

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
Sektion Nieren- und Hochdruckerkrankungen

**Bedeutung der Serin/ Threonin-Kinase DNA-PKcs
und der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP)
beim experimentellen nephrotischen Syndrom der Maus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schneider, Jonas Christoph

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Borst

Tag der Disputation: 05.06.2025

Für Romy und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung	1
1.1 Das nephrotische Syndrom	1
1.2 Das experimentelle nephrotische Syndrom in der Maus nach Gabe von Doxorubicin.....	1
1.2.1 Relevanz der DNA-PKcs für die Suszeptibilität des Doxorubicin-induzierten experimentellen Nephrotischen Syndroms im Mausmodell.....	3
1.3 Ödementstehung beim experimentellen nephrotischen Syndrom	4
1.4 Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)	7
1.4.1 Vorkommen	7
1.4.2 Aufbau	7
1.4.3 Funktion.....	9
1.4.4 Regulation des ENaC.....	10
1.4.4.1 ENaC-Regulation durch Aldosteron und Natrium-Selbstinhibition	10
1.4.4.2 ENaC-Regulation durch Proteasen	10
1.4.5 Pathophysiologische Bedeutung des ENaC beim experimentellen nephrotischen Syndrom.....	13
1.5 Kandidatenproteasen für die ENaC-Aktivierung beim experimentellen nephrotischen Syndrom.....	14
1.5.1 Faktor VII- aktivierende Protease (FSAP) als Kandidatenprotease	16
1.6 Ziele der Promotionsarbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Geräte und Werkzeuge.....	18
2.1.2 Tierhaltung und -versorgung	20
2.1.3 Medikamente und Substanzen.....	20
2.1.4 Versuchskits und Reagenzien	21
2.1.5 Programme	22
2.1.6 Antikörper.....	22
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Mausmodell.....	24
2.2.2 Studiendesign	25
2.2.3 Detaillierte Beschreibung der Genotypisierung	26
2.2.3.1 Genotypisierung von Habp2	28
2.2.3.2 Genotypisierung von Prkdc	29
2.2.3.3 Elektrophorese der PCR-Produkte	30
2.2.4 Gewinnung des Urins und Messung von Protein-, Kreatinin-, Natrium- und Kaliumgehalt.....	32
2.2.4.1 Proteinurie	32
2.2.4.2 Urin-Kreatinin.....	32
2.2.4.3 Natriurese und Kaliurese.....	33
2.2.5 Amilorid-sensitive Natriurese.....	33
2.2.6 Versuche im Metabolischen Käfig FSAP	33
2.2.7 Blutentnahme und Blutuntersuchungen.....	34
2.2.7.1 Blutgasanalyse.....	34

2.2.7.2	Harnstoffmessung.....	34
2.2.7.3	Albuminmessung.....	35
2.2.8	Entnahme und Fixierung der Nieren	35
2.2.9	PAS-Färbung	36
2.2.10	Western Blots.....	36
2.2.10.1	Allgemeine Grundlagen.....	36
2.2.10.2	Untersuchung der Expression der Untereinheiten von ENaC	37
2.2.10.3	Ergänzungen zum Western Blotting von DNA-PKcs	39
2.2.11	Immunhistochemie	40
2.2.12	FSAP-Aktivitätsmessungen im Mausurin	40
2.2.13	Statistik.....	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Die Untersuchung der Rolle von DNA-PKcs bei der Induktion des Doxorubicin-induzierten Nephrotischen Syndroms (DIN) im Mausmodell	41
3.1.1	Zucht und Bestimmung des Genotyps	41
3.1.2	Nephrotisches Syndrom bei Prkdc ^{C6418/C6418} , Prkdc ^{C6418/T6418} und Prkdc ^{T6418/T6418} -Mäusen	43
3.1.2.1	Proteinurie als Marker für die Induktion des nephrotischen Syndroms	43
3.1.2.2	Natriurese	44
3.1.2.3	Körpergewicht als Surrogat der Ödementstehung	45
3.1.2.4	Lichtmikroskopie PAS-gefärbter Nieren unterschiedlicher 129SB6F2-SNP-Genotypen	46
3.1.3	Expression von DNA-PKcs in Nierenlysaten.....	47
3.1.3.1	Western Blots bei gesunden Kontrollmäusen.....	47
3.1.3.2	Western Blots nach Doxorubicin-Applikation	50
3.1.3.3	Expression von DNA-PKcs im Nierengewebe	52
3.2	Die Untersuchung der Rolle der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) für die Ödementstehung im experimentellen Nephrotischen Syndrom im Mausmodell.....	53
3.2.1	FSAP-Ausscheidung im nephrotischen Mäuseurin.....	53
3.2.2	Nephrotisches Syndrom bei Wildtyp- und FSAP-KO-Mäusen	54
3.2.2.1	Futter- und Wasser-Aufnahme	54
3.2.2.2	Proteinurie als Marker für die Induktion des nephrotischen Syndroms	55
3.2.2.3	Natriurese	56
3.2.2.4	Kaliurese.....	57
3.2.2.5	Natrium-Kalium-Ratio	58
3.2.2.6	Körpergewicht als Surrogat der Ödementstehung	59
3.2.2.7	Amilorid-sensitive Natriurese	61
3.2.2.8	Die Natrium-Bilanz beim nephrotischen Syndrom.....	63
3.2.2.9	Untersuchungen aus dem Plasma.....	64
3.2.3	ENaC-Expression und proteolytische -Aktivierung.....	65
4.	Diskussion.....	68
4.1	Die Rolle von DNA-PKcs bei der Induktion des Doxorubicin-induzierten Nephrotischen Syndroms im Mausmodell	68
4.1.1	Genotypisierung und Nephrotisches Syndrom	68
4.1.2	Expression von DNA-PKcs in Western Blots und Immunhistochemie.....	68
4.1.3	C6418T-SNP beim Menschen	69
4.2	Die Rolle der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) für die Ödementstehung im experimentellen Nephrotischen Syndrom im Mausmodell.....	70
4.2.1	FSAP im nephrotischen Urin.....	70
4.2.2	FSAP aktiviert den γ -ENaC durch proteolytische Spaltung in vitro	71

4.2.3	Nephrotisches Syndrom bei Wildtyp- und FSAP-KO-Mäusen	72
4.2.4	Wissenschaftliche Einordnung der Ergebnisse.....	72
4.3	Translationale Aspekte zur Grundlagenforschung am nephrotischen Syndrom	75
4.3.1	Klinische Studien	75
4.3.2	Medikamentöse Therapieoptionen.....	76
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	78
6.	Literatur	79
7.	Erklärung zum Eigenanteil.....	89
8.	Veröffentlichungen	90
9.	Anhang	92
9.1	Versuchstierkundlicher Kurs	92
9.2	Überwachung der Tierbelastung	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Licht- und Elektronenmikroskopie gesunder und nephrotischer Nieren.....	4
Abbildung 1-2: Over- und Underfill-Theorie.....	6
Abbildung 1-3: ENaC-Darstellung mithilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie.....	8
Abbildung 1-4: Bildliche ENaC-Darstellung	9
Abbildung 1-5: Proteolytische ENaC-Regulation	12
Abbildung 1-6: Proteolytische ENaC-Aktivierung	14
Abbildung 1-7: Vulkandiagramm der Proteasurie	15
Abbildung 2-1: Beispielfoto eines Gellaufs unter dem Transilluminator.....	31
Abbildung 3-1: Gelelektrophorese nach Verdauungsreaktion mit dem Restriktionsenzym BsmBI zur Genotypisierung des C6418T-SNP.....	41
Abbildung 3-2: Züchtungsschema der Versuchstiere	42
Abbildung 3-3: Proteinurie im DIN-Modell	43
Abbildung 3-4: Natriurese im DIN-Modell	44
Abbildung 3-5: Relative Körpergewichtsveränderung im DIN-Modell	45
Abbildung 3-6: Lichtmikroskopie PAS-gefärbter Nieren der unterschiedlichen 129SB6F2-SNP-Genotypen im gesunden (oben) und im nephrotischen Zustand (unten).....	46
Abbildung 3-7: PKcs-Detektion in gesunden Nieren mit dem Antikörper ab32566	47
Abbildung 3-8: PKcs-Detektion in gesunden Nieren mit dem Antikörper SAB4502385	48
Abbildung 3-9: PKcs-Detektion nach Doxorubicin mit dem Antikörper ab32566	50
Abbildung 3-10: PKcs-Detektion nach Doxorubicin mit dem Antikörper SAB4502385	51
Abbildung 3-11: Immunhistochemie mit SAB4502385	52
Abbildung 3-12: FSAP-Nachweis im Mausurin und -plasma	53

Abbildung 3-13: FSAP-Aktivitäts-Assay bei der Maus	53
Abbildung 3-14: Trinken und Futter	54
Abbildung 3-15: Proteinurie	55
Abbildung 3-16: Natriurese	56
Abbildung 3-17: Kaliurese	57
Abbildung 3-18: Natrium/ Kalium Ratio	58
Abbildung 3-19: Relative Körpergewichtsveränderung im DIN-Modell	59
Abbildung 3-20: Klinische Aszitesentwicklung bei der Maus	60
Abbildung 3-21: Lipämie beim nephrotischen Syndrom	60
Abbildung 3-22: Amilorid-sensitive Natriurese	61
Abbildung 3-23: Vehikel-Amilorid-Ratio	62
Abbildung 3-24: Proteolytische ENaC-Aktivierung	66
Abbildung 3-25: Western Blots der ENaC-Untereinheiten	67
Abbildung 3-26: Densitometrie	67
Abbildung 4-1: FSAP-Aktivierung	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Geräte und Werkzeuge	18
Tabelle 2-2: Materialien zur Tierhaltung- und versorgung	20
Tabelle 2-3: Medikamente und Substanzen	20
Tabelle 2-4: Versuchskits und Reagenzien	21
Tabelle 2-5: Programme	22
Tabelle 2-6: Antikörper	22
Tabelle 2-7: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 2-8: Studiendesign	26
Tabelle 2-9: PCR-Ansatz für die Habp2-Genotypisierung, Gesamtmenge 12,5 µl	28
Tabelle 2-10: PCR-Protokoll im Thermocycler Habp2	28
Tabelle 2-11: PCR-Ansatz für die Genotypisierung des SNP C6418T des Prkdc-Gens (rs4164952), Gesamtmenge 12,5 µl	29
Tabelle 2-12: PCR-Protokoll im Thermocycler Prkdc	29
Tabelle 2-13: Verdauungsreaktion mit BsmBI	30
Tabelle 2-14: Protokoll im Thermocycler BsmBI	30
Tabelle 2-15: Banden von Wildtyp-DNA und der untersuchten Gen-Loci	31
Tabelle 3-1: Natrium-Bilanz	64
Tabelle 3-2: Untersuchungen aus dem Plasma	65

Abkürzungsverzeichnis

8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-Deoxyguanosin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACR	Albumin-Kreatinin-Ratio
ADP/ ATP	Adenosindiphosphat/ Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Arg	Arginin
ASIC1	acid-sensing ion channel
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	- in Zusammenhang mit DNA: Cytosin - in Zusammenhang mit Aminosäuren: Cystein
ca.	circa
CAP	Kanal-aktivierende Protease
cHbc	Berechnete Hämoglobin-Konzentration
CKD	Chronische Nierenkrankheit
CRISPR/Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated
d	Tage
DF	Verdünnungsfaktor; Beispiel: DF 5 = Verdünnung 1:5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-abhängigen Proteinkinase, katalytische Untereinheit
dNFP	abgeleitete nicht-fokale Sonden (DNA-Sequenzen)
DIN	Doxorubicin-induzierte Nephropathie
dl	Deciliter
dsDNA	Doppelsträngige DNA
E	in Zusammenhang mit Aminosäuren: Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENaC	Epithelialer Natrium Kanal
et al.	und andere
F1, F2	Filialgeneration 1, Filialgeneration 2
FSAP	Faktor VII-aktivierende Protease
g	Gramm
g	G-Zahl
G	in Zusammenhang mit Aminosäuren: Glycin
gDNA	genomische DNA
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
h	Stunden
H ⁺	Protonen
H ₂ O	Wasser
Habp2	Hyaluronsäure bindendes Protein 2
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat

HSA	Human Serum Albumin
Ile	Isoleucin
i. v.	intravenös
K ⁺	Kalium(-ion)
kD	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	knock-out
kp	Kilobasenpaare
Krea	Kreatinin
l	Liter
m	Meter
m ²	Quadratmeter
MI	Serinproteasen-Domäne „Marburg I“
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mOD	Milli-optische Dichte
MT-SP1	Membran Typ Serinprotease 1
Mut	Mutation
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium(-ion)
NaOH	Natriumhydroxid
NAD ⁺ / NADH	Nicotinamidadenindinukleotid NAD ⁺ = oxidierte Form, NADH = reduzierte Form
nm	Nanometer
Nphs2	nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PAN	Puromycin aminonucleosid
PAS	periodic acid–Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potential des Wasserstoffs
Plg	Plasminogen
PNGase	Peptide:N-glycosidase F
Prkdc	Protein Kinase, DNA-Aktiviert, katalytische Untereinheit
R	in Zusammenhang mit Aminosäuren: Arginin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	Renal outer medullary potassium channel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RU	Relative Units

s	Sekunde(n)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SGK1	Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase-1
SNP	Einzel Nukletid Polymorphismus
s.o.	Siehe oben
sog.	so genannt
SPD	Serinproteasen-Domäne
Std.	Standard
T	in Zusammenhang mit DNA: Thymin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline
TEVC	Two-electrode voltage-clamp
TMPRSS3	Transmembrane Protease, Serine 3
TMPRSS4	Transmembrane Protease, Serine 4
TPS	Gesamtproteinfärbung
u.a.	unter anderem
U/l	Units pro Liter
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
V	Volt
Vgl.	vergleiche
vs.	versus; gegenüber; im Gegensatz zu
wt/ WT	Wildtyp
xg	relative Zentrifugalbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
+/+	Wildtyp
-/-	Knock-out
>	größer
<	kleiner

1. Einleitung und wissenschaftliche Fragestellung

1.1 Das nephrotische Syndrom

Beim nephrotischen Syndrom handelt es sich um einen Symptomkomplex aus Proteinurie ($> 3,5$ g/ Tag), Hypalbuminämie ($< 3,5$ g/ dl), Ödemen, einer Hyperlipoproteinämie sowie einer Hyperkoagulabilität [1–3]. Während beim gesunden Menschen Proteine ab einer Größenordnung von Albumin (69 kD) den glomerulären Filterapparat nicht passieren können, führt eine Schädigung des glomerulären Filters beim nephrotischen Syndrom dazu, dass Proteine wie Albumin oder größer aus dem Blutplasma in den Primärharn und in das Tubulussystem gelangen [4].

Das nephrotische Syndrom kann durch primäre und sekundäre glomeruläre Erkrankungen ausgelöst werden. Bei den primären glomerulären Erkrankungen sind die Minimal-Change-Glomerulopathie im Kindesalter und die membranöse Glomerulonephritis im Erwachsenenalter die häufigsten Erkrankungen [5, 2]. Bei Erwachsenen tritt zudem die fokal-segmentale Glomerulonephritis häufig auf [6]. Zu den häufigsten sekundären glomerulären Erkrankungen, die zu einem nephrotischen Syndrom führen, zählt die Diabetische Nephropathie; seltener ist das Auftreten bei der Amyloidose oder dem Multiplen Myelom [2].

Darüber hinaus kann es zu Infektionen und zu Thrombembolien im Rahmen der Hyperkoagulabilität kommen. Die Gründe für beide Komplikationen sind vielfältig und können mit dem Syndrom selbst und dessen Therapie zusammenhängen [7].

1.2 Das experimentelle nephrotische Syndrom in der Maus nach Gabe von Doxorubicin

Zur Erforschung der Pathophysiologie des nephrotischen Syndroms *in vivo* bedarf es einer möglichst präzisen und zuverlässigen Reproduktion im Modell. Aufgrund der komplexen systemischen Auswirkungen des Krankheitsbildes in Säugetieren erscheinen Untersuchungen an isolierten Organen oder ethisch unbedenklicheren Organismen wie *Drosophila* oder Zebrafischen nicht ausreichend, um die Pathophysiologie genauer zu beleuchten.

Das klassische Modell des experimentellen nephrotischen Syndroms ist die Puromycin aminonucleosid-induzierte Nephropathie (PAN) in Ratten [8]. Die unilaterale PAN-Induktion und damit die Beobachtung einer nephrotischen und einer gesunden Niere

im selben Organismus ist durch die Größe der Ratten und der damit einhergehenden guten Operabilität begünstigt. Außerdem können durch den Größenvorteil gegenüber Mäusen größere Mengen Urin, Plasma oder Nierengewebe für Untersuchungen entnommen werden [9].

Demgegenüber steht die Möglichkeit genetische Veränderungen an Mäusen vornehmen zu können. Während beispielsweise die Gendelektion (sog. Knock-out) bei Mäusen bereits seit längerem gut erforscht und etabliert ist [9], wurde dies erst durch die Etablierung der CRISPR/Cas9-Methode bei Ratten realisierbar [10]. Zudem sind Mäuse aufgrund ihrer geringeren Größe leichter in der Handhabung und kostengünstiger zu halten [9].

Die Anwendung des PAN-Modells auf Mäuse erschien als die logische Konsequenz, um die Vorteile zu kombinieren. Die Übertragung erforderte allerdings ein anderes Medikament zur Induktion. Denn während die Tiere nach einer Puromycin aminonucleosid-Injektion nicht die gewünschte Proteinurie entwickelten, gelang dies mit Doxorubicin, einem Anthrazyklin, das DNA-Doppelstrangbrüche verursacht [11–13]. Hierbei erwies sich die retrobulbäre Injektion gegenüber der Schwanzvenen-Injektion als vorteilhaft bezüglich der Response-Rate, ohne dabei den Mäusen mehr zu schaden [14].

Bei der entsprechenden Dosierung [15] bewirkt Doxorubicin eine Schädigung des glomerulären Endothels und anschließend der Podozyten-Fußfortsätze, wobei die Plasminogen-Bindung an das Endothel essenziell für den Prozess ist, der zur Ausbildung der typischen Symptome des nephrotischen Syndroms führt [16, 13]. Zunächst findet sich bei den induzierten Mäusen eine ausgeprägte Proteinurie mit Werten > 100 mg Protein/ mg Kreatinin [17]. Innerhalb von 5-7 Tagen nach Einsetzen der Proteinurie entwickeln sich bei Mäusen eine maximale Körpergewichtszunahme von bis zu 30 % des Ausgangsgewichts sowie Ödeme in Form von Aszites als Folge einer Natriumretention bei gleichbleibender Natriumaufnahme [17]. Die Doxorubicin-induzierte Nephropathie (DIN) im Mausmodell ermöglicht die präzise, definierte und reproduzierbare Induktion des experimentellen nephrotischen Syndroms und durch die Deletion von Genen die Untersuchung der Relevanz z. B. von einzelnen Proteasen und Gerinnungsfaktoren für dessen Entstehung [15]. Ein weiteres relevantes Modell zur Induktion eines experimentellen nephrotischen Syndroms beruht auf der induzierbaren Gen-Deletion von *Nphs2*, welches für Podocin, einem essenziellen Protein der podozytären Schlitzmembran, codiert [17].

1.2.1 Relevanz der DNA-PKcs für die Suszeptibilität des Doxorubicin-induzierten experimentellen Nephrotischen Syndroms im Mausmodell

Während der Erforschung der DIN fiel auf, dass einige Mausstämme empfänglich für das Modell waren und andere nicht. Zu den empfänglichen Mausstämmen zählten A/J, BALB/c und 129S1/SvImJ, während die häufig verwendeten C57BL/6J (B6)-Mäuse keine Empfänglichkeit zeigten [18–20]. Zheng et al. konnten zeigen, dass es sich bei der Suszeptibilität um ein, nach den Mendelschen Regeln, rezessiv vererbtes Merkmal handelt. Die Forscher identifizierten als entscheidenden Locus das Chromosom 16A1-B1 und benannten es „DOX-NPH“ [21]. Später konnte dieselbe Arbeitsgruppe den entscheidenden Bereich auf eine 1,3-Mb Region eingrenzen [22].

Die Arbeitsgruppe um Papeta et al. entdeckten eine C6418T-Transition im Exon 48 des Prkdc-Gens, wodurch das Codon 2140 für Arginin (bei suszeptiblen Mäusen) anstatt für Cystein (bei nicht-suszeptiblen Mäusen) kodiert (R2140C). Passend dazu hatte die Arbeitsgruppe Yu et al. die erhöhte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung mit daraus folgendem erhöhten Brustkrebsrisiko bei weiblichen BALB/c-Mäusen untersucht. Als Ursache identifizierten sie eine C- → T-Transition an der Base 6418, was zu einer Arg- → Cys-Umwandlung am Codon 2140 führte. Hieraus resultierte eine verminderte DNA-PKcs-Aktivität, die wiederum der Grund für die erhöhte Strahlungsempfindlichkeit war [23].

Auf dieser Grundlage ermittelten Papeta et al. das Prkdc-Gen und die darauf kodierte katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) als entscheidendes Gen bzw. Protein für die Empfänglichkeit der DIN [20]. Das trimere Holoenzym der DNA-abhängigen Proteinkinase setzt sich aus dem DNA-PKcs und dem Ku70/Ku80-Komplex zusammen. Seine für das nephrotische Mausmodell relevante Funktion besteht aus der Bindung an DNA-Doppelstrangbrüche durch den Ku70-Ku80-Komplex und der Übernahme einer wichtigen Funktion bei der Bruchstellen-Reparatur nach Gabe von Doxorubicin [24].

Papeta et al. konnten also belegen, dass ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im Prkdc-Gen essenziell für die Empfänglichkeit des nephrotischen Syndroms bei der Maus ist. Somit kann nach Exposition gegenüber Doxorubicin keine DNA-Reparatur mithilfe der DNA-PKcs stattfinden, Podozyten gehen unter und es entwickelt sich eine Proteinurie, die zum experimentellen nephrotischen Syndrom führen kann. Dabei scheinen Doppelstrangbrüche mitochondrialer DNA entscheidend zu sein [20].

Histopathologisch stellt sich dies unter dem Elektronenmikroskop als Podozyten-Untergang mit Auflösung der, durch die Fußfortsätze gebildeten, Schlitzmembran dar. Lichtmikroskopisch wiesen die Glomeruli eine Glomerulosklerose auf und die Tubuli erschienen atrophiert und beinhalteten große Mengen an Protein [17].

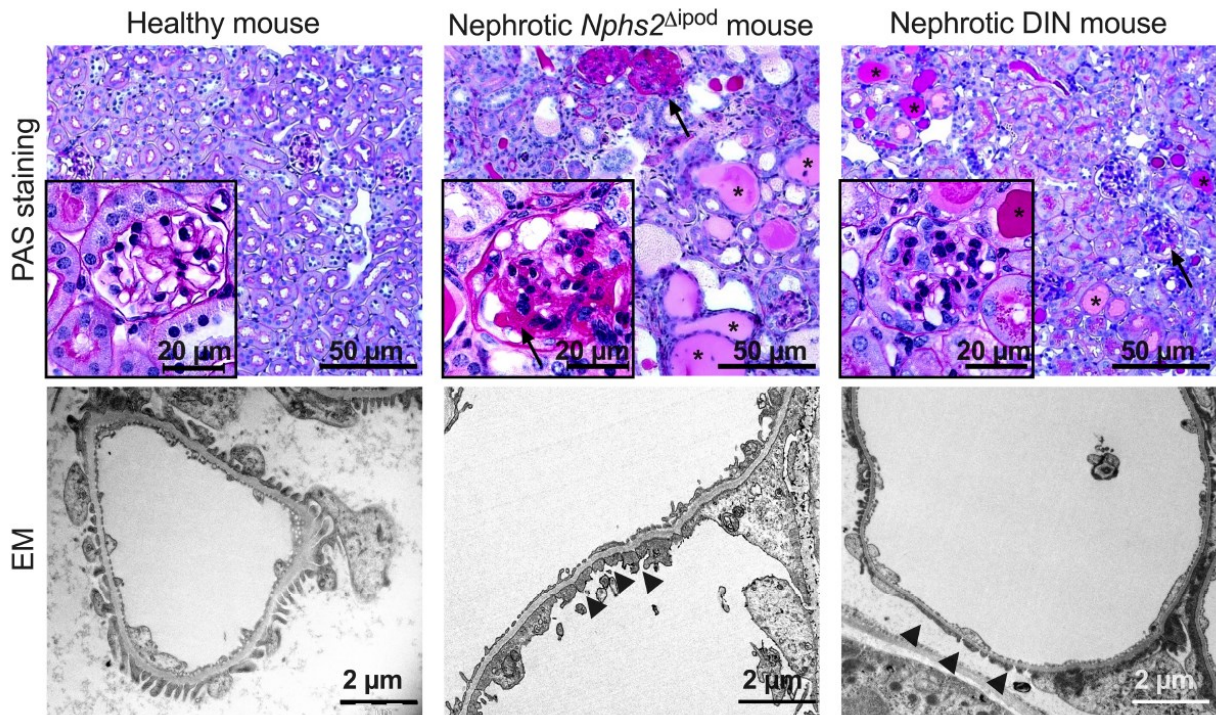


Abbildung 1-1: Licht- und Elektronenmikroskopie gesunder und nephrotischer Nieren

Bei den nephrotischen Mäusen erkennt man in der Lichtmikroskopie (PAS-Färbung) eine Glomerulosklerose (Pfeile) und Proteinablagerungen in den Tubuli (Sternchen) sowie in der Elektronenmikroskopie (EM) einen Podozytenverlust oder -schädigung (Pfeile) mit Fußfortsattauflösung. Aus [17].

1.3 Ödementstehung beim experimentellen nephrotischen Syndrom

Unter Ödemen versteht man eine Flüssigkeitsansammlung im Interstitium [25]. In ihrer Ausprägung können diese beim nephrotischen Syndrom von einem lokalisierten, z. B. periorbitalen Ödem, bis hin zu Anasarka, einem generalisierten Ödem, variieren [26]. In der Forschung wurden zwei Theorien zur Entstehung der Ödeme im Rahmen des Nephrotischen Syndroms entwickelt und werden bis heute diskutiert: Die Under- und die Overfill-Theorie.

Nach der klassischen Underfill-Theorie senkt die aus der Proteinurie resultierende Hypoproteinämie den onkotischen Druck in den Blutgefäßen. Dadurch verschiebt sich Plasma-Flüssigkeit ins Interstitium und Ödeme entstehen [27]. Infolge des intravasalen Flüssigkeitsmangels, dem so genannten „underfill“, und des fallenden Blutdrucks kommt es zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Renin wird ausgeschüttet und spaltet Angiotensinogen zu Angiotensin I. Anschließend wird Angiotensin I mittels ACE zu Angiotensin II konvertiert. Angiotensin II bewirkt durch direkte Effekte an Zielorganen und indirekt über eine Aldosteron- und Vasopressinausschüttung einen Blutdruck- und Extrazellulärvolumen-Anstieg [28]. Aldosteron wiederum sorgt in den Tubuluszellen von distalem Tubulus, Verbindungstubulus und Sammelrohr für den vermehrten Einbau des ENaC, des ROMK, der Na⁺-K⁺-ATPase und der H⁺-ATPase. Vasopressin vermittelt über V2-Rezeptoren im Sammelrohr eine Wasserrückresorption aus dem Primärharn. Aldosteron und Vasopressin führen so zu einer Retention von Wasser und Salz in der Niere [29] und steigern die Kalium- und Protonenausscheidung.

Im Rahmen weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen zeigten sich einige Widersprüchlichkeiten im Zusammenhang mit der Underfill-Theorie. So wurden nephrotische Patienten mit einer hohen RAAS-Aktivität mit Captopril und Albumin-Infusionen behandelt. Hierunter fand sich zwar die erwartete Suppression des RAAS, dennoch konnte weiterhin eine Natrium-Retention mit Gewichtszunahme beobachtet werden [30]. Darüber hinaus konnte bei nephrotischen Patienten in Remission zunächst ein Sistieren der Proteinurie und eine ausgeprägte Diurese festgestellt werden, bevor eine Normalisierung der Plasma-Proteinzusammensetzung und damit der onkotischen Druckverhältnisse nachweisbar waren [31].

Neben den klinischen Studien konnten auch in tierexperimentellen Studien Hinweise auf komplexere Zusammenhänge gefunden werden. Ichikawa et al. induzierten bei Ratten das experimentelle nephrotische Syndrom unilateral, wodurch sich eine Natrium-Retention nur bei der PAN-induzierten Niere entwickelte und dies, obwohl sich das Plasma-Albumin im Vergleich zu den Kontrollwerten nicht verändert hatte. Dies legte den Schluss nahe, dass die Natrium-Retention Folge eines lokalen, in der nephrotischen Niere ablaufenden Prozesses ist [32].

Diese Erkenntnisse stützen eine alternative Theorie zur Entstehung der Ödeme. Im Gegensatz zur Underfill- geht man bei dieser Overfill-Theorie davon aus, dass die Wasser- und Natriumretention nicht Konsequenz der Hypoproteinämie bzw.

Hypovolämie ist, sondern eine primäre, lokale Wirkung der Protein- oder auch Proteasurie in der Niere. Unter Proteasurie versteht man den Proteasen-Anteil der Proteinurie [33]. Diese aberrant filtrierte Proteasen, genauer die Serinproteasen, werden als entscheidend bei der Aktivierung des epithelialen Natrium-Kanals vermutet [33]. Die Folge ist eine intravasale Volumenüberladung, der so genannte „overfill“, und eine konsekutive Flüssigkeitsverschiebung ins Interstitium [34].

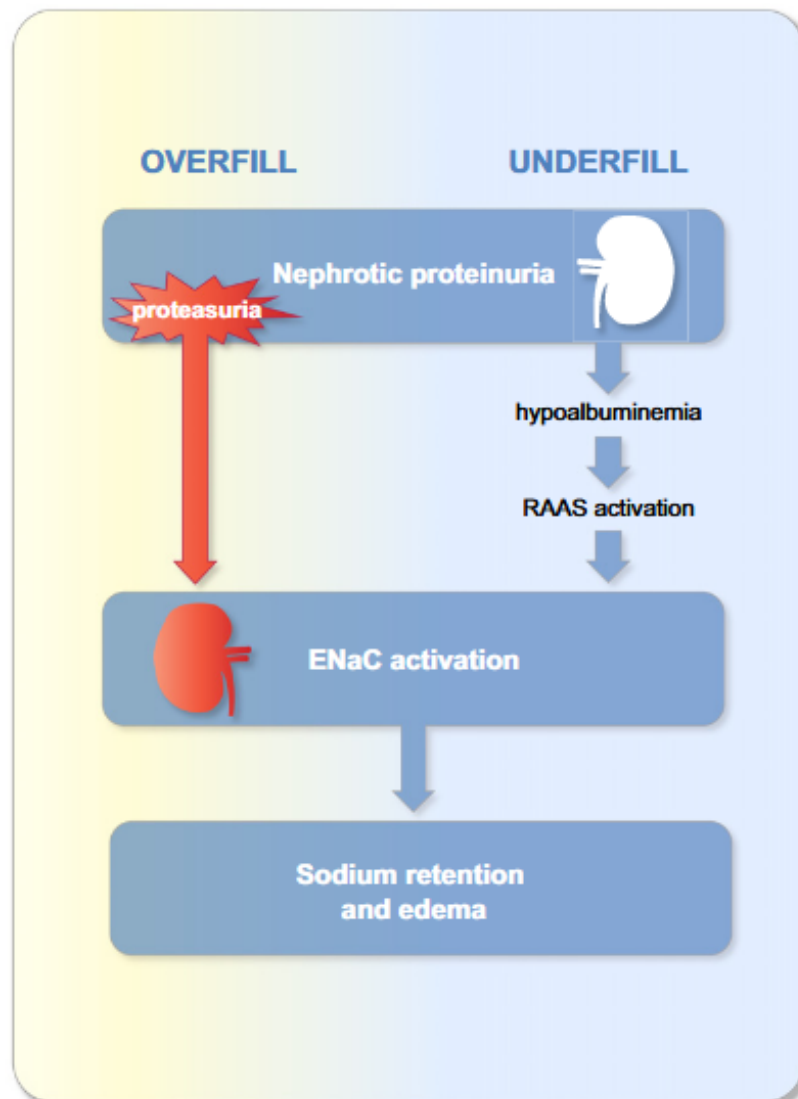


Abbildung 1-2: Over- und Underfill-Theorie

Das Schema verbindet die Over- und die Underfill-Theorie als zwei pathophysiologische Mechanismen, die beide eine Rolle bei der Entwicklung des nephrotischen Syndroms spielen können. Aus [33].

Die bisherigen Erkenntnisse zum nephrotischen Syndrom sprechen für eine ENaC-Aktivierung durch Proteasurie [32, 33] und dies passt zu den Überlegungen der Overfill-Theorie. Doch genauso gibt es Hinweise, die zur Underfill-Theorie passen [35]. Dies legt den Schluss nahe, dass möglicherweise beide pathophysiologischen

Interpretationen ihre Gültigkeit besitzen und in unterschiedlicher Ausprägung wirken. Artunc et al. beschrieben diesen Zusammenhang als ein Kontinuum an dessen Enden jeweils eine der beiden Theorien steht und sich die Patienten mit nephrotischem Syndrom individuell dazwischen bewegen [33]. Sowohl die Proteasurie als auch die RAAS-Aktivierung aufgrund des „underfills“ führen demnach über eine ENaC-Aktivierung zur Natrium- und Wasserretention und dadurch zur Ödementstehung.

