversuchsende ein erhöhter Blutdruck festgestellt werden. Aufgrund des experimentellen Versuchsaufbaus, der die Analyse der Mäuse zehn Wochen nach STZ-Behandlung vorsah, ist daher ein späteres Eintreten von Bluthochdruck in weiteren Mäusen anzunehmen.

Primär lag unser Fokus auf frühen Diabetes-bedingten Veränderungen, die vorwiegend in den ersten zehn Wochen stattfinden. Die chemische Methode stellt ein kostengünstiges und unkompliziertes Verfahren zur Erzeugung von T1Dm-Mausmodellen dar. Zudem lässt sich die Methode einfach auf alle Säugetiere, wie Primaten, und bereits genetisch veränderte Tiere anwenden. Das STZ-Mausmodell ist zudem ein etabliertes Modell zur Studie des Diabetes und damit verbundener Folgeerkrankungen wie die DN. Es spiegelt Veränderungen wieder, wie man sie in ähnlichem Ausmaß und Form in der humanen DN findet. Ebenfalls zeigt dieses Mausmodell eine progrediente Nierenschädigung im Krankheitsverlauf. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Applikation von STZ wurden die klassischen Anzeichen einer frühen DN besonders in Kon/STZ festgestellt, wie dauerhaft erhöhte Blutzuckerspiegel, eine erhöhte GFR, eine erhöhte Ausscheidung von Glukose im Urin sowie typische histopathologische Merkmale wie glomeruläre Hypertrophie, Verdickung der glomerulären und tubulären Basalmembran und Ausweitung des Mesangiums (AG Theilig, unveröffentlicht). Die beobachteten Veränderungen der renalen Funktionsparameter, der histologischen Morphologie sowie die Feststellung der hyperglykämischen Stoffwechsellage stellen das hier genutzte STZ-Modell als adäquat zur Erforschung pathophysiologischer Mechanismen, die zur Entwicklung einer frühen DN und deren Fortschreiten führen, dar.

Das erwähnte Akita-Mausmodell basiert auf einer Punktmutation im Gen *Ins2*, was in einer Fehlfaltung von (Pro-)Insulin resultiert. Dadurch kommt es zu einer Ansammlung von (Pro-)Insulin in den β -Zellen des Pankreas der Akita-Mäuse. Dies führt zum Stress des endoplasmatischen Retikulums und im weiteren Verlauf zur Dysfunktion und Apoptose der β -Zellen (Herbach et al., 2007; King, 2012; Scheuner & Kaufman, 2008; J. Wang et al., 1999). Wie auch das von uns genutzte STZ-Modell kommt es bei Akita ebenfalls zum frühen Einsetzen (ca. 3–4 Wochen nach Geburt) einer diabetischen Stoffwechsellage (Breyer et al., 2005; Tesch & Nikolic-Paterson, 2006). Aufgrund der genetisch bedingten Insulin-Defizienz treten keine toxischen Effekte, wie bei STZ-Behandlung möglich, auf (Bolzan & Bianchi, 2002; Breyer et al., 2005). Großer Nachteil des Akita-Modells ist der enorme zeitliche und finanzielle Aufwand. Bereits genetisch veränderte Tiere müssen zusätzlich mit Akita-Mäusen gekreuzt und verpaart werden, um einen T1Dm zu induzieren.

Weiterhin existieren neben T1Dm-Mausmodellen auch T2Dm-Mausmodelle, die besonders durch eine Insulinresistenz charakterisiert sind. Hier sei vor allem das db/db-Mausmodell erwähnt. Es beruht auf einer genetischen Deletion im Leptin-Rezeptor (Hummel, Dickie, & Coleman, 1966). Dieser Defekt wirkt sich auf die Funktion des Hypothalamus aus, was zur Entwicklung einer unphysiologisch gesteigerten Nahrungsaufnahme, Fettleibigkeit, Hyperlipidämie und -insulinämie, Insulinresistenz und Diabetes führt (Baribault, 2016; Edvell & Lindstrom, 1995; Kitada et al., 2016). Aufgrund der diversen Effekte durch die Mutation im Leptin-Rezeptor treten oft große Varianzen innerhalb der Ausbildung der DN auf. Generell

zeigen db/db Mäuse eine weniger starke Beeinträchtigung der Niere und weisen nicht in jedem Fall die klassischen Merkmale der humanen DN auf (Betz & Conway, 2016). Auch treten renale Veränderungen später verglichen zu STZ- und Akita-Mäusen ein (Soler, Rivera, & Batlle, 2012). Das Modell ist besonders geeignet um Patienten mit metabolischem Syndrom oder Übergewicht in Verbindung mit Diabetes mellitus nachzuahmen (Kennedy, Ellacott, King, & Hasty, 2010). Zudem ist der zu Grunde liegende genetische Defekt eher selten im Menschen, weshalb auch eine Behandlung mit Leptin gegen T2Dm im Menschen nicht erfolgsversprechend ist (Baribault, 2016).

5.2.2 *Vhl*-knockout im proximalen Tubulus fördert und hemmt die Ausbildung der diabetischen Nephropathie

Viele Studien belegen eine Beteiligung von Hypoxie an der Entstehung und des Verlaufs der DN. Aus diesem Grund sollte der Einfluss hypoxischer Bedingungen im PT näher untersucht werden. Durch die Verwendung des SGLT2-Promotors wurde ein konditioneller *knockout* von *Vhl* in den PTEC generiert. Dadurch war es möglich die Effekte der genetischen Inaktivierung von *Vhl* spezifisch für den PT im S1 und S2 Segment zu untersuchen ohne dabei andere Organsysteme und Gewebe zu beeinflussen. Der erzielte *knockout*-Grad betrug etwa 40–50% (AG Theilig, unveröffentlicht). Somit lag im PT ein Mosaik-*knockout* vor, das heißt, etwa die Hälfte der PTEC waren *Vhl*-defizient. Da der SGLT2-Promoter zu den „schwachen“ Promotoren zählt, ist ein deutlich höherer *knockout*-Grad kaum zu erwarten gewesen. Mit „schwach“ ist eine geringere Bindungsaffinität des Sigma-Faktors der RNA-Polymerase an den Promoter gemeint. Dementsprechend kommt es weniger häufig zum Transkriptionsstart. Ähnliche *knockout*-Effizienzen von Genen unter der Kontrolle des SGLT2-Promotors, wie *Nhe3* und *Gsa*, zeigen auch andere Publikation (H. C. Li et al., 2013; Zhu et al., 2016). Die erzielte *Vhl*-Defizienz in *Vhl*^{APT} und *Vhl*^{APT/STZ} führt zur Stabilisierung von HIF-1 α , was eine Hypoxie im PT nachahmt. Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierungs-Analysen (RNA-Seq) bestätigten die Stabilisierung durch den Anstieg der HIF-1 α -Transkripte in *Vhl*^{APT} und *Vhl*^{APT/STZ} im Vergleich zur Kontrollgruppe Kon. Die Gruppen *Vhl*^{APT} und *Vhl*^{APT/STZ} zeigten Merkmale der DN, wenn auch in abgeschwächter Form verglichen zur diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ. Dazu zählten u. a. erhöhte Salz- und Glukoseausscheidungen im Urin (AG Theilig, unveröffentlicht). Auf RNA-Ebene wurde in *Vhl*^{APT} und *Vhl*^{APT/STZ} eine erhöhte Expression von Genen identifiziert, die im Zusammenhang mit einer Verdickung der GBM, Proliferation der Mesangiumzellen und erhöhter Angiogenese stehen. Auch histomorphologische Untersuchungen bestätigten dies, u. a. durch eine Verbreiterung der GBM und der Basalmembran des PT (AG Theilig, unveröffentlicht). Die Ergebnisse stehen mit verschiedenen Studien in Einklang. So führte die

chemische Inhibierung von HIF-1 an dem T1Dm Mausmodell OVE26 mit persistierender DN zur Verhinderung der Glomerulosklerose, der Ausbreitung des Mesangiums und der Albuminurie (Nayak et al., 2016). Ein *Vhl-knockout* in epithelialen Tubuluszellen von Mäusen induzierte renale Fibrose (K. Kimura et al., 2008). HIF-1 zeigt also pathogene Effekte. Allerdings führte der *knockout* von *Vhl* vor Induktion des Diabetes (*Vhl*^{ΔPT}/STZ) zu einer Abmilderung der DN, was für einen protektiven Effekt von HIF-1 α spricht. In *Vhl*^{ΔPT}/STZ kam es zu keiner Erhöhung der GFR. Es erfolgte zudem in dieser Gruppe eine Reduktion der Natrium- und Glukosetransporter und der Expression von NOS1 verglichen zur diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ. Weiterhin führte die Induktion des Diabetes bei *Vhl*^{ΔPT}/STZ zu keiner deutlichen Veränderung des Genexpressionsprofils sondern blieb auf dem Niveau von *Vhl*^{ΔPT}. In Summe führte die Stabilisierung von HIF-1 α in *Vhl*^{ΔPT}/STZ zu Verbesserungen des Krankheitsbildes bzw. zur Abmilderung der DN. Diese hier erhaltenen Befunde passen zu denen von Nordquist et al. (Nordquist et al., 2015). Die orale Gabe von Kobaltchlorid, ein HIF-Stabilisator, vor Induktion von Diabetes mittels STZ normalisierte die GFR, reduzierte den Sauerstoffverbrauch und die Proteinurie in Ratten (Nordquist et al., 2015). Ein sehr ähnlicher Versuch an STZ-behandelten Ratten, der allerdings den HIF-Stabilisator Enarodustat während der frühen Progression der DN verwendete, zeigten ebenfalls positive Effekte von HIF (Hasegawa et al., 2020). Enarodustat wirkte metabolischen Veränderungen in der Niere entgegen durch eine Normalisierung des Fettsäure- und Aminosäure-Stoffwechsels und durch eine Erhöhung der Glykolyse (Hasegawa et al., 2020).

Die Stabilisierung von HIF-1 α führte in einigen Punkten zu Merkmalen Diabetes-induzierter DN. In anderen Punkten führte die Stabilisierung vor Induktion des T1Dm zur Verbesserung klassischer Anzeichen der DN und deutet auf eine Präkonditionierung des PT hin (siehe Kapitel 5.2.7). HIF-1 α kann eine duale Rolle zugesprochen werden.

5.2.3 Tubulozentrisches Modell der diabetischen Nephropathie

Die mit Diabetes einhergehende Hyperglykämie ist Hauptfaktor bei der Entstehung der DN. Chronisch erhöhte Blutzuckerwerte verursachen Schädigungen des vaskulären Systems, das im weiteren Verlauf zu Schäden am Glomerulus, am Tubulus und im Tubulointerstitium führt und final im Nierenversagen endet. Die DN kann in verschiedene Stadien der Pathogenese entsprechend vorliegender Merkmale eingeteilt werden. Die frühe Phase der DN ist durch das klassische klinische Zeichen einer erhöhten GFR, auch glomeruläre Hyperfiltration genannt, charakterisiert. Den allgemeinen Hypothesen folgend geht die Hyperfiltration dem Beginn der (Mirko-)Albuminurie voraus und legt die Grundlage zur fortschreitenden Nephronzerstörung, u. a. durch eine Erhöhung des glomerulären hydraulischen Drucks (Tonneijck et al., 2017). Eine erhöhte GFR ist das Resultat Diabetes-induzierter struktureller

und hämodynamischer Faktoren, die die GFR bestimmen (Tonneijck et al., 2017). Gegenwärtig werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die zur glomerulären Hyperfiltration führen, die eine primär vaskuläre oder primär tubuläre Hypothese beinhalten. Entsprechend der vaskulären Hypothese ist die glomeruläre Hyperfiltration Ergebnis einer Imbalance aus Vasodilatation und -konstriktion (Helal, Fick-Brosnahan, Reed-Gitomer, & Schrier, 2012; J. Zhang et al., 2022) bzw. eines Verlusts der Gefäßspannung in Bereichen der glomerulären Mikrovaskulatur (Thomson et al., 2001). Tierexperimente zeigten eine stärkere Dilatation der afferenten glomerulären Arteriole im Vergleich zur efferenten glomerulären Arteriole, was nicht nur eine erhöhte GFR sondern auch einen Anstieg des intraglomerulären Drucks und der Filtrationsfraktion nach sich zog (Bank, 1991; Helal et al., 2012; Hostetter, Olson, Rennke, Venkatachalam, & Brenner, 1981). Die Erhöhung der GFR führt zu einer Erhöhung filtrierter Substanzen im Primärharn. Dadurch kommt es, um den Verlust im Urin vorzubeugen, zur vermehrten Reabsorption am PT und zu dessen Hypertrophie. Welche Mechanismen zur Vasodilatation der afferenten Arteriole am Glomerulus führen, sind unklar. Es werden erhöhte Spiegel an Insulin, *insulin-like growth factor* (IGF), *atrial natriuretic peptide* (ANP) und *advanced glycation end products* (AGE) vermutet (Anderson & Vora, 1995; Bank, 1991; Helal et al., 2012; Hirschberg, Brunori, Kopple, & Guler, 1993; Sabbatini et al., 1992).

Die tubuläre Hypothese stellt den Tubulus ins Zentrum. Dabei geht die glomeruläre Hyperfiltration vor allem aus primären Veränderungen im Tubulussystem hervor. Besonders am PT erfolgt die gesteigerte Reabsorption von Glukose und Natrium(-chlorid), was sekundär zur Hemmung des tubuloglomerulären Rückkopplungsmechanismus (TGF) und zur Vasodilatation führt – die GFR steigt (Helal et al., 2012; Thomson, Vallon, et al., 2004; Vallon, Blantz, & Thomson, 2003; J. Zhang et al., 2022). Glukose beeinflusst den TGF über den Signalweg SGLT1-NOS1-TGF. Glukose wird durch SGLT1, lokalisiert in den MD Zellen, gemessen. Kommt es zur Detektion von Glukose, signalisiert dies eine Aus- bis Überlastung der Reabsorptionskapazität und somit eine bereits stattfindende Hyperreabsorption an stromaufwärts gelegenen Tubulussegmenten. Die dadurch induzierte vermehrte Produktion von NO durch NOS1 in den MD Zellen führt zur Steigerung der GFR, um die Volumenbalance sicherzustellen (Song et al., 2019; Vallon, 2020).

Die hier durchgeführten Untersuchungen von NOS1 in den MD Zellen zeigten in der diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ eine Erhöhung von NOS1, was der Grund für die gesteigerte GFR in dieser Gruppe sein kann. Auch Studien an T1Dm und T2Dm Ratten zeigten einen Zusammenhang zwischen erhöhten NOS1/NO Mengen und glomerulärer Hyperfiltration (Komers, Lindsley, Oyama, Allison, & Anderson, 2000; Thomson, Deng, et al., 2004; Tolins, Shultz, Raji, Brown, & Mauer, 1993). Die Gruppe um Zhang et al. führte umfangreiche Studien an frühdiabetischen Akita-Mäusen durch, und konnte den SGLT1-NOS1-TGF-Signalweg gänzlich *in vivo* nachweisen, der zur Steigerung der GFR führt (J. Zhang et al.,

2022; J. Zhang et al., 2019). Ob genau dieser Mechanismus, wie bei Zhang et al. beschrieben (J. Zhang et al., 2022; J. Zhang et al., 2019), auch in unserem Mausmodell zutrifft, kann durch die Untersuchung der Expression von SGLT1 und tatsächlich vorhandener NO-Mengen in der MD herausgefunden werden. Jedoch scheint er naheliegend. Unsere Daten demonstrieren, dass die glomeruläre Hyperfiltration in dem Frühdiabetes mit einer Erhöhung von NOS1 in den MD Zellen und einer Inhibition des TGF assoziiert war. Die Produktion von MD NO durch NOS1 kann allerdings auch rasant ansteigen, wenn die MD mit Salz perfundiert wird. Erhöhte Salzmengen können also NOS1 in der MD direkt aktivieren und zur GFR-Steigerung führen (R. Liu, Pittner, & Persson, 2002). Dieser Fall scheidet durch die vermehrte Expression von NHE3 im PT und DT bzw. auch durch NKCC2 im DT und der damit verbundenen Erhöhung der Reabsorption von Salzen, die im Folgenden näher erläutert wird, aus. Insofern muss Glukose als Hauptaktivator des SGLT1-NOS1-TGF-Signalwegs gedient haben.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Erhöhung der GFR in der diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ geführt haben könnte, ist eine verminderte Natriumchloridkonzentration an der MD. Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten eine signifikante Zunahme der Expression der Transporter NHE3 und NKCC2 in Kon/STZ, was mit einer vermehrten Aufnahme von Natrium, Kalium und Chlorid in die PTEC sowie einem passiven Wassereinstrom einhergeht. Die Folge ist die Abnahme von Natrium, Kalium und Chlorid im Harn. Die Zufuhr dieser Substanzen an der MD ist damit gesenkt und der TGF findet nicht in gewohnter Weise statt. Das heißt, es kommt zur verminderten Vasokonstriktion bzw. einer zusätzlichen Vasorelaxation der afferenten Arteriole und zu einer verminderten Dilatation der efferenten Arteriole am Glomerulus. Das Zusammenspiel beider Effekte führt zu mehr Blutvolumen im Glomerulus und zu einer gesteigerten Filtration – die GFR erhöht sich, wie es sich bei unseren diabetischen Mäusen Kon/STZ zeigte. Studien an experimenteller DN zeigten, dass sich die glomeruläre Hyperfiltration aus einer erhöhten Reabsorption von Glukose und Natrium am PT ergibt. Dadurch erfolgt eine Hemmung des TGF. Gleiche Ergebnisse wurden auch in Studien an Patienten mit T1Dm und T2Dm beobachtet (Pruijm et al., 2010; Vervoort, Veldman, Berden, Smits, & Wetzels, 2005), die eine vermehrte Reabsorption von Natrium am PT aufwiesen. Die am Menschen erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine Vergleichbarkeit der Befunde des in dieser Arbeit verwendeten Mausmodells hinsichtlich der Mechanismen der Diabetes-abhängigen Hyperfiltration hin. Auch belegen Daten, dass der in Mäusen/Ratten erforschte NOS1-abhängige TGF auch im Menschen vorhanden ist. Nieren-Analysen von Körperspendern, die erhöhte Blutglukosewerte und eine erhöhte errechnete GFR zeigten, wiesen eine deutliche Expression von NOS1 in der MD auf (J. Zhang et al., 2022).

Die frühe Stabilisierung von HIF-1 α im PT durch den *knockout* von *Vhl* in *Vhl*^{APT} und *Vhl*^{APT}/STZ konnte einen Anstieg der GFR verhindern. Die Proteinlevels der Transporter NHE3

und NKCC2 waren etwas erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren, allerdings deutlich geringer verglichen zur Diabetes-Kontrollgruppe Kon/STZ. Auch auf RNA-Ebene wurde eine Reduktion von *Slc12a1* (NKCC2) in *Vhl*^{ΔPT} und *Vhl*^{ΔPT}/STZ verglichen zu Kon/STZ beobachtet. Somit kann der TGF aufrechterhalten werden. Ähnliche Effekte wurden ebenfalls mit Kobaltchlorid, eine HIF-aktivierende Substanz gezeigt. Die Gabe von Kobaltchlorid T1Dm-Ratten bewirkte eine Normalisierung der GFR (Nordquist et al., 2015).

