

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Ralph Lucius)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Bedeutung der Cysteinprotease Cathepsin B
bei der Ausbreitung der fokal-segmentalen
Glomerulosklerose entlang des
Tubulointerstitiums**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Max Gerrit Ohrenschall
aus **Kiel**
Kiel (2023)

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Franziska Theilig, Anatomisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Josef Saftig, Biochemisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 6.9.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.4.2024

gez.: Prof. Dr. Franziska Theilig
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Meinen Eltern gewidmet

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen mikroskopischer Nierenanatomie und glomerulärer Erkrankungen	1
1.1.1	Der glomeruläre Filter	2
1.1.2	Das nephrotische Syndrom	4
1.1.3	Klassifizierung primär-glomerulärer Erkrankungen des nephrotischen Syndroms	4
1.1.4	Folgen des nephrotischen Syndroms	7
1.2	Der epitheliale Natriumkanal ENaC	8
1.2.1	Regulation von ENaC	10
1.2.2	Proteolytische Modifikationen ENaCs	12
1.3	Cathepsin B	13
1.3.1	Die Proteaseeigenschaften Cathepsin Bs	13
1.3.2	Intra- und extrazelluläre Bedeutung Cathepsin Bs	14
1.3.3	Die Rolle Cathepsin Bs bei inflammatorischen Prozessen	15
1.3.4	Mögliche Rolle Cathepsin Bs im nephrotischen Syndrom	16
1.4	Tiermodelle des nephrotischen Syndroms	17
1.4.1	Das Tamoxifen-induzierbare Mausmodell des nephrotischen Syndroms	18
1.5	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Plasmide	20
2.1.2	Bakterienstämme	20
2.1.3	Zelllinien	20
2.1.4	Mauslinien	20
2.1.5	Antikörperliste	21
2.2	Zellkulturmethoden	22
2.2.1	Zellkulturmedien und Lösungen	22
2.2.2	Zellzahlbestimmung	23
2.2.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	23
2.2.4	Transfektionen von Zellen	23
2.2.5	CRISPR/Cas9-Knockout von Cathepsin B in mpkCCD14-Zellen	24
2.2.6	Grenzverdünnungsklonieren der CRISPR/Cas9 behandelten Zellen	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1	Genotypisierung	26

2.3.2	Zielgerichtete Mutagenese	26
2.3.3	Agarosegele	27
2.3.3.1	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	27
2.3.4	Restriktionsverdau von DNA	28
2.3.5	DNA-Ligation.....	28
2.3.6	Gentransfer von Plasmiden in Prokaryoten	28
2.3.6.1	Elektroporation	28
2.3.7	Plasmidpräparation	29
2.3.7.1	Bestimmung der optischen Dichte	29
2.3.7.2	Miniprep.....	29
2.3.7.3	Midiprep.....	29
2.4	Proteinbiochemische Methoden	30
2.4.1	Proteinisolation durch Membranfraktion.....	30
2.4.2	BCA-Analyse.....	30
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.4.4	Western Blot	32
2.4.5	Ponceaufärbung	32
2.4.6	Western Blot-Detektion.....	33
2.4.7	Zymogramme.....	34
2.5	Mikroskopische Methoden.....	34
2.5.1	Paraffineinbettung und Entparaffinierung	34
2.5.2	Masson-Trichrom-Färbung.....	35
2.5.3	PAS-Färbung	36
2.5.4	Toluidinblaufärbung	36
2.5.5	Immunhistochemische Färbungen	36
2.5.6	Mikroskope	37
2.6	Tierexperimentelle Methoden	37
2.6.1	Durchführung der Mausexperimente	37
2.6.2	Blutdruckmessung	37
2.6.3	Urinparameterbestimmung	38
2.6.4	Perfusion.....	38
2.7	Statistische Analysen.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Verifizierung des Knockouts der Nphs2 ^{Δpod} - und Nphs2 ^{Δpod} ; Ctsb ^{Δpod} -Mäuse	40
3.2	Auswertung des glomerulären und tubulointerstitiellen Schadens	43

3.3	Proteinurie und Albuminurie im zeitlichen Verlauf.....	48
3.4	Auswertung der Proteasurie mittels Zymographie.....	51
3.5	Änderung des Blutdrucks	53
3.6	Elektrophysiologische Analysen des Einflusses Cathepsin Bs auf ENaC	55
3.7	ENaC-Expressionsverhalten in retransfizierten Cathepsin B-defizienten Sammelrohrzellen.....	57
3.8	Vergleich von Cathepsin B-Knockoutmäusen mit Wildtypmäusen	61
4	Diskussion.....	65
4.1	Die Tierexperimente verdeutlichen in vivo glomeruläre und tubuläre Effekte Cathepsin Bs	65
4.2	Die Zellkulturexperimente zeigen den fördernden Einfluss Cathepsin Bs auf die ENaC-Expression und die Kanalaktivität.....	69
4.3	Die möglichen Mechanismen hinter Cathepsin B im nephrotischen Syndrom	73
4.4	Ausblick	77
5	Zusammenfassung.....	79
6	Literaturverzeichnis	80
7	Anhang.....	89
7.1	Abbildungsverzeichnis	89
7.2	Tabellenverzeichnis.....	90
8	Danksagung.....	91
9	Publikationen	92
10	Eidesstattliche Erklärung.....	93

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Amp.	Ampicillin
ANCA	Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ASL	Airway surfaces liquid
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BMDM	Bone-marrow-derived macrophage
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
cFSGS	Collapsing focal segmental glomerulosclerosis
Cre	Cyclization recombination
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Ctsb	Cathepsin B (beziehungsweise Cathepsin B Gen)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos's modified Eagle Medium

DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's PBS
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ERK2	Extracellular-signal regulated kinase 2
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
g	Erdbeschleunigung
GBM	Glomeruläre Basalmembran
HDL	High density lipoprotein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgA	Immunglobulin A
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
LB	Lysogeny broth
LDL	Low density lipoprotein
loxP	Locus of x-over P1

LRR	Leucine-rich repeat
MCGN	Minimal-Change-Glomerulonephritis
MPGN	Membranproliferative Glomerulonephritis
mpkCCD	Murine principal kidney cortical collecting duct
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Na/K-ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nedd4-2	Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-2
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NOS FSGS	Not otherwise specified focal segmental glomerulosclerosis
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAN	Puromycin aminonucleoside nephrosis
PAS	Periodic Acid Schiff (Periodsäure-Schiff)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PCSK9	Proteinkonvertase subtilisin/kexin typ 9
pH	Pondus Hydrogenii
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMMA	Polymethylmethacrylat
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SGK1	Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
sgRNA	Single guide ribonucleic acid
SOC	Super Optimal Broth + Glucose
STED	Stimulated Emission Depletion
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEVC	Two-electrode-voltage-clamp
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPC6	Transient receptor potential canonical 6
TRPML1	Transient receptor potential cation channel, mucolipin subfamily, member 1
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
UV	Ultraviolett
VLDL	Very low-density lipoproteine
(v/v)	Volume per volume (Volumen/Volumen)

(w/v)	Weight per volume (Gewicht/Volumen)
WNK4	With no lysine/K kinase 4
WT1	Wilms-Tumorsuppressorgen
ZO-1	Zonula occludens-1

Größeneinheiten

A	Ampere
F	Farad
°C	Grad Celsius
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
min	Minute
Ω	Ohm
s	Sekunde
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Grundlagen mikroskopischer Nierenanatomie und glomerulärer Erkrankungen

In der Niere stellt das Nephron die kleinste funktionelle Einheit dar; es ist aufgebaut aus einem Nierenkörperchen und dem jeweiligen, ihm zugehörigen Tubulussystem mit proximalem Tubulus, Intermediärtubulus und distalen Tubulus. Letzterer setzt sich in den Verbindungstubulus fort; mehrere Verbindungstubuli konfluieren in einzelne, in das Nierenbecken mündende Sammelrohre. Verbindungstubuli und Sammelrohre, die funktionell dem Tubulussystem zuzuordnen sind, entstammen entwicklungsgeschichtlich aus der dem Urnierengang entspringenden Ureterknospe und sind damit streng genommen kein Teil des Nephrons, welches vollständig aus der Nachniere hervorgeht (Ulfig 2009). Das Nierenkörperchen selbst besteht aus einem Kapillarknäuel, dem sogenannten Glomerulus, und einer es umgebenden, doppelwandigen Kapsel (Bowman-Kapsel). Ein Glomerulus ist eine verzweigte Kapillarschlinge mit einer stabilisierenden, bindegewebigen Struktur aus kontraktile Zellen, dem Mesangium. Bei Zufluss (Vas afferens) und Abfluss (Vas efferens) der Kapillarschlinge handelt es sich in beiden Fällen um Arteriolen und damit um ein rein arterielles Gefäßsystem. Der gesamte Glomerulus ist in die Bowman-Kapsel eingestülpt, die aus zwei am Gefäßpol ineinander übergehenden Blättern, einem parietalen und einem viszeralen, sowie einem dazwischenliegenden Kapselraum besteht und den Beginn des Tubulussystems markiert. Das parietale Blatt besteht aus einem einschichtigen Epithel, das viszerale Blatt wird durch die Podozyten, spezialisierte und sich stark verzweigende Zellen, gebildet. In dem Kapselraum befindet sich der Primärharn, bei dem es sich um ein Filtrat des Blutplasmas aus dem Kapillarknäuel handelt. Das Kapillarendothel der Glomeruli ist fenestriert, die Plasmamembran der Endothelzellen ist jedoch mit einer stark negativ geladenen Glykokalyx ausgestattet. Zusammen mit der zwischen Podozyten und Endothel gelegenen glomerulären Basalmembran (GBM), den Zellfortsätzen der Podozyten (Podozytenfüßchen) und den zwischen einzelnen Podozyten ausgebildeten Schlitzdiaphragmen, stellt die Glykokalyx des Endothels den glomerulären Filter, auch Blut-Harn-Schranke genannt, dar. Dieser glomeruläre Filter dient dazu, Ionen, Wasser, kleine Moleküle sowie Ausscheidungsprodukte in den Primärharn zu filtrieren, wichtige Plasmaproteine oder Zellen aber zurückzuhalten. Über das Tubulussystem werden anschließend Ionen, Wasser oder wichtige Stoffe, die den Filter passieren konnten, aus homöostatischen Gründen rückresorbiert. Für diese Einleitung in die Nierenanatomie wurden,

sofern nicht anders angegeben, die Lehrbücher „Histologie“ (Lüllmann-Rauch 2012) und „Physiologie“ (Klinke et al. 2009) verwendet.

1.1.1 Der glomeruläre Filter

Die Bestandteile des glomerulären Filters haben unterschiedliche Eigenschaften, die seine Funktionalität aufrechterhalten: Die lumenseitige Glykokalyx des Endothels ist teilweise über 400 nm dick und überragt die Fensterungen des Endothels (Lüllmann-Rauch 2012). Sie beinhaltet stark glykosylierte Glykoproteine, Proteoglykane und Glukosaminoglykane, unter denen Heparansulfat am häufigsten vertreten ist (Li, Bonventre 2016). Die vielen anionischen Ladungen der Glykokalyx dienen dazu, negativ geladenen Makromolekülen den Zutritt durch den Filter zu erschweren, selbst wenn sie ob ihrer Größe passieren könnten. Die glomeruläre Basalmembran (GBM) besitzt eine ungewöhnliche Dicke, die daraus resultiert, dass sie eine Fusion der Basalmembranen von Endothelzellen und Podozyten darstellt (Miner 2011), sie also entsprechend eine Lamina rara interna zum Endothel und eine Lamina rara externa zu den Podozyten ausbildet. Das Grundgerüst der dazwischenliegenden Lamina densa aus Kollagen IV wird als Besonderheit der GBM hauptsächlich durch die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ gebildet (Lüllmann-Rauch 2012). Weitere entscheidende Bestandteile der GBM sind Proteoglykane, an dieser Stelle besonders stark vertreten durch Agrin, Laminin-521 und die sulfatierten Glykoproteine Nidogen 1 und Nidogen 2, die grundsätzlich wichtiger Bestandteil aller Basalmembranen sind (Miner 2011). Die GBM als Teil der Blut-Harn-Schranke scheint insbesondere für Albumin die entscheidende Barrierefunktion darzustellen (Suh, Miner 2013), zusammen mit der Glykokalyx verursacht sie im Wesentlichen die Ladungsselektivität des Filters. Eine Verdickung der GBM kann bereits frühzeitig ein Anzeichen für eine Veränderung einer renalen Pathologie darstellen. Die Barrierekraft der GBM selbst ist jedoch auch von der Integrität der Podozyten beeinflusst, sodass es ohne ausreichenden Widerstand der Podozyten gegen den Filtrationsdruck zu einer Relaxation der GMB kommt (Butt et al. 2020). Über die Laminin-Integrin-Interaktion stehen GBM und Podozyten miteinander in Verbindung. Bei den Podozyten handelt es sich um verzweigte Zellen, die dicke Primärfortsätze und, von diesen abgehend, zahlreiche, dünnere Sekundärfortsätze, die sogenannten Podozytenfüßchen, ausbilden, mit denen die Zellen sich an der GBM festhalten. Die Füßchen interdigitieren dabei mit denen benachbarter Podozyten und bilden so eine dichte, fast vollständige Abdeckung der gesamten GBM mit Ausnahme einzelner Filtrationsschlitze. Diese Aussparungen sind von den Schlitzdiaphragmen überbrückt, die durch ein komplexes System an Proteinen gebildet werden

und der Größenselektivität von Molekülen dienen. Das Transmembranprotein Nephrin stellt den Hauptverschluss des Diaphragmas her, indem es von den Podozyten im Filtrationsschlitz überlappend ausgebildet wird. Nephrin wird im Podozyten durch Podocin, einem Verbindungsprotein zwischen Zytoskelett und Plasmamembran, gebündelt und stabilisiert, da es an Nephrins zytoplasmatischen Teil bindet (Huber et al. 2001). Mit Nephrin, Podocin und den Aktinfilamenten des Zytoskeletts zusammen interagiert das zytoplasmatische Protein CD2AP (Schwarz et al. 2001), außerdem steht Nephrin über das Protein Nephl mit dem Ankerprotein der Zonula occludens ZO-1 in Verbindung (Sagar et al. 2017). Im Schlitzdiaphragma werden zusätzlich extrazellulär die Proteine Neurexin, FAT und Ephrin-B1 ausgebildet (Kawachi, Fukusumi 2020), des Weiteren sind für die Funktionalität des glomerulären Filters auch das von Podozyten exprimierte Podocalyxin und der TRPC6-Kanal, der bei Überfunktion durch erhöhte Calciumkonzentration die Podozyten schädigt (Winn et al. 2005), von Bedeutung (Simic et al. 2013). Einzelne Elemente des glomerulären Filters führen zu einer erhöhten Durchlässigkeit für Plasmaproteine, wenn sie krankhaften Veränderungen unterliegen, wie es beim nephrotischen Syndrom der Fall ist.

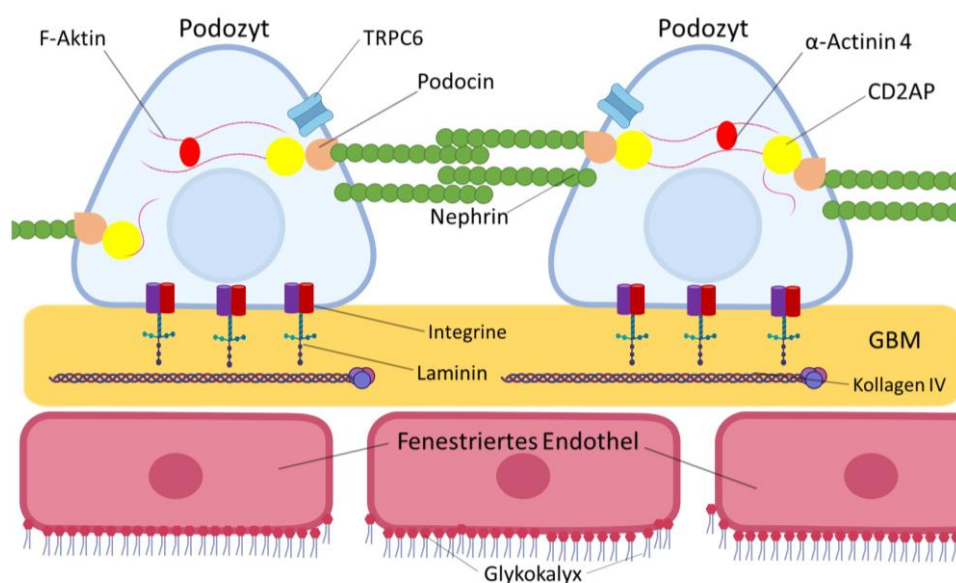


Abb. 1: Schemazeichnung des Aufbaus der Blut-Harn-Schranke. Angelehnt an Simic et al. 2013. Der glomeruläre Filter besteht aus einem fenestrierten Endothel, einer Basalmembran (GBM) sowie den Podozyten und zwischen selbigen ausgebildeten Schlitzdiaphragmen. Neben Podocin spielen auch CD2AP oder Aktinfilamente eine Rolle bei der Verankerung Nephrins. Verdickungen der GBM können frühzeitig einen Hinweis auf Nephropathien geben; ein Ablösen der Podozytenfüßchen („podocyte effacement“) führt zu einer stärkeren Durchlässigkeit der Blut-Harn-Schranke. Grafik erstellt mit BioRender.com.

1.1.2 Das nephrotische Syndrom

Das nephrotische Syndrom ist ein Sammelbegriff für verschiedene, klinische Symptome, die im Zusammenhang mit einer Schädigung des Nierenparenchyms auftreten. Dieser Symptomkomplex besteht aus Proteinurie (mehr als 3,5 g/Tag pro 1,73 m² Körperoberfläche), Hypoalbuminämie (weniger als 25 g/l), Hyperlipidämie, Natriumretention und Ödembildung. Die Inzidenz beträgt 4,7/100000 bei Kindern und 3/100000 bei Erwachsenen (Downie et al. 2017). Ursächlich ist eine gesteigerte Durchlässigkeit des glomerulären Filters als Folge primärer oder sekundärer Schädigungen eines oder mehrerer seiner Bestandteile. Bei primären Ursachen des nephrotischen Syndroms handelt es sich um direkte Podozytopathien, deren Ätiologie ausschließlich die Niere betrifft, während es sich bei den sekundären Ursachen des nephrotischen Syndroms um unterschiedliche systemische Erkrankungen oder Intoxikationen handelt, die sich auch in Form pathogener Veränderungen der Glomeruli manifestieren können (siehe Tab. 1).

1.1.3 Klassifizierung primär-glomerulärer Erkrankungen des nephrotischen Syndroms

Die Einteilung der primär-glomerulären Erkrankungen, die das nephrotische Syndrom verursachen, ergibt sich aus ihrer histologischen Unterscheidung. Da die sekundären Ursachen histologisch ähnliche Korrelate hervorrufen können, ist bei den primär-glomerulären Erkrankungen jeweils die idiopathische Form gemeint; im anderen Fall wird entsprechend von beispielsweise sekundärer FSGS gesprochen. Die idiopathischen Ursachen des nephrotischen Syndroms machen 80-90 % aller Fälle aus (Kodner 2016).

Membranöse Glomerulonephritis

Die Membranöse Glomerulonephritis ist hierbei die häufigste Ursache im Erwachsenenalter. Bei dieser Form kommt es zu einer diffusen Verdickung der glomerulären Basalmembran und unregelmäßigen Einlagerungen von Immunkomplexen zwischen Basalmembran und Endothelzellen (Cotran et al. 1999). Im frühen Stadium erwecken die Einlagerungen den histologischen Eindruck von Dornen („spikes“), später entstehen durch das Verschmelzen dieser Einlagerungen die irregulären Basalmembranverdickungen. Etwa 80 % der Fälle membranöser Glomerulonephritis sind idiopathisch bedingt, 4 von 5 Betroffenen dieser Variante entwickeln ein nephrotisches Syndrom (Witt, Schmid 2006). Etwa 30 % der Patienten erleiden innerhalb von 10 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz.

Minimal-Change-Glomerulonephritis

Die Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGN) zeichnet sich durch im Lichtmikroskop unverändert erscheinende Glomeruli aus. Allerdings kommt es bei MCGN zu einem, mit der Elektronenmikroskopie darstellbaren, teilweisen Ablösen der Podozytenfüßchen von der Basalmembran; es entsteht hierbei durch Schwellung und Vakuolenbildung der Eindruck, die Podozytenfortsätze seien miteinander verschmolzen (Cotran et al. 1999). MCGN hat insgesamt eine gute Langzeitprognose, obwohl die Rezidivrate bei Erwachsenen mit bis zu 76 % hoch ist (Müller-Deile et al. 2019). Bei Kindern stellt MCGN die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms dar, allerdings sprechen sie im Regelfall sehr gut auf eine Steroidtherapie an; dieser Effekt tritt bei Erwachsenen meist verzögert ein (Witt, Schmid 2006).

Membranproliferative Glomerulonephritis

Bei der membranproliferativen Glomerulonephritis (MPGN) kommt es zu Verdickungen der glomerulären Basalmembran, Leukozyteneinwanderung und einer Proliferation des Mesangiums. Es kann im Zuge der MPGN auch zum nephritischen Syndrom mit Hämaturie kommen (Cotran et al. 1999).

IgA-Nephritis

Wesentliches und namensgebendes Merkmal der IgA-Nephritis, die auch Morbus Berger genannt wird, ist die Ablagerung von IgA-Komplexen im Bereich des Mesangiums (Cotran et al. 1999). Die histologischen Korrelate zeichnen sich bei dieser Erkrankung eher dezent durch proliferative Veränderungen des Mesangiums oder gänzlich gesund anmutende Glomeruli aus. (Cotran et al. 1999). Sekundär kann diese Erkrankung auch im Rahmen von Purpura Schönlein-Henoch auftreten. Die IgA-Nephritis ist die häufigste primär-glomeruläre Erkrankung, allerdings entwickeln nur bis zu 10 % der Patienten ein nephrotisches Syndrom (Sommerer 2020).

Fokal-segmentale Glomerulosklerose

Die fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) zeichnet sich durch sklerotische Veränderungen einzelner Glomeruli innerhalb der Niere aus, während andere unverändert bleiben. Auch innerhalb eines einzelnen Glomerulus sind nicht zwangsweise alle Kapillarschlingen betroffen. In drei von vier Fällen führt FSGS zum nephrotischen Syndrom. Histologische Merkmale, die bei FSGS auftreten, sind Adhäsionen zwischen der glomerulären Basalmembran und dem parietalen Blatt der Bowman-Kapsel, hyaline Ablagerungen innerhalb

der Glomeruli und Proliferation des Mesangiums, sowie das Auftreten von Schaumzellen (Makrophagen). Die Adhäsion zwischen GBM und Bowman-Kapsel ist ein Resultat des Absterbens und Ablösens der Podozyten, die Proliferation sowie die Schaumzellen sind histologische Korrelate einer Entzündungsreaktion.

Primäre Ursachen	Sekundäre Ursachen
<ul style="list-style-type: none"> Minimal-Change-Glomerulonephritis (idiopathisch) Fokal-segmentale Glomerulosklerose (idiopathisch) Membranöse Glomerulonephritis (idiopathisch) Membranproliferative Glomerulonephritis (idiopathisch) IgA-Nephritis 	<ul style="list-style-type: none"> Diabetes mellitus (Typ I und II) Systemischer Lupus erythematodes Purpura Schönlein-Henoch Goodpasture-Syndrom Amyloidose Präeklampsie Sjögren-Syndrom Polyarteritis nodosa Sarkoidose Castleman-Krankheit Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) Tumorerkrankungen (Multiples Myelom, Lymphome, Melanome, Karzinome) Infektionskrankheiten (HIV, Hepatitis B, Hepatitis C, Parvovirus B1, Zytomegalievirus, EBV, Herpes zoster, Toxoplasmose, Mykoplasmen, Bilharziose, Syphilis, Malaria, Filariose) Medikamente/Toxine (Gold, Lithium, NSAR, Tamoxifen, Captopril, Penicillamine, Heroin, Interferon alpha) Weitere genetische Syndrome (beispielsweise Alport- Syndrom, Denys-Drash-Syndrom)

Tab. 1: Einteilung verschiedener Ursachen des nephrotischen Syndroms.

Zusammengetragen von Tapia, Bashir 2022; Hull Goldsmith 2008; Kodner 2016.

Die idiopathische FSGS ist bei 10-20 % aller Patienten mit nephrotischem Syndrom ursächlich (Witt, Schmid 2006). FSGS kann anhand des Verlaufs morphologisch weiter in eine perihiläre Läsion, eine zelluläre Variante, eine Spitzenläsion, eine kollabierende Version (cFSGS) und eine nicht weiter definierte Form (NOS FSGS) eingeteilt werden (Han, Kim 2016).

1.1.4 Folgen des nephrotischen Syndroms

Der Proteinverlust bringt neben der erhöhten Ausscheidung von Albumin weitere Komplikationen mit sich: Zum einen haben Patienten mit nephrotischem Syndrom ein erhöhtes Infektionsrisiko resultierend aus der proteinuriebedingten verringerten Menge an Immunglobulinen (Park, Shin 2011). Des Weiteren besteht durch die Ausscheidung von Erythropoetin und Transferrin ein erhöhtes Risiko für anämische Veränderungen (Park, Shin 2011). Eine der bedeutendsten Komplikationen der Proteinurie sind Thrombembolien, als Resultat des Verlustes an antikoagulierenden Faktoren wie Antithrombin III (Cotran et al. 1999); das Thromboserisiko der Nierenvene ist in diesem Zusammenhang besonders bei membranöser Glomerulonephritis erhöht (Witt, Schmid 2006). Die erhöhte Natriumrückresorption entlang des Tubulussystems der Niere führt zu einem erhöhten Blutdruck, der seinerseits einen erheblichen Risikofaktor für zahlreiche Herzkreislauferkrankungen darstellt. Ursächlich für diese erhöhte Natriumretention ist eine Dysregulation, die sich im Bereich des Verbindungstubulus- und Sammelrohrsystems abspielt, in welchem der epitheliale Natriumkanal ENaC exprimiert wird. ENaC zeigt im nephrotischen Syndrom eine erhöhte Expressionsrate und verstärkte Kanalaktivität (Larionov et al. 2019); eine Behandlung durch Amilorid, das ENaC selektiv blockiert, kann die Natriumretention und den erhöhten Blutdruck des nephrotischen Syndroms stoppen (Hinrichs et al. 2018). Die Hyperlipidämie der Patienten zeichnet sich durch erhöhte LDL-, VLDL-, Cholesterol-, Lipoprotein- und Triglyzeridwerte sowie bei einigen Patienten auch durch verringerte HDL-Werte aus (Cotran et al. 1999). Der Grund für diese Fehlregulation des Lipidstoffwechsels liegt in einer Gegenreaktion der Leber, die durch die Herstellung von Lipoproteinen versucht, den Proteinverlust zu kompensieren; der erniedrigte kolloidosmotische Druck durch die Albuminurie wird als Stimulus auf die Produktion von Apolipoprotein B vermutet (Lechleitner 2000), die genauen Mechanismen des gestörten Lipidstoffwechsels sind aber nicht vollständig verstanden (Macé, Chugh 2014). Es gibt Anzeichen, dass PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), welches posttranskriptional den LDL-Rezeptor reguliert, eine wichtige Rolle für die Hypercholesterolemie spielt, da der Knockout von PCSK9 im

Tierversuch die Dyslipidemie beim nephrotischen Syndrom verbessert hat (Haas et al. 2016). Das Arterioskleroserisiko wird neben der arteriellen Hypertonie durch die Natriumretention zusätzlich verstärkt. Für die Entstehung der Ödeme haben sich zwei Theorien entwickelt: Die Volumenmangelhypothese („underfill-hypothesis“) und die Volumenüberschusshypothese („overfill-hypothesis“). Bei der Volumenmangelhypothese wird davon ausgegangen, dass die Natriumretention, genau wie die Ödembildung, ein Resultat der Albuminurie ist. Durch den verminderten onkotischen Druck tritt demnach vermehrt Flüssigkeit in das Interstitium, der aus dieser Ödembildung resultierende Volumenmangel im Gefäßsystem bewirkt darauf durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine verstärkte Natriumrückresorption, um das Volumen wieder auszugleichen; die Natriumretention ist demnach ein sekundärer Effekt der Proteinurie (Siddal, Radhakrishnan 2012). Die Volumenüberschusshypothese hingegen geht davon aus, dass die Natriumretention ein primärer Effekt des nephrotischen Syndroms ist. Durch den aus der Natriumretention entstehenden, erhöhten kapillären Druck wird folglich vermehrt Flüssigkeit ins Interstitium filtriert; in diesem Fall sind also nicht die Hypoalbuminämie und der verminderte kolloidosmotische Druck entscheidend für die Entstehung der Ödeme (Siddal, Radhakrishnan 2012). Nach heutigem Standpunkt ist allerdings keine der beiden Theorien abschließend bewiesen oder widerlegt. Ebenso besteht außerdem die Möglichkeit, dass einzelne Punkte beider Theorien separat nebeneinander existieren, dass also sowohl ein verminderter onkotischer wie ein erhöhter kapillärer Druck die Ödembildung bewirken können, die Natriumretention durch ENaC aber auch unabhängig vom RAAS zustande kommt. Hypoalbuminämie und Natriumretention trügen demnach gemeinsam zur Ödembildung bei (Gurgoze et al. 2011). Durch den mit den glomerulären Erkrankungen einhergehenden Nierenschaden kann das nephrotische Syndrom im unbehandelten Zustand nach progressivem Verlauf zu chronischer Niereninsuffizienz mit terminalem Nierenversagen führen (Witt, Schmid 2006).

1.2 Der epitheliale Natriumkanal ENaC

Der epitheliale Natriumkanal ENaC ist ein membranständiger, spannungsunabhängiger Kationenkanal, der eine wichtige Rolle für die Rückresorption von Natriumionen im apikalen bzw. luminalen Teil einiger polarer Epithelien spielt. Neben seiner Expression im Sammelrohr und im Verbindungstubulus der Niere ist ENaC auch in der Lunge, in den Speicheldrüsen, im Kolon (Eaton et al. 2010) sowie in den Ausführungsgängen von Schweißdrüsen (Reddy, Quinton 2005) aufzufinden. Eine Besonderheit der Expression von ENaC in der Lunge ist

hierbei, dass sie unabhängig von Aldosteron erfolgt, sondern über Glukokortikoide reguliert wird (Gaillard, et al. 2010). Die Bedeutung ENaCs bei Mukoviszidose ob der Zusammensetzung des „airway surfaces liquid“ (ASL) wird kontrovers diskutiert (Shei et al. 2018), ENaC fungiert hierbei als Gegenspieler des Chloridkanals und kann bei Überfunktion den Salzhaushalt des Flüssigkeitsfilms ungünstig beeinflussen, weshalb er prinzipiell als therapeutisches Ziel in Betracht kommt (Moore, Tarran 2018). Die Rückresorption ENaCs im distalsten Abschnitt des Nephrons erfüllt eine elementar wichtige Funktion in Bezug auf den Salzhaushalt. Eine erhöhte Natriumrückresorption durch erhöhte ENaC-Expression oder ENaC-Aktivität bewirkt durch die damit einhergehende, verminderte Ausscheidung an Flüssigkeit einen Anstieg der Vorlast und des Blutdrucks. Wird der Kanal gehemmt, erhöht sich die Natriumausscheidung, weshalb ENaC auch als therapeutisches Ziel bei der Behandlung arterieller Hypertonie eine Rolle spielt, sei es durch direkte Hemmung, beispielsweise mittels Amilorid, oder der indirekten Wirkung durch Blockade der Aldosteronausschüttung, exemplarisch durch Medikamente wie Spironolacton. Neben dieser Hauptaufgabe, der Natriumresorption, weist ENaC auch eine Permeabilität für Lithiumionen und Protonen auf; durch Punktmutation der alpha-ENaC-Untereinheit konnte auch eine Durchlässigkeit des Kanals für Rubidiumionen, Caesiumionen und Kaliumionen erreicht werden, wenngleich sich die Selektivität für Natriumionen als ausgesprochen hoch erweist (Kellenberger et al. 1999). Der Kanal besteht aus den drei homologen, ein Heterotrimer bildenden Untereinheiten alpha-ENaC, beta-ENaC und gamma-ENaC. Zusätzlich sind auch delta-ENaC-Untereinheiten beschrieben, die strukturelle Ähnlichkeit mit der alpha-ENaC-Untereinheit aufweisen und mit beta-ENaC und gamma-ENaC einen atypischen ENaC-Kanal bilden können (Wichmann et al. 2018). Jede der Untereinheiten besteht aus zwei Transmembrandomänen, einer langen extrazellulären Schleife und intrazellulär gelegenen C- und N-Termini. Die Gene für die ENaC-Untereinheiten sind im Fall von alpha-ENaC auf Chromosom 12 (12p13.31) und bei beta- sowie gamma-ENaC auf Chromosom 16 (16p12.2) lokalisiert (Kozina et al. 2019). Eine wesentliche Eigenschaft ENaCs ist die Möglichkeit der sensitiven Hemmung durch das Medikament Amilorid, welches an den Untereinheiten jeweils extrazellulär in Nähe der C-terminalen zweiten Transmembrandomäne bindet (Moore, Tarran 2018). In der Region des C-Terminus befindet sich bei allen drei Einheiten eine als PY-Motiv bezeichnete Sequenz, die besonders reich an Prolin ist und für den ENaC-Umsatz der Zelle eine hohe Bedeutung hat, da hier die Ubiquitinierung durch die Ubiquitinligase Nedd 4.2 stattfindet (Tetti et al. 2019). Diese Ubiquitinierung verursacht die Internalisation der ENaC-Untereinheiten aus der Plasmamembran und ist daher ein sehr entscheidender Schritt des ENaC-Abbaus. Die klinische

Relevanz des PY-Motivs zeigt sich in Form des autosomal-dominant vererbten Liddle-Syndroms. Bei dieser Erkrankung kommt es in Folge genetischer Mutationen einer der drei Untereinheiten zu einer stärkeren Akkumulation von ENaC in der Plasmamembran und dadurch bedingt zu vergrößerter Natriumrückresorption und sekundärer Hypertonie (Tetti et al. 2019). Für das Liddle-Syndrom sind inzwischen zahlreiche Mutationen beschrieben worden, die meisten treten im Bereich des PY-Motivs von beta- und gamma-ENaC auf. Umgekehrt kann es bei Mutationen der Untereinheiten, die die Funktionalität ENaCs als Ionenkanal beeinträchtigen, zu dem Krankheitsbild des Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 und damit einhergehenden verstärktem Salzverlust sowie arterieller Hypotonie kommen (Boiko et al. 2015).