1.4 Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)

1.4.1 Vorkommen

Der ENaC befindet sich in den apikalen Membranen der Sammelrohr-Hauptzellen der Niere und damit an dem Ort, der als wesentlich für die Natrium- und Wasserretention identifiziert werden konnte [32, 36]. Außer im Sammelrohr konnte der ENaC noch im distalen Konvolut und im Verbindungstubulus nachgewiesen werden, den Aldosteron-sensitiven Anteilen des Tubulussystems [37]. Außerhalb der Niere wurde der ENaC bei Säugetieren unter anderem in den Lungen, den Schweiß- und Speicheldrüsen sowie im Kolon entdeckt [38].

1.4.2 Aufbau

Strukturell handelt es sich beim ENaC um ein Heterotrimer, das aus jeweils einer der drei Untereinheiten α , β und γ gebildet wird [39, 40]. Im Pankreas und im ZNS kommt anstatt der α - die δ -Untereinheit vor, welche aber nicht in der Niere detektiert werden konnte [41]. Die Untereinheiten selbst bestehen aus jeweils zwei Transmembrandomänen, die durch große extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die beiden kurzen NH_2 - und COOH -Termini liegen im Zytoplasma [42].

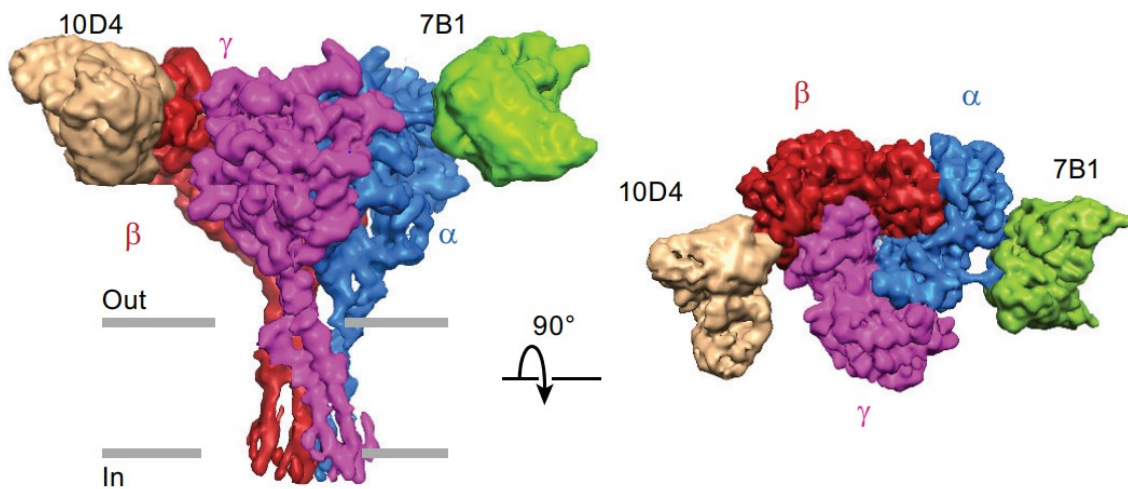


Abbildung 1-3: ENaC-Darstellung mithilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie

Die α -, β - und γ -Untereinheiten bestehen aus zwei Transmembrandomänen mit großen extrazellulären Schleifen und bilden gemeinsam einen schmalen Kanal.

„10D4“ und „7B1“ sind beim Mapping unterstützende Antikörper. Aus [40].

Die α -, β - und γ -Untereinheiten sind, aus dem Sammelrohr betrachtet, entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet und bilden einen schmalen Kanal [40]. Innerhalb der extrazellulären Anteile der α - und γ -Untereinheiten liegen inhibitorische Abschnitte, die durch Proteasen herausgetrennt werden können. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des ENaC und infolge dessen zu einer erhöhten Offenheitswahrscheinlichkeit des Kanals [40].

Der ENaC gehört zur ENaC-Degerin Ionen-Kanalfamilie [43]. Abgeleitet vom ASIC1, einem weiteren Mitglied dieser Ionen-Kanalfamilie, werden die ENaC-Untereinheiten in der Literatur als eine Hand, die einen Ball hält, beschrieben (Abb. 1-4) [44]. Der Zeigefinger und der Daumen sind in dieser bildlichen Darstellung die Bereiche aus denen Fragmente der α - und γ -Untereinheiten proteolytisch herausgetrennt werden können [45].

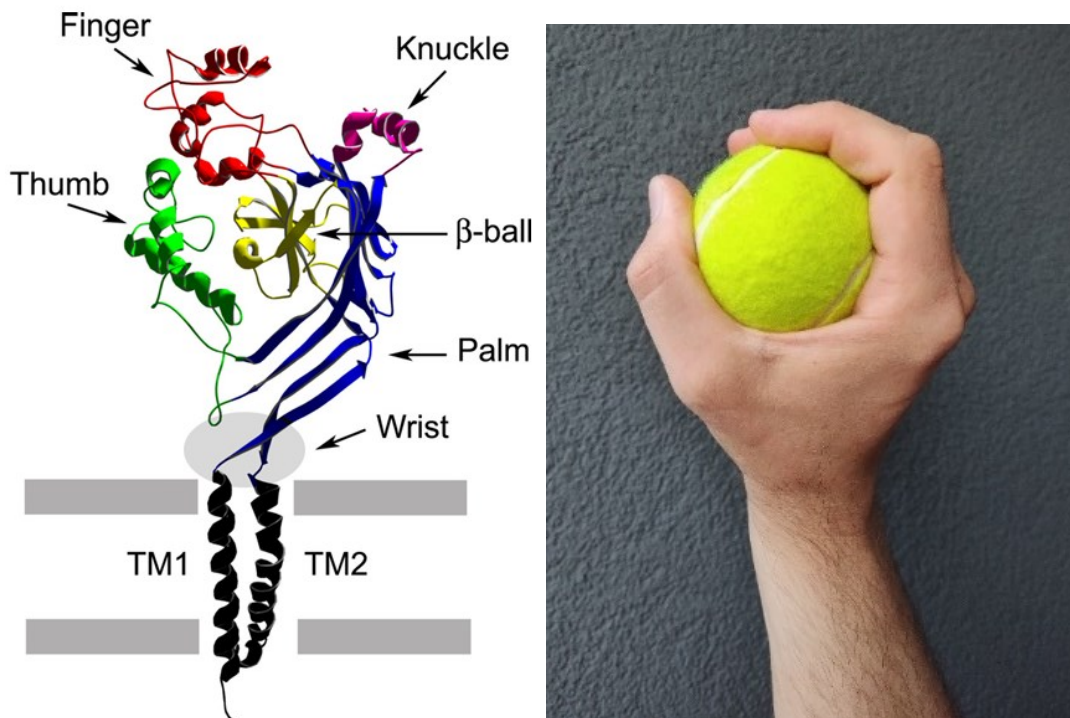


Abbildung 1-4: Bildliche ENaC-Darstellung

Zum besseren bildlichen Vorstellung der ENaC-Untereinheiten-Struktur wird diese in der Literatur als eine Hand, die einen Ball hält, beschrieben [44]. Der Zeigefinger und der Daumen sind die Bereiche aus denen Fragmente der α - und γ -Untereinheiten proteolytisch herausgetrennt werden können. Aus [45].

1.4.3 Funktion

Der ENaC ist in der Niere ein, für Natrium, hochselektiver Kanal [46] und nimmt darüber eine entscheidende Funktion in der Natrium- und Wasserregulation ein. Über die Natriumabsorption beeinflusst er den Volumenhaushalt, da Wasser passiv dem Natrium folgt, um das Gleichgewicht der beiden Lösungen wiederherzustellen. Der elektrische Ausgleich erfolgt durch luminale Kaliumsekretion sowie basolateral durch die Na^+/K^+ -ATPase und Kalium-Kanäle.

Durch den Volumenhaushalt beeinflusst der ENaC auch den Blutdruck [47]. Mutationen in ENaC-kodierenden Abschnitten zeigen die Bedeutung des Kanals für die Natrium- und Wasserregulation. Sie können zu Krankheitsbildern wie dem Liddle's Syndrom (Salz-sensitive Hypertonie) und dem Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 (Salzverlustsyndrom) führen [48]. Auch in der Lunge spielt der ENaC bei Volumenstörungen wie dem Lungenödem [49] oder der Zystischen Fibrose [50] eine wichtige Rolle.

1.4.4 Regulation des ENaC

Die Menge an aufgenommenem Natrium durch den ENaC wird durch die Offenheitswahrscheinlichkeit der vorhandenen Kanäle und durch die Veränderung der Gesamtzahl an Kanälen in der Zellmembran bestimmt.

1.4.4.1 ENaC-Regulation durch Aldosteron und Natrium-Selbstinhibition

Die ENaC-Aktivierung via Aldosteron ist eine bekannte Möglichkeit der Natriumwiederaufnahme, die *in vivo* bestätigt werden konnte [51]. Aldosteron ist ein Hormon der Nebennierenrinde. Es ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und bindet an zytosolische Mineralokortikoidrezeptoren, die über Signalkaskaden, z. B. über die Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase-1 (SGK1) wirken. Sie beeinflussen die Transkription und Translation von ENaC-Untereinheiten sowie deren intrazellulären Transport und die Prozessierung und darüber wiederum die Menge an exprimierten ENaC auf der Membran [52]. Physiologische Patch-Clamp- [53] und pathophysiologische *in vivo*-Experimente fanden Hinweise auf eine Erhöhung der Offenheitswahrscheinlichkeit bestehender ENaC unter Aldosteroneinfluss [54]. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf die Freisetzung von inhibitorischen Peptiden der ENaC-Untereinheiten [55]. Die Erhöhung der Offenheitswahrscheinlichkeit hat dabei eine größere Effekt-Steigerung -circa 75% zu 25%- auf den Natriumstrom bewirkt, als die vermehrte Kanal-Expression [55].

Eine weitere Komponente der ENaC-Regulation ist die sogenannte Natrium-Selbstinhibition. Hierunter versteht man den verminderten ENaC-Natriumstrom bei erhöhter extrazellulärer Natriumkonzentration [55]. Für die Natrium-Selbstinhibition ergaben sich synergistische Effekte mit CAPs in dem Sinne, dass proteolytisch gespaltene ENaCs von der Natrium-Selbstinhibition unbeeinflusst erschienen [56, 57]. Die Experimente von Knight et al. stellten zudem einen Bezug zwischen der intrazellulären Natriummenge und dem Zugang von Proteasen zu den aktivierenden ENaC-Spaltstellen her [58].

1.4.4.2 ENaC-Regulation durch Proteasen

In-vitro-Versuche mit Nieren-Epithelzelllinien von *Xenopus laevis* ergaben Hinweise darauf, dass der ENaC durch die proteolytische Aktivität von Serinproteasen aktiviert werden kann [59]. Durch die Zugabe von Aprotinin, einem unspezifischen Serinproteasen-Inhibitor [60], konnte der transepitheliale Natriumtransport vermindert

und durch die Applikation von Trypsin, einer Serinprotease, wieder verstärkt werden. In derselben Studie identifizierten die Forscher eine Kanal-aktivierende Protease (CAP1), die eine große Ähnlichkeit zur menschlichen Serinprotease Prostasin aufwies [59]. Darüber hinaus konnte *in vitro* eine proteolytische ENaC-Aktivierung für die Cysteinprotease Cathepsin S gezeigt werden [61]. Eine Übertragbarkeit der Entdeckungen auf Säugetiere und den Menschen erschien wahrscheinlich. So konnten die Wirkungen von Aprotinin und Trypsin auf den Natrium-Strom auch bei murinen M-1-Sammelrohr-Zellen gezeigt werden [62]. Passend dazu spricht die Existenz von proteolytisch gespaltenen und nicht-gespaltenen ENaC in der Membran [63] für das Vorhandensein einer schnell verfügbaren Reserve an Kanälen, die durch eine proteolytische Spaltung aktiviert werden kann [64].

Bereits intrazellulär, im Rahmen der Biosynthese, spaltet die Serinprotease Furin die α -Untereinheit an zwei Stellen und die γ -Untereinheit an einer Stelle [65]. Durch die doppelte Spaltung der α -Untereinheit resultiert die Entfernung eines inhibitorischen Peptids [66], was zu einer intermediären Offenheitswahrscheinlichkeit des Kanals in der Membran führt [67].

Befindet sich der ENaC in der Zellmembran kann eine weitere proteolytische Spaltung der γ -Untereinheit durch Kanal-aktivierende Proteasen (CAP) stattfinden. Eine davon ist die Membran-gebundene Serinprotease Prostasin/ CAP1 [68], wobei im physiologischen Modell ihre Gerüstfunktion für andere Serinproteasen als entscheidend für proteolytische Spaltung angesehen wird [69]. Weitere freie, nicht Membran-gebundene CAP sind Trypsin [70], Elastase [71], Plasmin [72] und TMPRSS4/ CAP2 [73]. Ebenso konnte für die Matriptase/ CAP3 eine Kanalaktivierung gezeigt werden, wobei ein direkter Nachweis der γ -Untereinheit-Spaltung fehlte [74, 73]. Durch die zweite Spaltung der γ -Untereinheit wird ein weiteres inhibitorisches Peptid heraus getrennt und es kommt über eine Konformationsänderung zur maximalen Offenheitswahrscheinlichkeit des ENaC [68, 45, 75].

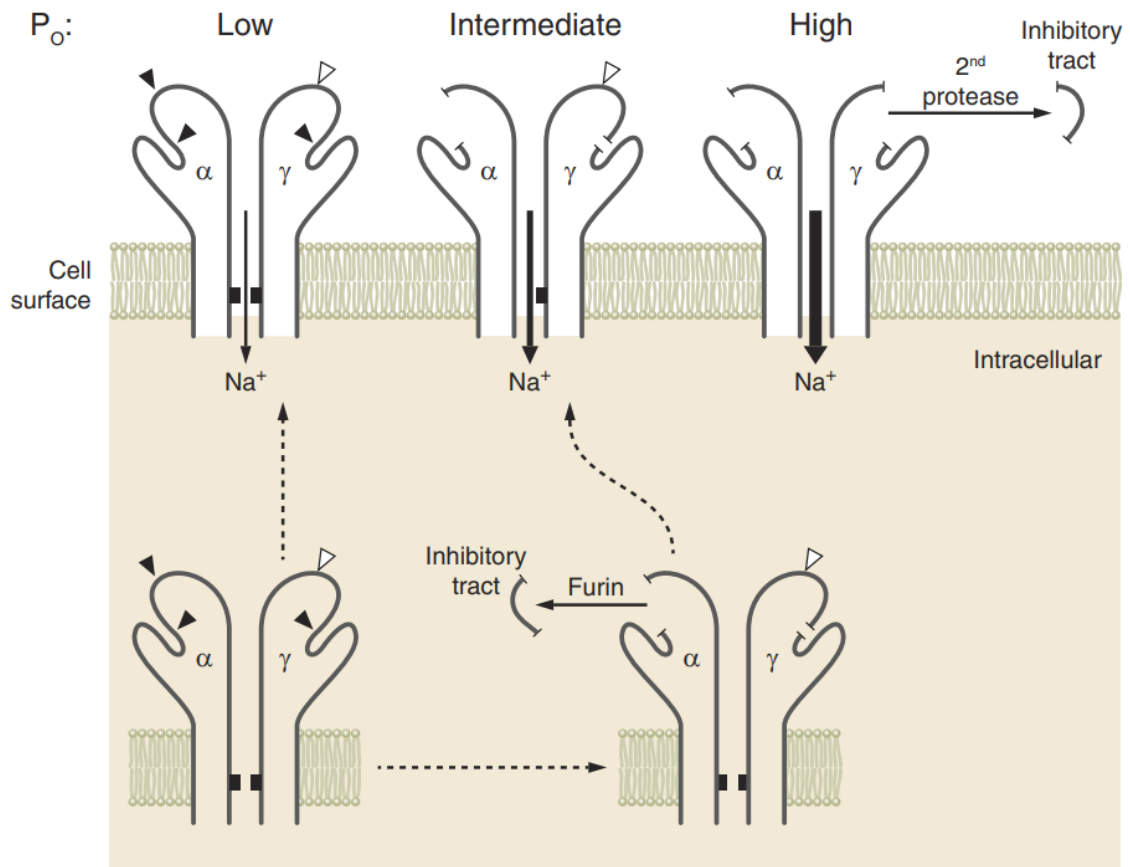


Abbildung 1-5: Proteolytische ENaC-Regulation

Zunächst erfolgt eine dreifache Spaltung während der Biosynthese durch Furin, was zu einer intermediären Offenheitswahrscheinlichkeit führt. In der Zellmembran kann eine weitere Spaltung durch eine Kanal-aktivierende Protease zur maximalen Offenheitswahrscheinlichkeit führen. Aus [55].

Weitere *in-vitro*-Studien konnten die bedeutende Rolle der Spaltung der γ -Untereinheit für die Aktivierung des ENaC in der Zellmembran verdeutlichen. Im Vergleich zur α -Untereinheit war die proteolytische Spaltung der γ -Untereinheit besonders wichtig für die Entstehung eines ausgeprägten Natrium-Stroms durch Maus- und Ratten-ENaCs in *Xenopus laevis* Oozyten [76, 77].

Die ENaC-Aktivierung durch Serinproteasen erfolgt also über die proteolytische Spaltung von Ektodomänen der ENaC-Untereinheiten, die zu einer wichtigen Besonderheit des ENaC führt, nämlich zu einer gestaffelten Erhöhung seiner Offenheitswahrscheinlichkeit. Hierbei nimmt die γ -Untereinheit eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Offenheitswahrscheinlichkeit ein. Sie wird im Gegensatz zur α -Untereinheit extrazellulär gespalten.

1.4.5 Pathophysiologische Bedeutung des ENaC beim experimentellen nephrotischen Syndrom

In *in-vitro*-Versuchen mit murinen M1-Sammelrohrzellen ließ sich durch proteinreichen Urin PAN-induzierter Ratten und nephrotischer Patienten eine ENaC-Aktivierung erreichen. Durch Zugabe des nephrotischen Urins wurden höhere Amilorid-sensitive ENaC-Stöme nachgewiesen und durch die Anwendung von Aprotinin konnte der ENaC-Strom signifikant reduziert werden [78]. Vor diesem Hintergrund schlug die Arbeitsgruppe um Per Senningsen eine neue pathophysiologische Betrachtungsweise der Entstehung des Nephrotischen Syndroms vor. Nach ihrer Vorstellung gelangen durch die gestörte glomeruläre Filterfunktion im Rahmen der Proteinurie Serinproteasen ins Tubuluslumen, die dort den ENaC aktivieren können [78]. In derselben Arbeit konnte eine Behandlung PAN-induzierter Ratten mit Candesartan und Canrenoat einer Entwicklung des nephrotischen Syndroms nicht entgegenwirken. Dies stützt die Hypothese einer RAAS-unabhängigen ENaC-Aktivierung im Rahmen des Nephrotischen Syndroms [78].

Experimente mit Doxorubicin-induzierten Mäusen bestätigten *in vivo* die Relevanz des ENaCs und die Relevanz von Serinproteasen im Urin für dessen Aktivierung mit der konsekutiven Entwicklung des nephrotischen Syndroms. Zunächst konnte eine hohe Serinproteasen-Aktivität des Urins von Doxorubicin-induzierten Mäusen und nephrotischen Patienten nachgewiesen werden [79]. Mit Aprotinin-Pellets behandelte Tiere entwickelten trotz ausgeprägter Proteinurie keine Natriumretention und keine Ödeme, vergleichbar mit Tieren, die mit dem ENaC-Blocker Amilorid behandelt wurden [79]. Im Hinblick auf die Entstehung des Nephrotischen Syndroms werden daher entscheidende Rollen des ENaCs und ENaC-aktivierender Proteasen angenommen [33].

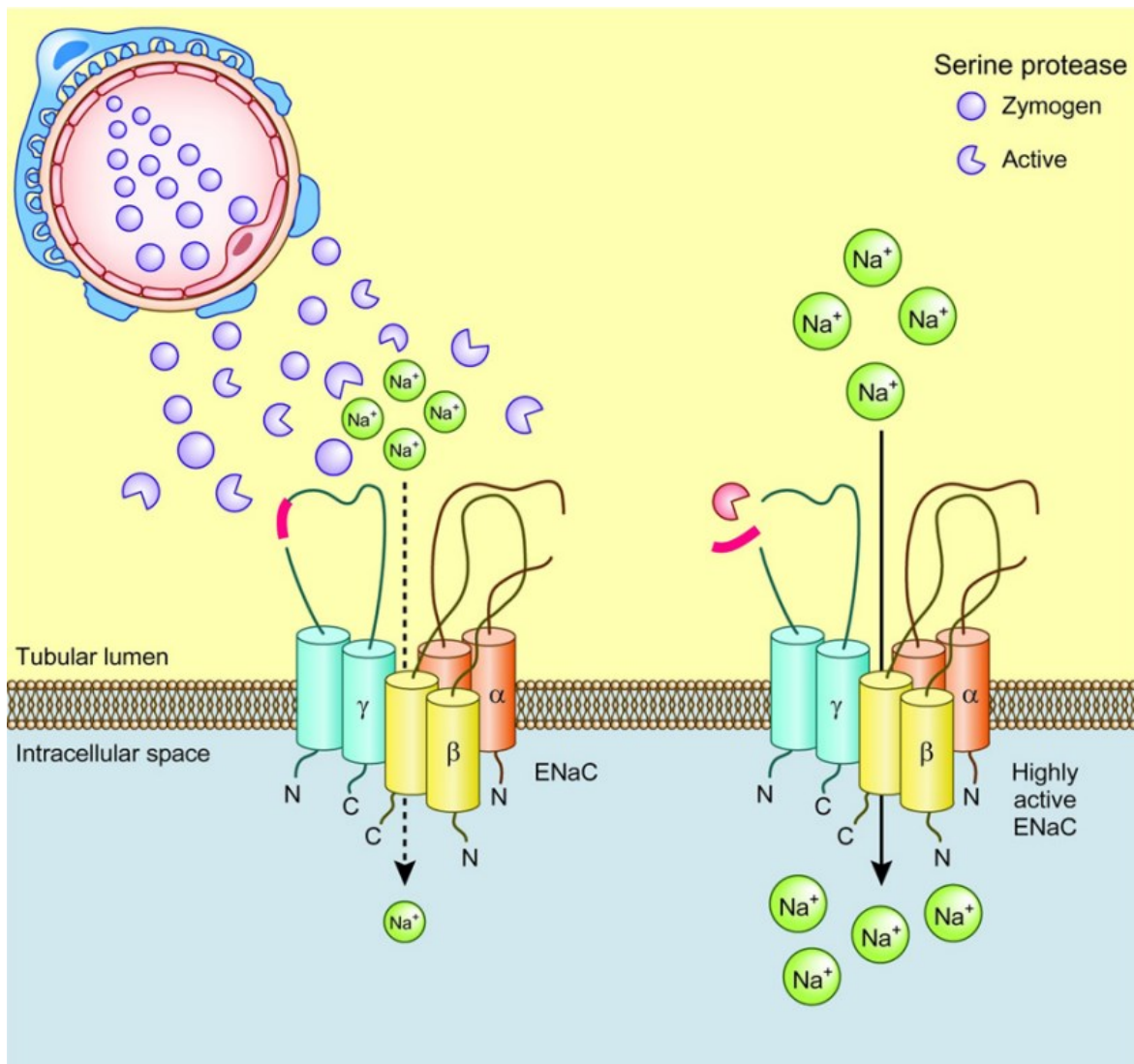


Abbildung 1-6: Proteolytische ENaC-Aktivierung

Schemazeichnung der proteolytischen ENaC-Aktivierung beim experimentellen nephrotischen Syndrom. Die Entfernung des inhibitorischen Peptids der γ -Untereinheit (pink) durch aberrant filtrierte Serinproteasen bewirkt eine erhöhte ENaC-Offenheitswahrscheinlichkeit und dadurch eine Natrium- und Volumenretention. Aus [33].

1.5 Kandidatenproteasen für die ENaC-Aktivierung beim experimentellen nephrotischen Syndrom

Als Kandidatenproteasen werden in diesem Zusammenhang Proteasen bezeichnet, die vielversprechende Anwärter darauf sind, „die“ essenzielle Protease bei der proteolytischen ENaC-Aktivierung zu sein [33]. Die bisherigen Erkenntnisse legen nahe, dass eine Serinprotease den ENaC proteolytisch spalten kann. Eine infrage kommende Protease sollte zudem die Eigenschaft besitzen durch Aprotinin hemmbar zu sein [79, 80], im Rahmen des nephrotischen Syndroms in den Urin gelangen und in einem aktiven Zustand sein.

Um geeignete Kandidatenproteasen zu identifizieren, untersuchten Wörn et al. die Proteasurie. Im nephrotischen Urin von Patienten und Mäusen konnte ein signifikanter Anstieg der Proteaseaktivität im Vergleich zum Urin von gesunden Probanden bzw. gesunden Tieren festgestellt werden [81]. Dies passt zum Verständnis der Proteasurie, wonach beim nephrotischen Syndrom im Rahmen der Proteinurie auch vermehrt Proteasen filtriert werden [33, 82]. Es wurde ein proteomischer Ansatz zur Identifizierung der Präsenz und Aktivität von Proteasen gewählt und mittels Tandem-Massenspektrometrie konnten alle Proteasen identifiziert werden, die im „Urin-Proteasom“ [81] von nephrotischen Patienten und Mäusen im Vergleich zu Gesunden erhöht auftraten. Dabei waren aktive Serinproteasen der Gerinnungs- und Komplementkaskade die dominante Gruppe und die Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP) eine der häufigsten von ihnen [81]. Im Urin nephrotischer Patienten war sie am zweit- und im nephrotischen Mäuseurin am dritthäufigsten zu finden. Weitere häufige Proteasen waren Plasminogen, die Komplementfaktoren D und B und Gerinnungsfaktor XII [81]. Aufgrund ihrer Menge erscheint das Vorkommen der essenziellen Protease in dieser dominanten Gruppe wahrscheinlich und die Erforschung der einzelnen Proteasen als der nächste logische Schritt. Die Ergebnisse beim Menschen waren mit jenen bei der Maus vergleichbar, was eine ähnliche Pathophysiologie vermuten lässt [81].

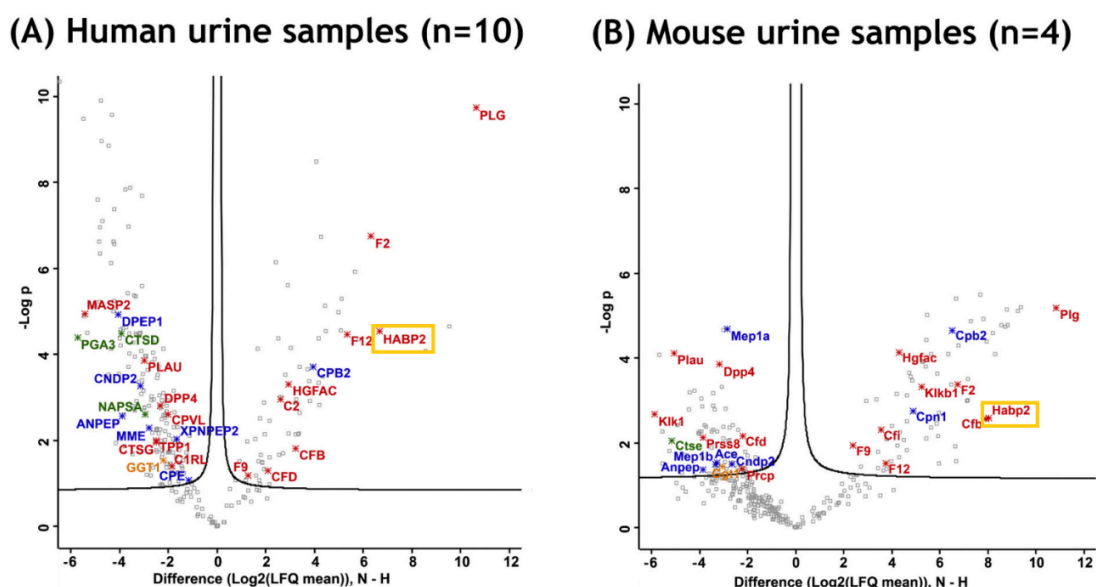


Abbildung 1-7: Vulkandiagramm der Proteasurie

Die Ergebnisse der Proteasurieanalyse von Patienten- und Mausproben. Jeweils auf der rechten Vulkanseite befinden sich die im nephrotischen Stadium vermehrt vorhandenen Proteasen. Zu den häufigsten gehörte u. a. FSAP (hier nach dem Genlokus „Habp2“ bezeichnet, gelb markiert). Bei den rot geschriebenen Proteasen handelt es sich um Serinproteasen. Aus [81].

1.5.1 Faktor VII- aktivierende Protease (FSAP) als Kandidatenprotease

Die FSAP ist eine Serinprotease und wird vom Habp2 (hyaluronic acid binding protein 2) -Gen kodiert [83]. Ihre Synthese findet in der Leber statt und die Freisetzung erfolgt in der einkettigen Zymogenform. Die Aktivierung zur zweikettigen, aktiven, Form geschieht durch Autoproteolyse der Einzelkette an der Stelle Arg313–Ile314, wobei die beiden resultierenden Ketten durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [84]. FSAP besitzt ein großes Spektrum an potentiellen Substraten und ist in zahlreichen Prozessen der Hämostase, Gewebsschädigung, Inflammation, vaskulären Integrität und bei Krebserkrankungen beteiligt [85]. Mit 78 kD ist FSAP zu groß für eine glomeruläre Filtration und daher beim Gesunden nicht im Urin vorhanden. Da es bei der Entstehung des nephrotischen Syndroms aber zur Zerstörung von Zellen der glomerulären Filterbarriere kommt, wird FSAP filtriert [81].

Im Rahmen einer Substrat-Analyse konnte kein spezifisches Muster für FSAP identifiziert werden. Passend zu den vermuteten Spalt-Positionen der α - und γ -ENaC-Untereinheiten [76, 68] zeigte sich eine Affinität zur proteolytischen Spaltung von basischen Aminosäuren-Clustern [86]. Sie selbst wird von vielen Proteaseinhibitoren wie Antithrombin, C1-Esterase-Inhibitor und α 2-Antiplasmin gehemmt, die dafür einen Komplex mit FSAP im Plasma bilden [84]. Außerdem kann FSAP durch Aprotinin gehemmt werden [87]. Damit hat FSAP das Profil einer aussichtsreichen Kandidatenprotease.

1.6 Ziele der Promotionsarbeit

Die Prkdc-Gen-Region kodiert für die DNA-PKcs, einem wesentlichen Bestandteil bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die beispielsweise durch Doxorubicin ausgelöst werden [24]. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im Prkdc-Gen bei suszeptiblen Mausstämmen wurde als entscheidender Faktor für die Sensitivität gegenüber der Induktion der DIN identifiziert [20]. Da die FSAP-KO-Tiere dem nicht-induzierbaren C57BL/6J(B6)-Stamm angehörten, war es entscheidend die empfänglichen Tiere zu identifizieren. So konnten nur sie für die weitere Zucht und das Experiment ausgewählt werden. Dies würde eine Optimierung der Methode der DIN und außerdem durch die Versuchstiereinsparung eine ethische Überlegenheit sowie die Einsparung zeitlicher und finanzieller Ressourcen bedeuten.

Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Genotypisierung der Prkdc-Region zu erforschen und darüber eine Aussage über die Suszeptibilität der FSAP-KO-Mäuse treffen zu können.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von FSAP auf die ENaC-Aktivierung bei der DIN. Sollte es sich bei der FSAP um die essenzielle Serinprotease für die Entstehung des Nephrotischen Syndroms im Mausmodell handeln, wären Mäuse mit einer Deletion von FSAP vor einer ENaC-Aktivierung und Ödementstehung geschützt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Werkzeuge

Tabelle 2-1: Geräte und Werkzeuge

Gerät/ Werkzeug	Hersteller
Agagel Standard ohne Kühlung G45/1	Biometra
Axioskop 2 plus mit Jenoptik ProgRes C10 plus Kamera und Software Objektive Plan-Neofluar 1,25×/0,035 NA, 2,5×/0,075 NA, 10×/0,30 NA, 20×/0,50 NA und 40×/0,75 NA.	Zeiss Laser Optik System
Biofuge 13	Heraeus Instruments
BioTek EL800 Microplate Reader	BioTek Instruments
CENTRIFUGE&VORTEX CM-70M	neoLab Migge
Criterion Plattenelektroden	Biorad
Dräger Vapor 2000 - Isoflurane	Dräger Medical GmbH
Duran Becher 600 ml	DWK Life Sciences GmbH
Duran Erlenmeyerkolben 250 ml	DWK Life Sciences GmbH
Elektrophorese Netzteil EPS600	Pharmacia Biotech
Eppendorf Research Pipette (0,1 µl - 2,5 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research plus Pipette (0,5 µl - 10 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research Pipette (2 µl - 20 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research plus Pipette (10 µl - 100 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research Pipette (20 µl - 200 µl)	Eppendorf AG

Eppendorf Research Pipette (100 µl - 1000 µl)	Eppendorf AG
Finnpipette 50-300 µl (Multi-channel)	ThermoLabsystems
Flammenphotometer EFUX 5057	Eppendorf AG
Fluorescence scanner	LI-COR Odyssey
Fluoreszenzphotometer	Tecan
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank VIP Series -86 °C	SANYO E&E America Company
GeneQuant pro Photometer	Amersham Pharmacia Biotech
Glas-Potter	Wheaton
IL GEM Premier 3000	Instrumentation Laboratory GmbH
Immunostainer	Ventana Medical Systems
KERN ALT 100-4M Präzisionswaage	KERN & Sohn GmbH
KERN 440-35A Waage	KERN & Sohn GmbH
Liebherr Premium Kühlschrank 2-8°C	Liebherr
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments
Mikrotiterplatten-Lesegerät EL 808	Bio Tek
Napox KN-292B Tierrohr-Lochzange	LabArt
Nitrozellulose-Membran	Amersham
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Plattenschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG
Sharp R-239 Mikrowelle	Sharp K.K.
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG
Tpersonal Thermocycler	Biometra
UV-Transilluminator 28 MP	Herolab GmbH Laborgeräte
Vortex Shaker MS 1	IKA – Works, Inc.