Zusammenfassend kann die erhöhte GFR in Kon/STZ auf zwei Mechanismen zurückgeführt werden: (1) Übermäßige Glukosekonzentration im Filtrat, was an der MD zur vermehrten Produktion von NO durch NOS1 führt und die GFR erhöht. (2) Übermäßige Natriumchlorid-Reabsorption durch NHE3 (im PT/DT) und durch NKCC2 (*Pars recta* des DT), was zur Hemmung des TGF durch geringe Natriumchloridkonzentrationen an der MD führt. Beides stützt das tubulozentrische Modell. Der *knockout* von *Vhl* verhinderte den Anstieg der GFR in *Vhl*^{ΔPT} und *Vhl*^{ΔPT}/STZ. Aufgrund der Spezifität des *knockouts*, der sich nur auf das S1 und S2 Segment des PT begrenzte, wurden primäre Veränderungen dort hervorgerufen. Da keine genetischen Manipulationen am Glomerulus vorgenommen wurden, ist *per se* von keiner direkten Beteiligung des Glomerulus an der Erhöhung der GFR auszugehen. Deswegen favorisieren auch wir – die AG Theilig – das tubulozentrische Modell, bei dem der PT den größten Beitrag zur glomerulären Hyperfiltration leistet.

5.2.4 Tubuloglomerulärer *crosstalk*

VEGF ist ein direktes Zielgen von HIF-1. VEGF stimuliert die Vaskulo- sowie Angiogenese und ist ein wichtiger Wachstumsfaktor während der Entwicklung der Glomeruli und zur Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere (Kuppe et al., 2018; Shibuya, 2011; Veron et al., 2012). Innerhalb des Glomerulus erfolgt die konstante Synthese und die Aufrechterhaltung kontinuierlich hoher Spiegel an VEGF durch die Podozyten (Satchell & Braet, 2009; Schrijvers, Flyvbjerg, & De Vriese, 2004). Berechnungsmodelle ergeben, dass etwa $\frac{2}{3}$ des VEGFs in den Primärharn sekretiert wird. Der Rest passiert den glomerulären Filter und wird somit gegen den Filtrationsstrom in das Lumen der glomerulären Kapillaren zurück filtriert. Dort wirkt VEGF hauptsächlich über den Rezeptor VEGF-R2 (flk-1/KDR) auf die Endothelzellen (Katavetin & Katavetin, 2008; Kuppe et al., 2018). Die Rückfiltration wird durch ein anliegendes elektrisches Feld, dem ein Strömungspotential zugrunde liegt, gewährleistet (Kuppe et al., 2018). Kuppe et al. bezeichnen diesen mathematisch modellierten Mechanismus als „elektrophoretische Rückfiltration“ von VEGF (Kuppe et al., 2018).

Die Kapillaren des Glomerulus bestehen aus einem kontinuierlichem Endothel, das Fenestrae ohne Diaphragma ausbildet, also „offene Fenster“ (Ichimura, Stan, Kurihara, & Sakai,

2008; Kuppe et al., 2018; Satchell & Braet, 2009). Ausreichend hohe Mengen rückfiltrierten VEGFs genügen, um diesen besonderen Phänotyp glomerulärer Kapillaren aufrecht zu erhalten. Die Untersuchungen lokaler VEGF-Aktivität in den Glomeruli aller vier Mausgruppen wurde indirekt durch eine Immunfärbung von endothelialen Fenestrae der glomerulären Kapillaren durchgeführt. Dabei wurden Diaphragmen, die die Fenestrae überspannen, markiert. Laut Kuppe et al. sind Fenestrae mit Diaphragmen auf geringe VEGF-Spiegel zurückzuführen (Kuppe et al., 2018). In beiden diabetischen Mausgruppen Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ wurden vermehrt Fenestrae mit Diaphragmen gefunden. Bei Kon/STZ war dieser Unterschied signifikant verglichen zur Kontrollgruppe und zu *Vhl*^{ΔPT}. Das heißt, die VEGF-Konzentration an den Endothelzellen glomerulärer Kapillaren lag unterhalb physiologischer VEGF-Konzentrationen. Dadurch konnte der Phänotyp von Fenestrae ohne Diaphragma nicht aufrechterhalten werden. Gründe könnten einerseits eine verminderte VEGF-Produktion durch die Podozyten oder eine verminderte VEGF-Rückfiltration sein. Ersterer scheint plausibler und würde mit den Experimenten von Kuppe et al. im Einklang stehen. Diese Versuche zeigten, dass die Hemmung der VEGF-Synthese in den Podozyten zu einer deutlichen Induktion von Fenestrae mit Diaphragma führt (Kuppe et al., 2018).

Weiterhin zeigten unsere Versuche eine Größenzunahme der Glomeruli ebenso eine Zunahme der glomerulären Kapillaren in beiden diabetischen Mausgruppen Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ (AG Theilig, unveröffentlicht). Wie bereits erläutert, wurden in diesen beiden Gruppen vermehrte Fenestrae mit Diaphragma festgestellt, die auf verminderte lokale VEGF-Spiegel deuten. Eine konditionelle Überexpression von VEGF im gesamten Tubulussystem transgener Mäuse führt zu einem Anstieg von VEGF im Blutserum, was zu einer Senkung der VEGF-Synthese durch die Podozyten führt (Hakrroush et al., 2009). Gleichzeitig wurden in diesen Mäusen vergrößerte Glomeruli beobachtet. Die Autoren führen die Größenzunahme auf einen Anstieg von VEGF im Blutserum zurück. Auch in unserem Mausmodell könnte dieser Mechanismus zutreffen. Durch die Stabilisierung von HIF-1 α in Kon/STZ und *Vhl*^{ΔPT}/STZ kommt es zur erhöhten VEGF-Produktion in den PTEC, die ebenfalls in der Lage sind, VEGF zu bilden (Schrijvers et al., 2004). Dadurch steigen, ähnlich zum transgenen Mausmodell, Serum-VEGF-Spiegel an. Das führt einerseits zu hypertrophen Glomeruli. Andererseits resultiert es in einer negativen Rückkopplung der VEGF-Synthese im Podozyten und somit auch zu einer verminderten VEGF-Rückfiltration, wie von Hakrroush et al. postuliert. Eine ähnliche Studie (Theilig et al., 2011) untersuchte den Einfluss des *knockouts* von *Vhl* im gesamten Tubulussystem und stützt sowohl die Publikation von Hakrroush et al. als auch unsere Beobachtungen. Der *knockout* von *Vhl* führte zur Induktion von HIF-1 α in den PTEC und zur vermehrten Produktion von VEGF in den PTEC, nicht aber in den Podozyten. Es wurde ebenfalls ein Anstieg von VEGF im Serum festgestellt (Theilig et al., 2011). Der genaue Mechanismus, wie die Rückkopplung auf die Podozyten funktioniert, ist bisher unbekannt. Natürlich stellt VEGF nicht den einzigen Faktor zur Regulation endothelialer

Fenestrae und Größe der Glomeruli dar. Auch PDGF, ebenfalls Zielgen von HIF-1 α , oder *bone morphogenic proteins* kommen in Frage. Beides sind Wachstumsfaktoren die vom Glomerulus gebildet werden können.

Aufgrund der Feststellung, dass vermehrt Fenestrae mit Diaphragma in den beiden diabetischen Gruppen Kon/STZ und *Vhl*^{APT}/STZ auftraten, scheint es sich vorwiegend um einen hyperglykämischen Effekt zu handeln, der durch einen frühzeitigen *Vhl-knockout* abgemildert wurde. Die geringere VEGF-Verfügbarkeit im Glomerulus ist durch eine Erhöhung von VEGF im Serum erklärbar, die über unbekannte Mechanismen negativ auf die Podozyten rückkoppelt. VEGF-Serum wurde bei unseren Mäusen nicht untersucht. Inwiefern die Induktion von Fenestrae mit Diaphragma zur DN beiträgt, ist offen. Bisher ist die Funktion der Diaphragmen unzureichend geklärt. Studien am glomerulären Kapillarendothel sind rar, da Fenestrae mit Diaphragmen dort kaum exprimiert werden. Zusätzlich besteht das Problem des Nachweises lokal aktiver VEGF-Spiegel, der derzeit nur indirekt über die morphologische Analyse des Endothels möglich ist. Die VEGF-Konzentration/-Aktivität scheint nicht in offensichtlicher Verbindung mit einer erhöhten GFR zu stehen, da diese nur in der diabetischen Kontrollgruppe auftrat.

5.2.5 Leucin-Decarboxylase und ihr katalysiertes Produkt Isopentylamin

Die RNA-Seq ergab eine stark veränderte Genregulation von *Ldc1*. Dabei wurden die stärksten Genexpressionsunterschiede zwischen Kon/STZ und *Vhl*^{APT}/STZ festgestellt. Aus diesem Grund wurde die Funktion der Leucin-Decarboxylase 1 (LDC1) näher untersucht, um einen mutmaßlich protektiven Beitrag in *Vhl*^{APT}/STZ näher zu bestimmen.

Analysen des Genexpressionsprofils verschiedener Mausgewebe zeigen eine starke Expression von *Ldc1* in der Niere (Lambertos et al., 2018). LDC1 wurde auch auf Proteinebene in PTEC nachgewiesen (Silander, Pihlajamaa, Sahu, Janne, & Andersson, 2017), was uns auf RNA-Ebene ebenfalls gelang. LDC1 wird in die Familie der ODC (Ornithindecaboxylase)/AZIN (ODC-Antizym Inhibitor) eingruppiert. Die ODC ist ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Polyaminen (Kahana, 2018). LDC1 verhält sich in einigen Punkten ähnlich wie die ODC, ist aber nicht in der Lage Ornithin oder Lysin zu decarboxylieren. LDC1 katalysiert die Decarboxylierung von L-Leucin und produziert das aliphatische Monoamin Isopentylamin (IPA)/Isoamlyamin (Lambertos et al., 2018; SahutoGlu, 2020). Trotz der hohen Konservierung des Gens in Säugetieren ist weder die biologische Relevanz von LDC1 noch von dem Syntheseprodukt IPA bekannt. Das erschwert fundierte Aussagen in Bezug auf unsere Experimente/Ergebnisse zu treffen ohne zu stark in Spekulationen zu enden.

LDC1 ist in der Lage mit ODC zu interagieren (Silander et al., 2017). *In vitro* Versuche mit Lysaten transfizierter COS-7 Zellen zeigten, dass Wildtyp-LDC1 die katalytische Aktivität endogener ODC hemmt. Aufgrund verminderter Genexpression von *Ldc1* in den PTEC der diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ kommt es zu einer weniger starken Hemmung der ODC-Aktivität durch LDC1 bzw. ist ODC aktiver. Dadurch werden mehr Polyamine gebildet. Polyamine tragen in diabetischen Ratten zu proximal tubulärer Hypertrophie und Hyperfiltration bei (Deng et al., 2003; Thomson et al., 2001). Der TGF wird gehemmt und die GFR steigt (Thomson et al., 2001; siehe auch Kapitel 5.2.3). Auch wenn dieser Mechanismus sehr hypothetisch ist, könnte er im Maße zur gesteigerten GFR in Kon/STZ beitragen.

Das durch LDC1 gebildete IPA wird in Mäusen über den Urin ausgeschieden (Lambertos et al., 2018). Menschen betreffend wurde IPA in der Brustmilch oder auch im kindlichen Fäzes nachgewiesen, was die Unterstützung einer gesunden Darmmikrobiota nahelegt (Suarez et al., 2019). Zusätzlich dazu weiß man, dass IPA den Rezeptor *trace amine associated acid receptor 3* (TAAR3) aktiviert (Ferrero et al., 2012). Dadurch steigen intrazelluläre cAMP-Spiegel an, die zur vermehrten Sekretion von Insulin in INS1-Zellen, eine pankreatische β -Zelllinie, führen (Cripps et al., 2020). TAAR3 liegt im Menschen nur als Pseudogen vor (Lindemann et al., 2005). Zwar kann IPA auch in geringem Maße den humanen TAAR1-Rezeptor aktivieren, doch ist dieser besonders in neuroendokrinen Zellen des Verdauungstraktes und den β -Zellen des Pankreas und nicht in der Niere exprimiert (Liberles & Buck, 2006). Aufgrund dieser Datenlage zu TAAR1/3 sind publizierte Forschungsergebnisse aus murinen Tiermodellen auf den Menschen sehr eingeschränkt übertragbar. Deswegen beschränkt sich die nachfolgende Diskussion auf den Effekt von IPA auf *Opossum Kidney* (OK) Zellen und deren Sauerstoffverbrauch.

Die Messung des Sauerstoffs an OK Zellen in Gegenwart von IPA demonstrierte einen deutlichen Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR). Da IPA dem Medium zugegeben wurde, muss eine Signaltransduktion ins Zellinnere stattgefunden haben. Hierbei ist TAAR3 naheliegend, wie es an HEK293 mittels CRE-SEAP-Reportergen-Assay gezeigt wurde (Ferrero et al., 2012; Liberles & Buck, 2006). In diesen Versuchen stimulierte IPA intrazelluläre cAMP-Spiegel über die Aktivierung transfizierter TAAR3s (Ferrero et al., 2012; Liberles & Buck, 2006). Der *second messenger* cAMP wirkt auf Mitochondrien, die wichtigsten Zellorganellen der Atmung. Das produzierte, im Zytoplasma frei bewegliche, cAMP kann durch die äußere Mitochondrienmembran diffundieren und gelangt in den mitochondrialen Intermembranraum. Dort aktiviert cAMP lokal befindliche Proteinkinasen A (PKA). PKA phosphorylieren ihrerseits viele Proteine, die dadurch aktiv werden. Unter anderem solche, die die Biogenese, die Morphologie, den Metabolismus und die Erneuerung der Mitochondrien regulieren (F. Zhang, Zhang, Qi, & Xu, 2016). Die cAMP-Signalwege in Mitochondrien sind sehr komplex und bisher nicht völlig verstanden. Es gehen die Meinungen auseinander,

ob cAMP vom Intermembranraum in die Matrix der Mitochondrien gelangen kann. cAMP ist in der mitochondriellen Matrix nachweisbar, woher es kommt, ist bisher strittig. Jedoch führt eine aktive cAMP-PKA-Kaskade in der Mitochondrienmatrix zur Phosphorylierung von Proteinen der Elektronentransportkette, wodurch es zur einer vermehrten oxidativen Phosphorylierung und ATP-Produktion kommt (Acin-Perez et al., 2009; R. Chen, Fearnley, Peak-Chew, & Walker, 2004; De Rasmo et al., 2012; Scacco et al., 2000; F. Zhang et al., 2016). Dieser Prozess geht mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch einher, was den Anstieg der OCR im Zellassay erklären könnte. Daher ist es denkbar, dass das durch die LDC1 produzierte IPA über den TAAR3-vermittelten cAMP-Anstieg den Sauerstoffverbrauch der OK Zellen erhöhte.

Anhand der Versuche mit OK Zellen konnte erstmalig eine Funktion von IPA – die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs – demonstriert werden. Welche genauen Mechanismen und Signalwege zugrunde liegen, muss in weiteren Studien eruiert werden. Aufgrund eines sehr schnellen Anstiegs der OCR in OK Zellen ist eine IPA-induzierte Vermehrung der Mitochondrien, die mit einem vermehrten Sauerstoffverbrauch einhergeht, ausgeschlossen. Gleichfalls sollte ein zelltypabhängiger Effekt, durch die Verwendung anderer renaler Zelllinien, ausgeschlossen werden. Überträgt man die erhaltenen Ergebnisse der OCR-Messung auf unser Mausmodell, so führen erhöhte IPA-Konzentrationen in PTEC, repräsentiert durch erhöhte Mengen an *Ldc1* in *Vhl^{ΔPT}/STZ* im Vergleich zu Kon/STZ, zur gesteigerten Zellatmung. Dadurch kann mehr ATP generiert werden, was dem Zellmetabolismus zu Gute kommt und dies einen protektiven Beitrag in *Vhl^{ΔPT}/STZ* leisten könnte.

5.2.6 Funktionen von ZBTB16

Die Ergebnisse der RNA-Seq führten zur Identifizierung des Transkriptionsfaktors ZBTB16, der in der diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ signifikant erhöht verglichen zu *Vhl^{ΔPT}/STZ* war. Auf Proteinebene konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zeigten eine vermehrte Proteinexpression in den Zellen der Glomeruli und den Epithelzellen entlang des Nephrons. ZBTB16 ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem reprimierend auf die Expression seiner Zielgene wirkt. Nur in Ausnahmefällen wird ihm die Rolle als Genexpressionsaktivator zugeschrieben. Die Expression von ZBTB16 lässt sich in nahezu jedem Gewebe nachweisen. Allerdings zeigen sich deutlich höhere Mengen des Transkriptionsfaktors in Stammzellen und Vorläuferzellen (Suliman, Xu, & Williams, 2012). Mit zunehmender Zelldifferenzierung nimmt die Expression von ZBTB16 ab. Trotzdem besitzt er bedeutende biologische Funktionen in differenzierten Zellen. ZBTB16 induziert epigenetische Veränderungen, wie Histonmodifizierungen oder DNA-Methylierungen, wodurch der Chromatinstatus reguliert wird (Seda et al., 2017).

Über sein N-terminales Zink-Finger-Motiv interagiert er mit Zellkernrezeptoren, darunter der Rezeptor RAR α (Retinsäure-Rezeptor *alpha/retinoic acid receptor alpha*). Weiterhin ist er an physiologischen Prozessen wie der Hämatopoese (Maeda, 2016), der Stammzellerneuerung (Liu, Lee, Lim, & Shyh-Chang, 2016), der Spermatogenese (Costoya et al., 2004) oder der Entwicklung der Extremitäten (Barna, Hawe, Niswander, & Pandolfi, 2000; Liska et al., 2009) beteiligt. In Bezug auf den Metabolismus wirkt ZBTB16 u. a. auf die Adipogenese, den Blutdruck und die Insulinsensitivität (Chen et al., 2014; Liska et al., 2017; Plaisier et al., 2012). Kurzum: ZBTB16 ist ein Dreh- und Angelpunkt vieler verschiedener zellulärer Prozesse.

Um die vielfältigen Funktionen von ZBTB16 näher charakterisieren zu können, wurden lentiviral veränderte OK Zellen (OK LV Zellen) etabliert. Durch die Gabe von Doxycyclin wird eine Überexpression von ZBTB16 induziert. Aufgrund der Beobachtungen in unserem Mausmodell, dass es zu einer vermehrten Expression von Natrium- und Glukosetransportern ebenso zu hypertrophen Glomeruli und proximalen Tubuli kam, wurde ein Zusammenhang dieser Effekte mit der Funktion von ZBTB16 im Zellkulturmodell untersucht. Weiterhin wurden Aspekte von ZBTB16 studiert, die in Verbindung mit einer Abmilderung der DN in *Vhl^{APT}/STZ* stehen könnten wie Zellatmung und Autophagie. Die Ergebnisse der Studien an OK LV Zellen zeigten eine Verringerung der Expression des Transporters NHE3, eine Hemmung der Autophagie und einen geringen Einfluss auf die Zellproliferation. Während ein Effekt von ZBTB16 auf Zellatmung und Expression ausgewählter Gene nicht nachgewiesen werden konnte.