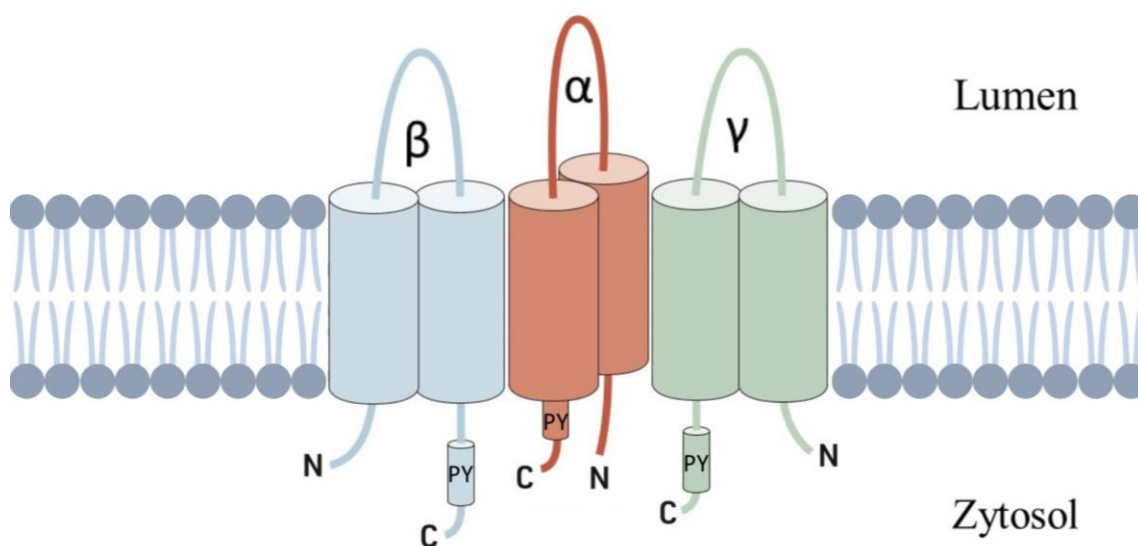


Abb. 2: Schemazeichnung des epithelialen Natriumkanals ENaC. Angelehnt an Bhalla, Hallows 2008. ENaC besteht aus den drei homologen Untereinheiten alpha, beta und gamma, die jeweils intrazellulär gelegene C- und N-Termini besitzen. In der Nähe des C-Terminus finden sich die jeweiligen PY-Motive (PY). Grafik erstellt mit BioRender.com.

1.2.1 Regulation von ENaC

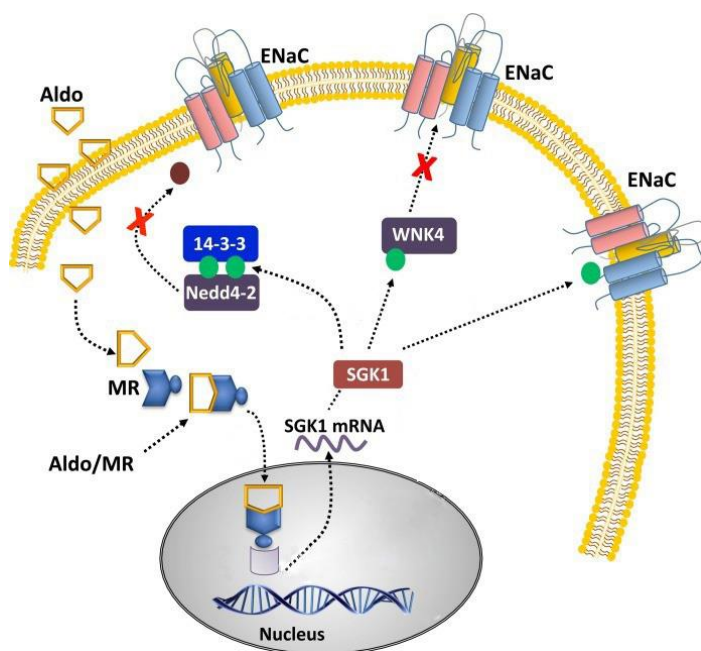
Die ENaC-Regulation in der Plasmamembran unterliegt einem sich stetig anpassenden Gleichgewicht aus Einbau und umgekehrter Internalisation, wodurch sich die Gesamtzahl luminaler Kanäle ergibt; in dieses Gleichgewicht greifen Regulationmechanismen für ENaC ein, indem sie entweder die Wiederaufnahme oder die Synthese fördern oder verhindern. ENaC wird in der Niere unter Einfluss des Mineralkortikoids Aldosteron in der Zellmembran der Hauptzellen im Sammelrohr und Verbindungstubulus exprimiert. Aldosteron ist ein in der Zona

glomerulosa der Nebennierenrinde gebildetes Mineralkortikoid, das auf Stimulus von Angiotensin II bei dessen Bindung an den AT1-Rezeptor freigesetzt wird. Auf diese Weise unterliegt die Regulation von ENaC dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Eine erhöhte Natriumkonzentration im distalen Tubulus wirkt folglich als Stimulus auf Aldosteronfreisetzung und die Zahl der ENaC-Kanäle in der Plasmamembran steigt an. Andere Faktoren, die zu einer vermehrten Ausschüttung von Aldosteron führen können, sind das adrenocortikotrope Hormon (ACTH), das die Sekretion von Aldosteron fördert, oder das Vorliegen einer Hyperkaliämie, bei der durch Depolarisation spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet und so Calmodulin sowie die Calmodulin-abhängige Proteinkinase aktiviert werden (Arai et al. 2020). Die Calmodulin-abhängige Proteinkinase aktiviert Transkriptionsfaktoren, die in der Promoterregion des Gens für Aldosteron binden und entsprechend dessen Synthese erhöhen (Arai et al. 2020). Dopamin und ANP hingegen haben einen hemmenden Einfluss auf Ausschüttung von Aldosteron, indem sie die Sekretion hemmen und im Falle von ANP auch die Wirkung von Angiotensin II beeinträchtigen (Arai et al. 2020). Die Wirkung von Aldosteron auf die ENaC-Expression erklärt sich durch seinen Effekt auf die Serin/Threonin-Proteinkinase SGK1, die durch Aldosteron verstärkt exprimiert wird (siehe Abb. 3). SGK1 inaktiviert die Ubiquitinligase Nedd4-2 und hemmt so die Wiederaufnahme und Degradation der Proteine. Die Menge an ENaC in der Plasmamembran steigt auf diese Weise an (Valinsky et al. 2018). Zusätzlich verhindert SGK1 durch Phosphorylierung der Proteinkinase WNK4 auch einen von Nedd4-2 unabhängigen Weg der ENaC-Endozytose (Yu et al. 2013) mit ähnlichem Effekt. Es wird des Weiteren davon ausgegangen, dass SGK1 alpha-ENaC auch direkt phosphorylieren kann, wodurch die Funktionalität des Kanals gesteigert wird (Valinsky et al. 2018). Phosphorylierungen bei beta- und gamma-ENaC-Untereinheiten im Bereich des C-Terminus durch die zu den MAP-Kinasen gehörende extracellular-signal regulated kinase 2 (ERK2) hingegen führen zu einer erleichterten Ubiquitinierung durch Nedd4-2 und damit zu einer geringeren luminalen ENaC-Expression (Bhalla, Hallows 2008). Neben Aldosteron spielen auch die Peptidhormone Insulin und Vasopressin eine Rolle bei der ENaC-Regulation. Insulin bewirkt eine Phosphorylierung der SGK1, welche nun Nedd4-2 vermehrt hemmt (Tiwari, et al. 2007). Das im Hypothalamus gebildete und in der Neurohypophyse freigesetzte Vasopressin bewirkt im Sammelrohr und im Verbindungstubulus an den V2-Rezeptoren eine vermehrte Expression von Aquaporin 2 sowie eine Stimulation der Adenylatzyklase. Die Adenylatzyklase aktiviert durch die vermehrte Bildung von cAMP die Proteinkinase A, die Nedd4-2 durch Phosphorylierung inaktiviert und so einen SGK1-ähnlichen Effekt erzielt (Rotin, Staub, 2012). Die Ausschüttung von Vasopressin erfolgt im

Hinterphysenhinterlappen auf Stimulus von Angiotensin II durch Bindung an AT1-Rezeptoren und ist dadurch ebenfalls in die Regulation des RAAS eingebunden; ANP und Cortisol hingegen inhibieren die Vasopressinfreisetzung.

1.2.2 Proteolytische Modifikationen ENaCs

ENaC ist im Grundzustand aktiv, beinhaltet aber einen in den Kanal eingebetteten inhibitorischen Trakt („inhibitory tract“), der durch proteolytische Spaltung freigesetzt werden kann, wodurch die Aktivität des Kanals gesteigert wird (Kashlan et al. 2012). Diese, inhibierende Eigenschaften aufweisenden Peptide finden sich, extrazellulär gelegen, innerhalb der alpha- und der gamma-Untereinheiten und sind durch verschiedene Proteasen spaltbar, so beispielsweise für die im trans-Golgi-Netzwerk lokalisierte Serinprotease Furin (Haerteis et al. 2012). Die alpha-Untereinheit besitzt zwei Schnittstellen, die gamma-Untereinheit eine, die beta-ENaC-Untereinheit keine bekannte Furinschnittstelle. Inzwischen wurden einige weitere Proteasen gefunden, deren Fähigkeit, die Untereinheiten ENaCs proteolytisch zu verändern, eine stärkere Aktivität des Kanals bewirken kann. Unter normalen Umständen finden sich bereits prozessierte und noch nicht prozessierte ENaC-Kanäle in der Plasmamembran (Hughey et al. 2004). Durch extrazellulär auftretende Proteasen können daraufhin weitere Kanäle aktiviert werden; diese derartig prozessierten Untereinheiten bilden die ausgereifte Form des Kanals. Zu den Proteasen, die alpha- und/oder gamma-ENaC spalten können, gehören Prostatin, Trypsin, Chymotrypsin und die neutrophile Elastase (Svenningsen et al. 2009), sowie Plasmin (Passero et al. 2008), Cathepsin S (Haerteis et al. 2012) und Cathepsin B (Alli et al. 2012). Die Vermutung liegt nahe, dass im Zusammenhang mit dem bei FSGS geschädigten glomerulären Filter vermehrt in den Primärharn gelangte Proteasen das Tubulussystem durchlaufen, bis sie im letzten Abschnitt des Tubulussystems die ENaC-Aktivität stimulieren (Svenningsen et al. 2009). Ob die Proteasen initial durch den geschädigten glomerulären Filter oder im Zusammenhang mit der FSGS-bedingten Entzündungsreaktion auftreten, ist dabei nicht abschließend geklärt; der Mechanismus und die Bedeutung einzelner Proteasen für die ENaC-Aktivierung im nephrotischen Syndrom sind noch unklar. Neben vielen Untersuchungen, die Serinproteasen im Allgemeinen und Plasmin im Speziellen als hauptverantwortlich für diese ENaC-Aktivierung ausmachen (Bohnert et al. 2019), sind aber mit Cathepsin S und Cathepsin B auch andere Proteasen mit der Eigenschaft, ENaC zu aktivieren, unter pathophysiologischen Bedingungen möglicherweise von Bedeutung.



Original:
<https://portlandpress.com/clinsci/article/132/2/173/72078/Aldosterone-SGK1-and-ion-channels-in-the-kidney>

Abb. 3: Regulationsmechanismus von SGK1 für ENaC. Modifiziert aus Valinsky et al. 2018 (Open Access-Artikel, CC BY 4.0 Lizenz <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Neben Nedd4-2 stellen auch WNK4 und alpha-ENaC eine Möglichkeit für SGK1 dar, ENaC in der Plasmamembran zu regulieren. Die Wirkung von SGK1 unterliegt der Kontrolle von Aldosteron (Aldo) und dessen Bindung an den Mineralkortikoidrezeptor (MR).

1.3 Cathepsin B

Cathepsin B ist eine lysosomale Cysteinprotease. Ihr werden unter anderem im Rahmen maligner Tumorerkrankungen prognostische Eigenschaften nachgesagt, aber auch im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit, Pankreatitis oder kardiovaskulären Erkrankungen wird die Rolle Cathepsin Bs bei der jeweiligen Pathogenese diskutiert.

1.3.1 Die Proteaseeigenschaften Cathepsin Bs

Cathepsine sind in Lysosomen gespeicherte, an Verdauvorgängen beteiligte Proteasen, die verschiedenen Klassen zugeordnet werden können, sodass es unter ihnen Serinproteasen wie Cathepsin G, Aspartatproteasen wie Cathepsin D oder Cysteinproteasen wie Cathepsin L gibt. Bei Cathepsin B handelt es sich um eine papainartige Cysteinprotease, die, gleich den Cathepsinen C, F, H, L, O und X praktisch allgegenwärtig in menschlichen Zellen exprimiert wird (Vidak et al. 2019). Das grundlegende Charakteristikum der Cysteinproteasen ist das aktive Zentrum mit einer katalytische Diade, bei der Histidin Cystein basenkatalytisch aktiviert; der Histidinrest wird bei den papainartigen Cysteinproteasen durch eine Aspartatseitenkette stabilisiert, weshalb in diesem Fall auch von einer katalytischen Triade gesprochen wird (Verma et al. 2016). Cathepsin B wird von der Zelle als inaktive Prä-Proform mit einer Länge von 339 Aminosäuren synthetisiert (Cavallo-Medved et al. 2011). Das aus 17 Aminosäuren bestehende Signalpeptid wird im rauen endoplasmatischen Retikulum bereits entfernt, sodass

Procathepsin B mit einer Größe von 46 kDa entsteht, welches nach Glykosylierungen über den Mannose-6-phosphat-Weg zum Lysosom transportiert wird (Aggarwal, Sloane 2014). Im Lysosom wird es entweder durch Autokatalyse, durch Dissoziation des inhibitorisch wirkenden Propeptids im sauren Milieu oder durch andere Proteasen aktiviert. Die aktive Form hat eine Größe von 31 kDa (Aggarwal, Sloane 2014). Zu den Proteasen, die nachweislich Cathepsin B aktivieren können, zählen Cathepsin D, Cathepsin G, urokinase-type plasminogen aktivator (uPA), tissue-type plasminogen activator oder Elastase (Aggarwal, Sloane 2014). Cathepsin B besitzt im Gegensatz zu anderen Enzymen der papainartigen Cysteinproteasen sowohl Eigenschaften einer Endo- wie einer Exopeptidase, wobei das Enzym in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung zu einer der beiden Eigenschaften eine Präferenz aufweist. Diese pH-Abhängigkeit erklärt sich durch eine Verschlusschleife („occluding loop“), die das aktive Zentrum der Protease bei saurem pH gegen lange Substrate abschirmt (Cavallo-Medved et al. 2011). Verantwortlich sind zwei Histidinreste, die im sauren Milieu mit dem Substrat interagieren und auf diese Weise die Exopeptidaseeigenschaft in Form einer am C-Terminus ansetzenden Peptidyl-dipeptidase ermöglichen. Bei neutraler werdendem pH-Wert wird die Schleife versetzt und die Endopeptidaseaktivität nicht weiter beeinträchtigt; ein Fehlen der Histidinreste verunmöglicht hingegen die Exopeptidaseseigenschaft vollständig (Naudin et al. 2010). Als Endopeptidase zeigt Cathepsin B eine Spezifität für hydrophobe Aminosäuren in der P2 Position (Sigloch et al. 2016) und Glycin an P3' Position (Ruan et al. 2015).

1.3.2 Intra- und extrazelluläre Bedeutung Cathepsin Bs

Cathepsin B findet sich vorrangig intrazellulär in Endosomen und Lysosomen, wo es am Ab- und Umbau verschiedener Proteine beteiligt ist. Im Rahmen pathologischer Veränderungen, beispielsweise maligner Tumorerkrankungen oder Pankreatitis, tritt es durch Über- oder Fehlexpression allerdings auch vermehrt extrazellulär auf. Innerhalb der Zelle zeigt Cathepsin B die Fähigkeit, entscheidend an der Aufrechterhaltung des Lysosomensystems und der Recyclingfunktionen der Zelle beteiligt zu sein und negativ regulierend auf Autophagie und die lysosomale Biogenese einzuwirken (Qi et al. 2016). Die Sekretion lysosomaler Proteasen bei malignen Tumoren trägt zu der Degradation der extrazellulären Matrix und damit zur Tumordinvasion bei (Weber et al. 2015). Eine Überexpression Cathepsin Bs konnte bei einer Reihe unterschiedlicher Tumore gezeigt werden, unter anderem beim Kolonkarzinom, beim Zervixkarzinom, beim Mammakarzinom oder beim Magenkarzinom (Ruan et al. 2015). Als Proenzym liegt Cathepsin B nach seiner Sekretion durch Tumorzellen komplexgebunden

zunächst an der Zelloberfläche und wird anschließend in aktiver Form in die Tumorumgebung freigesetzt (Ruan et al. 2015). Bei der Degradation der extrazellulären Matrix initiiert Cathepsin B eine proteolytische Kaskade, an der unter anderem Plasmin, uPA und Matrixmetalloproteasen beteiligt sind; auch bei kannibalistischen Zellprozessen, die im Zusammenhang mit malignen Tumoren auftreten, spielt Cathepsin B eine Rolle (Gondi, Rao 2013). Zu den Matrixproteinen, die Cathepsin B beispielsweise im Rahmen von Tumorzellinvasionen degradieren kann, zählen mit Kollagen IV, Aggrecan, Laminin oder Kollagen I grundsätzlich auch Substrate, die Bestandteile des glomerulären Filters sind (Saudenova et al. 2022).

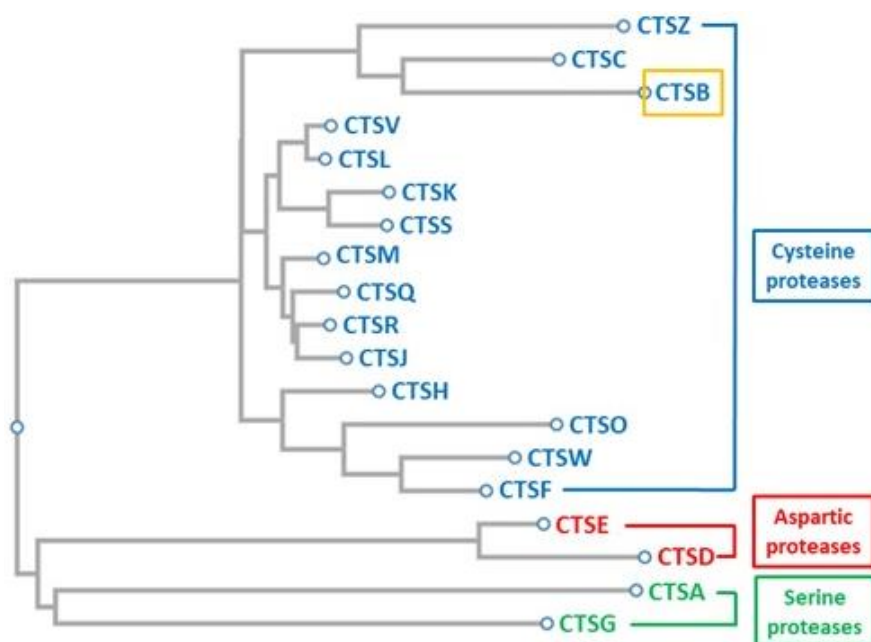


Abb. 4: Stammbaum der verschiedenen Cathepsine. Zur Kategorisierung wurden die Proteinsequenzen via multiplem Sequenzalignment durch ClustalW (NCBI) geordnet und mit dem Fast Tree Programm (NCBI) bearbeitet. Cathepsine können den verschiedenen Klassen der Aspartatproteasen (rot), Serinproteasen (grün) oder Cysteinproteasen (blau) zugeordnet werden. CTSB ist am stärksten mit den Cathepsinen C und Z verwandt. Für die Cathepsine M, Q, R und J wurden murine Sequenzen verwendet, da diese Cathepsine bislang nur in der Maus gefunden wurden; alle anderen Sequenzen waren menschlich. CTS = Cathepsin.

1.3.3 Die Rolle Cathepsin Bs bei inflammatorischen Prozessen

Im Zusammenhang mit Infektionsgeschehnissen konnte Cathepsin B als negativer Regulator der lysosomalen Biogenese in Makrophagen nachgewiesen werden, da die Fähigkeit Cathepsin Bs, den lysosomalen TRPML1 Kanal zu spalten, das Calcineurinlevel senkt und auf diese Weise den Transkriptionsfaktor EB (TFEB), der die Transkription lysosomaler Gene

veranlasst, in seiner Wirkung beeinträchtigt (Qi et al. 2016). Eine besondere Bedeutung erfährt Cathepsin B bei Entzündungsreaktionen im Zusammenhang mit dem NLRP3-Inflammasom: Das Inflammasom ist ein zytoplasmatischer Multiproteinkomplex, dessen Aktivierung in einem Zwei-Stufen-Prozess verläuft und letztlich die Aktivierung der Caspase 1 sowie, darauf aufbauend, der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 β und Interleukin 18 veranlasst. NLRP3 steht dabei für NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-, LRR (leucine-rich repeat)- and pyrin domain-containing protein 3 und ist dementsprechend ein selbst oligomerisierendes Sensorprotein (Kelley et al. 2019). Der erste Schritt hierfür ist das sogenannte Priming; hierbei kommt es, ausgelöst durch einen externen Stimulus, beispielsweise über Toll-like-Rezeptoren, zu einer verstärkten Transkription von NLRP3 und Interleukin 1 β durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Im zweiten Schritt können diverse unterschiedliche Stimuli das Inflammasom aktivieren, so unter anderem extrazelluläres ATP, Ionenströme, RNA-Viren oder auch die Ruptur von Lysosomen (Kelley et al. 2019). An dieser Stelle wurde eine Schlüsselrolle Cathepsin Bs bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell anhand spezifischer Versuche mit dem Inhibitor Ca-074 bewiesen (Saudenova et al. 2022) und gezeigt, dass das Fehlen Cathepsin Bs die Bildung des NLRP3-Inflammasomkomplexes verhindert (Chevriaux et al. 2020). Die Wirkung von Cathepsin B tritt demnach ein, wenn es nach Lysosomenruptur ins Zytosol gelangt (Saudenova et al. 2022). Cathepsin B scheint allerdings auch die Fähigkeit zu besitzen, Procaspase 1 direkt zu aktivieren (Saudenova et al. 2022).

1.3.4 Mögliche Rolle Cathepsin Bs im nephrotischen Syndrom

Trotz der besonderen Bedeutung von Proteasen und deren Zusammenhang mit ENaC im nephrotischen Syndrom konnte bislang keine spezifische Protease als zentrales Element der Pathogenese experimentell abschließend bewiesen werden. Im Tierversuch mit Nphs2^{fllox}/podocyte specific^{Cre}-Mäusen, die ein nephrotisches Syndrom und FSGS entwickeln, wurden aber Hinweise auf eine mögliche Beteiligung Cathepsin Bs gefunden: Zu einem Zeitpunkt, als die Mäuse mit nephrotischen Syndrom Natriumretention aber noch keine Proteinurie zeigten, wurde Cathepsin B vermehrt im Urin nachgewiesen (Larionov et al. 2019). In anderem Zusammenhang glomerulärer Erkrankungen konnte außerdem bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis Cathepsin B klinisch schon früher im Urin signifikant erhöht festgestellt werden (Senatorski et al. 1998). Cathepsin B wurde bereits die Fähigkeit zugeschrieben, die Aktivität ENaC durch Spaltung weiter zu steigern (Alli et al. 2012). Des

Weiteren wurde immunhistochemisch bei diesen Tieren in den Schaltzellen des Sammelrohrs eine erhöhte Cathepsin B-Expression verglichen mit Kontrolltieren gefunden. Und schließlich war die Behandlung mit dem spezifischen Cathepsin B-Inhibitor CA-074 Me dazu imstande, die $Nphs2^{lox}/podocyte\ specific^{Cre}$ -Mäuse vor erhöhtem Blutdruck zu schützen (Larionov et al. 2019).

1.4 Tiermodelle des nephrotischen Syndroms

Um das nephrotische Syndrom *in vivo* darstellen zu können, sind eine Reihe unterschiedlicher Tiermodelle entwickelt worden, die darauf basieren, den glomerulären Filter zu beeinträchtigen. Zum einen besteht hierfür die Möglichkeit, medikamentös die Podozyten zu schädigen, zum anderen bietet es sich an, Tiere mit genetischen Defekten zu verwenden, bei denen zentrale Proteine der glomerulären Barriere defekt sind oder gänzlich fehlen. Bei der medikamentösen, toxischen Variante sind das PAN (Puromycin aminonucleoside nephrosis)-induzierbare-Modell und das Doxorubicin-induzierbare Modell in der Lage, das histologische Krankheitsbild der FSGS auszulösen. Das PAN-induzierbare Modell wird bei Ratten, das Doxorubicinmodell bei adulten Mäusen angewendet; in beiden Fällen werden die Podozyten zur Initialisierung des glomerulären Schadens toxisch geschädigt (Frenk et al. 1955), (Artunc et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit, das nephrotische Syndrom ohne genetische Veränderungen im Tierversuch auszulösen, ist die einmalige Gabe einer niedrigen Konzentration an Lipopolysacchariden, die durch Verlust der Podozytenfortsätze in kurzer Zeit zur Proteinurie führt (Simic et al. 2013). Neben diesen Varianten besteht auch die Möglichkeit, Experimente mit Tieren durchzuführen, die durch genetische Manipulation das nephrotische Syndrom entwickeln. Für diese genetischen Modifikationen kommen unterschiedliche Zielstrukturen in Frage. Neben NPHS1 und NPHS2, den Genen für Nephrin und Podocin, sind auch Tiermodelle mit Veränderungen der Gene für A3 β 1 (Integrin), α ACT4 (Alpha-Actinin 4), CD2AP (CD2 assoziiertes Protein), TRPC6 (Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal 6), PODXL (Podocalyxin), WT1 (Wilm's Tumor Supressor), LAMB2 (Laminin β 2), COL IV (α 3) (Alpha-3 Typ IV Kollagen) und MYO1E (Myosin 1E) etabliert worden (Simic et al. 2013). Tiere mit entsprechenden genetischen Defekten entwickeln im Regelfall Proteinurie und ein nephrotisches Syndrom von Geburt an. Einige Tierexperimente, wie beispielsweise der Knockout des A3 β 1 Gens, hatten zur Folge, dass die Tiere sehr frühzeitig verstarben; bei anderen, wie im Fall homozygoter WT1-Knockoutmäuse, starben die Tiere bereits im Embryonalzustand. Aus allen genetischen Modellen zur Untersuchung des nephrotischen

Syndroms sticht das Tamoxifen-induzierbare Modell mit $Nphs2^{flox}/podocyte\ specific^{Cre}$ -Mäusen heraus, da es das bislang einzige Mausmodell mit genetisch veränderten Tieren ist, bei denen der FSGS verursachende Knockout im adulten Zustand ausgelöst werden kann. Der Vorteil dieses Modells liegt darin, dass der zeitliche Verlauf der Erkrankung detailliert analysiert werden kann, ohne dabei auf stark nephrotoxische Medikamente zurückgreifen zu müssen und stattdessen, ähnlich zum natürlichen Krankheitsbild, genetische Faktoren, die zur glomerulären Erkrankung führen, simulieren zu können.

1.4.1 Das Tamoxifen-induzierbare Mausmodell des nephrotischen Syndroms

In dem Tamoxifen-induzierbaren Mausmodell mit $Nphs2^{flox}/podocyte\ specific^{Cre}$ -Mäusen (Mollet et al. 2009) wird auf das Cre/loxP-System zurückgegriffen. Cre (cyclization recombination) ist eine aus dem Bakteriophagen P1 stammende Rekombinase, die kurze DNA-Abschnitte aus dem DNA-Strang herausschneiden kann, sofern sie von loxP (locus of X-over P1) flankiert sind. Bei LoxP handelt es sich um kurze DNA-Sequenzen, die sich als Erkennungsmuster für die Rekombinase Cre vor und hinter dem zu entfernenden Gen befinden müssen. Um auf diese Weise genetisch veränderte Mäuse erhalten zu können, werden Mäuse, bei denen Cre und ein zugehöriger, gewebespezifischer Promotor als Transgen ins Genom eingebracht worden sind, mit Mäusen, bei denen das gewünschte Gen mit dem loxP-Erkennungsmuster versehen worden ist, verpaart, sodass ein Teil der Nachkommen sowohl die Rekombinase Cre als auch das als gefloxed (von loxP flankiert) bezeichnete Gen in sich trägt. Im Fall des Tamoxifen-induzierbaren Mausmodells ist Cre an eine mutierte Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors gekoppelt, der nun zwar nicht mehr durch endogene, aber durch synthetische Liganden aktiviert werden kann. Körpereigenes Estrogen vermag, im Gegensatz zu dem synthetischen Estrogenantagonisten Tamoxifen, den Effekt daher nicht auszulösen. Wird der Maus Tamoxifen verabreicht, bindet die, nach Umwandlung in der Leber während des First-Pass-Effekts, aktive Form des Wirkstoffs an den mit Cre-gekoppelten Estrogenrezeptor, der daraufhin in den Zellkern gelangt, sodass die Cre-Rekombinase das von loxP flankierte Gen aus der DNA herausschneiden kann. Durch promotorbedingte, spezifische Expression der Cre-Rekombinase ausschließlich innerhalb des Podozyten bleibt auch der Knockout auf die Podozyten beschränkt. Mäuse mit erfolgreichem Knockout entwickeln ab der verringerten Podocinexpression innerhalb von etwa 10 Tagen Albuminurie und innerhalb von spätestens vier Wochen das Krankheitsbild der FSGS (Mollet et al. 2009). Im neuartigen Mausmodell wurde der Tierversuch um den Faktor Cathepsin B

erweitert, indem durch das Cre/loxP-System spezifisch nicht nur Podocin, sondern auch Cathepsin B in den Podozyten ausgeschaltet wurde. Zusätzlich wurden die $Nphs2^{flox}/podocyte\ specific^{Cre}$ -Mäuse mit Mäusen, bei denen Cathepsin B vollständig ausgeknockt worden ist, verpaart, um auch den Einfluss eines vollständigen Fehlens Cathepsin Bs in diesem Modell untersuchen zu können.

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Effekte der Cysteinprotease Cathepsin B bei der Entstehung des nephrotischen Syndroms sowohl mit Hinblick auf die Glomeruli als auch auf den epithelialen Natriumkanal ENaC zu ergründen. Um untersuchen zu können, inwieweit Cathepsin B sich auf die Expressionsrate ENaCs auswirkt, wurde geplant, Experimente mit einer murinen Sammelrohrzelllinie durchzuführen, bei der die Zellen ENaC intrinsisch exprimieren. Weitergehende, elektrophysiologische Untersuchungen, mit denen der Einfluss Cathepsin Bs auf die Kanalaktivität, veranschaulicht durch den transzellulären Stromfluss, bestimmt werden kann, sollten hingegen mit Oozyten des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durchgeführt werden. Um eine potenzielle Schnittstelle für Cathepsin B im Bereich von α -ENaC im Verlauf dieser Untersuchungen ausfindig machen zu können, wurde geplant, die Sequenz von α -ENaC mittels zielgerichteter Mutagenese an drei Stellen zu verändern und zu überprüfen, ob diese Mutationen den Einfluss Cathepsin Bs auf ENaC beeinflussen könnten. Neben diesen Zellkulturexperimenten wurde ein neuartiges Mausmodell, bei dem zusätzlich zu Podocin auch Cathepsin B gezielt im Podozyten ausgeschaltet wird, etabliert, um die klassischen, diagnostischen Parameter des nephrotischen Syndroms während der Entwicklung der Krankheit sowohl mit gesunden Tieren als auch mit Tieren, bei denen ausschließlich Podocin ausgeschaltet wird, zu vergleichen. Da der Podocinknockout bekanntermaßen FSGS verursacht, kann die Bedeutung Cathepsin Bs bei der Progression der Erkrankung im Glomerulus so gezielt und im zeitlichen Verlauf veranschaulicht werden. Die Bestimmung der renalen Funktionsparameter sollte durch regelmäßige Spontanurinproben der Mäuse, Blutdruckmessungen sowie der Entnahme der Nieren zwecks morphologischer Untersuchungen am Ende des Experiments erfolgen. Auf diese Weise sollte eine mögliche Rolle Cathepsin Bs bei der Progression der FSGS und des nephrotischen Syndroms geklärt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Mäuse, die gar kein Cathepsin B bilden können, sich phänotypisch in Bezug auf die renale Morphologie und im Speziellen im Bereich des Sammelrohrs von Wildtypmäusen unterscheiden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Tag	Addgenenummer
pcDNA3.1/h-alpha-ENaC	Ampicillin	Flag	83430
pcDNA3.1/h-beta-ENaC	Ampicillin	V5	83429
pcDNA3.1/h-gamma-ENaC	Ampicillin	Myc	83428
pcDNA3.1/h-Cathepsin B	Ampicillin	C9	11249

Tab. 2: Liste verwendeter Plasmide. Alle kommerziell erworbenen Plasmide wurden über Addgene (Watertown, USA) erworben.