2.1.2 Tierhaltung und -versorgung

Tabelle 2-2: Materialien zur Tierhaltung- und versorgung

Material	Firma
1264C EUROSTANDARD TYPE II	Tecniplast
1284L EUROSTANDARD TYPE II L	Tecniplast
3600 M 001 Stoffwechsellkäfig	Tecniplast
Alleinfuttermittel V1534 – 000 (Natriumgehalt 0,24%, entspricht ca. 104 µmol/g)	ssniff Spezialdiäten GmbH
Bottle C 260 ml	Tecniplast
C 1000 Kontrolldiät (Natriumgehalt: 2488 mg/kg, entspricht ca. 108,22 µmol/g)	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG
Haltungsdiät 1324	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
Maushäuschen, rot	Ehret GmbH
Premium Scientific Bedding	J. Rettenmaier & Söhne GmbH und CO KG
Standard Bottle Cap ACCP2521	Tecniplast

2.1.3 Medikamente und Substanzen

Tabelle 2-3: Medikamente und Substanzen

Medikament/ Substanz	Firma
Adrimedac Doxorubicinhydrochlorid	medac GmbH
Aprotinin	LOXO
Amiloride hydrochloride hydrate	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
DOXO-cell 150 mg Injektionslösung	cell pharm GmbH
DOXO-cell 150 mg Injektionslösung	Stada-Pharm
Isofluran CP 1 ml/ml	cp-pharma BURGDORF
Isotonische Kochsalzlösung 0,9% 100ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH

2.1.4 Versuchskits und Reagenzien

Tabelle 2-4: Versuchskits und Reagenzien

Versuchskit, Reagenz	Firma
2-Propanol 99%	Honeywell
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Aqua dest.	Stadtwerke Tübingen
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Blocking Buffer	LI-COR
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	LI-COR
Chromogenes Substrats S-2444 (L-pyroglutamyl-glycyl-L-arginin-p-nitroanilinedihydrochlorid)	Haemochrom Diagnostica
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
EchoLUTION Tissue DNA Micro Kit	BioEcho
Fluorescent Assay Kit	Active motif
Formaldehyd Lösung 4,5% neutral, gepuffert	SAV Liquid Production GmbH
GelRed Nucleic Acid Stain Färbelösung	Biotium Inc.
Lithium Stammlösung 500 mmol/l	Biorapid GmbH
LT-SYS Creatinin Jaffé, kinetisch (LT-CR 0121)	Labor+Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS Harnstoff enzymatisch (LT-UR 0010)	Labor+Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
Maus-Serum-Albumin-Lösung	Sigma-Aldrich
NewBlot Nitro Stripping Buffer	LI-COR
PAS (Periodic Acid Schiffs) - Färbekit	Carl Roth
<u>PNGase F-Kit</u> PNGase F	New England BioLabs Inc.

Glycoprotein Denaturing Buffer GlycoBuffer 2 (10X) NP-40	
Proteasehemmer-Cocktail	Mini cOmplete, Roche
pro-uPA (Saruplase)	Grünenthal
Reiniger-D Flammenphotometer- Reinigungslösung	Biorapid GmbH
REVERT 700 Total Protein Stain-Kit	LI-COR
ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System	Promega Corporation
Sterilium med Hände- Desinfektionsmittel	PAUL HARTMANN AG
System-Leerwertlösung	Biorapid GmbH
Urin-Standard	Biorapid GmbH

2.1.5 Programme

Tabelle 2-5: Programme

Excel 2010/ 365	Microsoft
Prism 8, 9 und 10	GraphPad Software
Image Studio version 3.1.4, Empiria Studio version 1.3.0.83	LI-COR
Adobe Photoshop CS6	Adobe

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2-6: Antikörper

Detektion von DNA-PKcs: SAB4502385 (Kaninchen, polyklonal)	Sigma-Aldrich
Detektion von DNA-PKcs: ab32566, clone Y393 (Kaninchen, monoclonal)	Abcam
FSAP-Antikörper Ab (Kaninchen, polyclonal)	

FSAP-Antikörper (monoclonal)	
Peroxidase-gekoppelter Secondary antibody	
α -ENaC ab (aa 45-68)	Pineda
β -ENaC ab (aa 617-638)	Pineda
γ -ENaC ab (aa 634-655), SPC-403	Stressmarq
Secondary antibody "IRDye 800CW"	LI-COR

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-7: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Advantage Serological Pipet 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon Corning Inc. – Life Sciences
Aluminium-Folie	
BD Micro-Fine Insulinspritze 0,5 ml	BD Medical
BD Plastipak Spritze 60 ml	BD Medical
Biosphere Filter Tips 0,1- 2,5 μ l, 0,1- 10 μ l, 0,1- 20 μ l, 2- 100 μ l, 100- 1000 μ l	Sarstedt AG & Co. KG
Blutgaskapillaren 100 mm/ 185 μ l	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
CELLSTAR TUBES 15 ml	Greiner Bio-One GmbH
CryoTube Vials 1,8 ml	Thermo Fischer Scientific
Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH
Einmal-Kapillarpipetten end to end	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Einmal-Mikrohaematokrit-Kapillaren 75 mm/ 75 μ l	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Ethanol 70 %	
Flüssigstickstoff	Westfalen AG
FOR Handspülmittel	Dr. Schnell GmbH & Co. KGaA

Kapillar-Adapter	SC – Kontrollblutherstellungs- und Vertriebs GmbH
Light Protection Tubes, braun 50 ml	Carl Roth GmbH+Co. KG
Mikrot-Streifenpalette Medium Bind. 12x8	Brand GmbH
Nitrile Powder-Free Medical Examination Gloves	Abena
Pipettenspitzen farblos 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pro-ophta Augenstäbchen	Lohmann und Rauscher International GmbH & Co. KG
Reagiergefäß 0,2 ml, 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG
RNaseZap	Ambion
SafeSeal-Tips Premium 200 µl	Biozym
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co. KG
Sauerstoff	Linde AG
Sterican Einmal-Injektions-Kanülen 0,90 x 40 mm	B. Braun Melsungen AG
UV-Küvette mikro 70 µl	Brand GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell

Für beide wissenschaftlichen Fragestellungen wurde das Doxorubicin-induzierte Nephrotische Syndrom (DIN) herangezogen.

Um den Genotyp des Prkdc-Gens auf die Entstehung der DIN zu erforschen, wurden 129S1/SvImJ- und C57BL/6J-Mäuse über zwei Generationen miteinander verpaart. Dann wurden deren Nachkommen (129B6F1) erneut verpaart, um 129B6F2-Hybriden zu erhalten. Die Jungtiere wurden jeweils drei Wochen nach Geburt aus dem Zuchtkäfig abgesetzt, markiert, genotypisiert und frühestens mit einem Alter von 10 Wochen erneut verpaart.

Es wurden Prkdc^{C6418/C6418}-, Prkdc^{C6418/R6418}- und Prkdc^{R6418/R6418}-Mäuse von heterozygoten Elterntieren aus einem Wurf miteinander im Modell verglichen.

Zur Analyse der FSAP-Relevanz wurden Hap2-KO-Mäuse des C57BL/6J-Mausstamms auf einen genetischen Wildtyp-Hintergrund (129S1/SvImJ) rückgekreuzt, um die Suszeptibilität für die DIN zu erreichen [88]. Die KO-Tiere zeigten phänotypisch keinen Unterschied zu Wildtypmäusen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass FSAP^{-/-} eine ungenügend regulierte Reaktion auf Verletzungen zeigen. Die Tiere weisen größere Infarkte nach Hirnischämien [89], eine größere Neointima nach mechanischer Gefäßverletzung [90] und eine ausgedehntere Leberfibrose [91] in den entsprechenden Modellen auf. Außerdem ist die Entstehung von Thromben erschwert [92]. Ein Einfluss auf die DIN war aus den früheren Erkenntnissen nicht zu erwarten. Es wurden Hap2-KO- und Wildtyp-Tiere von heterozygoten Elterntieren aus einem Wurf miteinander im Modell verglichen.

Im Versuchslabor war der Tag-Nacht-Rhythmus auf jeweils zwölf Stunden festgelegt. Die Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter in Form einer kontrollierten Pellet-Diät (ssniff, Natrium-Gehalt: 0,24%, entspricht 104 µmol/g) und Leitungswasser stand ebenfalls uneingeschränkt zur Verfügung.

Alle Experimente wurden nach den Richtlinien der National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals und nach dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Projektnummern: M07/18G und M11/19G) und eine Ausnahmegenehmigung für den Verfasser dieser Arbeit ausgestellt.

2.2.2 Studiendesign

Eine Experimentalserie bestand aus zwölf Tagen. Beim ersten Tag handelte es sich um einen Kontrolltag. Das Körpergewicht wurde bestimmt, Futter und Trinken gewogen, Urin abgenommen sowie die Mäuse auf ihr Allgemeinbefinden hin untersucht.

Am zweiten Tag wurde den Tieren einmalig Doxorubicin intravenös verabreicht. Dies geschah nach der Einleitung einer Isofluran-Kurzarkose und Überprüfung der Narkosetiefe. Zur Applikation wurde eine Spritze am medialen Augenwinkel der Maus eingebracht und das Medikament über den retrobulbären Venenplexus verabreicht [93]. Männliche Tiere erhielten 7,25 µl/g Körpergewicht (entspricht 14,5 µg/g) und weibliche Tiere 6,9 µl/g Körpergewicht (entspricht 13,8 µg/g) Doxorubicin [15].

Während den folgenden zehn Tagen wurde täglich das Körpergewicht sowie das Gewicht von Futter und Trinken bestimmt, Urin abgenommen und das Befinden der

Tiere kontrolliert. Das Wiegen und die Urinabnahme erfolgten morgens zwischen acht und zehn Uhr.

An Tag 10 nach der Doxorubicin-Gabe erfolgte die Euthanasie und Nierenentnahme für Histologie und Western Blot sowie die Blutentnahme für Blut-Gas-Analyse, Albumin- und Harnstoff-Messung.

Die Induktion der DIN wurde durch Proteinuriemessungen überprüft. Ohne die Proteinurie ist die volle Ausprägung des experimentellen nephrotischen Syndroms und die Überprüfung der Forschungsfragen nicht möglich, da es nur so zur aberranten FSAP-Filtration und einer ENaC-Aktivierung kommen konnte [33]. Die Beobachtung der ENaC-Aktivität erfolgte durch die Bestimmung von Natri- und Kaliurese, als Marker für die Natriumretention, und des Körpergewichts, als Marker der Flüssigkeits-Retention mit konsekutiver Ödementstehung. Zur Normierung wurde zusätzlich das Urin-Kreatinin gemessen und es erfolgte eine klinische Kontrolle auf Aszites.

Die verschiedenen Studien wurden an Wildtyp- und FSAP-KO-Mäusen durchgeführt, um herauszufinden, ob sich das nephrotische Syndrom auch bei FSAP-negativen *Habp2^{-/-}*-Mäusen entwickelt oder ob diese geschützt sind.

Die Experiment-Serien zur *Prkdc*-Genregion waren vom Ablauf ebenso aufgebaut. Hierbei wurden *Prkdc^{C6418/C6418}*-, *Prkdc^{C6418/R6418}*- und *Prkdc^{R6418/R6418}*-Tiere miteinander verglichen.

Tabelle 2-8: Studiendesign

Studiendesign von *Prkdc* und FSAP. Tag 1 war ein Kontrolltag, an Tag 2 wurde den Tieren Doxorubicin appliziert dann folgten die eigentlichen 10 Versuchstage mit Blut- und Nierenentnahme an Tag 10.

K	D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

2.2.3 Detaillierte Beschreibung der Genotypisierung

Die Genotypisierung war das zentrale Element zur Analyse des *Habp2*- (für die FSAP) und des *Prkdc*-Gen-Status. Zur individuellen Kennzeichnung wurden den Mäusen nach einem festen Muster Ohrstanzen entnommen. Diese dienten zudem zur Genotypisierung. Nach der Entnahme wurden die Gewebeproben bei -20 °C gelagert. Im nächsten Schritt wurde durch ein Gewebe-Lyse- und ein Reinigungs-Verfahren gDNA zur Weiterverwendung aus den Ohrstanzen gewonnen. Als Grundlage hierfür diente das „ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System (Cat.# A2051, 100 preps.)“ – Kit

der Firma PROMEGA. Es erfolgte aufgrund der geringen Probenmengen eine Reduktion der im Manual angegebenen Volumina.

Zunächst wurde das Gewebe in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben, mit 75 µl Tail Lysis Buffer sowie 15 µl Proteinase K 10 s gevortext und anschließend für mindestens 2 h im Thermo-Shaker bei 56°C bei 123 g inkubiert. Nun sollte das Gewebe vollständig aufgelöst sein. Größere intakte Gewebestückchen oder Haare waren in der Zentrifuge abzuspinnen. Danach wurden 200 µl Binding Buffer zugegeben und abermals 10 s gevortext.

Die gesamte flüssige Probe wurde auf eine Membransäule geladen und eine Minute mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Lysat musste dabei vollständig durch die Membran gelangen, um eine Proteinbindung an die Säule zu erreichen.

Die Säule wurde in ein frisches Mikroreaktionsgefäß gestellt, mit 400 µl Column Wash Solution bedeckt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieses Waschen wurde zweimal wiederholt.

Zuletzt wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gestellt und die Säulenmembran mit 150 µl Nuclease-freiem Wasser bedeckt, eine Minute inkubiert und eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Man erhielt die eluierte gDNA im Mikroreaktionsgefäß unter der Säule.

Im Februar 2019 wurde das Verfahren zur Gewinnung der gDNA umgestellt. Es wurde nun das „EchoLUTION Tissue DNA Micro Kit“ von BioEcho verwendet, welches wesentlich Zeit-sparender war.

Jede Gewebeprobe wurde mit einem Lyse-Mix aus 5 µl TurboLyse T Protease und 90 µl Tissue Lysis Buffer in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und unter maximaler Schüttelfunktion für maximal 30 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur auf 80 °C erhöht und für weitere 10 min unter maximaler Schüttelfunktion inkubiert, um die Protease zu inaktivieren.

Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Säulchen, wobei der Säulchen-Puffer durch Zentrifugation entfernt wurde. Nach der Inkubation bei 80 °C wurden zu jeder Probe 1 µl RNase A hinzugegeben, um eventuell vorhandene RNA-Spuren zu entfernen. Daraufhin wurden 10 µl Clearing Solution dazu gegeben, die Probe trübte sich und nach zweiminütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurden maximal 90 µl klarer, gDNA-haltiger Überstand in die vorbereitete Säule pipettiert. Nach wiederholtem Zentrifugieren für eine Minute bei 1000 g wurde die gereinigte DNA in das 1,5 Mikroreaktionsgefäß eluiert.

Die so gewonnene gDNA konnte nach beiden Verfahren für wenige Stunden bei 4°C und für mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden.

Die Detektion des Habp2- und des Prkdc-Gens begann mit der Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung des entsprechenden Amplikons. Dazu wurde zu Beginn eine Mischung aller notwendigen Komponenten hergestellt, die nach Zugabe der gDNA ein bestimmtes Programm im Thermocycler durchlief.

2.2.3.1 Genotypisierung von Habp2

Tabelle 2-9: PCR-Ansatz für die Habp2-Genotypisierung, Gesamtmenge 12,5 µl

<u>Stoffmengenkonzentration</u>	<u>Komponente</u>
	1 x GoTaqG2 HotStart Green Mastermix (M7422 für 100 Reaktionen; M7423 für 1000 Reaktionen)
2 mM	MgCl ₂
0,2 mM	dNFP
1 µM	Primer 1 [10µM] Wildtyp 5'-GTG TTC CGT GTC CTG CTG CTA ATC GCC CTG-3'
1 µM	Primer 2 Common 5'-GAC GAA TTC ATG GAG GCT TTG CCA CAG AGT TC-3'
1 µM	Primer 3 KO 5'-GCA GCG CAT CGC CTT CTA TCG CCT TCT TGA C-3'
1,50 µl	Nuclease-free water
1 µl	Template DNA

Die Detektion der Wt-Bande erfolgte mit dem Primerpaar 1 + 2 und Detektion der Mut-Bande mit dem Primerpaar 2 + 3.

Tabelle 2-10: PCR-Protokoll im Thermocycler Habp2

1.	Initiale Denaturierung	1 min, 93 °C
2.	Denaturierung	20 s, 93 °C

3.	Annealing:	3 min, 68 °C
4.	Die Schritte zwei und drei wurden 30-mal wiederholt	
5.	Elongation	7 min, 72 °C
6.	Kühlen	72 h, 4 °C

2.2.3.2 Genotypisierung von Prkdc

Tabelle 2-11: PCR-Ansatz für die Genotypisierung des SNP C6418T des Prkdc-Gens (rs4164952), Gesamtmenge 12,5 µl

<u>Stoffmengenkonzentration</u>	<u>Komponente</u>
	1 x GoTaqGreen Reaction Buffer
1 mM	MgCl ₂
0,2 mM	dNTP
0,5 µM	Primer 1 (forward) 5'-GCC ATG ATC CTT AGC AAG TG-3'
0,5 µM	Primer 2 [10 µM] (reverse) 5'-GCC TAA GGT AAG GTG CTG TA-3'
1 Unit	GoTaq G2 Hot Start Polymerase [5 U/µl]
5,05 µl	Nuclease-free water
2 µl	Template DNA

Tabelle 2-12: PCR-Protokoll im Thermocycler Prkdc

1.	Denaturierung	30 s, 94 °C
2.	Annealing	30 s, 49 °C
3.	Elongation	30 s, 72 °C
4.	Die Schritte eins bis drei wurden 40-mal wiederholt	
5.	Finale Elongation	10 min, 70 °C
6.	Kühlen	72 h, 4 °C

Nach der PCR erfolgte der Verdau mit dem Restriktionsenzym BsmBI (CGTCTCn/nnnn).

Bei den C57BL/6J-Mäusen ist der SNP nicht vorhanden, sodass das Gen normal „funktioniert“ und DNA-Schäden repariert werden können. Bei den 129S1/SvImJ-

Mäusen gibt es den SNP, der die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BsmBI beseitigen sollte, sodass eine Unterscheidung bei der Genotypisierung erfolgen kann.

Tabelle 2-13: Verdauungsreaktion mit BsmBI

<u>Stoffmengenkonzentration</u>	<u>Komponente</u>
	1 x NEB Buffer 3,1
16 µl	Nuclease-free water
15 Units	BsmBI (10 000 U/ml)
5,0 µl	PCR-Produkt

Tabelle 2-14: Protokoll im Thermocycler BsmBI

1.	Inkubation	2 h, 55 °C
2.	Enzym-Inaktivierung	20 min, 80 °C

Nach der PCR und dem Verdau konnte das Produkt über Nacht bei 4 °C gelagert und der Gellauf am Folgetag durchgeführt werden. Die besten Ergebnisse wurden bei der Durchführung aller Schritte an einem Tag erzielt.

2.2.3.3 Elektrophorese der PCR-Produkte

Das PCR-Produkt wurde nun mittels Elektrophorese im Agarosegel detektiert. Die verwendete Standardagarose war bei FSAP 1,5 %-ig und bei Prkdc 2 %-ig.

Das vorbereitete Gel wurde mit dem PCR-Produkt beladen. Für FSAP wurden 6 µl und für Prkdc 9 µl pro Slot eingebracht.

Als Marker diente ein 50 bp DNA-Leiter (peqGOLD 50bp DNA-Leiter, peqlab, Bestell-Nr.:25-2000, 1x50µg, 0,5 mg DNA/ml). 1 µl des Markers (0,5 µg) wurde mit 1 µl Ladepuffer (6x) und 4 µl destilliertem Wasser zusammen pipettiert, zentrifugiert, gevortext und die komplette Menge von 6 µl direkt aufgetragen.

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 120 Volt über circa eine Stunde. Im Green Go Taq Flexi Buffer waren zwei Farbstoffe enthalten. Ein blauer Farbstoff lief bezogen auf ein 1 %-iges Gel wie ein 3-5 kb DNA-Fragment und ein gelber Farbstoff lief mit weniger als 50 bp schneller als die Primer. Somit konnte erkannt werden, wann der Gellauf zu beenden war.

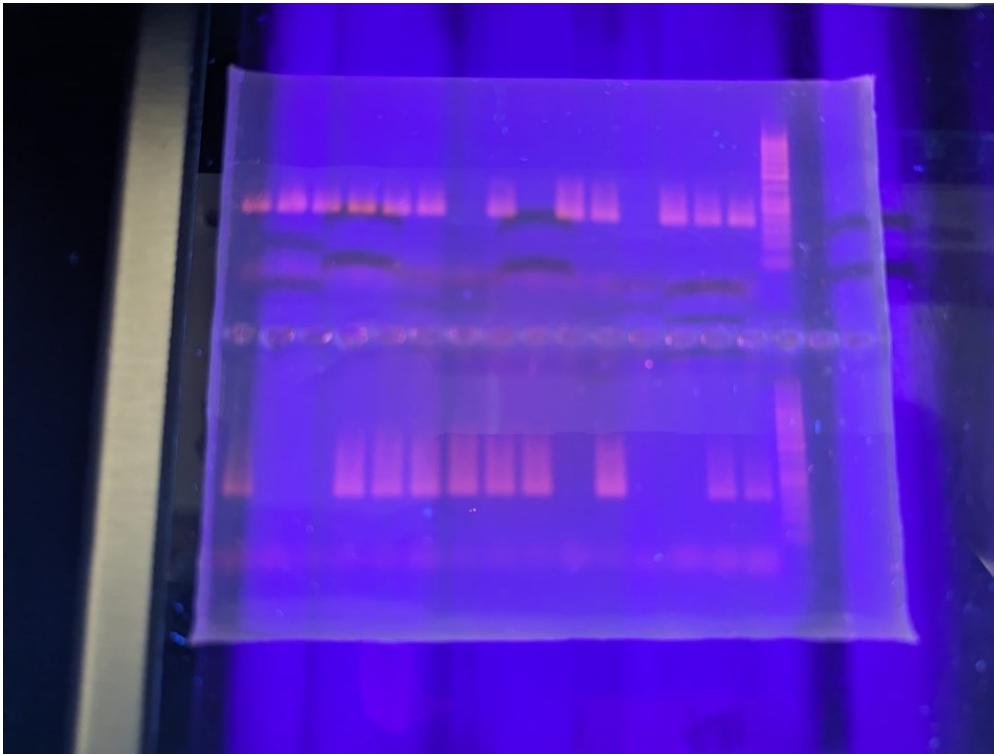


Abbildung 2-1: Beispielfoto eines Gellaufs unter dem Transilluminator

Man erkennt die mit GelRed eingefärbte DNA nach dem Gellauf.

Im Anschluss daran wurde die DNA mit GelRed eingefärbt. Dafür wurden 15 µl GelRed (10 000 x Stock Solution) mit 50 ml Aqua dest. vermischt und das Gel darin für 30 min unter Schütteln und Lichtschutz inkubiert. Der Farbstoff interkaliert in dsDNA. Somit konnten die Banden unter dem UV-Licht eines Transilluminators dargestellt, fotografiert und schlussendlich das Ergebnis abgelesen werden.

Tabelle 2-15: Banden von Wildtyp-DNA und der untersuchten Gen-Loci

	Wildtyp (+/+)	KO-Tiere (-/-)	Heterozygote (+/-)
Habp2	278 bp	389 bp	beide Banden

	129-Stamm	Bl6-Stamm	Bl6/129
Prkdc	512 bp	259 bp	beide Banden

2.2.4 Gewinnung des Urins und Messung von Protein-, Kreatinin-, Natrium- und Kaliumgehalt

Die Sammlung von Spontan- oder Sammelurin erfolgte täglich in den Morgenstunden. Anschließend wurde der Urin bei -20 °C gelagert.

2.2.4.1 Proteinurie

Die Messung des Proteingehalts im Urin wurde mit den Bio-Rad Protein Assay, der auf der Bradford-Methode basiert, durchgeführt. Die Bradford-Working-Solution bestand dabei aus einem Teil Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) und vier Teilen destilliertem Wasser.

Zunächst wurden 2 µl unverdünnter Urin und 1 ml Bradford-Working-Solution pro Küvette gemischt.

Nach einer Inkubation von mindestens 10 Minuten wurde die Proteinmenge via Spektrophotometer (GeneQuant pro Photometer von Amersham Pharmacia Biotech) bei 595 nm gemessen. Beim Überschreiten des Messbereichs (> 10 mg/ml) erfolgte eine entsprechende Verdünnung des Urins.

Das Ergebnis wurde anhand einer Standardkurve bestimmt und in mg/ml angegeben.

2.2.4.2 Urin-Kreatinin

Zur Normalisierung des Natrium-, Kalium- und Proteingehalts auf die Urinmenge wurde das Urin-Kreatinin nach der modifizierten Jaffé-Methode (Versuchskit LT-SYS Creatinin Jaffé, kinetisch ohne Enteiweißung; LT-CR 0121) bestimmt. Dieses Kit macht sich die Eigenschaft von Kreatinin zunutze, in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen orange-gelben Komplex zu bilden. Diese Farbintensität verhält sich proportional zur Kreatininkonzentration und kann photometrisch bestimmt werden.

Die Working-Solution bestand aus einem Teil NaOH 400 mM, 0,25 Teilen Pikrinsäure und 0,75 Teilen destilliertem Wasser. 200 µl dieser Lösung wurden mit 10 µl verdünntem Urin (DF 20) vermischt. Die Extinktion wurde zweizeitig (zu Beginn und nach acht Minuten) mittels ELISA-Reader bei 490 nm bestimmt und die Konzentration folgendermaßen berechnet.

$$\Delta = \text{Extinktion 2} - \text{Extinktion 1}$$

$$c_{\text{Kreatinin}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{\Delta \text{Probe} - \Delta \text{Nullwert}}{\Delta \text{Standard} - \Delta \text{Nullwert}} * c_{\text{Standard}} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bis zu einer Konzentration von 300 mg/dl Urin-Kreatinin verläuft dieser Test linear. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,03 mg/dl.

2.2.4.3 Natriurese und Kaliurese

Die Messung von Natrium- und Kaliumgehalt des Urins erfolgte an unverdünnten Proben mit dem Flammenphotometer EFUX 5057 (Eppendorf AG). Beim Verbrennen der zerstäubten Proben ergeben Natrium und Kalium eine charakteristische Färbung, die mithilfe von Lithium quantifiziert wird. Hieraus errechnet die Maschine die jeweilige Konzentration.

War von einer Probe zu wenig Volumen für eine Messung durch die Maschine vorhanden, wurde diese mit der Lithium-Stammlösung auf den Verdünnungsfaktor 5 (DF 5) verdünnt und manuell in den Flammenphotometer eingebracht.

Die Messbereiche betragen für Natrium 10 – 300 mmol/l und für Kalium 5 – 200 mmol/l.

2.2.5 Amilorid-sensitive Natriurese

Zur indirekten Untersuchung der ENaC-Aktivität *in vivo* wurden Wildtyp- und KO-Mäusen im gesunden Zustand und am siebten Tag nach Induktion der DIN eine Dosis Amilorid intraperitoneal injiziert (10 µg/g Körpergewicht gelöst in Aqua ad iniectabilia mit einer Konzentration von 2 µg/µl, Injektionsvolumen 5 µl/g). Zur Kontrolle wurden 5 µl/g Körpergewicht Aqua ad iniectabilia als Vehikel verabreicht.

Über sechs Stunden wurde der Mäuseurin aus Käfigen ohne Streueinlage aufgesammelt und daraus die Amilorid-sensitive Natriurese bestimmt, die sich aus der Differenz der Natriurese nach Vehikel- und Amilorid-Gabe ergab.

2.2.6 Versuche im Metabolischen Käfig FSAP

Zum Vergleich des Natriumhaushalts im Gesunden und im nephrotischen Zustand, wurden Experimente mit Mäusen beider Genotypen (jeweils n=6) im metabolischen Käfig durchgeführt. Die Mäuse erhielten hierfür eine Kontrolldiät mit normalem Natriumgehalt (C1000, Altromin, ca. 106 µmol/g Futter) und wurden vor und am 7. Tag nach Doxorubicin-Induktion für 24 Stunden in metabolische Käfige gesetzt. Dies erlaubte neben der Erfassung von Körpergewicht, Futter- und Trinkmengenverbrauch

auch allen Urin und Kot zu sammeln, wodurch die Natriumaufnahme und -ausscheidung bzw. -bilanz bestimmt werden konnte.

2.2.7 Blutentnahme und Blutuntersuchungen

Die Blutentnahmen fanden einige Tage vor der Doxorubicin-Induktion im gesunden Zustand und am zehnten Versuchstag statt. Nachdem eine Maus mit Isofluran narkotisiert und die Narkosetiefe überprüft wurde, konnte eine Einmal-Kapillarpipette im medialen Augenwinkel eingebracht werden. Durch Ausrichtung zum gegenüberliegenden Kieferwinkel und durch vorsichtige Rotationsbewegungen wurde der retrobulbäre, kapilläre Venenplexus der Mäuse eröffnet und Blut in eine Blutgasanalyse-Kapillare (ca. 120µl) abgenommen.

Das so gewonnene Blut wurde zentrifugiert und das Blutplasma bei -20 °C gelagert.

2.2.7.1 Blutgasanalyse

Die Blut-Gas-Analyse erfolgte durch die Messung von retrobulbären, kapillären Blut am IL GEM Premier 3000 (Instrumentation Laboratory GmbH). Es konnten so pH, pCO₂, Natrium, Kalium und Calcium bestimmt und Hämatokrit, Hämoglobin sowie Standard-HCO₃⁻ errechnet werden.

2.2.7.2 Harnstoffmessung

Zur Bestimmung der Plasma-Harnstoffkonzentration wurde das „LT-UR 0010“-Kit (Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH) verwendet, dessen Funktion auf dem folgenden Prinzip beruht: Nach dem enzymatischen Abbau von Harnstoff durch Urease entstehen Ammoniak und Bikarbonat, Ammoniak wiederum reagiert mit NADH und α-Ketoglutarat zu L-Glutamat und NAD⁺, was durch die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert wird. Der NADH-Abbau ist proportional zur Harnstoff-Konzentration in der Probe, was in einer verminderten Absorption resultiert [94].

Nach Vorbereitung der Arbeitslösung mit 16 ml Puffer (TRIS Puffer 100 mM, pH 7,8, Ketoglutarate 6 mM, NADH 0,2 mM, ADP 2 mM, EDTA 4 mM, Stabilisatoren) und Enzymen (Urease ≥ 4000 U/l und ≥ 9000 U/l GLDH) wurden jeweils 300 µl davon mit 3 µl unverdünnter Probe, Standard (Harnstoff 40 mg/dl) oder Aqua dest. in eine Küvette pipettiert. Anschließend wurde nach 10 s Inkubation (A1) und wiederholt nach 8 min (A2) die Extinktion im Photometer bei 340 nm gemessen.

Die Berechnung der Harnstoffkonzentration wurde nach den folgenden Formeln durchgeführt: $\Delta A = \text{Extinktion } A_2 - \text{Extinktion } A_1 \text{ (} A_1 > A_2 \text{)}$

$$c_{\text{Harnstoff}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{(\Delta A \text{ Probe} - \Delta A \text{ Blank})}{(\Delta A \text{ Standard} - \Delta A \text{ Blank})} * \text{Konz. Standard} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Nachweisgrenzen für diesen Test liegen zwischen 2 und 300 mg/dl.

