

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkt: Diabetologie, Endokrinologie und Nephrologie)

**Bedeutung der Serinproteasen Plasma-Kallikrein und
Plasminogen 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

Dörffel, Thomas

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger

Tag der Disputation: 03.12.2024

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteasen	1
1.1.1	Kallikrein	1
1.1.2	Plasminogen und Plasminogen-System	2
1.2	Das nephrotische Syndrom	3
1.2.1	Definition eines Nephrotischen Syndroms	3
1.2.2	Ätiologie	3
1.2.3	Glomerulärer Filtrationsapparat und Rolle der Podozyten	4
1.2.4	Klinik	9
1.2.5	Therapie	12
1.2.6	Modell der Doxorubicin-induzierten Nephropathie der Maus	13
1.3	Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.2	Methoden	17
2.2.1	Mausmodell und Tierhaltung	17
2.2.2	Studiendesign	18
2.2.3	Probengewinnung	22
2.2.4	Genotypisierung	22
2.2.5	Messungen	27
2.2.6	Histologie	35
2.2.7	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Plasma-Kallikrein-defiziente Mäuse	38
3.1.1	Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms	38
3.1.2	Protease-Aktivität im Urin	42
3.2	Plasminogen-defiziente Mäuse	46
3.2.1	Plasminogen-Konzentration unter Kontroll-Bedingungen	46
3.2.2	Wachstumskurve der Mäuse	47

3.2.3	Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms in der Akutphase.....	48
3.2.4	Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms im Langzeitverlauf	51
3.2.5	Immunhistologie.....	54
4	Diskussion.....	62
4.1	Plasma-Kallikrein-defiziente Mäuse	62
4.1.1	Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms	62
4.1.2	Protease-Aktivität im Urin	63
4.2	Plasminogen-defiziente Mäuse	65
4.2.1	Kontrollbedingungen.....	65
4.2.2	Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms in der Akutphase und in der Langzeitbeobachtung.....	66
4.2.3	Glomeruläre Bindung von Plasminogen.....	68
4.2.4	Rolle des Plasminogen-Rezeptors Histon H2B.....	70
4.2.5	Zusammenschau der Ergebnisse	73
4.3	Ausblick.....	74
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis.....	77
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	85
8	Veröffentlichungen	86
	Danksagung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des glomerulären Filtrationsapparats	5
Abbildung 2: Übersicht der podozytären Pathophysiologie und der Mechanismen des Podozytenverlustes	7
Abbildung 3: Hypothetischer Zusammenhang zwischen Plg und Podozyten	8
Abbildung 4: Modell und Theorie der proteolytischen ENaC-Aktivierung im Rahmen der Overfill-Theorie am Beispiel Plasminogen	10
Abbildung 5: Aufbau und Möglichkeiten der Aktivierung des ENaCs	12
Abbildung 6: Ablauf der Studie zu p-KLK-defizienten Mäusen	19
Abbildung 7: Ablauf der Studie zu Plg-defizienten Mäusen	20
Abbildung 8: Repräsentative Bilder der Gelelektrophorese für p-KLK und Plg.	26
Abbildung 9: Beispielhafte Standardkurve des Plg-ELISAs	32
Abbildung 10: Fress- und Trinkmengen p-KLK-defizienter Mäuse	38
Abbildung 11: Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms bei p-KLK-defizienten Mäusen	40
Abbildung 12: Verlauf der p-KLK-Aktivität im Urin nephrotischer Mäuse und Nachweis von p-KLK in Plasma und Urin gesunder und nephrotischer <i>klkb1^{+/-}</i> - und <i>klkb1^{-/-}</i> -Mäuse im Western Blot	42
Abbildung 13: Verlauf der Plasminaktivität im Urin nephrotischer Mäuse und Nachweis von Plg im Urin nephrotischer Mäuse im Western Blot	44
Abbildung 14: Plg-Konzentration im Plasma bei <i>Plg^{+/+}</i> , <i>Plg^{+/-}</i> und <i>Plg^{-/-}</i> -Mäusen	46
Abbildung 15: Wachstumskurve von <i>Plg^{+/+}</i> , <i>Plg^{+/-}</i> und <i>Plg^{-/-}</i> -Mäusen	47
Abbildung 16: Akuter klinischer Verlauf von <i>Plg^{+/+}</i> , <i>Plg^{+/-}</i> und <i>Plg^{-/-}</i> -Mäusen ...	48
Abbildung 17: Harnstoff-Konzentration im Langzeitverlauf	51
Abbildung 18: Überlebensraten über 80 Tage	52

Abbildung 19: Lichtmikroskopie von Nieren 80 Tage nach Doxorubicin	53
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung der Nieren für Plg.....	54
Abbildung 21: Ansprechen der verschiedenen Genotypen nach Injektion von Doxorubicin	55
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung der Nieren von <i>Plg^{-/-}</i> -Mäusen unter Substitution von murinem Plg.....	56
Abbildung 23: Immunfluoreszenztrische Färbung der Nieren für Plg acht Stunden nach Doxorubicin-Gabe.....	57
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung der Nieren für Histon H2B.....	59
Abbildung 25: Immunfluoreszenz der Nieren für Plg und Histon H2B acht Stunden nach Doxorubicin-Gabe.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	15
Tabelle 2: Kits und Materialien für Messungen.....	16
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 4: Primer für die Genotypisierung	17
Tabelle 5: Materialien zur Tierhaltung	17
Tabelle 6: Bestandteile Mastermix Plg	24
Tabelle 7: PCR-Protokoll Plg.....	24
Tabelle 8: Bestandteile Mastermix p-KLK	25
Tabelle 9: PCR-Protokoll p-KLK.....	25
Tabelle 10: Pipettierschema Plasmin- und p-KLK-Aktivität für jeweils eine Urinprobe.....	33
Tabelle 11: Immunfluoreszenz Primärantikörper	37
Tabelle 12: Immunfluoreszenz Sekundärantikörper	37

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
Ca²⁺	Calcium
DAPI	4',6-diamidino-2-Pehnylindol
DNA-PKc	DNA-abhängige Proteinkinase
EACA	ε-Aminocaprinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENaC	Epithelialer Natrium-Kanal
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
gDNA	Genomische DNA
GLDH	Glutamatdehydrogenase
K⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
Krea	Kreatinin
MCGN	Minimal-Change-Glomerulonephritis
MGN	Membranöse Glomerulonephritis
Na⁺	Natrium
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAN	Puromycin-Aminonukleosid-Nephropathie
PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PAS-Färbung	Periodic-Acid-Schiff-Färbung
PCR	Polymerasekettenreaktion
p-KLK	Plasma-Kallikrein
Plg	Plasminogen
ROS	Reactive Oxygen Species
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
suPAR	soluble urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
TBS	Trisgepufferte Saline
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TMB	Tetramethylbezdine
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
VASP	Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren und damit für die Prozessierung von Proteinen verantwortlich sind. Durch Abspaltung bestimmter Peptidregionen können die jeweiligen Proteine beispielsweise aktiviert werden (limitierte Proteolyse), aber auch der Abbau oder die intrazelluläre Organisation von Proteinen werden durch Proteasen mitgesteuert [1, 2].

Die Proteasen Plasma-Kallikrein (p-KLK) und Plasminogen (Plg) beziehungsweise dessen aktive Form Plasmin sind Vertreter der Klasse der Serinproteasen [1]. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sich in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Serin befindet. Serinproteasen erfüllen Aufgaben in verschiedenen Bereichen des menschlichen Organismus, zum Beispiel im Rahmen der Verdauung, der Gerinnung oder des Immunsystems. Weitere Beispiele für Serinproteasen sind Trypsin, Elastase oder Lactoferrin [3, 4]. Weitere Proteaseklassen, die durch ihre aktiven Zentren abgegrenzt und unterschieden werden, sind beispielsweise Aspartatproteasen, Cysteinproteasen oder Metalloproteasen [5].