2.1.2 Bakterienstämme

Bei den zum Klonieren verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um Escheria coli Bakterien mit der Bezeichnung E. coli XL1 blue supercompetent (Stratagene, La Jolla, USA).

2.1.3 Zelllinien

Bei den verwendeten mpkCCD14-Zellen handelt es sich um eine Kultur kortikaler Sammelrohrzellen. Die Zellen entsprechen der Sicherheitsstufe 1, wurden 1999 aus einer transgenen, mit SV40 veränderten Maus isoliert und sind ein gut etabliertes Zellmodell (Bens et al. 1999).

2.1.4 Mauslinien

Das Modell mit Nphs2^{flox}/podocyte specific^{Cre} Mäusen wurden von G. Mollet (Mollet et al. 2009) zuerst beschrieben. Es handelt sich um Mäuse, bei denen in adultem Zustand FSGS Tamoxifen-induzierbar ausgelöst werden kann. Die Mäuse werden im Folgenden mit Nphs2^{Δpod} abgekürzt. Bei den Cathepsin B^{flox}/ Nphs2^{flox}/podocyte specific^{Cre} Mäusen handelt es sich um ein neu generiertes Mausmodell, bei dem die Nphs2^{flox}/podocyte specific^{Cre} Mäuse mit Cathepsin B^{flox} Mäusen verpaart wurden, sodass man bei diesen Mäusen die Gene für Cathepsin B und Podocin durch Tamoxifengabe ausschließlich in den Podozyten ausschalten kann. Diese Mäuse werden im Folgenden auch als Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod} bezeichnet. Des Weiteren wurden konventionelle Cathepsin B-Knockoutmäuse mit Nphs2^{flox}/podocyte specific^{Cre} Mäusen verpaart, sodass die geborenen Mäuse im ganzen Organismus kein Cathepsin B mehr bilden

können, aber FSGS durch Tamoxifen induziert werden kann. Diese, im Folgenden auch als Cathepsin B^{-/-}-Mäuse bezeichneten Tiere, stammten, ebenso wie die Cathepsin B^{flox}-Mäuse aus der Arbeitsgruppe von Thomas Reinheckel vom Institut für molekulare Medizin und Zellforschung der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Stefan-Meier-Straße 17.

2.1.5 Antikörperliste

Primäre Antikörper:

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	
		Western Blot	Immun-histo-chemie
Rabbit Anti-Rat ENaC Alpha polyclonal	StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Kanada	1:1000	
Rabbit Anti-Rat ENaC Beta polyclonal	StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Kanada	1:500	
Rabbit Anti-Mouse-Gamma-ENaC	Pineda Antikörper Service, Berlin, selbst hergestellt	1:500	1:100
Rabbit Anti-Podocin Polyclonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1:4000	1:200
Goat-Anti-Mouse Cathepsin B, polyclonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:500	1:200
Mouse Anti-Na/K ATPase α -1, clone C464.6	Merck Millipore, Burlington, USA	1:10000	
Rat Anti LAMP2 (M3/84): sc-19991	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA		1:100
Rabbit Anti-LAMP1, polyclonal	Abcam®, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:1000	1:200
Rat Anti-LAMP1, ID4B-c	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA		1:40
Mouse Anti- β -Aktin (C4): sc47778	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA	1:10000	
Guinea pig Anti-Nephrin polyclonal	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg		1:50
Rat Anti-ZO-1, R26.4C-c	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA		1:200

Sekundäre Antikörper:

Star Red Donkey Anti-Goat	Abberior GmbH, Göttingen		1:200
Star Red Donkey Anti-Rat	Abberior GmbH, Göttingen		1:200
Star Red Donkey Anti-Rabbit	Abberior GmbH, Göttingen		1:200

Star Orange Donkey Anti-Goat	Abberior GmbH, Göttingen		1:200
Star 580 Donkey Anti-Rabbit	Abberior GmbH, Göttingen		1:200
Donkey Anti-Rabbit HRP-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg	1:5000	
Donkey Anti-Goat HRP-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg	1:5000	
Donkey Anti-Mouse HRP-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg	1:5000	
Donkey Anti-Goat Cy3-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg		1:250
Donkey Anti-Rat Cy2-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg		1:50
Donkey Anti-guinea pig Cy2-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg		1:50

Tab. 3: Liste verwendeter Antikörper.

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Zellkulturmedien und Lösungen

mpkCCD-Medium:

250 ml Ham's F-12 Medium GIBCO: 21765-029

250 ml DMEM with phenol red GIBCO: 11880-028

5 µg/ml Insulin

50 nM Dexamethason

160 nM Selenium

5 µg/ml Transferrin

10 nM Triiodthyronin

10 ng/ml EGF

20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure)

20 mM Glutamin

25 ml Fetales Kälberserum (FCS)

100 Units/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Das mpkCCD-Hungermedium enthält im Gegensatz zum normalen Medium kein Insulin, kein Dexamethason und kein fetales Kälberserum. Für antibiotikumfreies mpkCCD-Medium wurden Penicillin und Streptomycin ausgelassen.

1 x PBS:

137 mM Natriumchlorid

1,76 mM Kaliumdihydrogenphosphat

1,14 mM Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat

5,36 mM Kaliumchlorid

pH 7,4

Trypsin/ETDA-Lösung:

ROTI®Cell DPBS/EDTA, 1:10 mit 1 x PBS verdünnt

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zellen wurden in Lösung mit Hilfe der Neubauer improved Zählkammer (Hecht Assistent, Sondheim vor der Rhön) gezählt. Tote Zellen wurden dabei nach dem Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung vom Untergrund mit Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gefärbt.

2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte möglichst zügig durch Erwärmen der Kryogefäße im Wasserbad. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in vorgewärmtes Medium überführt, bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet im Medium mit erhöhter FCS-Konzentration von 20 % (v/v) resuspendiert.

Um Zellen zu kryokonservieren, wurden die ausgesäten Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA für 3-5 Minuten vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Um das Trypsin zu neutralisieren, wurde das jeweilige FCS-haltige Zellkulturmedium in der doppelten Menge des verwendeten Trypsins/EDTA hinzugefügt und die Zellen bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in circa 1 Millionen Zellen/ml in Bambanker™ Einfriermedium (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) gelöst, in 1,6 ml CryoPure Gefäße (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) pipettiert und anschließend langsam schrittweise auf bis zu -140 °C gekühlt.

2.2.4 Transfektionen von Zellen

Transfektionen eukaryotischer Zellen wurden mit TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden so

ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 50 bis 70 % konfluent waren. Für eine einzelne Transfektion wurden Zellen wahlweise auf kleine Flaschen oder auf 6-Well-Platten ausgesät, die DNA-Menge betrug je Ansatz 3-5 µg Plasmid-DNA. Spätestens 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

2.2.5 CRISPR/Cas9-Knockout von Cathepsin B in mpkCCD14-Zellen

sgRNA 1: Name: Ctsb+63135614

Sequenz: cuuuugccuagggguugcguu

sgRNA 2: Name: Ctsb+63135619

Sequenz: gccuagggguugcguucggug

sgRNA 3: Name: Ctsb-63135609

Sequenz: uccucaccgaacgcaaccu

Um das CTSB-Gen in mpkCCD14-Zellen auszuschalten, wurden single guide RNAs verwendet; die verwendeten Reagenzien für den sgRNA-Ansatz stammten aus dem Synthetic sgRNAKit (Synthego Corporation, Menlo Park, USA). Die Elektroporation wurde mit dem Neon® Transfection System (invitrogen, Waltham, USA) durchgeführt, sodass die Protokolle der Hersteller aufeinander abgestimmt werden mussten. Für einen CRISPR-Ansatz wurden insgesamt 60 pMol sgRNA verwendet, von jeder der drei unterschiedlichen sgRNAs jeweils 20 pMol. Die sgRNAs wurden dafür in Neon® Transfection Buffer R gelöst und das Enzym Cas9 hinzugegeben, wobei das Verhältnis von Cas9 zu der Gesamtmenge der sgRNA 1:9 betrug. Der Ansatz wurde in der Pipette gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen, die für den Versuch verwendet werden sollten, waren am Versuchstag zu 75 % konfluent. Sie wurden mit 1 x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, gezählt, 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und als Pellet noch einmal mit 1 x PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet derart in Buffer R (Neon® Transfection) gelöst, dass die Konzentration 90000 Zellen pro µl betrug. Für einen einfachen Ansatz wurden 150000 Zellen verwendet; aus Gründen der Durchführbarkeit wurde ein 1,5 x Ansatz vorbereitet. Der CRISPR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteile	1 x Ansatz	1,5 x Ansatz
Buffer R (Neon® Transfection)	7 µl	10,5 µl
sgRNA 1 (60 pMol/µl)	0,33 µl = 20 pMol	0,5 µl = 30 pMol
sgRNA 2 (60 pMol/µl)	0,33 µl = 20 pMol	0,5 µl = 30 pMol
sgRNA 3 (60 pMol/µl)	0,33 µl = 20 pMol	0,5 µl = 30 pMol
Cas9 (20 pMol/µl)	0,33 µl = 6,66 pMol	0,5 µl = 10 pMol
mpkCCD14-Zellen, gelöst in Buffer R (Neon® Transfection)	1,66 µl (150000 Zellen)	2,5 µl (225000 Zellen)

Tab. 4: CRISPR/Cas9-Ansätze.

Die Zellen wurden in oben beschriebener Menge zu dem sgRNA-Cas9-Ansatz pipettiert und mit der Pipette gemischt. Aus diesem 1,5 x Ansatz wurden 10 µl mit einem Neon™ Tip Aufsatz auf der Neon® Pipette aufgezogen und in das mit 3 ml Buffer E gefüllte Neon® Tube in der Neon® Pipette Station gesteckt. Die Elektroporation wurde bei 1150 V für 30 ms bei 2 Pulsen durchgeführt, wie es zuvor für die mpkCCD14-Zellen ausgetestet worden war. Die Lösung wurde danach in vorgewärmtes mpkCCD-Medium ohne Antibiotikum in einer 24-Well-Platte pipettiert, durch Rütteln der Platte gemischt und in den Inkubator gestellt. 24 Stunden später wurde das Medium gewechselt, erneut wurde Medium ohne Antibiotikum verwendet.

2.2.6 Grenzverdünnungsklonieren der CRISPR/Cas9 behandelten Zellen

Drei Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung von ihrem Untergrund gelöst und ausgezählt. Für das Grenzverdünnungsklonieren wurden die Zellen schrittweise mit normalem mpkCCD-Medium verdünnt, bis eine Konzentration von 2000 Zellen in 20 ml (1 Zelle/100 µl) erreicht war. Aus diesem Ansatz wurden nun jeweils 100 µl pro Well einer 96 Well-Platte pipettiert, sodass man nur eine einzelne Zelle pro Well erwarten konnte. Die Zellzahl wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Aus jeder einzelnen Zelle erwuchs eine Kultur, deren erfolgreicher Knockout durch Immunhistochemie und Western Blot überprüft wurde.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden Schwanzspitzen verwendet. Die Schwanzspitzen wurden in je 100 µl Direct PCR® Lysis-Reagent Ear (peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt) Lysispuffer mit 1,5 µl Proteinkinase K (Eurobio Scientific, Paris, Frankreich) gegeben, um anschließend zuerst bei 55 °C für 6 Stunden und danach bei 85 °C für 45 Minuten inkubiert zu werden. Für die PCR wurden 1,2-1,5 µl DNA unter Verwendung der Q5® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs® Inc., Ipswich, USA) verwendet.

2.3.2 Zielgerichtete Mutagenese

Die Herstellung der h- $\alpha^{177A, 182A, 199A}$ ENaC in pcDNA3.1 Mutation aus dem h- α ENaC-Plasmid (Addgen, siehe oben) erfolgte in zwei Schritten durch PCR: Glycin an den Positionen 173 und 182 wurden in einem Schritt zu Alanin mutiert; bei dem daraus resultierenden neuen Plasmid wurde im zweiten Schritt Glycin an Position 199 zu Alanin geändert.

Die Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen mit der Q5® High Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) durchgeführt.

Verwendete Primer zur Herstellung von h- $\alpha^{177A, 182A, 199A}$ ENaC:

5'acagctagcCGCAGCCGTCGCGACTTAAGAGCTACTCTGCCGCACCCCTTGC 3'

5'aacagctagcGGCCACGAGAGTGGTGAAGGAAGC 3'

5'aacaggcgcgccGAGCC CGT AGCGTGGCCTCCAGCTTGCG 3'

5'aacaggcgcgccgcGTGAGGCGGGGGCGGGACCCTCAGGCG 3'

PCR-Programm:

Initialdenaturierung: 98 °C 3 min

Denaturierung: 98 °C 10 s

Annealing: 72 °C 30 s

Elongation: 72 °C 5 min

Finale Elongation: 72 °C 7 min

Denaturierung, Annealing und Elongation erfolgten für 30 Zyklen.

Nach erfolgter PCR wurde die DNA durch Ethanolfällung extrahiert. Hierfür wurde die Probe im Verhältnis 1:10 mit 3 M Natriumacetat (pH 5,4) versetzt und anschließend das 2,5-fache

Volumen Ethanol hinzugefügt. Die Fällung erfolgte darauf bei -20 °C über Nacht. Für die Kontrolle der erfolgreichen Mutagenese wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt und die entsprechenden Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt.

Die Messungen der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren wurden mit dem NanoDrop® ND1000 (peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt) durchgeführt.

Die Konstrukte wurden anschließend über die Firma Eurofins Scientific (Luxemburg) sequenziert und die Sequenzdaten mit Hilfe des Programms ApE (A plasmid editor, Wayne Davis, Utah, USA) ausgewertet.

2.3.3 Agarosegele

1 x TAE-Puffer:

40 mM Tris

1,27 mM (pH 8,0) EDTA

5,7 % (v/v) Essigsäure

Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden in Konzentrationen zwischen 0,7 % (w/v) und 2 % (w/v) Agarose angesetzt, je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente. Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle solange aufgeköcht, bis die Lösung klar war. Nachdem sie auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurde die Lösung mit 6 µl peqGreen DNA/RNA Dye Fluoreszenzfarbstoff (peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt) versetzt und das Gel in der Wide Mini-Sub Cell GT Agarosekammer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) ausgehärtet. Für die Auftrennung wurden die DNA-Proben im Verhältnis 1 zu 6 mit 6 x DNA loading buffer blue (Solis BioDyne, Tartu, Estland) gemischt und bei 120 V in 1 x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Als Marker wurden der 100 bp DNA Ladder und der 1 kb DNA Ladder von Solis Biodyne (Tartu, Estland) verwendet.

2.3.3.1 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die unter UV-Licht sichtbaren DNA-Banden wurden mit einem Skalpell auf dem UV-Tisch unter visueller Kontrolle ausgeschnitten. Um die DNA aus der Agarose zu isolieren, wurde das Wizard® SV Gel PCR Clean up Set Kit (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.4 Restriktionsverdau von DNA

Es wurden die Restriktionsenzyme NheI, AflII, AscI, NcoI und SacI verwendet. Um 200-600 ng DNA zu schneiden, wurden 5 Units des jeweiligen Enzyms in einem Ansatz von 50 µl verwendet. Der Verdau geschah bei 37 °C über Nacht, die Enzyme wurden anschließend vor der Ligation für 20 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Alle verwendeten Enzyme stammten von New England Biolabs® Inc. (Ipswich, USA). NheI diente zur Überprüfung der Mutation α^{177A} ENaC, AflII zur Kontrolle der Mutation α^{182A} ENaC und AscI für Mutation α^{199A} ENaC.

2.3.5 DNA-Ligation

Die Ligation der DNA erfolgte bei 16 °C für 12-14 Stunden (über Nacht). Für einen Ansatz à 20 µl wurden 2 µl 10 x TyDNALigasebuffer, 1 µl TyDNALigase (5 Weiss Units/µl) und 1-5 µl DNA, die je nach Konzentration zwischen 10 und 40 ng entsprachen, mit 12-16 µl nukleasefreiem Wasser, das Volumen auf 20 µl ergänzend, gemischt. Nach der Ligation wurde die Ligase für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

2.3.6 Gentransfer von Plasmiden in Prokaryoten

LB + Amp.-Medium:

17 mM Natriumchlorid
10 % (w/v) Pepton aus Casein
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
100 mg/l Ampicillin
pH 7,0

SOC-Medium:

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

Für die Herstellung von LB + Amp.-Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 10 g/l Agar-Agar (Carl Roth, Karlsruhe) beigelegt.

2.3.6.1 Elektroporation

Um die Plasmide sowie die damit durch zielgerichtete Mutagenese gebildeten Mutationen in kompetente Prokaryoten einzubringen, mit dem Ziel, die Plasmid-DNA zu vervielfältigen, wurde die Elektroporation angewendet. Es wurden hierfür Bakterien des Stammes XL1 blue supercompetent eingesetzt. In einem Ansatz wurden 50 µl auf Eis aufgetauter Bakterien mit 1 µl des bei der Ligation entstandenen Vektors, unter der Bedingung, dass es sich maximal um

100 ng handelte, mit der Pipette gemischt und unter Ausschluss von Luftblasen in die Elektroporationsküvette (peqlab Biotechnologie GmbH, Darmstadt) gefüllt. Die Elektroporation wurde durch den Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) bei 2,5 kV, 25 μ F und 400 Ω durchgeführt, die Bakterien im Anschluss in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium überführt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf LB + Amp.-Agarplatten ausplattiert wurden.

2.3.7 Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA zu isolieren wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: Für kleinere DNA-Mengen wurden Minipreps, für größere Midipreps durchgeführt.

2.3.7.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte, indem in eine kleine Küvette aus PMMA 1 ml der Bakteriensuspension gefüllt und bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen wurde (OD_{600}). Anhand des Absorptionsverhaltens können Rückschlüsse auf die Menge der Bakterien gezogen werden, Werte über 0,6 wurden als günstige Voraussetzung für die Plasmidpräparation angestrebt.

2.3.7.2 Miniprep

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden gewonnen, indem einzelne Bakterienkolonien, die auf LB + Amp.-Agarplatten gewachsen waren, mit einer gelben Pipettenspitze mobilisiert und in 5 ml LB + Amp.-Medium gegeben wurden, um für 12-16 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert zu werden. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und die Plasmid-DNA durch das Monarch™ Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs® Inc., Ipswich, USA.) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.3.7.3 Midiprep

Für den Ansatz wurde eine einzelne Kolonie mit einer gelben Pipettenspitze entnommen und in 5 ml LB + Amp.-Medium für 8 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Aus diesem Startansatz wurden im Anschluss 500 μ l entnommen und in weitere 150 ml LB + Amp.-Medium gegeben, um für weitere 12-15 Stunden bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert zu werden. Die Bakterienkultur wurde nach ausreichendem Wachstum bei 2500 x g für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet für die Midiprep verwendet, die mittels des NucleoBond® Xtra Midi Plus Systems (Macherey-

Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstelleranweisung durchgeführt wurde. Das am Ende resultierende Pellet wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, bevor es in nukleasefreiem, destilliertem Wasser über den Zeitraum von 2 Stunden gelöst wurde.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinisolation durch Membranfraktion

Saccharosepuffer:

250 mM Saccharose

0,13 % (v/v) Triethanolamin

4,5 mg/ml Natriumpyrophosphat

0,184 g/ml Natriumorthovanadat

4,2 mg/ml Natriumfluorid

1 Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) auf 20 ml ddH₂O

Für die Aufarbeitung des Nierengewebes von Mäusen wurde je Maus eine halbe Niere, gefroren in Flüssigstickstoff, gemörsert, in 1 ml Saccharosepuffer aufgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Proben wurden daraufhin 3 x 3 Sekunden mit dem UP200S Ultraschallgerät (Hielscher Ultrasonics; Teltow) sonifiziert und anschließend für 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu isolieren. Das Pellet wurde verworfen und die Überstände für eine Stunde bei 20000 x g zentrifugiert. Die anschließend entstandenen Pellets, die durch die Membranen der Zellkompartimente gebildet wurden, wurden je nach Größe in 100 µl bis 250 µl Saccharosebuffer gelöst und 3 x 3 Sekunden sonifiziert, um die Proteine zu lösen. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss mittels BCA bestimmt.

2.4.2 BCA-Analyse

Die BCA wurde durchgeführt, um Proteinkonzentrationen der Proben aus Membranfraktionen zu bestimmen. Hierfür wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) unter Anweisung des Herstellers verwendet. Als Standard wurde bovines Serumalbumin in Konzentrationen zwischen 0 und 2 mg/ml verwendet. Die Adsorption wurde bei 550 nm durch den Genios Microplatereader (Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt, sodass anhand des Standards, dessen Adsorptionsspektrum sich in besagtem Bereich linear ansteigend zur Proteinkonzentration verhält, die Proteinkonzentrationen der Proben anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes rückgerechnet werden konnte.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1 x SDS-Elektrodenpuffer:

192 mM Glycin

25 mM Tris

3,5 mM SDS

5 x Laemmli-Ladepuffer:

62,5 mM Tris pH 6,8

20 % (v/v) Glycerol

2 % (w/v) SDS

5 % (v/v) Betamercaptoethanol (bei Zymogrammen ausgelassen)

0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Um die isolierten Proteine aus Zellkulturexperimenten nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Hierfür wurden Proteinproben zwischen 20 und 50 µg im Verhältnis 1:5 (v/v) mit 5 x Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, bevor sie in das Gel pipettiert wurden. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Pageruler™ Plus prestained protein ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde mit dem System Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) bei Spannungen zwischen 80 V zu Beginn und bis zu 140 V beim Auftrennen in 1 x SDS-Elektrodenpuffer durchgeführt.

Bestandteile	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %	Trenngel für Zymogramme (10 %)
Gelatinelösung (Roth): 8 mg/ml in ddH ₂ O			200 µl
ddH ₂ O	3,75 ml	4,8 ml	4,7 ml
Rotiphorese® Gel 40 (29:1) Bisacrylamidstammlösung (Carl Roth)	0,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	/	2,5 ml	2,5 ml
Tris 0,5 M pH 6,8	0,65 ml	/	/
SDS 10 % (w/v)	50 µl	100 µl	/
Ammoniumperoxidisulfat 10 % (w/v) in ddH ₂ O	50 µl	100 µl	100 µl
TEMED (Carl Roth)	5 µl	10 µl	10 µl

Tab. 5: Ansätze für SDS-PAGE-Gele.

2.4.4 Western Blot

1 x Western Blot-Transferpuffer:

192 mM Glycin

25 mM Tris

10 % (v/v) Methanol

Der Proteintransfer der zuvor durch Glycin-SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte durch die Nassblotmethode auf NC 45 Nitrocellulosemembranen der Porengröße 0,45 µm (Serva, Heidelberg) mittels der Blotting-Apparaturen Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). Hierfür wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit den Proteinen in Transferpuffer überführt. Die Membran wurde für die Gelgröße zurechtgeschnitten und die Schwämme und Whatman-Filterpapiere (GE Healthcare, Chicago, USA) wurden mit Transferpuffer getränkt. Der Zusammenbau der Western Blot-Kassette gestaltete sich anschließend folgendermaßen:

- ❖ Anode
- ❖ Schwamm
- ❖ Zwei Lagen Whatman-Filterpapier
- ❖ Nitrocellulosemembran
- ❖ Gel
- ❖ Zwei Lagen Whatman-Filterpapier
- ❖ Schwamm
- ❖ Kathode

Die Kassetten wurden in die eisgekühlte Blottingkammer eingebaut und selbige mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer wurde je nach Größe bei 100 V für 1-2 Stunden durchgeführt und die Kammer dabei eisgekühlt. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran nach Beendigung des Blottings mit destilliertem Wasser von Methanolresten gereinigt und anschließend eine Ponceaufärbung durchgeführt.

2.4.5 Ponceaufärbung

Ponceaulösung:

6 % Essigsäure

1 % (w/v) Ponceau S (Carl Roth, Karlsruhe)

Die Färbung der Nitrocellulosemembran erfolgte als Kontrolle des Proteintransfers, indem die Eigenschaft des Azofarbstoffs Ponceau S ausgenutzt wird, reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der geblotteten Proteine zu binden. Nach 2-3-minütigem Schwenken der Membran in der Ponceaulösung wurde die Membran durch mehrfaches Spülen mit destilliertem Wasser entfärbt, bis nur noch die Bandenmuster der aufgetrennten Proteine sichtbar waren. Für weitere Analysen der Membran hatte die Ponceaufärbung keine Konsequenzen und konnte durch weiteres Spülen mit destilliertem Wasser vollständig entfärbt werden.

2.4.6 Western Blot-Detektion

1 x TBS:

7,5 mM Tris

43 mM Tris-HCl

1,5 M Natriumchlorid

pH 7,4

1 x TBST:

0,5 % Tween (v/v) in 1 x TBS

Blockierlösung:

5 % (w/v) Milchpulver (Carl Roth,

Karlsruhe) in 1 x TBS

Nach Kontrolle des Proteintransfers durch die Ponceaufärbung wurden die Nitrocellulosemembranen für mindestens eine Stunde in Blockierlösung geschwenkt, um die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren und unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Im Anschluss wurden die Membranen in dem jeweiligen Antikörper, gelöst in der entsprechenden Konzentration in Blockierlösung, über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für mindestens 10 Minuten mit 1 x TBST gewaschen und daraufhin für 2 Stunden mit dem jeweiligem, sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils mindestens 10 Minuten erfolgte die Detektion mit Immobilon HRP Substrat Reagenz (Merck Millipore, Burlington, USA) Chemilumineszenz und dem Fusion SL Vilber Lourmat (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell). Die Waschschritte dienten jeweils dazu, überschüssige, nicht gebundene Antikörper von den Membranen zu entfernen.

2.4.7 Zymogramme

Entwicklungspuffer:

50 mM Tris
0,3 M Natriumchlorid
5 mM Zinkchlorid
5 mM Calciumchlorid
0,1 % (v/v) Nonidet P-40
In ddH₂O gelöst, pH auf 7,44
gestellt

1 x Comassielösung:

1 g Comassie® Brilliant Blue R250-
Pulver (Serva Heidelberg)
400 ml Methanol
100 ml Essigsäure
500 ml ddH₂O

Waschpuffer:

2,5 % (v/v) Triton X-100 in
ddH₂O

Entfärbelösung:

200 ml Methanol
100 ml Essigsäure
700 ml ddH₂O

Für Zymogramme wurden 10 % Acrylamidgele verwendet, die 0,16 g/ml Gelatine enthielten und ohne SDS gegossen wurden. Die Urinproben waren auf 1 µg Kreatinin normiert, zu Beginn für 2 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, die entsprechenden Volumina mit 5 x Laemmli-Ladepuffer ohne beta-Mercaptoethanol versetzt und mit 1 x PBS auf gleich große Volumina angeglichen. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese bei 120 V eiskühlt aufgetrennt und die Gele anschließend zweimal für je 30 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden sie in Entwicklungspuffer für 60-70 Stunden auf 37 °C gestellt. Proteinbanden sowie die Wirkung der Proteasen wurden mittels Comassiefärbung dargestellt, indem die Gele für 1 Stunde in 1 x Comassielösung gefärbt und für mehrere Stunden in Entfärbelösung entfärbt wurden, bis sich die Banden gut darstellten.

2.5 Mikroskopische Methoden

2.5.1 Paraffineinbettung und Entparaffinierung

300 mosm Caco-Saccharose-Puffer:

100 mM Natriumcacodylat Trihydrat
100 mM Saccharose
0,02 % (v/v) Natriumazid
pH 7,4

Für die Paraffineinbettung wurde das in Fixierlösung befindliche Gewebe am Tag nach der Organentnahme aus der Fixierlösung in 300 mosm Caco-Sacharose-Puffer gegeben. Die Paraffineinbettung geschah in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des UKSH, Arnold-Heller-Straße 3. Mit dem in Paraffinblöcken eingebetteten Nierengewebe konnten anschließend Schnitte der Dicke von 5 µm durchgeführt werden. Für die Entparaffinierung wurden die eingebetteten Gewebeproben zweimal für 10 Minuten mit Xylol, anschließend zweimal für 5 Minuten in 100 % Ethanol, sowie, darauffolgend, zweimal für 5 Minuten mit 70 % (v/v) Ethanol entparaffiniert und schließlich durch gründliches Spülen mit destilliertem Wasser gereinigt.

2.5.2 Masson-Trichrom-Färbung

Saure Hämaluenlösung nach Mayer:

1 g Hämatoxylin
0,2 g Natriumjodat
50 g Kaliumaluminiumsulfat
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure
in 1000 ml ddH₂O

Celestinblaulösung:

25 g Ammoniumeisen-II-Sulfat
Hexahydrat
2,5 g Celestinblau B
In 500 ml ddH₂O aufgekocht und
anschließend mit 70 ml Glycerin versetzt

Säurefuchsinlösung:

1g Säurefuchsin
1 ml Eisessig
200 ml ddH₂O

Methylblaulösung:

4 g Methylblau in 200 ml ddH₂O
gelöst und mit 5 ml Eisessig gemischt

Für die Masson-Trichrom-Färbung wurden entparaffinierte Gewebsschnitte zunächst 5 Minuten in Celestinblaulösung und, nach anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser, für 5 Minuten in saurer Hämaluenlösung nach Mayer gefärbt. Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült, bis keine Farbwolken mehr zu erkennen waren und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach erneuter Reinigung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 5 Minuten in Säurefuchsinlösung gefärbt, mit destilliertem Wasser gereinigt und mit 1 % (v/v) Essigsäure gespült. Schließlich wurden die Schnitte für je 8 Minuten in gebrauchsfertiger 1 % Phosphormolybdänsäurelösung und danach in Methylblaulösung gefärbt, zweimal mit destilliertem Wasser gespült und 2 Minuten in 1 % (v/v) Essigsäure gelegt. Anschließend wurden die Schnitte durch je dreimalige Inkubation à 3 Minuten in 100 % Ethanol und anschließend Xylol entwässert.

2.5.3 PAS-Färbung

Sulfitwasser:

30 ml 10 % (w/v) Natriumsulfitlösung

25 ml 1 M Salzsäure

500 ml ddH₂O

Für die PAS-Färbung wurden entparaffinierte Schnitte für 5-10 Minuten in 0,5 % (w/v) Perjodsäure inkubiert, etwa 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, zweimal für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gereinigt und 15-50 Minuten mit Schiff's Reagenz im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je 2 Minuten mit Sulfitwasser und danach für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült und mit destilliertem Wasser gereinigt, bevor sie für 1 Minute in saurer Hämalauenlösung nach Mayer inkubiert und wie bei der Masson-Trichrom-Färbung gereinigt wurden. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit je dreiminütiger Inkubation in 70 % Ethanol, 90 % Ethanol, 96 % Ethanol und 100 % Ethanol, jeweils (v/v), sowie letztlich zweimaliger Inkubation in Xylol für je 5 Minuten wurden die Schnitte zum Schluss entwässert.

2.5.4 Toluidinblaufärbung

Das bei der Perfusion für die Elektronenmikroskopie entnommene Gewebe wurde zunächst in Araldit eingebettet und anschließend ein Semidünnschnitt durchgeführt, der mit Toluidinblau gefärbt wurde. Für diese Färbung wurde der Schnitt auf einem 60 °C warmen Wärmetisch mit 0,1 % Toluidinblau in 1 % (w/v) Di-Natriumtetraborat-Decahydrat-Lösung für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Danach wurde der Schnitt 5 Minuten in 70 % (v/v) Ethanol gegeben und auf einem Wärmetisch trocknen gelassen, bevor er eingedeckt wurde.

2.5.5 Immunhistochemische Färbungen

Für immunhistochemische Analysen des Nierengewebes wurden im Kryostaten (Leica Biosystems, Nussloch) Schnitte der Dicke von 5 µm von zur Kryokonservierung entnommenen Nierenhälften durchgeführt und danach für 20 Minuten auf Raumtemperatur aufgetaut. Sollten Zellen immunhistochemisch analysiert werden, wurden die auf mit Kolagen IV (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) beschichteten Deckgläschen gewachsenen Zellen für 10 Minuten mit 4 % (w/v) Paraformaldehydlösung fixiert, die Deckgläschen entnommen und auf

mit Parafilm beschichtete Objektträger transferiert. Nach zehnminütigem Waschen mit 1 x PBS wurden die Zellen oder die Gewebsschnitte für 10 Minuten mit 0,5 % Triton X-100, gelöst in 1 x PBS, inkubiert, erneut dreimal für jeweils 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen und für eine Stunde mit 5 % (w/v) Milchpulver in 1 x PBS inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper, gelöst in 5 % (w/v) 1 x PBS-Milch, auf die Zellen oder das Gewebe gegeben und anschließend über Nacht binden gelassen. Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal mit 1 x PBS für je 5 Minuten gewaschen, der sekundäre Antikörper auf die Zellen gegeben und nach 2 Stunden erneut dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Proben für 10 Minuten mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) inkubiert und anschließend kurz mit 1 x PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Proben mit 50 % (v/v) Glycerin in 1 x PBS zwischen Objektträger und Deckglas eingedeckt. Wurde die Immunhistochemie für STED-Mikroskopie durchgeführt, wurde anstelle der Milch mit reinem Eselserum geblockt und alle Antikörper in 5 % Eselserum (v/v), gelöst in 1 x PBS, angesetzt.