2.2.7.3 Albuminmessung

Zur fluorometrischen Bestimmung des Serumalbumins wurde das „Albumin Blue Fluorescent Assay Kit“ (Active Motif) verwendet. Vor Beginn musste die Farbstoffreagenz-Arbeitslösung nach Herstellerinformation vorbereitet, auf Raumtemperatur gebracht und eine Tabelle für die Standardkurve erstellt werden. Danach wurde eine Maus-Serum-Albumin-Lösung (Sigma Aldrich) mit Puffer B verdünnt und jeweils 40 µl Lösung mit absteigenden Konzentrationen in acht Kammern einer 96-Lochplatte gegeben. Damit wurde die Standardkurve erstellt. Nun konnten die Serumproben mit Puffer B verdünnt (z. B. 1:50 oder 1:200 für nephrotische Proben) und insgesamt 20 µl in die weiteren Kammern pipettiert werden. Danach wurden 100 µl Farbstoffreagenz-Arbeitslösung hinzugefügt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln konnte die Fluoreszenz (Exzitation: 560 nm, Emission: 620 nm) gemessen werden. Mithilfe der vorbereiteten Tabelle konnte nun eine Standardkurve erstellt und die Albuminkonzentration der einzelnen Proben berechnet werden [95]. Für die Standardkurve wurde die Formel $y = Ax + B$ verwendet. Die Emissionsintensität konnte dann für y eingesetzt und nach x für die Albuminkonzentration aufgelöst werden. Das Nachweisminimum für diesen Versuch wurde mit 0,5 mg/l angegeben.

2.2.8 Entnahme und Fixierung der Nieren

Die Entnahme der Nieren erfolgte zur Erstellung von Histologie und Histopathologie sowie der Western Blots. Die Nieren wurden nach Entnahme kurzzeitig in einem Kryotube in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Histologie wurde Formaldehyd (4,5 %) in die Nierengefäße injiziert. Die Entwässerung der Nieren erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit dem Einlegen in Isopropanol (= 2-Propanol). Danach wurde das Organ in ein, mit Formaldehyd gefülltes, Gefäß gegeben und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.9 PAS-Färbung

Es wurde das PAS- Färbekit von Carl Roth verwendet. Die 3-5 µm dünnen, paraffinierten Nierenschnitte wurden zunächst erhitzt, bevor sie mit Roti®Histol deparaffinierten wurden. Anschließend erfolgte die Rehydrierung mit der absteigenden Alkoholreihe. Für den Färbvorgang wurde erst die Hydrolyse mit Perjodsäure durchgeführt, danach das Färben mit Schiffs Reagenz und das Gegenfärben mit der Hämalaunlösung nach Mayer. Nach dem erneuten Entwässern über die aufsteigende Alkoholreihe, erfolgte das Einlegen in Roti®Histol (= Xylol) und das Eindecken mit einem Tropfen synthetischem Einschlussmittel aus dem Roti® Histokit. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend mit dem Axioskop 2 plus aufgenommen (Zeiss). Die endgültige Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS6.

2.2.10 Western Blots

2.2.10.1 Allgemeine Grundlagen

Western Blotting wird angewendet, um ein bestimmtes Protein nachzuweisen [96], sowie sein Molekulargewicht und seine relative Menge in der Probe zu bestimmen [97]. Sind die Zielproteine in Gewebe enthalten, muss dieses zunächst lysiert werden. Danach erfolgt eine Gesamtproteinbestimmung aus den Proben. Dies ist die Voraussetzung, um gleiche Proteinmengen zu laden und die Proteinbanden miteinander vergleichen zu können.

Es folgt die Elektrophorese, bei der die Proteine im elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung der Anode laufen und dabei nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Anhand eines Markers kann die Masse einer Proteinbande abgelesen werden. Für die Durchführung weiterer Verfahren wird nun das eigentliche Blotting durchgeführt. Dabei werden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen [98, 99]. Als nächstes erfolgen eine Gesamtproteinfärbung und der erste Scan, um die Menge des geladenen Proteins zu bestimmen. Anhand dessen kann später mittels Densitometrie die Quantifizierung des gesuchten Proteins erfolgen. Das anschließende Blocking mit Blocking Buffer hat den Zweck unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Danach beginnt die Inkubation mit Antikörpern. Der erste Antikörper (primary antibody) ist speziell auf das gesuchte Zielprotein (hier α -, β - und γ -ENaC sowie DNA-PKcs) zugeschnitten. Anschließend wird mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der spezifisch an den Primärantikörper bindet. Der

zweite Antikörper wird im Fluoreszenz-Scanner sichtbar gemacht und ermöglicht so die Visualisierung des ersten Antikörpers und damit des Zielproteins.

2.2.10.2 *Untersuchung der Expression der Untereinheiten von ENaC*

Proteinlysate

Bei der Verarbeitung von Mausnieren zu einem Lysat sollte grundsätzlich auf Eis gearbeitet und alles gut gekühlt werden, um Proteinabbau zu verhindern.

Die Nieren wurden zunächst halbiert, ein Cortex (ca. 100 mg) präpariert und mit 1 ml des Lysepuffers für zwei Minuten in einem Glas-Potter homogenisiert. Zusätzlich zum Sucrose-Lyse-Puffer (250 mM Sucrose, 10 mM Triethanolamin HCl, 1,6 mM Ethanolamin und 0,5 EDTA bei pH 7,4) [100] wurden Aprotinin (40 µg/ml) und ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Endkonzentration 1:10) hinzugegeben, um einen Abbau der Proteine *in vitro* zu verhindern. Das Homogenisat wurde in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben, 15 min auf Eis inkubiert und dann 15 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Im Pellet befanden sich nun die Zellkerne, die verworfen wurden. Der Überstand wurde abpipettiert und erneut für 30 min und 4 °C bei 20000 g zentrifugiert. Die Pellets enthielten jetzt das Membranprotein und wurden anschließend in Sucrose-Puffer überführt.

Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtproteins wurden nun 2 µl Proteinlysate mit 1 ml (1:5 verdünntem) BIORAD-Reagenz zusammengegeben und die Proteinmenge im Photometer gemessen (vgl. Vorgehen in 2.2.4). Vor Verwendung wurde die Proteinmenge oder Konzentration auf 5 mg/l eingestellt.

Deglycosylierung (für die Analyse der γ -ENaC-Expression)

Zu Beginn wurden die Proteine denaturiert. Dafür wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl aus 1-20 µg Glykoprotein, 1 µl Glycoprotein Denaturing Buffer (10x) und H₂O, falls notwendig, hergestellt. Dieser wurde für 10 min bei 70 °C erhitzt. Danach wurden dem Reaktionsgemisch 2 µl GlycoBuffer 2 (10X), 2 µl 10 % NP-40, 1 µl PNGase F und H₂O (wenn notwendig) hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Danach wurde alles für eine Stunde bei 37 °C inkubiert [80, 101]. Durch die Deglycosylierung werden N-gebundene Polysaccharide abgespalten. Dies ist hilfreich, um in der Elektrophorese eine deutlichere Akkumulation

der Zielproteine und damit klarer abgegrenzte Banden zu erhalten. Außerdem wird dadurch erst die Darstellung des proximalen und distalen Spaltprodukts ermöglicht [80].

Denaturierung von α - und β -ENaC

Die Proben für die anderen beiden ENaC-Untereinheiten, α und β , wurden ohne Deglycosilierung mit Laemmli-Puffer für 10 min bei 70 °C behandelt.

Gelelektrophorese

Es wurden Polyacrylamid-Gele mit 4-15 % (α - und β -ENaC) und 8 % (γ -ENaC) verwendet. Es wurden 20 μ g Protein geladen. 2,5-3 μ l des Leiters „Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder“ diente zur Markierung der Molekulargewichte. Die Auftrennung erfolgte für 10 min bei 100 V und danach für 70-80 min bei 200 V im Eisbad.

Blotting

Nachdem das Gel und die Nitrozellulose-Membran (0,2 μ m) für einige Minuten in Puffer äquilibriert wurden, wurde beides zwischen zwei Filter gebracht und mit kaltem Transferpuffer (20 % Methanol und 0,025 % SDS) bedeckt. Es wurde ein elektrisches Feld installiert, das die Proteine auf die Membran transferierte. Bei der Verwendung der Criterion Plattenelektroden (Biorad) wurden 100 V über 30 min angelegt.

Gesamtproteinfärbung

Unter leichtem Schütteln wurde die Membran 5 min in 5 ml Total Protein Stain-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Lösung dekantiert und die Membran zweimal 30 Sek. mit ca. 5 ml wash solution gespült. Die Membran wurde nun mit dem Kanal „700 nm“ bei Intensität 2 (je nach Bandenstärke) eingescannt. Zwischen den Schritten wurde die Membran regelmäßig kurz mit Aqua dest. gespült.

Blocking

Die Membran wurde mit Blocking Puffer für eine Stunde inkubiert und anschließend in TBS/ Tween für 5 min. gewaschen.

Antikörper-Inkubation

Zunächst erfolgte bei 4 °C die Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper. Für den α - und den β -ENaC wurde ein Kaninchen-Antikörper gegen die Aminosäuren 45-68 (α -ENaC) und 617-638 (β -ENaC) verwendet (Sonderanfertigungen von Pineda, Berlin). Für den γ -ENaC wurde SPC-403 (Stressmarq) benutzt, der gegen die Aminosäuren 634-655 gerichtet war. Als Grundlage für die verwendeten Antikörper dienten die Peptidsequenzen nach Masilamani et al. [102]. Die Antikörper wurden im Mischverhältnis von 1:1000 mit Blocking Puffer angewendet [103]. Anschließend wurden ungebundene Antikörper mit viermal 5 min TBS/ Tween entfernt. Der Sekundärantikörper „IRDye 800CW“ wurde im Verhältnis von 1:20000 mit Blocking Buffer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hiernach erfolgte das Entfernen ungebundener Antikörper: Viermal 5 min in TBS/ Tween 20 und danach noch zweimal 5 min ohne Tween 20. Die Antikörper-Spezifität wurde zuvor anhand von Lysaten von ENaC-exprimierenden Oozyten überprüft [80]. Das Einscannen der Membran wurde nun mit dem 800 nm-Kanal bei Intensität 5 (je nach Bandenstärke) durchgeführt, um den fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar zu machen. Die Farbsignale der Proteine wurden im Rahmen der Densitometrie auf die verwendete Gesamtproteinmenge normalisiert. Nach der Visualisierung des α -ENaC, wurde ein Stripping mit Stripping-Puffer durchgeführt, um den Primär- und den Sekundärantikörper zu entfernen und aus denselben Proben den β -ENaC zu detektieren.

2.2.10.3 Ergänzungen zum Western Blotting von DNA-PKcs

Nach der Homogenisierung der Nieren wurde das Zellkernpellet nach Zentrifugation bei 1000 g nicht verworfen, sondern weiterverwendet, da es sich bei den DNA-PKcs um ein nukleäres Protein handelt. Die Proben wurden anschließend mit Laemmli-Puffer für 10 min auf 70°C erhitzt. Für die Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde 4 %-iges Gel verwendet und 10 μ g Gesamtprotein geladen. Die Durchführung der Gelelektrophorese und des Western Blots entspricht zu großen Teilen der Vorgehensweise für die ENaC-Proteine. Die Nieren wurden von gesunden Tieren sowie acht beziehungsweise 72 Stunden nach Doxorubicin-Applikation entnommen. Als Primärantikörper wurden SAB4502385 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, 1:1000, Sigma-Aldrich) gegen die Aminosäuresequenz 4061-4110 von DNA-PKcs und ab32566WB (auch „clone Y393“, monoklonaler Kaninchen-Antikörper, 1:750,

Abcam) gegen eine Aminosäuresequenz zwischen 4050 und dem C-Terminus von DNA-PKcs verwendet.

2.2.11 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde mit primären Antikörpern gegen DNA-PKcs (SAB4502385 und ab32566WB) mit einem automatischen Immunostainer (Ventana Medical Systems) gemäß den Protokollen des Herstellers mit leichten Modifikationen durchgeführt.

2.2.12 FSAP-Aktivitätsmessungen im Mausurin

Eine Mikrotiterplatte wurde jeweils mit verdünntem Urin von nephrotischen und nicht-nephrotischen Mäusen beimpft. Pro-uPA (1 µg/mL; Saruplase, Grünenthal) und 0,2 mM des chromogenen Substrats S-2444 (Haemochrom Diagnostica) wurden hinzugegeben und die proteolytische Aktivität durch eine Absorptionsmessung mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät EL 808 (Bio Tek) bei 405 nm ermittelt.

2.2.13 Statistik

Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Sammlung und Zusammenfassung der Daten erfolgten mit Office Excel 2010/ 365 (Microsoft). Die statistischen Berechnungen und die Erstellung der Graphiken wurden mit Prism 8, 9 und 10 (Graphpad Software Inc.) realisiert. Zur Testung auf Normalverteilung wurden der D'Agostino & Pearson test, der Anderson-Darling test, der Shapiro-Wilk test und der Kolmogorov-Smirnov test angewendet. Zeigte mindestens einer dieser Tests die Daten als nicht normalverteilt an, so wurden sie als solche behandelt. In diesem Fall erfolgte dann die Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis test. Bei Normalverteilung wurde der Ordinary one-way ANOVA zur Varianzanalyse benutzt. Die Signifikanzanalyse erfolgte bei normalverteilten Werten mit dem gepaarten oder ungepaarten Students t test, dem Dunnett post-Test oder dem Tukey's multiple comparison post-Test. Der Dunn's post-Test oder der Mann-Whitney post-test wurde für nicht normalverteilte Daten verwendet. Als signifikanter Unterschied wurden Ergebnisse bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Die Untersuchung der Rolle von DNA-PKcs bei der Induktion des Doxorubicin-induzierten Nephrotischen Syndroms (DIN) im Mausmodell

3.1.1 Zucht und Bestimmung des Genotyps

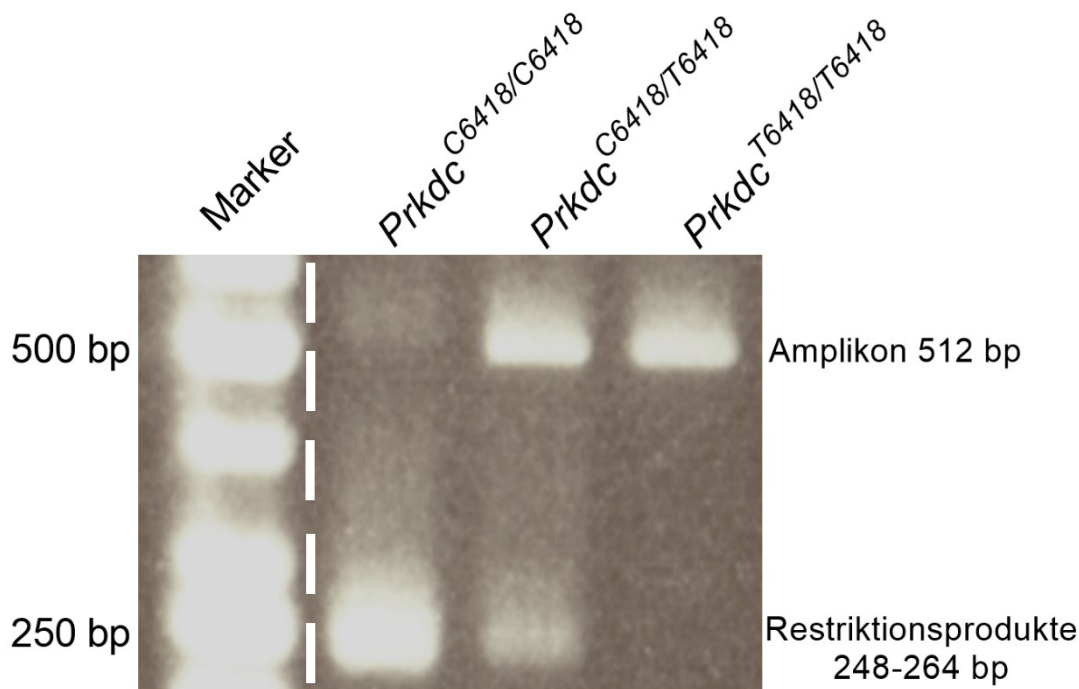


Abbildung 3-1: Gelelektrophorese nach Verdauungsreaktion mit dem Restriktionsenzym BsmBI zur Genotypisierung des C6418T-SNP

Es konnten bei 129S1/SvImJ-Mäusen ($\text{Prkdc}^{\text{T6418/T6418}}$) ein Amplikon (512 bp) und bei C57BL/6-Mäusen ($\text{Prkdc}^{\text{C6418/C6418}}$) Restriktionsprodukte (248-264 bp) dargestellt werden. Für Heterozygote ($\text{Prkdc}^{\text{C6418/T6418}}$) waren das Amplikon und die Restriktionsprodukte nachweisbar.

Marker und Proben stammten aus derselben Gel-Elektrophorese. Die weiße-gestichelte Linie markiert die Schnittstelle aus der Entfernung anderer Proben zur besseren Übersicht. Aus [13]

Bei den Versuchstieren wurde der Einzelnukleotid-Polymorphismus C6418T im Prkdc-Gen (rs4164952) genotypisiert. Die dafür angewendete Methode wurde zuvor in einem anderen Zusammenhang publiziert [23]. Die Genotypisierung ergab bei den 129S1/SvImJ-Mäusen ($\text{Prkdc}^{\text{T6418/T6418}}$) ein Amplikon mit 512 bp, welches resistent gegenüber der Verdauungsreaktion war. Bei den C57BL/6-Mäusen ($\text{Prkdc}^{\text{C6418/C6418}}$) wurde das Amplikon bei der Verdauung gespalten und es konnten Restriktionsprodukte mit 248-264 bp dargestellt werden. Für die heterozygoten

$Prkdc^{C6418/T6418}$ -Tiere waren sowohl das Amplikon mit 512 bp als auch die Restriktionsprodukte mit 248-264 bp nachweisbar.

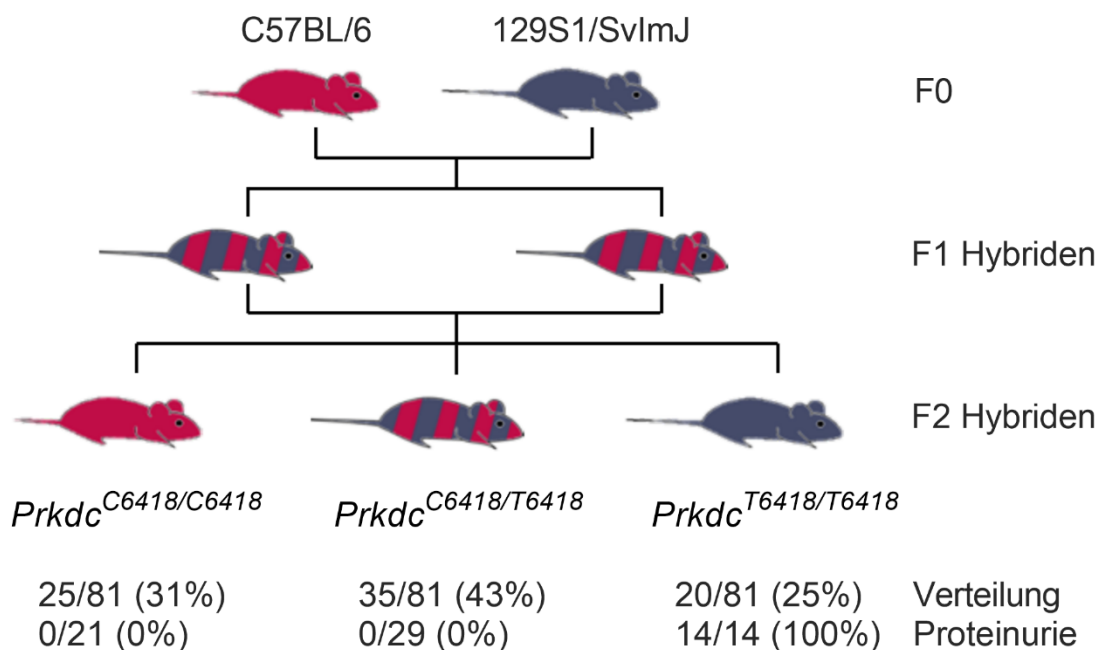


Abbildung 3-2: Züchtungsschema der Versuchstiere

Abgebildet ist die Verpaarung von C57BL/6- und 129S1/SvImJ-Mäusen über zwei Generationen sowie die Verteilung des C6418T-Einzelnukleotidpolymorphismus bei den 129SB6F2-Tieren und die Proteinurie-Entwicklung am 4. Tag nach Doxorubicin-Injektion. Aus [13]

Zur Untersuchung der Rolle des Einzelnukleotid-Polymorphismus C6418T bei der Entwicklung des nephrotischen Syndroms im DIN-Modell wurden geeignete Mäuse mit den entsprechenden Genotypen gezüchtet. Es wurden zunächst die DIN-unempfindlichen C57BL/6- ($Prkdc^{C6418/C6418}$) mit den DIN-empfindlichen 129S1/SvImJ-Mäusen ($Prkdc^{T6418/T6418}$) verpaart [21, 22]. Die heterozygote 1. Filialgeneration (F1) ($Prkdc^{C6418/T6418}$) wurde anschließend erneut verpaart, um in der F2-Generation homo- und heterozygote Tiere zu erhalten. Die Allel-Verteilung entsprach näherungsweise den Mendelschen Regeln: 31% ($Prkdc^{C6418/C6418}$), 43% ($Prkdc^{C6418/T6418}$) und 25% ($Prkdc^{T6418/T6418}$).

3.1.2 Nephrotisches Syndrom bei $Prkdc^{C6418/C6418}$, $Prkdc^{C6418/T6418}$ und $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Mäusen

Insgesamt wurden 64 129SB6F2-Tiere (21 $Prkdc^{C6418/C6418}$, 29 $Prkdc^{C6418/T6418}$ und 14 $Prkdc^{T6418/T6418}$) auf einem Unterschied zwischen den Genotypen in Bezug auf die Entwicklung des nephrotischen Syndroms im DIN-Modell untersucht.

3.1.2.1 Proteinurie als Marker für die Induktion des nephrotischen Syndroms

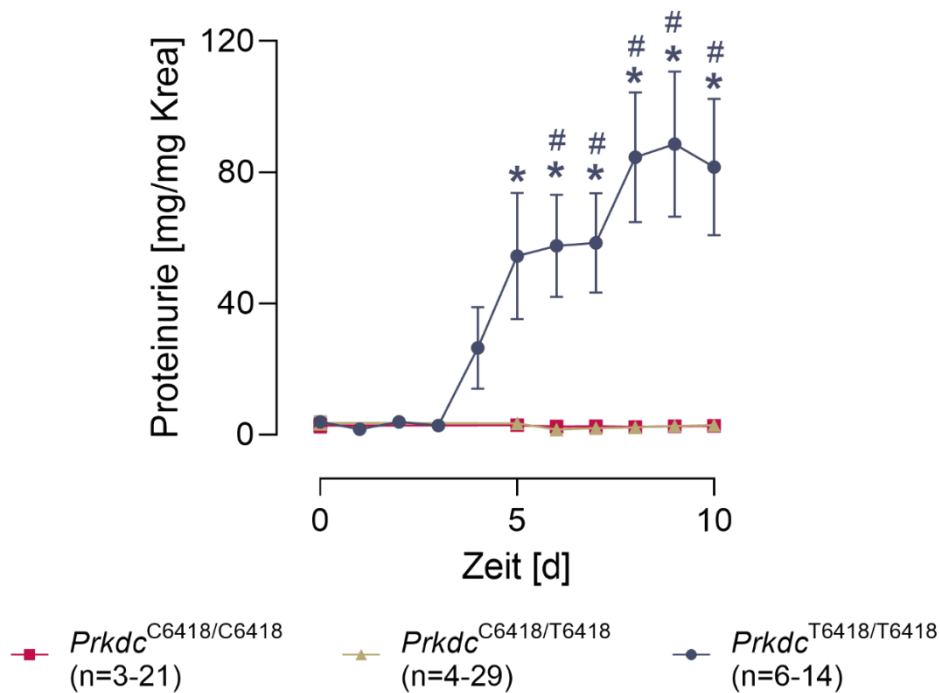


Abbildung 3-3: Proteinurie im DIN-Modell

Gezeigt wird die hohe Proteinurie der $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Mäuse gegenüber der nicht erhöhten Proteinurie im Vergleich zu Kontrollwerten bei den $Prkdc^{C6418/C6418}$ - und heterozygoten Mäusen. Markiert sind signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (*) und signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollwerten am Tag 0 (#). Aus [13].

Bei allen untersuchten $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Mäusen (100 %) konnte eine ausgeprägte Proteinurie festgestellt werden, während bei keinem der $Prkdc^{C6418/C6418}$ - (0 %) oder heterozygoten Tiere (0 %) eine signifikant gesteigerte Proteinurie gegenüber den Kontrollwerten nachgewiesen werden konnte.

Die Proteinurie der $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Mäuse war ab Versuchstag fünf (55 ± 19 mg/mg Kreatinin) im Vergleich zu den $Prkdc^{C6418/C6418}$ - ($3 \pm 0,5$ mg/mg Kreatinin) und heterozygoten Tieren ($3 \pm 0,6$ mg/mg Kreatinin) signifikant erhöht. Im Vergleich zu den Kontrollwerten war die Proteinurie ab Tag sechs (58 ± 16 mg/mg Kreatinin) signifikant

erhöht. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen und jene im Vergleich zu den Kontrollwerten waren bis zum Ende des Versuchs an Versuchstag zehn vorhanden.

3.1.2.2 Natriurese

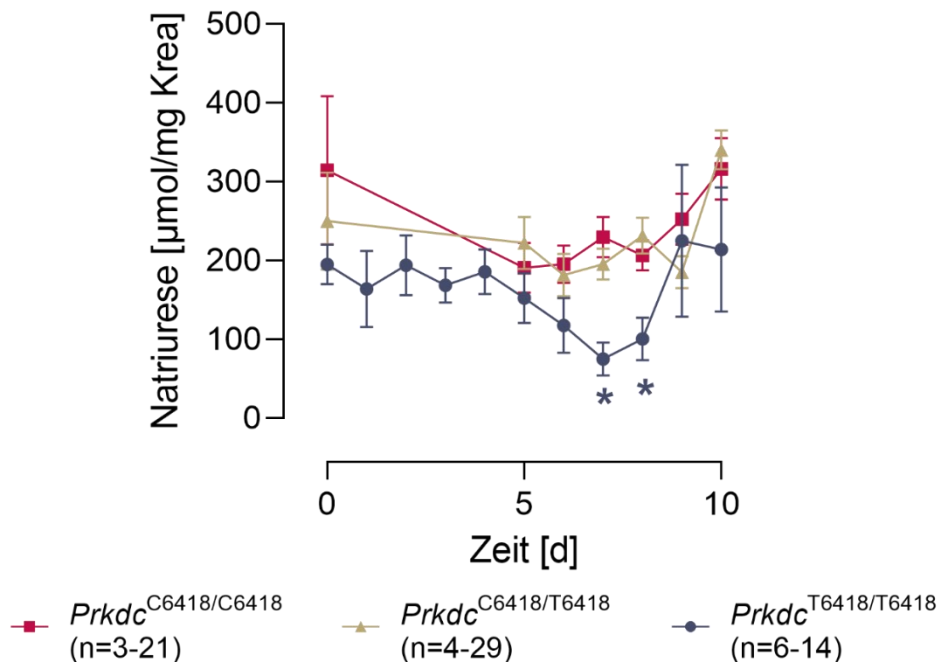


Abbildung 3-4: Natriurese im DIN-Modell

Man erkennt die signifikant verminderte Natriurese der $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Mäuse an den Versuchstagen 7 und 8 im Gegensatz zu der weiterhin hohen Natriurese der $Prkdc^{C6418/C6418}$ - und heterozygoten Mäuse. Markiert sind signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (*). Aus [13].

An den Versuchstagen sieben und acht war die Natriurese bei den $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Mäusen (75 ± 21 und 101 ± 27 µmol/mg Kreatinin) im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen $Prkdc^{C6418/C6418}$ (230 ± 26 und 207 ± 19 µmol/mg Kreatinin) und Heterozygoten (196 ± 20 und 232 ± 23 µmol/mg Kreatinin) signifikant geringer im Sinne einer ENaC-Aktivierung und Natriumretention.

3.1.2.3 Körpergewicht als Surrogat der Ödementstehung

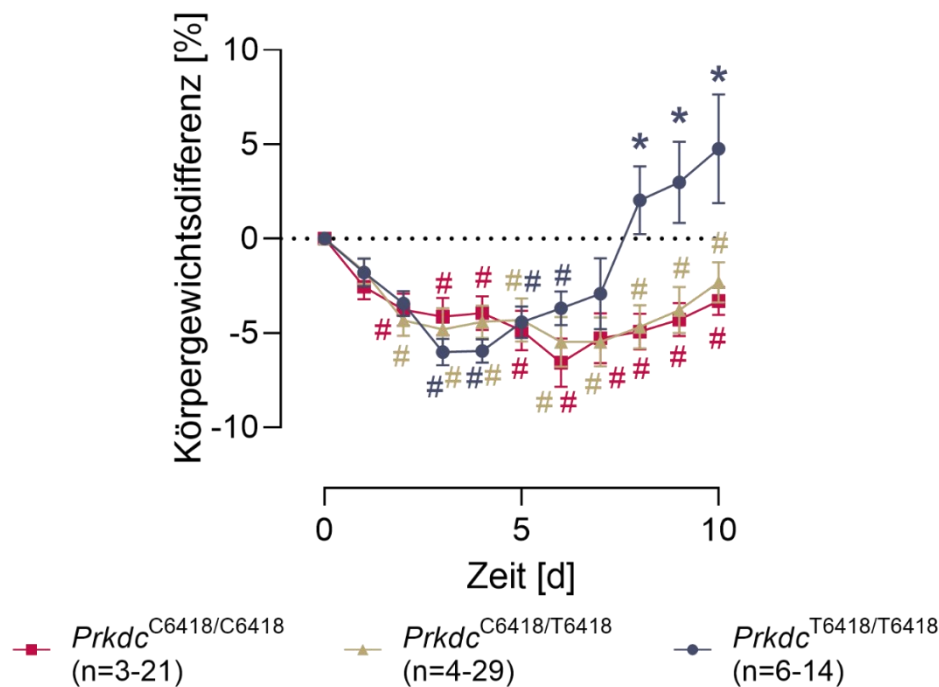


Abbildung 3-5: Relative Körpergewichtsveränderung im DIN-Modell

Dargestellt ist die signifikante Zunahme des relativen Körpergewichts der *Prkdc*^{T6418/T6418}-Mäuse gegenüber den *Prkdc*^{C6418/C6418}- und heterozygoten Tieren. Markiert sind signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (*) und signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollwerten (#). Aus [13]

Bei der Betrachtung der Körpergewichtsdifferenz im Vergleich zum Versuchsbeginn (Kontrolltag 0) ergab sich an den ersten drei Versuchstagen bei allen drei SNP-Genotypen einen Gewichtsverlust um ca. 5 %. Ab Tag drei nach Doxorubicin-Injektion konnte man bei den *Prkdc*^{T6418/T6418}-Mäusen zunächst ein stabiles (Tag drei: $-6,0 \pm 0,7$ %, Tag vier: $-5,9 \pm 0,6$ %) und dann ein ansteigendes Körpergewicht beobachten (Tag fünf: $-4,4 \pm 0,8$ %, Tag sechs: $-3,7 \pm 0,9$ % und Tag sieben: $-2,9 \pm 1,9$ %). An den Versuchstagen acht bis zehn (Tag zehn: $+4,8 \pm 2,9$ %) war die Körpergewichtsdifferenz der *Prkdc*^{T6418/T6418}-Mäuse gegenüber den anderen beiden Genotypen signifikant erhöht (*Prkdc*^{C6418/C6418}: Tag zehn $-3,3 \pm 0,7$ %, Heterozygote: Tag zehn: $-2,3 \pm 1,1$ %). Bei *Prkdc*^{C6418/C6418}-Mäusen mit $-3,8 \pm 0,9$ % und den heterozygoten Mäusen mit $-4,3 \pm 0,8$ % war zudem ab Tag zwei nach Doxorubicin-Injektion bis zum letzten Versuchstag (10) ein signifikant erniedrigtes Körpergewicht im Vergleich zum Kontrolltag festzustellen.

3.1.2.4 Lichtmikroskopie PAS-gefärbter Nieren unterschiedlicher 129SB6F2-SNP-Genotypen

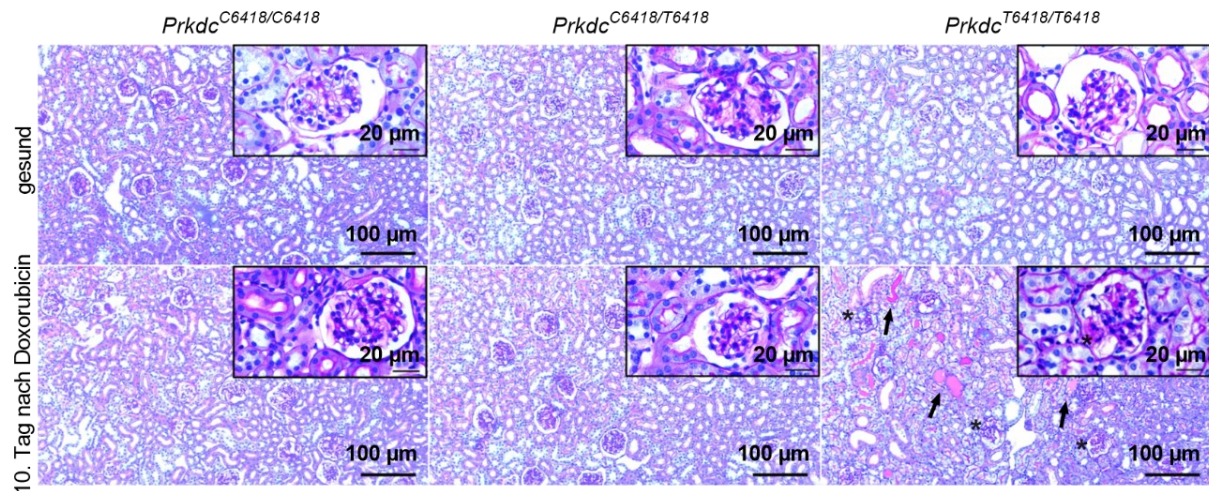


Abbildung 3-6: Lichtmikroskopie PAS-gefärbter Nieren der unterschiedlichen 129SB6F2-SNP-Genotypen im gesunden (oben) und im nephrotischen Zustand (unten)

Man erkennt Proteinablagerungen in den Tubuli (Pfeile) und im Bowman'schen Kapselraum (*) der nephrotischen $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Nierenschnitte, die sich bei den anderen Genotypen nicht zeigten. Diese wurden als Folge des Doxorubicin-induzierten glomerulären Schadens und der daraus resultierenden Proteinurie interpretiert. Aus [13].