1.1.1 Kallikrein

Kallikreine stellen eine Untergruppe der Serinproteasen dar, welche sich in p-KLK und 15 Gewebe-Kallikreine unterteilen lassen [6]. Kallikreine werden unter anderem in der Niere, der Prostata, den Ovarien, dem Gehirn, der Haut und im Pankreas exprimiert. Außerdem können sie zu diagnostischen Zwecken genutzt werden, wie zum Beispiel KLK3, auch bekannt als Prostata-spezifisches Antigen, das als Screening- und Verlaufsparemeter im Rahmen von Prostatatumoren dient [7]. Funktionell sind die Kallikreine im Kinin-Kallikrein-System eingebettet [6]. Ausgangspunkt in diesem System sind die Kininogene, diese Proteine kommen im Plasma vor und werden in ein hochmolekulares (120 kDa) und ein

niedermolekulares (70 kDa) Kininogen unterteilt [8]. Gewebe-Kallikreine nutzen beide Kininogen-Arten als Substrat, während p-KLK nur das hochmolekulare Kininogen prozessiert [9]. Die Kininogene werden dadurch zu Kininen, wie zum Beispiel Bradykinin (1,1 kDa) umgewandelt [10, 11]. Außerdem können Kinine durch Kininasen modifiziert werden [12]. Die Kinine stellen die Effektoren dieses Systems dar, das unter anderem bei der Blutdruckregulation, Gerinnung, Entzündungsreaktionen oder der Immunantwort eine Rolle spielt [13, 14]. Das Proenzym von p-KLK ist Präkallikrein (88 kDa), welches durch die Leber synthetisiert wird und im Plasma von Faktor XIIa aktiviert werden kann [6, 15]. P-KLK kann wiederum die Reaktion von Plg in dessen aktive Form Plasmin katalysieren [16].

1.1.2 Plasminogen und Plasminogen-System

Das Plg-System besteht aus mehreren Faktoren und Modulatoren. Diese lassen sich in Aktivatoren, Inhibitoren und Rezeptoren unterteilen. Plg (90 kDa) ist das Proenzym der Serinprotease Plasmin und wird unter anderem in der Leber und in der Niere synthetisiert [17]. Es ist als zentraler Faktor in einem eigenen System eingebettet [18, 19]. Als Hauptaufgabe dieses Systems wird bisher vor allem die Fibrinolyse in Thromben angesehen. Aber auch im Kontext der Embryogenese, der Wundheilung, der Angiogenese oder der Tumorentstehung rückt dieses System mittlerweile ins Blickfeld [20].

Eine Vielzahl von Proteinen besitzt die Fähigkeit Plg zu Plasmin umzusetzen und zu aktivieren, wie zum Beispiel p-KLK, Faktor XI oder Faktor XII [16, 21, 22]. Die Aktivierung zu Plasmin geschieht hauptsächlich durch den tissue-type Plasminogen Activator (tPA) und den urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) [18]. Der tPA wird vor allem von Endothelzellen produziert. Glomeruläre Endothelzellen exprimieren ebenfalls tPA [23]. Der uPA kommt in der Niere sowohl im proximalen Tubulus als auch in der Henle-Schleife vor und gelangt in den Urin. Während der tPA selbst als Plg-Rezeptor an Zelloberflächen fungieren kann, besitzt der uPA einen eigenen Rezeptor, den urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (uPAR) [24]. Dieser existiert in membrangebundener oder gelöster Form als soluble urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

(suPAR) [25]. Der uPAR kommt sowohl an den Podozyten als auch am glomerulären Endothel vor [26]. Der uPA kann an den uPAR binden und in dieser Position Plg aktivieren [24].

Ein weiterer Plg-Rezeptor, der an den Podozyten vorkommt, ist der Rezeptor Plg-RKT. Dieser ist räumlich sowohl mit dem uPAR als auch mit dem tPA-Rezeptor assoziiert [27]. Die Funktionen des Plg-RKT werden bisher noch diskutiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser im Rahmen von Entzündungen zur Mobilisation von Makrophagen beiträgt [28, 29].

Der Histon H2B ist ein weiterer Plg-Rezeptor, der an glomerulären Endothelzellen zu finden ist [30, 31]. Dieser ist ebenfalls mit dem uPAR assoziiert [32]. Ein weiteres Merkmal des Histon H2B ist dessen Verbindung mit geschädigten Zellen, an denen er gehäuft vorkommt [32, 33].

Den wichtigsten plasmatischen Plasmin-Inhibitor stellt α 2-Antiplasmin dar, während mit dem Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) eine weitere inhibitorische Komponente existiert, die allerdings bereits die Konversion von Plg zu Plasmin über die Inhibition der Aktivatoren verhindert [34, 35].

1.2 Das nephrotische Syndrom

1.2.1 Definition eines Nephrotischen Syndroms

Das nephrotische Syndrom ist ein Symptomkomplex, der durch vier pathologische Befunde definiert ist. Dies sind eine Proteinurie von mindestens 3,5 g pro Tag, eine Hypalbuminämie beziehungsweise Hypoproteinämie, periphere Ödeme und eine Hyperlipoproteinämie [36]. Des Weiteren kann auch eine Hyperkoagulabilität dazugezählt werden.

1.2.2 Ätiologie

Eine Vielzahl von Erkrankungen kann zur Entwicklung eines nephrotischen Syndroms führen. Diese lassen sich in primäre und sekundäre Ursachen einteilen [37]. Beispiele für primäre Ursachen sind die Minimal-Change-

Glomerulopathie (MCGN), die Membranöse Glomerulonephritis (MGN) oder die Fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Sekundäre Ursachen sind beispielsweise endokrinologische (Diabetes mellitus) oder immunologische Grunderkrankungen (Systemischer Lupus Erythematoses, IgA-Nephropathie), Medikamente (Interferon) und Infektionen (HIV) [38, 39].

Die primären Erkrankungen stellen dabei den häufigsten Grund für ein nephrotisches Syndrom dar und weisen verschiedene Risikogruppen auf. So betrifft die MCGN beispielsweise vor allem Kinder und die MGN meist Erwachsene [40, 41].

1.2.3 Glomerulärer Filtrationsapparat und Rolle der Podozyten

Allen Grunderkrankungen des nephrotischen Syndroms ist als pathophysiologischer Grundmechanismus gemein, dass Podozyten in ihrer Funktion gestört sind [38, 42]. Podozyten sind Teil des Filtrationsapparats, welcher außerdem aus Endothelzellen und einer glomerulären Basalmembran (GBM) besteht [43]. Dies ist in Abbildung 1 dargestellt. Sie garantieren die Selektivität der Filtermembran. Durch die Fußfortsätze der einzelnen Podozyten entsteht eine enge Schlitzmembran, welche physiologisch lediglich für Moleküle mit geringerer Größe als Albumin (69 kDa) durchlässig ist [24]. Die Fußfortsätze sowie die Verankerung in der GBM stellen die zwei wichtigsten Voraussetzungen für eine regelrechte Funktion der Podozyten dar [44]. Damit verbunden existieren verschiedene Strukturproteine und Einheiten des podozytären Zytoskeletts. Die interpodozytäre Integration geschieht über Nephrin, welches an Podocin und intrazellulär über CD2AP an F-Actin gekoppelt ist. Die Stabilität der F-Actin-Filamente wird wiederum durch Myo1E und über α -Actinin-4, das sich zwischen den F-Actin-Filamenten befindet, gewährleistet. Die Verbindung zur GBM stellen Integrine, unter anderem β 3 und α 1, her, welche innerhalb der GBM mit Laminin- β 2 verbunden sind [45]. Neben der Verankerung der Zellen trägt auch die GBM selbst einen Teil zur Filtrationsbarriere bei, da sie negativ geladen ist und ebenfalls negativ geladene Proteine dadurch zurückgehalten werden [46].