2.5.6 Mikroskope

Konfokale Mikroskopie oder STED-Mikroskopie wurden mit dem Facility Line STED microscope (Abberior Instruments GmbH, Göttingen) durchgeführt. Für lichtmikroskopische Aufnahmen wurde das Photomikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) verwendet.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

2.6.1 Durchführung der Mausexperimente

Zur Induktion des Knockouts wurde den Mäusen über vier Tage lang jeden Nachmittag 33 µg/g Körpergewicht Tamoxifen (T5648; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) intraperitoneal verabreicht. Das Tamoxifen wurde dafür zuvor in der Konzentration 5 µg/µl in Maisöl (C8267; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst.

2.6.2 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung der Mäuse erfolgte durch Schwanzplethysmographie unter Verwendung des MRBP Blood Pressure Systems (IITC Life Science, Los Angeles, USA). Die Messung wurde je Maus insgesamt dreimal durchgeführt und vor jeder Messung sichergestellt, dass etwaige Störfaktoren vermieden wurden und die Mäuse bestmöglich entspannt waren.

2.6.3 Urinparameterbestimmung

Die Urinproben wurden zunächst bei 600 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Kreatininbestimmung erfolgte mittels der Jaffé-Reaktion unter Verwendung des Creatinin Jaffé Kits (LT-Sys® Eberhard Lehmman GmbH, Berlin). Um die Menge des Proteins im Urin zu ermitteln, wurde das Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Albuminkonzentrationen wurden mittels des Mouse albumin ELISA Kit (Crytal Chem, Elk Grove Village, USA) gemessen.

2.6.4 Perfusion

Fixierlösung für Elektronenmikroskopie:

0,1 mM Natriumcacodylat Trihydrat
600 mM Saccharose
1,5 % (v/v) Paraformaldehyd
1,5 % (v/v) Glutaraldehyd
0,05 % (v/v) Pikrinsäure

Fixierlösung für Kryokonservierung:

100 mM Natriumcacodylat Trihydrat
600 mM Saccharose
pH 7,4

Fixierlösung:

50 mM Natriumcacodylat Trihydrat
50 mM Saccharose
6 % Hydroxyethylstärke (steril)
3 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat
3 % (w/v) Paraformaldehyd
pH 7,35

Vorspüllösung:

100 mM Natriumcacodylat Trihydrat
6 % Hydroxyethylstärke (steril)
pH 7,35

Die Mäuse wurden durch 100 µg/g Körpergewicht intraperitoneale Applikation eines Xylazin/Ketamingemisches (1 ml Rompun® 2 % (Bayer AG, Leverkusen) + 0,75 ml Narketan® 10 (Vétoquinol GmbH, Ismaning) + 0,25 ml Wasser) betäubt. Nachdem eine Niere abgeklemmt, entnommen und für biochemische Analysen in Flüssigstickstoff kryokonserviert worden war, wurde die zweite Niere durch die Aorta abdominalis für 5 Minuten und 30 Sekunden mit Fixierlösung perfundiert. Diese Niere wurde nach Entnahme für das jeweilige Analyseverfahren wie folgt fixiert: Eine halbe Niere wurde für Paraffineinbettung für 24 Stunden in Fixierlösung gegeben und eine Scheibe dieser Hälfte für die Elektronenmikroskopie in der entsprechenden Lösung gelagert. Die andere Nierenhälfte wurde über Nacht in der

Fixierlösung für die Kryokonservierung gelagert, bevor sie am nächsten Tag unter Zuhilfenahme von Isopentan in Flüssigstickstoff eingefroren wurde.

2.7 Statistische Analysen

Statische Auswertungen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Je nach Versuchsaufbau wurde entweder der Mann-Whitney-U-Test bei zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen oder der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc-Test bei mehreren zu vergleichenden Gruppen durchgeführt. Normalverteilungen wurden mit dem D'Agostino-Pearson-Test überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Verifizierung des Knockouts der $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse

In der Zellkultur sind bereits verschiedene Proteasen, insbesondere Serinproteasen wie Plasmin, hinsichtlich ihrer Bedeutung im nephrotischen Syndrom ausgetestet worden, für den tatsächlichen Mechanismus jedoch lassen sich aufgestellte Hypothesen nur im Tierexperiment sinnvoll darstellen. Die zuvor von Larionov et al. 2019 gezeigten Ergebnisse bezüglich der Bedeutung Cathepsin Bs im nephrotischen Syndrom gaben Anlass, herauszufinden, in wieweit Cathepsin B im Zusammenhang mit der Etablierung des nephrotischen Syndroms bei FSGS eine Rolle spielt.

Neben der $Nphs2^{\Delta pod}$ -Maus wurde daher eine neuartige $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Maus gezüchtet, um gezielt Unterschiede bei der Progression der Erkrankung in Bezug auf glomeruläres Cathepsin B ausarbeiten zu können. Diese Mäuse sollten mit den bereits bekannten $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen, die nach dem Verlust des Gens für Podocin erfahrungsgemäß innerhalb von weniger als vier Wochen das Krankheitsbild der FSGS entwickeln, sowie gesunden Tieren als Kontrolle verglichen werden. Für diese Kontrolltiere dienten dabei Cre-negative Mäuse, bei denen der Knockout durch Tamoxifengabe nicht ausgelöst werden konnte. Im Experiment sollten bekannte Parameter des nephrotischen Syndroms in Form von Proteinurie, histopathologischer Veränderungen des Nierengewebes und Veränderung des Blutdrucks verglichen sowie speziell im Urin auftretende Proteasen untersucht werden.

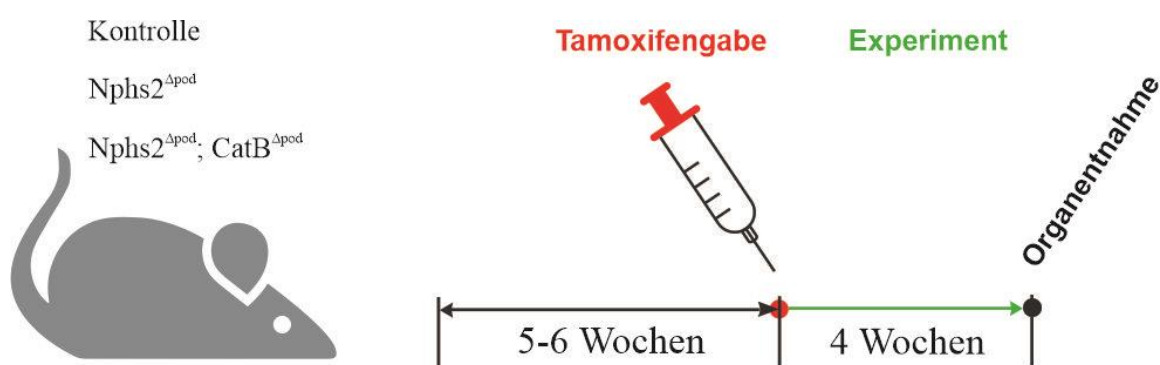


Abb. 5: Schemazeichnung des Mausmodells. Etwa 6 Wochen alten Mäusen wurde zu Beginn des Experiments Tamoxifen verabreicht, um bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen den Knockout auszulösen.

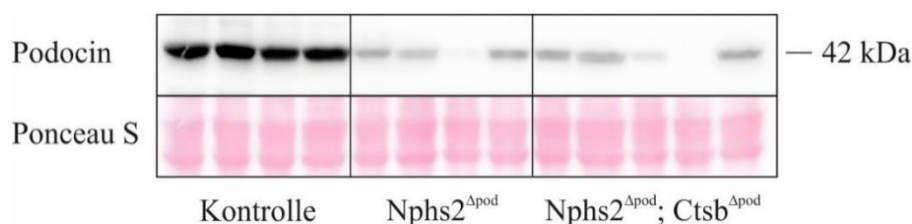


Abb. 6: Verifikation des Knockouts durch Western Blot-Analyse von Podocin. Die Western Blots von Membranfraktionen des Nierengewebes wurden durchgeführt, um den Knockout von Podocin zu bestimmen. Die Ponceaufärbung wurde als Ladungskontrolle verwendet.

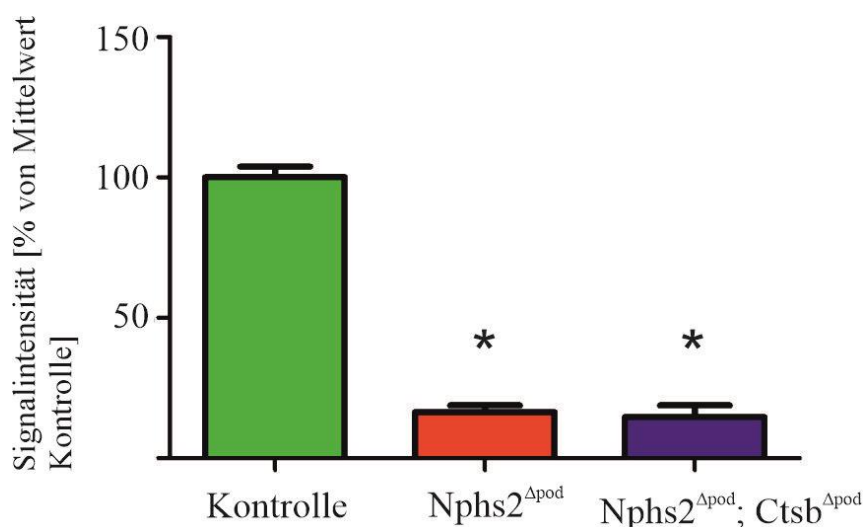


Abb. 7: Auswertung des Knockoutgrads von Podocin bei Nphs2^{Δpod}- und Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Mäusen. Der Knockoutgrad quantifiziert den Verlust des Zielproteins in Bezug auf die Kontrolle. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. n > 7, *P < 0,0005.

Die Zucht der Mäuse wurde durch regelmäßige Genotypisierung überwacht und die Verpaarung entsprechend so gesteuert, dass genetische Hintergrundeffekte ausgeschlossen werden können und die Tiere aller drei Gruppen aus einem Zuchtprogramm stammten. Auch wurden zeitnah erfolgte Würfe verwendet, um alle Tiere möglichst gleich alt ins Experiment starten zu lassen; die Diskrepanz betrug maximal 7 Tage. Bei der Gruppeneinteilung wurde darauf geachtet, Tiere aus gleichen Würfen zu verwenden und auch eine geschlechtsspezifische Einteilung berücksichtigt, sodass Männchen und Weibchen anteilmäßig in den drei Gruppen gleiche

Verhältnisse bildeten. Diese Mischung aus Männchen und Weibchen war möglich, da geschlechtsspezifische Änderungen nicht beobachtet worden waren und derartige, geschlechtsspezifische Effekte folgerichtig im Experiment ausgeschlossen werden können. Das Experiment wurde begonnen, nachdem die Tiere das Alter von 5-6 Wochen erreicht hatten, indem der Knockout durch Tamoxifengabe induziert wurde. Der Blutdruck wurde bei den Tieren zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen, einmal frühzeitig, an Tag 16, nachdem die Mäuse an die Messung gewöhnt worden waren, und ein weiteres Mal an Tag 27 gegen Ende des Experiments. Spontanurin der Mäuse wurde jeden zweiten bis dritten Tag gesammelt. Die Abbruchkriterien des Experiments wurden im Vorfeld klar definiert und täglich überprüft. Zu diesen Abbruchkriterien zählten das allgemeine körperliche Befinden der Mäuse, höherer Gewichtsverlust, Nahrungsverweigerung sowie schwere Aszites mit Apathie in Bezug auf etwaige Ödembildungen im Verlauf des Experiments. Nach vier Wochen, am Ende des Experiments, wurden die Mäuse für 24 Stunden in metabolische Käfige gesetzt, um Urin zu sammeln, bevor sie euthanasiert und die Nieren zur biochemischen und mikroskopischen Untersuchung entnommen wurden. Der Knockoutgrad, der das Ausmaß des erfolgreichen Verlusts des Zielproteins angibt, wurde anhand von Western Blot-Analysen des Nierengewebes hinsichtlich der Expression von Podocin bestimmt. Zwischen $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen unterschied sich der Knockoutgrad nicht wesentlich, war aber mit 80-90 % sehr hoch. Der Knockoutgrad des glomerulären Cathepsin Bs bei den $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen entsprach dabei dem des Podocins, da es sich bei den Gensequenzen um den gleichen Promoter handelte; zusätzlich wurde der Knockout aber auch durch immunhistochemische Färbungen kryokonservierten Nierengewebes verifiziert (siehe Abb. 8).

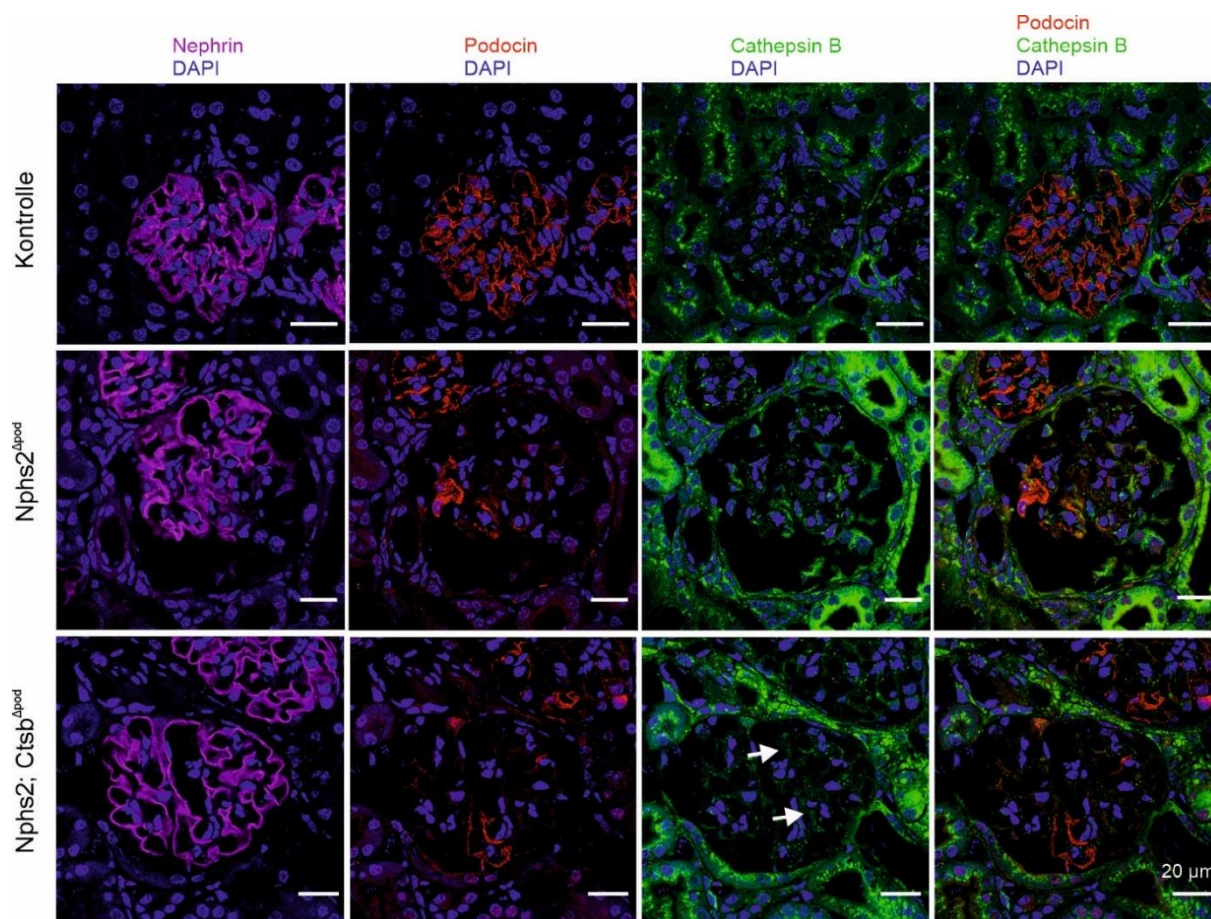


Abb. 8: Immunhistochemie zur Darstellung des Knockouts von Cathepsin B und Podocin. Spezifische Signale von Cathepsin B fehlen bei der $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Gruppe (weiße Pfeile). Der Knockout Podocins ist in beiden Tiergruppen klar ersichtlich, Nephrin ist unverändert und dient der Darstellung der Podozyten. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 μm . Sichtbar sind Cathepsin B (grün), Nephrin (violett), Podocin (rot) und DAPI zur Darstellung der Zellkerne (blau).

3.2 Auswertung des glomerulären und tubulointerstitiellen Schadens

Am Ende des Experiments wurden die Mäuse perfundiert und die Nieren entnommen, um die glomerulären sowie tubulointerstitiellen Schäden zu klassifizieren. Zur histologischen Darstellung der FSGS wurden Paraffinschnitte angefertigt, die mit PAS- oder Masson-Trichrom-Färbung entsprechend gefärbt wurden. Der Schweregrad der Erkrankung wurde anschließend unter dem Mikroskop semiquantitativ anhand des jeweiligen Schädigungsausmaßes beurteilt (siehe Tabelle 6). $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse entwickeln innerhalb von vier Wochen deutlich erkennbare Anzeichen einer FSGS mit allen dazugehörigen, klassischen, histologischen Korrelaten in Form von Adhäsionen zwischen GBM und parietalem

Blatt der Bowman-Kapsel als Resultat des Podozytenverlusts, hyalinen Ablagerungen, Proliferation des Mesangiums sowie sklerotischem Kollabieren des Kapillarknäuels. Für den glomerulären Injury Score wurden einzelne Glomeruli, wie beschrieben von Aldigier et al. 2005, in jeweils vier Quadranten aufgeteilt und anschließend anhand dieser Verteilung das Ausmaß der Schädigung entlang des Kapillarknäuels eingeordnet. Analog dazu wurde eine entsprechende Auswertung mit gemachten Aufnahmen des Tubulointerstitiums durchgeführt und der Schaden klassifiziert (Nangaku et al. 2002), indem angefertigte Aufnahmen in vier Quadranten eingeteilt wurden und in den jeweiligen Segmenten das Auftreten von Fibrosen und Proteineinlagerungen bestimmt wurde (Tabelle 7).

Injury Score	Glomerulärer Schaden
0	Kein Schaden
1	Weniger als 25 % des Glomerulus betroffen
2	25 % bis 50 % des Glomerulus betroffen
3	50 % bis 75 % des Glomerulus betroffen
4	Mehr als 75 % des Glomerulus betroffen

Tab. 6: Injury Score nach Aldigier et al. 2005.

Injury Score	Tubulointerstitieller Schaden
0	Kein Schaden
1	Weniger als 25 % des Gewebes betroffen
2	25 % bis 50 % des Gewebes betroffen
3	50 % bis 75 % des Gewebes betroffen
4	Mehr als 75 % des Gewebes betroffen

Tab. 7: Injury Score nach Nangaku et al. 2002.

Die bekannten, FSGS-typischen Schädigungen der Glomeruli konnten bei den im Experiment ausgewerteten $Nphs2^{\Delta pod}$ -Tieren einmal mehr nachgewiesen werden. Bei der Quantifizierung des Schadens ergaben sich allerdings deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren dieser Gruppe, sodass der Injury Score der Glomeruli bei einigen Tieren noch unter 25 % des Gewebes und nur bei einem Tier über 50 % lag; im Mittel betrug der Wert allerdings über 25 %. Bei den $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen waren hingegen bereits qualitativ deutliche Unterschiede feststellbar: Während auch bei diesen Tieren Adhäsionen und Proliferation des Mesangiums beobachtet werden konnten, waren hyaline Ablagerungen hier nahezu vollständig unauffindbar (siehe Abb. 9). Quantitativ waren ebenfalls deutlich weniger Glomerulienteile

betroffen, die Streuung der Einzelwerte war in dieser Gruppe deutlich geringer und kein Tier erreichte Werte jenseits der 25 %. Histologisch war auf diese Weise die $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Gruppe klar von den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen abzugrenzen, deren pathophysiologische Veränderungen in diesem Experiment mit vorherigen Daten in Einklang zu bringen waren. Der Verlust Cathepsin Bs schützt folglich nach histologischen Maßstäben zum Teil vor pathologischen Veränderungen der Glomeruli.

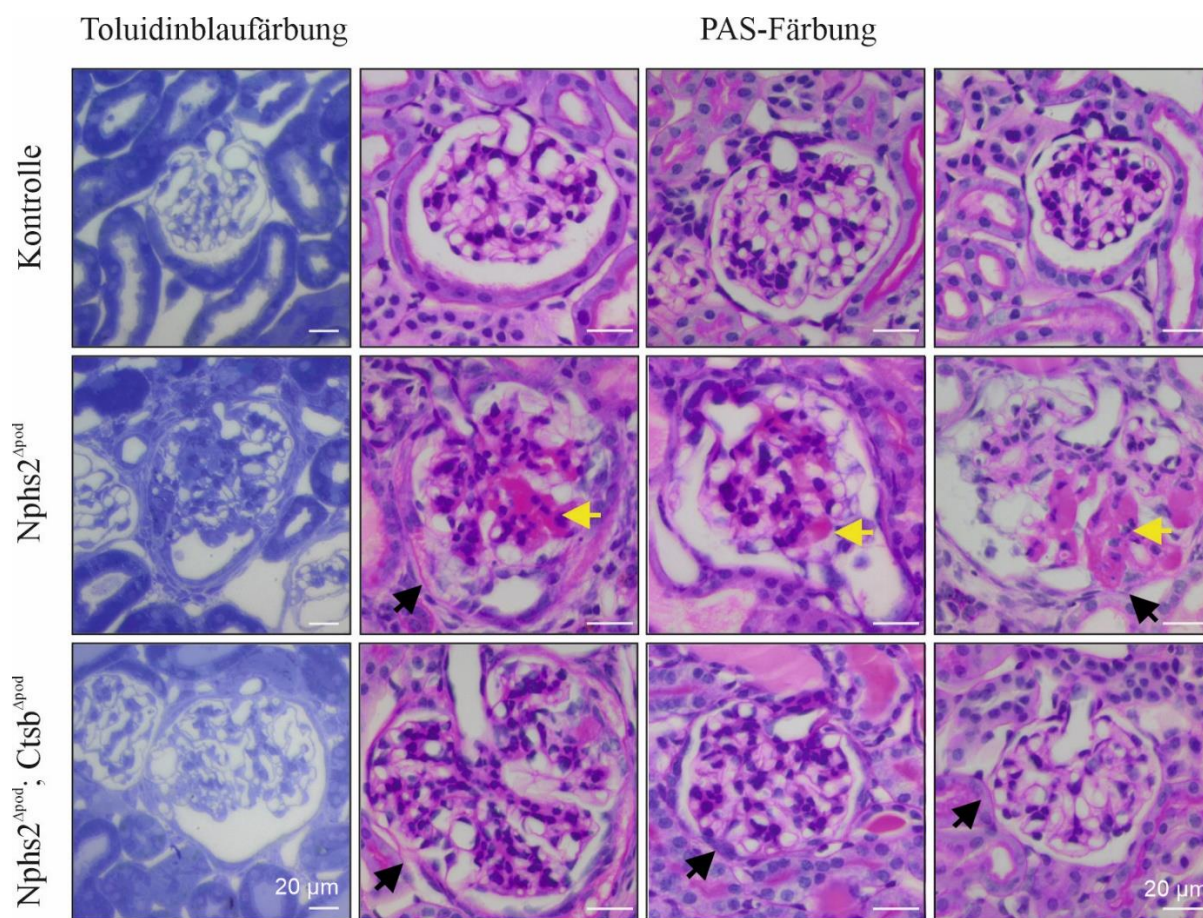


Abb. 9: Toluidinblaufärbung und PAS-Färbung der Glomeruli der Mäuse. Bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen kommt es zu Adhäsionen zwischen parietalem Blatt der Bowman-Kapsel und GBM (schwarze Pfeile) sowie zu einer Proliferation des Mesangiums, allerdings finden sich die ausgeprägten hyalinen Ablagerungen (gelbe Pfeile) nur bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Tieren. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 μm Länge.

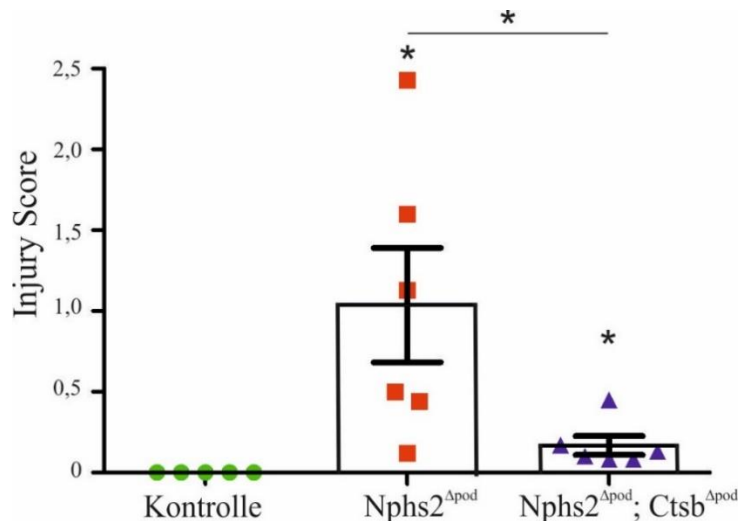


Abb. 10: Auswertung der glomerulären Schädigungen aller drei Gruppen. Die Kontrolltiere haben keine glomerulären Schäden, während die Nphs2^{Δpod}-Mäuse einen Injury Score über 1 und die Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Mäuse einen von unter 0,5 aufweisen. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. *P < 0,05, n ≥ 5.

Neben den Unterschieden der Glomeruli waren beim Betrachten des Tubulointerstitiums die Färbemethoden zur Darstellung der Pathologie ausschlaggebend: Während in der PAS-Färbung die Unterschiede zwischen Nphs2^{Δpod}- und Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Mäusen eher gering ausfielen, waren sie in der Masson-Trichrom-Färbung eindeutiger. Die PAS-Färbung zeigte in beiden Gruppen Ablagerungen von Proteinen im Gewebe als Zeichen der FSGS (siehe Abb. 11). Dieser Schaden konnte mit der Masson-Trichrom-Färbung weiter unterteilt werden: Bei den Nphs2^{Δpod}-Mäusen waren im Gewebe atrophe, dilatierte Tubuli mit eindeutig erkennbaren Proteinablagerungen, die im Schnitt rot angefärbt waren, zu sehen sowie, blau gefärbt, fibrotische Veränderungen des Gewebes (siehe Abb. 11). Bei den Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Mäusen waren dagegen zwar Dilatationen der Tubuli erkennbar, allerdings fielen diese deutlich geringer aus (siehe Abb. 11). Zusätzlich fehlten die bei den Nphs2^{Δpod}-Mäusen vorhandenen Fibrosen größtenteils oder waren qualitativ sowie quantitativ geringer ausgeprägt. Daher wurde der tubulointerstitielle Schaden entsprechend in die Kategorien „fibrotische Veränderungen“ und „Proteinablagerungen“ eingeteilt, die ersteren wurden mit den mit Masson-Trichrom-Färbung gefärbten Schnitten anhand des Injury Scores quantifiziert, wohingegen die Proteinablagerungen mit PAS-gefärbten Schnitten durch denselben Injury Score beurteilt wurden. Der Unterschied bei den fibrotischen Veränderungen zwischen Nphs2^{Δpod}- und Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Mäusen war im Gegensatz zu den Proteinablagerungen bei der PAS-

Färbung statistisch signifikant, verglichen mit den gesunden Kontrolltieren waren beide Parameter beider Gruppen ebenfalls signifikant erhöht (siehe Abb. 12).

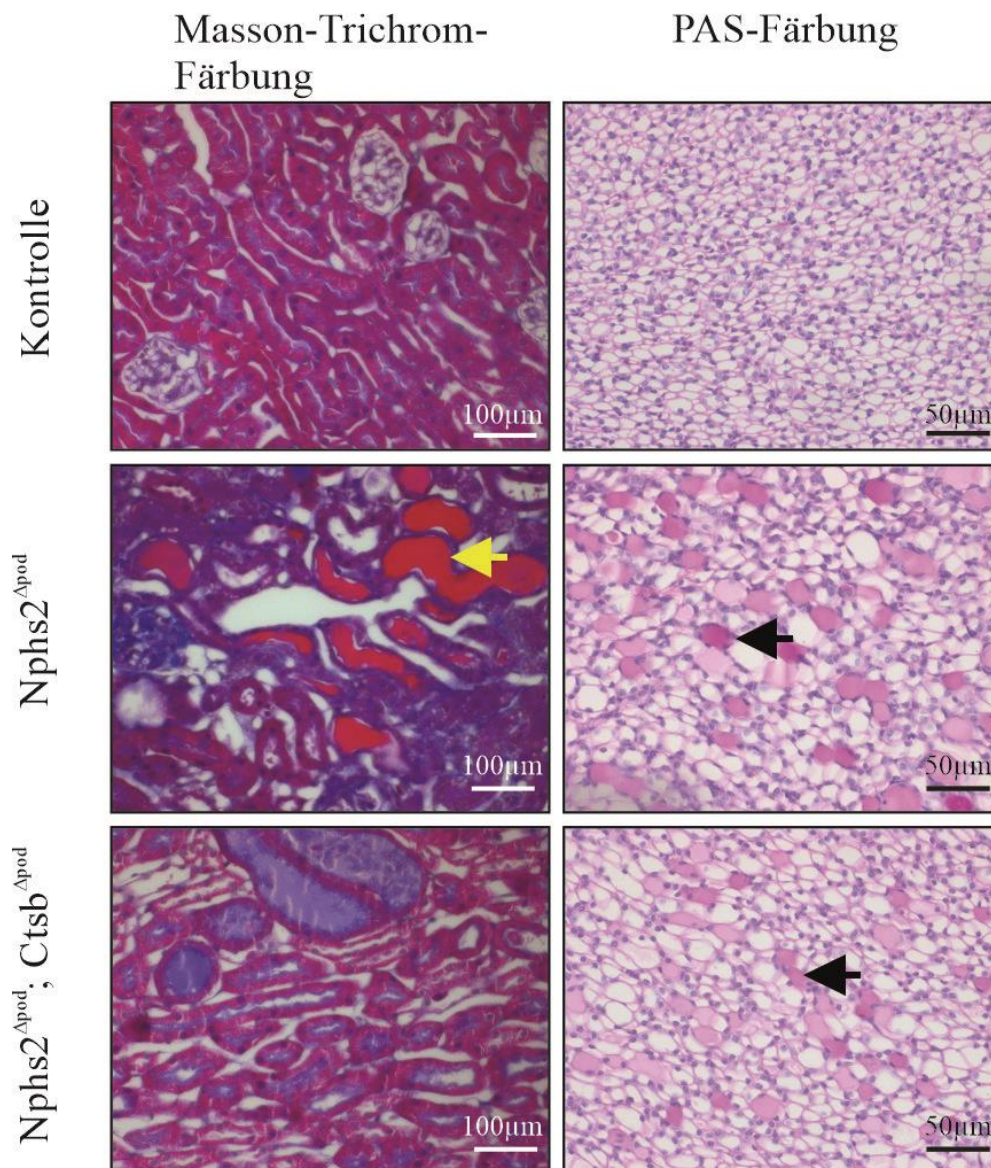


Abb. 11: Aufnahmen des Tubulointerstitiums der Mäuse. Bei allen drei Gruppen wurden Paraffinschnitte entweder mit Masson-Trichrom-Färbung oder PAS-Färbung gefärbt, um die sklerotischen Veränderungen darzustellen. Bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen sind in der Masson-Trichrom-Färbung blau gefärbte Fibrosen sowie rote Proteinablagerungen (gelber Pfeil) erkennbar, bei den $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen fehlen die Fibrosen größtenteils. Bei der PAS-Färbung fallen die qualitativen wie quantitativen Unterschiede geringer aus, die Proteinablagerungen (schwarze Pfeile) sind allerdings bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen stärker erkennbar. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 μm , der schwarze 50 μm Länge.

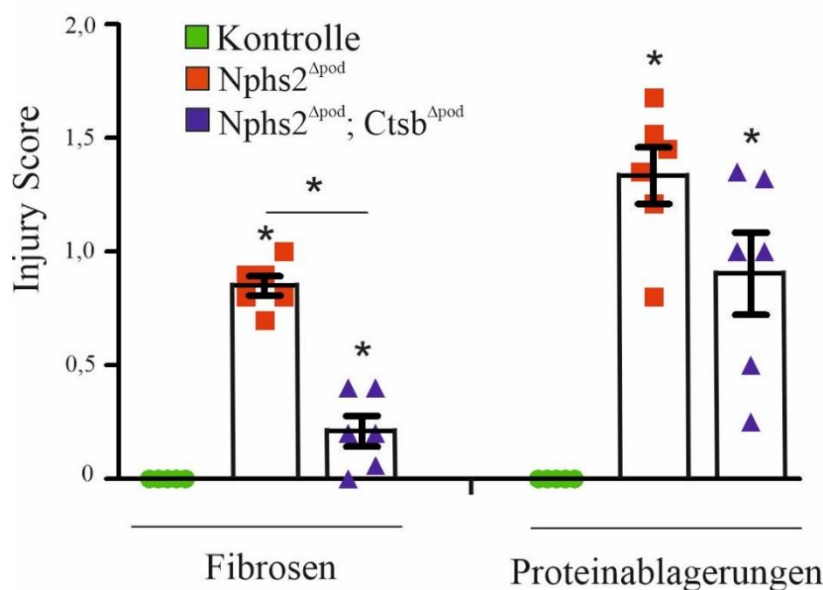


Abb. 12: Auswertung des Injury Scores in zwei unterschiedlichen Färbungen.