Das Nierengewebe der unterschiedlichen SNP-Genotypen von 129SB6F2-Mäusen wurde histologisch auf Anzeichen eines Doxorubicin-induzierten Schadens untersucht. Unter Kontrollbedingungen entnommene Nieren zeigten dabei keinen Genotypspezifischen Unterschied zwischen den drei Gruppen. Nach Doxorubicin-Injektion fanden sich bei $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Nierenschnitten Proteinablagerungen in den Tubuli und im Bowman'schen Kapselraum. Diese wurden als Folge des glomerulären Schadens und der daraus resultierenden Proteinurie gewertet. Dieses Schädigungsmuster ließ sich nur bei den $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Tieren nachweisen, während $Prkdc^{C6418/C6418}$ und $Prkdc^{C6418/T6418}$ keine Veränderungen zeigten.

3.1.3 Expression von DNA-PKcs in Nierenlysaten

3.1.3.1 Western Blots bei gesunden Kontrollmäusen

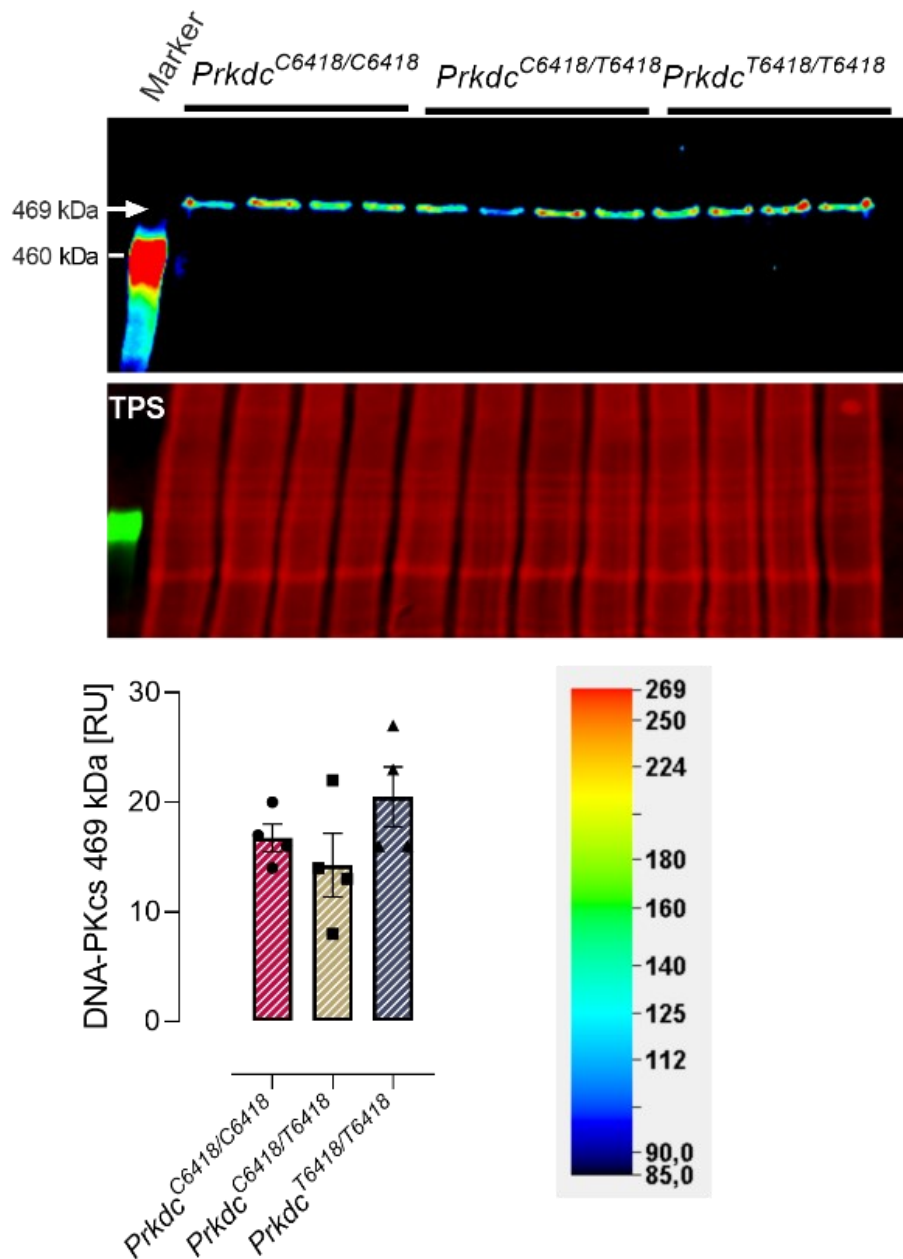


Abbildung 3-7: PKcs-Detektion in gesunden Nieren mit dem Antikörper ab32566

Oben: Der Blot zeigt bei allen drei Prkdc-SNP-Genotypen jeweils Banden mit einer Masse von 469 kDa.

Mitte: Gesamtproteinfärbung (TPS) zur Quantifizierung.

Unten: Densitometrie der 469 kDa-Bande.

Aus [13].

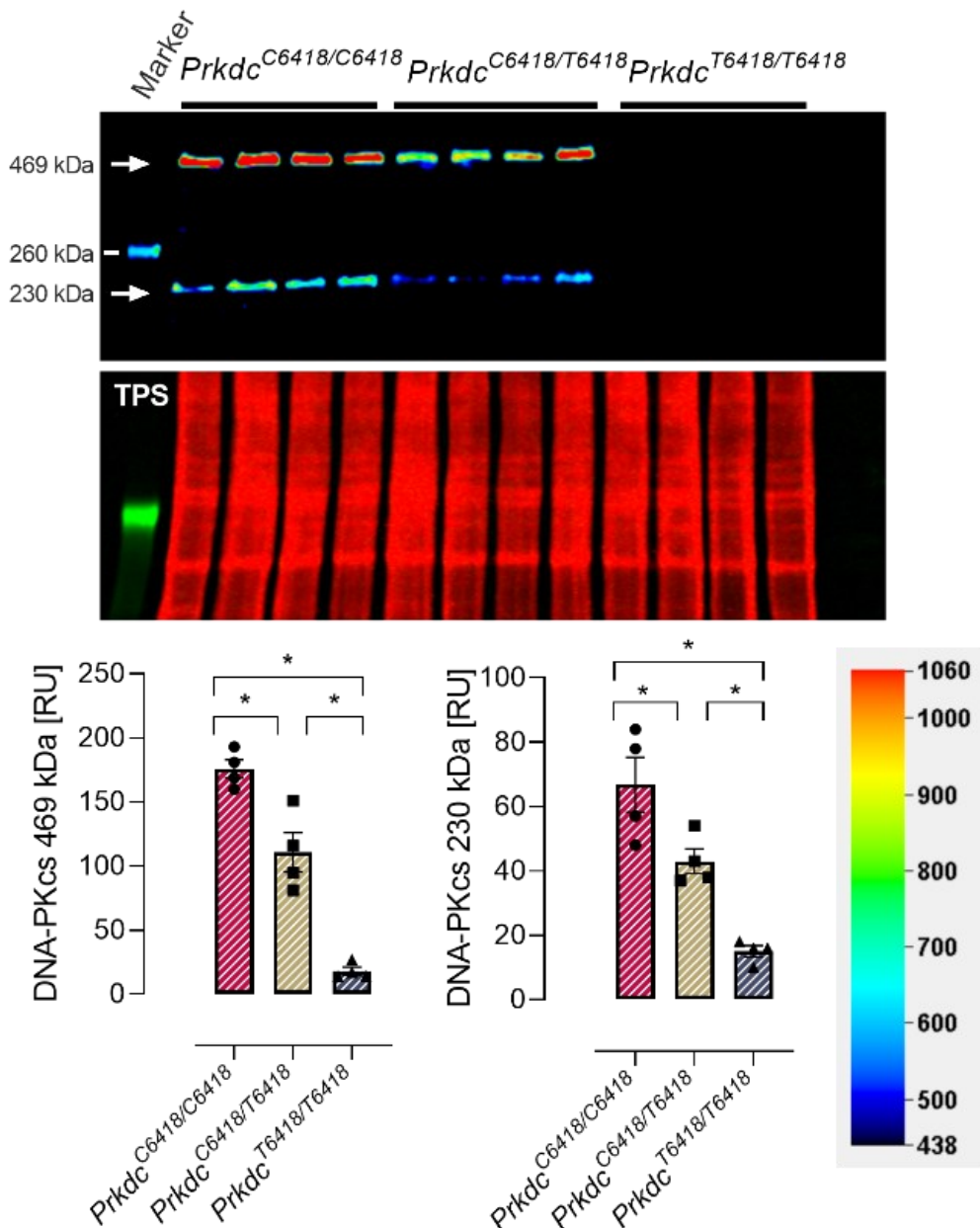


Abbildung 3-8: PKCs-Detektion in gesunden Nieren mit dem Antikörper SAB4502385

Oben: Man erkennt 469 kDa-Banden bei Prkdc^{C6418/C6418}-Mäusen. Bei Prkdc^{T6418/C6418}- Tieren sind diese reduziert und bei Prkdc^{T6418/T6418} nicht vorhanden, was auf eine SNP-Konformationsänderung zurückgeführt wurde. Die zudem detektierte Bande bei 230 kDa ging vermutlich auf eine DNA-PKcs-Spaltung durch Caspase 3 zurück.

Mitte: Gesamte Proteinfärbung (TPS) zur Quantifizierung.

Unten: Densitometrie der 469 kDa und 230kDa-Banden.

Aus [13].

Mithilfe des Antikörpers ab32566 fanden sich bei allen drei Prkdc-SNP-Genotypen Banden mit einer Masse von 469 kDa. Der Antikörper SAB4502385 zeigte für die Prkdc^{C6418/C6418}-Mäuse ebenfalls Banden bei 469 kDa. Für Prkdc^{T6418/C6418}- Tiere waren diese um circa 50% reduziert und bei der bei den Prkdc^{T6418/T6418}-Mäusen

wiederum nicht vorhanden. Zusätzlich konnte mit SAB4502385 bei den Prkdc^{C6418/C6418}-Mäusen und den Heterozygoten eine Bande bei 230 kDa entdeckt werden. In einem vergleichbaren Verhältnis zur 469 kDa-Bande war die 230 kDa-Bande bei den Heterozygoten um etwa 50% reduziert und bei Prkdc^{T6418/T6418}-Tieren nicht vorhanden.

Die Darstellung der 230 kDa-Bande ging möglicherweise auf eine Spaltung der DNA-PKcs am Aminosäurenabschnitt 2017-2018 durch Caspase 3 zurück [159]. Bei der 230 kDa-Bande würde es sich somit um ein Spaltprodukt der DNA-PKcs handeln.

Als Grund für den reduzierten Nachweis beider Banden durch SAB4502385 wurde eine Konformationsänderung durch den Prkdc-SNP vermutet, sodass der Antikörper nur noch zu etwa 50% (Prkdc^{C6418/T6418}) beziehungsweise nicht wesentlich (Prkdc^{T6418/T6418}) DNA-PKcs binden konnte.

3.1.3.2 Western Blots nach Doxorubicin-Applikation

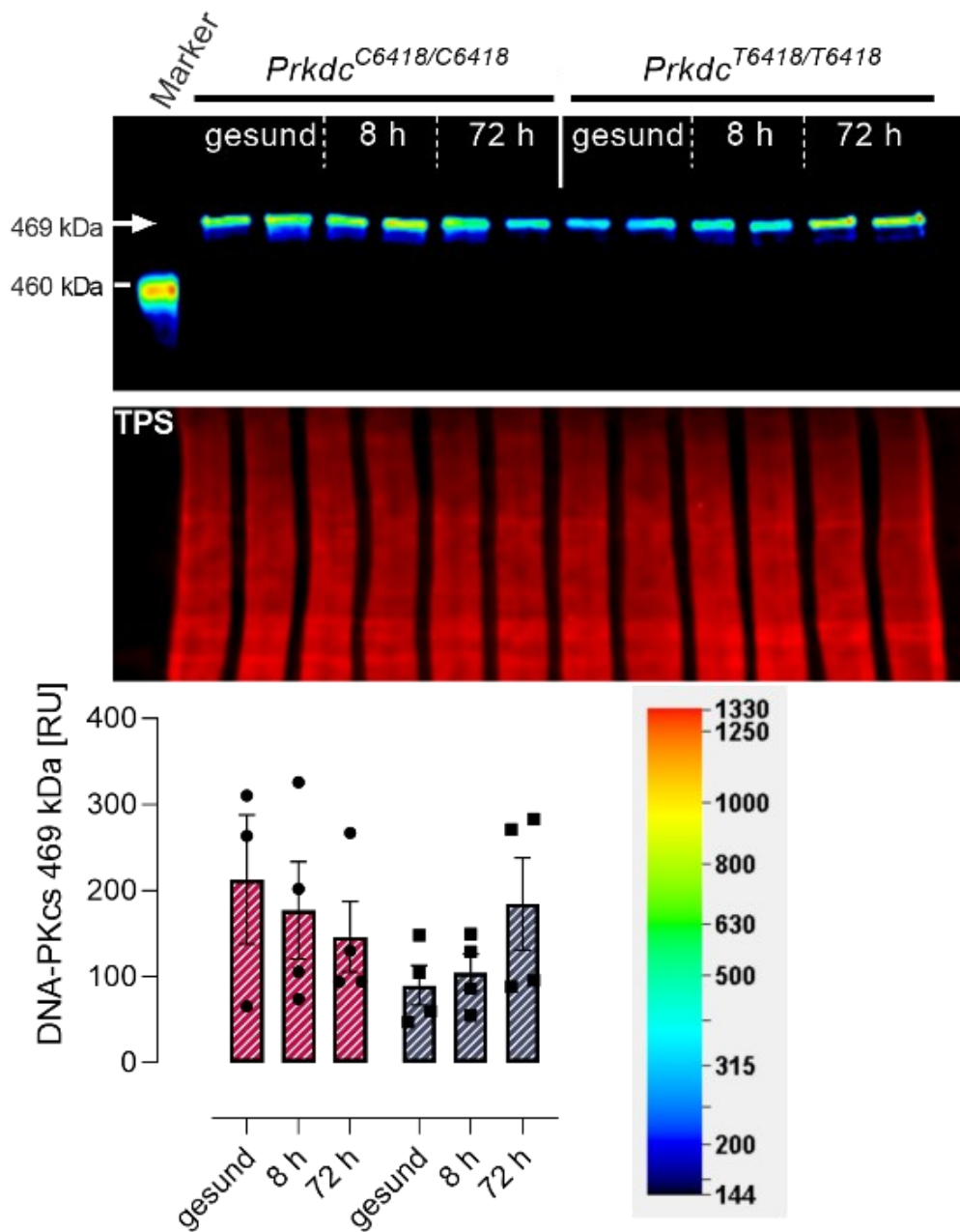


Abbildung 3-9: PKCs-Detektion nach Doxorubicin mit dem Antikörper ab32566

Oben: Dargestellt ist die 469 kDa-Bande bei beiden untersuchten Genotypen sowohl im Gesunden als auch nach Doxorubicin-Injektion.

Mitte: Gesamtproteinfärbung (TPS) zur Quantifizierung.

Unten: In der Densitometrie sieht man eine tendenzielle PKCs-Abnahme bei *Prkdc*^{C6418/C6418} (•, rot) und eine tendenzielle PKCs-Zunahme bei *Prkdc*^{T6418/T6418} (▪, blau) nach Doxorubicin-Injektion.

Aus [13].

Mit dem Antikörper ab32566 ergab sich in den Nierengeweben beider SNP-Genotypen der Nachweis der Bande bei 469 kDa. Dies war im Gesunden und acht, beziehungsweise 72 Stunden nach Doxorubicin-Injektion der Fall. Es deutete sich

dabei tendenziell eine PKcs-Abnahme bei den $Prkdc^{C6418/C6418}$ - und eine PKcs-Zunahme bei den $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Mäusen in der Densitometrie nach acht beziehungsweise nach 72 Stunden an.

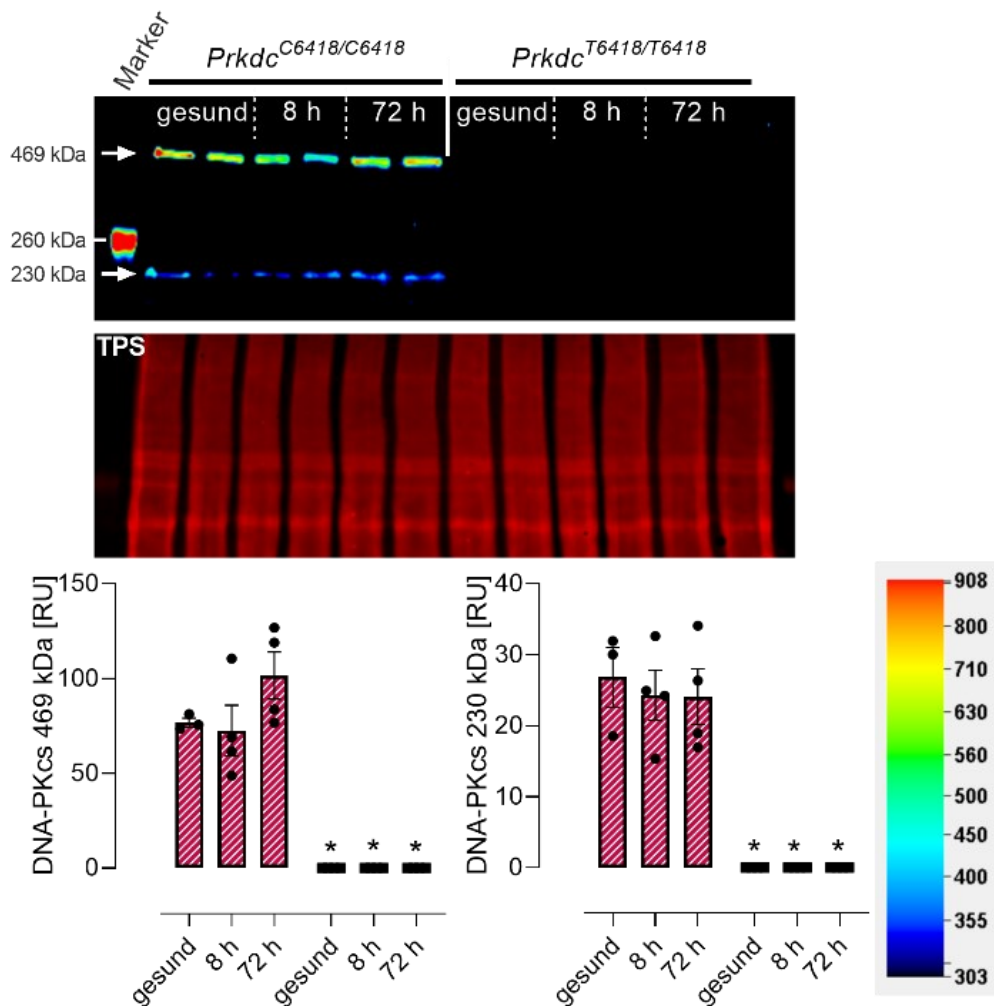


Abbildung 3-10: PKcs-Detektion nach Doxorubicin mit dem Antikörper SAB4502385

Oben: Abgebildet sind die 469 kDa- und 230 kDa-Banden in allen untersuchten Nierengewebe von $Prkdc^{C6418/C6418}$. Bei $Prkdc^{T6418/T6418}$ sind keine Banden dargestellt.

Mitte: Gesamtproteinfärbung (TPS) zur Quantifizierung.

Unten: Densitometrie der 469 kDa und 230 kDa-Banden bei $Prkdc^{C6418/C6418}$ (•, rot) und $Prkdc^{T6418/T6418}$ (▪, blau). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (*).

Aus [13].

Der Antikörper SAB4502385 zeigte bei den $Prkdc^{C6418/C6418}$ -Mäusen die Banden bei 469 kDa und zusätzlich die Banden bei 230 kDa in gesunden Nierengewebe und in Nierengewebe nach Doxorubicin-Applikation. Es konnten keine wesentlichen Veränderungen der DNA-PKcs-Menge nach der Doxorubicin-Injektion festgestellt werden. Bei den $Prkdc^{T6418/T6418}$ -Tieren konnten keine Banden detektiert werden.

3.1.3.3 Expression von DNA-PKcs im Nierengewebe

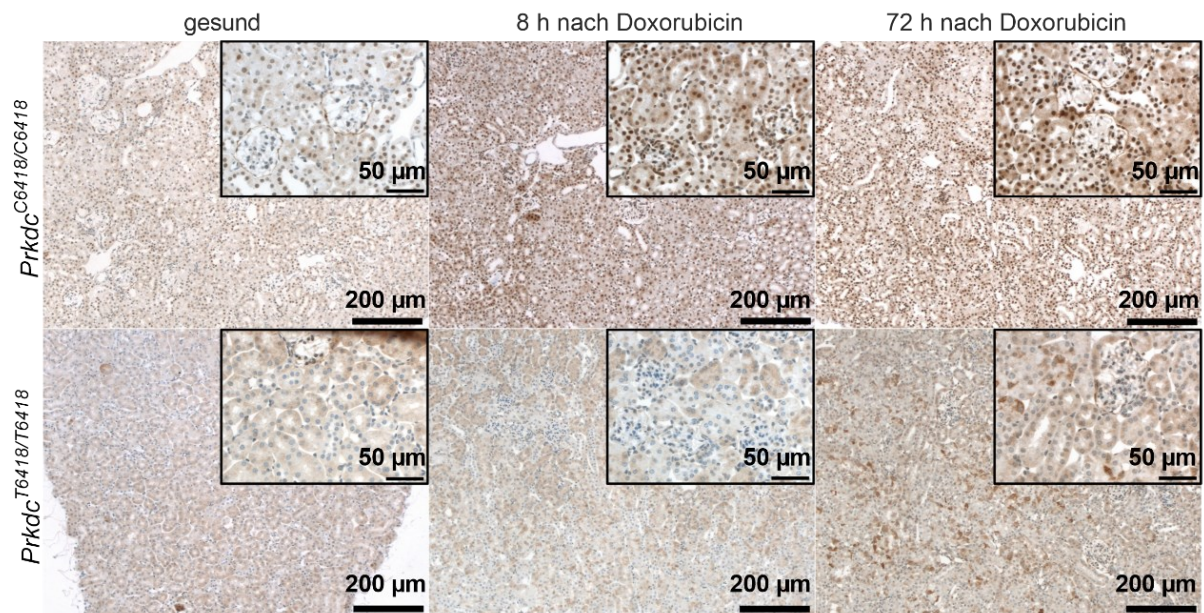


Abbildung 3-11: Immunhistochemie mit SAB4502385

Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme von DNA-PKcs (dunkelbraun, obere Reihe) in den Nucleoli der Prkdc^{C6418/C6418}-Mäuse nach Doxorubicin-Injektion. Aus [13].

Es ließ sich eine deutliche Zunahme von dunkelbraun gefärbtem DNA-PKcs in den Zell-Nucleoli der Prkdc^{C6418/C6418}-Mäuse sowohl nach acht als auch nach 72 Stunden nach Doxorubicin-Injektion im Vergleich zum Gesunden beobachten. Bei den Prkdc^{T6418/T6418}-Mäusen schien es keine vermehrte DNA-PKcs-Expression in den Nucleoli zu geben, was zu den Ergebnissen der Western Blots passte. Mit dem Antikörper ab32566 ergab sich keine spezifische Färbung der Nierenschnitte (nicht dargestellt).

3.2 Die Untersuchung der Rolle der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) für die Ödementstehung im experimentellen Nephrotischen Syndrom im Mausmodell

3.2.1 FSAP-Ausscheidung im nephrotischen Mäuseurin

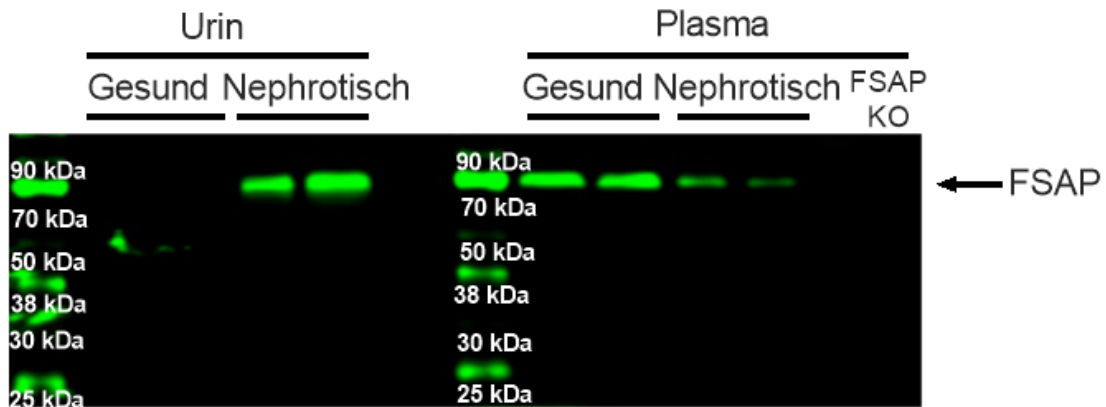


Abbildung 3-12: FSAP-Nachweis im Mausurin und -plasma

Die Western Blots zeigen die FSAP in ihrer Zymogen-Form bei 64 kDa im Urin nephrotischer Wildtyp-Mäuse. Passend dazu stellt sie sich im Plasma vermindert dar.

Im Gesunden war FSAP nur im Plasma und nicht im Urin nachweisbar. Bei FSAP-KO-Mäusen war kein FSAP im Plasma detektierbar. Aus [104].

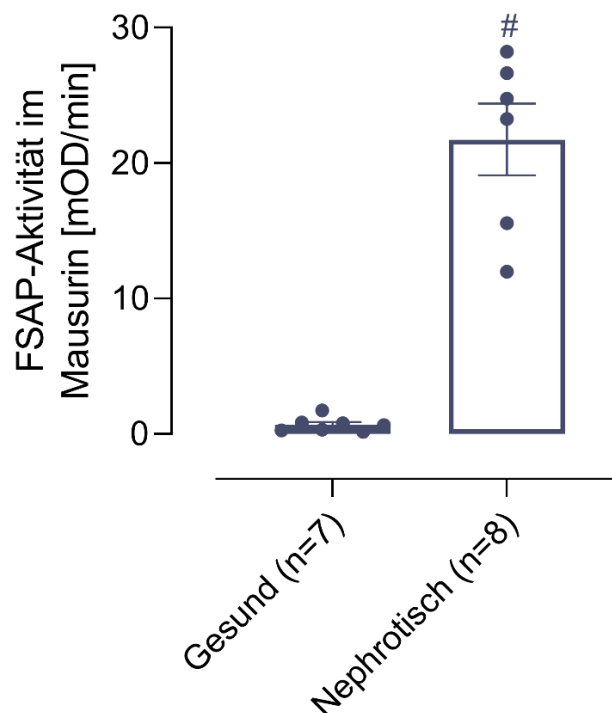


Abbildung 3-13: FSAP-Aktivitäts-Assay bei der Maus

Dargestellt ist die signifikant gesteigerte FSAP-Aktivität im nephrotischen Urin von Wildtyp-Mäusen (#). Zur Quantifizierung erfolgte eine Umsatz-Messung mit pro-uPA. Aus [104].

Im nephrotischen Urin von Wildtyp-Mäusen fand sich FSAP und passend dazu eine reduzierte FSAP-Menge im Blutplasma. Mit 64 kDa hatte das Urin-FSAP die gleiche molekulare Masse wie das Plasma-FSAP. Bei gesunden Wildtyp-Mäusen wurde FSAP im Plasma nachgewiesen, nicht aber in deren Urin.

Mit dem verwendeten Antikörper für Maus-FSAP konnte nicht zwischen der Zymogen- und der proteolytisch aktiven Form unterschieden werden. Eine indirekte Aktivitätsprüfung via pro-uPA ergab eine hohe proteolytische FSAP-Aktivität im nephrotischen Urin bei FSAP-Wildtyp-Mäusen. Bei KO-Mäusen konnte kein FSAP im Plasma festgestellt werden.

3.2.2 Nephrotisches Syndrom bei Wildtyp- und FSAP-KO-Mäusen

3.2.2.1 Futter- und Wasser-Aufnahme

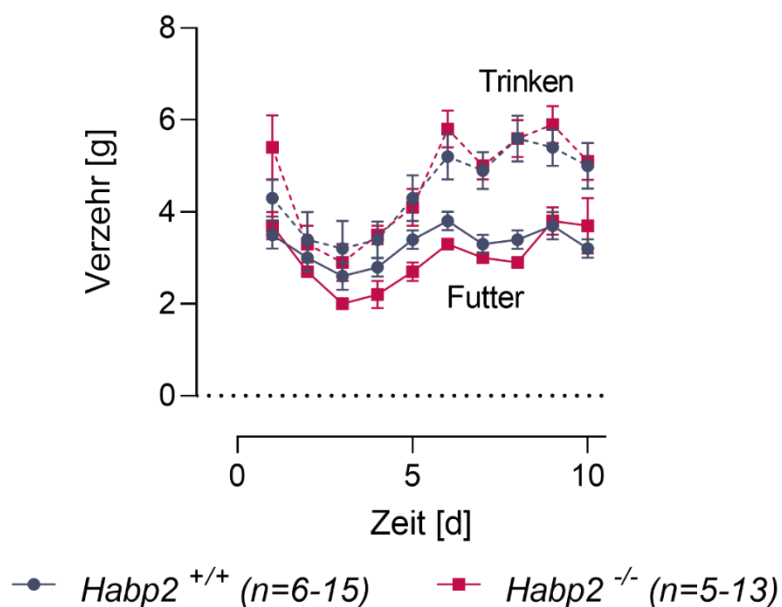


Abbildung 3-14: Trinken und Futter

Man erkennt keine signifikanten Unterschiede im Trink- und Futtermengenverlauf beider Genotypen während der Versuche im DIN-Modell. Aus [104].

Die Wildtyp-Mäuse nahmen täglich durchschnittlich $3,0 \pm 0,2$ g Futter und $4,7 \pm 0,4$ g Wasser zu sich. Die KO-Tieren fraßen durchschnittlich $3,3 \pm 0,1$ g Futter und tranken $4,5 \pm 0,3$ g Wasser pro Tag. Sowohl bei der Futter- als bei der Wasseraufnahme zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Außerdem ergaben sich keine Unterschiede zu den Kontrollwerten. Aus der konstanten Nahrungs- und Wasseraufnahme ergab sich kein Anhalt dafür, dass diese

Einflussfaktoren für das Körpergewicht und die Natriuresis waren. Die verminderte Nahrungs- und Wasseraufnahme zwischen dem 1. und dem 5. beziehungsweise 6. Versuchstag wurden auf die Kurznarkose und die Doxorubicin-Injektion und -Wirkung zurückgeführt.

3.2.2.2 Proteinurie als Marker für die Induktion des nephrotischen Syndroms

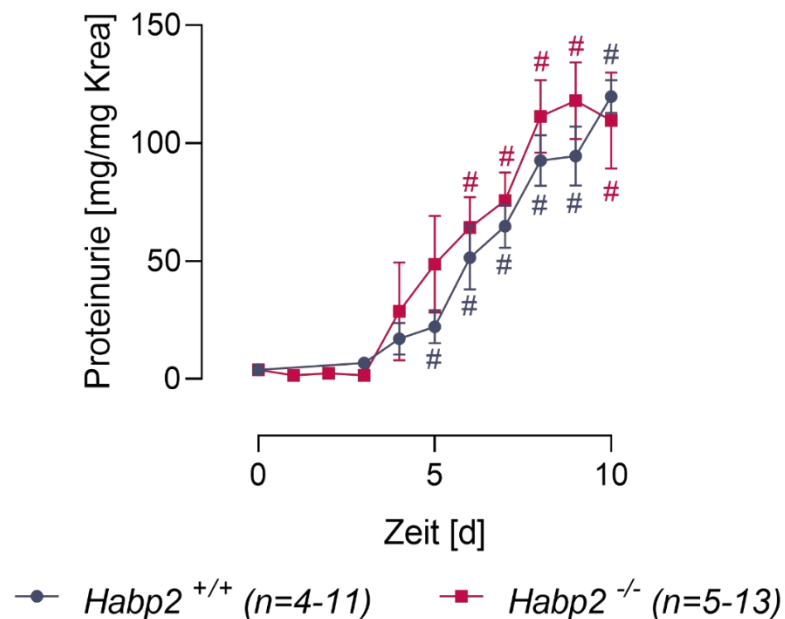


Abbildung 3-15: Proteinurie

Die Graphik zeigt eine deutliche Proteinurieentwicklung beider Genotypen nach der Applikation von Doxorubicin.