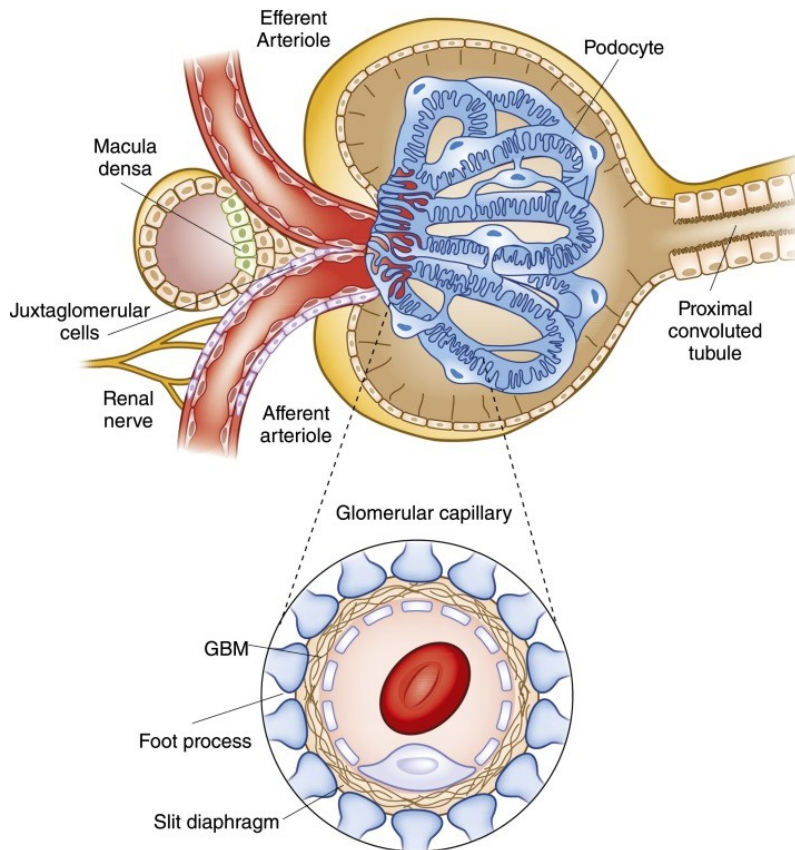


Abbildung 1: Darstellung des glomerulären Filtrationsapparats [47]

Dargestellt ist der Aufbau eines Glomerulums und des glomerulären Filtrationsapparats. Blut wird durch das Vas afferens in das Kapillargeflecht transportiert. Dort findet durch Endothelzellen, GBM und Podozyten mit den charakteristischen Fußfortsätzen die Filtration des Blutes und die Produktion des Primärharns statt. Der Primärharn gelangt anschließend in den proximalen Tubulus, das Blut wird aus dem Glomerulum in das Vas efferens geleitet.

Die dritte Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere sind die Endothelzellen. Diese besitzen durch transzelluläre Poren eine fenestrierte Struktur [48, 49]. Neben dieser Grundstruktur tragen Elemente der Zelloberfläche wie eine spezielle Glykokalyx zur Filterfunktion des Endothels bei. Während für Wasser eine hohe Permeabilität besteht, werden insbesondere Proteine davon abgehalten in den Urin zu gelangen [50]. Zudem besteht eine gegenseitige Kommunikation zwischen Podozyten und Endothel über Stoffe wie den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und den Transforming Growth Factor β (TGF- β), durch die beispielsweise die Filtrationsrate und Zellstruktur beeinflusst werden kann [51].

1.2.3.1 Mechanismen der glomerulären Schädigung

Bei Funktionsverlust der Podozyten entsteht eine verringerte Selektivität des glomerulären Filtrationsapparats [52]. Es existieren dabei unterschiedliche Möglichkeiten wie auf die Podozyten Einfluss genommen werden kann. Die MCGN ist beispielsweise durch rein histologische Veränderungen, bei unveränderter Podozytenzahl charakterisiert. Allerdings kann auch eine gesteigerte Proliferation zu einer gestörten Filtrationsmembran führen, da die Kapillaren dadurch kollabieren. Im Rahmen der diffusen mesangialen Sklerose liegt dagegen eine verminderte Proliferation zu Grunde. Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist der Podozytenverlust. Die FSGS stellt dabei eine typische Krankheit dar, welche mit einem Podozytenverlust einhergeht [38].

Um eine Verringerung der Podozytenzahl zu erreichen, können wiederum drei Grundmechanismen definiert werden: die Apoptose, die Ablösung der Podozyten von der Basalmembran und eine verringerte Proliferation. Diese Grundmechanismen sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Proliferation kann dabei vor allem genetisch, durch eine erhöhte Synthese antiproliferativer Proteine, wie p21, p27 oder p57, supprimiert werden. Wird die Integrität zytoskelettaler Strukturproteine, die in Verbindung mit der Basalmembran oder den benachbarten Podozyten stehen, gestört, führt dies zur Ablösung. Die zytoskelettären Bestandteile bieten dafür eine Vielzahl an möglichen Einflussfaktoren, wie zum Beispiel die Integrine. Die Produktion proapoptischer Faktoren wie TGF- β oder allgemein die Förderung oxidativen Stresses führt zum apoptotischen Zelltod [53].

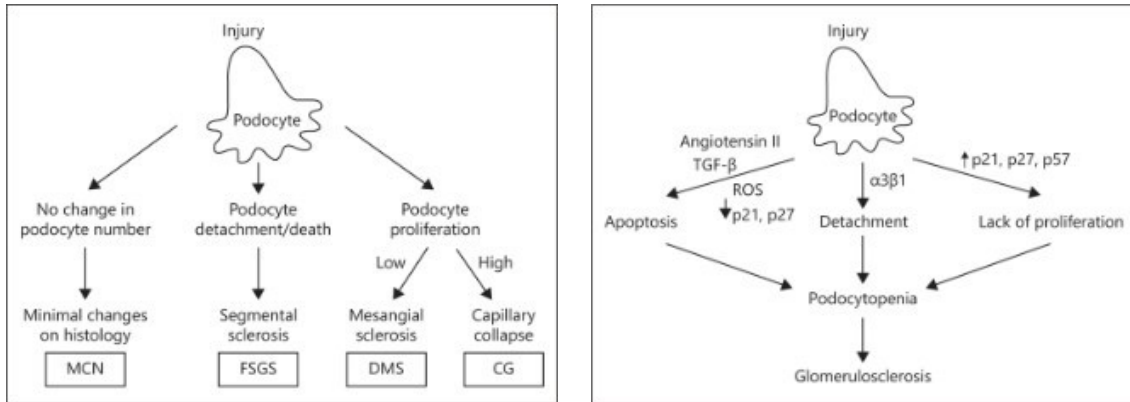


Abbildung 2: Übersicht der podozytären Pathophysiologie und der Mechanismen des Podozytenverlustes [38, 42]

Dargestellt sind die Mechanismen der Podozytenfunktionseinschränkung und Beispiele entsprechender Grunderkrankungen (links). Mögliche Pathophysiologien sind histologische Veränderungen bei normaler Podozytenanzahl (MCN), Untergang beziehungsweise Ablösung der Zellen (FSGS) und die Sklerosierung (DMS) beziehungsweise der kapilläre Kollaps (CG) bei moderater oder hoher Steigerung der Podozytenproliferation.

Zudem Darstellung der Pathophysiologie der Podozytopenie (rechts). Dabei liegen die Apoptose (zum Beispiel durch TGF- β), die Ablösung (Störung der $\alpha 3 \beta 1$ -Integrine) und die Proliferationshemmung (zum Beispiel durch erhöhtes p21) zu Grunde und führen in weiterer Konsequenz zur Glomerulosklerose.

MCN: Minimal-Change-Nephropathie, FSGS: Fokal-segmentale Glomerulosklerose, DMS: Diffuse mesangiale Sklerose, CG: Collapsing Glomerulopathy, TGF- β : Transforming-Growth-Factor- β , ROS: Reactive Oxygen Species.

1.2.3.2 Plasminogen und Podozytenschaden

Bei *in vitro* Untersuchungen an Podozyten konnte gezeigt werden, dass Plg zu einem Anstieg des oxidativen Stresses in Podozyten führt [54]. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 3 dargestellt. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass Plg an die Rezeptoren der Podozyten bindet und durch den uPA beziehungsweise den uPAR in die aktive Form Plasmin umgewandelt werden kann. Die anschließende mitochondriale Produktion der NADPH-Oxidase-Isoform Nox2 bewirkte einen zytoplasmatischen und mitochondrialen Anstieg von O_2^- und mitochondrialem H_2O_2 (Nox4). Dies resultierte in einem intrazellulären Anstieg der reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und die damit verbundene Produktion von Stoffen wie CD36 und oxidiertes Low-Density Lipoprotein führte zur Apoptose der Podozyte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Plg-Podozyten-Interaktion als ein Mechanismus und Motor des podozytären Schadens dienen könnte. Die gesteigerte Synthese von Endothelin-1 war ein

weiterer Befund dieser Studie [54]. Dies ist wiederum ein Hinweis auf eine mögliche Rolle des glomerulären Endothels, da Endothelin-1 Teil der interzellulären Kommunikation zwischen Podozyten und Endothelzellen ist [55].