5.2.6.1 ZBTB16 reguliert NHE3

Der Transporter NHE3 ist im gesamten PT und im *Pars recta* des DT lokalisiert, wo er die Aufnahme von Natrium aus dem Filtrat und parallel dazu die Exkretion von Protonen ins Filtrat gewährleistet. Die Untersuchung der Proteinlevels ergab einen signifikanten Anstieg von NHE3 in Kon/STZ im Vergleich zur Kontrollgruppe (AG Theilig, unveröffentlicht). Auch die Proteinlevels von ZBTB16 waren in Kon/STZ signifikant erhöht. Beide Ergebnisse zeigen eine positive Korrelation miteinander, was aber nicht gleichbedeutend mit einer direkten positiven Regulation von NHE3 durch ZBTB16 ist. Die Überexpression von ZBTB16 in OK LV Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion von NHE3. Die Resultate der Zellkulturversuche lassen somit auf eine reprimierende Wirkung von ZBTB16 auf NHE3 schließen und spricht für die allgemein anerkannte Rolle von ZBTB16 als transkriptioneller Repressor. Die Ergebnisse aus Maus- und Zellkulturmodell sind somit konträr. Jedoch kann man die Versuchsbedingungen nicht komplett miteinander vergleichen. Da es sich bei ZBTB16 um einen Transkriptionsfaktor handelt, ist die durchgeführte Überexpression im Zellkultur-

modell mit einer starken Aktivierung/Repression von Genen verbunden. Wie eingangs des Kapitels erwähnt, ist ZBTB16 ein pleiotropher Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung in seiner Gesamtheit zur Veränderung des Zellverhaltens führt. Zudem fehlte im Zellkulturmodell der Einfluss hypoxischer Bedingungen bzw. waren die Zellen nicht *Vhl*-defizient. Ebenso wurde keine diabetische Stoffwechsellage nachgeahmt. Beides Konditionen, die im Mausmodell vorlagen.

Ob ZBTB16 direkt die Transkription von NHE3 beeinflusst, konnte mit diesen Versuchen nicht geklärt werden. *Gel-Mobility-Shift* Assays oder auch *Chromatin Immuno Precipitation Sequencing* (Chip-Seq) könnten helfen. Allerdings ist bekannt, dass NHE3 besonders auf Proteinebene über PTM reguliert wird (P. He & Yun, 2010), weswegen auch eine Protein-Protein-Interaktion, in der ZBTB16 involviert ist, nicht auszuschließen ist. Bisher wurde von keiner Interaktion zwischen ZBTB16 und NHE3 weder auf Gen- noch auf Protein-expressionsebene berichtet.

5.2.6.2 ZBTB16 hemmt die Autophagie

Autophagie stellt einen hoch konservierten katabolischen Prozess in Zellen dar. Dabei werden geschädigte Proteine und Organellen abgebaut, wodurch die zelluläre Homöostase wesentlich erhalten wird. Durch hyperglykämische Bedingung und weitere Diabetes-abhängige metabolische Veränderungen sammeln sich Proteinaggregate und defekte Organellen vermehrt an, was in großer Verbindung mit der Entstehung der DN steht (Yamahara et al., 2013). Es häufen sich immer mehr Belege, dass eine dysregulierte Autophagie zu glomerulären und tubulointerstitiellen Schäden in diabetischen Nieren beiträgt (Barbosa Junior Ade et al., 1992; Kitada et al., 2011; D. Yang et al., 2018; Zhan, Usman, Sun, & Kanwar, 2015). Studien führten zu dem Ergebnis, dass die Autophagie in Podozyten und PTEC unter diabetischen Bedingungen verändert ist (Yamahara et al., 2013). Autophagie wird ganz besonders durch intrazellulären Stress, wie ROS und Hypoxie, hervorgerufen. Beides Punkte, die bei DN vorliegen. Dabei führt Hypoxie zur Aktivierung von HIF-1. HIF-1 induziert die Expression zentraler Proteine der Autophagie-Maschinerie, wie Bnip3 und Bnip3l (Daskalaki, Gkikas, & Tavernarakis, 2018). Beide führen zur Induktion der Autophagie *via* Beclin-1 (Bellot et al., 2009; Daskalaki et al., 2018). Gleichfalls induzieren Nährstoffmangelsituationen die Autophagie. Die Nährstoffverfügbarkeit wird einerseits durch mTORC1 gemessen und mTORC1 inhibiert die Autophagie (Sengupta, Peterson, & Sabatini, 2010; Wullschleger, Loewith, & Hall, 2006; Zoncu, Efeyan, & Sabatini, 2011). Alternativ wird die Nährstoffverfügbarkeit durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) bestimmt, die wiederum den Autophagieprozess induziert (Steinberg & Kemp, 2009). PTEC sind im Vergleich zu Podozyten eher autophagieträge, selbst bei Nährstoffmangel kommt es nur zu einer geringen Erhöhung der

Autophagie (T. Kimura et al., 2011; Yamahara et al., 2013), weswegen diesem Prozess in PTEC zunächst kaum Bedeutung beigemessen wurde. Allerdings erhält genau diese geringe Basalaktivität der Autophagie die proximal tubuläre Homöostase aufrecht (T. Kimura et al., 2011). Gegenüber hypoxischem Stress erhöhen PTEC ihre Autophagieaktivität, um sich besser zu schützen und das Zellüberleben zu sichern (T. Kimura et al., 2011; Periyasamy-Thandavan et al., 2008). Dabei spielen anti-inflammatorische, -fibrotische und -oxidative Effekte eine Rolle (Sakai et al., 2019). Beispielsweise eliminieren PTEC ROS-produzierende Mitochondrien (Takahashi et al., 2012). Autophagievorgänge werden als zyto- bzw. renoprotektiv angesehen, wie an proximal tubulär autophagiedefizienten Mäusen und an autophagiedefizienten immortalisierten PTEC beschrieben (M. Jiang, Liu, Luo, & Dong, 2010; T. Kimura et al., 2011; Periyasamy-Thandavan et al., 2008; Sakai et al., 2019; Takahashi et al., 2012). Im diabetischen Kontext demonstrierten Studien eine allgemeine Hemmung der Autophagie in PTEC unabhängig, ob T1Dm oder T2Dm, wodurch die PTEC sensibler gegenüber Stress waren (Barbosa Junior Ade et al., 1992; Kitada et al., 2011; Zhan et al., 2015). Die Autophagie in PTEC wird vorwiegend durch Insulin reguliert, folglich unterscheidet sich die Autophagieaktivität zwischen T1Dm- und T2Dm-bedingter DN (Sakai et al., 2019). In T2Dm scheint der mTOR-Signalweg in den PTEC hyperaktiv aufgrund höherer Plasma-Insulinlevel (Sakai et al., 2019). Insulin gilt als allgemeiner Autophagiehemmer, weil er mTORC1 aktiviert. In T1Dm liegen minimale Insulinkonzentrationen vor, wodurch mTORC1 nicht aktiviert wird. Daher sollte die Autophagieaktivität steigen. Jedoch zeigen die PTEC, verglichen zu den PTEC von T2Dm Mäusen, eine basal deutlich erhöhte Autophagieaktivität. Diese kann unter Nährstoffmangel in T1Dm PTEC nicht mehr zusätzlich gesteigert werden (Sakai et al., 2019). Obwohl Autophagie generell einen protektiven Mechanismus darstellt, kann sie unter bestimmten Umständen auch direkt im Zelltod münden und bringt daher nicht nur Vorteile für die Zelle (Baehrecke, 2005; Shen & Codogno, 2011).

Der beschriebene zyto- bzw. renoprotektive Effekt einer gesteigerten Autophagie könnte zur Abmilderung der DN in *Vhl^{ΔPT}/STZ* verglichen zu *Kon/STZ* beigetragen haben. Eine negative Regulation der Autophagie durch ZBTB16 wurde bereits gezeigt (T. Zhang et al., 2015) und in der hier vorliegenden Arbeit anhand der Überexpression von ZBTB16 in OK LV Zellen untersucht. Die Induktion von ZBTB16 hatte die Herunterregulation von LC3II, ein allgemein anerkannter Biomarker für die Autophagosomenbildung/Autophagie, zur Folge. Aufgrund der Dynamik und der aufeinanderfolgenden Phasen der Autophagie kann eine reduzierte Menge an Autophagosomen an einer erniedrigten Autophagieaktivität oder an einem erhöhten Fluss der Autophagosomen (*flux*) hin zur lysosomalen Degradation liegen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail untersucht. Die im OK LV Zellkulturmodell beobachteten verminderten LC3II-Levels bei Überexpression von ZBTB16 sprechen für eine Reduktion der Autophagie. Die Ergebnisse passen zu verschiedenen Publikationen. Beispielsweise wurde in einem genomweitem siRNA-Screen entdeckt, dass ein *knockdown*

von *Zbtb16* zur Aktivierung der Autophagie führt (Lipinski et al., 2010). Die Arbeiten von Zhang et al. untersuchten später den Einfluss von ZBTB16 auf die Autophagie in HEK293T sowie HeLa Zellen näher und konnten eine hemmende Rolle für ZBTB16 auf ATG14L feststellen (T. Zhang et al., 2015). ZBTB16 agiert dabei als Adapter zur Bildung des aktiven E3-Ubiquitinligasekomplexes CULLIN3-ROC1-ZBTB16. ATG14L wiederum ist essentieller Bestandteil des *class III phosphatidylinositol 3 kinase* (PtdIns3K) Komplexes, der sich aus Beclin-1, VPS34, VPS15 und ATG14L zusammensetzt (Murrow & Debnath, 2013; D. Yang et al., 2018). Nach der Initiationsphase induziert der PtdIns3K-Komplex die Nukleationsphase und Reifung des Autophagosoms. Die Regulation von ATG14L durch ZBTB16 erfolgte dabei nicht auf mRNA sondern auf Proteinebene durch eine mögliche Interaktion der BATS (*Barkor/Atg14(L) autophagosome targeting sequence*) Domäne von ATG14L mit der zentralen Domäne von ZBTB16 im CULLIN3-ROC1-ZBTB16-Komplex (T. Zhang et al., 2015). Es kommt zur Ubiquitinierung von ATG14L durch CULLIN3-ROC1-ZBTB16 und zum proteasomalen Abbau von ATG14L (T. Zhang et al., 2015). Da die hier beschriebene Kaskade im Zytoplasma abläuft, ist auch ZBTB16 dort aktiv. Somit erfüllt ZBTB16, neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor im Zellkern, auch eine Rolle im Zytoplasma. Die Lokalisation im Zytoplasma konnte sowohl an OK LV +Ind +ZBTB16 +Dox als auch an TAL LV +Ind +ZBTB16 +Dox *via* Immunfluoreszenzfärbung als auch im Western Blot bestätigt werden. Dementsprechend wird die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse des verwendeten OK LV Zellkulturmodells zusätzlich gestärkt. Die Autophagie wurde in unserem Mausmodell nicht untersucht. Allerdings zeigten sich signifikant erhöhte ZBTB16-Levels auf RNA- und Proteinebene in Kon/STZ verglichen zu *Vhl*^{ΔPT}/STZ. Die Erkenntnisse, dass Autophagie überwiegend protektiv wirkt und ZBTB16 die Autophagie hemmt, könnte ZBTB16 einen Beitrag zur Pathogenese der DN in Kon/STZ leisten.

Eine andere Veröffentlichung, die ZBTB16 im T2Dm Mausmodell (db/db) untersuchte, stellte auch erhöhte Proteinmengen von ZBTB16 fest (Zhao et al., 2017). Die Lokalisation von ZBTB16 in db/db Mäusen zeigte sich vor allem in den renalen Epithelzellen der Tubuli (Zhao et al., 2017) und deckt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen. In den db/db Mäusen wurde eine Hemmung der Autophagie vorgefunden, die sich auf eine Aktivierung durch ZBTB16 zurückführen ließ. Ebenso zeigte sich eine vermehrte Bildung von Kollagen III in diesen Mäusen (Zhao et al., 2017). Gleiche Resultate ergaben auch Versuche mit PTEC von Ratten derselben Arbeitsgruppe. Eine Überexpression von ZBTB16 ging mit einer Abnahme von LC3II und zusätzlich einer Erhöhung von Kollagen III einher (Zhao et al., 2017). Eine Exposition der Zellen in hyperglykämischen Medium für mehr als 48 h führte zu einem Anstieg von ZBTB16 sowie Kollagen III und zu einer Erniedrigung von LC3II. Die Beobachtungen, dass Kollagen III durch die Überexpression von ZBTB16 zunimmt, lässt kurze, direkte Signalwege vermuten. Kollagen

III ist Hauptkomponente der EZM und die Produktion von EZM ist durch Autophagie negativ reguliert. Ebenfalls ist bekannt, dass Autophagie den Abbau von Typ I und III Kollagen in renalen Tubuluszellen fördert (S. Liu et al., 2016; Pushpakumar, Kundu, Metreveli, Tyagi, & Sen, 2013). Kurzum, je mehr Autophagie desto weniger EZM. Mit dem Wissen, dass eine glomeruläre und tubuläre Akkumulation von EZM ein Kennzeichen späterer Phasen der DN darstellt, kann auch hier ein indirekter pathologischer Effekt von ZBTB16 vorliegen. Das heißt, die höheren Proteinlevels von ZBTB16 in Kon/STZ im Vergleich zu *Vhl*^{ΔPT}/STZ führen zu einer Reduktion der Autophagie, dadurch kommt es zur Akkumulation von Kollagen III/EZM in renalen Tubuluszellen.

Fasst man die Resultate aktueller Publikationen, der hier durchgeführten Mausanalysen und der Versuche an OK LV +Ind +ZBTB16 ± Dox zusammen, könnte sich folgendes Bild ergeben: ZBTB16 ist vermehrt unter einer diabetischen Stoffwechsellage exprimiert und eine erhöhte Aktivität von ZBTB16 hemmt die Autophagie und führt zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber Stressfaktoren. Weiterhin scheint ZBTB16 an der autophagieabhängigen Regulation von Kollagen III beteiligt. Inwiefern die Regulation von ZBTB16 durch den *knockout* von *Vhl* bzw. die Stabilisierung von HIF-1 α stattfindet, ist unbekannt.

5.2.6.3 ZBTB16 und Zellproliferation

Der Effekt von ZBTB16 auf die Zellproliferation wurde am OK LV Zellkulturmodell untersucht. Hierbei zeigte sich eine geringe Erhöhung der Proliferation nach Überexpression von ZBTB16. Das Zellwachstum bzw. die Zellvermehrung wurde auf zwei verschiedene Arten untersucht. Eine Methode benutzte PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), ein Protein, welches in der G1- und S-Phase des Zellzyklus synthetisiert wird. Die Resultate zeigten, dass bereits ohne die Wirkung Doxycyclin eine vermehrte Zellproliferation der OK LV +Ind +ZBTB16 im Vergleich zur Kontrollzelllinie vorlag. Die Überexpression von ZBTB16 durch Doxycyclin führte zu keiner weiteren Steigerung der Proliferation. Ähnliches wurde mit der zweiten Methode beobachtet, die die Proliferationsrate über die Zellviabilität bestimmt. Bereits bei der ersten Messung nach 24 h Zellkultivierung war auch hier die Proliferation der uninduzierten Zelllinie OK LV +Ind +ZBTB16 höher im Vergleich zur uninduzierten und induzierten Kontrollzelllinie. Die Inkubation von OK LV +Ind +ZBTB16 mit Doxycyclin zeigte bei diesem Messpunkt keine weiteren Veränderungen. Die erhaltenen Ergebnisse beider Methoden bekräftigten das subjektive Empfinden eines schnelleren Zellwachstums der OK LV +Ind +ZBTB16 Zellen, welches etwa 12–20 h nach Aussäen der Zellen bemerkt wurde. Hierfür kann *leakiness* eine mögliche Erklärung liefern, wie auch von Wasim et al. an lentiviralen ZBTB16-Zelllinien beobachtet (Wasim et al., 2010). Die basale ZBTB16-Expression ohne Doxycyclin beeinflusste das Proliferationsverhalten der OK LV

Zellen offenbar deutlicher, als es während der Verifizierung des Zellmodells erkennbar war. Mittels Western Blot und Immunfluoreszenz konnten keine erheblichen Proteinmengen von ZBTB16 in uninduzierten OK LV Zellen detektiert werden. Trotz Nutzung von tetracyclin-freiem FKS im OK LV Vollmedium konnte dieser Effekt nicht komplett unterdrückt werden. *Leakiness* im TET-ON-Systems ist ein leider oft beschriebenes Problem (Pham, Moretti, Goodall, & Pitson, 2008; Sun, Chen, & Xiao, 2007). Dennoch ist ein förderlicher Effekt von ZBTB16 auf die Zellproliferation nicht auszuschließen. Ein Blick in die Literatur ergibt ein sehr diverses Bild von ZBTB16 im Kontext der Zellproliferation/-überlebensrate. Es reicht von ohne Effekt in der Leukämie-Zelllinie CCRF-CEM-C7H2 (Wasim et al., 2010) über Erhöhung der Zellproliferation in Spermato gonien und in den Zelllinien HEK293, NIH3T3 (Fibroblasten), HCT116 (Kolonkrebs), Caki-1 (*clear cell renal cell carcinoma*) sowie H460 (Lungenkrebs) (Choi et al., 2014; Costoya et al., 2004) bis hin zur Hemmung der Prolifera-tion wie in den hämatopoetischen Zelllinien Jurkat, NB4, U937 und 32DG/GM (Bernardo et al., 2007; Choi et al., 2014; Costoya et al., 2004; McConnell et al., 2003; Shaknovich et al., 1998) oder auch in verschiedenen Melanomzelllinien (Felicetti et al., 2004). Da es sich um unterschiedliche Zelltypen/Gewebe handelt, ist der Effekt von ZBTB16 sehr zelltypspezi-fisch. Hierbei sind einige publizierte Daten mit Vorsicht zu interpretieren, besonders bei der Untersuchung des Zellzyklus von Krebszellen. Krebszellen sind entartete Zellen, in denen wichtige Regulatorproteine teilweise nicht funktionell aktiv sind und Signalwege nicht wie gewöhnlich ablaufen.

5.2.7 Mechanismen einer HIF-1 α -bedingten Präkonditionierung

Hypoxie spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen. HIF-Proteine sind hierbei die wichtigsten Regulatoren und sorgen für eine angemessene Antwort durch die Aktivierung von Genen, die zur Verbesserung der Sauerstoffverfügbarkeit und -versorgung führen. In der hier vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss eines spezifischen *knock-outs* von *Vhl* im PT untersucht. Der *Vhl-knockout* in den PTEC bewirkte die Stabilisierung von HIF-1 α , wodurch HIF-1 α in einem Komplex mit weiteren Proteinen im Zellkern als Transkriptionsfaktor agiert und entsprechende Zielgene reguliert. Neben dem Einfluss des *knockouts per se* (*Vhl*^{APT}), wurden zudem die Auswirkungen einer frühzeitigen Aktivierung von HIF-1 α auf die Ausbildung eines STZ-induzierten T1Dm untersucht (*Vhl*^{APT}/STZ). Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde das Phänomen einer Präkonditionierung in *Vhl*^{APT}/STZ beobachtet. Im Allgemeinen beschreibt der Begriff eine Situation, bei dem intrinsische zelluläre Schutzmechanismen als Antwort auf einen kurzen Reiz aktiviert werden und dadurch eine gewisse Adaption an Zellstress erzielt wird. Sind Zellen einem subletalen, transienten Stress wie einer kurzen oder milden Sauerstoffunterversorgung ausgesetzt, entwickeln sie daraufhin eine gewisse zeitliche Toleranz gegenüber einem folgendem, heftigeren Stressor.