Mit # sind die signifikanten Unterschiede nach Doxorubicin-Gabe im Vergleich zu den Kontrollwerten im Gesunden markiert. Aus [104].

Zu Beginn wurden im gesunden Stadium Kontrollwerte für die Proteinurie erhoben. Diese betragen durchschnittlich $3,9 \pm 0,9$ mg/mg Kreatinin bei den Wildtyp- und $3,9 \pm 1,0$ mg/mg Kreatinin bei den KO-Mäusen. Am 4. Tag nach Doxorubicin-Injektion fand sich bei beiden Genotypen ein deutlicher Anstieg der Proteinurie. Eine signifikant erhöhte Proteinurie im Vergleich zur Messung im Gesunden konnte bei den nephrotischen Wildtyp-Mäusen ab dem 5. Tag (22 ± 7 mg/mg Kreatinin) und bei den FSAP-KO-Mäusen ab dem 6. Tag (64 ± 13 mg/mg Kreatinin) post injectionem festgestellt werden. Sowohl die Wildtyp- mit 119 ± 7 mg/mg Kreatinin als auch die KO-Tiere mit 109 ± 20 mg/mg Kreatinin hatten bis zum 10. Versuchstag nach Doxorubicin-Injektion eine signifikant erhöhte Proteinurie. Zwischen den Genotypen bestand kein signifikanter Unterschied.

3.2.2.3 Natriurese

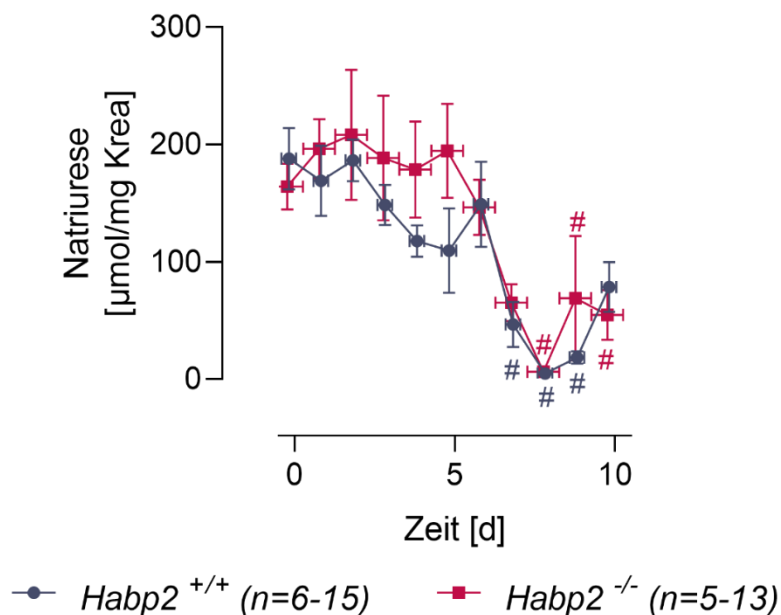


Abbildung 3-16: Natriurese

Man sieht bei den Wildtyp- und den FSAP-KO-Mäusen eine deutliche Reduktion der Natriurese nach Induktion der DIN.

Der Beginn der ENaC-Überaktivierung variierte individuell von Maus zu Maus. Daher wurde das Minimum auf den 8. Tag nach Doxorubicin-Injektion angepasst, woraus ein x-Achsen-Fehler resultierte und die Datenpunkte nun nicht genau auf den Versuchstagen liegen. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Kontrollwert sind markiert (#). Aus [104].

Am Kontrolltag (Versuchstag 0) hatten die Wildtyp-Mäuse eine Natriurese von 188 ± 26 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin und die FASP-KO-Tiere von 164 ± 19 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin Natrium. Während der ersten Tage zu Versuchsbeginn blieben diese Werte konstant. Deutlich erniedrigte Werte konnten ab dem 5. (Wildtypen) beziehungsweise 6. Versuchstag (FASP-KO) gemessen werden.

Vom 7. bis 9. Versuchstag reduzierte sich die Natriurese der Wildtyp-Mäuse signifikant auf 47 ± 19 $\mu\text{mol/mg}$, 5 ± 1 $\mu\text{mol/mg}$ beziehungsweise 18 ± 5 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin im Vergleich zum Kontrollwert.

Bei den FASP-KO-Mäusen konnte zwischen dem 8. und 10. Tag post injectionem eine signifikante Natriurese-Reduktion auf 6 ± 1 $\mu\text{mol/mg}$, 69 ± 53 $\mu\text{mol/mg}$ und 55 ± 21 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin gemessen werden.

3.2.2.4 Kaliurese

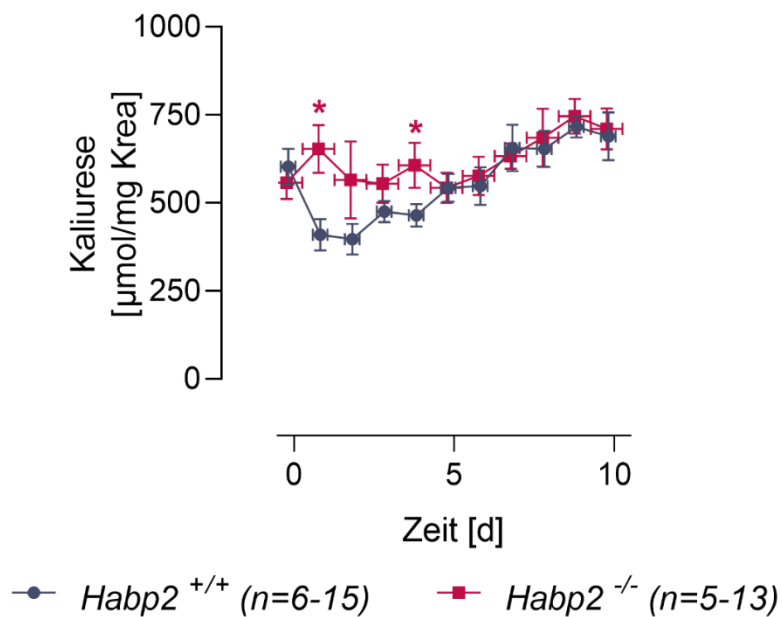


Abbildung 3-17: Kaliurese

Zu Erkennen ist der Verlauf der Kalium-Ausscheidung beider Genotypen über den Versuchszeitraum. Der Beginn der ENaC-Überaktivierung variierte individuell von Maus zu Maus. Daher wurde das Minimum auf den 8. Tag nach Doxorubicin-Injektion angepasst, woraus ein x-Achsen-Fehler resultierte und die Datenpunkte nun nicht genau auf den Versuchstagen liegen. Mit * sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen markiert. Aus [104].

Die Kaliurese bei Wildtyp- und KO-Tieren war über die gesamte Versuchszeit weitestgehend konstant. Ab dem 5. Versuchstag war bei beiden Genotypen ein Anstieg zu verzeichnen, der aber keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten darstellte.

Der tendenzielle Anstieg der Kaliurese im Versuchsverlauf ist durch die Überaktivierung des ENaCs erklärbar. Durch die vermehrte Natriumaufnahme kommt es zu einer vermehrten Kaliumausscheidung aus den Hauptzellen (vgl. 1.6.2). Die signifikanten Kaliurese-Unterschiede zwischen den Genotypen wurden als zufällig gewertet.

3.2.2.5 Natrium-Kalium-Ratio

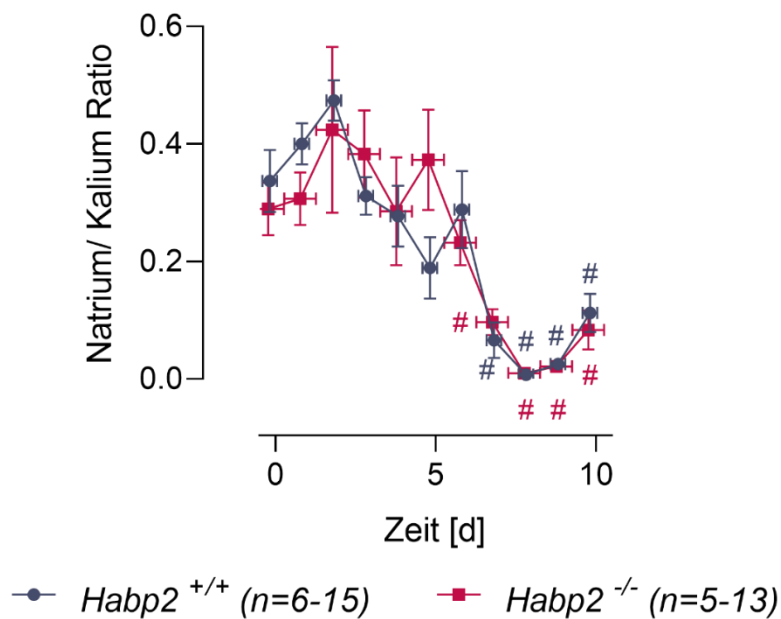


Abbildung 3-18: Natrium/ Kalium Ratio

Man erkennt bei beiden Genotypen eine deutliche Reduktion der Natrium-/ Kalium-Ratio. Der Beginn der ENaC-Überaktivierung variierte individuell von Maus zu Maus. Daher wurde das Minimum auf den 8. Tag nach Doxorubicin-Injektion angepasst, woraus ein x-Achsen-Fehler resultierte und die Datenpunkte nun nicht genau auf den Versuchstagen liegen. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Kontrollwert sind markiert (#). Aus [104]

Die Natrium-Kalium-Ratio ist der Quotient aus Natri- und Kaliurese. Sie wurde zur Betonung der Tendenzen der Einzelparameter-Daten bestimmt. Während zu Versuchsbeginn für beide Genotypen konstante Werte abzulesen waren, sank der Quotient tendenziell ab Versuchstag zwei (Wildtypen) beziehungsweise fünf (KO-Tiere) ab. Bei beiden Genotypen wurden für die Tage 7-10 nach Doxorubicin-Injektion signifikant erniedrigte Werte errechnet. Das Minimum war jeweils an Tag 8 und betrug für die Wildtypen $0,007 \pm 0,001$ und für die KO-Mäuse $0,009 \pm 0,002$.

Insgesamt verringerte sich die Natriurese bei beiden Genotypen um etwa den Faktor 30 (Wildtypen: 37,6 und FSAP-KO: 27,3) vom Kontrollwert auf das Minimum im nephrotischen Zustand. Passend dazu ergab sich eine deutlich reduzierte Natrium-Kalium-Ratio. Zusammengenommen spricht dies für eine prolongierte Natriumretention durch ENaC-Aktivierung bei beiden Genotypen.

3.2.2.6 Körpergewicht als Surrogat der Ödementstehung

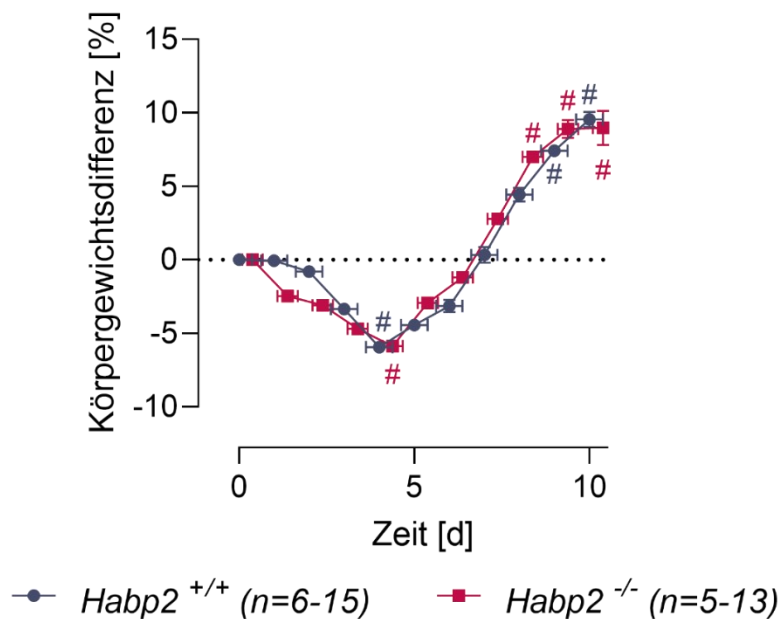


Abbildung 3-19: Relative Körpergewichtsveränderung im DIN-Modell

Abgebildet ist eine deutliche relative Körpergewichtszunahme bei beiden Genotypen von insgesamt ca. 15% als indirekter Parameter für die Ödementwicklung.

Durch den individuell unterschiedlichen Beginn der Ödementwicklung mit Körpergewichtsanstieg wurden die Daten auf den Versuchstag vier als Tag mit dem durchschnittlich geringsten Körpergewicht angepasst. Hieraus resultierte ein x-Achsen-Fehler, weshalb die Datenpunkte nun nicht genau auf den Versuchstagen liegen. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Kontrollwert sind markiert (#). Aus [104].

Bis einschließlich des sechsten Tags nach Doxorubicin-Injektion konnte bei beiden Genotypen ein vermindertes Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrollwerten gemessen werden. Das niedrigste Körpergewicht mit einer signifikanten Reduktion zum Kontrollwert am Versuchstag vier betrug $-5,9 \pm 0,7$ % Körpergewichtsdifferenz bei den Wildtyp- und $-5,9 \pm 0,7$ % Körpergewichtsdifferenz bei den KO-Mäusen.

Bei den Wildtypen konnte mit $7,4 \pm 1,3$ % am neunten und $9,5 \pm 1,7$ % Körpergewichtsdifferenz am zehnten Versuchstag ein signifikant erhöhtes Körpergewicht gemessen werden. Bei den KO-Tieren war dies am achten, neunten und zehnten Tag post injectionem mit $7,0 \pm 1,5$ %, $8,9 \pm 2,2$ % und $9,0 \pm 3,8$ % Körpergewichtsdifferenz der Fall.

Als Korrelat für die absolute Ödemmasse ergab sich von geringsten bis zum höchsten Körpergewicht eine relative Gesamtzunahme von 15,4 % für die Wildtyp- und 14,9 % für die KO-Tiere. Zwischen den beiden Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Zusätzlich zu den Messwerten konnten Beobachtungen gemacht werden, die zur Entfaltung des nephrotischen Syndroms passten. So entwickelten die nephrotischen Mäuse Aszites, der sich klinisch als ausladendes Abdomen und bei der Nierenentnahme als klare Flüssigkeit im Abdomen darstellte. Außerdem fand sich das Plasma nach Zentrifugation einer nephrotischen Mausblutprobe trüb als Hinweis auf eine Lipämie im Gegensatz zum klarem Plasma bei gesunden Mäusen.

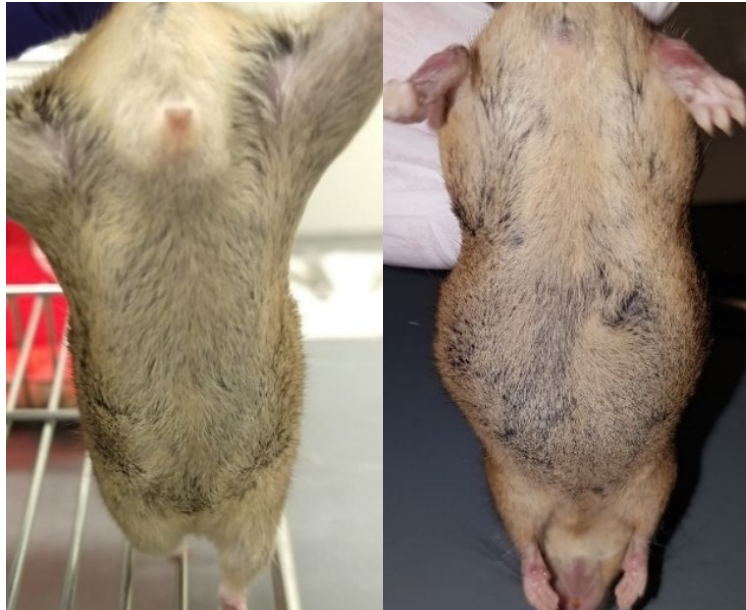


Abbildung 3-20: Klinische Aszitesentwicklung bei der Maus

Man erkennt links eine schlanke, gesunde Maus (männlich) und rechts eine Maus (weiblich) im nephrotischen Stadium mit klinischem Aszites bei ausladendem Abdomen.



Abbildung 3-21: Lipämie beim nephrotischen Syndrom

Dargestellt sind zwei zentrifugierte Maus-Blutproben. Die rechte Probe war von einer gesunden Maus mit klarem Plasma und die linke von einer nephrotischen Maus mit trübem Plasma als Hinweis auf eine Lipämie.

3.2.2.7 Amilorid-sensitive Natriurese

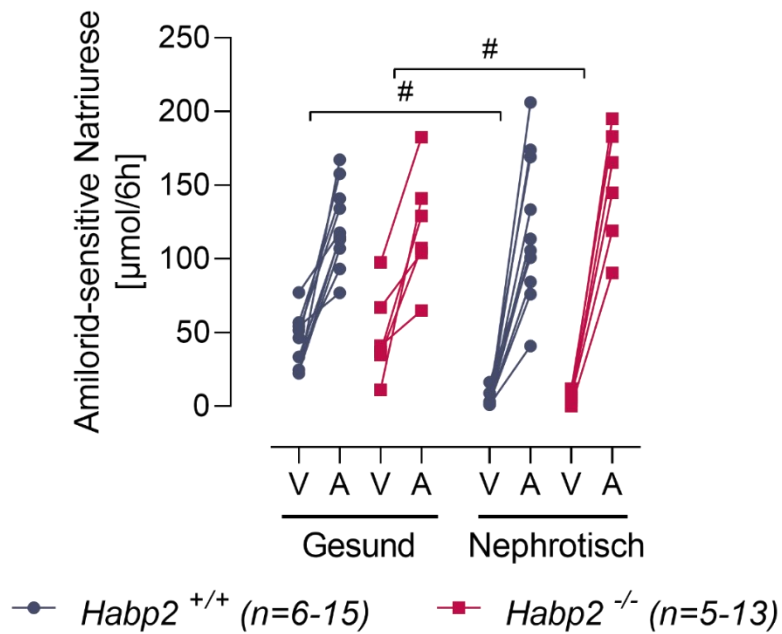


Abbildung 3-22: Amilorid-sensitive Natriurese

Abgebildet ist eine gesteigerte Amilorid-sensitive Natriurese beider Genotypen im nephrotischen Zustand im Vergleich zum Gesunden, was für eine gesteigerte ENaC-Aktivität spricht. Markiert sind signifikante Unterschiede (#). Aus [104].

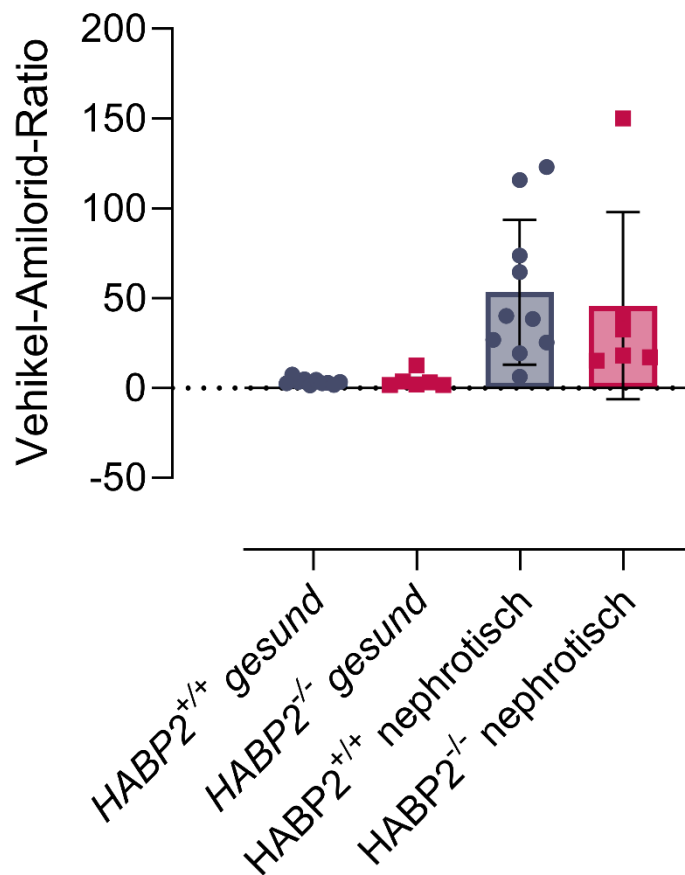


Abbildung 3-23: Vehikel-Amilorid-Ratio

Man sieht die aus der Amilorid-sensitiven Natriurese errechnete Vehikel-Amilorid-Ratio beider Genotypen im nephrotischen Zustand im Vergleich zum Gesunden.

Im Gesunden fand sich bei den Wildtypen mit einer Vehikel-Amilorid-Ratio von $3,4 \pm 0,6$ und bei den KO-Mäusen mit $4,0 \pm 1,7$ ein erwartbarer Anstieg der Natriurese nach Amilorid-Gabe im Vergleich zum Vehikel-Versuch. Im nephrotischen Zustand ergab sich bei den Wildtypen eine Vehikel-Amilorid-Ratio von 53 ± 13 und bei den KO-Mäusen von 46 ± 21 . Damit wiesen dabei beide Genotypen eine signifikante Steigerung der Amilorid-sensitiven Natriurese bzw. der Vehikel-Amilorid-Ratio im nephrotischen Zustand im Vergleich zum Gesunden auf. Der ausgeprägte Anstieg der Vehikel-Amilorid-Ratio im nephrotischen Stadium weist auf die tragende Rolle des gesteigert aktiven ENaC im DIN-Modell bei beiden Genotypen hin. Zwischen den Genotypen waren im Gesunden ($p=0,87$) und im Nephrotischen ($p=0,49$) keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

3.2.2.8 Die Natrium-Bilanz beim nephrotischen Syndrom

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der Natriumretention erfolgte die Bestimmung der Natrium-Bilanz als Differenz zwischen der Natrium-Aufnahme und -Ausscheidung im Urin und Stuhl.

Bei beiden Genotypen zeigte sich im gesunden Zustand eine ähnliche Natriumausscheidung von $103 \pm 22 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Urin) und $24 \pm 4 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Kot) bei Wildtyp-Mäusen sowie $108 \pm 13 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Urin) und $37 \pm 4 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Kot) bei KO-Mäusen (Tab. 3-1). Bezüglich der Natrium-Aufnahme in der nephrotischen Phase (Wildtyp: $291 \pm 38 \mu\text{mol}/24\text{h}$; KO: $261 \pm 39 \mu\text{mol}/24\text{h}$) im Vergleich zum Gesunden (Wildtyp: $245 \pm 26 \mu\text{mol}/24\text{h}$; KO: $265 \pm 38 \mu\text{mol}/24\text{h}$) fand sich bei keinem der beiden Genotypen ein relevanter Unterschied. Die Werte zwischen den beiden Genotypen waren vergleichbar und ohne einen relevanten Unterschied.

Nach Induktion des nephrotischen Syndroms ergaben sich mit $12 \pm 4 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Urin) und $13 \pm 3 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Kot) bei Wildtyp-Mäusen sowie $10 \pm 3 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Urin) und $11 \pm 1 \mu\text{mol}/24\text{h}$ (Kot) bei KO-Mäusen signifikant reduzierte Werte für die Natriumausscheidung in der nephrotischen Phase im Vergleich zum Gesunden.

Zusammengenommen resultierte eine Natriumbilanz im nephrotischen Zustand von $266 \pm 36 \mu\text{mol}/24\text{h}$ bei Wildtypen bzw. $239 \pm 37 \mu\text{mol}/24\text{h}$ bei KO-Tieren im Vergleich zum Gesunden von $118 \pm 22 \mu\text{mol}/24\text{h}$ bei Wildtypen und $120 \pm 33 \mu\text{mol}/24\text{h}$ bei KO-Tieren, was für eine ausgeprägte Natriumretention in der DIN im Vergleich zum Gesunden spricht.

Im Gesunden war bezüglich der Natrium-Bilanz kein relevanter Unterschied zwischen den Genotypen (Wildtyp: $118 \pm 22 \mu\text{mol}/24\text{h}$ vs. KO: $120 \pm 33 \mu\text{mol}/24\text{h}$) feststellbar. Während bei den Einzelparametern die Natrium-Aufnahme und die Natriuresis ebenfalls keine Unterschiede aufwiesen, fand sich bei der fäkalen Natrium-Ausscheidung ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Wildtyp: $24 \pm 4 \mu\text{mol}/24\text{h}$ vs. KO: $37 \pm 4 \mu\text{mol}/24\text{h}$), der als zufällig angesehen wurde. Im nephrotischen Zustand ergab sich bei keinem der erhobenen Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und KO-Mäusen.

Tabelle 3-1: Natrium-Bilanz

Die Tabelle zeigt Natrium-Bilanzen, die bei beiden Genotypen für eine Natriumretention im nephrotischen Stadium im Vergleich zum Gesunden sprechen.

Alle Werte sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler und in $\mu\text{mol}/24\text{h}$ angegeben. Markiert sind signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (*) und zwischen gesundem und nephrotischen Zustand (#). Aus [104].

	Gesund		Nephrotisch	
	<i>Habp2</i> ^{+/+}	<i>Habp2</i> ^{-/-}	<i>Habp2</i> ^{+/+}	<i>Habp2</i> ^{-/-}
Natrium-Aufnahme	245±26	265±38	291±38	261±39
Natriuresis	103±22	108±13	12±4 #	10±3 #
Fäkale Natriumausscheidung	24±4	37±4 *	13±3 #	11±1 #
Natrium-Bilanz	118±22 [!]	120±33 [!]	266±36 #	239±37 #

[!] Bemerkung: Die positive Bilanz unter Kontrollbedingungen resultierte aus den nicht erfassten Urinverlusten im Stoffwechselläufig.

3.2.2.9 Untersuchungen aus dem Plasma

Die Serum-Albumin-Konzentration beider Genotypen war im nephrotischen Stadium (Wildtyp: 12±1 g/l; KO: 13±2 g/l) deutlich reduziert im Vergleich zum Gesunden (Wildtyp: 34±2 g/l; KO: 35±2 g/l, Tab. 3-2).

Darüber hinaus ergab sich bei nephrotischen Wildtyp-Mäusen ein signifikant reduziertes Plasma-Natrium (139±2 mM) im Vergleich zum Gesunden (147±0,4 mM). Bei den KO-Tieren war das Plasma-Natrium im nephrotischen Zustand auch reduziert (143±2 mM) im Vergleich zum Gesunden (147±1 mM), ein signifikanter Unterschied lag allerdings nicht vor (Tab. 3-2).

Bei nephrotischen Wildtyp-Mäusen fand sich weiterhin ein signifikant verminderter Hämatokrit (gesund: 44,3±0,7 %; nephrotisch: 37,2±2,5 %) und eine reduzierte errechnete Hb-Konzentration (gesund: 14,6±0,2 g/dl; nephrotisch: 12,3±0,8 g/dl) im Vergleich zum Gesunden. Bei KO-Mäusen stagnierte der Hämatokrit (gesund: 43,7±0,8 %; nephrotisch: 43,7±1,7 %) und die errechnete Hb-Konzentration stieg in der nephrotischen Phase minimal an (gesund: 14,4±0,2 g/dl; nephrotisch: 14,5±0,6 g/dl, Tab. 3-2).

Bei Wildtypen (gesund: 51±7 mg/dl; nephrotisch: 58±15 mg/dl) und KO-Tieren (gesund: 39±3 mg/dl; nephrotisch: 78±28 mg/dl) stiegen die Harnstoff-Werte in der nephrotischen Phase im Vergleich zum Gesunden an. Signifikante Unterschiede konnten hierbei keine gefunden werden (Tab. 3-2).

Nebenbefundlich fand sich das Plasma-Kalium im nephrotischen Zustand (Wildtyp: $5,8 \pm 0,2$ mM und KO: $5,7 \pm 0,4$ mM) im Vergleich zum Gesunden (Wildtyp: $4,4 \pm 0,1$ mM und KO: $4,2 \pm 0,1$ mM) bei beiden Genotypen signifikant erhöht (Tab. 3-2).

Beim pH-Wert, dem Standardbikarbonat und dem Calcium konnten keine großen Unterschiede zwischen dem gesunden und dem nephrotischen Zustand festgestellt werden. Weder im Gesunden noch im Nephrotischen fanden sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und KO-Tieren (Tab. 3-2).

Tabelle 3-2: Untersuchungen aus dem Plasma

Aufgeführt sind die Plasmaparameter von Wildtyp- und KO-Mäusen im Gesunden und in der nephrotischen Phase (Tag 10 nach Doxorubicin-Gabe).

Es wurden jeweils $n=7-9$ bei der Blutgasanalyse und $n=4$ bei der Harnstoff- und Albuminbestimmung untersucht. Alle Werte sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

Markiert sind signifikante Unterschiede zwischen gesundem und nephrotischen Zustand (#). Aus [104].

	Gesund		Nephrotisch	
	<i>Habp2^{+/+}</i>	<i>Habp2^{-/-}</i>	<i>Habp2^{+/+}</i>	<i>Habp2^{-/-}</i>
pH	$7,24 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,01$	$7,29 \pm 0,02$	$7,32 \pm 0,02$
Std. HCO ₃ ⁻ [mM]	$22 \pm 0,4$	21 ± 1	24 ± 1	25 ± 2
Natrium [mM]	$147 \pm 0,4$	147 ± 1	139 ± 2 #	143 ± 2
Kalium [mM]	$4,4 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$ #	$5,7 \pm 0,4$ #
Calcium [mM]	$1,09 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,02$	$1,09 \pm 0,05$
Hämatokrit [%]	$44,3 \pm 0,7$	$43,7 \pm 0,8$	$37,2 \pm 2,5$ #	$43,7 \pm 1,7$
Errechnetes Hb [g/dl]	$14,6 \pm 0,2$	$14,4 \pm 0,2$	$12,3 \pm 0,8$	$14,5 \pm 0,6$
Harnstoff [mg/dl]	51 ± 7	39 ± 3	58 ± 15	78 ± 28
Albumin [g/l]	34 ± 2	35 ± 2	12 ± 1 #	13 ± 2 #

3.2.3 ENaC-Expression und proteolytische -Aktivierung

Um herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß der ENaC bei FSAP-KO-Mäusen proteolytisch gespalten wird, wurden Western Blots zur Detektion der entsprechenden ENaC-Untereinheiten und deren Spaltprodukten durchgeführt. Hierbei konnten die Spaltprodukte der α - (25 kDa) und der γ -ENaC-Untereinheiten (49 kDa und 56 kDa) im nephrotischen Stadium signifikant erhöht detektiert werden im Vergleich zum Gesunden.

Bei der α -ENaC-Untereinheit waren im Gesunden zwei Banden bei 25 kDa und 82 kDa nachweisbar. Die 25 kDa-Bande entsprach dabei am ehesten dem Spaltprodukt nach Spaltung an der distalen Spaltstelle (vom N-Terminus aus) und die 82 kDa-Bande

entsprach der vollständigen Untereinheit. Die 82 kDa-Bande konnte ebenfalls mit einer signifikant erhöhten Intensität im nephrotischen Zustand nachgewiesen werden.

Für den γ -ENaC wurden drei Banden bei 49 kDa, 56 kDa und 66 kDa detektiert. Die Banden mit 49 kDa und 56 kDa standen für das distale und proximale Spaltprodukt (vom N-Terminus aus) und die 66 kDa-Bande für die komplette Untereinheit in Gesamtlänge. Alle drei Banden waren auch im nephrotischen Zustand detektierbar, wobei die Spaltprodukte (Banden bei 49 kDa und 56 kDa) eine signifikant erhöhte Intensität aufwiesen.

Beim β -ENaC wurden bei beiden Genotypen im gesunden und im nephrotischen Zustand Banden bei 84 kDa entdeckt. Diese Bande entspricht der kompletten, nicht-gespaltenen Untereinheit. Unterschiede zwischen gesundem und nephrotischem Zustand fanden sich keine.

Die Ergebnisse waren für Wildtyp- und KO-Mäuse im Gesunden und nach Induktion des nephrotischen Syndroms sehr ähnlich und ein Unterschied in der Verteilung von vorhandenen ENaC-Untereinheiten bestand nicht.