Deutlichere Unterschiede bei den Fibrosen, die mit Masson-Trichrom-Färbung bestimmt wurden, weniger Unterschiede bei den Proteinablagerungen, die durch PAS-Färbung ausgewertet wurden. $n \geq 5$, $*P < 0,05$.

Die histologischen Korrelate der Nphs2^{Δpod}- und Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Mäuse nach vier Wochen, in denen sich das nephrotische Syndrom bei den Tieren entwickeln hätte sollen, unterschieden sich zusammenfassend sowohl bei den Glomeruli als auch, wenn auch weniger eindeutig ausgeprägt, beim Tubulussystem und dem umgebenden Bindegewebe. Vor allem außerhalb der Glomeruli schienen die Korrelate tubulointerstitieller Veränderungen im Rahmen der Entzündungsreaktion aber bei den Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Mäusen noch gut nachweisbar zu sein.

3.3 Proteinurie und Albuminurie im zeitlichen Verlauf

Kennzeichnend für die Entstehung des glomerulären Schadens, der sich histologisch am Gewebe nach Organentnahme zum Endpunkt des Experiments untersuchen lässt, ist der zeitliche Verlauf der Proteinurie und im Speziellen der Albuminurie. Mäuse des Tamoxifen-induzierbaren nephrotischen Syndrom-Modells erreichen dabei für die Proteinausscheidung, normiert anhand des Kreatininwertes (Protein/Kreatinin-Quotient) Werte, die über 40-mal höher als bei normalen Mäusen sind (Larionov 2017). Die Entwicklung des nephrotischen Syndroms konnte durch Analysen von Spontanurin nachverfolgt werden, indem die Urinproben für Protein/Albuminassays anhand des Kreatininwertes normiert wurden. Für die Darstellung des Verlaufs wurden drei Zeitpunkte im Experiment gewählt: Die Werte 10 Tage nach Beginn

der Tamoxifengabe markieren den allmählichen Beginn der Albuminurie im Experiment, welche sich zeitlich früher darstellt, als die Proteinurie als Ganzes. Wenngleich nach 10 Tagen bereits Albumin im Urin der $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse im Mittel erhöht ist, sind die Unterschiede zwischen allen drei Gruppen noch nicht statistisch signifikant (siehe Abb. 13). Nach 17 Tagen bestehen sowohl zur Kontrollgruppe wie auch zu den $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Tieren deutliche Unterschiede: Sowohl Albumin als auch die Gesamtmenge des Proteins sind bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen stark verändert, der Albuminwert erreicht im Mittelwert etwa das 16-Fache und das Gesamtprotein das 8-Fache des Kontrollwerts (siehe Abb. 13). Ein Unterschied zwischen Proteinurie und Albuminurie findet sich im Vergleich zu der $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Gruppe: Bei dieser besteht an Tag 17 zwar die Tendenz eines erhöhten Proteinwerts, der allerdings nicht statistisch signifikant ist. Genauso wenig besteht allerdings ein signifikanter Unterschied zur $Nphs2^{\Delta pod}$ -Gruppe; die Proteinurie setzt an dieser Stelle also erst langsam ein, während sie bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen schon etabliert ist. Die Albuminurie hingegen ist auch bei den $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen an Tag 17 schon ausgeprägt, die Tiere erreichen auch hier wesentlich geringere Werte als die $Nphs2^{\Delta pod}$ -Gruppe. Zum späten Zeitpunkt im Experiment, an Tag 24, besteht bei den Albuminwerten kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen und auch bei der Proteinurie ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht signifikant, wenngleich die $Nphs2^{\Delta pod}$ -Tiere in der Tendenz deutlich stärker Proteine ausscheiden (siehe Abb. 13). Möglicherweise würde ein entsprechender Unterschied an dieser Stelle im Experiment bei größerer Stichprobengröße noch statistische Signifikanz erreichen. Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Mäuse mit podozytären Cathepsin B-Knockout auch physiologisch für die Etablierung der Schädigung des glomerulären Filters eine längere Zeit benötigen als die Mäuse, welche Cathepsin B regelgerecht im Podozyten exprimieren können. Sowohl die Albuminurie als auch die Proteinurie entstehen langsamer und die Menge des ausgeschiedenen Proteins ist gegen Ende des Experiments tendenziell immer noch geringer. Das Fehlen von Cathepsin B in den Podozyten beeinflusst folglich die Progression des Proteinverlusts vorteilhaft.

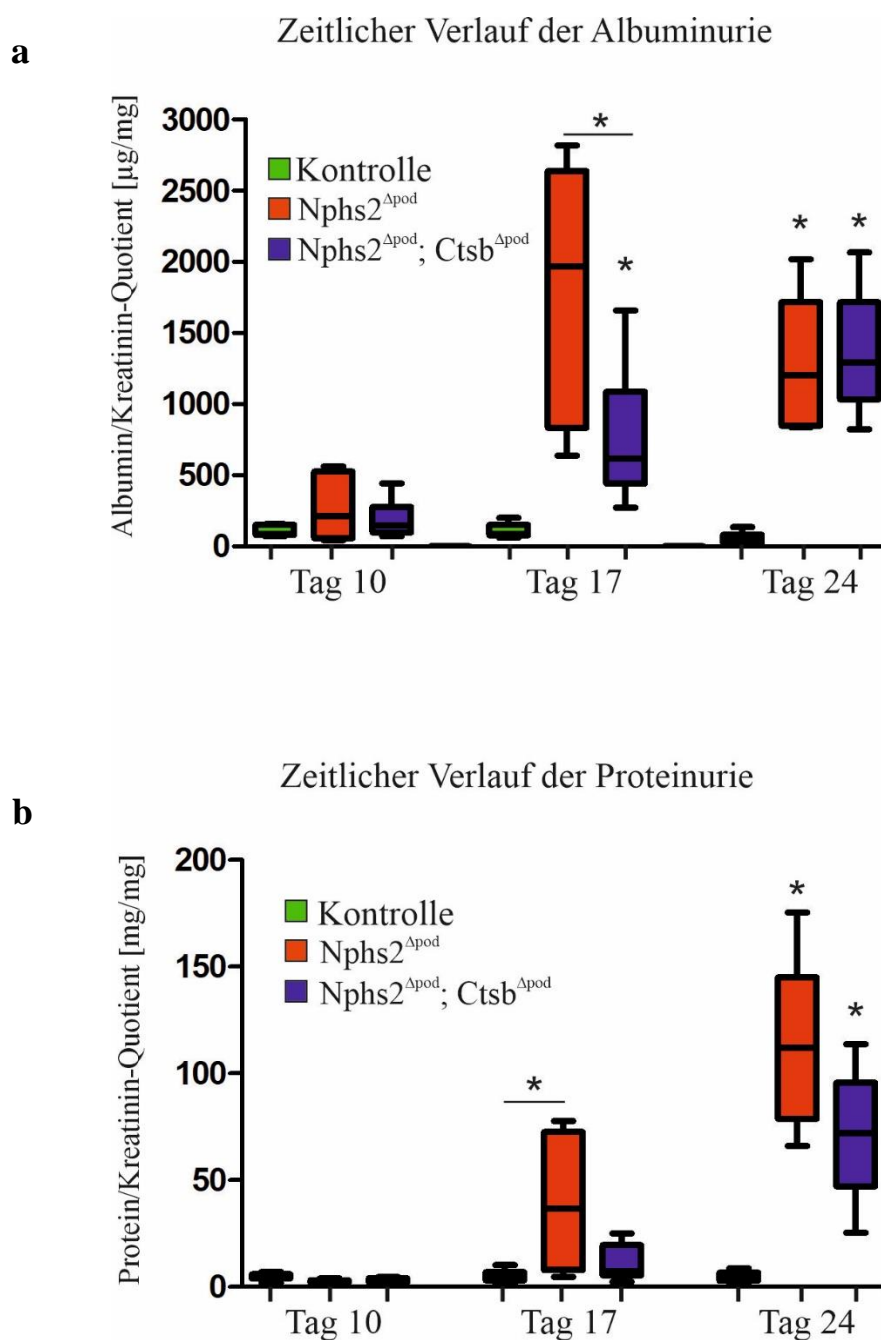


Abb. 13: Proteinurie und Albuminurie im zeitlichen Verlauf. **a:** Zwischen $\text{Nphs2}^{\Delta\text{pod}}$ - und $\text{Nphs2}^{\Delta\text{pod}}; \text{Ctsb}^{\Delta\text{pod}}$ -Mäusen besteht beim Albumin/Kreatinin-Quotienten an Tag 17 ein signifikanter Unterschied. **b:** Beim Protein/Kreatinin-Quotienten ist an Tag 17 nur die $\text{Nphs2}^{\Delta\text{pod}}$ -Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe erhöht, an Tag 24 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen $\text{Nphs2}^{\Delta\text{pod}}$ - und $\text{Nphs2}^{\Delta\text{pod}}; \text{Ctsb}^{\Delta\text{pod}}$ -Mäusen. Die Asteriske an Tag 24 markieren Signifikanz verglichen mit der Kontrolle. $n \geq 6$, $*P < 0,05$.

3.4 Auswertung der Proteasurie mittels Zymographie

Das Auftreten von Proteasen im Urin während des nephrotischen Syndroms ist hinlänglich bekannt und viele Proteasen besitzen die Eigenschaft, ENaC-Untereinheiten zu modifizieren. Im Verlauf des nephrotischen Syndroms kommt es nicht nur zu Proteinurie, sondern auch zu einer Proteasurie, bei der immer mehr Proteasen in den Primärharn gelangen und möglicherweise auch die ENaC-Untereinheiten spalten. Diesen Vorgang galt es im Speziellen nun für die neuartigen $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse zu untersuchen, um herauszufinden, inwieweit das Cathepsin B der Glomeruli für das Zustandekommen einer entsprechenden proteolytischen Kaskade eine Rolle spielen könnte. Um die Aktivität von Proteasen im Urin der verschiedenen Mausgruppen im zeitlichen Verlauf mittels Zymographie darzustellen, wurden die gesammelten Spontanurinproben auf 1 μ g Kreatinin normalisiert und für jedes Tier ein eigenes SDS-PAGE-Gel angefertigt, in welchem die Proteine bzw. Proteasen der Urinproben nach Tagen aufgetrennt wurden (siehe Abb. 15). Als Proteasen wurden ausschließlich eindeutig spezifische Banden unter 200 kDa ausgewertet, mittels ImageJ die Intensität pro Fläche ermittelt und der Hintergrund des jeweiligen Gels als entsprechende, äquivalente Fläche abgezogen, sodass sich die proteolytische Aktivität als Intensität pro Fläche darstellte, ausgehend vom Nullwert, bei welchem keine Banden vorliegen. In der Frühphase, zwischen Tag 2 und Tag 7, war bei allen drei Gruppen eine gewisse Aktivität zu erkennen, die möglicherweise eine Reaktion auf die Tamoxifengabe darstellt, nicht jedoch als Manifestation einer glomerulären Erkrankung zu deuten ist und auch bei vorherigen Experimenten aufgetreten war (Larionov 2017). Bei den Tieren mit nephrotischem Syndrom entwickelte sich zwischen Tag 11 und Tag 14 eine stetig ansteigende Proteasurie, während die $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse diese Entwicklung um etwa eine Woche verzögert aufwiesen (siehe Abb. 14). Für den Zeitraum um Tag 11 waren bei dieser Gruppe bei einem einzelnen Tier an zwei Tagen und bei einem Tier an einem Tag jeweils spezifisch als Proteasen zu identifizierende Banden erkennbar, die jedoch in beiden Fällen nicht in eine sich anschließende größere Kaskade an Proteasen eingebettet war und daher höchstwahrscheinlich unabhängig von der tatsächlichen nephrotischen Erkrankung auftrat. Zum Ende des Experiments war die Aktivität der Proteasen in der $Nphs2^{\Delta pod}$ -Gruppe insgesamt in der Tendenz deutlich ausgeprägter und das Auftreten der Proteasurie deutlich früher als bei den $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen. Statistische Signifikanz ergab sich zwischen diesen beiden Gruppen für die Vergleichswerte an den Tagen 18 und 21; für die Tage 23 und 25 sowie Tag 16 waren die Werte bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Tieren zwar ebenfalls eindeutig erhöht, aufgrund der großen Standardabweichung jedoch statistisch nicht signifikant. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren die Werte von Tag 18 bis Tag 25 bei der $Nphs2^{\Delta pod}$ -Gruppe signifikant

erhöht, während bei der $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Gruppe nur die beiden letzten Werte an den Tagen 23 und 25, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant erhöht waren. Einzelne Werte der Kontrolltiere jenseits der Nulllinie resultierten aus Banden, die aufgrund ihres spezifischen Bandenmusters in die Auswertung aufgenommen wurden. Daraus ergibt sich, dass die Proteasurie bei den $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen genau wie die Proteinurie zeitlich verzögert auftritt, dass allerdings auch zusätzlich die umfangreiche proteolytische Kaskade, wie sie bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen zu sehen war, ausblieb oder nur rudimentär zu erkennen war.

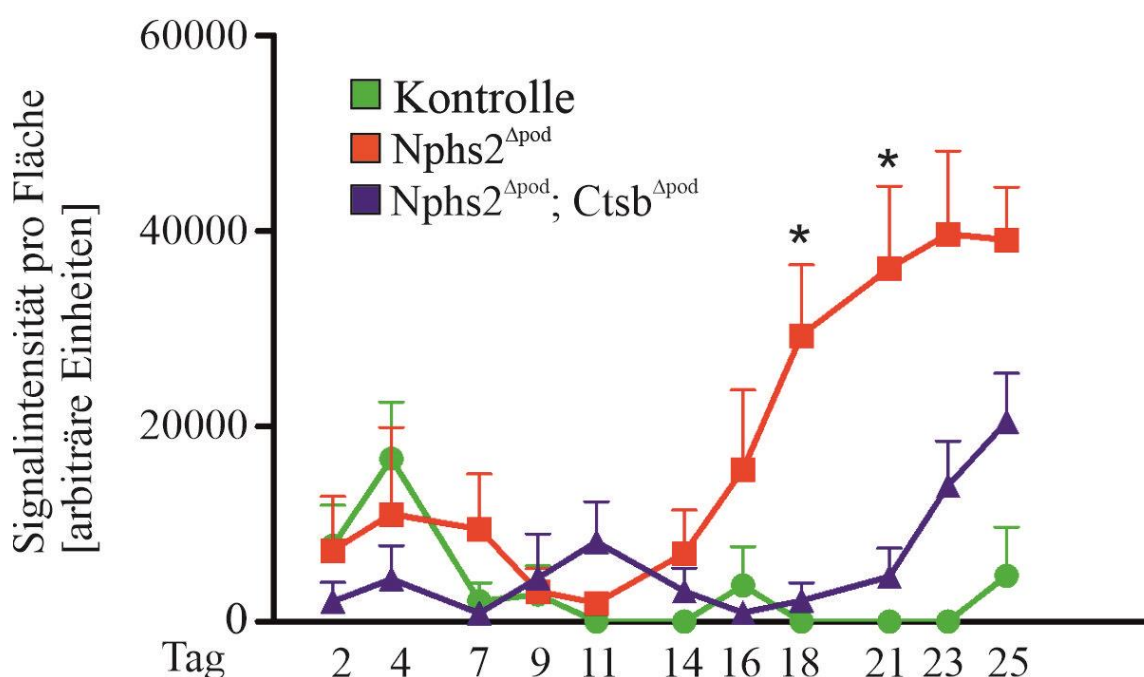


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Proteasurie aller drei Gruppen. Statistische Signifikanz ergibt sich zwischen den Gruppen $Nphs2^{\Delta pod}$ und $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ nur an Tag 18 und 21, markiert durch die Asteriske. Tag 23 und 25 wären bei beiden Gruppen signifikant zur Kontrolle. Die Auswertung erfolgte für die einzelnen Tage gruppiert. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts nach Tagen. $n \geq 7$, $*P < 0,05$.

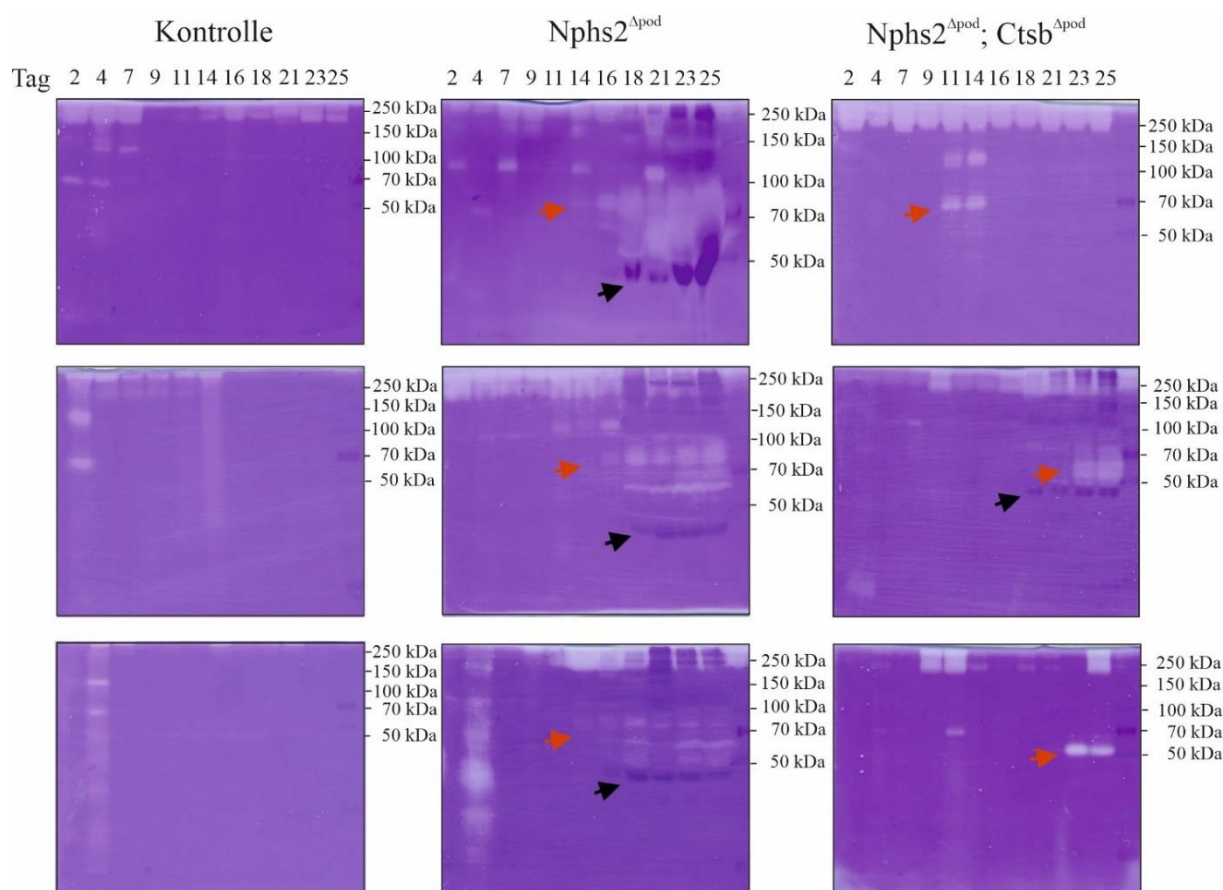


Abb. 15: Ausgewählte Beispielzymogramme der murinen Spontanurinproben. Für jedes Tier wurde ein eigenes Comassiegel erstellt und die Urinproben im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die weißen Banden (rote Pfeile) resultieren aus dem enzymatischen Verdau der Gelatine im Gel, farbige Banden sind klar erkennbare Proteinbanden (schwarze Pfeile). Ab Tag 16 ist bei der $Nphs2^{\Delta pod}$ -Gruppe ein immer stärker werdendes Auftreten an Proteasen feststellbar, wohingegen die Proteasen bei den $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Tieren nur vereinzelt und in sehr viel schwächerer Form zeitlich später sichtbar sind. An Tag 4 sind bei Tieren aller drei Gruppen unspezifisch auftretende Proteasen festgestellt worden. Die Zymogramme zeigen deutliche Unterschiede der Proteasurie zwischen $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen. Die Kontrolltiere haben keine spezifischen Proteasen im Urin.

3.5 Änderung des Blutdrucks

Neben den glomerulären Veränderungen ist auch interessant, ob der Podocinknockout sich auch auf ENaC bei der Entstehung der FSGS auswirken kann. Die Bedeutung ENaCs bei FSGS manifestiert sich durch die gesteigerte Natriumrückresorption am erhöhten Blutdruck, der bei den Mäusen zu diesem Zweck gemessen werden sollte. Hierfür mussten die Mäuse für eine Woche an die Funktionsweise des Blutdruckmessgeräts gewöhnt werden. Anschließend

wurden bei allen Tieren der drei Gruppen zunächst einmal frühzeitig an Tag 16 und daraufhin folgend später an Tag 27 im laufenden Experiment die systolischen Blutdruckwerte mittels Schwanzpletysmographie bestimmt. Zum frühen Zeitpunkt, an Tag 16, ergaben sich bereits signifikant erhöhte systolische Blutdruckwerte bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen, sowohl verglichen mit den Kontrolltieren als auch verglichen mit den $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen (siehe Abb. 16). Letztere zeigten zu diesem Zeitpunkt keine relevanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zum späteren Zeitpunkt waren sowohl bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen als auch bei den $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen die systolischen Blutdruckwerte verglichen mit der Kontrollgruppe erhöht, allerdings erreichten die $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse auch höhere Werte als die $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse. Die durch die Natriumretention auftretende arterielle Hypertonie der Mäuse entstand bei den Tieren mit podozytenspezifischem Verlust von Cathepsin B also ebenfalls später und war gegen Ende des Experiments auch geringer als bei den Tieren, deren Podozyten Cathepsin B exprimierten.

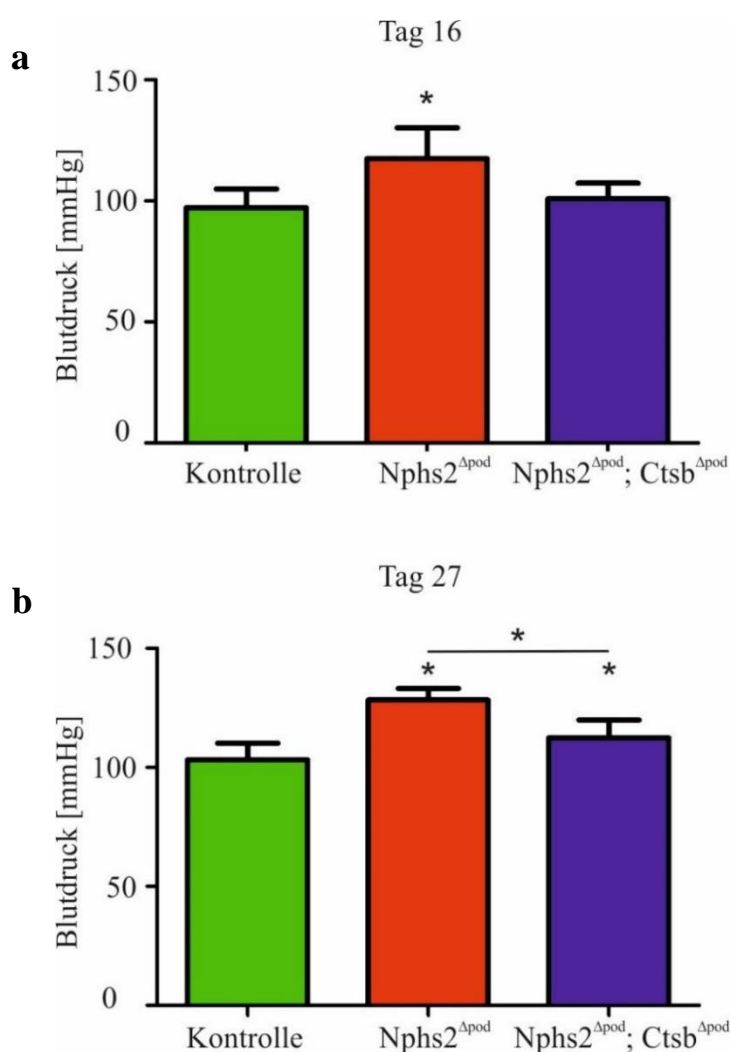


Abb. 16: Vergleich der systolischen Blutdruckwerte zwischen den drei Gruppen.

Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. $n \geq 7$ je Gruppe, * $P < 0,05$. **a:** An Tag 16 ist nur bei $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen der Blutdruck erhöht. **b:** Der Blutdruckanstieg der $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse erfolgt zeitlich versetzt (Tag 27), dennoch ist der Blutdruck bei diesen Tieren an diesem Zeitpunkt immer noch signifikant geringer als bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen.

3.6 Elektrophysiologische Analysen des Einflusses Cathepsin Bs auf ENaC

Eine stärkere Aktivität ENaCs, sei es durch proteolytische Spaltung oder eine erhöhte Zahl luminaler ENaC-Kanäle, ist einhergehend mit einer elektrophysiologischen Veränderung des transzellulären Stroms, da vermehrt Natriumionen ins Zellinnere gelangen. Dieser ENaC-spezifische Stromfluss, der aufgrund seiner Amiloridsensitivität von denen anderer Kanäle gut abgegrenzt werden kann, ist experimentell durch die Two-electrode-voltage-clamp (TEVC) Technik an Oozyten des Krallenfrosches darstellbar. Auf RNA-Ebene in die Zelle eingebracht, können diese Oozyten die entsprechenden Kanaluntereinheiten exprimieren; hierfür wurde die entsprechende Plasmid-DNA in RNA umgeschrieben. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten allesamt in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Baukrowitz des physiologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (siehe Abb. 17). Um herauszufinden, inwieweit Punktmutationen im Bereich der potenziellen Schnittstelle Cathepsin Bs bei der alpha-ENaC-Untereinheit die Aktivität des Kanals bzw. seine proteolytische Modifikation verändern können, wurden Oozyten durch RNA-Injektionen dazu gebracht, entweder alpha-, beta- und gamma-ENaC oder beta-, gamma- und alpha^{177A, 182A, 199A}-ENaC zu exprimieren. Drei Tage nach der RNA-Injektion, wenn die Expressionsrate erfahrungsgemäß hoch genug war, wurde dem neuen Nährmedium der Oozyten mit geringer Natriumkonzentration Cathepsin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in der Konzentration von 0,1 Units pro ml für 4 Stunden zugesetzt und der pH-Wert auf 6,5 gestellt; den Kontrollzellen wurde in gleicher Konzentration Tris-hydrochlorid, in welchem das Cathepsin B für die anderen Zellen gelöst war, ins Medium beigefügt. Der pH-Wert von 6,5 wurde hierbei gewählt, weil er sich im Bereich dessen befand, was physiologisch im Sammelrohr zu erwarten ist und Cathepsin B bei diesem Wert bereits stärkere Aktivität aufweist. Die Ausgangsmessungen ergaben, dass die Kanäle mit der Dreifachmutation alpha-ENaCs gegenüber der unveränderten Variante keine wesentlichen Veränderungen aufwiesen, lediglich minimal und nicht signifikant erhöht waren (siehe Abb. 17). Wurde dem Medium allerdings Cathepsin B zugesetzt, ließ sich der Stromfluss bei normalem alpha-ENaC um etwa das 2,4-fache steigern, wohingegen dieser Cathepsin B Effekt bei der Dreifachmutation etwa das Zweifache betrug. Da bei dieser Mutation die entsprechenden drei Glycin-Aminosäuren durch Alanin ersetzt worden waren, bestand die Möglichkeit, dass der sehr geringe Unterschied zwischen Glycin und Alanin für diesen Effekt verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde eine neue Mutation, in diesem Fall käuflich erworben (VectorBuilder Inc., Chicago, USA), verwendet, bei der die drei Positionen Glycins durch Isoleucin ersetzt wurden. Isoleucin gehört wie Glycin und Alanin zu den aliphatischen Aminosäuren, weist allerdings deutlichere Unterschiede ob der längeren Seitenkette zu Glycin

auf. Tatsächlich zeigten die Oozyten, die beta-, gamma- und alpha^{177I, 182I, 199I}-ENaC exprimierten, sobald sie mit Cathepsin B inkubiert wurden, keinen Cathepsin B-Effekt mehr (siehe Abb. 17). Eine Veränderung im Bereich der erwarteten Schnittstelle für Cathepsin B bei alpha-ENaC führte also tatsächlich dazu, dass Cathepsin B die Effektivität ENaCs nicht weiter steigern konnte und ENaC nicht vermehrt Natriumionen ins Zellinnere transportierte. Auf diese Weise konnte im Zellmodell ein Effekt Cathepsin Bs im Zusammenhang mit dem nephrotischen Syndrom modelliert werden und gezeigt werden, dass Cathepsin B die ENaC-Aktivität steigern kann und eine Mutation im Bereich Glycins an den Positionen 173, 182 und 199 bei humanem ENaC diesen Effekt abzumildern vermag.

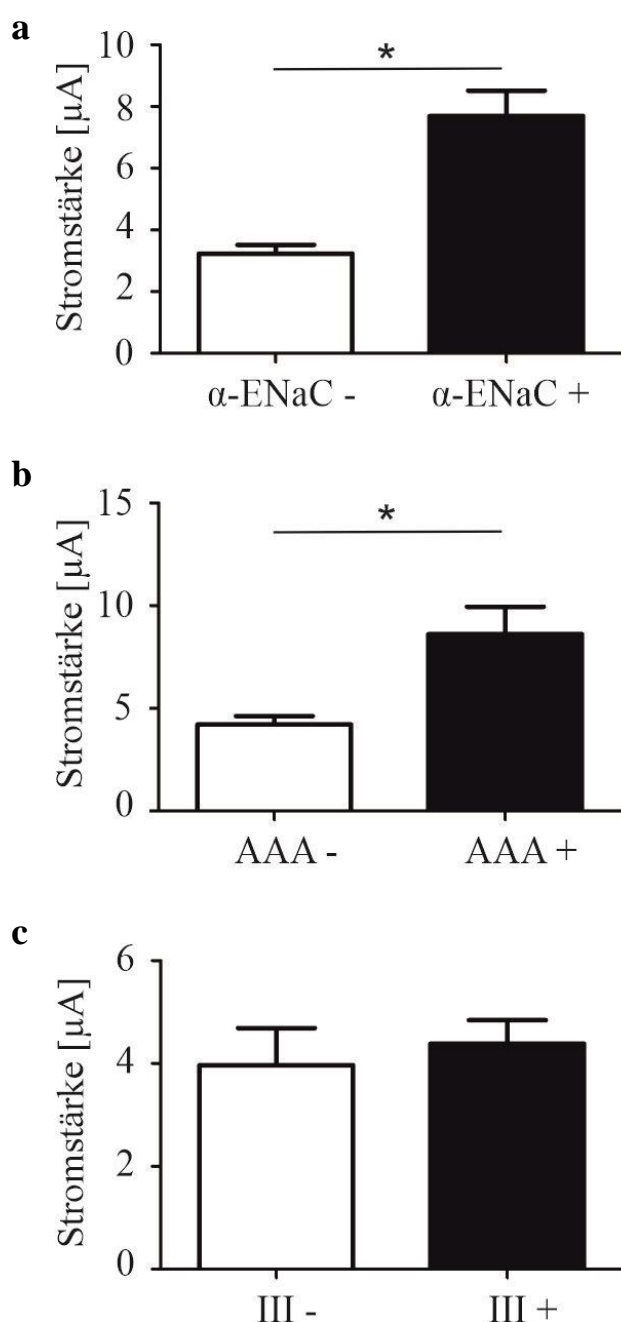


Abb. 17: TEVC-Messungen der Oozyten. **a:** Die Inkubation des Mediums mit 0,1 Units Cathepsin B pro ml steigert bei humanem alpha-ENaC die Kanalaktivität. $n \geq 38$. **b:** Eine Dreifachmutation von Glycin zu Alanin an den Positionen 173, 182 und 199 bei humanem alpha-ENaC verringert diese Cathepsin B-bedingte, gesteigerte Kanalaktivität kaum. $n \geq 4$. **c:** Eine Veränderung der entsprechenden Aminosäuren zu Isoleucin verhindert diesen Effekt nahezu vollständig. $n \geq 21$. AAA steht für alpha^{177A, 182A, 199A}-ENaC; III steht für alpha^{177I, 182I, 199I}-ENaC. + bedeutet, dass das Medium 0,1 Units Cathepsin B pro ml enthielt, - steht für normales Medium. * $P < 0,05$. Die Messungen erfolgten bei einer Spannung von -60 mV.

3.7 ENaC-Expressionsverhalten in retransfizierten Cathepsin B-defizienten

Sammelrohrzellen

Um die Mechanismen des nephrotischen Syndroms besser verstehen und in vitro darstellen zu können, bot es sich an, mit Sammelrohrzellen, die ENaC intrinsisch exprimieren, zu arbeiten; zu derartigen Zellen gehören beispielsweise die mpkCCD14-Zellen. Ziel war es, zu überprüfen, ob Cathepsin B in der Zellkultur lediglich eine verstärkte Kanalaktivität ENaCs oder auch eine Veränderung der Expressionsrate hervorrufen kann. Die mpkCCD14-Zellen zeigen, sobald sie kultiviert sind, allerdings intrinsisch eine sehr ausgeprägte Expression Cathepsin Bs, die, gemessen an den Erfahrungswerten aus Gewebeuntersuchungen, ungewöhnlich hoch erscheint (siehe Abb. 18). Versuche, Zellmedium mit zusätzlichem Cathepsin B zu versetzen, vergleichbar mit den Oozytenexperimenten, führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen in Bezug auf die Expression des Kanals (Ergebnisse nicht gezeigt).