Das heißt, die genetische Inaktivierung von *Vhl* verhinderte den Diabetes-bedingten Anstieg renalen Hif-1 α , wie der Vergleich der RNA-Seq von Hif-1 α zwischen Kon/STZ und *Vhl*^{APT}/STZ zeigte. Ebenso verhinderte der *knockout* von *Vhl* den Anstieg der GFR sowie in Teilen die Ausprägung pathologisch-morphologischer Veränderungen in *Vhl*^{APT}/STZ. Zudem führte der initiale *Vhl-knockout* und die nachfolgende STZ-Behandlung zu einer Verbesserung der Nierenfunktion (AG Theilig, unveröffentlicht, siehe Kapitel 5.2.2). Diese Beobachtungen werden durch die Studie von Nordquist et al. gestützt, die an STZ-induzierten diabetischen Ratten forschten (Nordquist et al., 2015). Der Sauerstoffpartialdruck war sowohl im Kortex als auch der Medulla der Niere von T1Dm-Ratten deutlich reduziert, was auf hypoxische Verhältnisse deutet. Die Tiere zeigten eine erhöhte GFR, tubulointerstitielle Schäden, Proteinurie und weiteres. Ähnliches wurde auch in unserer diabetischen Kontrollgruppe Kon/STZ beobachtet. Die Behandlung der Ratten mit Kobaltchlorid führte u. a. zur Normalisierung der GFR und zur Verbesserung der allgemeinen Nierenfunktion (Nordquist et al., 2015), was sich mit unserer Mausgruppe *Vhl*^{APT}/STZ deckt. Dass HIFs eine protektive Rolle spielen, konnte sowohl an verschiedenen genetischen *Hif-knockout/-down* Mausmodellen, an Ischämie/Reperfusion-Rattenmodellen als auch durch die Verwendung verschiedener HIF-aktivierender Substanzen wie Kobaltchlorid oder mittels *Vhl-knockout* belegt werden, wo HIFs eine akute Nierenschädigung (AKI, *acute kidney injury*) abmilderten (Conde et al., 2012; Hill et al., 2008; Iguchi et al., 2008; Kapitsinou et al., 2012; Kojima et al., 2007; Nangaku, Rosenberger, Heyman, & Eckardt, 2013; Schley et al., 2011; Shokeir et al., 2012; Z. Wang et al., 2012; C. C. Yang, Lin, Wu, Chien, & Lai, 2009; L. Zhang et al., 2011).

Allerdings scheint der Zeitpunkt der HIF-Aktivierung von Belang. Die sehr frühe HIF-Aktivierung durch die Gabe von PHD-Inhibitoren führte in Ratten zu renalen Fibrosen. Erfolgte die Gabe später, wurde die renale Fibrose reduziert und hatte auch einen allgemeinen Schutz der Nierenfunktion zur Folge (Yu et al., 2012). Aufgrund dessen, lassen sich keine Aussagen treffen, wie sich die Ausprägung der DN besonders in der *Vhl*^{APT}/STZ-Mausgruppe entwickelt hätte. Das von uns neu generierte transgene Mausmodell basiert auf dem Cre/loxP-System in Kombination mit SGLT2^{Cre}-Promotor und *Vhl*^{f/f}. Nach entsprechenden Kreuzungen der Mauslinien weisen die Nachkommen bereits ab der Embryonalphase eine gewebsspezifische *Vhl*-Defizienz im S1 und S2 des PT auf. Somit ist keine spätere Induktion des *knockouts* von *Vhl* im PT möglich. Neben dem zeitlichen Faktor tritt der Grad des bei uns erzielten *Vhl-knockouts* im PT hinzu (siehe auch Kapitel 5.1.2). Ob ein stärkerer *knockout*-Grad deutlicher zur Pathogenese der DN beigetragen oder sie weiter abgemildert hätte, kann man nicht abschätzen.

Ein Frage, die sich stellt, ist der zugrunde liegende Mechanismus, der hinter der Präkonditionierung durch HIF-1 steckt. Die Aktivierung von HIFs bewirkt Histonmodifizierungen, wodurch die DNA in ihrer Packungsdichte geändert wird und HIF-Zielgene besser zugäng-

lich sind (Mimura et al., 2012; Nangaku et al., 2013). Solche epigenetischen Modulationen werden vorwiegend durch Methylierungen und Acetylierungen der DNA und der Histone erreicht. Histonmethylierungen werden durch Methyltransferasen und Demethylasen vermittelt. Dabei entscheidet der Methylierungsstatus spezifischer Aminosäuren innerhalb der Histone, ob es zu einer Genaktivierung oder -repression kommt. Histonacetylierungen hingegen sind Marker für Genaktivierung, während Histondeacetylierungen Marker für Genrepression sind. Diese Histonmodifizierungen ändern die genregulatorische Antwort auf Hypoxie. Das erlaubt es der Zelle sich an Stresssituationen durch die Erniedrigung des Sauerstoffverbrauchs anzupassen. Der Sauerstoffverbrauch kann durch die Umstellung des Stoffwechsel vom oxidativen hin zum glykolytischen Stoffwechsel oder durch die Reduktion des Energiebedarfs für zelluläre Prozesse, wie dem der Zellteilung, gesenkt werden (Ratcliffe, 2013).

Bestimmte Histon-Lysin-Demethylasen (KDM) und Histon-Acetylasen werden unter hypoxischen Bedingungen durch HIF-1 α -Stabilisierung induziert, wie KDM3A und KDM4B (Beyer, Kristensen, Jensen, Johansen, & Staller, 2008; Pollard et al., 2008). Interessanterweise ist KDM3A in renalen Krebszellen, die *Vhl*-defizient sind, induziert. Mimura et al. (Mimura et al., 2012) untersuchten den zeitlichen Verlauf der Hypoxie-Effekte und stellten fest, dass HIF-1 innerhalb der ersten 8 Stunden nach Hypoxie-Induktion zuerst Gene für grundlegende Stoffwechselprozesse, wie Glukosetransporter und glykolytische Enzyme für die anaerobe Glykolyse, aktiviert. In der späteren Phase der Hypoxie (12–24 h) kommt es zur Regulation zelltypspezifischer HIF-Zielgene (Mimura et al., 2012; Nangaku et al., 2013). Die Demethylase KDM3A zählt zu den frühhypoxischen Genen. HIF-1 bindet an die Promotorregion von *Kdm3a* und *Kdm3a* wird aktiviert. Gemeinsam binden HIF-1 und KDM3A an entsprechende regulatorische Bereiche weiterer frühhypoxischer Zielgene. Hypoxie-bedingte Histonmodifikationen, die durch histonmodifizierende Enzyme wie KDM3A katalysiert werden, bewirken eine Änderung der Chromatinstruktur. Darüber hinaus agiert HIF-1 nicht nur unter hypoxischen Bedingungen. Der Transkriptionsfaktor bindet auch unter Normoxia an die DNA, bewahrt die Chromatinstruktur und kann daher auch im Zellkern detektiert werden. Beispielsweise bindet HIF-1 unter Normoxia die Promotorregion von *Nr2f1*. NR2F1 ist ein Defenzprotein gegenüber oxidativen Stress und dessen Aktivierung wirkt sich deutlich und vorteilhaft auf die DN aus (Nangaku et al., 2013; Pergola et al., 2011). Ein weiterer exemplarischer Regulationsmechanismus ist der von *Slc2a3* (GLUT3) in HUVEC-Zellen: Unter Normoxia ist HIF-1 α an den Transkriptionsstart von *Slc2a3* gebunden, der in räumlicher Nähe zu einem *enhancer* liegt. Bei Sauerstoffmangel führt die zusätzliche Bindung weiterer HIFs zu einer Konformationsänderung dahingehend, dass ein weiterer *enhancer* in räumliche Nähe zum Komplex aus ersten *enhancer*, Transkriptionsstart und HIF-1 kommt. Dies bewirkt die HIF-1 vermittelte Rekrutierung von KDM3A an *Slc2a3*. KDM3A demethyliert eine reprimierende Histonmarkierung und parallel dazu findet eine aktivierende Histonacetylierung statt. Im weiteren Verlauf resultiert es in einer robusten

Hochregulation von *Slc2a3* (Mimura et al., 2012). Die RNA-Seq ergab eine signifikant erhöhte Expression von *Kdm1a* und *Kdm5d* in *Vhl*^{ΔPT} und Kon/STZ im Vergleich zur Kontrollgruppe, was auf eine epigenetische Modulation in diesen Gruppen deutet. KDM1a fördert renale Fibrose im STZ-induzierten DN Rattenmodell (Dong, Yu, & Zhong, 2022). Auch die Histondeacetylase *Hdac11* war in den gleichen Gruppen signifikant erhöht und *Hdac11* steht im Zusammenhang renale Fibrosen zu begünstigen (Mao et al., 2020).

Histonmodifikationen sind allerdings nicht die einzigen Möglichkeiten wie HIF-1 die Genregulation längerfristig beeinflusst. HIF-1 α ist u. a. mit dem Chromatin-remodelling Komplex SWI/SNF assoziiert, um Hypoxie-induzierbare Gene zu regulieren (Kenneth, Mudie, van Uden, & Rocha, 2009). Oder auch die beschriebene Interaktion von HIF-1 α mit MTA1 (*metastasis-associated 1*), eine Nukleosom-remodelling-Deacetylase, die zur Erhöhung der Expression von *Vegf* und zur Erhöhung der Stabilität und der Transkriptionsaktivität von HIF-1 α führt (Yoo, Kong, & Lee, 2006). Die dynamischen Umbauprozesse der Chromatinstruktur unter Hypoxie beeinflussen somit ebenfalls die nachfolgende Gentranskription HIF-abhängiger Gene bzw. erleichtern sie. Zugleich führen diese Hypoxie-induzierten remodelling-Prozesse der Chromatinstruktur zu einer schnelleren, rapiden Aktivierung der Transkriptionskaskade sobald der entsprechende Stressor präsent ist (Choudhry & Harris, 2018).

Die Simulation transienter hypoxischer Bedingung im PT durch den *knockout* von *Vhl* und die damit verbundene Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α führt zur epigenetischen Reprogrammierung, die in einer Änderung des Genexpressionsprofils resultiert. Die genauen epigenetischen Mechanismen hierzu müssen weiter studiert werden.

Nicht angesprochen wurden ganz andere, nämlich HIF-unabhängige, Effekte von VHL. VHL interagiert nicht nur mit HIFs sondern auch mit weiteren Substraten und Bindepartnern, wie AKT oder B-Myb, ein Transkriptionsfaktor zur Zellzyklusregulation (J. Zhang & Zhang, 2018). Inwiefern die damit verbundenen Signalwege zur Abmilderung der DN führen, würde an dieser Stelle zu weit führen. Weil VHL am besten im HIF-System beschrieben ist, wurde sich hierauf beschränkt.

Literaturverzeichnis

- Abd-Elrahman, K. S., Hamilton, A., Vasefi, M., & Ferguson, S. S. G. (2018). Autophagy is increased following either pharmacological or genetic silencing of mGluR5 signaling in Alzheimer's disease mouse models. *Mol Brain*, 11(1), 19. doi:10.1186/s13041-018-0364-9
- Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L. R., & Manfredi, G. (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 9(3), 265-276. doi:10.1016/j.cmet.2009.01.012
- Ahler, E., Sullivan, W. J., Cass, A., Braas, D., York, A. G., Bensinger, S. J., . . . Christofk, H. R. (2013). Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PLoS One*, 8(5), e64561. doi:10.1371/journal.pone.0064561
- Al-Mashhadi, R. H., Skott, O., Vanhoutte, P. M., & Hansen, P. B. (2009). Activation of A(2) adenosine receptors dilates cortical efferent arterioles in mouse. *Kidney Int*, 75(8), 793-799. doi:10.1038/ki.2008.684
- Alicic, R. Z., Rooney, M. T., & Tuttle, K. R. (2017). Diabetic Kidney Disease: Challenges Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*, 12(12), 2032-2045. doi:10.2215/CJN.11491116
- Alsahli, M., & Gerich, J. E. (2017). Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 133, 1-9. doi:10.1016/j.diabetes.2017.07.033
- Amsellem, S., Gburek, J., Hamard, G., Nielsen, R., Willnow, T. E., Devuyst, O., . . . Kozyraki, R. (2010). Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*, 21(11), 1859-1867. doi:10.1681/ASN.2010050492
- Anders, H. J., Davis, J. M., & Thurau, K. (2016). Nephron Protection in Diabetic Kidney Disease. *N Engl J Med*, 375(21), 2096-2098. doi:10.1056/NEJMcibr1608564
- Anderson, S., & Vora, J. P. (1995). Current concepts of renal hemodynamics in diabetes. *J Diabetes Complications*, 9(4), 304-307. doi:10.1016/1056-8727(95)80028-d
- Aseem, O., Smith, B. T., Cooley, M. A., Wilkerson, B. A., Argraves, K. M., Remaley, A. T., & Argraves, W. S. (2014). Cubilin maintains blood levels of HDL and albumin. *J Am Soc Nephrol*, 25(5), 1028-1036. doi:10.1681/ASN.2013060671
- Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., . . . Jenkins, N. A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet*, 11(4), 369-375. doi:10.1038/ng1295-369
- Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(6), 505-510. doi:10.1038/nrm1666
- Bank, N. (1991). Mechanisms of diabetic hyperfiltration. *Kidney Int*, 40(4), 792-807. doi:10.1038/ki.1991.277

- Barbosa Junior Ade, A., Zhou, H., Hultenschmidt, D., Totovic, V., Jurilj, N., & Pfeifer, U. (1992). Inhibition of cellular autophagy in proximal tubular cells of the kidney in streptozotocin-diabetic and uninephrectomized rats. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 61(6), 359-366. doi:10.1007/BF02890439
- Baribault, H. (2016). Mouse Models of Type 2 Diabetes Mellitus in Drug Discovery. *Methods Mol Biol*, 1438, 153-175. doi:10.1007/978-1-4939-3661-8_10
- Barna, M., Hawe, N., Niswander, L., & Pandolfi, P. P. (2000). Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet*, 25(2), 166-172. doi:10.1038/76014
- Bell, P. D., Lapointe, J. Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K., . . . Okada, Y. (2003). Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 4322-4327. doi:10.1073/pnas.0736323100
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*, 29(10), 2570-2581. doi:10.1128/MCB.00166-09
- Bernardo, M. V., Yelo, E., Gimeno, L., Campillo, J. A., & Parrado, A. (2007). Identification of apoptosis-related PLZF target genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(2), 317-322. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.085
- Betz, B., & Conway, B. R. (2016). An Update on the Use of Animal Models in Diabetic Nephropathy Research. *Curr Diab Rep*, 16(2), 18. doi:10.1007/s11892-015-0706-2
- Beyer, S., Kristensen, M. M., Jensen, K. S., Johansen, J. V., & Staller, P. (2008). The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J Biol Chem*, 283(52), 36542-36552. doi:10.1074/jbc.M804578200
- Biemesderfer, D. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of megalin: linking urinary protein and gene regulation in proximal tubule? *Kidney Int*, 69(10), 1717-1721. doi:10.1038/sj.ki.5000298
- Biemesderfer, D., DeGray, B., & Aronson, P. S. (2001). Active (9.6 s) and inactive (21 s) oligomers of NHE3 in microdomains of the renal brush border. *J Biol Chem*, 276(13), 10161-10167. doi:10.1074/jbc.M008098200
- Biemesderfer, D., Nagy, T., DeGray, B., & Aronson, P. S. (1999). Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. *J Biol Chem*, 274(25), 17518-17524. doi:10.1074/jbc.274.25.17518
- Birn, H., Fyfe, J. C., Jacobsen, C., Mounier, F., Verroust, P. J., Orskov, H., . . . Christensen, E. I. (2000). Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest*, 105(10), 1353-1361. doi:10.1172/JCI8862
- Bobulescu, I. A., & Moe, O. W. (2009). Luminal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange in the proximal tubule. *Pflugers Arch*, 458(1), 5-21. doi:10.1007/s00424-008-0595-1
- Bolte, S., & Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, 224(Pt 3), 213-232. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x

- Bolzan, A. D., & Bianchi, M. S. (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res*, 512(2-3), 121-134. doi:10.1016/s1383-5742(02)00044-3
- Bonventre, J. V. (2012). Can we target tubular damage to prevent renal function decline in diabetes? *Semin Nephrol*, 32(5), 452-462. doi:10.1016/j.semnephrol.2012.07.008
- Brattsand, M. (2020). Doxycycline at Low Concentrations Could Influence Your Experimental Results When Working With Prostate Cancer Cell Lines. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 28.
- Breyer, M. D., Bottinger, E., Brosius, F. C., 3rd, Coffman, T. M., Harris, R. C., Heilig, C. W., . . . Amdcc. (2005). Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 16(1), 27-45. doi:10.1681/ASN.2004080648
- Brownlee, M. (1995). The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med*, 18(4), 275-281.
- Bu, G., & Marzolo, M. P. (2000). Role of rap in the biogenesis of lipoprotein receptors. *Trends Cardiovasc Med*, 10(4), 148-155. doi:10.1016/s1050-1738(00)00045-1
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., . . . Pandolfi, P. P. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*, 118(9), 3065-3074. doi:10.1172/JCI34739
- Cassady, J. P., D'Alessio, A. C., Sarkar, S., Dani, V. S., Fan, Z. P., Ganz, K., . . . Jaenisch, R. (2014). Direct lineage conversion of adult mouse liver cells and B lymphocytes to neural stem cells. *Stem Cell Reports*, 3(6), 948-956. doi:10.1016/j.stemcr.2014.10.001
- Catrina, S. B., & Zheng, X. (2021). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia*, 64(4), 709-716. doi:10.1007/s00125-021-05380-z
- Chagnac, A., Herman, M., Zingerman, B., Erman, A., Rozen-Zvi, B., Hirsh, J., & Gafter, U. (2008). Obesity-induced glomerular hyperfiltration: its involvement in the pathogenesis of tubular sodium reabsorption. *Nephrol Dial Transplant*, 23(12), 3946-3952. doi:10.1093/ndt/gfn379
- Chagnac, A., Zingerman, B., Rozen-Zvi, B., & Herman-Edelstein, M. (2019). Consequences of Glomerular Hyperfiltration: The Role of Physical Forces in the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease in Diabetes and Obesity. *Nephron*, 143(1), 38-42. doi:10.1159/000499486
- Chang, J., Yan, J., Li, X., Liu, N., Zheng, R., & Zhong, Y. (2021). Update on the Mechanisms of Tubular Cell Injury in Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*, 8, 661076. doi:10.3389/fmed.2021.661076
- Chatelet, F., Brianti, E., Ronco, P., Roland, J., & Verroust, P. (1986). Ultrastructural localization by monoclonal antibodies of brush border antigens expressed by glomeruli. I. Renal distribution. *Am J Pathol*, 122(3), 500-511.
- Chawla, T., Sharma, D., & Singh, A. (2010). Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy. *World J Diabetes*, 1(5), 141-145. doi:10.4239/wjd.v1.i5.141