Plasminogen-Plasmin as a “second hit” of podocyte injury associated with proteinuria

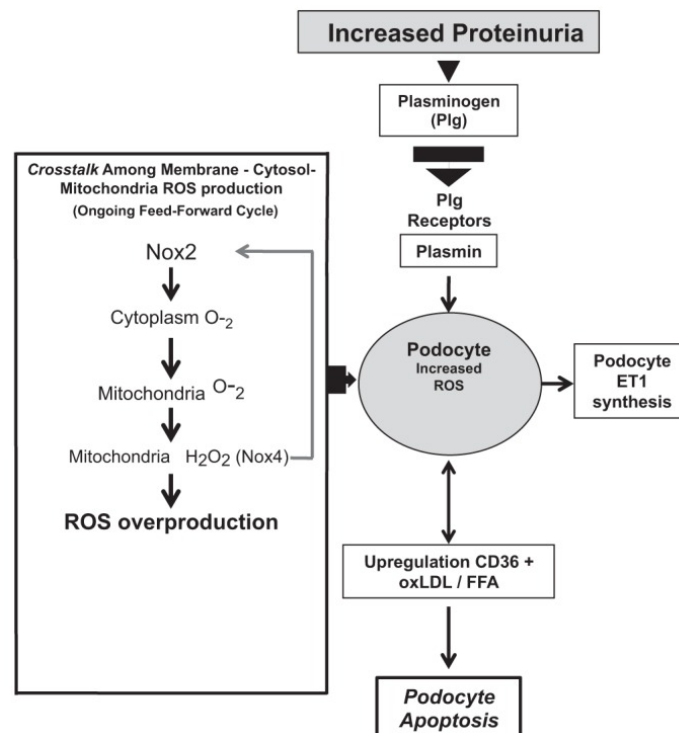


Abbildung 3: Hypothetischer Zusammenhang zwischen Plg und Podozyten [54]

Dargestellt ist eine mögliche Kaskade, begonnen mit der Proteinurie, durch die Plg an Rezeptoren binden und zu Plasmin umgesetzt werden kann. Daraus resultiert eine erhöhte ROS-Produktion sowie erhöhte oxidative Marker (CD36, oxidiertes Low-density Lipoprotein (oxLDL), Free Fatty Acids (FFA)). In der Folge Apoptose des Podozyten. Zusätzlich gesteigerte Endothelin-1-Synthese (ET-1).

In einer weiteren Studie konnten *in vivo* ebenfalls Hinweise auf eine krankheitsfördernde Wirkung des Plgs gefunden werden. So wiesen Ratten im Modell der Puromycin-Aminonukleosid-Nephropathie (PAN) eine deutlich erhöhte glomeruläre Plg-Konzentration und damit verbundene erhöhte Parameter für den oxidativen Stress sowie eine ausgeprägte Proteinurie auf. Die Injektion des uPA-Inhibitors Amilorid führte hingegen zu einer Reduktion des oxidativen Stresses und der Proteinurie [56].

1.2.4 Klinik

Eines der Leitsymptome des nephrotischen Syndroms ist eine Proteinurie von über 3,5 g pro Tag, welche aus der verminderten glomerulären Selektivität im Rahmen des Podozytenschadens resultiert [57]. Die Proteinurie und der damit verbundene Proteinverlust führt zu einem Albuminmangel. Zudem kommt es zu einer Hyperlipidämie, die unter anderem aus einer reduzierten hepatischen Aufnahme des Low Density Lipoproteins resultiert [58, 59]. Weitere Symptome resultieren aus dem proteinurischen Verlust verschiedener Proteine wie Immunglobulinen oder Gerinnungs-assoziierten Proteinen wie Antithrombin-3. Dadurch kommt es beispielsweise zu einer erhöhten Infektanfälligkeit oder einer Hyperkoagulabilität. Neben der Proteinurie, der Hypalbuminämie und der Hyperlipidämie sind stark ausgeprägte, generalisierte Ödeme eines der vier zentralen Kriterien des nephrotischen Syndroms [39].

Zu beachten ist, dass noch weitere Proteine aus dem Blutkreislauf in den Urin gelangen und nicht nur die oben beschriebenen Protein-Mangelzustände zu Beschwerden führen können. Dies trifft insbesondere auf Proteasen wie zum Beispiel Plg und p-KLK zu. Im Rahmen dieser Proteasurie können Enzymreaktionen an Strukturen und Bestandteilen des Nephrons stattfinden, die physiologischerweise durch die glomeruläre Filtrationsbarriere nicht möglich gewesen wären [60-62].

1.2.4.1 Underfill- und Overfill-Theorie

Zur Entstehung der Ödeme existieren zwei Hypothesen, die Underfill- und die Overfill-Theorie [63]. Einerseits wird im Rahmen der Underfill-Theorie diskutiert, ob durch die Hypalbuminämie der onkotische Druck in den Gefäßen so stark abnimmt, dass Flüssigkeit in das extravasale Gewebe diffundiert. Der daraus resultierende intravasale Volumenmangel (= Underfill) setze wiederum eine Aktivierung des Renin-Angiotension-Aldosteron-Systems in Gang. Durch eine gesteigerte Retention des Natriums (Na^+) soll so der relative intravasale Volumenmangel ausgeglichen werden, dies führt jedoch zur Aufrechterhaltung und weiteren Zunahme der Ödeme [61, 63].

Andererseits beschäftigt sich die Overfill-Theorie mit einer möglichen aktiven Rolle aberrant filtrierter Proteine im Tubulussystem der Niere. Da der glomerulärer Filtrationsapparat durch den Podozytenniedergang seine Selektivität verliert, gelangen verschiedene Proteasen in das Tubulussystem. Dabei könnten sie bereits in aktivierter Form vorliegen oder im Tubulussystem aktiviert werden. Diese Proteasen seien nach der Overfill-Theorie für die Aktivierung des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) und damit für die Ödeme verantwortlich. Eine mögliche Kaskade, in der Plg beziehungsweise Plasmin als Aktivator fungiert, ist in Abbildung 4 dargestellt [64].

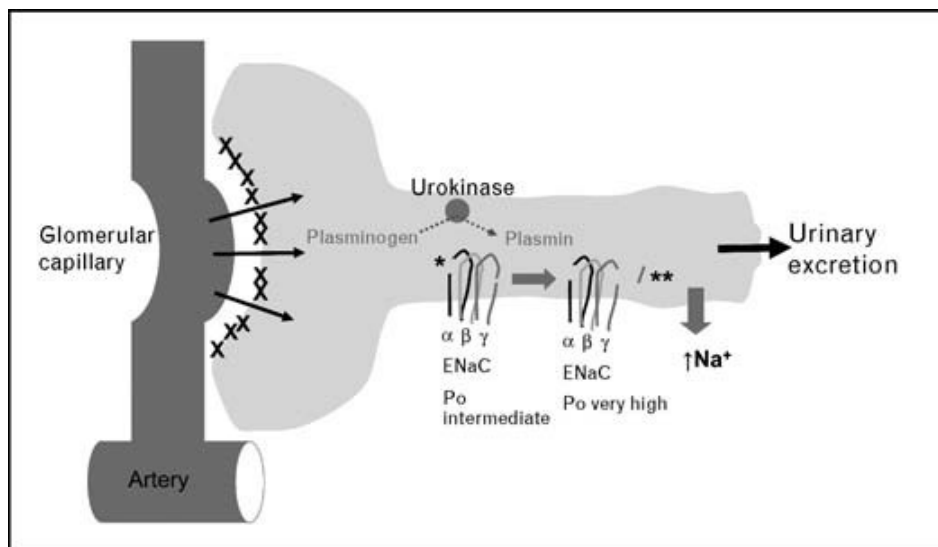


Abbildung 4: Modell und Theorie der proteolytischen ENaC-Aktivierung im Rahmen der Overfill-Theorie am Beispiel Plasminogen [65]

Dargestellt ist die Kaskade der möglichen proteolytischen ENaC-Aktivierung durch Plasmin. Im Rahmen der Proteinurie wird aberrant filtriertes Plg durch die tubuläre uPA in die aktive Form Plasmin umgesetzt. Plasmin kann wiederum den ENaC durch proteolytische Spaltung der γ-Untereinheit, in einen hochaktiven Zustand versetzen und damit dessen Offenheitswahrscheinlichkeit erhöhen. Dies führt zu einer vermehrten Na⁺-Retention.