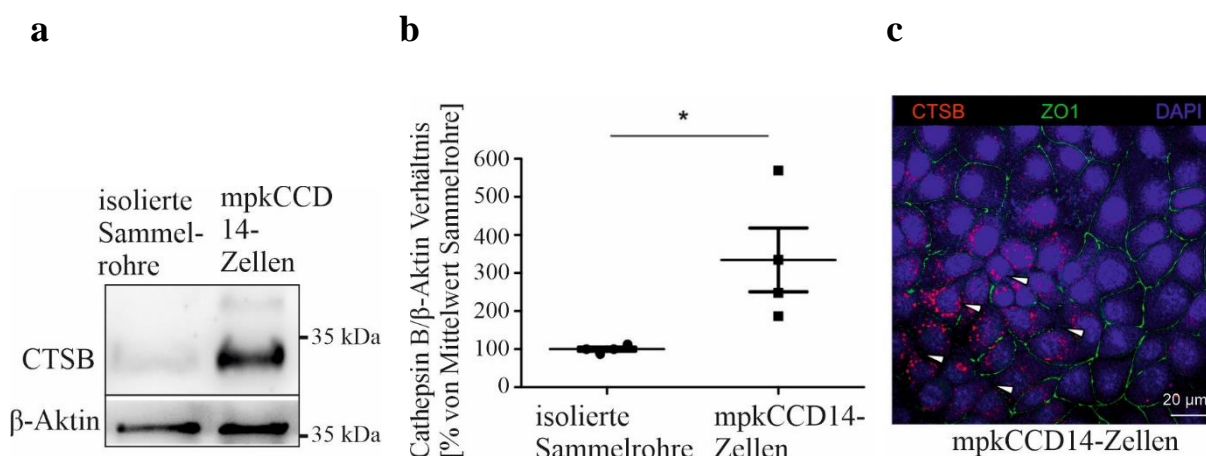


Abb. 18: Vergleich mpkCCD14-Zellen mit isolierten Sammelrohren. **a:** Western Blots von Sammelrohrlysaten und mpkCCD14-Zellen. Die kultivierten Sammelrohrzellen der mpkCCD14-Zelllinie exprimieren Cathepsin B wesentlich stärker, als es in der Niere der Maus der Fall ist. β-Aktin fungiert als Ladungskontrolle. **b:** Auswertung der Western Blots: Die Zellen in Kultur haben ein signifikant höheres Expressionslevel Cathepsin Bs verglichen mit Sammelrohren des Mausegewebes. $n \geq 3$, $*P < 0,05$. **c:** Mikroskopische Aufnahme von mpkCCD14-Zellen in Kultur. Die weißen Pfeile markieren die starken Ansammlungen Cathepsin Bs in der Zelle, der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 μm. Gefärbt sind Cathepsin B (rot), ZO-1 (grün), das die Zellgrenzen markiert, und DAPI (blau) zur Darstellung der Zellkerne. CTSB = Cathepsin B. Modifiziert aus Saudenova et al. 2022.

Um unter diesen Umständen die Bedeutung Cathepsin Bs überhaupt adäquat untersuchen zu können, wurde in mpkCCD14-Zellen durch die CRISPR/Cas9-Methode das Gen CTSB, das für Cathepsin B codiert, ausgeschaltet. Anschließend wurden durch Grenzverdünnungsklonieren einzelne Klone mit erfolgreichem Knockout kultiviert. Die Experimente wurden mit einer Mischkultur aus Zellen zweier verschiedener Klone durchgeführt, bei denen der Erfolg des Knockouts jeweils sowohl immunhistochemisch als auch durch Western Blot verifiziert worden war (Abb. 19); die Zellen wurden für die Experimente auf mit Kollagen IV beschichteten Deckgläschen ausgesät.

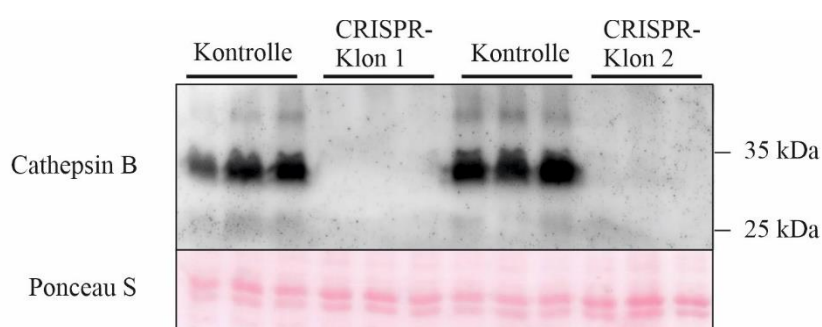
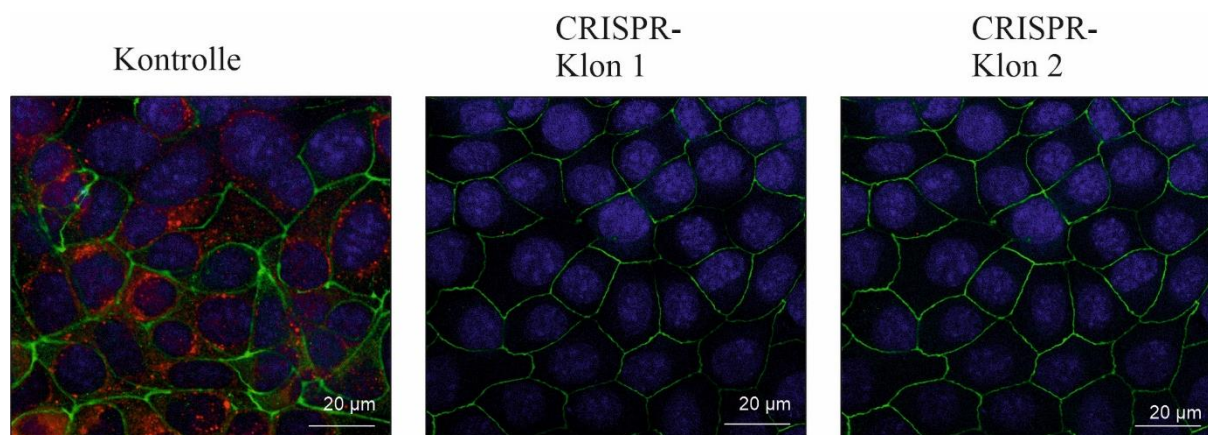
a**b**

Abb. 19: Verifikation des Knockouts von Cathepsin B in mpkCCD14-Zellen. **a:** Im Western Blot konnte bei beiden CRISPR-Klonen weder die Hauptbande Cathepsin Bs bei 27 kDa, noch die Vorstufe auf Höhe von 40 kDa detektiert werden. Die Ponceaufärbung diente als Ladungskontrolle. **b:** Analog dazu zeigten immunhistochemische Markierungen von Cathepsin B (rot) den Knockout der Klone, sodass dieser durch mehrere Methoden gesichert war. ZO-1 (grün) dient der Darstellung der Zellgrenzen, die DAPI-Markierung (blau) der Zellkerne. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Im Anschluss wurde durch transiente Transfektion DNA für humanes Cathepsin B in die Zellen eingebracht, um retransfizierte Zellen einzeln mit den Knockoutzellen vergleichen zu können. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 72 Stunden bei täglichem Mediumwechsel konfluent wachsen gelassen, um eine ausreichende Expressionsrate sowie eine angemessene Zelldifferenzierung erreichen zu können und darauffolgend die Zielproteine immunhistochemisch markiert. Repräsentativ für die ENaC-Expression wurde Cathepsin B zusammen mit gamma-ENaC markiert, da dieser Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen die besten Resultate zeigte. Auf diese Weise konnten die Effekte Cathepsin Bs zellspezifisch ausgewertet und mit Zellen der gleichen Kultur verglichen werden. Diejenigen CRISPR-Zellen, die erfolgreich retransfiziert worden waren, zeigten gegenüber den originalen CRISPR-Zellen eine signifikant erhöhte Expressionsrate, die etwas mehr als 30 % über der Kontrolle lag (siehe Abb. 20).

Da im Zusammenhang mit dem Verlust Cathepsin Bs Veränderungen auf lysosomaler Ebene bei einigen Zellen in vitro beobachtet worden sind, beispielsweise in Knochenmarksmakrophagen (BMDM), bei denen der Verlust oder die Hemmung Cathepsin Bs zu einem Anstieg der Lysosomenzahl führte (Qi et al. 2016), wurde das Expressionsverhalten des Proteins LAMP1 (lysosome-associated membrane glycoprotein 1), welches als spezifischer Marker in lysosomalen Membranen aufzufinden ist, ebenfalls immunhistochemisch untersucht und ausgewertet (siehe Abb. 21). Im Gegensatz zu gamma-ENaC in diesem Versuchsaufbau und anderen beschriebenen Zellmodellen, bei denen Zellen mit Cathepsin B transfiziert worden sind, zeigen die murinen Sammelrohrzellen mit Cathepsin B-Knockout allerdings keine Veränderung im Vergleich zu den mit Cathepsin B retransfizierten Zellen in Bezug auf LAMP1 (siehe Abb. 21). Bei mpkCCD14-Zellen ohne eigenes Cathepsin B führt die Retransfektion mit dieser Protease also zu einer stärkeren Expression des epithelialen Natriumkanals, ohne dass dabei die lysosomale Biogenese beeinflusst wird.

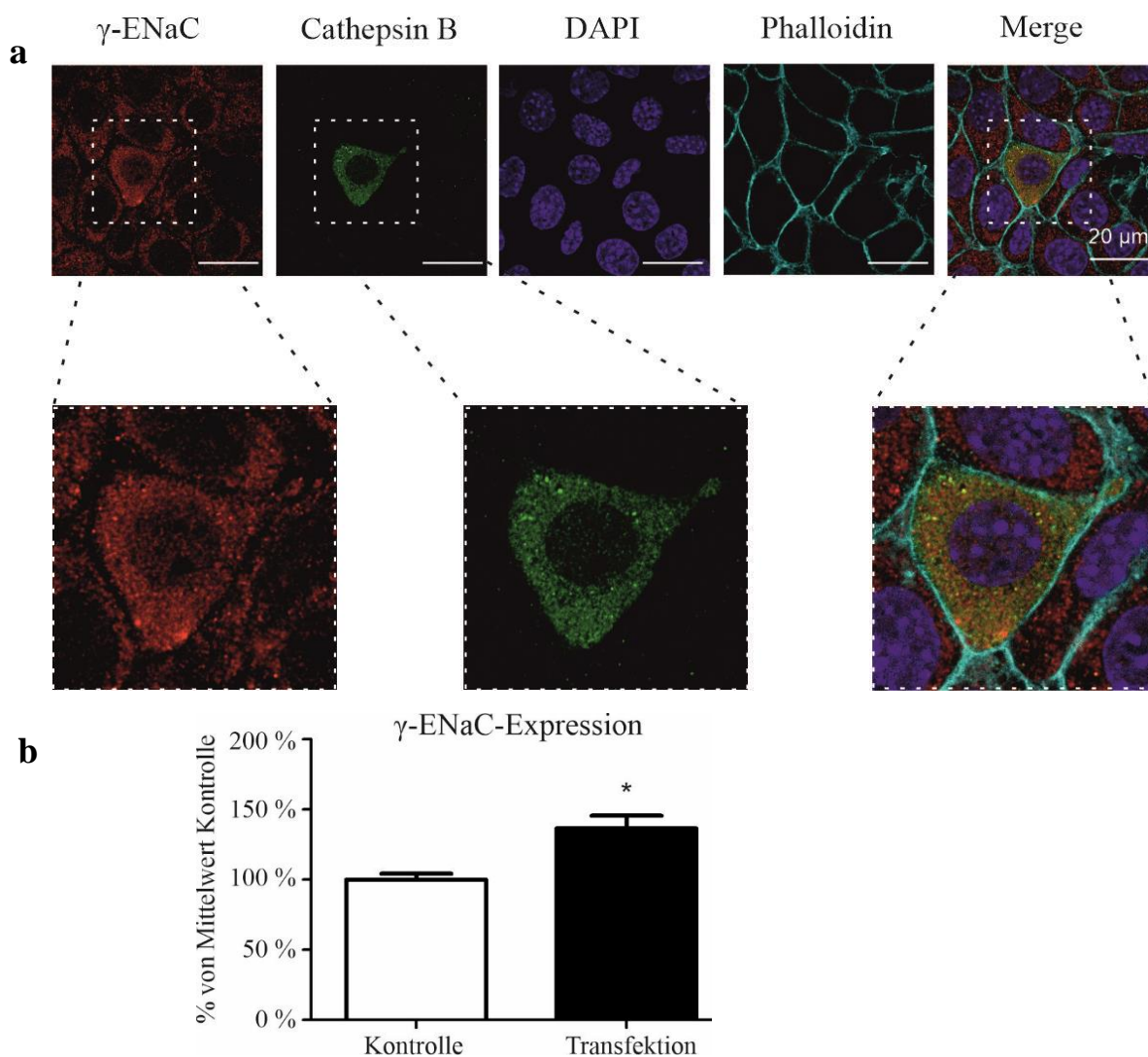


Abb. 20: Konfokale Bilder retransfizierter mpkCCD Ctsb KO-Zellen mit gamma-ENaC-Markierung. a: Die Zellen, die Cathepsin B (grün) bilden, zeigen verstärkte gamma-ENaC-Expression (rot). Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 μ m Länge. Phalloidin dient der Markierung der Zellgrenzen, DAPI zur Darstellung der Zellkerne.

b: Die statistische Auswertung ergibt einen signifikanten Unterschied. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. $n > 125$, $*P < 0,05$.

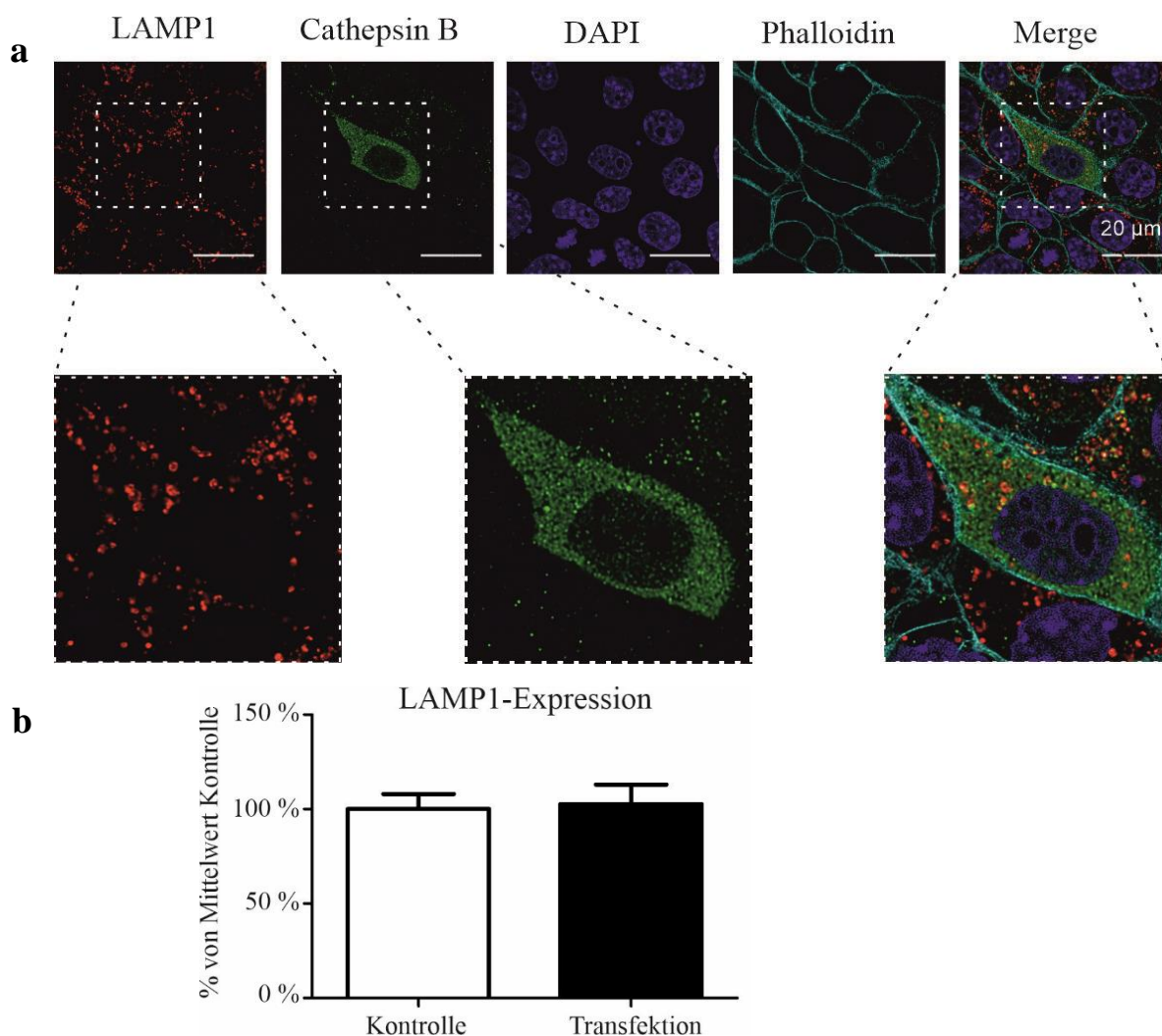


Abb. 21: Konfokale Bilder retransfizierter mpkCCD Ctsb KO-Zellen mit LAMP1-

Markierung. a: Es bestehen keine Unterschiede zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen hinsichtlich der LAMP1-Expression (rot). Phalloidin dient der Markierung der Zellgrenzen, DAPI zur Darstellung der Zellkerne. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 μm Länge. Die Bilder wurden mit der Deconvolution Software Huygens Professional 20.04 bearbeitet. **b:** Die statistische Auswertung ergibt keine Unterschiede zwischen retransfizierten und untransfizierten mpkCCD Ctsb KO-Zellen. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. $n > 50$, $*P < 0,05$.

3.8 Vergleich von Cathepsin B-Knockoutmäusen mit Wildtypmäusen

Nachdem die Versuche mit den $Nphs2^{\Delta pod}$, $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen gezeigt haben, dass bei ihnen sowohl im Bereich der Glomeruli als auch im Sammelrohr die Progression der FSGS schwächer verläuft als bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen, stellt sich die Frage, in wieweit Cathepsin B in den anderen Zellen des Nierenparenchyms bei FSGS eine Bedeutung zukommt. Daher sollen die

Versuche mit Mäusen, die neben des Verlusts Podocins auch vollständige Cathepsin B-Knockoutmäuse sind, wiederholt werden. Dafür sollte zunächst geklärt werden, ob diese Mäuse sich im Bereich der Nierenphysiologie von Wildtypmäusen unterscheiden, sofern der Nphs2-Knockout nicht initiiert wird. Hierfür wurden Mäuse im Alter von 8 Wochen untersucht, ohne dass ihnen Tamoxifen verabreicht worden war. Die Aufarbeitung des Nierengewebes geschah wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Expressionsrate von ENaC und der Na/K-ATPase durch Western Blots analysiert. Die Na/K-ATPase wurde ausgewertet, da sie im Tubulussystem und im Falle ENaCs speziell in den Hauptzellen des Sammelrohrs basolateral der Homöostase dient und intrazellulär die geringe Natriumkonzentration aufrecht erhält; ihre Expression also Rückschlüsse auf den Salzhaushalt der Niere zulässt. Die Auswertung ergab, dass sich das Expressionsniveau weder von alpha-ENaC noch von beta-ENaC noch von gamma-ENaC zwischen den normalen Wildtypmäusen und den Cathepsin B-Knockout-Mäusen signifikant unterschied, ebenso gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Expression der Na/K-ATPase (siehe Abb. 23). Bei beiden Gruppen wurde außerdem der Blutdruck gemessen, der sich, passend zu den Ergebnissen des ENaC-Expressionsverhaltens, bei Cathepsin B-Knockoutmäusen und Wildtypmäusen ebenfalls nicht unterschied (siehe Abb. 24).

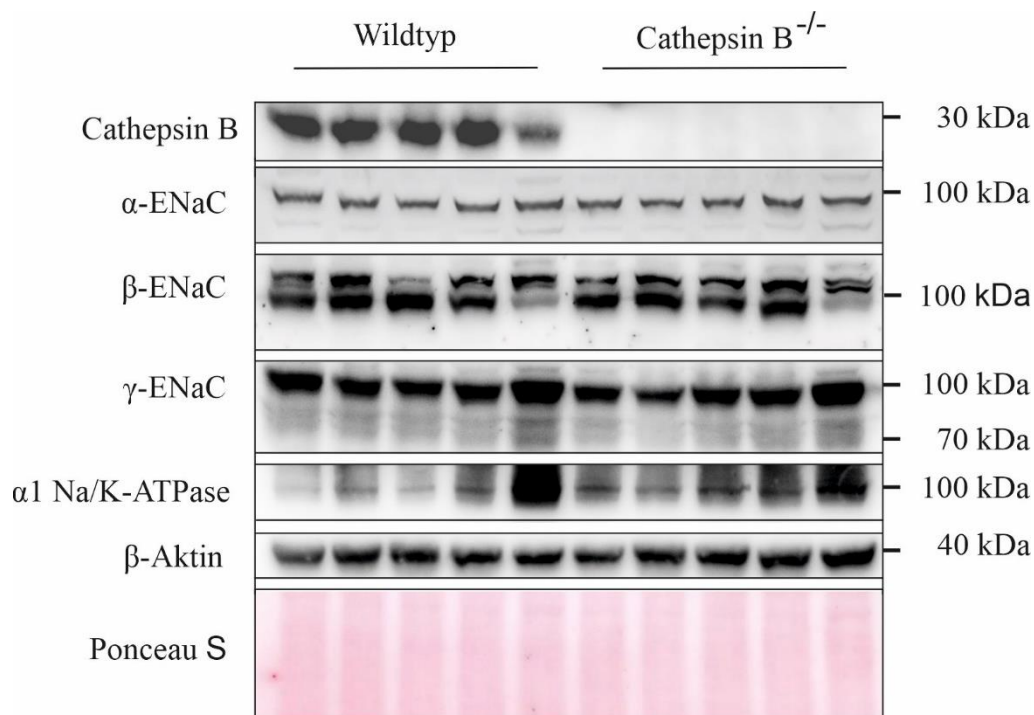


Abb. 22: Repräsentative Western Blots von Cathepsin B^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren. Es bestehen keine Unterschiede in der Expression von ENaC oder der Na/K-ATPase. Ponceau S und β-Aktin fungierten hierbei als Ladungskontrollen.

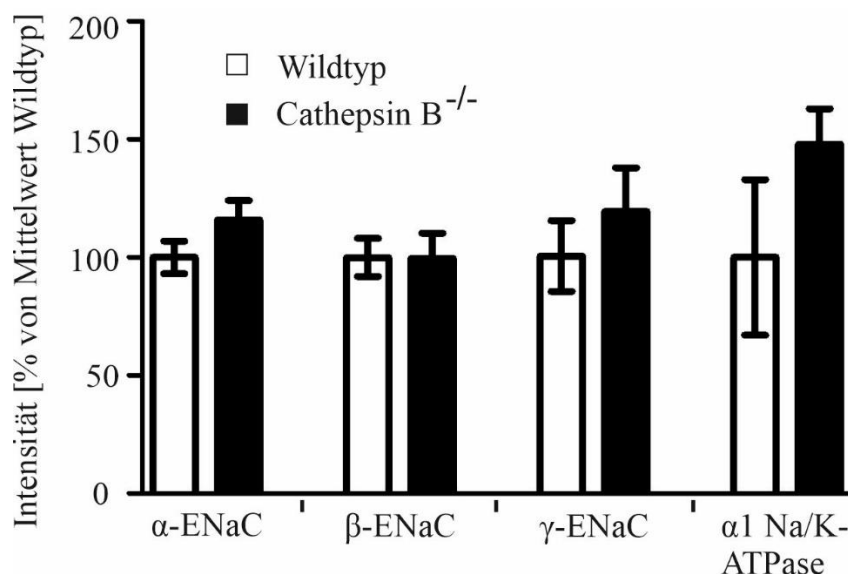


Abb. 23: Statistische Auswertung der Western Blot-Analysen von ENaC und der Na/K-ATPase bei Cathepsin B^{-/-}-Mäusen und Kontrolltieren. Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts. *P < 0,05, n = 5. Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf ENaC und die Na/K-ATPase.

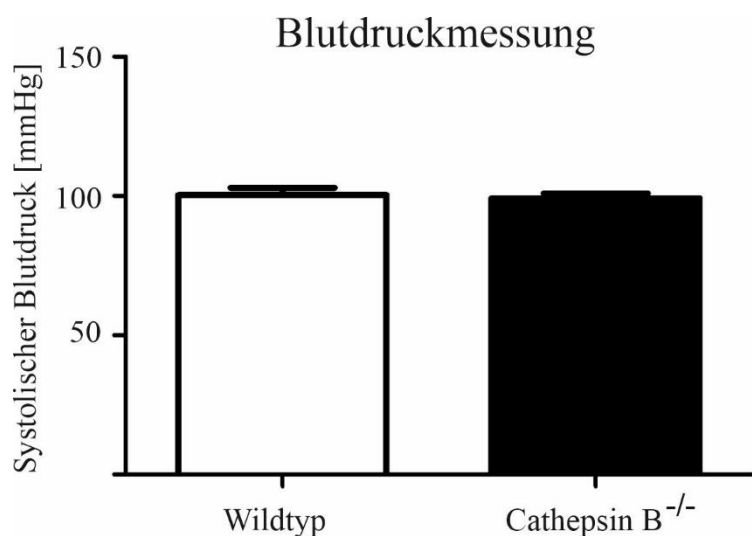


Abb. 24: Vergleich der Blutdruckwerte von Cathepsin B^{-/-}-Mäusen mit Wildtypmäusen. Die Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied des systolischen Blutdrucks. Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts. *P < 0.05, n = 5.

Neben den Untersuchungen in Bezug auf die distalen Abschnitte des Tubulussystems sollte auch geklärt werden, ob die Cathepsin B^{-/-}-Mäuse glomeruläre Unterschiede zu den Wildtypmäusen aufweisen. Hierfür wurden Paraffinschnitte des Nierengewebes mit Masson-Trichrom-Färbung markiert und lichtmikroskopisch ausgewertet. Bei den Glomeruli fanden sich jedoch keine Unterschiede zwischen den Glomeruli beider Gruppen, ebenso fielen in den Tubuli keine morphologischen Unterschiede auf (siehe Abb. 25).

Die Cathepsin B-Knockoutmäuse unterscheiden sich folglich im unbelasteten Zustand im Bereich der Niere nicht von normalen Wildtypmäusen.

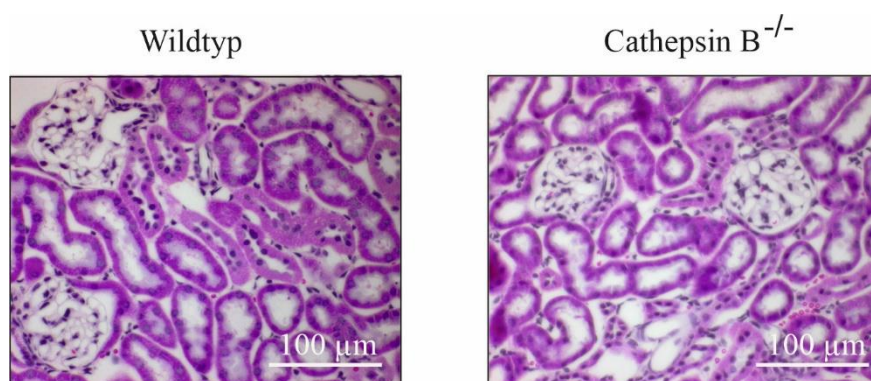


Abb. 25: Morphologischer Vergleich des Nierenparenchyms von Cathepsin B^{-/-}-Mäusen und Wildtypmäusen. Zur Übersicht wurden Schnitte des Nierengewebes mit Masson-Trichrom-Färbung angefärbt. Es gibt keine ersichtlichen Unterschiede zwischen beiden Mausarten. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 µm Länge.

4 Diskussion

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass der podozytäre Verlust Cathepsin Bs im Tierversuch den Verlauf der fokal-segmentalen Glomerulosklerose günstig beeinflusst. Außerdem konnte in der Zellkultur nachgewiesen werden, dass Cathepsin B die Expression ENaCs in Sammelrohrzellen *in vitro* beeinflusst sowie, dass alpha-ENaC eine Schnittstelle für Cathepsin B aufweist, bei der eine Punktmutation die proteolytische Prozessierung und damit einhergehende Aktivierung des Kanals verhindert.

4.1 Die Tierexperimente verdeutlichen *in vivo* glomeruläre und tubuläre Effekte Cathepsin Bs

Die neuartige Nphs2^{Δpod}; Ctsb^{Δpod}-Maus unterscheidet sich von der Nphs2^{Δpod}-Maus ausschließlich durch das zusätzliche podozytäre Fehlen Cathepsin Bs und ist daher mit selbiger auf die bestmögliche Art vergleichbar. Die Kontrollgruppe zeichnet sich durch das Fehlen Cres aus, sodass der genetisch-induzierbare Knockout nicht stattfinden kann. Podocin findet sich ausschließlich in Podozyten, weswegen sich die Bestimmung des Knockouts durch die Aufbereitung des Nierengewebes mittels Membranfraktion und anschließender Western Blot-Analysen durchführen lässt, ohne durch die anderen Zellen der Niere bzw. derer Proteinlysate beeinträchtigt zu werden. Da Cathepsin B auch von allen anderen Zellen der Membranfraktionslysate gebildet und im Podozyten, verglichen mit beispielsweise den Zellen des proximalen Tubulus oder Endothelzellen (Saudenova et al. 2022), ohnedies schwächer exprimiert wird, würde eine reine Western Blot-Analyse den Knockout Cathepsin Bs nicht adäquat darstellen können. Da Ctsb und Nphs2 jedoch in der gleichen Kasette gefloxt wurden, ist die Quantifizierung des Knockouts von Nphs2 exakt auf Ctsb übertragbar. Um zusätzlich den Verlust Cathepsin Bs im Podozyten darzustellen, wurden mikroskopische Aufnahmen durchgeführt, bei denen Cathepsin B durch Immunhistochemie markiert wurde. Der Erfolg des Knockouts wurde also anhand mehrerer Methoden verifiziert, der Knockoutgrad war mit etwa 90 % bei beiden Gruppen sehr hoch. Die Originalpublikation beschrieb für das Mausmodell der Nphs2^{Δpod}-Mäuse einen Rückgang der Podocin-mRNA von circa 80 % vier Wochen nach Tamoxifengabe, also demselben Zeitpunkt, wie bei unseren Versuchen, auch wenn der Knockout an dieser Stelle mittels Real-Time PCR bestimmt worden ist (Mollet et al. 2009). Die im Experiment nach Induktion des nephrotischen Syndroms erreichten systolischen Blutdruckwerte waren bei allen drei Gruppen mit Ausgangswerten von 100 mmHg etwas höher als die von Larionov et al. 2019 gemessenen Werte. Der Anstieg bei den Nphs2^{Δpod}-Mäusen

war dafür ziemlich genau so stark, wie seinerzeit bestimmt, sodass die Ergebnisse mit vorherigen Resultaten in Einklang zu bringen sind; zumal die früheren Werte unter 100 mmHg eher gering wirken. Dass die Blutdruckwerte bei den $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen gegen Ende des Experiments ebenfalls erhöht sind, könnte neben der Wirkung Cathepsin Bs aus anderen Zellen auch ein Effekt der zahlreichen anderen Proteasen sein, die im Urin nephrotischer Mäuse am Ende des Experiments auftreten, beispielsweise auch die Serinproteasen, die andere Autoren als hauptursächlich für die Natriumretention vermuten. Wesentlich festzuhalten ist aber, dass auch diese Blutdruckwerte gegenüber den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen bis zum Ende des Experiments erniedrigt bleiben. In Anbetracht der Tatsache, dass das Cathepsin B ausschließlich im Podozyten fehlt, ist dieser Sachverhalt bemerkenswert, bedeutet es doch, dass entweder tatsächlich Cathepsin B, im Glomerulus freigesetzt, einen Effekt auf ENaC haben könnte, oder die abgemilderte glomeruläre Schädigung auf eine andere Weise entlang des Tubulussystems den Mechanismus, der ENaC aktiviert, in seiner Wirkkraft reduziert. Denkbar wäre, dass Cathepsin B im Rahmen der Entzündungsreaktion an anderen inflammatorischen Prozessen beteiligt ist und im Tubulointerstitium unabhängig vom glomerulären Anteil seine Wirkung entfaltet, wie beispielsweise auch im Zusammenhang mit den Schaltzellen des Sammelrohrs vermutet wurde. Selbige könnten demnach, da sie beim neprotischen Syndrom außerordentlich viel Cathepsin B besitzen, einen parakrinen Effekt ausüben (Larionov 2017). Die Schädigung des glomerulären Filters manifestiert sich bei der Proteinurie dadurch, dass frühzeitig vor allem Albumin ausgeschieden wird. Die Zeitpunkte, die für die Spontanurinauswertung gewählt wurden, orientierten sich daher an Erfahrungswerten. Gewählt wurde ein früher Wert, der nicht durch die Injektion beeinflusst ist, an dem die Albuminurie der $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse allerdings erfahrungsgemäß einsetzt (Tag 10), ein mittlerer Wert eine Woche darauf (Tag 17), und ein später Wert, an dem die Proteinurie vollständig ausgeprägt sein sollte (Larionov 2017). Auch die absoluten Protein- bzw. Albuminwerte, die die $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse erreichten, passten zu den bereits publizierten Daten (Larionov 2017). Werte, die in anderen Modellen erreicht werden, unterscheiden sich hierbei sowohl zeitlich, als auch in der Intensität, da diese Modelle gänzlich anders konzeptioniert sind; so werden beim Doxorubicinmodell Werte von über 150 mg Protein/mg Kreatinin im Urin bereits 8 Tage nach der Doxorubicingabe erreicht (Haerteis et al. 2018). Da die $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse sich bis auf den zusätzlichen podozytären Cathepsin B-Knockout nicht von den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Tieren unterscheiden, der Knockoutgrad beider Gruppen nahezu identisch ist und andersartige Hintergrundeffekte aufgrund der Zucht und der Haltungsweise auszuschließen sind, gibt es für die Diskrepanz zwischen den beiden Gruppen keine andere Erklärung, als einen Einfluss Cathepsin Bs auf die Albumin- bzw.