- Chen, R., Fearnley, I. M., Peak-Chew, S. Y., & Walker, J. E. (2004). The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem*, 279(25), 26036-26045. doi:10.1074/jbc.M402710200
- Chen, S., Qian, J., Shi, X., Gao, T., Liang, T., & Liu, C. (2014). Control of hepatic gluconeogenesis by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Endocrinol*, 28(12), 1987-1998. doi:10.1210/me.2014-1164
- Chen, S. J., Lv, L. L., Liu, B. C., & Tang, R. N. (2020). Crosstalk between tubular epithelial cells and glomerular endothelial cells in diabetic kidney disease. *Cell Prolif*, 53(3), e12763. doi:10.1111/cpr.12763
- Cheng, H., Pablico, S. J., Lee, J., Chang, J. S., & Yu, S. (2020). Zinc Finger Transcription Factor Zbtb16 Coordinates the Response to Energy Deficit in the Mouse Hypothalamus. *Front Neurosci*, 14, 592947. doi:10.3389/fnins.2020.592947
- Cheng, L., Wu, Q., Kortenoeven, M. L. A., Pisitkun, T., & Fenton, R. A. (2015). A Systems Level Analysis of Vasopressin-mediated Signaling Networks in Kidney Distal Convoluted Tubule Cells. *Sci Rep*, 5, 12829. doi:10.1038/srep12829
- Chi, L. M., Yu, J. S., & Chang, Y. S. (2002). Identification of protein kinase CK2 as a potent kinase of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(3), 586-591. doi:10.1016/S0006-291X(02)00515-6
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, 138, 271-281. doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023
- Choi, W. I., Kim, M. Y., Jeon, B. N., Koh, D. I., Yun, C. O., Li, Y., . . . Hur, M. W. (2014). Role of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. *J Biol Chem*, 289(27), 18625-18640. doi:10.1074/jbc.M113.538751
- Choudhry, H., & Harris, A. L. (2018). Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab*, 27(2), 281-298. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.005
- Christ, A., Terryn, S., Schmidt, V., Christensen, E. I., Huska, M. R., Andrade-Navarro, M. A., . . . Willnow, T. E. (2010). The soluble intracellular domain of megalin does not affect renal proximal tubular function in vivo. *Kidney Int*, 78(5), 473-477. doi:10.1038/ki.2010.169
- Christensen, E. I., & Birn, H. (2001). Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(4), F562-573. doi:10.1152/ajprenal.2001.280.4.F562
- Christensen, E. I., Birn, H., Rippe, B., & Maunsbach, A. B. (2007). Controversies in nephrology: renal albumin handling, facts, and artifacts! *Kidney Int*, 72(10), 1192-1194. doi:10.1038/sj.ki.5002526

- Christensen, E. I., Birn, H., Storm, T., Weyer, K., & Nielsen, R. (2012). Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)*, 27(4), 223-236. doi:10.1152/physiol.00022.2012
- Christensen, E. I., Birn, H., Verroust, P., & Moestrup, S. K. (1998). Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *Int Rev Cytol*, 180, 237-284. doi:10.1016/s0074-7696(08)61772-6
- Christensen, E. I., Moskaug, J. O., Vorum, H., Jacobsen, C., Gundersen, T. E., Nykjaer, A., . . . Moestrup, S. K. (1999). Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol*, 10(4), 685-695. doi:10.1681/ASN.V104685
- Christensen, E. I., Nielsen, S., Moestrup, S. K., Borre, C., Maunsbach, A. B., de Heer, E., . . . Verroust, P. (1995). Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Eur J Cell Biol*, 66(4), 349-364.
- Christensen, E. I., Verroust, P. J., & Nielsen, R. (2009). Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch*, 458(6), 1039-1048. doi:10.1007/s00424-009-0685-8
- Christensen, E. I., Wagner, C. A., & Kaissling, B. (2012). Uriniferous tubule: structural and functional organization. *Compr Physiol*, 2(2), 805-861. doi:10.1002/cphy.c100073
- Churchill, P. C., & Churchill, M. C. (1985). A1 and A2 adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther*, 232(3), 589-594.
- Comper, W. D., Haraldsson, B., & Deen, W. M. (2008). Resolved: normal glomeruli filter nephrotic levels of albumin. *J Am Soc Nephrol*, 19(3), 427-432. doi:10.1681/ASN.2007090997
- Conde, E., Alegre, L., Blanco-Sanchez, I., Saenz-Morales, D., Aguado-Fraile, E., Ponte, B., . . . Garcia-Bermejo, M. L. (2012). Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS One*, 7(3), e33258. doi:10.1371/journal.pone.0033258
- Cooper, M. E. (1998). Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*, 352(9123), 213-219. doi:10.1016/S0140-6736(98)01346-4
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., . . . Pandolfi, P. P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*, 36(6), 653-659. doi:10.1038/ng1367
- Coudroy, G., Gburek, J., Kozyraki, R., Madsen, M., Trugnan, G., Moestrup, S. K., . . . Maurice, M. (2005). Contribution of cubilin and amnionless to processing and membrane targeting of cubilin-amnionless complex. *J Am Soc Nephrol*, 16(8), 2330-2337. doi:10.1681/ASN.2004110925
- Cripps, M. J., Bagnati, M., Jones, T. A., Ogunkolade, B. W., Sayers, S. R., Caton, P. W., . . . Turner, M. D. (2020). Identification of a subset of trace amine-associated receptors and ligands as potential modulators of insulin secretion. *Biochem Pharmacol*, 171, 113685. doi:10.1016/j.bcp.2019.113685

- Cui, S., Guerriero, C. J., Szalinski, C. M., Kinlough, C. L., Hughey, R. P., & Weisz, O. A. (2010). OCRL1 function in renal epithelial membrane traffic. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(2), F335-345. doi:10.1152/ajprenal.00453.2009
- Culi, J., Springer, T. A., & Mann, R. S. (2004). Boca-dependent maturation of beta-propeller/EGF modules in low-density lipoprotein receptor proteins. *EMBO J*, 23(6), 1372-1380. doi:10.1038/sj.emboj.7600132
- Curthoys, N. P., & Moe, O. W. (2014). Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(9), 1627-1638. doi:10.2215/CJN.10391012
- Dai, J., Bercury, K. K., & Macklin, W. B. (2014). Interaction of mTOR and Erk1/2 signaling to regulate oligodendrocyte differentiation. *Glia*, 62(12), 2096-2109. doi:10.1002/glia.22729
- Daskalaki, I., Gkikas, I., & Tavernarakis, N. (2018). Hypoxia and Selective Autophagy in Cancer Development and Therapy. *Front Cell Dev Biol*, 6, 104. doi:10.3389/fcell.2018.00104
- De Rasmio, D., Signorile, A., Larizza, M., Pacelli, C., Cocco, T., & Papa, S. (2012). Activation of the cAMP cascade in human fibroblast cultures rescues the activity of oxidatively damaged complex I. *Free Radic Biol Med*, 52(4), 757-764. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.030
- De, S., Kuwahara, S., & Saito, A. (2014). The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes (Basel)*, 4(3), 333-355. doi:10.3390/membranes4030333
- Deng, A., Munger, K. A., Valdivielso, J. M., Satriano, J., Lortie, M., Blantz, R. C., & Thomson, S. C. (2003). Increased expression of ornithine decarboxylase in distal tubules of early diabetic rat kidneys: are polyamines paracrine hypertrophic factors? *Diabetes*, 52(5), 1235-1239. doi:10.2337/diabetes.52.5.1235
- Dickson, L. E., Wagner, M. C., Sandoval, R. M., & Molitoris, B. A. (2014). The proximal tubule and albuminuria: really! *J Am Soc Nephrol*, 25(3), 443-453. doi:10.1681/ASN.2013090950
- Dong, L., Yu, L., & Zhong, J. (2022). Histone lysine-specific demethylase 1 induced renal fibrosis via decreasing sirtuin 3 expression and activating TGF-beta1/Smad3 pathway in diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr*, 14(1), 2. doi:10.1186/s13098-021-00771-z
- Drummond, K., Mauer, M., & International Diabetic Nephropathy Study, G. (2002). The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes*, 51(5), 1580-1587. doi:10.2337/diabetes.51.5.1580
- Edvell, A., & Lindstrom, P. (1995). Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umea ob/ob). *Metabolism*, 44(7), 906-913. doi:10.1016/0026-0495(95)90244-9

- Eng, B., Mukhopadhyay, S., Vio, C. P., Pedraza, P. L., Hao, S., Battula, S., . . . Ferreri, N. R. (2007). Characterization of a long-term rat mTAL cell line. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(4), F1413-1422. doi:10.1152/ajprenal.00426.2006
- Eshbach, M. L., & Weisz, O. A. (2017). Receptor-Mediated Endocytosis in the Proximal Tubule. *Annu Rev Physiol*, 79, 425-448. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034234
- Faria, J., Gerritsen, K. G. F., Nguyen, T. Q., Mihaila, S. M., & Masereeuw, R. (2021). Diabetic proximal tubulopathy: Can we mimic the disease for in vitro screening of SGLT inhibitors? *Eur J Pharmacol*, 908, 174378. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174378
- Felicetti, F., Bottero, L., Felli, N., Mattia, G., Labbaye, C., Alvino, E., . . . Care, A. (2004). Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene*, 23(26), 4567-4576. doi:10.1038/sj.onc.1207597
- Fernandes, N., & Allbritton, N. L. (2009). Effect of the DEF motif on phosphorylation of peptide substrates by ERK. *Biochem Biophys Res Commun*, 387(2), 414-418. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.049
- Ferrero, D. M., Wacker, D., Roque, M. A., Baldwin, M. W., Stevens, R. C., & Liberles, S. D. (2012). Agonists for 13 trace amine-associated receptors provide insight into the molecular basis of odor selectivity. *ACS Chem Biol*, 7(7), 1184-1189. doi:10.1021/cb300111e
- Fioretto, P., Caramori, M. L., & Mauer, M. (2008). The kidney in diabetes: dynamic pathways of injury and repair. *The Camillo Golgi Lecture 2007. Diabetologia*, 51(8), 1347-1355. doi:10.1007/s00125-008-1051-7
- Fioretto, P., & Mauer, M. (2007). Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*, 27(2), 195-207. doi:10.1016/j.semnephrol.2007.01.012
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*, 93(1), 137-188. doi:10.1152/physrev.00045.2011
- Forbes, J. M., Cooper, M. E., Oldfield, M. D., & Thomas, M. C. (2003). Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 14(8 Suppl 3), S254-258. doi:10.1097/01.asn.0000077413.41276.17
- Foster, D. A., & Toschi, A. (2009). Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle*, 8(7), 1026-1029. doi:10.4161/cc.8.7.8044
- Friederich-Persson, M., Thorn, E., Hansell, P., Nangaku, M., Levin, M., & Palm, F. (2013). Kidney hypoxia, attributable to increased oxygen consumption, induces nephropathy independently of hyperglycemia and oxidative stress. *Hypertension*, 62(5), 914-919. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01425
- Friis, U. G., Stubbe, J., Uhrenholt, T. R., Svenningsen, P., Nusing, R. M., Skott, O., & Jensen, B. L. (2005). Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(5), F989-997. doi:10.1152/ajprenal.00201.2005

- Fujii, H., Kono, K., Nakai, K., Goto, S., Komaba, H., Hamada, Y., . . . Fukagawa, M. (2010). Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Am J Nephrol*, 31(4), 342-352. doi:10.1159/000297290
- Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc*, 1(4), e78. doi:10.1002/cpz1.78
- Fyfe, J. C., Madsen, M., Hojrup, P., Christensen, E. I., Tanner, S. M., de la Chapelle, A., . . . Moestrup, S. K. (2004). The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood*, 103(5), 1573-1579. doi:10.1182/blood-2003-08-2852
- Gallagher, H., Oleinikov, A. V., Fenske, C., & Newman, D. J. (2004). The adaptor disabled-2 binds to the third psi xNPxY sequence on the cytoplasmic tail of megalin. *Biochimie*, 86(3), 179-182. doi:10.1016/j.biochi.2004.03.001
- Gekle, M., Drumm, K., Mildenerger, S., Freudinger, R., Gassner, B., & Silbernagl, S. (1999). Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *J Physiol*, 520 Pt 3, 709-721. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.00709.x
- Gekle, M., Freudinger, R., & Mildenerger, S. (2001). Inhibition of Na⁺-H⁺ exchanger-3 interferes with apical receptor-mediated endocytosis via vesicle fusion. *J Physiol*, 531(Pt 3), 619-629. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0619h.x
- Gilbert, R. E. (2017). Proximal Tubulopathy: Prime Mover and Key Therapeutic Target in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes*, 66(4), 791-800. doi:10.2337/db16-0796
- Gilbertson, D. T., Liu, J., Xue, J. L., Louis, T. A., Solid, C. A., Ebben, J. P., & Collins, A. J. (2005). Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J Am Soc Nephrol*, 16(12), 3736-3741. doi:10.1681/ASN.2005010112
- Gomes, J. R., Lobo, A., Nogueira, R., Terceiro, A. F., Costelha, S., Lopes, I. M., . . . Saraiva, M. J. (2020). Neuronal megalin mediates synaptic plasticity-a novel mechanism underlying intellectual disabilities in megalin gene pathologies. *Brain Commun*, 2(2), fcaa135. doi:10.1093/braincomms/fcaa135
- Gorboulev, V., Schurmann, A., Vallon, V., Kipp, H., Jaschke, A., Klessen, D., . . . Koepsell, H. (2012). Na⁽⁺⁾-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes*, 61(1), 187-196. doi:10.2337/db11-1029
- Grahammer, F., Ramakrishnan, S. K., Rinschen, M. M., Larionov, A. A., Syed, M., Khatib, H., . . . Theilig, F. (2017). mTOR Regulates Endocytosis and Nutrient Transport in Proximal Tubular Cells. *J Am Soc Nephrol*, 28(1), 230-241. doi:10.1681/ASN.2015111224
- Grant, B. D., & Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), 597-608. doi:10.1038/nrm2755

- Gravotta, D., Perez Bay, A., Jonker, C. T. H., Zager, P. J., Benedicto, I., Schreiner, R., . . . Rodriguez-Boulan, E. (2019). Clathrin and clathrin adaptor AP-1 control apical trafficking of megalin in the biosynthetic and recycling routes. *Mol Biol Cell*, 30(14), 1716-1728. doi:10.1091/mbc.E18-12-0811
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*, 103(2), 137-149. doi:10.1016/j.diabres.2013.11.002
- Gurley, S. B., Clare, S. E., Snow, K. P., Hu, A., Meyer, T. W., & Coffman, T. M. (2006). Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(1), F214-222. doi:10.1152/ajprenal.00204.2005
- Guyton, A. C. (1991). Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*, 252(5014), 1813-1816. doi:10.1126/science.2063193
- Haase, V. H. (2006). The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int*, 69(8), 1302-1307. doi:10.1038/sj.ki.5000221
- Hader, C., & Plum, J. (2002). [Diabetic nephropathy - Diagnostic]. *Dtsch Med Wochenschr*, 127(24), 1324-1327. doi:10.1055/s-2002-32185
- Hakrroush, S., Moeller, M. J., Theilig, F., Kaissling, B., Sijmonsma, T. P., Jugold, M., . . . Kriz, W. (2009). Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease. *Am J Pathol*, 175(5), 1883-1895. doi:10.2353/ajpath.2009.080792
- Haraguchi, R., Kohara, Y., Matsubayashi, K., Kitazawa, R., & Kitazawa, S. (2020). New Insights into the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy: Proximal Renal Tubules Are Primary Target of Oxidative Stress in Diabetic Kidney. *Acta Histochem Cytochem*, 53(2), 21-31. doi:10.1267/ahc.20008
- Hasegawa, S., Tanaka, T., Saito, T., Fukui, K., Wakashima, T., Susaki, E. A., . . . Nangaku, M. (2020). The oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor enarodustat counteracts alterations in renal energy metabolism in the early stages of diabetic kidney disease. *Kidney Int*, 97(5), 934-950. doi:10.1016/j.kint.2019.12.007
- Hasslacher, C., Ritz, E., Wahl, P., & Michael, C. (1989). Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*, 4(10), 859-863. doi:10.1093/ndt/4.10.859
- Hasson, T. (2003). Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci*, 116(Pt 17), 3453-3461. doi:10.1242/jcs.00669
- He, G., Gupta, S., Yi, M., Michael, P., Hobbs, H. H., & Cohen, J. C. (2002). ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem*, 277(46), 44044-44049. doi:10.1074/jbc.M208539200
- He, J., Wu, M., Xiong, L., Gong, Y., Yu, R., Peng, W., . . . Xiang, T. (2020). BTB/POZ zinc finger protein ZBTB16 inhibits breast cancer proliferation and metastasis through up-regulating ZBTB28 and antagonizing BCL6/ZBTB27. *Clin Epigenetics*, 12(1), 82. doi:10.1186/s13148-020-00867-9

- He, P., & Yun, C. C. (2010). Mechanisms of the regulation of the intestinal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 238080. doi:10.1155/2010/238080
- Heerspink, H. J. L., Perco, P., Mulder, S., Leierer, J., Hansen, M. K., Heinzl, A., & Mayer, G. (2019). Canagliflozin reduces inflammation and fibrosis biomarkers: a potential mechanism of action for beneficial effects of SGLT2 inhibitors in diabetic kidney disease. *Diabetologia*, 62(7), 1154-1166. doi:10.1007/s00125-019-4859-4
- Helal, I., Fick-Brosnahan, G. M., Reed-Gitomer, B., & Schrier, R. W. (2012). Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol*, 8(5), 293-300. doi:10.1038/nrneph.2012.19
- Herbach, N., Rathkolb, B., Kemter, E., Pichl, L., Klaften, M., de Angelis, M. H., . . . Wanke, R. (2007). Dominant-negative effects of a novel mutated Ins2 allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich Ins2C95S mutant mice. *Diabetes*, 56(5), 1268-1276. doi:10.2337/db06-0658
- Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., . . . Haase, V. H. (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 117(12), 3810-3820. doi:10.1172/JCI30487
- Hill, P., Shukla, D., Tran, M. G., Aragonés, J., Cook, H. T., Carmeliet, P., & Maxwell, P. H. (2008). Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 19(1), 39-46. doi:10.1681/ASN.2006090998
- Hirschberg, R., Brunori, G., Kopple, J. D., & Guler, H. P. (1993). Effects of insulin-like growth factor I on renal function in normal men. *Kidney Int*, 43(2), 387-397. doi:10.1038/ki.1993.57
- Horita, S., Nakamura, M., Suzuki, M., Satoh, N., Suzuki, A., Homma, Y., & Nangaku, M. (2017). The role of renal proximal tubule transport in the regulation of blood pressure. *Kidney Res Clin Pract*, 36(1), 12-21. doi:10.23876/j.krcp.2017.36.1.12
- Hosaka, K., Takeda, T., Iino, N., Hosojima, M., Sato, H., Kaseda, R., . . . Saito, A. (2009). Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells. *Kidney Int*, 75(12), 1308-1315. doi:10.1038/ki.2009.85
- Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A., & Brenner, B. M. (1981). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol*, 241(1), F85-93. doi:10.1152/ajprenal.1981.241.1.F85
- Hsu, P. P., Kang, S. A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K. A., Lim, D., . . . Sabatini, D. M. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 332(6035), 1317-1322. doi:10.1126/science.1199498
- Hummel, K. P., Dickie, M. M., & Coleman, D. L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153(3740), 1127-1128. doi:10.1126/science.153.3740.1127

- Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell*, 28(5), 730-738. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.019
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J*, 30(17), 3481-3500. doi:10.1038/emboj.2011.286
- Hutchinson, J. A., Shanware, N. P., Chang, H., & Tibbetts, R. S. (2011). Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation by casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *J Biol Chem*, 286(10), 8688-8696. doi:10.1074/jbc.M110.141754
- Ichimura, K., Stan, R. V., Kurihara, H., & Sakai, T. (2008). Glomerular endothelial cells form diaphragms during development and pathologic conditions. *J Am Soc Nephrol*, 19(8), 1463-1471. doi:10.1681/ASN.2007101138
- Iguchi, M., Kakinuma, Y., Kurabayashi, A., Sato, T., Shuin, T., Hong, S. B., . . . Furihata, M. (2008). Acute inactivation of the VHL gene contributes to protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *Nephron Exp Nephrol*, 110(3), e82-90. doi:10.1159/000166994
- Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., & Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J*, 16(12), 3693-3704. doi:10.1093/emboj/16.12.3693
- Jeon, H., Meng, W., Takagi, J., Eck, M. J., Springer, T. A., & Blacklow, S. C. (2001). Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol*, 8(6), 499-504. doi:10.1038/88556
- Jerums, G., Panagiotopoulos, S., Premaratne, E., & MacIsaac, R. J. (2009). Integrating albuminuria and GFR in the assessment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 5(7), 397-406. doi:10.1038/nrneph.2009.91
- Jiang, M., Liu, K., Luo, J., & Dong, Z. (2010). Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*, 176(3), 1181-1192. doi:10.2353/ajpath.2010.090594
- Jiang, N., Zhao, H., Han, Y., Li, L., Xiong, S., Zeng, L., . . . Sun, L. (2020). HIF-1 α ameliorates tubular injury in diabetic nephropathy via HO-1-mediated control of mitochondrial dynamics. *Cell Prolif*, 53(11), e12909. doi:10.1111/cpr.12909
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19(21), 5720-5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Kahana, C. (2018). The antizyme family for regulating polyamines. *J Biol Chem*, 293(48), 18730-18735. doi:10.1074/jbc.TM118.003339
- Kapitsinou, P. P., Jaffe, J., Michael, M., Swan, C. E., Duffy, K. J., Erickson-Miller, C. L., & Haase, V. H. (2012). Preischemic targeting of HIF prolyl hydroxylation inhibits fibrosis associated with acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302(9), F1172-1179. doi:10.1152/ajprenal.00667.2011

- Katavetin, P., & Katavetin, P. (2008). VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*, 359(2), 205-206; author reply 206-207. doi:10.1056/NEJMc080770
- Kennedy, A. J., Ellacott, K. L., King, V. L., & Hasty, A. H. (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech*, 3(3-4), 156-166. doi:10.1242/dmm.003467
- Kenneth, N. S., Mudie, S., van Uden, P., & Rocha, S. (2009). SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem*, 284(7), 4123-4131. doi:10.1074/jbc.M808491200
- Kim, S. S., Kim, J. H., Lee, S. M., Kim, I. Y., & Song, S. (2018). *New Tubulocentric Insights for Diabetic Nephropathy: From Pathophysiology to Treatment* (R. Thomas Ed.): IntechOpen.
- Kim, Y. H., Kumar, A., Chang, C. H., & Pyaram, K. (2017). Reactive Oxygen Species Regulate the Inflammatory Function of NKT Cells through Promyelocytic Leukemia Zinc Finger. *J Immunol*, 199(10), 3478-3487. doi:10.4049/jimmunol.1700567
- Kimura, K., Iwano, M., Higgins, D. F., Yamaguchi, Y., Nakatani, K., Harada, K., . . . Saito, Y. (2008). Stable expression of HIF-1 α in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(4), F1023-1029. doi:10.1152/ajprenal.90209.2008
- Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kaimori, J. Y., Matsui, I., Namba, T., . . . Isaka, Y. (2011). Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol*, 22(5), 902-913. doi:10.1681/ASN.2010070705
- King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*, 166(3), 877-894. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Kitada, M., Ogura, Y., & Koya, D. (2016). Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 9, 279-290. doi:10.2147/IJNRD.S103784
- Kitada, M., Takeda, A., Nagai, T., Ito, H., Kanasaki, K., & Koya, D. (2011). Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in diabetic Wistar fatty (fa/fa) rats: a model of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2011, 908185. doi:10.1155/2011/908185
- Kliscic, J., Zhang, J., Nief, V., Reyes, L., Moe, O. W., & Ambuhl, P. M. (2003). Albumin regulates the Na⁺/H⁺ exchanger 3 in OKP cells. *J Am Soc Nephrol*, 14(12), 3008-3016. doi:10.1097/01.asn.0000098700.70804.d3
- Kobayashi, N., Suzuki, Y., Tsuge, T., Okumura, K., Ra, C., & Tomino, Y. (2002). FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282(2), F358-365. doi:10.1152/ajprenal.0164.2001
- Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R., Kato, H., Yamashita, T., Sakiyama, A., . . . Nangaku, M. (2007). Protective role of hypoxia-inducible factor-2 α against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 18(4), 1218-1226. doi:10.1681/ASN.2006060639

- Komers, R., Lindsley, J. N., Oyama, T. T., Allison, K. M., & Anderson, S. (2000). Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(3), F573-583. doi:10.1152/ajprenal.2000.279.3.F573
- Komlosi, P., Peti-Peterdi, J., Fuson, A. L., Fintha, A., Rosivall, L., & Bell, P. D. (2004). Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286(6), F1054-1058. doi:10.1152/ajprenal.00336.2003
- Koral, K., & Erkan, E. (2012). PKB/Akt partners with Dab2 in albumin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302(8), F1013-1024. doi:10.1152/ajprenal.00289.2011
- Kortenoeven, M. L., Pedersen, N. B., Rosenbaek, L. L., & Fenton, R. A. (2015). Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*, 309(4), F280-299. doi:10.1152/ajprenal.00093.2015
- Krause, M. P., Riddell, M. C., Gordon, C. S., Imam, S. A., Cafarelli, E., & Hawke, T. J. (2009). Diabetic myopathy differs between Ins2Akita^{+/+} and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *J Appl Physiol* (1985), 106(5), 1650-1659. doi:10.1152/jappphysiol.91565.2008
- Kristiansen, M., Kozyraki, R., Jacobsen, C., Nexø, E., Verroust, P. J., & Moestrup, S. K. (1999). Molecular dissection of the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, discloses regions important for membrane association and ligand binding. *J Biol Chem*, 274(29), 20540-20544. doi:10.1074/jbc.274.29.20540
- Kuger, S., Flentje, M., & Djuzenova, C. S. (2015). Simultaneous perturbation of the MAPK and the PI3K/mTOR pathways does not lead to increased radiosensitization. *Radiat Oncol*, 10, 214. doi:10.1186/s13014-015-0514-5
- Kumar, A., Pyram, K., Yarosz, E. L., Hong, H., Lyssiotis, C. A., Giri, S., & Chang, C. H. (2019). Enhanced oxidative phosphorylation in NKT cells is essential for their survival and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(15), 7439-7448. doi:10.1073/pnas.1901376116
- Kuppe, C., Rohlf, W., Grepl, M., Schulte, K., Veron, D., Elger, M., . . . Moeller, M. J. (2018). Inverse correlation between vascular endothelial growth factor back-filtration and capillary filtration pressures. *Nephrol Dial Transplant*, 33(9), 1514-1525. doi:10.1093/ndt/gfy057
- Kurtz, A., & Wagner, C. (1998). Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol*, 275(6), F849-862. doi:10.1152/ajprenal.1998.275.6.F849
- Lambertos, A., Ramos-Molina, B., Cerezo, D., Lopez-Contreras, A. J., & Penafiel, R. (2018). The mouse Gm853 gene encodes a novel enzyme: Leucine decarboxylase. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1862(3), 365-376. doi:10.1016/j.bbagen.2017.11.007
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 20), 3589-3594. doi:10.1242/jcs.051011

- Larionov, A., Dahlke, E., Kunke, M., Zanon Rodriguez, L., Schiessl, I. M., Magnin, J. L., . . . Theilig, F. (2019). Cathepsin B increases ENaC activity leading to hypertension early in nephrotic syndrome. *J Cell Mol Med*, 23(10), 6543-6553. doi:10.1111/jcmm.14387
- Layton, A. T., Vallon, V., & Edwards, A. (2015). Modeling oxygen consumption in the proximal tubule: effects of NHE and SGLT2 inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 308(12), F1343-1357. doi:10.1152/ajprenal.00007.2015
- Lee, J. W., Chou, C. L., & Knepper, M. A. (2015). Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes. *J Am Soc Nephrol*, 26(11), 2669-2677. doi:10.1681/ASN.2014111067
- Li, H. C., Du, Z., Barone, S., Rubera, I., McDonough, A. A., Tauc, M., . . . Soleimani, M. (2013). Proximal tubule specific knockout of the Na(+)/H(+) exchanger NHE3: effects on bicarbonate absorption and ammonium excretion. *J Mol Med (Berl)*, 91(8), 951-963. doi:10.1007/s00109-013-1015-3
- Li, X. C., Zhu, D., Chen, X., Zheng, X., Zhao, C., Zhang, J., . . . Zhuo, J. L. (2019). Proximal Tubule-Specific Deletion of the NHE3 (Na(+)/H(+) Exchanger 3) in the Kidney Attenuates Ang II (Angiotensin II)-Induced Hypertension in Mice. *Hypertension*, 74(3), 526-535. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13094
- Li, Y., Cong, R., & Biemesderfer, D. (2008). The COOH terminus of megalin regulates gene expression in opossum kidney proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(2), C529-537. doi:10.1152/ajpcell.00037.2008
- Liberles, S. D., & Buck, L. B. (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, 442(7103), 645-650. doi:10.1038/nature05066
- Lighthouse, J. K., Zhang, L., Hsieh, J. C., Rosenquist, T., & Holdener, B. C. (2011). MESD is essential for apical localization of megalin/LRP2 in the visceral endoderm. *Dev Dyn*, 240(3), 577-588. doi:10.1002/dvdy.22477
- Limbutara, K., Chou, C. L., & Knepper, M. A. (2020). Quantitative Proteomics of All 14 Renal Tubule Segments in Rat. *J Am Soc Nephrol*, 31(6), 1255-1266. doi:10.1681/ASN.2020010071
- Lindemann, L., Ebeling, M., Kratochwil, N. A., Buzow, J. R., Grandy, D. K., & Hoener, M. C. (2005). Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*, 85(3), 372-385. doi:10.1016/j.ygeno.2004.11.010
- Lipinski, M. M., Hoffman, G., Ng, A., Zhou, W., Py, B. F., Hsu, E., . . . Yuan, J. (2010). A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Dev Cell*, 18(6), 1041-1052. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.005
- Liska, F., Landa, V., Zidek, V., Mlejnek, P., Silhavy, J., Simakova, M., . . . Pravenec, M. (2017). Downregulation of Plzf Gene Ameliorates Metabolic and Cardiac Traits in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension*, 69(6), 1084-1091. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08798

- Liska, F., Snajdr, P., Sedova, L., Seda, O., Chylikova, B., Slamova, P., . . . Kren, V. (2009). Deletion of a conserved noncoding sequence in Plzf intron leads to Plzf down-regulation in limb bud and polydactyly in the rat. *Dev Dyn*, 238(3), 673-684. doi:10.1002/dvdy.21859
- Liu, R., Pittner, J., & Persson, A. E. (2002). Changes of cell volume and nitric oxide concentration in macula densa cells caused by changes in luminal NaCl concentration. *J Am Soc Nephrol*, 13(11), 2688-2696. doi:10.1097/01.asn.0000033275.17169.67
- Liu, S., Chen, S., Li, M., Zhang, B., Shen, P., Liu, P., . . . Jiang, J. (2016). Autophagy activation attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Arch Biochem Biophys*, 590, 37-47. doi:10.1016/j.abb.2015.11.001
- Liu, T. M., Lee, E. H., Lim, B., & Shyh-Chang, N. (2016). Concise Review: Balancing Stem Cell Self-Renewal and Differentiation with PLZF. *Stem Cells*, 34(2), 277-287. doi:10.1002/stem.2270
- Luger, A. L., Sauer, B., Lorenz, N. I., Engel, A. L., Braun, Y., Voss, M., . . . Ronellenfitsch, M. W. (2018). Doxycycline Impairs Mitochondrial Function and Protects Human Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death: Implications of Using Tet-Inducible Systems. *Int J Mol Sci*, 19(5). doi:10.3390/ijms19051504
- Lytvyn, Y., Bjornstad, P., van Raalte, D. H., Heerspink, H. L., & Cherney, D. Z. I. (2020). The New Biology of Diabetic Kidney Disease-Mechanisms and Therapeutic Implications. *Endocr Rev*, 41(2). doi:10.1210/endrev/bnz010
- Maeda, T. (2016). Regulation of hematopoietic development by ZBTB transcription factors. *Int J Hematol*, 104(3), 310-323. doi:10.1007/s12185-016-2035-x
- Mao, L., Liu, L., Zhang, T., Qin, H., Wu, X., & Xu, Y. (2020). Histone Deacetylase 11 Contributes to Renal Fibrosis by Repressing KLF15 Transcription. *Front Cell Dev Biol*, 8, 235. doi:10.3389/fcell.2020.00235
- Marino, M., Lisi, S., Pinchera, A., Chiovato, L., & McCluskey, R. T. (2003). Targeting of thyroglobulin to transcytosis following megalin-mediated endocytosis: evidence for a preferential pH-independent pathway. *J Endocrinol Invest*, 26(3), 222-229. doi:10.1007/BF03345161
- Marzolo, M. P., & Bu, G. (2009). Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2), 191-200. doi:10.1016/j.semcdb.2008.10.005
- Marzolo, M. P., & Farfan, P. (2011). New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression. *Biol Res*, 44(1), 89-105. doi:10.4067/S0716-97602011000100012
- Marzolo, M. P., Yuseff, M. I., Retamal, C., Donoso, M., Ezquer, F., Farfan, P., . . . Bu, G. (2003). Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic*, 4(4), 273-288. doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00081.x

- Mather, A., & Pollock, C. (2011). Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl*(120), S1-6. doi:10.1038/ki.2010.509
- Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori, N. (2019). Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*, 1855, 101-105. doi:10.1007/978-1-4939-8793-1_10
- Mattila, P. E., Raghavan, V., Rbaibi, Y., Baty, C. J., & Weisz, O. A. (2014). Rab11a-positive compartments in proximal tubule cells sort fluid-phase and membrane cargo. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(5), C441-449. doi:10.1152/ajpcell.00236.2013
- Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 121-132. doi:10.1038/nrm1315
- McConnell, M. J., Chevallier, N., Berkofsky-Fessler, W., Giltnane, J. M., Malani, R. B., Staudt, L. M., & Licht, J. D. (2003). Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol*, 23(24), 9375-9388. doi:10.1128/MCB.23.24.9375-9388.2003
- Mellman, I., Fuchs, R., & Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem*, 55, 663-700. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.003311
- Meyer, C., Woerle, H. J., Dostou, J. M., Welle, S. L., & Gerich, J. E. (2004). Abnormal renal, hepatic, and muscle glucose metabolism following glucose ingestion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(6), E1049-1056. doi:10.1152/ajpendo.00041.2004
- Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M., & Egido, J. (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*, 38(3 Pt 2), 635-638. doi:10.1161/hy09t1.094234
- Mimura, I., Nangaku, M., Kanki, Y., Tsutsumi, S., Inoue, T., Kohro, T., . . . Wada, Y. (2012). Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol Cell Biol*, 32(15), 3018-3032. doi:10.1128/MCB.06643-11
- Mishra, S. K., Keyel, P. A., Hawryluk, M. J., Agostinelli, N. R., Watkins, S. C., & Traub, L. M. (2002). Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *EMBO J*, 21(18), 4915-4926. doi:10.1093/emboj/cdf487
- Mishra, S. K., Watkins, S. C., & Traub, L. M. (2002). The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25), 16099-16104. doi:10.1073/pnas.252630799
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728-741. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545. doi:10.4161/auto.4600
- Mogensen, C. E., Christensen, C. K., & Vittinghus, E. (1983). The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32 Suppl 2, 64-78. doi:10.2337/diab.32.2.s64

- Morales, C. R., Zeng, J., El Alfy, M., Barth, J. L., Chintalapudi, M. R., McCarthy, R. A., . . . Argraves, W. S. (2006). Epithelial trafficking of Sonic hedgehog by megalin. *J Histochem Cytochem*, 54(10), 1115-1127. doi:10.1369/jhc.5A6899.2006
- Morcos, M., Sayed, A. A., Bierhaus, A., Yard, B., Waldherr, R., Merz, W., . . . Nawroth, P. P. (2002). Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 51(12), 3532-3544. doi:10.2337/diabetes.51.12.3532
- Mori, K. P., Yokoi, H., Kasahara, M., Imamaki, H., Ishii, A., Kuwabara, T., . . . Mori, K. (2017). Increase of Total Nephron Albumin Filtration and Reabsorption in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 28(1), 278-289. doi:10.1681/ASN.2015101168
- Morris, S. M., Tallquist, M. D., Rock, C. O., & Cooper, J. A. (2002). Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport. *EMBO J*, 21(7), 1555-1564. doi:10.1093/emboj/21.7.1555
- Moullan, N., Mouchiroud, L., Wang, X., Ryu, D., Williams, E. G., Mottis, A., . . . Auwerx, J. (2015). Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep*, 10(10), 1681-1691. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.034
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N., & Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev*, 77(3), 759-803. doi:10.1152/physrev.1997.77.3.759
- Murrow, L., & Debnath, J. (2013). Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol*, 8, 105-137. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-163918
- Muskiet, M. H., Smits, M. M., Morsink, L. M., & Diamant, M. (2014). The gut-renal axis: do incretin-based agents confer renoprotection in diabetes? *Nat Rev Nephrol*, 10(2), 88-103. doi:10.1038/nrneph.2013.272
- Nagai, J., Christensen, E. I., Morris, S. M., Willnow, T. E., Cooper, J. A., & Nielsen, R. (2005). Mutually dependent localization of megalin and Dab2 in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(3), F569-576. doi:10.1152/ajprenal.00292.2004
- Nagai, M., Meerloo, T., Takeda, T., & Farquhar, M. G. (2003). The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes. *Mol Biol Cell*, 14(12), 4984-4996. doi:10.1091/mbc.e03-06-0385
- Najafian, B., & Mauer, M. (2012). Morphologic features of declining renal function in type 1 diabetes. *Semin Nephrol*, 32(5), 415-422. doi:10.1016/j.semnephrol.2012.07.003
- Nangaku, M. (2006). Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 17(1), 17-25. doi:10.1681/ASN.2005070757
- Nangaku, M., & Eckardt, K. U. (2007). Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med (Berl)*, 85(12), 1325-1330. doi:10.1007/s00109-007-0278-y