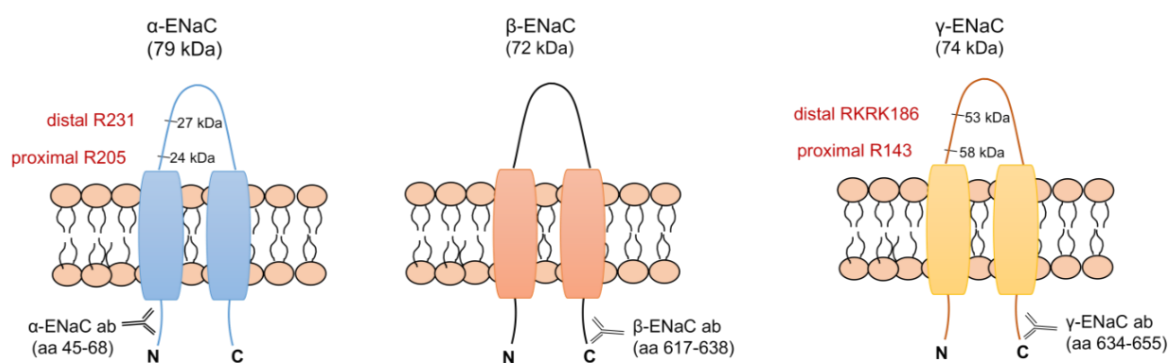


Abbildung 3-24: Proteolytische ENaC-Aktivierung

Dargestellt sind Skizzen der ENaC-Untereinheiten und ihrer proximalen und distalen proteolytischen Spaltstellen (vom N-Terminus aus betrachtet). Zusätzlich sind die immunogenen Sequenzen der verwendeten Antikörper angegeben. Aus [104].

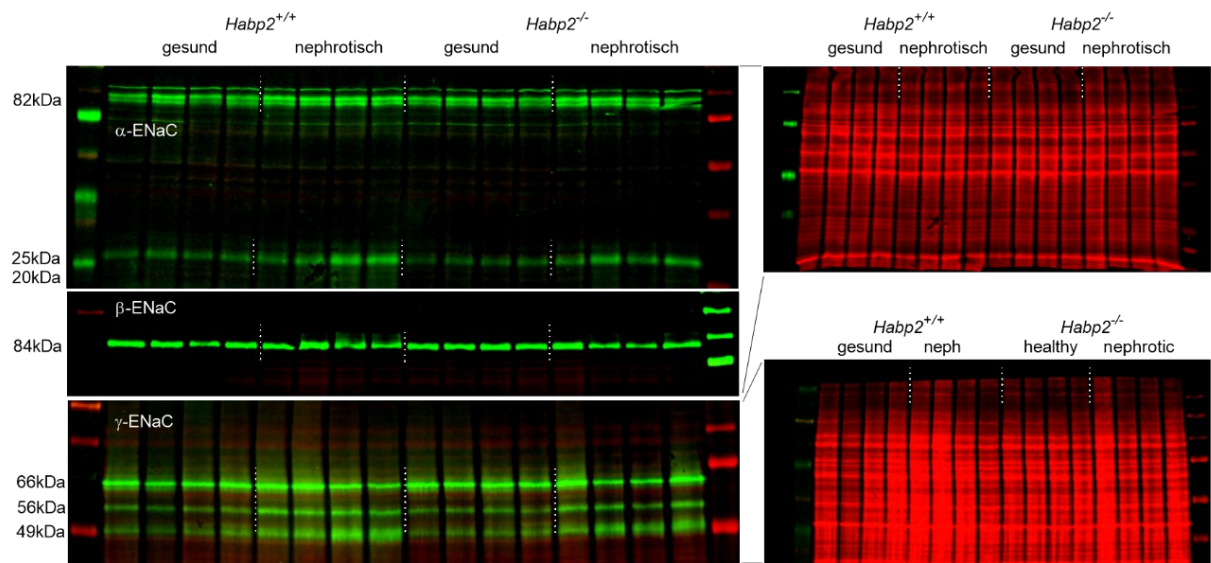


Abbildung 3-25: Western Blots der ENaC-Untereinheiten

Links: Die Banden der Spaltprodukte von α - (25 kDa) und γ -ENaC-Untereinheiten (49 kDa und 56 kDa) scheinen jeweils im nephrotischen Stadium vermehrt detektiert worden zu sein.

Rechts: Gesamtproteinfärbung zur Quantifizierung. Aus [104].

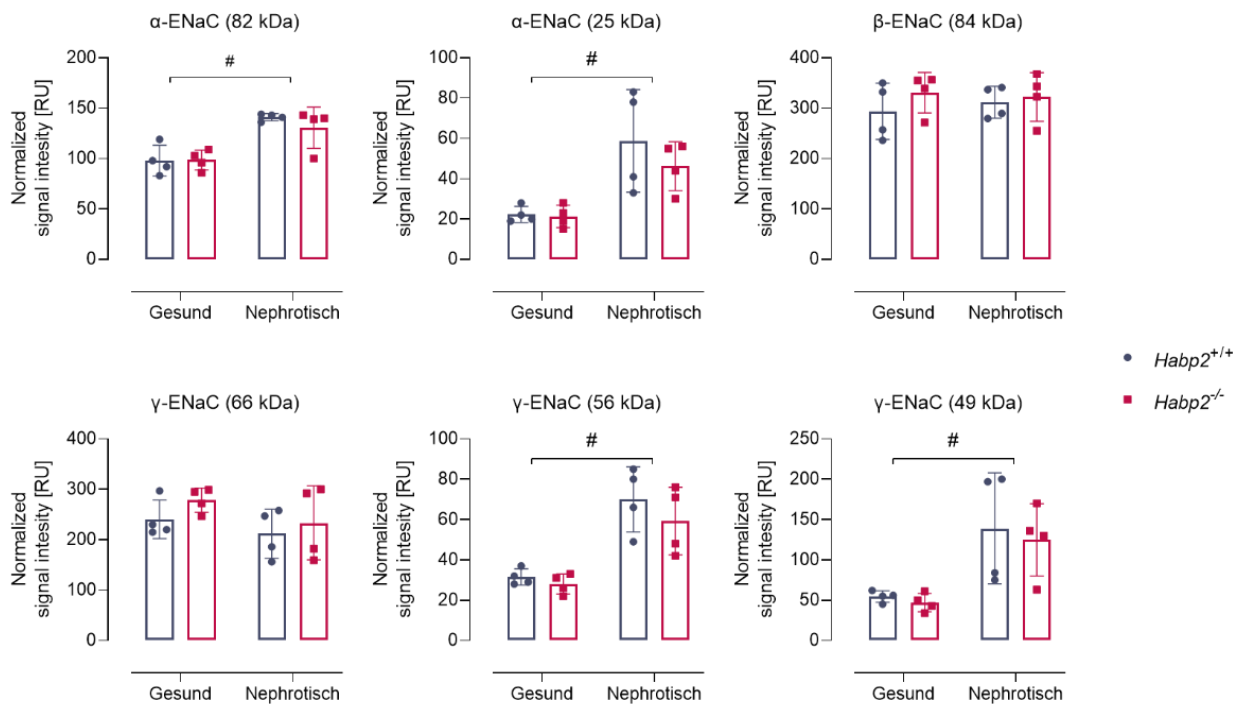


Abbildung 3-26: Densitometrie

Die Graphiken der Densitometrie zeigen die Banden der Spaltprodukte von α - (25 kDa) und γ -ENaC-Untereinheiten (49 kDa und 56 kDa) im nephrotischen Stadium signifikant erhöht im Vergleich zum Gesunden.

Signifikante Unterschiede zwischen gesundem und nephrotischem Zustand sind markiert (#). Aus [104].

4. Diskussion

4.1 Die Rolle von DNA-PKcs bei der Induktion des Doxorubicin-induzierten Nephrotischen Syndroms im Mausmodell

4.1.1 Genotypisierung und Nephrotisches Syndrom

Die Ergebnisse der Genotypisierung bestätigten das Vorgehen nach Yu et al. [23] als geeignete Methode, den C6418T-SNP zu genotypisieren. Die darauffolgenden Versuche konnten nachweisen, dass es dadurch möglich ist, suszeptible Mäuse für die Induktion der DIN zu identifizieren. Die Verteilung entsprach dabei näherungsweise den Mendelschen Regeln. In der Zusammenschau ergeben die Daten ein konsistentes Bild: Ausschließlich die 129SB6F2-Prkdc^{T6418/T6418}-Mäuse entwickelten im Versuchsverlauf ein nephrotisches Syndrom mit Proteinurie, Natriumretention und einer Zunahme des Körpergewichts als Ausdruck der Ödementwicklung. Für die Prkdc^{C6418/C6418}- und den heterozygoten Mäuse konnte dies nicht nachgewiesen werden. Außerdem konnten nur in den Prkdc^{T6418/T6418}-Nierenschnitten Proteinablagerungen in den Tubuli und im Bowman'schen Kapselraum dargestellt werden. Diese interpretierten wir als Folge des Doxorubicin-induzierten glomerulären Schadens und der daraus resultierenden Proteinurie.

4.1.2 Expression von DNA-PKcs in Western Blots und Immunhistochemie

Die Western-Blot-Resultate mit dem Antikörper SAB4502385 legten die Vermutung nahe, dass die vorhandene PKcs-Menge von der Gen-Dosis abhängt. Dies konnte mit dem ab32566-Antikörper nicht bestätigt werden. Möglicherweise liegt die -mit dem SAB4502385 festgestellte- ca. 50%-ige Reduktion der Bandenintensität bei Heterozygoten und der nahezu fehlende Nachweis bei Prkdc^{T6418/T6418}-Mäusen an der Folge einer Konformationsänderung, wonach der Antikörper SAB4502385 nicht wesentlich an Prkdc^{T6418/T6418}-DNA-PKcs binden kann. Diese Ergebnisse sprechen demnach nicht für eine verminderte DNA-PKcs-Expression, sondern für eine unzureichende DNA-Reparatur-Fähigkeit. SAB4502385 würde somit die Menge zur DNA-Reparatur fähiger DNA-PKcs und ab32566 die Gesamtmenge der vorhandenen DNA-PKcs anzeigen.

Frühere Studien führten die schützende Wirkung vor DNA-Doppelstrangbrüchen auf die Überexpression von Prkdc zurück [20]. Fabre et al. konnten sowohl eine geringere DNA-PKcs-Expression als auch eine geringere DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur bei C6418T-SNP-Mäusen zeigen [105]. Letzteres deckt sich mit den Erkenntnissen dieser Arbeit. Mit ab32566 fand sich tendenziell eine PKcs-Abnahme bei den Prkdc^{C6418/C6418}-Tieren nach Doxorubicin-Gabe, was als „Verbrauch“ funktionierender PKcs im Rahmen der Doppelstrang-Reparatur interpretiert werden kann. Die PKcs-Zunahme bei den Prkdc^{T6418/T6418}-Mäusen in der Densitometrie nach acht beziehungsweise nach 72 Stunden spräche demnach für eine Kumulation nicht funktionierender PKcs aufgrund des C6418T-SNP.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie ergaben eine deutliche Zunahme von DNA-PKcs in den Zell-Nucleoli nephrotischer Prkdc^{C6418/C6418}-Mäuse. Diese lässt sich als Ausdruck vermehrt gebildeter DNA-PKcs nach DNA-Doppelstrangbrüchen, ausgelöst durch die Doxorubicin-Injektion, erklären. Bei den Prkdc^{T6418/T6418}-Mäusen war keine vermehrte DNA-PKcs-Expression in den Nucleoli nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass der C6418T-Einzelnukleotidpolymorphismus für die Induktion des Nephrotischen Syndroms im Mausmodell mit Doxorubicin (DIN) essenziell ist. Er führt bei den PKcs zum Aminosäureaustausch R2140C, wodurch die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beeinträchtigt wird. Mittels Genotypisierung können Mäuse mit dem entsprechenden SNP identifiziert werden, die für die DIN suszeptibel sind.

Diese Erkenntnisse führten zur Etablierung einer obligaten Genotypisierung auf den C6418T-SNP bei Mäusen, die unsere Arbeitsgruppe für DIN-Versuche verwendet. In der Zucht ermöglicht dies eine schnellere Rückkreuzung von KO-Mauslinien auf einen genetischen Wildtyp-Hintergrund. Dies bedeutet eine Optimierung der Methode der DIN und außerdem durch die Versuchstiereinsparung eine ethische Überlegenheit sowie die Einsparung zeitlicher und finanzieller Ressourcen.

4.1.3 C6418T-SNP beim Menschen

Um die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf den Menschen zu überprüfen, führte unsere Arbeitsgruppe eine Genomdatenbank-Recherche durch. Die Suche nach dem C6418T-SNP im menschlichen Prkdc-Gen erbrachte kein Ergebnis. Ebenso wenig konnten genetisch determinierte Nierenerkrankungen gefunden werden, die auf das

Prkdc-Gen beschränkt sind. Die Ergebnisse passen dazu, dass keine nephrotoxische Wirkung von Doxorubicin beim Menschen bekannt ist [13].

4.2 Die Rolle der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) für die Ödementstehung im experimentellen Nephrotischen Syndrom im Mausmodell

4.2.1 FSAP im nephrotischen Urin

Das Vorkommen der proteolytisch aktiven FSAP im nephrotischen Urin ist eine Voraussetzung für die Hypothese, dass es sich dabei um die entscheidende Protease bei der proteolytischen ENaC-Aktivierung handeln könnte. Wörn et al. konnten das Vorkommen im nephrotischen Urin bereits mit anderen Methoden zeigen [81]. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte das FSAP-Vorkommen im nephrotischen Mäuseurin bestätigt und seine proteolytische Aktivität indirekt nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von Professor Kanse (Kooperationspartner des Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo, Norwegen) analysierte auch humanen nephrotischen Urin in dem FSAP als Zymogen und in ihrer proteolytisch-aktiven Doppelkettenform nachgewiesen wurde [104]. Dies lässt darauf schließen, dass FSAP durch Spaltung in ihre proteolytisch aktive Form überführt wurde. Die proteolytische Aktivität wurde daraufhin in einem Aktivitäts-Assay nachgewiesen [104].

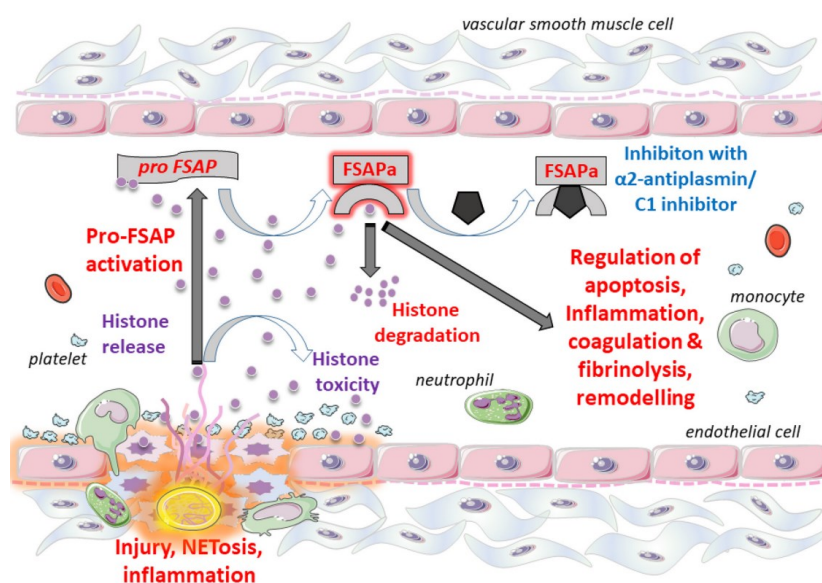


Abbildung 4-1: FSAP-Aktivierung

Nach einer Zellschädigung, z. B. nach Schädigung der glomerulären Filterbarriere, können Histone frei werden. Diese vermitteln die Auto-Aktivierung der FSAP-Zymogenform (proFSAP) hin zur aktiven Protease (FSAPa) [85].

Die FSAP-Autoproteolyse wird von unterschiedlichen geladenen Teilchen [106] und Oberflächen [107] vermittelt. Dazu gehören Histone, die bei Gewebsuntergang freigesetzt werden. *In vivo* konnte nach Injektion von Histonen eine Aktivierung von circa 40% des Gesamt-FSAPs bei Mäusen nachgewiesen werden [108]. Freigewordene Histone aus den zerstörten Zellen der glomerulären Filterbarriere könnten so FSAP im Primärharn aktivieren, das wiederum den ENaC proteolytisch spalten und zur Natrium- und Volumenretention mit Ödementstehung führen könnte.

4.2.2 FSAP aktiviert den γ -ENaC durch proteolytische Spaltung *in vitro*

Elektrophysiologische Versuche unseres Kooperationspartners aus dem Physiologischen Institut der Universität Erlangen zeigten eine ENaC-Aktivierung von FSAP [104]. Hierfür wurden menschliche $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierende *Xenopus laevis* Oozyten in unterschiedliche Versuchslösungen mit rekombinant hergestellten FSAP-Serinproteasen-Domänen inkubiert. Im ersten Versuch enthielt das Bad die Wildtypform der FSAP-Serinproteasen-Domäne (FSAP-SPD-WT) und im zweiten Versuch die FSAP-Serinproteasen-Domäne „Marburg I“ (FSAP-SPD-MI), mit der zuvor eine reduzierte proteolytische Aktivität nachgewiesen wurde [109]. Bei dem FSAP-SPD-WT-Versuch konnte ein Amilorid-sensitiver ENaC-Strom gemessen werden, während dies mit den FSAP-SPD-MI nicht möglich war [104]. In weiteren Versuchen konnte eine Abhängigkeit bezüglich einer längeren Wirkzeit sowie einer höheren Konzentration von FSAP-SPD-WT nachgewiesen werden, wodurch sich der relative Effekt auf den ENaC-Ganzzellstrom steigern ließ [104]. Zur Identifikation der entscheidenden Untereinheit, beziehungsweise der entscheidenden Schnittstelle wurden die Experimente an ENaCs mit Wildtyp- α -, Wildtyp- β - und einer, an der mutmaßlichen Proctasin-Schnittstelle [110, 111] mutierten, γ -Untereinheit wiederholt. Durch diesen so veränderten ENaC ($\alpha\beta\gamma$ RKRK178AAAA) konnte kein Ganzzellstrom festgestellt werden [104].

Zusammenfassend konnte *in vitro* eine ENaC-Aktivierung durch FSAP nachgewiesen werden, welche eine proteolytische Spaltung der Wildtyp- γ -ENaC-Untereinheit erfordert [104]. Die Spaltung an der Proctasin-Schnittstelle passt zur bekannten Substrataffinität von FSAP zu basischen Aminosäuren-Clustern [86] und zu bevorzugten Schnittstellen weiterer Serinproteasen wie Plasmin und Plasma Kallikrein [110, 111].

4.2.3 Nephrotisches Syndrom bei Wildtyp- und FSAP-KO-Mäusen

Die Zunahme der Proteinurie sprach für eine zuverlässige Induktion des nephrotischen Syndroms. Die Abnahme der Natriuresis und der Natrium-Kalium-Ratio nach dem 6. Versuchstag waren Marker für eine ENaC-bedingte Natriumretention und die Körpergewichtszunahme wies auf eine Volumenretention mit Ödementstehung hin. Alle diese Ergebnisse waren gleichermaßen bei FSAP-Wildtyp- und -KO-Mäusen feststellbar.

Gestützt wurden die Ergebnisse durch den indirekten Nachweis einer gesteigerten ENaC-Aktivierung im nephrotischen Stadium bei beiden Genotypen im Rahmen der Versuche zur Amilorid-sensitiven Natriuresis. Weiterhin passten die Daten der Natrium-Bilanz im Metabolischen Käfig zu den Ergebnissen der vorherigen Versuche und sprachen bei beiden Genotypen für eine ausgeprägte Natriumretention in der DIN im Vergleich zum Gesunden.

Bei den Blutplasma-Untersuchungen resultierte die reduzierte Albumin-Konzentration aus der aberranten Filtration von Proteinen im Rahmen der DIN. Der verminderte Hämatokrit-Wert und die reduzierte errechnete Hämoglobin-Konzentration bei den Wildtypen sowie das verminderte Serum-Natrium beider Genotypen wiesen auf einen Verdünnungseffekt durch die Natrium- und Volumenretention hin. Zudem signalisierte die erhöhte Plasma-Harnstoff-Konzentration eine verminderte GFR.

Bei den Western-Blots zur ENaC-Expression war die Menge an proteolytisch gespaltenen α - und γ -Untereinheiten im nephrotischen Zustand deutlich gesteigert, was für eine proteolytische Spaltung der beiden Untereinheiten und einer damit einhergehenden ENaC-Aktivierung sprach. Für den β -ENaC wurde nur eine Bande identifiziert. Dies wies darauf hin, dass keine Spaltungen der Untereinheit vorlagen.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass eine ausgeprägte Proteinurie mit konsekutiver ENaC-Aktivierung, Natriumretention und Ödementstehung sowohl bei Wildtyp- als auch bei FSAP-KO-Mäusen vorhanden war und es sich daher bei FSAP nicht um „die“ gesuchte Kandidatenprotease handelt.

4.2.4 Wissenschaftliche Einordnung der Ergebnisse

Während die elektrophysiologischen Versuche bestätigen, dass FSAP den ENaC *in vitro* proteolytisch spalten kann, ergeben die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es sich bei der vielversprechenden Kandidaten-Protease FSAP nicht um „die“ essenzielle Protease bei der ENaC-Aktivierung im Mausmodell handelt.

In vivo-Experimente zu früheren Kandidatenproteasen mit entsprechenden KO-Mäusen und Wildtypen kamen zu folgenden Ergebnissen:

Bei uPA-KO-Mäusen wurde nach DIN-Induktion eine Proteinurie von über 100 mg/ mg Krea, eine relative Körpergewichtszunahme von ca. 10 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht sowie eine Natriurese-Reduktion und indirekt eine reduzierte ENaC-Aktivierung nach Amiloridgabe festgestellt [112].

Auch bei Plasma Kallikrein-KO-Mäusen fanden sich nach DIN-Induktion eine Proteinurie von deutlich über 100 mg/ mg Krea, eine relative Körpergewichtszunahme von über 10 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht sowie eine Natriurese-Reduktion und indirekt eine reduzierte ENaC-Aktivierung nach Amiloridgabe [111].

Gleichermaßen ergab sich bei Plasminogen-KO Mäusen im induzierbaren Podocin-Knockout-Modell ($nphs2^{\Delta ipod} * plg^{-/-}$) nach der Induktion mit Doxycyclin eine Proteinurie von deutlich über 100 mg/ mg Krea, eine relative Körpergewichtszunahme von weit über 10 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht sowie eine Natriurese-Reduktion und indirekt eine reduzierte ENaC-Aktivierung nach Amiloridgabe [113].

Zieht man nun die Ergebnisse dieser Arbeit vergleichend heran, reiht sich FSAP in die zuvor untersuchten Kandidatenproteasen ein.

Weiterhin davon ausgehend, dass es „die“ entscheidende ENaC-aktivierende Protease gibt, müssen nun weitere potenzielle Kandidatenproteasen untersucht werden. So gibt es Hinweise, dass sich die entscheidende Protease im Spektrum der Koagulation- oder Komplementkaskaden findet [114, 81]. Möglich wäre auch eine weitere Redundanz der Ergebnisse, die eine alternative Interpretation nahelegen, wonach FSAP eine von mehreren möglichen Serinproteasen ist, die den ENaC im DIN aktivieren kann. Eventuell müssen zukünftige Forschungsfragen umformuliert werden: Gibt es „eine“ relevante Protease oder können mehrere Serinproteasen den ENaC im DIN durch proteolytische Spaltung aktivieren und sich dadurch gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen? So könnte z. B. FSAP die ENaC-spaltende Funktion „übernehmen“, wenn Plasmin -wie bei $Plg^{-/-}$ -Mäusen- nicht vorhanden ist. Ist FSAP, wie bei Habp2-KO-Tieren, nicht vorhanden, kann die Funktion wieder von Plasmin übernommen werden etc.

Die Untersuchung der verschiedenen Theorien erfordert weitere Experimente mit Gen-KO-Tieren und gegebenenfalls Tieren mit mehreren Gen-KOs.

Eine alternative Erklärung könnte sein, dass es möglicherweise eine unbekannte Serinproteasen-Kaskade gibt, die sich selbst austariert [115, 116]. Hinweise auf eine

solche Kaskaden finden sich in physiologischen Modellen: So konnte eine Aktivierung von Proxalin durch Matriptase (CAP 3) nachgewiesen werden [117]. Eventuell spielt auch eine Modulation durch Proteasen-Inhibitor-Prozesse eine Rolle. Passend hierzu konnten *in vitro*-Experimente Nexin-1 als einen Proxalin-Inhibitor identifizieren, der Natrium-Ganzzellströme verringerte [118]. In diesem Zusammenhang waren Aldosteron und das Zytokin TGF- β 1 sich wechselseitig modulierende Einflussfaktoren von Nexin-1 [118] und weitere *in vivo*-Experimente konnten eine Beeinflussung der Natrium-Rückresorption von Aldosteron über Proxalin bestätigten [119].

Zudem könnte die Rolle von Aldosteron auch in anderer Hinsicht erneut beleuchtet werden, da es über Zell-Signalwege die ENaC-Verweildauer in der Zellmembran [120] und darüber die Wahrscheinlichkeit einer proteolytischen Spaltung [121] beeinflusst. Aldosteron als alleiniger Einflussfaktor für eine pathophysiologische Natriumretention anzusehen, erscheint allerdings sehr unwahrscheinlich. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Blockade von Mineralokortikoid-Rezeptoren mit Canrenoat eine Natriumretention im nephrotischen Syndrom *in vivo* nicht verhindern kann [79]. Zusätzlich zeigten sowohl adrenaletomierte Ratten [122] als auch SGK1-defiziente Mäuse [88] eine Natriumretention im experimentellen nephrotischen Syndrom. Darüber hinaus konnten Vuaginaux et al. *in vitro* einen synergistischen, sich potenzierenden Effekt von SGK1 und CAPs für den ENaC-vermittelten Natriumstrom demonstrieren [74].

In der Literatur wurde außerdem ein Rezeptor-vermittelter Einfluss von (Serin-)proteasen auf die ENaC-Funktion diskutiert [123].

Weiterhin ist es möglich, dass bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedliche (Serin-)Proteasen filtriert werden [81]. Dies wäre auch eine passende Erklärung, warum Patienten trotz hoher Proteasurie nur geringe oder keine Ödeme haben können [33]. Eine sich hieraus ergebende individuelle Diagnostik und Therapie ist aktuell Spekulation.

4.3 Translationale Aspekte zur Grundlagenforschung am nephrotischen Syndrom

4.3.1 Klinische Studien

In den letzten Jahren fanden sich zahlreiche Erkenntnisse, die für eine genauere Analyse der Proteinurie bei chronischen Nierenerkrankungen sprechen. So ist die Bestimmung der Albuminurie sensitiver als die Proteinurie bei der Erkennung von glomerulären Schädigungen und Permeabilitätsveränderungen [124–126] und dabei auch besser geeignet zur frühzeitigen Erkennung glomerulärer Nephropathien, z. B. im Rahmen eines Diabetes mellitus [127, 128]. Darüber hinaus kann anhand der Albuminurie eine Prognose für chronische Nierenerkrankungen im Hinblick auf Mortalität und terminaler Niereninsuffizienz getroffen werden [129–131] und sie ist ein prognostischer Einzelparameter für das kardiovaskuläre Risiko [132, 133].

Die Leitlinie von Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) empfiehlt seit 2012 die Albuminurie als Prognosefaktor für die Gesamtmortalität und kardiovaskuläre Mortalität sowie für die Progression einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) und wird daher zusammen mit der GFR und der Erkrankungsursache in die Bewertung des Stadiums einer Chronischen Nierenerkrankung einbezogen [134, 135]. Passend dazu verlangsamte die medikamentöse Hemmung der Albuminurie die Progression von Chronischen Nierenerkrankungen [136].

Angesichts der Schwere der untersuchten Endpunkte unterstreichen die klinischen Studien und die Leitlinie die Relevanz der Erforschung der Proteinurie. Vor diesem Hintergrund ist eine detailliertere Analyse der Protein- und damit der Proteasurie und ihrer pathophysiologischen Zusammenhänge wesentlich, um die Grundlagen für diese klinischen Erkenntnisse zu verstehen. Dabei könnte sich die Proteinurie weniger als passiver Risikomarker, sondern vielmehr als aktiver Risikofaktor erweisen [82]. Welche Rolle die Proteinurie bei der Entstehung von chronischen Nierenerkrankungen wirklich einnimmt, ist nicht eindeutig geklärt [137, 33]. Bekannt ist, dass die Albuminurie selbst einen direkten tubulointerstitiellen Schaden verursachen kann, der zu einer Entzündungsreaktion und zur Fibrosierung der Niere führt [138–140]. Die Albuminurie ist außerdem eng mit der aberranten glomerulären Filtration von Proteasen, also der Proteasurie, korreliert. So zeigte sich bei Patientinnen mit Prä-Eklampsie [141] und auch bei Patienten mit diabetischer Nephropathie [142, 143] eine deutlich erhöhte Ausscheidung der Serinprotease Plasmin in Korrelation zur

Albuminurie. Zudem waren bei Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung Plasmin und Plasma Kallikrein, eine weitere Serinprotease, erhöht im Urin nachweisbar [111, 144]. In diesen beiden Studien konnte auch gezeigt werden, dass die Proteasurie mit der Albuminurie und einer Überwässerung -vor allem bei Patienten mit nephrotischem Syndrom- assoziiert war. Die Überwässerung äußerte sich bei den betroffenen Patienten klinisch durch Hypertonie und Ödementstehung.

4.3.2 Medikamentöse Therapieoptionen

Eine medikamentöse Option, um die Volumenretention im Rahmen des nephrotischen Syndroms zu behandeln, ist die ENaC-Blockade mit Amilorid. So konnte durch Amilorid eine effektive Senkung des Blutdrucks [145] und die Ausscheidung von Ödemen erreicht werden [146]. Zusätzlich wird aber über die reduzierte Natriumaufnahme und die konsekutive Hemmung der Na-K-ATPase die Kalium-Ausscheidung behindert, was zu lebensbedrohlichen Hyperkaliämien führen kann [147, 148].

Im experimentellen nephrotischen Syndrom bei Mäusen konnte Aprotinin die ENaC-Aktivierung und Ödementstehung *in vivo* verhindern [79]. Die Anwendung dieses vielversprechenden Medikaments beim Menschen gestaltete sich jedoch problematisch und es war nie für diese Indikation zugelassen. 2007 wurde Aprotinin vom Markt genommen, da eine gesteigerte Mortalität bei der Anwendung als antifibrinolytisches Medikament im Rahmen von Herzoperationen vermutet wurde [149]. Diese Ansicht relativierte sich zwischenzeitlich nach erneuter Analyse der Daten, aber ein Zusammenhang ist weiterhin naheliegend [150]. Zusätzlich fand sich bei Patienten, die im Rahmen einer kardiochirurgischen Operation Aprotinin erhalten hatten, ein erhöhtes Risiko für eine akute Nierenschädigung bis hin zur Dialysepflichtigkeit [151]. Experimente an gesunden Mäusen wiesen darauf hin, dass bei hoher Dosierung die Nierenschädigung Konsequenz einer renalen Aprotinin-Akkumulation ist. Die Störung tubulärer Prozesse und -überraschenderweise- eine Aktivierung des ENaC sind die Folge [152].

Ein weiteres verfügbares Medikament ist der Serinproteasen-Inhibitor Camostat, das ursprünglich zur Behandlung von Pankreatitiden entwickelt wurde [153]. Einige tierexperimentelle Studien zeigten Hinweise auf eine verminderte ENaC-Aktivierung trotz Aldosteron-Stimulation [54], eine Reduktion der Proteinurie im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz [154] und eine Blutdrucksenkung in einem

Bluthochdruck-Modell [155]. Für eine Anwendung von Camostat beim Patienten mit Nephrotischem Syndrom sind die wenigen verfügbaren Erkenntnisse jedoch nicht ausreichend [33, 156, 157].

Die aktuelle Therapie des nephrotischen Syndroms umfasst neben der Behandlung der Grunderkrankung die symptomatische Therapie. So werden die Ödeme mit Schleifendiuretika behandelt und es wird eine Natriumrestriktion durchgeführt [158]. Außerdem wird das RAAS mit ACE-Hemmern und Angiotensin II Rezeptor-Blockern gehemmt [158].

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Progressions-hemmende Wirkung einer chronischen Nierenerkrankung der RAAS-Therapie in erster Linie auf die Reduktion der Albuminurie zurückzuführen ist [136]. Berücksichtigt man zusätzlich die Korrelation der Protein- bzw. Albuminurie mit der Proteasurie ergibt sich eine mögliche, wenn auch spekulative, Erklärung für die Wirksamkeit der RAAS-hemmenden Therapie: Durch die verminderte Proteinurie wird auch die Menge der filtrierten Proteasen reduziert, was zu einer verminderten ENaC-Aktivierung und damit verminderten Volumenretention führt [33].

Bei der Proteasurie gelangen aberrant filtrierte Proteasen in das Tubulussystem und führten bei *in vivo*-Experimenten über die Aktivierung des Epithelialen Natrium Kanals (ENaC) zur Natrium- und Volumenretention [79]. Die Kanal-aktivierende und damit „entscheidende“ Protease für die Volumenretention wurde bisher noch nicht entdeckt. Könnte diese essenzielle Protease entdeckt und medikamentös gehemmt werden, wäre dies ein kausaler Therapieansatz, um die Volumenretention mit konsekutiver Ödementstehung und Hypertonie beim Nephrotischen Syndrom zu verhindern.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das erste Ziel dieser Promotionsarbeit ergab sich aus dem angewendeten Doxorubicin-induzierten Nephrotischen Syndrom im Mausmodell (DIN). Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) im Prkdc-Gen bei suszeptiblen Mausstämmen wurde als entscheidender Faktor für die Sensitivität gegenüber der Induktion der DIN identifiziert [20]. Da Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP)-KO-Mäuse dem nicht-induzierbaren C57BL/6J(B6)-Stamm angehören, war es entscheidend die für das Modell empfänglichen Tiere zu identifizieren. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der C6418T-SNP essenziell für die Induktion des Nephrotischen Syndroms im DIN ist. Er führt bei den PKcs zum Aminosäureaustausch R2140C, wodurch die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beeinträchtigt wird. Mittels Genotypisierung können Mäuse mit dem entsprechenden SNP identifiziert werden, die für die DIN suszeptibel sind. Die Erkenntnisse führten zur Etablierung einer obligaten Genotypisierung auf den C6418T-SNP bei Mäusen, die unsere Arbeitsgruppe für DIN-Versuche verwendet, ermöglicht eine schnellere Rückkreuzung von KO-Mauslinien auf einen genetischen Wildtyp-Hintergrund und bedeutet eine Optimierung der Methode der DIN.