Proteinausscheidung. Bei der Albuminurie erreichen die $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse gegen Ende ähnliche Werte wie die $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse, der Effekt podozytären Cathepsin Bs scheint die Albuminurie also nur zeitlich zu verzögern; bei der Proteinurie sind an Tag 24 die Werte zwar unterschiedlich, die Tendenz, dass die $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse zeitlich verzögert folgen, ist aber zu erkennen. Die morphologische Auswertung der glomerulären Schäden hingegen, die nach vier Wochen stattfand, ergab signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Ursächlich könnte für diese, auch nach vier Wochen markanten Unterschiede sein, dass der morphologische Schaden sich histologisch erst wirklich manifestiert, sobald der glomeruläre Filter stärker geschädigt ist. Die Daten zum Auftreten morphologischer Veränderungen variieren hierbei zwischen der Originalpublikation (Mollet et al. 2009), die nach zwei und vier Wochen histologische Auswertungen durchgeführt hatte und die FSGS entsprechend erst nach vier Wochen klassifizierte, und den uns bekannten Daten der eigenen Zucht (Larionov 2017), bei denen schon nach 17 Tagen morphologische Veränderungen ins Gewicht fielen. Dieser Zeitraum, zwischen der zweiten und vierten Woche, blieb in der Originalpublikation histologisch unerfasst. Die tubulointerstitiellen Schädigungen treten dafür bekannterweise spät im Experiment auf (Larionov 2017). In den entsprechenden Gruppen lassen sich zum Ende des Experiments ebenfalls Unterschiede feststellen, allerdings fallen diese nicht so deutlich aus, wie die glomerulären Schädigungen. Dass die betroffenen Zellen Cathepsin B selbst weiterhin produzieren können, könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein. In jedem Fall hätte sich die FSGS spätestens nach vier Wochen vollständig etablieren müssen.

Die Zymographie der Urinproben diente der Gesamtanalyse verschiedener Proteasen im nephrotischen Syndrom auch losgelöst von der Rolle Cathepsin Bs. Larionov 2017 hatte das massive Auftreten der Proteasen bereits ab Tag 12 und damit noch frühzeitiger als in unseren Experimenten festgestellt, da wir bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen die Proteasurie erst ab Tag 14 wirklich zeigen konnten. Dieser eher kleinere Unterschied sollte angesichts der Differenzen zwischen $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen nicht weiter ins Gewicht fallen. Bei der Auswertung traten in allen Gruppen, also auch bei der Kontrollgruppe, Banden jenseits der 200 kDa auf und wurden daher nicht als spezifische Bestandteile der Proteasurie betrachtet; sie hätten andernfalls die Werte zu stark verzerrt und die Auswertung nahezu verunmöglicht. Die angewendete Methode, die Zymogramme auszuwerten, hat, bezogen auf die ganzen Gruppen, den Nachteil, dass einzelne, starke Banden den Gesamtwert verzerren können, sodass insbesondere im Bereich zwischen Tag 2 und Tag 11 diese Quantifizierung möglicherweise den tatsächlichen Umständen nicht ganz gerecht wird. Ein sehr starkes Signal egalisiert aufgrund

seines hohen, mit ImageJ gemessenen Wertes leicht die Nullwerte der anderen Tiere innerhalb der Gruppe und überlagert somit auch schwache Werte anderer Gruppen. Da für jedes Gel einzeln der Hintergrund, im Idealfall möglichst niedrig, bestimmt und von den Werten abgezogen werden musste, um eine Gleichbehandlung nach der Färbung und dem Einscannen des Bildes gewährleisten zu können, können schwach gefärbte Banden leicht untergehen, wie es bei den $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäusen zwischen Tag 2 und Tag 11 zu erkennen ist. So haben auch die $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse an Tag 9 und Tag 11 auf niedrigem Niveau höhere Werte in Summe als die $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse, was ausschließlich auf die jeweils bei einzelnen Tieren singulär auftretenden, wenn doch auch als spezifisches Signal zu interpretierenden Banden, zurückzuführen ist. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass die Werte unter 10000 arbiträren Einheiten nicht besonders gut aufgelöst sind. Erst wenn die Signale eine gewisse Schwelle über dem Hintergrund erreichen, geben sie die Proteasurie zuverlässig wieder, wie es ab Tag 14 klar ersichtlich ist. Hier heben sich die Tiere deutlich genug vom Hintergrund ab und ermöglichen so die Quantifizierung der Unterschiede zwischen den Tiergruppen über die reine Blickdiagnostik hinaus. Statistische Signifikanz zu erreichen war auf diese Weise daher ebenfalls nur an zwei Tagen möglich, obwohl das bloße Auge beim Betrachten auch an den Tagen unmittelbar davor sowie danach die $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse unterscheiden konnte; dieser Effekt wäre bei sehr hoher Tieranzahl im Experiment aber vermutlich aufzulösen. Durch die Zymographie hingegen sehr gut dargestellt ist, dass die Proteasen bereits vor der großen Proteinurie einsetzen, nämlich vor Tag 18. Zu diesem Zeitpunkt hat die Proteinurie der $Nphs2^{\Delta pod}$ -Mäuse zwar schon begonnen, die Werte sind aber noch nicht groß genug, als dass man sie, normiert auf 1 μ g Kreatinin, im Gel beobachten kann, während der Effekt der Proteasen bereits davor zum Tragen kommt. Bedenkt man die vermutete Wirkung der Proteasen auf ENaC, kann hier verifiziert werden, was Larionov et al. 2019 mit diesen Mäusen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Salzretention und der ihr nachfolgenden Proteinurie gezeigt haben. Dass Cathepsin B-spezifische, frühzeitig auftretende Proteasenbanden in diesen Versuchen nicht gezeigt werden konnten, könnte möglicherweise an dem Einsatz von Gelatine im Gel liegen, die verwendet wurde, um ein möglichst breites Spektrum an Proteasen abbilden zu können. Ein Substrat speziell für Cathepsin B wäre in diesem Fall hilfreicher gewesen. Tiefergehende Untersuchungen diesbezüglich am gleichen Mausmodell wurden allerdings bereits zuvor durch high-performance liquid chromatography (HPLC) durchgeführt (Larionov 2017).

Nachdem die Tierexperimente klare Unterschiede zwischen Mäusen, die Cathepsin B im Podozyten exprimieren und denen, die es nicht können, bei der Entstehung der FSGS aufzeigten, stellte sich die Frage, ob Cathepsin B bereits im Normalzustand einen Einfluss auf die renale Physiologie haben könnte, weswegen vollständige Cathepsin B-Knockoutmäuse mit Wildtypkontrolltieren im unbelasteten Zustand verglichen wurden. Da ein entsprechender phänotypischer Unterschied in der Literatur bislang nicht bekannt war, ist es aber wenig überraschend, dass die Cathepsin B^{-/-}-Mäuse bei diesem Vergleich keine veränderten Blutdruckwerte aufwiesen, ebenso, wie die Expression ENaCs und der Na/K-ATPase unverändert war. Da Cathepsin B auch im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielt, wäre theoretisch vorstellbar gewesen, dass der Knockout minimale, bereits bestehende arteriosklerotische Veränderungen nivellieren könnte, sprich, dass der Blutdruck eher leicht erniedrigt sein könnte. Dies ist allerdings nicht der Fall, womit sich unsere Daten der verwendeten Knockoutmaus in die Reihe an Untersuchungen einreihen, die keinen speziellen Phänotyp bei alleinigem Vorliegen des Ctsb-Knockouts ausmachen, sofern die Tiere nicht pathophysiologisch gestresst werden (Tholen et al. 2013).

Betrachtet man nun abschließend die Versuche mit den Mäusen, hat unsere Arbeit es geschafft, den tatsächlichen Einfluss der Protease Cathepsin B für die Entwicklung des nephrotischen Syndroms im Tierexperiment darzustellen sowie, gemessen durch die Blutdruckwerte, auch einen Einfluss auf ENaC bestätigt. Cathepsin B spielt demnach vom Glomerulus ausgehend entlang des Tubulussystems eine Rolle bei der Progression des nephrotischen Syndroms im Zusammenhang mit FSGS und könnte einen möglichen, pharmakologischen Ansatzpunkt bieten, sofern geklärt ist, wie die Erkenntnisse des Tiermodells auf die klinische Situation bei FSGS-Patienten übertragbar sind.

4.2 Die Zellkulturexperimente zeigen den fördernden Einfluss Cathepsin Bs auf die ENaC-Expression und die Kanalaktivität

Oozyten des Krallenfrosches sind in der Elektrophysiologie ein bewährtes Modell und für die Untersuchung von ENaC ein vielfach durchgeführtes Verfahren. Die proteolytische Spaltung ENaCs wurde bereits mehrfach an diesem Modell demonstriert, sowohl im Allgemeinen für Serinproteasen aus Rattenurin des PAN-Modells (Svenningsen et al. 2009), als auch konkret für einzelne Proteasen wie zum Beispiel durch uPA aktiviertes Plasmin (Bohnert et al. 2019), Kallikerin (Haerteis et al. 2018) oder auch für die Cysteinprotease Cathepsin S (Haerteis et al. 2012). Auffällig ist bei den Versuchen zu Plasmin und Plasma-Kallikerin, dass die Ergebnisse

der Zellkultur im Tierexperiment hinsichtlich der vermuteten Bedeutung der Protease für das nephrotische Syndrom nicht bestätigt werden konnten, während die proteolytische Aktivierung ENaCs und der dadurch verursachte transzelluläre Stromfluss am Oozytenmodell klar ersichtlich waren. Bezüglich Cathepsin B wurde das Oozytenmodell ebenfalls bereits zuvor verwendet (Tan et al. 2014). In diesem Fall wurde auch durch extern in die Oozytenlösung gegebenes Cathepsin B ein Anstieg des transzellulären, ENaC-bedingten Stromflusses um etwa das 2,5-3-fache gemessen; Werte also, die in den oben gezeigten Ergebnissen gleichermaßen beobachtet und von uns entsprechend verifiziert werden konnten. Im Gegensatz jedoch zu den oben gezeigten Versuchen verwendeten Tan et al. 2014 anschließend eine Kombination aus beta-ENaC, mutiertem alpha-ENaC und mutiertem gamma-ENaC, bei welchen alpha-ENaC an den Positionen 202, 205, 228 und 231 und gamma-ENaC zwischen den Positionen 135 und 138 verändert wurden. Diese Mutationen allein führten zu einer geringeren Ausgangsstromstärke des Kanals auf weniger als ein Achtel verglichen mit normalem ENaC, wohingegen der Cathepsin B-bedingte Stromanstieg relativ zu dem geringeren Ausgangswert in etwa ähnlich stark ausfiel, selbsterklärend deutlich reduziert zu den Werten des mit Cathepsin B behandelten normalen ENaCs. Ursächlich könnte hierbei sein, dass die Mutationen im Bereich der Schnittstelle für Furin durchgeführt wurden, wohingegen die von uns veränderten Aminosäuren alpha-ENaCs sich spezifisch an den drei Positionen 173, 182 und 199 befanden, an welchen durch die Position des Glycins die Schnittstelle für Cathepsin B vermutet werden kann (Biniossek et al. 2011). Der Ausgangswert blieb bei normalem ENaC verglichen mit der Mutation unverändert, wohingegen der Stromanstieg reduziert werden konnte. Für die Protease Plasmin konnten Bohnert et al. 2019 zeigen, dass uPA und Plasminogen, gemeinsam in die Zelllösung für Oozyten gegeben, murine ENaC-Kanäle aktivieren können, da uPA Plasminogen zu Plasmin umwandeln kann. Aktives Plasmin führte im Oozytenexperiment zu einer Spaltung gamma-ENaCs, dargestellt durch ein 67 kDa großes Spaltfragment. Der transzelluläre Stromanstieg bewegte sich dabei in etwa im Bereich des Doppelten des Ausgangswertes. Ebenfalls wurde in Bezug auf humane ENaC-Untereinheiten exprimierende Oozyten auch bei Versuchen mit Plasma-Kallikrein im Oozytenmedium ein ENaC-spezifischer Stromanstieg um etwa das Dreifache bis Vierfache gegenüber der Negativkontrolle gemessen (Haerteis et al. 2018); dieser wurde gleichermaßen der proteolytischen Spaltung gamma-ENaCs zugeschrieben. Das gleiche Spaltfragment für gamma-ENaC wurde auch bei Versuchen mit Cathepsin S und Oozyten, die menschliches ENaC exprimierten, festgestellt, dabei war Cathepsin S ebenfalls in der Lage, ENaC konzentrationsabhängig zu aktivieren (Haerteis et al. 2012). All diese Experimente fokussieren sich letztlich auf die Spaltung gamma-ENaCs sowie

die damit einhergehende Aktivierung des Kanals. Ergänzend zu diesen Ergebnissen zeigen unsere Versuche nun, dass Proteasen des nephrotischen Syndroms auch auf alpha-ENaC eine spezielle, die Aktivität des Kanals in vitro beeinflussende Wirkung erzielen können, indem Cathepsin B einen Effekt auf alpha-ENaC auszuüben vermag, der durch Mutation der Schnittstelle aufgehoben werden kann. Die kleineren Mutationen der Glycinaminosäuren dieser Bereiche zu Alanin haben dabei einen geringen Einfluss, wohingegen eine deutlich längere Seitenkette, wie bei Isoleucin, diesen Effekt vollständig bewirken kann. Unklar ist in diesem Zusammenhang noch, ob der Cathepsin B-Effekt und sein Ausbleiben bei der alpha-ENaC Mutation auf proteolytische Spaltung oder auf eine Veränderung der ENaC-Degradation, die daraufhin zu einer längeren Membranhalfwertszeit und damit assoziierter Akkumulation ENaCs führt, zurückzuführen ist. Versuche unsererseits, Spaltfragmente durch Oberflächenbiotinylierung darzustellen, haben uneindeutige Ergebnisse hervorgerufen (Ergebnisse nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang haben Alli et al. 2012 jedoch bereits demonstriert, dass alpha-ENaC durch Cathepsin B in vitro gespalten werden kann und die Schnittstelle für Cathepsin B in der extrazellulären Schleife alpha-ENaCs vermutet. Die Elektrophysiologie konnte zusammenfassend einen Zusammenhang zwischen der Wirkung Cathepsin Bs und alpha-ENaC feststellen und so eine potenzielle Funktion dieser Protease im Zusammenhang mit dem nephrotischen Syndrom experimentell verifizieren.

Die Zellkulturexperimente mit Cathepsin B und immortalisierten Zelllinien gestalteten sich insgesamt eher schwierig: Anders als bei den Oozytenexperimenten, führte ein einfaches Inkubieren des Zellmediums der mpkCCD14-Zellen mit Cathepsin B nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Anstelle einer erwarteten Veränderung auf Proteinebene hinsichtlich der Expression oder des Auftretens bzw. vermehrten Auftretens eines Spaltfragments unterschieden sich die Expressionsraten der ENaC-Untereinheiten zwischen einzelnen Experimenten so stark, dass keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Ebenso gestalteten sich Vergleiche zwischen Cathepsin B exprimierenden mpkCCD14-Zellen und den mpkCCD Ctsb KO-Zellen schwierig, da die einzelnen Knockoutklone beim Passagieren unterschiedlich schnell konfluent wurden und beim Vergleich mit den normalen Zellen Cathepsin B-Effekte möglicherweise überlagert wurden. Durch die Retransfektion der Knockoutzellen mit Cathepsin B bot sich die Möglichkeit, innerhalb einer einzelnen Passage mit vollständig gleich behandelten Zellen, die Unterschiede durch die Immunhistochemie sichtbar zu machen, da die Zellen klar in einer mikroskopischen Aufnahme voneinander abgegrenzt werden konnten. Humanes Cathepsin B weist ähnliche

Eigenschaften wie murines Cathepsin B auf und ist als Transgen bereits im Tierversuch mit Mäusen angewendet worden (Sevenich et al. 2011), weshalb prinzipiell nichts gegen die Transfektion muriner Sammelrohrzellen mit humanem Cathepsin B spricht, welches als Plasmid zu Verfügung stand. Die Transfektionsrate betrug im Durchschnitt etwa 10 %, unterschied sich zwischen den einzelnen Versuchen aber auch nicht wesentlich. Insgesamt wurden vier verschiedene Transfektionen durchgeführt, bei denen 74 Bilder angefertigt wurden. Mit über 125 retransfizierten Zellen sowie noch wesentlich mehr Kontrollzellen konnte eine ausreichend hohe Stichprobe für die Auswertung gamma-ENaCs erreicht werden. Bei der Auswertung LAMP1s ergab sich bereits bei über 50 retransfizierten Zellen und wesentlich mehr Kontrollzellen, dass sich keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr einstellen würden. Der Anstieg der gamma-ENaC-Expression fand nach der Retransfektion mit Cathepsin B ungefähr in dem Ausmaß statt, wie es bei FSGS im Tierversuch gemessen werden konnte (Larionov 2017). Dass LAMP1 nach der Retransfektion der Knockoutzellen mit Cathepsin B unverändert blieb, zeigt zum einen, dass Cathepsin B bei murinen Sammelrohrhauptzellen, im Gegensatz beispielsweise zu Knochenmarksmakrophagen (BMDM) (Qi et al. 2016), die Lysosomenzahl und damit die lysosomale Biogenese nicht zu verändern scheint. Zum anderen deutet die ausgebliebene Veränderung LAMP1s darauf hin, dass die verstärkte Expression gamma-ENaCs nicht auf in Lysosomen ablaufenden Effekten beruht. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang gewesen, dass Cathepsin B, ähnlich wie für BMDM beschrieben, die lysosomale Biogenese negativ beeinflusst, weshalb eine verminderte Lysosomenzahl ENaC wesentlich schlechter abbauen kann und ENaC sich in der Zelle akkumulieren würde. Die Bedeutung lysosomaler Degradation von ENaC scheint in diesem in vitro Modellversuch daher eine mindestens untergeordnete Rolle zu spielen. In der Zelle ist für den Abbau ENaCs grundsätzlich die Ubiquitinierung essentiell; wobei intrinsisch exprimierte ENaC-Untereinheiten im Regelfall mehrfach ubiquitiniert und im Anschluss durch das Proteasom abgebaut werden, während überexprimiertes ENaC oder transfizierte ENaC-Kanäle monoubiquitiniert und lysosomal degradiert werden (Eaton et al. 2010). Unsere Daten sind mit diesen Ergebnissen in Einklang zu bringen, da die mpkCCD14-Zellen auch nach Cathepsin B-Knockout ENaC intrinsisch bilden. Nicht ganz eindeutig ist der tatsächliche Anteil gamma-ENaCs in der Plasmamembran, da die ausgewerteten Signale die ganzen Zellen beinhalten und nur ein kleiner Anteil der Kanäle in der Plasmamembran eingebaut ist. Um den Abbau ENaCs weiter zu verstehen, würde es sich, nach Ausschluss des lysosomalen Degradationswegs anbieten, die Versuche zu wiederholen und dabei den proteasomalen Degradationsweg zu überprüfen, indem man feststellt, ob die Expression gamma-ENaCs nach Retransfektion bei

gleichzeitiger Gabe eines Proteasominhibitors, wie MG-132, unverändert bleibt. Da sich gamma-ENaC und beta-ENaC leicht von alpha-ENaC unterscheiden, ist die Aussagekraft der Zellkulturexperimente mit den CRISPR-Zellen nur begrenzt auf alle drei Untereinheiten übertragbar. Entscheidende Limitierung war an dieser Stelle die Funktionalität der verwendeten Antikörper in der Immunhistochemie, die bei beta- und alpha-ENaC nicht sehr gut war. Um die Aussagekraft dieser Experimente zu erhöhen, müssten sie daher für beta-ENaC und insbesondere für alpha-ENaC mit jeweils besseren Antikörpern wiederholt werden.

4.3 Die möglichen Mechanismen hinter Cathepsin B im nephrotischen Syndrom

Aufgrund der Tatsache, dass das Fehlen Cathepsin Bs im Podozyten die Entwicklung der FSGS positiv beeinflusst, stellt sich die Frage, welcher Wirkmechanismus Cathepsin Bs bei der Schädigung des glomerulären Filters zugrunde liegt. Grundsätzlich wäre vorstellbar, dass das podozytäre Cathepsin B innerhalb der Zelle oder, sezerniert, auch auf andere Bestandteile der Blut-Harn-Schranke Einfluss nehmen kann. Da Cathepsin B Ähnlichkeiten mit der Cysteinprotease Cathepsin L aufweist, lohnt sich ein Vergleich mit möglichen, für das nephrotische Syndrom beschriebenen Wirkmechanismen Cathepsin Ls. Cathepsin L wird bei Nephropathie im Zusammenhang mit Diabetes mellitus als ursächliche Protease in Erwägung gezogen. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die kein Cathepsin L bilden können, bei Vorliegen von Typ 1 Diabetes eine normale Nierenfunktion haben und keine Albuminurie entwickeln (Keisuke et al. 2020). Die Autoren diskutieren hierbei den Zusammenhang zwischen Cathepsin L und den Proteinen Dynamin und Synaptopodin, da Synaptopodin als ein mit Aktin assoziiertes Protein als Teil des Zytoskeletts in Podozyten im dephosphoryliertem Zustand durch Cathepsin L degradiert werden kann (Keisuke et al. 2020). Dynamin hat eine entscheidende Bedeutung für die Organisation des Zytoskeletts und kann ebenfalls durch Cathepsin L gespalten werden, wodurch Proteinurie ausgelöst werden kann (Sever et al. 2007). Zusätzlich ist Dynamin 2 verantwortlich für die Internalisierung ENaCs aus der Plasmamembran (Eaton et al. 2010), was auch einen Ansatzpunkt für den Effekt Cathepsin Bs auf die Expression ENaCs bieten würde.

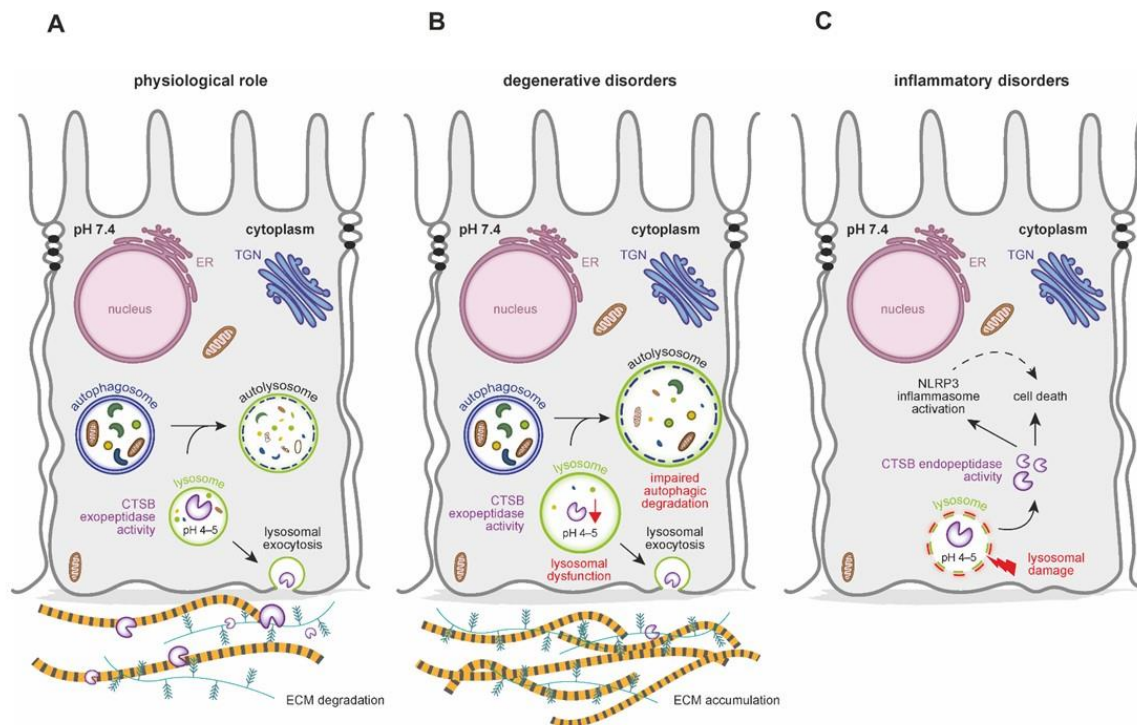


Abb. 26: Die Rolle Cathepsin Bs in der Zelle. Aus Saudenova et al. 2022. **A:**

Physiologische Rolle Cathepsin Bs im Lysosom; **B:** Erniedrigte Cathepsin B Werte im Lysosom bei degenerativen Erkrankungen beeinträchtigen die Autophagie, stören die lysosomale Funktion und führen zu einer Akkumulation extrazellulärer Matrix; **C:** Bei inflammatorischen Prozessen kann freigesetztes Cathepsin B im Zytosol das NLRP3-Inflammasom aktivieren und den programmierten Zelltod einleiten. ER = endoplasmatisches Retikulum, ECM = extrazelluläre Matrix, TGN = trans-Golgi-Netzwerk.

Auch CD2AP, das als Ankerprotein Nephrins einen wichtigen Bestandteil der Blut-Harn-Schranke bildet, wird als potenzielles Substrat Cathepsin Ls vermutet, da CD2AP bei Fehlen von Cathepsin L im PAN-Modell vor Degradation geschützt ist (Reiser et al. 2010). Das Resultat, dass nämlich das Fehlen einer lysosomalen Cysteinprotease, in diesem Fall Cathepsin L, den Verlauf des glomerulären Schadens bei Typ 1 Diabetes günstig beeinflusst, erinnert an die oben gezeigten Ergebnisse. Während der podozytenspezifische Knockout von Cathepsin B im Tamoxifen-induzierbarem Mausmodell jedoch die Albuminurie nur zeitlich verzögert sowie deren Ausprägung zum Endpunkt des Experiments verringert, fehlt die Albuminurie bei den Cathepsin L-Knockoutmäusen der diabetischen Nephropathie vollständig (Garsen et al. 2016). Auch die morphologischen Veränderungen während der diabetesbedingten Nierenschädigung,

bestehend aus tubulointerstitiellen Fibrosen, Makrophageninvasion und Proliferation des Mesangiums, fielen bei Cathepsin L-Knockoutmäusen nach Initiierung des Typ 1 Diabetes verglichen mit den diabetischen Wildtyp-Tieren deutlich geringer aus. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass sich der Versuchsaufbau zwischen FSGS und diabetischer Nephropathie wesentlich unterscheidet; so erfolgte die Auswertung bei den Diabetesmäusen in diesem Experiment in einem Zeitraum von bis zu 16 Wochen, während die FSGS-Tiere nach Tamoxifeninjektion eine solche Zeitspanne nicht überleben würden und das Krankheitsbild in weniger als 4 Wochen ausprägen (Mollet et al. 2009). Im Ergebnis kommen Garsen et al. 2016 für die Diabetesmäuse zu dem Schluss, dass Cathepsin L elementar für die Ausprägung der diabetischen Nephropathie ist, während der podozytenspezifische Knockout Cathepsin Bs bei unseren Versuchen das Krankheitsbild der FSGS lediglich abschwächt bzw. zeitlich verzögert. In eine ähnliche Richtung mit Hinblick auf den Einfluss von Cysteinproteasen auf das Zytoskelett führen neuere Ergebnisse zu der Cysteinprotease Cathepsin C, die ergeben, dass Podozyten, die unter hoher Zuckerkonzentration kultiviert werden, Cathepsin C überexprimieren (Audzeyenka et al. 2020). Der Proteinkinase C-Aktivat Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), der in diesen Experimenten nachweislich Cathepsin C aktivieren konnte, ist bereits dafür bekannt, auch die Cathepsin L, K und B aktivieren zu können; außerdem führte die Inkubation der Podozyten mit PMA, ebenso wie die erhöhte Zuckerkonzentration, zu einer erhöhten Permeabilität für Albumin (Audzeyenka et al. 2020). PMA bewirkte des Weiteren eine Umstrukturierung des podozytären Zytoskeletts, weshalb die Autoren neben Cathepsin L auch Cathepsin C-Effekte auf das Zytoskelett diskutieren, nachdem sie zeigen konnten, dass das Ausschalten Cathepsin Cs die Effekte des PMAs aufheben konnte. Daher ist die Frage zu stellen, ob Cathepsin B in ähnlicher Weise wirken könnte, bedenkt man die Wechselwirkung von PMA und Cathepsin B sowie die Tatsache, dass Cathepsin B von allen anderen Cathepsinen am ehesten mit Cathepsin C und Cathepsin Z verwandt ist. Es wäre daher vorstellbar, dass Cathepsin B ähnlich wie Cathepsin L oder möglicherweise Cathepsin C, direkte oder indirekte Komponenten des Zytoskeletts der Podozyten degradieren kann und das Fehlen Cathepsin Bs daher die Podozyten vor stärkerer Schädigung schützt, zumindest so lange, bis andere Proteasen, die später durch den geschädigten Filter gelangen, die Wirkung Cathepsin Bs ersetzen können. Dass das Zytoskelett des Podozyten vielfach für Proteasen Ansätze für proteolytische Prozessierungen bietet, ist auch das Ergebnis von N-Degradomic-Analysen an humanen, mit Puromycin behandelten Podozytenkulturen (Rinschen et al. 2017). Diese kommen zu dem Schluss, dass wahrscheinlich ein ganzes Netzwerk aus Proteasen an dem Ab- und Umbau von Zytoskelettkomponenten beteiligt ist; insbesondere Caspase 3, die ihrerseits

wiederum auch Cathepsin B aktivieren kann, wird eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Rinschen et al. 2017). Das Zytoskelett könnte auch Ansatzpunkt für die Einflussnahme auf ENaC sein, da die Aufnahme der ENaC-Untereinheiten aus der Plasmamembran Dynamin 2 abhängig ist (Eaton et al. 2010).

Neben der Wirkung auf Bestandteile des Zytoskeletts käme auch die glomeruläre Basalmembran als Ansatzpunkt für den Effekt Cathepsin Bs in Frage. Die Wirkung der Cysteinproteasen Cathepsin B, L und H sind bereits früher im Zusammenhang mit glomerulären Schädigungen beschrieben worden, so konnten Baricos et al. 1990 in vitro Hinweise auf eine Beteiligung dieser Enzyme an der Degradation der GBM finden. Cathepsin B hätte demnach eine Wirkung, die Parallelen zu seiner Beteiligung beim Abbau der Extrazellulärmatrix und Basalmembranen im Zusammenhang mit malignen Tumoren aufweist. Für diese Hypothese spricht, dass bei Patienten mit cFSGS, einer morphologisch weiter definierten Unterform der FSGS, die sich durch den vollständigen Kollaps des Kapillarknäuels auszeichnet, Cathepsin B nicht nur vermehrt im Urin auftrat, sondern auch die Transkription der Cathepsine B und C erhöht war (Merchant et al. 2020). Über TGF- β könnte Cathepsin B laut den Autoren Einfluss auf die Regulation extrazellulärer Matrixproteine nehmen und an der Infiltration der Glomeruli durch Zellen des parietalen Blatts der Bowman-Kapsel beteiligt sein. Allerdings ergaben sich keine Hinweise darauf, dass die Cathepsine B oder C selbst die erhöht anfallenden Degradationsprodukte der extrazellulären Matrixproteine bei cFSGS zu verantworten haben; so fanden sich in silico für die Matrixproteine keine bekannten Schnittstellen für Cathepsin C und nur 8 bekannte für Cathepsin B, bei denen die Peptide allesamt keine Unterschiede zur Kontrollgruppe ergaben (Merchant et al. 2020).

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt wäre eine bekannte Beteiligung Cathepsin Bs an der Entstehung des NLRP3-Inflammasoms, bei dem nach Freisetzung Cathepsin Bs aus dem Lysosom ins Zytosol die NLRP3-Aktivierung und damit im weiteren Geschehen auch die Aktivierung von Caspasen und proapoptotischen Genen veranlasst wird, wodurch über weitere Signalwege letzten Endes der Zelltod eingeleitet wird (Saudenova et al. 2022). Da in Podozyten der erste Schritt des Primings für eine bedingte, konstante Inflammasomentstehung nicht von Nöten ist, könnte durch die Cathepsin B Freisetzung das NLRP3-Inflammasom direkt über Interleukin-1 β sowie den resultierenden anderen Zytokinen die Podozyten schädigen (Saudenova et al. 2022). Die speziellen Zusammenhänge zwischen Cathepsin B und dem NLRP3-Inflammasom im Bereich der Glomeruli bzw. des Nierensystems sowie die von

Caspasen beim nephrotischen Syndrom werden daher in naher Zukunft im Besonderen Gegenstand der Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe sein.