1.2.4.2 Epithelialer Natrium-Kanal (ENaC)

Der ENaC kommt in der Niere, aber auch im distalen Kolon und der Lunge vor [66]. In der Niere befindet sich der ENaC im distalen Tubulus und besteht aus den drei Untereinheiten α , β und γ [66, 67]. Der ENaC-medierte Na^+ -Transport ist mit der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase funktionell gekoppelt [68]. Die Regulation des ENaCs selbst geschieht über zwei Wege. Zum einen über die Anzahl beziehungsweise Expression der Kanäle und zum anderen über die Offenwahrscheinlichkeit der einzelnen Kanäle [61, 69].

Die Expression wird dabei über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System gesteuert [70]. Da diese Kaskade physiologisch durch einen zu niedrigen Na^+ -Bestand in Gang gebracht wird, führt Aldosteron zu einer vermehrten Expression der α -Untereinheit des ENaCs und damit zu einer erhöhten Na^+ -Retention. Die physiologische Aktivität beziehungsweise Offenheitswahrscheinlichkeit des ENaCs wurde an *Xenopus* Oozyten mithilfe von Amilorid gemessen [71]. Amilorid ist ein Kalium (K^+) sparendes Diuretikum, welches die ENaC-Aktivität senkt [72]. So konnte gezeigt werden, dass der ENaC physiologisch eine relativ niedrige Aktivität aufweist, da diese unter Amilorid nur gering absank [71].

Die gezielte Steigerung der Einzelkanal-Aktivität des ENaCs ist über die proteolytische Aktivierung der verschiedenen Untereinheiten möglich (siehe Abbildung 5). Schon im Rahmen der Expression steigert Aldosteron die Produktion einer proteolytisch prozessierten α - und γ -Untereinheit [70]. Intrazellulär kann Furin die α - und γ -Untereinheit spalten [73]. Extrazellulär können sowohl lösliche als auch membranständige Proteasen die Aktivität erhöhen [74]. Proteasen, die bisher die Fähigkeit zeigten, den ENaC zu aktivieren, sind zum Beispiel die Serinproteasen Plasmin, Kallikrein, Prostasin, Neutrophile Elastase oder Pankreas-Elastase [65, 75-77]. Die γ -Untereinheit wird dabei distal der Furin-Spaltstelle gespalten. Kallikrein und Prostasin besitzen die gleiche Spaltstelle $\gamma\text{RKRK}186$ [78, 79]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die Ödementstehung im Doxorubicin-induzierten nephrotischen Syndrom der Maus durch die subkutane Implantation von Pellets des Protease-Inhibitors Aprotinin verhindert wird [80].

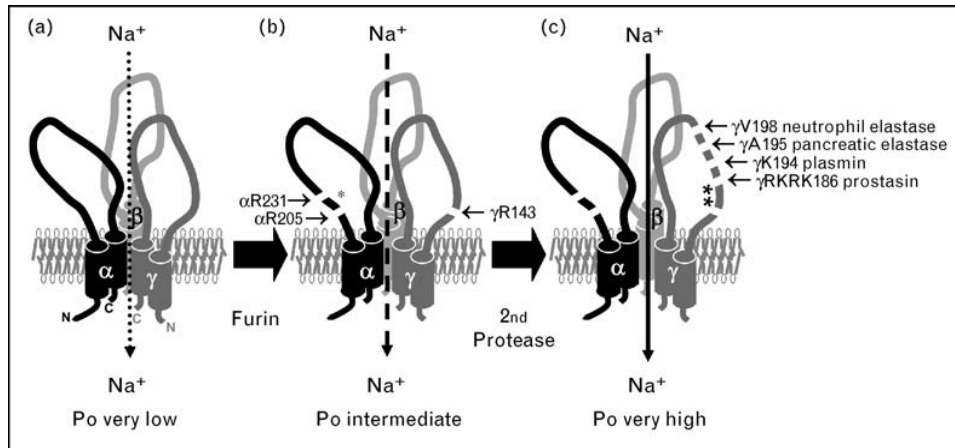


Abbildung 5: Aufbau und Möglichkeiten der Aktivierung des ENaCs [77]

Dargestellt sind die unterschiedlichen Aktivitätszustände des ENaCs und die möglichen Schnittstellen der ENaC-Untereinheiten. (a) Geringe Offenheitswahrscheinlichkeit, Untereinheiten ungeschnitten. (b) Mittelstarke Offenheitswahrscheinlichkeit: Intrazelluläre Aktivierung durch Furin-Proteolyse an α - und/oder γ -Untereinheit. (c) Hohe Offenheitswahrscheinlichkeit: Aktivierung durch extrazelluläre Proteasen (Elastasen, Plasmin, Prostaticin, Kallikrein) an jeweiligen Prädilektionsstellen der γ -Untereinheit.

1.2.5 Therapie

Die zwei Hauptsäulen der Therapie des nephrotischen Syndroms stellen zum einen die Behandlung der auslösenden Grunderkrankungen sowie die symptomatische Therapie dar [81]. So werden beispielsweise die Ödeme durch Diuretika ausgeschwemmt oder auch eine Antikoagulation zur Prophylaxe einer Thrombenbildung durchgeführt. Komplikationen wie Infektionen, für die durch den Antikörpermangel eine höhere Anfälligkeit besteht, werden entsprechend, zum Beispiel mittels Antibiotika, behandelt. Liegt dem nephrotischen Syndrom eine Grunderkrankung, wie zum Beispiel ein Systemischer Lupus Erythematoses oder ein Diabetes mellitus, zu Grunde, erfolgt eine dementsprechende Therapie (zum Beispiel Immunsuppression, Antidiabetika) [57].

Vor allem bei Kindern werden zudem Kortikosteroide und Cyclosporin A erfolgreich eingesetzt [82]. Deren Wirkung liegt mutmaßlich an einer Stabilisierung der Podozyten. Eine spezielle Therapie, die gezielt am podozytären Pathomechanismus ansetzt, existiert aktuell jedoch noch nicht [83, 84].

1.2.6 Modell der Doxorubicin-induzierten Nephropathie der Maus

Anthrazykline rufen bei manchen Mausstämmen und Ratten nach intravenöser Injektion ein experimentelles nephrotisches Syndrom hervor [85]. Anthrazykline mit dieser Wirkung sind Doxorubicin, Puromycin und Daunorubicin [86]. Die Pathophysiologie auf zellulärer Ebene ist dabei vor allem durch Brüche des Doppelstrangs der DNA und oxidative Schädigung gekennzeichnet [87]. Zu beachten ist, dass C57BL/6-Mäuse resistent für die nephrotoxische Wirkung von Doxorubicin sind [88]. Sensitive Mausstämme sind dagegen Mäuse der 129/SvJ- und der BALB/c-Linien. Es konnte gezeigt werden, dass sensitive Mausstämme einen Einzelnukleotid-Polymorphismus im Prkdc-Gen aufweisen. Dieses Gen kodiert die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKc), ein Protein zur DNA-Reparatur bei Doppelstrangbrüchen. Während die intakte Form dieses Proteins vor der Induktion der Nephropathie schützt, sind Tiere mit dem Einzelnukleotid-Polymorphismus C6418T sensitiv. Dies resultiert in einer Podozytenschädigung und anschließender nephrotischer Proteinurie, Hypalbuminämie, Hyperlipoproteinämie sowie der Entwicklung einer FSGS [89].