- Nangaku, M., Rosenberger, C., Heyman, S. N., & Eckardt, K. U. (2013). Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 40(2), 148-157. doi:10.1111/1440-1681.12005
- Navarro-Gonzalez, J. F., Mora-Fernandez, C., Muros de Fuentes, M., & Garcia-Perez, J. (2011). Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 7(6), 327-340. doi:10.1038/nrneph.2011.51
- Nayak, B. K., Shanmugasundaram, K., Friedrichs, W. E., Cavaglieri, R. C., Patel, M., Barnes, J., & Block, K. (2016). HIF-1 Mediates Renal Fibrosis in OVE26 Type 1 Diabetic Mice. *Diabetes*, 65(5), 1387-1397. doi:10.2337/db15-0519
- Neubauer, B., Schrankl, J., Steppan, D., Neubauer, K., Sequeira-Lopez, M. L., Pan, L., . . . Wagner, C. (2018). Angiotensin II Short-Loop Feedback: Is There a Role of Ang II for the Regulation of the Renin System In Vivo? *Hypertension*, 71(6), 1075-1082. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10357
- Nielsen, R., Christensen, E. I., & Birn, H. (2016). Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int*, 89(1), 58-67. doi:10.1016/j.kint.2015.11.007
- Nielsen, R., Courtoy, P. J., Jacobsen, C., Dom, G., Lima, W. R., Jadot, M., . . . Christensen, E. I. (2007). Endocytosis provides a major alternative pathway for lysosomal biogenesis in kidney proximal tubular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13), 5407-5412. doi:10.1073/pnas.0700330104
- Nihalani, D., & Susztak, K. (2013). Sirt1-Claudin-1 crosstalk regulates renal function. *Nat Med*, 19(11), 1371-1372. doi:10.1038/nm.3386
- Nordquist, L., Friederich-Persson, M., Fasching, A., Liss, P., Shoji, K., Nangaku, M., . . . Palm, F. (2015). Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 26(2), 328-338. doi:10.1681/ASN.2013090990
- Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., . . . Willnow, T. E. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell*, 96(4), 507-515. doi:10.1016/s0092-8674(00)80655-8
- Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2002). The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol*, 12(6), 273-280. doi:10.1016/s0962-8924(02)02282-1
- Oleinikov, A. V., Zhao, J., & Makker, S. P. (2000). Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochem J*, 347 Pt 3, 613-621.
- Osterby, R., & Gundersen, H. J. (1975). Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities. *Diabetologia*, 11(3), 225-229. doi:10.1007/BF00422326
- Pacher, P., Obrosova, I. G., Mabley, J. G., & Szabo, C. (2005). Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutic strategies. *Curr Med Chem*, 12(3), 267-275. doi:10.2174/0929867053363207

- Packham, D. K., Alves, T. P., Dwyer, J. P., Atkins, R., de Zeeuw, D., Cooper, M., . . . Lambers Heerspink, H. J. (2012). Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database. *Am J Kidney Dis*, 59(1), 75-83. doi:10.1053/j.ajkd.2011.09.017
- Palm, F., Hansell, P., Ronquist, G., Waldenstrom, A., Liss, P., & Carlsson, P. O. (2004). Polyol-pathway-dependent disturbances in renal medullary metabolism in experimental insulin-deficient diabetes mellitus in rats. *Diabetologia*, 47(7), 1223-1231. doi:10.1007/s00125-004-1434-3
- Palmer, L. G., & Schnermann, J. (2015). Integrated control of Na transport along the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10(4), 676-687. doi:10.2215/CJN.12391213
- Park, C. H. (1988). Time course and vectorial nature of albumin metabolism in isolated perfused rabbit PCT. *Am J Physiol*, 255(3 Pt 2), F520-528. doi:10.1152/ajprenal.1988.255.3.F520
- Paul, M., Poyan Mehr, A., & Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 86(3), 747-803. doi:10.1152/physrev.00036.2005
- Peacock, T. P., Shihabi, Z. K., Bleyer, A. J., Dolbare, E. L., Byers, J. R., Knovich, M. A., . . . Freedman, B. I. (2008). Comparison of glycated albumin and hemoglobin A(1c) levels in diabetic subjects on hemodialysis. *Kidney Int*, 73(9), 1062-1068. doi:10.1038/ki.2008.25
- Perez Bay, A. E., Schreiner, R., Benedicto, I., Paz Marzolo, M., Banfelder, J., Weinstein, A. M., & Rodriguez-Boulan, E. J. (2016). The fast-recycling receptor Megalin defines the apical recycling pathway of epithelial cells. *Nat Commun*, 7, 11550. doi:10.1038/ncomms11550
- Pergola, P. E., Raskin, P., Toto, R. D., Meyer, C. J., Huff, J. W., Grossman, E. B., . . . Investigators, B. S. (2011). Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 365(4), 327-336. doi:10.1056/NEJMoa1105351
- Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Wei, Q., Smith, R., Yin, X. M., & Dong, Z. (2008). Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int*, 74(5), 631-640. doi:10.1038/ki.2008.214
- Persson, A. E., Lai, E. Y., Gao, X., Carlstrom, M., & Patzak, A. (2013). Interactions between adenosine, angiotensin II and nitric oxide on the afferent arteriole influence sensitivity of the tubuloglomerular feedback. *Front Physiol*, 4, 187. doi:10.3389/fphys.2013.00187
- Persson, P., Hansell, P., & Palm, F. (2015). Reduced adenosine A2a receptor-mediated efferent arteriolar vasodilation contributes to diabetes-induced glomerular hyperfiltration. *Kidney Int*, 87(1), 109-115. doi:10.1038/ki.2014.219
- Peti-Peterdi, J., & Harris, R. C. (2010). Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol*, 21(7), 1093-1096. doi:10.1681/ASN.2009070759

- Peti-Peterdi, J., Komlosi, P., Fuson, A. L., Guan, Y., Schneider, A., Qi, Z., . . . Bell, P. D. (2003). Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *J Clin Invest*, 112(1), 76-82. doi:10.1172/JCI18018
- Pham, D. H., Moretti, P. A., Goodall, G. J., & Pitson, S. M. (2008). Attenuation of leakiness in doxycycline-inducible expression via incorporation of 3' AU-rich mRNA destabilizing elements. *Biotechniques*, 45(2), 155-156, 158, 160 passim. doi:10.2144/000112896
- Plaisier, C. L., Bennett, B. J., He, A., Guan, B., Lusic, A. J., Reue, K., & Vergnes, L. (2012). Zbtb16 has a role in brown adipocyte bioenergetics. *Nutr Diabetes*, 2, e46. doi:10.1038/nutd.2012.21
- Polesel, M., & Hall, A. M. (2019). Axial differences in endocytosis along the kidney proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 317(6), F1526-F1530. doi:10.1152/ajprenal.00459.2019
- Pollard, P. J., Loenarz, C., Mole, D. R., McDonough, M. A., Gleadle, J. M., Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2008). Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Biochem J*, 416(3), 387-394. doi:10.1042/BJ20081238
- Pruijm, M., Wuerzner, G., Maillard, M., Bovet, P., Renaud, C., Bochud, M., & Burnier, M. (2010). Glomerular hyperfiltration and increased proximal sodium reabsorption in subjects with type 2 diabetes or impaired fasting glucose in a population of the African region. *Nephrol Dial Transplant*, 25(7), 2225-2231. doi:10.1093/ndt/gfq008
- Pugsley, H. R. (2017). Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry. *J Vis Exp*(125). doi:10.3791/55637
- Pushpakumar, S. B., Kundu, S., Metreveli, N., Tyagi, S. C., & Sen, U. (2013). Matrix Metalloproteinase Inhibition Mitigates Renovascular Remodeling in Salt-Sensitive Hypertension. *Physiol Rep*, 1(3), e00063. doi:10.1002/phy2.63
- Pyzik, M., Sand, K. M. K., Hubbard, J. J., Andersen, J. T., Sandlie, I., & Blumberg, R. S. (2019). The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front Immunol*, 10, 1540. doi:10.3389/fimmu.2019.01540
- Rahmoune, H., Thompson, P. W., Ward, J. M., Smith, C. D., Hong, G., & Brown, J. (2005). Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, 54(12), 3427-3434. doi:10.2337/diabetes.54.12.3427
- Ratcliffe, P. J. (2013). Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol*, 591(8), 2027-2042. doi:10.1113/jphysiol.2013.251470
- Reid, A., Gould, A., Brand, N., Cook, M., Strutt, P., Li, J., . . . Zelent, A. (1995). Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood*, 86(12), 4544-4552.

- Rieg, T., Masuda, T., Gerasimova, M., Mayoux, E., Platt, K., Powell, D. R., . . . Vallon, V. (2014). Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306(2), F188-193. doi:10.1152/ajprenal.00518.2013
- Ries, M., Basseau, F., Tyndal, B., Jones, R., Deminiere, C., Catargi, B., . . . Grenier, N. (2003). Renal diffusion and BOLD MRI in experimental diabetic nephropathy. Blood oxygen level-dependent. *J Magn Reson Imaging*, 17(1), 104-113. doi:10.1002/jmri.10224
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 715-725. doi:10.1038/nri2155
- Rosenberger, C., Khamaisi, M., Abassi, Z., Shilo, V., Weksler-Zangen, S., Goldfarb, M., . . . Heyman, S. N. (2008). Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int*, 73(1), 34-42. doi:10.1038/sj.ki.5002567
- Rosenberger, C., Mandriota, S., Jurgensen, J. S., Wiesener, M. S., Horstrup, J. H., Frei, U., . . . Eckardt, K. U. (2002). Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 13(7), 1721-1732. doi:10.1097/01.asn.0000017223.49823.2a
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), 320-344. doi:10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Ruperez, M., & Egido, J. (2001). Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10(3), 321-329. doi:10.1097/00041552-200105000-00005
- Russo, L. M., Sandoval, R. M., Campos, S. B., Molitoris, B. A., Comper, W. D., & Brown, D. (2009). Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 20(3), 489-494. doi:10.1681/ASN.2008050503
- Rust, H. L., & Thompson, P. R. (2011). Kinase consensus sequences: a breeding ground for crosstalk. *ACS Chem Biol*, 6(9), 881-892. doi:10.1021/cb200171d
- Ruthardt, M., Orleth, A., Tomassoni, L., Puccetti, E., Riganelli, D., Alcalay, M., . . . Pelicci, P. G. (1998). The acute promyelocytic leukaemia specific PML and PLZF proteins localize to adjacent and functionally distinct nuclear bodies. *Oncogene*, 16(15), 1945-1953. doi:10.1038/sj.onc.1201722
- Sabbatini, M., Sansone, G., Uccello, F., Giliberti, A., Conte, G., & Andreucci, V. E. (1992). Early glycosylation products induce glomerular hyperfiltration in normal rats. *Kidney Int*, 42(4), 875-881. doi:10.1038/ki.1992.363
- SahutoGlu, A. S. (2020). Comparative modelling of a novel enzyme: Mus musculus leucine decarboxylase. *Turk J Chem*, 44(3), 817-832. doi:10.3906/kim-2003-63
- Saito, A., Takeda, T., Sato, K., Hama, H., Tanuma, A., Kaseda, R., . . . Gejyo, F. (2005). Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1043, 637-643. doi:10.1196/annals.1333.072

- Sakai, S., Yamamoto, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Namba-Hamano, T., Minami, S., . . . Isaka, Y. (2019). Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 30(6), 929-945. doi:10.1681/ASN.2018100983
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., . . . Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 22(2), 159-168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029
- Satchell, S. C., & Braet, F. (2009). Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296(5), F947-956. doi:10.1152/ajprenal.90601.2008
- Saudenova, M., Promnitz, J., Ohrensall, G., Himmerkus, N., Bottner, M., Kunke, M., . . . Theilig, F. (2022). Behind every smile there's teeth: Cathepsin B's function in health and disease with a kidney view. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1869(4), 119190. doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119190
- Scacco, S., Vergari, R., Scarpulla, R. C., Technikova-Dobrova, Z., Sardaneli, A., Lambo, R., . . . Papa, S. (2000). cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18-kDa (IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures. *J Biol Chem*, 275(23), 17578-17582. doi:10.1074/jbc.M001174200
- Scheen, A. J. (2020). Sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 16(10), 556-577. doi:10.1038/s41574-020-0392-2
- Scheuner, D., & Kaufman, R. J. (2008). The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev*, 29(3), 317-333. doi:10.1210/er.2007-0039
- Schley, G., Klanke, B., Schodel, J., Forstreuter, F., Shukla, D., Kurtz, A., . . . Willam, C. (2011). Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 22(11), 2004-2015. doi:10.1681/ASN.2010121249
- Schmitt, R., Klusmann, E., Kahl, T., Ellison, D. H., & Bachmann, S. (2003). Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(5), F1097-1104. doi:10.1152/ajprenal.00368.2002
- Schnermann, J. (2014). The maturing relationship between tubules and glomeruli in diabetes mellitus. *Acta Physiol (Oxf)*, 210(2), 233-235. doi:10.1111/apha.12161
- Schnermann, J., & Levine, D. Z. (2003). Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol*, 65, 501-529. doi:10.1146/annurev.physiol.65.050102.085738
- Schodel, J., & Ratcliffe, P. J. (2019). Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat Rev Nephrol*, 15(10), 641-659. doi:10.1038/s41581-019-0182-z

- Schrijvers, B. F., Flyvbjerg, A., & De Vriese, A. S. (2004). The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int*, 65(6), 2003-2017. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00621.x
- Schuh, C. D., Polesel, M., Platonova, E., Haenni, D., Gassama, A., Tokonami, N., ... Hall, A. M. (2018). Combined Structural and Functional Imaging of the Kidney Reveals Major Axial Differences in Proximal Tubule Endocytosis. *J Am Soc Nephrol*, 29(11), 2696-2712. doi:10.1681/ASN.2018050522
- Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., ... Shull, G. E. (1998). Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*, 19(3), 282-285. doi:10.1038/969
- Seda, O., Sedova, L., Vcelak, J., Vankova, M., Liska, F., & Bendlova, B. (2017). ZBTB16 and metabolic syndrome: a network perspective. *Physiol Res*, 66(Suppl 3), S357-S365. doi:10.33549/physiolres.933730
- Seetharam, B., Christensen, E. I., Moestrup, S. K., Hammond, T. G., & Verroust, P. J. (1997). Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J Clin Invest*, 99(10), 2317-2322. doi:10.1172/JCI119411
- Seetharam, B., Levine, J. S., Ramasamy, M., & Alpers, D. H. (1988). Purification, properties, and immunochemical localization of a receptor for intrinsic factor-cobalamin complex in the rat kidney. *J Biol Chem*, 263(9), 4443-4449.
- Sengupta, S., Peterson, T. R., & Sabatini, D. M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*, 40(2), 310-322. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.026
- Shah, M., Baterina, O. Y., Jr., Taupin, V., & Farquhar, M. G. (2013). ARH directs megalin to the endocytic recycling compartment to regulate its proteolysis and gene expression. *J Cell Biol*, 202(1), 113-127. doi:10.1083/jcb.201211110
- Shaknovich, R., Yeyati, P. L., Ivins, S., Melnick, A., Lempert, C., Waxman, S., ... Licht, J. D. (1998). The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol*, 18(9), 5533-5545. doi:10.1128/MCB.18.9.5533
- Shen, H. M., & Codogno, P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*, 7(5), 457-465. doi:10.4161/auto.7.5.14226
- Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2(12), 1097-1105. doi:10.1177/1947601911423031
- Shokeir, A. A., Hussein, A. M., Awadalla, A., Samy, A., Abdelaziz, A., Khater, S., & Barakat, N. (2012). Protection against renal ischaemia/reperfusion injury: A comparative experimental study of the effect of ischaemic preconditioning vs. postconditioning. *Arab J Urol*, 10(4), 418-424. doi:10.1016/j.aju.2012.08.003

- Shu, S., Wang, Y., Zheng, M., Liu, Z., Cai, J., Tang, C., & Dong, Z. (2019). Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells*, 8(3). doi:10.3390/cells8030207
- Silander, K. M., Pihlajamaa, P., Sahu, B., Janne, O. A., & Andersson, L. C. (2017). Characterization of an androgen-responsive, ornithine decarboxylase-related protein in mouse kidney. *Biosci Rep*, 37(4). doi:10.1042/BSR20170163
- Silva-Aguiar, R. P., Peruchetti, D. B., Florentino, L. S., Takiya, C. M., Marzolo, M. P., Dias, W. B., ... Caruso-Neves, C. (2022). Albumin Expands Albumin Reabsorption Capacity in Proximal Tubule Epithelial Cells through a Positive Feedback Loop between AKT and Megalin. *Int J Mol Sci*, 23(2). doi:10.3390/ijms23020848
- Singh, I., Grams, M., Wang, W. H., Yang, T., Killen, P., Smart, A., . . . Briggs, J. P. (1996). Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am J Physiol*, 270(6 Pt 2), F1027-1037. doi:10.1152/ajprenal.1996.270.6.F1027
- Skolnikova, E., Sedova, L., Chylikova, B., Kabelova, A., Liska, F., & Seda, O. (2020). Maternal High-Sucrose Diet Affects Phenotype Outcome in Adult Male Offspring: Role of Zbtb16. *Front Genet*, 11, 529421. doi:10.3389/fgene.2020.529421
- Slyne, J., Slattery, C., McMorrow, T., & Ryan, M. P. (2015). New developments concerning the proximal tubule in diabetic nephropathy: in vitro models and mechanisms. *Nephrol Dial Transplant*, 30 Suppl 4, iv60-67. doi:10.1093/ndt/gfv264
- Soler, M. J., Riera, M., & Batlle, D. (2012). New experimental models of diabetic nephropathy in mice models of type 2 diabetes: efforts to replicate human nephropathy. *Exp Diabetes Res*, 2012, 616313. doi:10.1155/2012/616313
- Song, P., Huang, W., Onishi, A., Patel, R., Kim, Y. C., van Ginkel, C., . . . Vallon, V. (2019). Knockout of Na(+)-glucose cotransporter SGLT1 mitigates diabetes-induced upregulation of nitric oxide synthase NOS1 in the macula densa and glomerular hyperfiltration. *Am J Physiol Renal Physiol*, 317(1), F207-F217. doi:10.1152/ajprenal.00120.2019
- Steenhard, B. M., Isom, K., Stroganova, L., St John, P. L., Zelenchuk, A., Freeburg, P. B., . . . Abrahamson, D. R. (2010). Deletion of von Hippel-Lindau in glomerular podocytes results in glomerular basement membrane thickening, ectopic subepithelial deposition of collagen $\alpha 1(\text{I})$, expression of neuroglobin, and proteinuria. *Am J Pathol*, 177(1), 84-96. doi:10.2353/ajpath.2010.090767
- Steinberg, G. R., & Kemp, B. E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*, 89(3), 1025-1078. doi:10.1152/physrev.00011.2008
- Storm, T., Tranebjaerg, L., Frykholm, C., Birn, H., Verroust, P. J., Neveus, T., . . . Nielsen, R. (2013). Renal phenotypic investigations of megalin-deficient patients: novel insights into tubular proteinuria and albumin filtration. *Nephrol Dial Transplant*, 28(3), 585-591. doi:10.1093/ndt/gfs462

- Suarez, L., Moreno-Luque, M., Martinez-Ardines, I., Gonzalez, N., Campo, P., Huerta-Cima, P., & Sanchez, M. (2019). Amine variations in faecal content in the first weeks of life of newborns in relation to breast-feeding or infant formulas. *Br J Nutr*, 122(10), 1130-1141. doi:10.1017/S0007114519001879
- Subramanya, A. R., & Ellison, D. H. (2014). Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(12), 2147-2163. doi:10.2215/CJN.05920613
- Suliman, B. A., Xu, D., & Williams, B. R. (2012). The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology. *Front Oncol*, 2, 74. doi:10.3389/fonc.2012.00074
- Sun, Y., Chen, X., & Xiao, D. (2007). Tetracycline-inducible expression systems: new strategies and practices in the transgenic mouse modeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39(4), 235-246. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00258.x
- Takahashi, A., Kimura, T., Takabatake, Y., Namba, T., Kaimori, J., Kitamura, H., . . . Rakugi, H. (2012). Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol*, 180(2), 517-525. doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.001
- Takeda, T., Yamazaki, H., & Farquhar, M. G. (2003). Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(5), C1105-1113. doi:10.1152/ajpcell.00514.2002
- Tang, S. C., Leung, J. C., Chan, L. Y., Tsang, A. W., & Lai, K. N. (2006). Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy and the role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist. *J Am Soc Nephrol*, 17(6), 1633-1643. doi:10.1681/ASN.2005101113
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88. doi:10.1007/978-1-59745-157-4_4
- Tenten, V., Menzel, S., Kunter, U., Sicking, E. M., van Roeyen, C. R., Sanden, S. K., . . . Moeller, M. J. (2013). Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. *J Am Soc Nephrol*, 24(12), 1966-1980. doi:10.1681/ASN.2013010018
- Tervaert, T. W., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., Cook, H. T., Drachenberg, C. B., . . . Renal Pathology, S. (2010). Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 21(4), 556-563. doi:10.1681/ASN.2010010010
- Tesch, G. H., & Nikolic-Paterson, D. J. (2006). Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*, 104(2), e57-62. doi:10.1159/000093998
- Theilig, F., Enke, A. K., Scolari, B., Polzin, D., Bachmann, S., & Koesters, R. (2011). Tubular deficiency of von Hippel-Lindau attenuates renal disease progression in anti-GBM glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 179(5), 2177-2188. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.012
- Theilig, F., Kriz, W., Jerichow, T., Schrade, P., Hahnel, B., Willnow, T., . . . Bachmann, S. (2007). Abrogation of protein uptake through megalin-deficient proximal tubules does not safeguard against tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol*, 18(6), 1824-1834. doi:10.1681/ASN.2006111266