Als letzte Möglichkeit kommt an Einflussmöglichkeiten noch die Rolle Cathepsin Bs als lysosomale Protease bei Autophagie in Frage. Die Auswertung von Biopsien, entnommen von Patienten mit MCGN, ergab, dass die Zahl an autophagischen Vakuolen in Podozyten und Proteinurie sowie Podozytenfüßschädigung positiv korrelierte (Ogawa-Akiyama et al. 2020). Allerdings ist von Cathepsin B bekannt, dass es, zumindest für Neuroblastomzellen und Knochenmarksmakrophagen (BMDM), die Autophagie eher hemmend beeinflusst; dass der Verlust Cathepsin Bs also zu einem Anstieg der Autophagie und lysosomaler Biogenese führt (Qi et al. 2016). Da in unseren oben gezeigten Zellkulturexperimenten mit murinen Sammelrohrzellen keine Veränderung auf lysosomaler Ebene durch die Retransfektion mit Cathepsin B feststellbar war, ist nicht auszuschließen, dass Cathepsin B auf einzelne Zelltypen sehr unterschiedliche Auswirkungen haben kann; einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der von den Autoren beschriebenen stärkeren Autophagie und Cathepsin B ist allerdings nicht direkt ersichtlich. Einen entsprechenden Effekt gilt es für Podozyten zu untersuchen. Grundsätzlich ist aufgrund der mannigfaltigen Eigenschaften Cathepsin Bs auch vorstellbar, dass mehrere dieser Aspekte für den verringerten glomerulären Schaden der $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse verantwortlich sind und sich daher in Bezug auf Cathepsin B bei FSGS ein Gesamtbild für die beobachteten Effekte ergibt.

4.4 Ausblick

Neben den neu gewonnenen Erkenntnissen unserer Experimente bedarf es folgerichtig weiterer Untersuchungen, sowohl mit Hinblick auf den Glomerulus als auch auf ENaC. Zum einen ist der zelluläre Mechanismus der ENaC-Regulation mit Blick auf die erhöhte Expressionsrate gamma-ENaCs unklar, sodass geklärt werden muss, ob proteasomale Degradierung, Veränderungen auf mRNA-Ebene, Komponenten des Zytoskeletts, die die Internalisation der Kanaluntereinheiten betreffen, oder gänzlich andere Prozesse für dieses Phänomen verantwortlich sind. Zusätzlich sollte abgeklärt werden, ob diese Ergebnisse auf alpha- und beta-ENaC übertragbar sind. In beiden Fällen bietet es sich an, die Zellkulturexperimente mit den mpkCCD $Ctsb$ KO-Zellen zu wiederholen. Gegebenenfalls wäre auch die Arbeit an einem anderen Zellmodell vielversprechender, wenn gewährleistet ist, dass Cathepsin B im Grundzustand in diesen Zellen nicht überexprimiert auftritt. Grundsätzlich wäre, aufgrund der unterschiedlichen Ubiquitinierung, das Modell mit intrinsisch ENaC-bildenden Zellen anderen,

bei denen ENaC transfiziert werden muss, weiterhin vorzuziehen. Zum anderen müssen die glomerulären Effekte weiter untersucht werden. Hierfür sollen in naher Zukunft die Tierexperimente der $Nphs2^{\Delta pod}$; $Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäuse mit den $Nphs2^{\Delta pod}$; Cathepsin B^{-/-}-Mäusen, bei denen Cathepsin B vollständig fehlt, wiederholt werden, um festzustellen, ob insbesondere der tubulointerstitielle Schaden noch weniger ausgeprägt sein könnte und Cathepsin B eine absolute Schlüsselrolle zukommt. Ebenfalls Teil des Projektes sind die tiefergehende Untersuchung der Inflammation beim nephrotischen Syndrom sowie der mögliche Einfluss extrazellulärer Vesikel bei der Ausbreitung entlang des Tubulussystems. Sollte es sich bei der Wirkung Cathepsin Bs auf ENaC um einen parakrinen Effekt der Schaltzellen handeln, wäre vorstellbar, dass extrazelluläre Vesikel, die eine Möglichkeit der Kommunikation zwischen Zellen darstellen, die Expression Cathepsin Bs veranlassen. Der letzte Schritt bestünde darin, die Rolle Cathepsin Bs bei FSGS vom Tiermodell auf die klinische Situation am Patienten zu übertragen und zu überprüfen, ob Cathepsin B als Marker, insbesondere für die Rezidive der FSGS, in Frage kommt. Für diesen Aspekt sollen Urinproben von FSGS-Patienten mit Rezidivrisiko ausgewertet werden. Aufgrund der epidemiologischen Situation der FSGS ist dieses Unterfangen mit Hinblick auf die Rekrutierung der Patienten allerdings zeitaufwendig und logistisch schwierig, weshalb Ergebnisse dieses Verfahrens eher langfristig zu erwarten sind. In jedem Fall haben unsere Experimente die Bedeutung Cathepsin Bs für die Entwicklung der FSGS jedoch unterstrichen und geben Anlass, ein solches Unterfangen weiter zu verfolgen.

5 Zusammenfassung

Das nephrotische Syndrom ist ein Symptomkomplex, bei dem es durch Schädigung des glomerulären Filters unter anderem zu Proteinurie, Hyperlipidämie, Bluthochdruck und Ödembildungen kommt. Es tritt entweder im Rahmen verschiedener, primär-glomerulärer Krankheiten wie fokal-segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) oder sekundär auf Basis anderer Grunderkrankungen auf. Obwohl der genaue Mechanismus der Entstehung des nephrotischen Syndroms im Zusammenhang mit FSGS unklar ist, haben zahlreiche Publikationen der letzten Jahre die Bedeutung von Proteasen in Bezug auf den epithelialen Natriumkanal ENaC und der durch diesen beim nephrotischen Syndrom ausgelösten arteriellen Hypertonie herausgearbeitet. Nachdem neuere Untersuchungen Hinweise auf eine mögliche, bedeutende Rolle der Cysteinprotease Cathepsin B gefunden hatten, setzten wir uns zur Aufgabe, diese Hintergründe Cathepsin Bs im Zusammenhang mit FSGS zu untersuchen. Hierfür wurde ein neuartiges Mausmodell mit Mäusen, die FSGS entwickeln und deren Podozyten kein Cathepsin B bilden können, verwendet sowie anhand von Zellkulturexperimenten die Auswirkungen Cathepsin Bs auf ENaC in vitro untersucht. Die Tierexperimente ergaben, dass der podozytäre Verlust Cathepsin Bs bei Mäusen sowohl einen vorteilhaften Einfluss auf die Progression der FSGS in den Glomeruli, gemessen an histologischen Befunden und labordiagnostischen Analysen, hat als auch den ENaC-bedingten Blutdruckanstieg reduziert. Mäuse mit podozytärem Cathepsin B- und Podocinknockout wiesen deutlich weniger aktive Proteasen im Urin auf als vergleichbare Mäuse, denen lediglich Podocin fehlte. Phänotypisch unterscheiden sich vollständige Cathepsin B-Knockoutmäuse ohne Erkrankung dabei aus nephrologischer Sicht nicht von Wildtypmäusen. In der Zellkultur konnten wir zeigen, dass Cathepsin B einen fördernden Einfluss auf die Expression von ENaC-Untereinheiten im Sammelrohr hat, da die Retransfektion mit Cathepsin B bei *Ctsb*-defizienten Sammelrohrzellen die Expression gamma-ENaCs signifikant erhöhte. Lysosomal waren durch diese Retransfektion keine Veränderungen ersichtlich, veranschaulicht an der unveränderten Expression von LAMP1. In Bezug auf die Aktivität luminaler ENaC-Kanäle konnten wir zeigen, dass humanes alpha-ENaC eine Schnittstelle für Cathepsin B zwischen Position 173 und 199 besitzt, da Mutationen in diesem Bereich eine proteolytische Aktivierung alpha-ENaCs durch Cathepsin B verringern. Die Daten unterstreichen daher insgesamt, dass Cathepsin B im nephrotischen Syndrom bei FSGS nicht nur im Sammelrohr einen aktivierenden Einfluss auf ENaC auszuüben vermag, sondern auch an den pathologischen Veränderungen im Glomerulus beteiligt zu sein scheint, da sich der podozytäre Verlust Cathepsin Bs günstig auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, N., Sloane, B. F., (2014). Cathepsin B: multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl*, 8(5-6): 427–437.
- Aldigier, J. C., Kanjanbuch, T., Ma, L. J., Brown, N. J., Fogo, A. B., (2005). Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J Am Soc Nephrol*, 16(11): 3306-14.
- Alli, A. A., Song, J. Z., Al-Khalili, O., Bao, H. F., Ma, H. P., Alli, A. A., Eaton, D. C., (2012). Cathepsin B is secreted apically from xenopus 2F3 cells and cleaves the epithelial sodium channel (ENaC) to increase its activity. *J Biol Chem*, 287(36): 30073–30083.
- Arai, K., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., (2020). Aldosterone deficiency and resistance. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth, (MA).
- Artunc, F., Nasir, O., Amann, K., Boini, K. M., Häring, H. U., Risler, T, Lang, F., (2008). Serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(6): F1624–34.
- Audzeyenka, I., Rachubik, P., Rogacka, D., Typiak, M., Kulesza, T., Angielski, S., Rychłowski, M., Wysocka, M., Gruba, N., Lesner, A., Saleem, M. A., Piwkowska, A., (2020). Cathepsin C is a novel mediator of podocyte and renal injury induced by hyperglycemia. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867 (8), 118723.
- Baricos, W. H., Cortez, S. L., LE, Q. C., Zhou, Y., Dicarlo, R. M., O'Connor, S. E., Shah, S., (1990). Glomerular basement membrane degradation by endogenous cysteine proteinases in isolated rat glomeruli. *Kidney International*, Vol. 38(3): 395-401.
- Bens, M., Vallet, V., Cluzeaud, F., Pascual-Letallec, L., Kahn, A., Rafestin-Oblin, M. E., Rossier, B. C., Vandewalle, A., (1999). Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel immortalized mouse collecting duct principal cell line. *J Am Soc Nephrol*, 10(5): 923–934.
- Bhalla, V., Hallows, K. R., (2008). Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol*, 19(10): 1845–1854.
- Binossek, M. L., Nägler, D. K., Becker-Pauly, C., Schilling, O., (2011). Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *Proteome Res*, 10(12): 5363–5373.

- Bohnert, B. N., Daiminger, S., Wörn, M., Sure, F., Staudner, T., Ilyaskin, A. V., Batbouta, F., Janessa, A., Schneider, J. C., Essigke, D., Kanse, S., Haerteis, S., Korbmacher, C., Artunc, F., (2019). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)*, 227(4): e13286.
- Boiko, N., Kucher, V., Stockand, J. D., (2015). Pseudohypoaldosteronism type 1 and liddle's syndrome mutations that affect the single-channel properties of the epithelial Na⁺ channel. *Physiol Rep*, 3(11), e12600.
- Butt, L., Unnersjö-Jess, D., Höhne, M., Edwards, A., Binz-Lotter, J., Reilly, D., Hahnfeldt, R., Ziegler, V., Fremter, K., Rinschen, M. M., Helmstädter, M., Ebert, L. K., Castrop, H., Hackl, M. J., Walz, G., Brinkkoetter, P. T., Liebau, M. C., Tory, K., Hoyer, P. F., Beck, B. B., Brismar, H., Blom, H., Schermer, B., Benzing, T., (2020). A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab*, 2(5): 461-474.
- Cavallo-Medved, D., Moin, K., Sloane, B., (2011). Cathepsin B. *AFCS Nat Mol Pages*, A000508.
- Chevriaux, A., Pilot, T., Derangère, V., Simonin, H., Martine, P., Chalmin, F., Ghiringhelli, F., Rébé, C., (2020). Cathepsin b is required for NLRP3 inflammasome activation in macrophages, through NLRP3 interaction. *Front Cell Dev Biol*, 8: 167.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T., (1999). Robbins pathologic basis of disease. 6. Auflage, W.B. Saunders Company Philadelphia, USA.
- Downie, M. L., Gallibois, C., Parekh, R. S., Noone, D. G., (2017). Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management. *Paediatr Int Child Health*, 37(4): 248-258.
- Eaton, D. C., Malik, B., Bao, H. F., Yu, L., Jain, L., (2010). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. *Proc Am Thorac Soc*, 7(1): 54-64.
- Frenk, S., Antonowicz, I., Craig, J. M., Metcalf, J., (1955). Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside; renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med*, 89(3): 424-7.

- Gaillard, E. A., Kota, P., Gentzsch, M., Dokholyan, N. V., Stutts, M. J., Tarran, R., (2010). Regulation of the epithelial Na⁺ channel and airway surface liquid volume by serine proteases. *Pflugers Arch*, 460(1): 1-17.
- Garsen, M., Rops, A. L., Dijkman, H., Willemsen, B., van Kuppevelt, T. H., Russel, F. G., Rabelink, T. J., Berden, J. H., Reinheckel, T., van der Vlag, J., (2016). Cathepsin L is crucial for the development of early experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 90(5): 1012-1022.
- Gondi, C. S., Rao, J.S., (2013). Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets*, 17(3): 281-91.
- Gurgoze, M. K., Gunduz, Z., Poyrazoglu, M. H., Dursun, I., Uzum, K., Dusunsal, R., (2011). Role of sodium during formation of edema in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Int*, 53(1): 50-6.
- Haas, M. E., Levenson, A. E., Sun, X., Liao, W. H., Rutkowski, J. M., de Ferranti, S. D., Schumacher, V. A., Scherer, P. E., Salant, D. J., Biddinger, S. B., (2016). The role of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in nephrotic syndrome-associated hypercholesterolemia. *Circulation*, 134(1): 61-72.
- Haerteis, S., Krappitz, M., Bertog, M., Krappitz, A., Baraznenok, V., Henderson, I., Lindström, E., Murphy, J. E., Bunnett, N. W., Korbmacher, C., (2012). Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by the cysteine protease cathepsin-S. *Pflugers Arch*, 464(4): 353-65.
- Haerteis, S., Schork, A., Dörffel, T., Bohnert, B. N., Nacken, R., Wörn, M., Xiao, M., Essigke, D., Janessa, A., Schmaier, A. H., Feener, E. P., Häring, H. U., Bertog, M., Korbmacher, C., Artunc, F., (2018). Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice. *Acta Physiol (Oxf)*, 224(1): e13060.
- Han, M. H., Kim, Y. J., (2016). Practical application of columbia classification for focal segmental glomerulosclerosis. *Biomed Res Int*, 2016: 9375753.
- Hinrichs, G. R., Mortensen, L. A., Jensen, B. L., Bistrup, C., (2018). Amiloride resolves resistant edema and hypertension in a patient with nephrotic syndrome; a case report. *Physiol Rep*, 6(12): e13743.
- Huber, T. B., Kottgen, M., Schilling, B., Walz, G., Benzing, T., (2001). Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem*, 276(45): 41543-6.

- Hughey, R. P., Bruns, J. B., Kinlough, C. L., Kleyman, T. R., (2004). Distinct pools of epithelial sodium channels are expressed at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 279(47): 48491-4.
- Hull, R. P., Goldsmith, D. J., (2008). Nephrotic syndrome in adults. *BMJ*, 336(7654): 1185-9.
- Kashlan, O. B., Blobner, B. M., Zuzek, Z., Carattino, M. D., Kleyman, T. R., (2012). Inhibitory tract traps the epithelial Na⁺ channel in a low activity conformation. *J Biol Chem*, 287(24): 20720-6.
- Kawachi, H., Fukusumi, Y., (2020). New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria. *Clin Exp Nephrol*, 24(3): 193-204.
- Keisuke, S., Kohei, M., Takuji, E., Tomoki, M., Yuichi, M., Rina, O., Tsukasa, T., Mitsuru, O., (2020). Role of cathepsin L in idiopathic nephrotic syndrome in children. *Med Hypotheses*, 141: 109718.
- Kellenberger, S., Gautschi, I., Schild, L., (1999). A single point mutation in the pore region of the epithelial Na⁺ channel changes ion selectivity by modifying molecular sieving. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7): 4170-5.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., He, Y., (2019). The NLRP3 Inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci*, 20(13): 3328.
- Klinke, R., Pape, H. C., Kurtz, A., Silbernagl, S., (2009). *Physiologie.*, 6 Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kodner, C., (2016). Diagnosis and management of nephrotic syndrome in adults. *Am Fam Physician*, 93(6): 479-85.
- Kozina, A. A., Trofimova, T. A., Okuneva, E. G., Baryshnikova, N. V., Obuhova, V. A., Krasnenko, A. Y., Tsukanov, K. Y., Klimchuk, O. I., Surkova, E. I., Shatalov, P. A., Ilinsky, V. V., (2019). Liddle syndrome due to a novel mutation in the γ subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) in family from Russia: a case report. *BMC Nephrol*, 20(1): 389.
- Larionov, A., (2017). Sodium retention in nephrotic syndrome occurs independently of proteinuria. *Rer. Nat. Diss.*, Fribourg (Schweiz).
- Larionov, A., Dahlke, E., Kunke, M., Zanon Rodriguez, L., Schiessl, I. M., Magnin, J. L., Kern, U., Alli, A. A., Mollet, G., Schilling, O., Castrop, H., Theilig, F., (2019). Cathepsin B increases

ENaC activity leading to hypertension early in nephrotic syndrome. *J Cell Mol Med*, 23(10): 6543-6553.

Lechleitner, M., (2000). Dyslipidämie und Nierenerkrankungen - Pathophysiologie und lipidsenkende Therapie bei Patienten mit Nierenfunktionsstörung. *Journal für Kardiologie*, 7 (5) 194-200.

Li, L., Bonventre, J. V., (2016). Endothelial glycocalyx: not just a sugar coat. *Am J Respir Crit Care Med*, 194(4): 390-3.

Lüllmann-Rauch, R., (2012). Taschenlehrbuch Histologie., 4 Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Macé, C., Chugh, S. S., (2014). Nephrotic syndrome: components, connections, and angiotensin-like 4-related therapeutics. *J Am Soc Nephrol*, 25(11): 2393-8.

Merchant, M. L., Barati, M. T., Caster, D. J., Hata, J. L., Hobeika, L., Coventry, S., Brier, M. E., Wilkey, D. W., Li, M., Rood, I. M., Deegens, J. K., Wetzels, J. F., Larsen, C. P., Troost, J. P., Hodgins, J. B., Mariani, L. H., Kretzler, M., Klein, J. B., McLeish, K.R., (2020). Proteomic analysis identifies distinct glomerular extracellular matrix in collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 31(8): 1883-1904.

Miner, J.H., (2011). Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol*, 26(9): 1413-7.

Mollet, G., Ratelade, J., Boyer, O., Muda, A. O., Morisset, L., Lavin, T. A., Kitzis, D., Dallman, M. J., Bugeon, L., Hubner, N., Gubler, M. C., Antignac, C., Esquivel, E. L., (2009). Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 20(10): 2181-9.

Moore, P. J., Tarran, R., (2018). The epithelial sodium channel (ENaC) as a therapeutic target for cystic fibrosis lung disease. *Expert Opin Ther Targets*, 22(8): 687-701.

Müller-Deile, J., Schenk, H., Schiffer, M., (2019). Minimal-change-Glomerulonephritis und fokale-segmentale Glomerulosklerose. *Internist* 60(5), 450–457.

Nangaku, M., Pippin, J., Couser, W.G., (2002). C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in rats with remnant kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 13(4): 928-936.

- Naudin, C., Lecaille, F., Chowdhury, S., Krupa, J. C., Purisima, E., Mort, J. S., Lalmanach, G., (2010). The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. *J Mol Biol*, 400(5): 1022-35.
- Ogawa-Akiyama, A., Sugiyama, H., Kitagawa, M., Tanaka, K., Kano, Y., Mise, K., Otaka, N., Tanabe, K., Morinaga, H., Kinomura, M., Uchida, H. A., Wada, J., (2020). Podocyte autophagy is associated with foot process effacement and proteinuria in patients with minimal change nephrotic syndrome. *PLoS One*, 15(1): e0228337.
- Park, S. J., Shin, J. I., (2011). Complications of nephrotic syndrome. *Korean J Pediatr*, 54(8): 322-328.
- Passero, C. J., Mueller, G. M., Rondon-Berrios, H., Tofovic, S. P., Hughey, R. P., Kleyman, T. R., (2008). Plasmin activates epithelial Na⁺ channels by cleaving the gamma subunit. *J Biol Chem*, 283(52): 36586-91.
- Qi, X., Man, S. M., Malireddi, R. K., Karki, R., Lupfer, C., Gurung, P., Neale, G., Guy, C. S., Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D., (2016). Cathepsin B modulates lysosomal biogenesis and host defense against *Francisella novicida* infection. *J Exp Med*, 213(10): 2081-97.
- Reddy, M. M., Quinton, P. M., (2005). ENaC activity requires CFTR channel function independently of phosphorylation in sweat duct. *J Membr Biol*, 207(1): 23-33.
- Reiser, J., Adair, B., Reinheckel, T., (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest*, 120(10): 3421-31.
- Rinschen, M. M., Hoppe, A. K., Grahammer, F., Kann, M., Völker, L. A., Schurek, E. M., Binz, J., Höhne, M., Demir, F., Malisic, M., Huber, T. B., Kurschat, C., Kizhakkedathu, J. N., Schermer, B., Huesgen, P. F., Benzing, T., (2017). N-Degradomic analysis reveals a proteolytic network processing the podocyte cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol*, 28(10): 2867-2878.
- Rotin, D., Staub, O., (2012). Nedd4-2 and the regulation of epithelial sodium transport. *Front Physiol*, 3: 212.
- Ruan, H., Hao, S., Young, P., Zhang, H., (2015). Targeting cathepsin B for cancer therapies. *Horiz Cancer Res*, 56: 23-40.
- Sagar, A., Arif, E., Solanki, A. K., Srivastava, P., Janech, M. G., Kim, S. H., Lipschutz, J. H., Kwon, S. H., Ashish, Nihalani, D., (2017). Targeting Neph1 and ZO-1 protein-protein

interaction in podocytes prevents podocyte injury and preserves glomerular filtration function. *Sci Rep*, 7(1): 12047.

Saudenova, M., Promnitz, J., Ohrenschall, G., Himmerkus, N., Böttner, 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.

Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M. A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A. S., Holzman, L. B., Mundel, P., (2001). Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest*, 108(11): 1621-9.

Senatorski, G., Paczek, L., Sułowicz, W., Gradowska, L., Bartłomiejczyk, I., (1998). Urine activity of cathepsin B, collagenase and urine excretion of TGF-beta 1 and fibronectin in membranous glomerulonephritis. *Res Exp Med (Berl)*, 198(4): 199-206.

Sevenich, L., Werner, F., Gajda, M., Schurigt, U., Sieber, C., Müller, S., Follo, M., Peters, C., Reinheckel, T., (2011). Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-middle-T-induced breast cancer in mice. *Oncogene*, 30(1): 54-64.

Sever, S., Altintas, M. M., Nankoe, S. R., Möller, C. C., Ko, D., Wei, C., Henderson, J., del Re, E. C., Hsing, L., Erickson, A., Cohen, C. D., Kretzler, M., Kerjaschki, D., Rudensky, A., Nikolic, B., Reiser, J., (2007). Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest*, 117(8): 2095-104.

Shei, R. J., Peabody, J. E., Kaza, N., Rowe, S. M., (2018). The epithelial sodium channel (ENaC) as a therapeutic target for cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*, 43: 152-165.

Siddall, E. C., Radhakrishnan, J., (2012). The pathophysiology of edema formation in the nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 82(6): 635-42.

Sigloch, F. C., Knopf, J. D., Weißer, J., Gomez-Auli, A., Biniossek, M. L., Petrera, A., Schilling, O., (2016). Proteomic analysis of silenced cathepsin B expression suggests non-proteolytic cathepsin B functionality. *Biochim Biophys Acta*, 1863(11): 2700-2709.

Simic, I., Tabatabaeifar, M., Schaefer, F., (2013). Animal models of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 28(11): 2079-88.

Sommerer, C., (2020). IgA-Nephropathie: Pathogenese, Klinik und Therapie. *Hessisches Ärzteblatt*, 6: 340-346.

- Suh, J. H., Miner, J.H., (2013). The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol*, 9(8): 470-7.
- Svenningsen, P., Bistrup, C., Friis, U. G., Bertog, M., Haerteis, S., Krueger, B., Stubbe, J., Jensen, O. N., Thieson, H. C., Uhrenholt, T. R., Jespersen, B., Jensen, B. L., Korbmacher, C., Skøtt, O., (2009). Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol*, 20(2): 299-310.
- Tan, C. D., Hobbs, C., Sameni, M., Sloane, B. F., Stutts, M. J., Tarran, R., (2014). Cathepsin B contributes to Na⁺ hyperabsorption in cystic fibrosis airway epithelial cultures. *J Physiol*, 592(23): 5251-68.
- Tapia, C., Bashir, K., (2022). Nephrotic syndrome. *StatPearls [Internet]*. Treasure Island, (FL).
- Tetti, M., Monticone, S., Burrello, J., Matarazzo, P., Veglio, F., Pasini, B., Jeunemaitre, X., Mulatero, P., (2019). Liddle syndrome: review of the literature and description of a new case. *Int J Mol Sci*, 19(3): 812.
- Tholen, S., Biniossek, M. L., Gansz, M., Gomez-Auli, A., Bengsch, F., Noel, A., Kizhakkedathu, J. N., Boerries, M., Busch, H., Reinheckel, T., Schilling, O., (2013). Deletion of cysteine cathepsins B or L yields differential impacts on murine skin proteome and degradome. *Mol Cell Proteomics*, 12(3): 611-25.
- Tiwari, S., Riazi, S., Ecelbarger, C. A., (2007). Insulin's impact on renal sodium transport and blood pressure in health, obesity, and diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(4): F974-84.
- Ulfig, N., (2009). *Kurzlehrbuch Embryologie.*, 2 Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Valinsky, W. C., Touyz, R. M., Shrier, A., (2018). Aldosterone, SGK1, and ion channels in the kidney. *Clin Sci (Lond)*, 132(2): 173-183.
- Verma, S., Dixit, R., Pandey, K. C., (2016). Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front Pharmacol*, 7: 107.
- Vidak, E., Javoršek, U., Vizovišek, M., Turk, B., (2019). Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment. *Cells*, 8(3): 264.
- Weber, E., Barbulescu, E., Medek, R., Reinheckel, T., Sameni, M., Anbalagan, A., Moin, K., Sloane, B. F., (2015). Cathepsin B-deficient mice as source of monoclonal anti-cathepsin B antibodies. *Biol Chem*, 396(3): 277-81.

Wichmann, L., Vowinkel, K. S., Perniss, A., Manzini, I., Althaus, M., (2018). Incorporation of the δ -subunit into the epithelial sodium channel (ENaC) generates protease-resistant ENaCs in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*, 293(18): 6647-6658.

Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L., Pericak-Vance, M. A., Howell, D. N., Vance, J. M., Rosenberg, P. B., (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729): 1801-4.

Witt, M., Schmid, H., (2006). Nephrotische Erkrankungen. Medikamentöse Therapie. *AMT*, 24: 382–90.

Yu, L., Cai, H., Yue, Q., Alli, A. A., Wang, D., Al-Khalili, O., Bao, H. F., Eaton, D. C., (2013). WNK4 inhibition of ENaC is independent of Nedd4-2-mediated ENaC ubiquitination. *Am J Physiol Renal Physiol*, 305(1): F31-41.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schemazeichnung des Aufbaus der Blut-Harn-Schranke.

Abb. 2: Schemazeichnung des epithelialen Natriumkanals ENaC.

Abb. 3: Regulationsmechanismus von SGK1 für ENaC. Modifiziert aus Valinsky et al. 2018 (Open Access-Artikel, CC BY 4.0 Lizenz).

Abb. 4: Stammbaum der verschiedenen Cathepsine.

Abb. 5: Schemazeichnung des Mausmodells.

Abb. 6: Verifikation des Knockouts durch Western Blot-Analyse von Podocin.

Abb. 7: Auswertung des Knockoutgrads von Podocin bei $Nphs2^{\Delta pod}$ - und $Nphs2^{\Delta pod}; Ctsb^{\Delta pod}$ -Mäusen.

Abb. 8: Immunhistochemie zur Darstellung des Knockouts von Cathepsin B und Podocin.

Abb. 9: Toluidinblaufärbung und PAS-Färbung der Glomeruli der Mäuse.

Abb. 10: Auswertung der glomerulären Schädigungen aller drei Gruppen.

Abb. 11: Aufnahmen des Tubulointerstitiums der Mäuse.

Abb. 12: Auswertung des Injury Scores in zwei unterschiedlichen Färbungen.

Abb. 13: Proteinurie und Albuminurie im zeitlichen Verlauf.

Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Proteasurie aller drei Gruppen.

Abb. 15: Ausgewählte Beispielzymogramme der murinen Spontanurinproben.

Abb. 16: Vergleich der systolischen Blutdruckwerte zwischen den drei Gruppen.

Abb. 17: TEVC-Messungen der Oozyten.

Abb. 18: Vergleich mpkCCD14-Zellen mit isolierten Sammelrohren.

Abb. 19: Verifikation des Knockouts von Cathepsin B in mpkCCD14-Zellen.

Abb. 20: Konfokale Bilder retransfizierter mpkCCD Ctsb KO-Zellen mit gamma-ENaC-Markierung.

Abb. 21: Konfokale Bilder retransfizierter mpkCCD Ctsb KO-Zellen mit LAMP1-Markierung.

Abb. 22: Repräsentative Western Blots von Cathepsin B^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren.

Abb. 23: Statistische Auswertung der Western Blot-Analysen von ENaC und der Na/K-ATPase bei Cathepsin B^{-/-}-Mäusen und Kontrolltieren.

Abb. 24: Vergleich der Blutdruckwerte von Cathepsin B^{-/-}-Mäusen mit Wildtypmäusen.

Abb. 25: Morphologischer Vergleich des Nierenparenchyms von Cathepsin B^{-/-}-Mäusen und Wildtypmäusen.

Abb. 26: Die Rolle Cathepsin Bs in der Zelle.

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung verschiedener Ursachen des nephrotischen Syndroms.

Tab. 2: Liste verwendeter Plasmide.

Tab. 3: Liste verwendeter Antikörper.

Tab. 4: CRISPR/Cas9-Ansätze.

Tab. 5: Ansätze für SDS-PAGE-Gele.

Tab. 6: Injury Score nach Aldigier et al. 2005.

Tab. 7: Injury Score nach Nangaku et al. 2002.

8 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Theilig dafür, dass sie mir die Möglichkeit, bei ihr zu promovieren geboten und mich während dieser gesamten Zeit mit Rat und Tat bestens unterstützt hat.

In diesem Zusammenhang danke ich der gesamten Arbeitsgruppe von Frau Prof. Theilig für die vertrauensvolle und sehr kollegiale Zusammenarbeit. Frau Dr. Dahlke danke ich für die Unterstützung beim Umgang mit dem STED-Mikroskop, außerdem möchte ich mich bei den MTAs der Gruppe für die Hilfe bei den Versuchsdurchführungen bedanken, insbesondere bei Frau Geurink für die Hilfe bei den Tierexperimenten bzw. der Genotypisierung. Frau Dr. Böttner danke ich für die tatkräftigen Ratschläge sowie für das Zurverfügungstellen der Abbildung zur Verwandtschaft der einzelnen Cathepsine. Frau Dr. Kunke, Frau Anan und Herrn Zanon Rodriguez danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, ebenso Frau Lemmer, Frau Luick, Frau Gerneth und Frau Nissen. Frau Nünning danke ich für die Hilfe beim Erstellen der Schemazeichnungen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Saudenova, mit der ich zusammen innerhalb des IRTG an diesem Projekt gearbeitet habe, für ihren Einsatz während der Tierexperimente sowie dafür, dass sie mich in die molekularbiologischen Methoden eingearbeitet hat.

Ich danke des Weiteren der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Baukrowitz des physiologischen Instituts der CAU zu Kiel für die Forschungsarbeit an den Oozyten des Krallenfrosches, namentlich hierbei Herrn Dr. Marcus Schewe und Frau Sandra Grüssel für die TEVC-Messungen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saftig möchte ich für die Unterstützung bei den CRISPR/Cas9-Experimenten danken. Außerdem möchte ich mich beim SFB 877 für die Annahme als Stipendiat und Herrn Prof. Dr. Becker-Pauly als Ansprechpartner des IRTG bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und mir immer wieder Zuversicht gegeben hat.

9 Publikationen

Saudenova, M., Promnitz, J., **Ohrenschall, G.**, Himmerkus, N., Böttner, 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.

Derzeit im Review:

Kunke, M., Knoefler, H., Dahlke, E., Zanon Rodriguez, L., Böttner, M., Larionov, A., Saudenova, M., **Ohrenschall, G.**, Westermann, M., Porubsky, S., Bernardes, J. P., Häsler, R., Magnin, J. L., Koepsell, H., Jouret, F., Theilig, F., (2023). Targeted deletion of von-Hippel-Lindau in the proximal tubule conditions the kidney against early diabetic kidney disease.

Kongress-Abstract und Posterpräsentation:

Saudenova, M., **Ohrenschall, G.**, Larionov, A., Theilig, F., (2019).

Epithelial sodium channel (ENaC) activation by cathepsin B in nephrotic syndrome

IRTG Summer school Degradomics - Protease Web in Health and Disease. 16.–19. September 2019 in Kiel

Poster 37

Knöfler, H., Larionov, A., Dahlke, E., Magnin, J. L., **Ohrenschall, G.**, Saudenova, M., Böttner, M., Theilig, F., (2019).

VHL deletion in proximal tubule epithelial cells of diabetic mice affects renal physiology and architecture

33. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft 25. bis 27. September 2019 am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg

Vortrag 3

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers/meiner Betreuerin und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Datum, Unterschrift Doktorand