Die Nephrotoxizität von Doxorubicin äußert sich durch mehrere glomeruläre Folgen [85]. Zum einen resultieren sowohl die Apoptose als auch die Ablösung der Podozyten. Zum anderen wird über die podozytäre Produktion des VEGF und dessen endotheliale Bindung die Hyperpermeabilität und Albuminurie gesteuert. Die Zunahme der Extrazellulärmatrix wird über Zytokine wie TGF- β in Verbindung mit dem Mesangium vermittelt [85]. Gleichzeitig kann an den Endothelzellen eine reduzierte Glykokalyx, die zur Aufrechterhaltung der endothelialen Filtrationsbarriere notwendig ist, beobachtet werden [89, 90]. Langfristig kann bei den Tieren im Doxorubicin-Modell histologisch eine glomeruläre Sklerose, eine interstitielle Fibrose sowie eine Tubulusatrophie beobachtet werden. Im Gesamtbild entspricht die Doxorubicin-induzierte Nephropathie bei Mäusen und Ratten somit am ehesten einer FSGS [91].

1.3 Ziel der Arbeit

Die aktuelle Datenlage widmet sich vermehrt der Bedeutung der Rolle von Proteasen in der Pathophysiologie der zentralen Befunde des nephrotischen Syndroms, den Ödemen und der ausgeprägten Proteinurie. Insbesondere Serin-Proteasen wie p-KLK und Plg sowie die Proteasurie stehen dabei im Fokus. Sie sind Bestandteil der Überlegungen, dass nicht der onkotisch bedingte intravasale Volumenmangel, sondern aberrant filtrierte Proteasen für die charakteristischen Ödeme, durch die Aktivierung des ENaCs, verantwortlich sein könnten (Overfill-Theorie). Außerdem finden sich Hinweise, dass das Plg-System bereits in der Genese der Proteinurie, der glomerulären und podozytären Schädigung, eine relevante Rolle spielt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Bedeutung von p-KLK und Plg beim Doxorubicin-induzierten nephrotischen Syndrom der Maus zu beleuchten. Hierzu wurden Plg- und p-KLK-defiziente Mäuse herangezogen. Primär war dabei von Interesse die Rollen der Proteasen bezüglich der Pathophysiologie der Ödementstehung zu untersuchen. Als weiteres Ziel sollte die Rolle von Plg im Rahmen der glomerulären Schädigung betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In den folgenden Tabellen werden die verwendeten Geräte, Kits, Reagenzien und Materialien, die in dieser Arbeit genutzt wurden, aufgelistet.

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
ABIMED VX 100	Labnet
ALT 100-4M Analysenwaage	KERN & Sohn GmbH
Biofuge 13	Haraeus Instruments
BioMate3 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Centrifuge & Vortex CM-70M	neoLab Migge
ChemiDoc Touch Imaging System	Bio-Rad
Dräger Vapor® 2000 – Isoflurane	Dräger Medical GmbH
DUAL-TIMER C5080	TFA
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham pharmacia biotech
Elx800 Absorptionsreader	BioTek
Eppendorf Research® plus (0,1 µl - 2,5 µl) Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (0,5 µl - 10 µl) Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (10 µl - 100 µl) Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (100 µl - 1000 µl) Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (2 µl - 20 µl) Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (20 µl - 200 µl) Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® pro (20 - 300) Multipipette	Eppendorf AG
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Flammenphotometer EFUX 5057	Eppendorf AG
FORMA 900 SERIES	Thermo Scientific
HIBRIDIZATION OVEN/SHAKER	Amersham LIFE SCIENCCE
Mini Tans-Blot Cell	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad
Neo Accupette 3-9905	neoLab Migge
POLYMAX 2040	Heidolph
PowerPac Basic PowerSupply	Bio-Rad
Precision SP-2400	SEIKO
SHAKER DOS-20S	neoLab
SPECTRAFluor Absorptionsreader	Tecan
Thermocycler Biometra®	Biometra
TS-100 Thermo Shaker	GKISKER
Vortex VF2	IKA-Labortechnik
VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries

Material und Methoden

Tabelle 2: Kits und Materialien für Messungen

Kit/Material	Hersteller
Amersham ECL Plex Markers, RPN 850 E	GE Healthcare
Antiplasmin	Loxo
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad
GoTaq G2 Hot Start Polymerase	PROMEGA
GoTaq Green Master Mix, 2X	PROMEGA
LT-SYS® Creatinin, mod. nach Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Harnstoff, UV, kinetisch	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
Marker Gelelektrophorese: peqGOLD 50bp DNA-Leiter	peqlab
Mouse Plasminogen Total Antigen ELISA Kit	Loxo Molecular Innovations
Nitrocellulose Blotting Membrane Amersham Protran 0,2 µM	GE Healthcare
PKSI-527	Santa Cruz Biotechnology
ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System Kit	PROMEGA
S-2302, 25 mg	Haemochrom

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Ampuwa	Fresenius
BD Micro-Fine Insulinspritzen	Seidel Medipool
BRANDplates Strip Plate 12xF8	Brand
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner bio-one
Doxorubicin Doxo-Cell 150 mg	Heyl Chem.-pharm.
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich
Ep Dualfilter T.I.P.S. steril 0,1-1000,l	Eppendorf
Ep T.I.P.S. Standard 50-1000 µl	Eppendorf
Eppendorf Combitips plus 2,5 ml	Eppendorf
Isofluran CP 1ml/ml	Cp-pharam Burgdorf
Isotonische Kochsalzlösung 100 ml	Fresenius
Lithium Stammlösung 500 mmol/l	biorapid
minicaps Kapillarpipetten Na-Hep 10 µl	Hirschmann
Mouse Plasminogen Purified	Molecular Innovations
Reaction tubes 1,5 ml	Greiner bio-one
Reaction tubes 2 ml	Sarstedt
Serum Standard	biorapid
Sterilium classic pure 500 ml	BODE Chemie GmbH
System Leerwertlösung	Biorapid GmbH
Urin Standard	Biorapid
UV-Küvetten 70 µl mikro, Zentrumshöhe 8,5 mm, Schichtdicke 1 cm	Brand

Tabelle 4: Primer für die Genotypisierung

Primer	5' → 3'
KO3	CGC TGC TTA GGA TGG TAG GAG
KO4	GCT AGA CTA GTC TAG CTA GAG CGG
Neo2	gca cag ctg cgc aag gaa cgc c
Neo5	aag atg gat tgc acg cag gtt ctc
Plg1	tca gca ggg caa tgt cac gg
Plg2	ctc tct gtc tgc ctt cca tgg
WT1	CTT CCA GGT AGC TGC TTT CTA CC
WT2	TCA CCC ACA ACC TTC ACA GAA AGG

Tabelle 5: Materialien zur Tierhaltung

Material zur Tierhaltung	Hersteller
Käfige Typ II (L)	Ehret GmbH
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
LIGNOCEL® Einstreu	JRS
Rotes Käfighaus	Ehret GmbH
Ssniff 9988 Standarddiät	ssniff Spezialdiäten GmbH
Zellstoff	

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell und Tierhaltung

Plg- und p-KLK-defiziente Mäuse auf dem C57BL/6-Hintergrund wurden aus den USA von den kooperierenden Wissenschaftlern Prof. Plow und Prof. Leener importiert. Sie wurden dann über mindestens sechs Generationen auf den Hintergrund 129S1/SvImJ zurückgekreuzt, um die Doxorubicin-induzierte Nephropathie auslösen zu können.

Die 129 S1/SvImJ-Mäuse wurden von Jackson Laboratories (USA) bezogen. Die Haltung erfolgte in Käfigen bei festem Tag-Nacht-Rhythmus über jeweils zwölf Stunden und einer Temperatur von 22 bis 24 °C. Trinkwasser und Nahrung (ssniff) standen den Tieren jederzeit frei zur Verfügung.

Die Plg-Knockout-Mäuse (*Plg^{-/-}*) zeigen multiple Auffälligkeiten und Einschränkungen im Vergleich zu den Wildtypen (*Plg^{+/+}*) und auch den heterozygoten Geschwistertieren (*Plg^{+/-}*). So imponieren eine verzögerte Wundheilung, häufigere Rektalprolapse und eine schwere Thromboseneigung. Auch bezüglich der Konstitution fallen ein signifikant schlechteres Gedeihen sowie eine erhöhte Mortalität auf [92, 93]. Trotz eingeschränkter Laktation sind die Mäuse reproduktionsfähig [94]. Die p-KLK-Knockout-Mäuse (*klkb1^{-/-}*) zeigen hingegen keine konstitutionellen Auffälligkeiten gegenüber den Wildtypen (*klkb1^{+/+}*). Sie sind zudem fertil und verhalten sich wie Wildtyp-Mäuse [95].