Das zweite Ziel dieser Promotionsarbeit war die Untersuchung des Einflusses der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) auf die ENaC-Aktivierung im DIN. Grundlegend für diese Zielsetzung ist die Vorstellung, wonach durch einen glomerulären Nierenschaden Serinproteasen aus dem Blutkreislauf in das Tubulussystem gelangen. Sie nehmen in diesem Milieu eine pathophysiologische Funktion ein, indem sie durch eine proteolytische Spaltung den ENaC aktivieren. Dieser retiniert daraufhin vermehrt Natrium und Volumen und Ödeme entstehen. FSAP konnte als eine vielversprechende Kandidaten-Protease identifiziert werden, eine essenzielle Serinprotease für die ENaC-Aktivierung zu sein [81]. Die in-vivo-Daten ergeben, dass es sich bei FSAP nicht um die gesuchte Kandidatenprotease handelt. Es fand sich eine ausgeprägte Proteinurie mit konsekutiver ENaC-Aktivierung, Natriumretention und Ödementstehung sowohl bei Wildtyp- als auch bei FSAP-KO-Mäusen. In der Konsequenz müssen nun weitere potenzielle Kandidatenproteasen untersucht werden. Möglicherweise findet sich die entscheidende Protease im Spektrum der Koagulation- oder Komplementkaskaden [114, 81]. Folgt aber nach den bisher untersuchten Kandidatenproteasen eine weitere Redundanz der Ergebnisse, müssen zukünftige Forschungsfragen möglicherweise umformuliert werden.

6. Literatur

- 1 *Orth SR, Ritz E.* The nephrotic syndrome. *The New England journal of medicine* 1998; 338: 1202–1211
- 2 *Herold G.* Innere Medizin 2023. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2023
- 3 *Vaziri ND.* Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: mechanisms and consequences. *Kidney international* 2016; 90: 41–52
- 4 *Eddy AA, Symons JM.* Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet (London, England)* 2003; 362: 629–639
- 5 *Ronco P, Beck L, Debiec H et al.* Membranous nephropathy. *Nature reviews. Disease primers* 2021; 7: 69
- 6 *Rosenberg AZ, Kopp JB.* Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2017; 12: 502–517
- 7 *Wang C-S, Greenbaum LA.* Nephrotic Syndrome. *Pediatric clinics of North America* 2019; 66: 73–85
- 8 *FRENK S, ANTONOWICZ I, CRAIG JM et al.* Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside; renal lesions and body electrolyte composition. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 1955; 89: 424–427
- 9 *Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC et al.* Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *American journal of physiology. Renal physiology* 2009; 296: F213-29
- 10 *Lu J, Liu J, Guo Y et al.* CRISPR-Cas9: A method for establishing rat models of drug metabolism and pharmacokinetics. *Acta pharmaceutica Sinica. B* 2021; 11: 2973–2982
- 11 *Chen A, Wei CH, Sheu LF et al.* Induction of proteinuria by adriamycin or bovine serum albumin in the mouse. *Nephron* 1995; 69: 293–300
- 12 *Chen A, Sheu LF, Ho YS et al.* Experimental focal segmental glomerulosclerosis in mice. *Nephron* 1998; 78: 440–452
- 13 *Bohnert BN, Gonzalez-Menendez I, Dörffel T et al.* Essential role of DNA-PKcs and plasminogen for the development of doxorubicin-induced glomerular injury in mice. *Disease models & mechanisms* 2021; 14
- 14 *Bohnert BN, Dörffel T, Daiminger S et al.* Retrobulbar Sinus Injection of Doxorubicin is More Efficient Than Lateral Tail Vein Injection at Inducing Experimental Nephrotic Syndrome in Mice: A Pilot Study. *Laboratory animals* 2019; 53: 564–576
- 15 *Bohnert BN, Daniel C, Amann K et al.* Impact of phosphorus restriction and vitamin D-substitution on secondary hyperparathyroidism in a proteinuric mouse model. *Kidney & blood pressure research* 2015; 40: 153–165
- 16 *Bertani T, Poggi A, Pozzoni R et al.* Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1982; 46: 16–23
- 17 *Xiao M, Bohnert BN, Grahammer F et al.* Rodent models to study sodium retention in experimental nephrotic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2022; 235: e13844
- 18 *Kimura M, Takahasi H, Ohtake T et al.* Interstrain differences in murine daunomycin-induced nephrosis. *Nephron* 1993; 63: 193–198

- 19 Wang Y, Wang YP, Tay YC et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney international* 2000; 58: 1797–1804
- 20 Papeta N, Zheng Z, Schon EA et al. Prkdc participates in mitochondrial genome maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice. *The Journal of clinical investigation* 2010; 120: 4055–4064
- 21 Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S et al. A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 2502–2507
- 22 Zheng Z, Pavlidis P, Chua S et al. An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006; 17: 1796–1800
- 23 Yu Y, Okayasu R, Weil MM et al. Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the Prkdc (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. *Cancer research* 2001; 61: 1820–1824
- 24 O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nature reviews. Genetics* 2006; 7: 45–54
- 25 Traves KP, Studdiford JS, Pickle S et al. Edema: diagnosis and management. *American family physician* 2013; 88: 102–110
- 26 Hedin E, Bijelić V, Barrowman N et al. Furosemide and albumin for the treatment of nephrotic edema: a systematic review. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2022; 37: 1747–1757
- 27 Epstein AA. Concerning the causation of edema in chronic parenchymatous nephritis: Method for its alleviation. *The American Journal of Medicine* 1952; 13: 556–561
- 28 Patel S, Rauf A, Khan H et al. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2017; 94: 317–325
- 29 Bockenhauer D. Over- or underfill: not all nephrotic states are created equal. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2013; 28: 1153–1156
- 30 Brown E, Sagnella G, Jones B et al. EVIDENCE THAT SOME MECHANISM OTHER THAN THE RENIN SYSTEM CAUSES SODIUM RETENTION IN NEPHROTIC SYNDROME. *The Lancet* 1982; 320: 1237–1240
- 31 Brown EA, Markandu N, Sagnella GA et al. Sodium retention in nephrotic syndrome is due to an intrarenal defect: evidence from steroid-induced remission. *Nephron* 1985; 39: 290–295
- 32 Ichikawa I, Rennke HG, Hoyer JR et al. Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 1983; 71: 91–103
- 33 Artunc F, Wörn M, Schork A et al. Proteasuria-The impact of active urinary proteases on sodium retention in nephrotic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2019; 225: e13249
- 34 Meltzer JI, Keim HJ, Laragh JH et al. Nephrotic syndrome: vasoconstriction and hypervolemic types indicated by renin-sodium profiling. *Annals of internal medicine* 1979; 91: 688–696
- 35 Cadnapaphornchai MA, Tkachenko O, Shchekochikhin D et al. The nephrotic syndrome: pathogenesis and treatment of edema formation and secondary complications. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2014; 29: 1159–1167

- 36 *Deschênes G, Doucet A.* Collecting duct (Na⁺/K⁺)-ATPase activity is correlated with urinary sodium excretion in rat nephrotic syndromes. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 2000; 11: 604–615
- 37 *Nesterov V, Dahlmann A, Krueger B et al.* Aldosterone-dependent and -independent regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) in mouse distal nephron. *American journal of physiology. Renal physiology* 2012; 303: F1289-99
- 38 *Garty H, Palmer LG.* Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiological reviews* 1997; 77: 359–396
- 39 *Canessa CM, Schild L, Buell G et al.* Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994; 367: 463–467
- 40 *Noreng S, Bharadwaj A, Posert R et al.* Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy. *eLife* 2018; 7
- 41 *Giraldez T, Rojas P, Jou J et al.* The epithelial sodium channel δ -subunit: new notes for an old song. *American journal of physiology. Renal physiology* 2012; 303: F328-38
- 42 *Snyder PM, McDonald FJ, Stokes JB et al.* Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269: 24379–24383
- 43 *La Alvarez de Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK et al.* Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annual review of physiology* 2000; 62: 573–594
- 44 *Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB et al.* Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 2007; 449: 316–323
- 45 *Kleyman TR, Carattino MD, Hughey RP.* ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284: 20447–20451
- 46 *Palmer LG.* Ion selectivity of epithelial Na channels. *The Journal of membrane biology* 1987; 96: 97–106
- 47 *Rossier BC.* Epithelial sodium channel (ENaC) and the control of blood pressure. *Current opinion in pharmacology* 2014; 15: 33–46
- 48 *Rossier BC, Pradervand S, Schild L et al.* Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annual review of physiology* 2002; 64: 877–897
- 49 *Olivier R, Scherrer U, Horisberger J-D et al.* Selected contribution: limiting Na(+) transport rate in airway epithelia from alpha-ENaC transgenic mice: a model for pulmonary edema. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2002; 93: 1881–1887
- 50 *Tong Z, Illek B, Bhagwandin VJ et al.* Proxasin, a membrane-anchored serine peptidase, regulates sodium currents in JME/CF15 cells, a cystic fibrosis airway epithelial cell line. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2004; 287: L928-35
- 51 *Frindt G, Palmer LG.* Na channels in the rat connecting tubule. *American journal of physiology. Renal physiology* 2004; 286: F669-74
- 52 *Frindt G, Palmer LG.* Acute effects of aldosterone on the epithelial Na channel in rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology* 2015; 308: F572-8
- 53 *Kemendy AE, Kleyman TR, Eaton DC.* Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. *The American journal of physiology* 1992; 263: C825-37
- 54 *Uchimura K, Kakizoe Y, Onoue T et al.* In vivo contribution of serine proteases to the proteolytic activation of γ ENaC in aldosterone-infused rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 2012; 303: F939-43

- 55 *Kleyman TR, Eaton DC*. Regulating ENaC's gate. *American journal of physiology. Cell physiology* 2020; 318: C150-C162
- 56 *Sheng S, Carattino MD, Bruns JB et al*. Furin cleavage activates the epithelial Na⁺ channel by relieving Na⁺ self-inhibition. *American journal of physiology. Renal physiology* 2006; 290: F1488-F1496
- 57 *Chraïbi A, Horisberger J-D*. Na self inhibition of human epithelial Na channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases. *The Journal of general physiology* 2002; 120: 133–145
- 58 *Knight KK, Wentzlaff DM, Snyder PM*. Intracellular sodium regulates proteolytic activation of the epithelial sodium channel. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 27477–27482
- 59 *Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP et al*. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 1997; 389: 607–610
- 60 MEROPS - the Peptidase Database (16.12.2022). Online: <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/pepsum?id=I02.001> letzter Zugriff: 16.12.2022
- 61 *Haerteis S, Krappitz M, Bertog M et al*. Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by the cysteine protease cathepsin-S. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2012; 464: 353–365
- 62 *Nakhoul NL, Hering-Smith KS, Gambala CT et al*. Regulation of sodium transport in M-1 cells. *The American journal of physiology* 1998; 275: F998-F1007
- 63 *Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL et al*. Distinct pools of epithelial sodium channels are expressed at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 48491–48494
- 64 *Kleyman TR, Myerburg MM, Hughey RP*. Regulation of ENaCs by proteases: An increasingly complex story. *Kidney international* 2006; 70: 1391–1392
- 65 *Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL et al*. Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 18111–18114
- 66 *Carattino MD, Sheng S, Bruns JB et al*. The epithelial Na⁺ channel is inhibited by a peptide derived from proteolytic processing of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 18901–18907
- 67 *Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ*. Serine protease activation of near-silent epithelial Na⁺ channels. *American journal of physiology. Cell physiology* 2004; 286: C190-4
- 68 *Bruns JB, Carattino MD, Sheng S et al*. Epithelial Na⁺ channels are fully activated by furin- and prostaticin-dependent release of an inhibitory peptide from the gamma-subunit. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 6153–6160
- 69 *Carattino MD, Mueller GM, Palmer LG et al*. Prostaticin interacts with the epithelial Na⁺ channel and facilitates cleavage of the γ -subunit by a second protease. *American journal of physiology. Renal physiology* 2014; 307: F1080-7
- 70 *Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF et al*. Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2000; 11: 828–834
- 71 *Harris M, Firsov D, Vuagniaux G et al*. A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 58–64

- 72 Passero CJ, Mueller GM, Rondon-Berrios H et al. Plasmin activates epithelial Na⁺ channels by cleaving the gamma subunit. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 36586–36591
- 73 Garcia-Caballero A, Dang Y, He H et al. ENaC proteolytic regulation by channel-activating protease 2. *The Journal of general physiology* 2008; 132: 521–535
- 74 Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF et al. Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* Oocytes. *The Journal of general physiology* 2002; 120: 191–201
- 75 Kleyman TR, Kashlan OB, Hughey RP. Epithelial Na⁺ Channel Regulation by Extracellular and Intracellular Factors. *Annual review of physiology* 2018; 80: 263–281
- 76 Diakov A, Bera K, Mokrushina M et al. Cleavage in the {gamma}-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the proteolytic activation of near-silent channels. *The Journal of physiology* 2008; 586: 4587–4608
- 77 Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR. Proteolytic processing of the epithelial sodium channel gamma subunit has a dominant role in channel activation. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 25290–25295
- 78 Svenningsen P, Bistrup C, Friis UG et al. Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009; 20: 299–310
- 79 Bohnert BN, Menacher M, Janessa A et al. Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome. *Kidney international* 2018; 93: 159–172
- 80 Bohnert BN, Essigke D, Janessa A et al. Experimental nephrotic syndrome leads to proteolytic activation of the epithelial Na⁺ channel in the mouse kidney. *American journal of physiology. Renal physiology* 2021; 321: F480-F493
- 81 Wörn M, Bohnert BN, Alenazi F et al. Proteasuria in nephrotic syndrome-quantification and proteomic profiling. *Journal of proteomics* 2021; 230: 103981
- 82 Bohnert BN. Proteinurie. *Dialyse aktuell* 2021; 25: 68–75
- 83 Römisch J. Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis. *Biological chemistry* 2002; 383: 1119–1124
- 84 Zeerleder S. Factor VII-Activating Protease: Hemostatic Protein or Immune Regulator? *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2018; 44: 151–158
- 85 Byskov K, Etscheid M, Kanse SM. Cellular effects of factor VII activating protease (FSAP). *Thrombosis research* 2020; 188: 74–78
- 86 Kara E, Manna D, Løset GÅ et al. Analysis of the substrate specificity of Factor VII activating protease (FSAP) and design of specific and sensitive peptide substrates. *Thrombosis and haemostasis* 2017; 117: 1750–1760
- 87 Kannemeier C, Al-Fakhri N, Preissner KT et al. Factor VII-activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18: 728–730
- 88 Artunc F, Nasir O, Amann K et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. *American journal of physiology. Renal physiology* 2008; 295: F1624-34
- 89 Joshi AU, Orset C, Engelhardt B et al. Deficiency of Factor VII activating protease alters the outcome of ischemic stroke in mice. *The European journal of neuroscience* 2015; 41: 965–975

- 90 *Daniel J-M, Reichel CA, Schmidt-Woell T et al.* Factor VII-activating protease deficiency promotes neointima formation by enhancing leukocyte accumulation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2016; 14: 2058–2067
- 91 *Borkham-Kamphorst E, Zimmermann HW, Gassler N et al.* Factor VII activating protease (FSAP) exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in liver fibrosis in mice and men. *Journal of hepatology* 2013; 58: 104–111
- 92 *Subramaniam S, Thielmann I, Morowski M et al.* Defective thrombus formation in mice lacking endogenous factor VII activating protease (FSAP). *Thrombosis and haemostasis* 2015; 113: 870–880
- 93 *Bohnert BN, Artunc F.* Induction of Nephrotic Syndrome in Mice by Retrobulbar Injection of Doxorubicin and Prevention of Volume Retention by Sustained Release Aprotinin. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2018
- 94 *FAWCETT JK, SCOTT JE.* A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of clinical pathology* 1960; 13: 156–159
- 95 *Kessler MA, Meinitzer A, Wolfbeis OS.* Albumin blue 580 fluorescence assay for albumin. *Analytical biochemistry* 1997; 248: 180–182
- 96 *Renart J, Reiser J, Stark GR.* Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; 76: 3116–3120
- 97 *Hnasko TS, Hnasko RM.* The Western Blot. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2015; 1318: 87–96
- 98 *Burnette WN.* "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* 1981; 112: 195–203
- 99 *Towbin H, Staehelin T, Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; 76: 4350–4354
- 100 *Yang L, Frindt G, Lang F et al.* SGK1-dependent ENaC processing and trafficking in mice with high dietary K intake and elevated aldosterone. *American journal of physiology. Renal physiology* 2017; 312: F65-F76
- 101 *Frindt G, Shi S, Kleyman TR et al.* Cleavage state of γ ENaC in mouse and rat kidneys. *American journal of physiology. Renal physiology* 2021; 320: F485-F491
- 102 *Masilamani S, Kim GH, Mitchell C et al.* Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *The Journal of clinical investigation* 1999; 104: R19-23
- 103 *Essigke D, Ilyaskin AV, Wörn M et al.* Zymogen-locked mutant prostatic (Prss8) leads to incomplete proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) and severely compromises triamterene tolerance in mice. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2021; 232: e13640
- 104 *Artunc F, Bohnert BN, Schneider JC et al.* Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by factor VII activating protease (FSAP) and its relevance for sodium retention in nephrotic mice. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2022; 474: 217–229
- 105 *Fabre KM, Ramaiah L, Dregalla RC et al.* Murine Prkdc polymorphisms impact DNA-PKcs function. *Radiation research* 2011; 175: 493–500
- 106 *Muhl L, Galuska SP, Oörni K et al.* High negative charge-to-size ratio in polyphosphates and heparin regulates factor VII-activating protease. *The FEBS journal* 2009; 276: 4828–4839

- 107 *Sperling C, Maitz MF, Grasso S et al.* A Positively Charged Surface Triggers Coagulation Activation Through Factor VII Activating Protease (FSAP). *ACS applied materials & interfaces* 2017; 9: 40107–40116
- 108 *Yamamichi S, Fujiwara Y, Kikuchi T et al.* Extracellular histone induces plasma hyaluronan-binding protein (factor VII activating protease) activation in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 2011; 409: 483–488
- 109 *Etscheid M, Muhl L, Pons D et al.* The Marburg I polymorphism of factor VII activating protease is associated with low proteolytic and low pro-coagulant activity. *Thrombosis research* 2012; 130: 935–941
- 110 *Haerteis S, Krappitz M, Diakov A et al.* Plasmin and chymotrypsin have distinct preferences for channel activating cleavage sites in the γ subunit of the human epithelial sodium channel. *The Journal of general physiology* 2012; 140: 375–389
- 111 *Haerteis S, Schork A, Dörffel T et al.* Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice. *Acta Physiol* 2018; 224: e13060
- 112 *Bohnert BN, Daiminger S, Wörn M et al.* Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2019; 227: e13286
- 113 *Xiao M, Bohnert BN, Aypek H et al.* Plasminogen deficiency does not prevent sodium retention in a genetic mouse model of experimental nephrotic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2021; 231: e13512
- 114 *Pang L, Li Q, Li Y et al.* Urine proteomics of primary membranous nephropathy using nanoscale liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Clinical proteomics* 2018; 15: 5
- 115 *Rossier BC, Stutts MJ.* Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annual review of physiology* 2009; 71: 361–379
- 116 *Ray EC, Rondon-Berrios H, Boyd CR et al.* Sodium retention and volume expansion in nephrotic syndrome: implications for hypertension. *Advances in chronic kidney disease* 2015; 22: 179–184
- 117 *Netzel-Arnett S, Currie BM, Szabo R et al.* Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 32941–32945
- 118 *Wakida N, Kitamura K, Tuyen DG et al.* Inhibition of prostasin-induced ENaC activities by PN-1 and regulation of PN-1 expression by TGF- β 1 and aldosterone. *Kidney international* 2006; 70: 1432–1438
- 119 *Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M et al.* Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *The Journal of clinical investigation* 2002; 109: 401–408
- 120 *Kellenberger S, Schild L.* Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiological reviews* 2002; 82: 735–767
- 121 *Kabra R, Knight KK, Zhou R et al.* Nedd4-2 induces endocytosis and degradation of proteolytically cleaved epithelial Na⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 6033–6039
- 122 *Seigneux S de, Kim SW, Hemmingsen SC et al.* Increased expression but not targeting of ENaC in adrenalectomized rats with PAN-induced nephrotic syndrome. *American journal of physiology. Renal physiology* 2006; 291: F208-17
- 123 *Bengrine A, Li J, Hamm LL et al.* Indirect activation of the epithelial Na⁺ channel by trypsin. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 26884–26896

- 124 *Ballantyne FC, Gibbons J, O'Reilly DS.* Urine albumin should replace total protein for the assessment of glomerular proteinuria. *Annals of clinical biochemistry* 1993; 30 (Pt 1): 101–103
- 125 *Lamb EJ, MacKenzie F, Stevens PE.* How should proteinuria be detected and measured? *Annals of clinical biochemistry* 2009; 46: 205–217
- 126 *Newman DJ, Thakkar H, Medcalf EA et al.* Use of urine albumin measurement as a replacement for total protein. *Clinical nephrology* 1995; 43: 104–109
- 127 *Gross JL, Azevedo MJ de, Silveiro SP et al.* Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes care* 2005; 28: 164–176
- 128 *Shihabi ZK, Konen JC, O'Connor ML.* Albuminuria vs urinary total protein for detecting chronic renal disorders. *Clinical chemistry* 1991; 37: 621–624
- 129 *Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT et al.* Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney international* 2011; 79: 1331–1340
- 130 *Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M et al.* Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney international* 2011; 80: 93–104
- 131 *Brantsma AH, Bakker SJL, Hillege HL et al.* Cardiovascular and renal outcome in subjects with K/DOQI stage 1-3 chronic kidney disease: the importance of urinary albumin excretion. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2008; 23: 3851–3858
- 132 *Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR et al.* Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet (London, England)* 2013; 382: 339–352
- 133 *Jackson CE, Solomon SD, Gerstein HC et al.* Albuminuria in chronic heart failure: prevalence and prognostic importance. *Lancet (London, England)* 2009; 374: 543–550
- 134 *Stevens PE, Levin A.* Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Annals of internal medicine* 2013; 158: 825–830
- 135 *KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.* *Kidney international* 2024; 105: S117-S314
- 136 *Lambers Heerspink HJ, Gansevoort RT.* Albuminuria Is an Appropriate Therapeutic Target in Patients with CKD: The Pro View. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2015; 10: 1079–1088
- 137 *Zandi-Nejad K, Eddy AA, Glasscock RJ et al.* Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney international. Supplement* 2004: S76-89
- 138 *Abbate M, Zoja C, Remuzzi G.* How does proteinuria cause progressive renal damage? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006; 17: 2974–2984
- 139 *Birn H, Christensen EI.* Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney international* 2006; 69: 440–449
- 140 *Gekle M.* Renal tubule albumin transport. *Annual review of physiology* 2005; 67: 573–594
- 141 *Buhl KB, Friis UG, Svenningsen P et al.* Urinary plasmin activates collecting duct ENaC current in preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 2012; 60: 1346–1351

- 142 *Andersen H, Friis UG, Hansen PBL et al.* Diabetic nephropathy is associated with increased urine excretion of proteases plasmin, prostaticin and urokinase and activation of amiloride-sensitive current in collecting duct cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2015; 30: 781–789
- 143 *Buhl KB, Oxlund CS, Friis UG et al.* Plasmin in urine from patients with type 2 diabetes and treatment-resistant hypertension activates ENaC in vitro. *Journal of hypertension* 2014; 32: 1672-7; discussion 1677
- 144 *Schork A, Woern M, Kalbacher H et al.* Association of Plasminuria with Overhydration in Patients with CKD. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2016; 11: 761–769
- 145 *Unruh ML, Pankratz VS, Demko JE et al.* Trial of Amiloride in Type 2 Diabetes with Proteinuria. *Kidney international reports* 2017; 2: 893–904
- 146 *Hinrichs GR, Mortensen LA, Jensen BL et al.* Amiloride resolves resistant edema and hypertension in a patient with nephrotic syndrome; a case report. *Physiological reports* 2018; 6: e13743
- 147 *Jaffey L, Martin A.* Malignant hyperkalaemia after amiloride/hydrochlorothiazide treatment. *Lancet (London, England)* 1981; 1: 1272
- 148 *Chiu TF, Bullard MJ, Chen JC et al.* Rapid life-threatening hyperkalemia after addition of amiloride HCl/hydrochlorothiazide to angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Annals of emergency medicine* 1997; 30: 612–615
- 149 *Fergusson DA, Hébert PC, Mazer CD et al.* A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *The New England journal of medicine* 2008; 358: 2319–2331
- 150 *Benedetto U, Altman DG, Gerry S et al.* Safety of Perioperative Aprotinin Administration During Isolated Coronary Artery Bypass Graft Surgery: Insights From the ART (Arterial Revascularization Trial). *Journal of the American Heart Association* 2018; 7
- 151 *Mangano DT, Tudor IC, Dietzel C.* The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *The New England journal of medicine* 2006; 354: 353–365
- 152 *Wörner S, Bohnert BN, Wörn M et al.* Renal effects of the serine protease inhibitor aprotinin in healthy conscious mice. *Acta pharmacologica Sinica* 2022; 43: 111–120
- 153 *Beckh K, Göke B, Müller R et al.* Elimination of the low-molecular weight proteinase inhibitor camostat (FOY 305) and its degradation products by the rat liver. *Research in experimental medicine. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie* 1987; 187: 401–406
- 154 *Hayata M, Kakizoe Y, Uchimura K et al.* Effect of a serine protease inhibitor on the progression of chronic renal failure. *American journal of physiology. Renal physiology* 2012; 303: F1126-35
- 155 *Maekawa A, Kakizoe Y, Miyoshi T et al.* Camostat mesilate inhibits prostaticin activity and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension. *Journal of hypertension* 2009; 27: 181–189
- 156 *Onbe T, Makino H, Kumagai I et al.* Effect of proteinase inhibitor camostat mesilate on nephrotic syndrome with diabetic nephropathy. *The Journal of diabetic complications* 1991; 5: 167–168
- 157 *Makino H, Onbe T, Kumagai I et al.* A proteinase inhibitor reduces proteinuria in nephrotic syndrome. *American journal of nephrology* 1991; 11: 164–165

- 158 *Rovin BH, Adler SG, Barratt J et al.* Executive summary of the KDIGO 2021 Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney international* 2021; 100: 753–779
- 159 <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P97313/entry> (Stand: 06.11.2024)

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studien erfolgte zusammen mit meinem Doktorvater und Betreuer Professor Dr. Ferruh Artunc sowie mit meinem Betreuer Dr. Bernhard Bohnert.

Alle Versuche wurden nach Einarbeitung durch Professor Dr. Artunc und Dr. Bohnert von mir durchgeführt. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte nach Einarbeitung durch Andrea Janessa (MTAL) durch mich.

Die Nierenschnitte für die Lichtmikroskopie der DNA-PKcs-Versuche wurden von Elke Zabinsky (Klinische Pharmakologie Tübingen) und die PAS-Färbungen inklusive der Lichtmikroskopischen Aufnahmen von mir und Dr. Bohnert durchgeführt.

Die Literaturrecherche und die statistische Auswertung der Daten erfolgten durch mich.

Die retrobulbäre Doxorubicin-Injektion erfolgte durch Professor Dr. Artunc oder Dr. Bohnert.

Die Western Blots wurden von meinen Arbeitsgruppen-Kollegen Andrea Janessa und Matthias Wörn durchgeführt. Die Studien in metabolischen Käfigen wurden federführend von meinem Kollegen Dr. Daniel Essigke umgesetzt. Die Albumin- und Harnstoffmessungen erfolgten durch Matthias Wörn. Die Immunhistochemie wurde von Irene Gonzalez-Menendez und Felicitas Quintanilla-Martinez erstellt. Die FSAP-Aktivitätsmessungen im Mausurin wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Sandip M. Kanse (Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo, Oslo, Norwegen) durchgeführt.

Alle benötigten Nieren-, Blut- und Urinproben wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Bohnert durch mich gewonnen.

Ich versichere, die vorliegende Promotionsarbeit selbständig verfasst und außer den angegebenen Quellen keine weiteren verwendet zu haben.

Tübingen, den

8. Veröffentlichungen

„Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im PRDKC-Gen determiniert die Suszeptibilität für die Doxorubicin-induzierte Nephropathie bei 129S1/SvImJ-Mäusen“

Jonas C. Schneider, Bernhard N. Bohnert, Irene Gonzalez Menendez, Leticia Quintanilla-Fend, Ferruh Artunc

Posterpräsentation auf der 11. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2019

„Essential role of DNA-PKcs and plasminogen for the development of doxorubicin-induced glomerular injury in mice“

Bernhard N. Bohnert, Irene Gonzalez-Menendez, Thomas Dörffel, **Jonas C. Schneider**, Mengyun Xiao, Andrea Janessa, M. Zaher Kalo, Birgit Fehrenbacher, Martin Schaller, Nicolas Casadei, Kerstin Amann, Christoph Daniel, Andreas L. Birkenfeld, Florian Grahammer, Lahoucine Izem, Edward F. Plow, Leticia Quintanilla-Martinez and Ferruh Artunc

Publikation in Dis Model Mech. 2021 Sep 1;14(9):dmm049038.

DOI: 10.1242/dmm.049038

„Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by factor VII activating protease (FSAP) and its relevance for sodium retention in nephrotic mice“

Ferruh Artunc, Bernhard N. Bohnert, **Jonas C. Schneider**, Tobias Staudner, Florian Sure, Alexandr V. Ilyaskin, Matthias Wörn, Daniel Essigke, Andrea Janessa, Nis V. Nielsen⁵, Andreas L. Birkenfeld, Michael Etscheid, Silke Haerteis, Christoph Korbmacher, Sandip M. Kanse

Publikation in Pflugers Arch. 2022 Feb;474(2):217-229.

DOI: 10.1007/s00424-021-02639-7

(Zweitautor bei geteilter Erstautorschaft)

Danksagung (vorletzte Seite)

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Artunc bedanken. Lieber Ferruh, vielen Dank, dass Du es mir ermöglicht hast, bei Dir zu promovieren, von Dir zu lernen und von deiner Begeisterung für die Wissenschaft angesteckt zu werden. Es war mir eine Freude und Ehre.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Bernhard Bohnert. Lieber Bernhard, vielen Dank für Deine Unterstützung bei allen kleineren und größeren Problemen. Auf Dich konnte ich mich immer verlassen. Deine Art und Weise Wissenschaft und Klinik zu vereinbaren ist für mich vorbildlich.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Andrea Janessa bedanken. Liebe Andrea, vielen Dank für Deine Geduld und Deine Mühen bei meiner Einarbeitung und meinen Fragen im Labor.

Mein Dank geht außerdem an alle Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor von Prof. Artunc. Dies gilt besonders für Dr. Daniel Essigke, PhD Mengyun Xiao, Matthias Wörn, Zaher Kalo und Dr. Rosi Bissinger.

Vielen Dank an Euch alle für die großartige Zeit. Ich werde Euch niemals vergessen.

9. Anhang

9.1 Versuchstierkundlicher Kurs

Im Wintersemester 2018/ 19 absolvierte ich den „Versuchstierkundlichen Kurs“ der Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Universität Tübingen unter der Leitung von Veterinärdirektor Dr. med. vet. Franz Iglauer und seinen Stellvertreter:innen. Im Rahmen des Kurses wurde ich über die rechtlichen Grundlagen, Hygiene- und Haltungsverfahren, Handling und natürliches Verhalten der Tiere, sowie Narkose- und Operationstechniken unterrichtet. Via Ausnahmegenehmigung durch das Veterinäramt erhielt ich die Erlaubnis zur Gewinnung von Ohrlochstanzen zur Genotypisierung, Sammlung von Urin, Durchführung von subkutanen und intraperitonealen Injektionen sowie die Erlaubnis zur Durchführung von retrobulbären Blutentnahmen (unter Isofluran-Narkose) im Rahmen von Tierversuchen.

Zusätzlich bildete ich mich über das „Versuchstierkundliche Kolloquium“ derselben Einrichtung regelmäßig fort.

9.2 Überwachung der Tierbelastung

Die Erfassung der Belastung durch das experimentelle Nephrotische Syndrom wurde im laufenden Versuch täglich mithilfe eines Scores durchgeführt. Für diese Einschätzung wurde die Zu- beziehungsweise Abnahme des Körpergewichts der Mäuse berücksichtigt. Zudem wurde eine Bewertung des Allgemeinzustandes anhand der Lokomotion, Fellqualität und des Atmungstyps vorgenommen.