- Thomson, S. C., Deng, A., Bao, D., Satriano, J., Blantz, R. C., & Vallon, V. (2001). Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest*, 107(2), 217-224. doi:10.1172/JCI10963
- Thomson, S. C., Deng, A., Komine, N., Hammes, J. S., Blantz, R. C., & Gabbai, F. B. (2004). Early diabetes as a model for testing the regulation of juxtaglomerular NOS I. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(4), F732-738. doi:10.1152/ajprenal.00340.2003
- Thomson, S. C., & Vallon, V. (2021). Effects of SGLT2 inhibitor and dietary NaCl on glomerular hemodynamics assessed by micropuncture in diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 320(5), F761-F771. doi:10.1152/ajprenal.00552.2020
- Thomson, S. C., Vallon, V., & Blantz, R. C. (2004). Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286(1), F8-15. doi:10.1152/ajprenal.00208.2003
- Tian, Y. M., Guan, Y., Li, N., Ma, H. J., Zhang, L., Wang, S., & Zhang, Y. (2016). Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates diabetic nephropathy through enhancing HIF1 signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract*, 118, 90-97. doi:10.1016/j.diabetes.2016.06.021
- Tiwari, P., Kaila, P., & Guptasarma, P. (2019). Understanding anomalous mobility of proteins on SDS-PAGE with special reference to the highly acidic extracellular domains of human E- and N-cadherins. *Electrophoresis*, 40(9), 1273-1281. doi:10.1002/elps.201800219
- Tojo, A., Onozato, M. L., Ha, H., Kurihara, H., Sakai, T., Goto, A., . . . Endou, H. (2001). Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochem Cell Biol*, 116(3), 269-276. doi:10.1007/s004180100317
- Tolins, J. P., Shultz, P. J., Raij, L., Brown, D. M., & Mauer, S. M. (1993). Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of NO. *Am J Physiol*, 265(6 Pt 2), F886-895. doi:10.1152/ajprenal.1993.265.6.F886
- Tonneijck, L., Muskiet, M. H., Smits, M. M., van Bommel, E. J., Heerspink, H. J., van Raalte, D. H., & Joles, J. A. (2017). Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol*, 28(4), 1023-1039. doi:10.1681/ASN.2016060666
- Urano, J., Sato, T., Matsuo, T., Otsubo, Y., Yamamoto, M., & Tamanoi, F. (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3514-3519. doi:10.1073/pnas.0608510104
- Vallon, V. (2003). Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci*, 18, 169-174. doi:10.1152/nips.01442.2003
- Vallon, V. (2011). The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300(5), R1009-1022. doi:10.1152/ajpregu.00809.2010

- Vallon, V. (2015). The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu Rev Med*, 66, 255-270. doi:10.1146/annurev-med-051013-110046
- Vallon, V. (2020). Glucose transporters in the kidney in health and disease. *Pflugers Arch*, 472(9), 1345-1370. doi:10.1007/s00424-020-02361-w
- Vallon, V., Blantz, R. C., & Thomson, S. (2003). Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early [corrected] type 1 diabetes mellitus: a tubulo-centric view. *J Am Soc Nephrol*, 14(2), 530-537. doi:10.1097/01.asn.0000051700.07403.27
- Vallon, V., Gerasimova, M., Rose, M. A., Masuda, T., Satriano, J., Mayoux, E., ... Rieg, T. (2014). SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306(2), F194-204. doi:10.1152/ajprenal.00520.2013
- Vallon, V., & Komers, R. (2011). Pathophysiology of the diabetic kidney. *Compr Physiol*, 1(3), 1175-1232. doi:10.1002/cphy.c100049
- Vallon, V., Richter, K., Blantz, R. C., Thomson, S., & Osswald, H. (1999). Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol*, 10(12), 2569-2576. doi:10.1681/ASN.V10122569
- Vallon, V., Rose, M., Gerasimova, M., Satriano, J., Platt, K. A., Koepsell, H., ... Rieg, T. (2013). Knockout of Na-glucose transporter SGLT2 attenuates hyperglycemia and glomerular hyperfiltration but not kidney growth or injury in diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304(2), F156-167. doi:10.1152/ajprenal.00409.2012
- Vallon, V., & Thomson, S. C. (2020). The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 16(6), 317-336. doi:10.1038/s41581-020-0256-y
- Veron, D., Villegas, G., Aggarwal, P. K., Bertuccio, C., Jimenez, J., Velazquez, H., ... Tufro, A. (2012). Acute podocyte vascular endothelial growth factor (VEGF-A) knockdown disrupts alphaVbeta3 integrin signaling in the glomerulus. *PLoS One*, 7(7), e40589. doi:10.1371/journal.pone.0040589
- Vervoort, G., Veldman, B., Berden, J. H., Smits, P., & Wetzels, J. F. (2005). Glomerular hyperfiltration in type 1 diabetes mellitus results from primary changes in proximal tubular sodium handling without changes in volume expansion. *Eur J Clin Invest*, 35(5), 330-336. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01497.x
- Vicinanza, M., Di Campli, A., Polishchuk, E., Santoro, M., Di Tullio, G., Godi, A., ... De Matteis, M. A. (2011). OCRL controls trafficking through early endosomes via PtdIns4,5P(2)-dependent regulation of endosomal actin. *EMBO J*, 30(24), 4970-4985. doi:10.1038/emboj.2011.354
- von Rappard, J., Wechselberger, J., Hopfer, H., & Werner, J. A. (2020). Diabetische Nephropathie. *Swiss Medical Forum*, 2020/35-38 483-487. doi:doi.org/10.4414/smf.2020.08565
- Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., Kubo, S. K., Kayo, T., Lu, D., ... Izumi, T. (1999). A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest*, 103(1), 27-37. doi:10.1172/JCI4431

- Wang, X. X., Levi, J., Luo, Y., Myakala, K., Herman-Edelstein, M., Qiu, L., . . . Levi, M. (2017). SGLT2 Protein Expression Is Increased in Human Diabetic Nephropathy: SGLT2 PROTEIN INHIBITION DECREASES RENAL LIPID ACCUMULATION, INFLAMMATION, AND THE DEVELOPMENT OF NEPHROPATHY IN DIABETIC MICE. *J Biol Chem*, 292(13), 5335-5348. doi:10.1074/jbc.M117.779520
- Wang, Z., Schley, G., Turkoglu, G., Burzlaff, N., Amann, K. U., Willam, C., . . . Bernhardt, W. M. (2012). The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. *Nephrol Dial Transplant*, 27(3), 929-936. doi:10.1093/ndt/gfr379
- Wasim, M., Carlet, M., Mansha, M., Greil, R., Ploner, C., Trockenbacher, A., . . . Kofler, R. (2010). PLZF/ZBTB16, a glucocorticoid response gene in acute lymphoblastic leukemia, interferes with glucocorticoid-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 120(4-5), 218-227. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.04.019
- Weisz, O. A. (2003). Acidification and protein traffic. *Int Rev Cytol*, 226, 259-319. doi:10.1016/s0074-7696(03)01005-2
- Weisz, O. A. (2021). Endocytic adaptation to functional demand by the kidney proximal tubule. *J Physiol*, 599(14), 3437-3446. doi:10.1113/JP281599
- Welling, P. A., & Weisz, O. A. (2010). Sorting it out in endosomes: an emerging concept in renal epithelial cell transport regulation. *Physiology (Bethesda)*, 25(5), 280-292. doi:10.1152/physiol.00022.2010
- Willnow, T. E., & Christ, A. (2017). Endocytic receptor LRP2/megalin-of holoprosencephaly and renal Fanconi syndrome. *Pflugers Arch*, 469(7-8), 907-916. doi:10.1007/s00424-017-1992-0
- Wolf, G., Chen, S., & Ziyadeh, F. N. (2005). From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 54(6), 1626-1634. doi:10.2337/diabetes.54.6.1626
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016
- Yamagishi, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., & Takeuchi, M. (2003). Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int*, 63(2), 464-473. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00752.x
- Yamahara, K., Yasuda, M., Kume, S., Koya, D., Maegawa, H., & Uzu, T. (2013). The role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*, 2013, 193757. doi:10.1155/2013/193757
- Yammani, R. R., Seetharam, S., & Seetharam, B. (2001). Identification and characterization of two distinct ligand binding regions of cubilin. *J Biol Chem*, 276(48), 44777-44784. doi:10.1074/jbc.M106419200

- Yang, C. C., Lin, L. C., Wu, M. S., Chien, C. T., & Lai, M. K. (2009). Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 alpha-dependent bcl-2 signaling. *Transplantation*, 88(11), 1251-1260. doi:10.1097/TP.0b013e3181bb4a07
- Yang, D., Livingston, M. J., Liu, Z., Dong, G., Zhang, M., Chen, J. K., & Dong, Z. (2018). Autophagy in diabetic kidney disease: regulation, pathological role and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci*, 75(4), 669-688. doi:10.1007/s00018-017-2639-1
- Yoo, Y. G., Kong, G., & Lee, M. O. (2006). Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1. *EMBO J*, 25(6), 1231-1241. doi:10.1038/sj.emboj.7601025
- Yu, X., Fang, Y., Liu, H., Zhu, J., Zou, J., Xu, X., . . . Ding, X. (2012). The balance of beneficial and deleterious effects of hypoxia-inducible factor activation by prolyl hydroxylase inhibitor in rat remnant kidney depends on the timing of administration. *Nephrol Dial Transplant*, 27(8), 3110-3119. doi:10.1093/ndt/gfr754
- Yuseff, M. I., Farfan, P., Bu, G., & Marzolo, M. P. (2007). A cytoplasmic PPPSP motif determines megalin's phosphorylation and regulates receptor's recycling and surface expression. *Traffic*, 8(9), 1215-1230. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00601.x
- Zeni, L., Norden, A. G. W., Cancarini, G., & Unwin, R. J. (2017). A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J Nephrol*, 30(6), 701-717. doi:10.1007/s40620-017-0423-9
- Zhai, X. Y., Nielsen, R., Birn, H., Drumm, K., Mildenerger, S., Freudinger, R., . . . Gekle, M. (2000). Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney Int*, 58(4), 1523-1533. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00314.x
- Zhan, M., Usman, I. M., Sun, L., & Kanwar, Y. S. (2015). Disruption of renal tubular mitochondrial quality control by Myo-inositol oxygenase in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 26(6), 1304-1321. doi:10.1681/ASN.2014050457
- Zhang, F., Zhang, L., Qi, Y., & Xu, H. (2016). Mitochondrial cAMP signaling. *Cell Mol Life Sci*, 73(24), 4577-4590. doi:10.1007/s00018-016-2282-2
- Zhang, J., Cai, J., Cui, Y., Jiang, S., Wei, J., Kim, Y. C., . . . Liu, R. (2022). Role of the macula densa sodium glucose cotransporter type 1-neuronal nitric oxide synthase-tubuloglomerular feedback pathway in diabetic hyperfiltration. *Kidney Int*, 101(3), 541-550. doi:10.1016/j.kint.2021.10.037
- Zhang, J., Wei, J., Jiang, S., Xu, L., Wang, L., Cheng, F., . . . Liu, R. (2019). Macula Densa SGLT1-NOS1-Tubuloglomerular Feedback Pathway, a New Mechanism for Glomerular Hyperfiltration during Hyperglycemia. *J Am Soc Nephrol*, 30(4), 578-593. doi:10.1681/ASN.2018080844
- Zhang, J., & Zhang, Q. (2018). VHL and Hypoxia Signaling: Beyond HIF in Cancer. *Biomedicines*, 6(1). doi:10.3390/biomedicines6010035

- Zhang, L., Huang, H., Cheng, J., Liu, J., Zhao, H., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2011). Pre-treatment with isoflurane ameliorates renal ischemic-reperfusion injury in mice. *Life Sci*, 88(25-26), 1102-1107. doi:10.1016/j.lfs.2011.04.004
- Zhang, T., Dong, K., Liang, W., Xu, D., Xia, H., Geng, J., . . . Yuan, J. (2015). G-protein-coupled receptors regulate autophagy by ZBTB16-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of Atg14L. *Elife*, 4, e06734. doi:10.7554/eLife.06734
- Zhao, H., Li, X., Zhao, T., Zhang, H., Yan, M., Dong, X., . . . Li, P. (2017). Tangshen formula attenuates diabetic renal injuries by upregulating autophagy via inhibition of PLZF expression. *PLoS One*, 12(2), e0171475. doi:10.1371/journal.pone.0171475
- Zhu, Y., He, Q., Aydin, C., Rubera, I., Tauc, M., Chen, M., . . . Bastepe, M. (2016). Ablation of the Stimulatory G Protein alpha-Subunit in Renal Proximal Tubules Leads to Parathyroid Hormone-Resistance With Increased Renal Cyp24a1 mRNA Abundance and Reduced Serum 1,25-Dihydroxyvitamin D. *Endocrinology*, 157(2), 497-507. doi:10.1210/en.2015-1639
- Zinchuk, V., & Grossenbacher-Zinchuk, O. (2011). Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 4, Unit4 19. doi:10.1002/0471143030.cb0419s52
- Zoja, C., Donadelli, R., Colleoni, S., Figliuzzi, M., Bonazzola, S., Morigi, M., & Remuzzi, G. (1998). Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int*, 53(6), 1608-1615. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00905.x
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 21-35. doi:10.1038/nrm3025
- Zou, Z., Chung, B., Nguyen, T., Mentone, S., Thomson, B., & Biemesderfer, D. (2004). Linking receptor-mediated endocytosis and cell signaling: evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule. *J Biol Chem*, 279(33), 34302-34310. doi:10.1074/jbc.M405608200

Publikationen

Veröffentlichungen

bisherige Veröffentlichungen

Saudenova, M., Promnitz, J., Ohrensall, G., Himmerkus, N., Bottner, M., **Kunke, M.**, Bleich, M., Theilig, F. (2022). Behind every smile there's teeth: Cathepsin B's function in health and disease with a kidney view. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1869(4), 119190

Larionov, A., Dahlke, E., **Kunke, M.**, Zanon Rodriguez, L., Schiessl, I. M., Magnin, J. L., . . . Theilig, F. (2019). Cathepsin B increases ENaC activity leading to hypertension early in nephrotic syndrome. *J Cell Mol Med*, 23(10), 6543-6553. doi:10.1111/jcmm.14387

Teile dieser Dissertation wurden eingereicht bei:

Journal of the American Society of Nephrology

Kunke, M., Knoefler, H., Zanon Rodriguez, L., Böttner, M., Larionov, A., Dahlke, E., Saudenova, M., . . . Theilig, F. (2022). Proximal tubular von-Hippel-Lindau deletion prevents glomerular hyperfiltration and ameliorates diabetic kidney disease.

Science Signaling

Rinschen, M. M., Harder, J. L., Carter-Timofte, M. E., Zanon Rodriguez, L., Mirabell, C., Demir, F., Kurmasheva, N., Ramakrishnan, S. K., **Kunke, M.**, . . . Theilig, F. (2022). A molecular map of VPS34 activity links nutrient recovery and apical membrane function. Manuskriptnummer: abo7940

Kongressbeiträge

Kunke, M., Zanon Rodriguez, L., Dahlke, E., Larionov, A., Schwaerzer, G., Theilig, F. (2019). mTORC1 phosphorylates megalin to alter proximal tubular endocytosis. Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Düsseldorf, Deutschland.

Zanon Rodriguez, L., **Kunke, M.**, Geurink, I., Theilig, F. (2019). Altered L-WNK1 expression in mouse models for FSGS and metabolic syndrome. Posterbeitrag Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Deutschland.

Kunke, M., Zanon Rodriguez, L., Schwaerzer, G., Theilig, F. (2018). mTORC1 regulates renal proximal tubule function. Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, Deutschland.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Madlen Kunke, an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation nach Inhalt und Form, unter der Beratung durch meine Betreuerin, meine eigene Arbeit ist. Ich verwendete keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel.

Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation bis jetzt weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegt wurde. Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht.

Ich habe bisher keinen weiteren Promotionsversuch unternommen und mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft entstanden.

Kiel, den _____

(Madlen Kunke)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren begleitet und zum Erstellen und Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zu Beginn möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Franziska Theilig für die Ratschläge, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit bei der Planung meiner Experimente, ebenso für die Möglichkeit aktiv an der Gestaltung und dem Aufbau der neuen Arbeitsgruppe mitzuwirken, bedanken.

Ein ganz besonderer Dank kommt dem ganzen Anatomischen Institut und vor allem meiner Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Schwierigkeiten im Laboralltag, aber auch für die sympathische, humorvolle und herzliche Atmosphäre, zu. Die gegenseitige Unterstützung und die gemeinsame Zeit außerhalb des Labors schätzte ich sehr.

Im Einzelnen danke ich meinem Mitdoktorand Luis, der mir so manches nicht krumm nahm, meine verrückten fünf Minuten im Büro ertrug und sich widerwillig um meine Pflanzen kümmerte. Für ihr immer offenes Ohr, ihre beruhigende Art auch in brenzlichen Situationen sowie für ihre fachliche Hilfe und das Korrekturlesen danke ich Eileen. Ein großes Dankeschön geht besonders an Sonja ohne die ich wahrscheinlich durchgedreht wäre und die mich an das Leben außerhalb des Labors erinnerte und an Christina, die leider schon zu früh promovierte und mit ihr kurze, abwechslungsreiche Klön-Sessions gingen. Ebenso möchte ich mich bei François nicht nur für seine Zeit mit mir wissenschaftliche Diskussionen zu führen sondern auch für seine Verwaltung meines Süßigkeiten-Depots und glücklicherweise auch dessen kontinuierliche Reduktion bedanken. Weiterhin vielen Dank an Frank und Frankline, Miriam für ihre großartige Laborunterstützung und ihre flotten Sprüche, Inka für die Erweiterung meines Sprachschatzes und die Korrektur, Yaman und Makhabbat for talking english with me, Martina für die geschmackliche Offenbarung von Mairübchen und ihre lieben Überraschungen auf meinen Schreibtisch, auch Alyn und Makhabbat sollen nicht unerwähnt bleiben. Viele von euch sind zu sehr guten Freunden geworden!

Darüberhinaus möchte ich mich beim Biochemischen Institut bei der Arbeitsgruppe Voss und Saftig, insbesondere Sebastian Held, für die großzügige Nutzung der Geräte bedanken.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine Familie und auch an alle meine Freunde, die mir den Rücken in jeder Hinsicht stärkten, mir stets Mut zusprachen und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