Die Arbeiten an den Mäusen waren vom Regierungspräsidium unter den Versuchsnummern M8/15 sowie M11/19G für die Plg-defizienten Mäuse und M11/15 für p-KLK-defizienten Mäuse genehmigt worden. Für die Durchführung der Experimente an den Mäusen lag eine Ausnahmegenehmigung für meine Person vor.

2.2.2 Studiendesign

Im Folgenden sind die unterschiedlichen Versuchsabläufe der Plg- und p-KLK-defizienten Mäuse ausgeführt. Die in vorherigen Untersuchungen beobachtete Schwelle, um von einer nephrotischen Proteinurie auszugehen, lag bei 120 mg/mg Kreatinin (Krea), welche an mindestens zwei Tagen innerhalb der ersten zehn Tage *post injectionem* überschritten worden sein musste [96]. Zur Objektivierung des Ödemstatus diente das erhobene Gewicht. Zur Erkennung einer übermäßigen Belastung wurden die Tiere mittels festgelegtem Scoring-System beurteilt und bei Vorliegen bestimmter Kriterien oder Überschreiten eines Punktwerts wurde das Experiment abgebrochen und die entsprechenden Tiere euthanasiert. Die Tötung der Mäuse wurde per zervikaler Dislokation unter Isofluran-Narkose vorgenommen.

2.2.2.1 Plasma-Kallikrein-defiziente Mäuse

Es erfolgte eine retrobulbäre Injektion von Doxorubicin unter Isofluran-Narkose an Tag 0 (Männchen: 7,25 µg/g Körpergewicht (KG); Weibchen: 6,8 µg/g KG), um ein nephrotisches Syndrom bei den p-KLK-defizienten Mäusen zu induzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die retrobulbäre Injektion des Doxorubicins der Schwanzveneninjektion zur Induktion des nephrotischen Syndroms überlegen ist [97]. Die Mäuse wurden anschließend zehn Tage lang beobachtet und dabei täglich deren Gewicht, Fress- und Trinkmenge erhoben sowie deren Urin am Morgen zwischen 8:00 und 9:00 Uhr per transabdomineller Blasenmassage gewonnen. Im Urin wurden die Parameter Proteinurie, die Krea- und Na⁺-Konzentration sowie die Aktivität der Proteasen Plg und p-KLK bestimmt. Zudem erfolgten Western Blots auf Plg und p-KLK aus Urin- und Plasma-Proben. Der Ablauf ist in Abbildung 6 nochmals bildlich dargestellt.

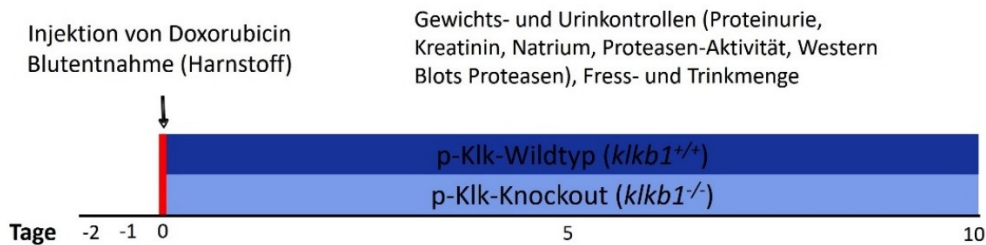


Abbildung 6: Ablauf der Studie zu p-KLK-defizienten Mäusen

2.2.2.2 Plasminogen-defiziente Mäuse

Die Untersuchung der Plg-defizienten Mäuse beinhaltete vier unterschiedliche Herangehensweisen. Die akute Phase, die Langzeitbeobachtung, mögliche Einflussfaktoren zur Erhöhung der Proteinurie sowie ergänzende histologische Untersuchungen. Zunächst wurde die akute Phase nach Injektion von Doxorubicin bezüglich Entstehung und Verlauf eines nephrotischen Syndroms beobachtet. Daran schloss sich die Untersuchung der Auswirkungen auf den Langzeitverlauf bezüglich der Überlebensrate, Nierenfunktion und -histologie, an. Um mögliche Einflussfaktoren auf die erhobenen Parameter zu untersuchen, wurde *Plg*^{-/-}-Mäusen außerdem murines Plg substituiert und die glomerulären Auswirkungen betrachtet. Zudem erfolgte eine nähere histologische Betrachtung entnommener Nieren vor Einsetzen der Proteinurie beziehungsweise zeitnah nach Injektion von Doxorubicin.

2.2.2.2.1 Klinischer Verlauf: Akutphase und Langzeitbeobachtung

In Abbildung 7 ist der Studienverlauf zu den *Plg*-Mäusen bezüglich der Akutphase und der Langzeitphase dargestellt. Der Ablauf entsprach grundsätzlich dem der *p-KLK*-Tiere. Nach Injektion des Doxorubicins erfolgte die Erfassung der Parameter des nephrotischen Syndroms. Die zentralen Unterschiede waren, dass bei den *Plg*-Tieren keine Proteasen-Aktivitätsmessungen erfolgten, dafür aber quantitative Messungen des *Plg*s beziehungsweise des Plasmins. Initial wurde dafür die Menge des *Plg*s im Blut und Urin bestimmt und im weiteren Verlauf die Plasmin(-ogen)urie.

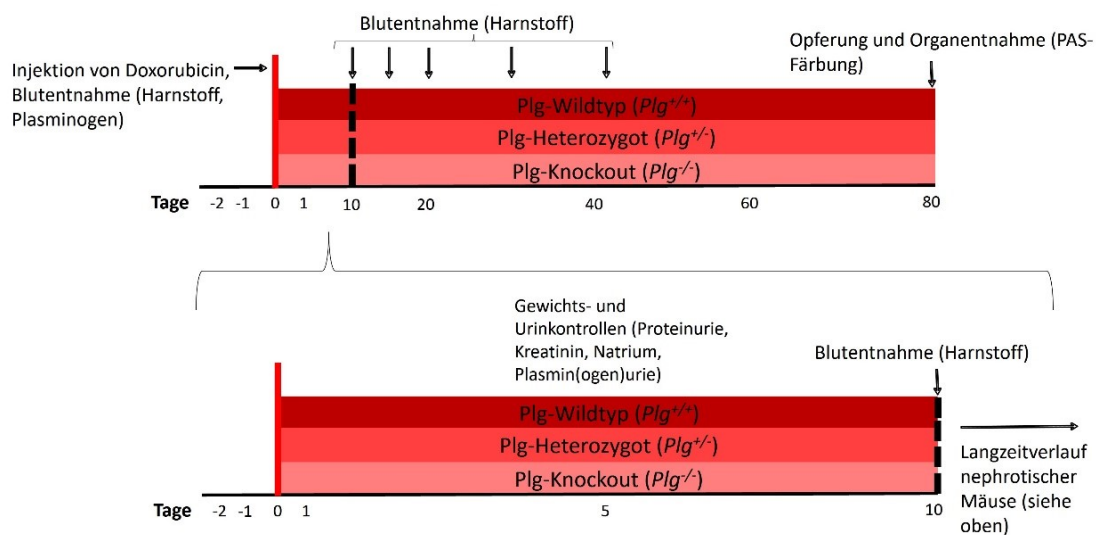


Abbildung 7: Ablauf der Studie zu *Plg*-defizienten Mäusen

Nach zehn Tagen schloss sich der akuten Beobachtung die Langzeitbeobachtung an. Eingeschlossen waren alle *Plg*^{+/+}- und *Plg*^{+/-}-Mäuse mit nephrotischer Proteinurie. Außerdem wurden alle *Plg*^{-/-}-Tiere im Langzeitverlauf beobachtet, die mindestens eine Proteinurie von 10 mg/mg Krea innerhalb der ersten zehn Tagen nach Injektion von Doxorubicin entwickelt hatten. Betrachtet wurden dabei das Gesamtüberleben und die Nierenfunktion anhand der Plasma-Harnstoff-Konzentration, wozu an den Tagen 10, 15, 20, 30 und 40 Blutentnahmen erfolgten. Als Kontrollwert diente die am Kontrolltag bestimmte Harnstoff-Konzentration. Die Tiere wurden dabei entweder aufgrund zu großer

Einschränkungen (insbesondere Allgemeinzustand, Gewichtsverlust, Verhalten) aus dem Versuch genommen und euthanasiert oder verstarben spontan. An Tag 80 wurden die übrigen Tiere getötet und deren Nieren entnommen, um anschließend per Periodic-Acid-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) histologisch beurteilt werden zu können.

2.2.2.2 Histologische Untersuchungen

Zur genaueren Untersuchung der glomerulären Abläufe im Rahmen der Doxorubicin-induzierten Nephropathie erfolgten immunhistochemische Färbungen und Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz aus entnommenen Nieren. Im Fokus lag dabei der Nachweis von Plg und Histon H2B. Die immunhistochemischen Schnitte wurden jeweils vor Injektion sowie an diversen Zeitpunkten nach Injektion angefertigt. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenz bei Nieren von Mäusen, denen acht Stunden zuvor Doxorubicin verabreicht worden war.

2.2.2.3 Einfluss auf die Proteinurie

Um sowohl die Rolle von Plg bei der Entstehung einer Proteinurie beziehungsweise der Schädigung der glomerulären Strukturen als auch mögliche Auswirkungen auf die Ödementstehung beim nephrotischen Syndrom untersuchen zu können, wurde durch einen zusätzlichen Versuchsaufbau versucht, die Induzierbarkeit einer Proteinurie der *Plg*^{-/-}-Mäuse zu beeinflussen. Es erfolgte dazu die Substitution murinen Plgs, um zu untersuchen, ob ein kurzfristiges Aufheben der Plg-Defizienz zu histologischen Auffälligkeiten führen und damit die induzierte Proteinurie beeinflusst werden könnte. Die Mäuse erhielten dabei an den ersten fünf Tagen 250 µg murines Plg per intravenöser Injektion. Zum Nachweis einer möglichen glomerulären Plg-Bindung wurden immunhistochemische Färbungen acht Stunden nach Injektion des Doxorubicins angefertigt.

2.2.3 Probengewinnung

Das Gewebe zur Genotypisierung wurde bei der Markierung der Mäuse durch Ohrlochung gewonnen. Die Ohrstanzen wurden direkt in ein Eppendorfgefäß übertragen und konnten anschließend im Rahmen der Genotypisierung analysiert werden. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

Um den Urin zu gewinnen, wurde eine transabdominelle Blasenmassage bei gleichzeitiger Fixierung der Mäuse vorgenommen und die Miktion auf diese Weise angeregt. Der gewonnene Urin wurde bei -20 °C gelagert.

Um Werte im Blutplasma zu bestimmen, wurde durch das Einführen einer 10 µl-Kapillare in den Retrobulbärraum Blut gewonnen. Anschließend wurde das Blut mit Lithium-Heparin gemischt und nach einer Zentrifugation das Blutplasma abpipettiert. Die Lagerung geschah bei -20 °C.

Zur histologischen Untersuchung erfolgten zudem Nierenentnahmen. Die Mäuse wurden dazu unter Isofluran-Narkose geopfert. Anschließend wurden die Nieren transabdominell freipräpariert, explantiert und sofort bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung gliedert sich in die drei Abschnitte Aufbereitung der genomischen DNA (gDNA), Polymerasekettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese. Die PCR stellt dabei den einzigen Schritt dar, in dem sich die Genotypisierung der Plg-defizienten von der der p-KLK-defizienten Mäuse unterscheiden hat [98].

2.2.4.1 Aufbereitung der genomischen DNA

Zur Genotypisierung musste zunächst die gDNA aus dem Ausgangsgewebe gewonnen werden. Durch verschiedene Lösungen wurden dabei zunächst die Zellstrukturen lysiert, um die DNA aus den Zellen zu extrahieren. Anschließend wurde dieses Lysat gewaschen und die gDNA daraus getrennt [98-100].

Die Präparation und Isolation der gDNA erfolgte mit dem ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System Kit der Firma Promega.

Durchführung:

1. Dem Gewebe (Ohrstanzen) 50 μ l Tail Lysis Buffer und 15 μ l Proteinase K zugeben und für zehn Sekunden durch Vortexen mischen.
2. Ansätze für zwei bis drei Stunden bei 56 °C und 1000 rpm in einem Thermo Shaker inkubieren.
3. Vorbereitung der Aufreinigung: Dem Lysat 200 μ l Binding Buffer hinzugeben und für zehn Sekunden durch Vortexen mischen.
4. Proben auf eine Säule übertragen und bei 13793g für eine Minute zentrifugieren, Durchfluss verwerfen.
5. Säulen mit jeweils 400 μ l Column Wash Solution beladen und bei 13793g zwei Minuten lang zentrifugieren, Schritt zwei Mal wiederholen.
6. Lösung gDNA aus Membran: Säule mit 150 μ l nuklease-freiem Wasser beladen und mit 13793g eine Minute lang zentrifugieren.

2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation der gewonnenen gDNA wurde eine PCR durchgeführt. Dabei wird die gDNA mit verschiedenen Komponenten, wie den zugehörigen Primern, der DNA-Polymerase und Nukleosidtriphosphaten, gemischt. Anschließend wird durch die Erhitzung der DNA deren Denaturierung erreicht, sodass sich die Doppelstrangstruktur auflöst und sich Primer sowie die Nukleosidtriphosphate an den jeweiligen Einzelsträngen anlagern können, nachdem die Temperatur wieder erniedrigt wurde. Durch die enzymatische Wirkung der DNA-Polymerase werden diese Bestandteile verbunden und neue DNA-Doppelstränge sind entstanden. Damit die DNA-Polymerase ihre Wirkung entfalten kann muss sich auch dafür die Temperatur in einem bestimmten Bereich befinden. Durch die zyklische Wiederholung dieser Vorgänge beziehungsweise Temperaturanpassungen wird der gewünschte DNA-Abschnitt, der nachgewiesen werden soll, exponentiell vermehrt [101].

Durchführung PCR für Plg:

1. Mastermix nach Tabelle 6 herstellen, indem die angegebenen Volumina mit der Anzahl der benötigten Ansätze, inklusive Kontrollen und Leerprobe, multipliziert werden.
2. Mastermix zu je 10,5 µl in Eppendorfgefäße (0,5 ml) aufteilen.
3. 2 µl der jeweils zu genotypisierenden gDNA hinzupipettieren.
4. Für die PCR-Reaktion Ansätze in einem Thermocycler platzieren.
5. Protokoll des Thermocycler wie in Tabelle 7 einstellen und starten.
6. Amplifizierte DNA bei -20 °C eingefrieren oder direkt auf ein Agarose-Gel zur Gelelektrophorese aufgetragen.

Tabelle 6: Bestandteile Mastermix Plg

Bestandteil	Volumen [µl]
5X GoTaqGreen Flexi Buffer	2,5
MgCl ₂ [25 mM]	1,25
dNTP [2,5 mM]	1,00
Primer Plg1 [10 µM]	1,25
Primer Plg2 [10 µM]	1,25
Primer Neo2 [10 µM]	1,25
Primer Neo5 [10 µM]	1,25
GoTaq G2 Hot Start Polymerase [5U/µl]	0,2
Nuclease-freies Wasser	0,55

Tabelle 7: PCR-Protokoll Plg

	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
	Initiale Denaturierung	94	5 Minuten
30 Zyklen	Denaturierung	94	30 Sekunden
	Annealing	60	1 Minute
	Elongation	72	1 Minute
	Auffüllreaktion	72	10 Minuten
	Kühlen	4	72 Stunden

Durchführung PCR für p-KLK:

1. Mastermix nach Tabelle 8 herstellen, indem die angegebenen Volumina mit der Anzahl der benötigten Ansätze, inklusive Kontrollen und Leerprobe, multipliziert werden.
2. Mastermix zu je 11,5 µl in Eppendorfgefäße (0,5 ml) aufteilen.
3. 1 µl der jeweils zu genotypisierenden gDNA hinzupipettieren.
4. Für die PCR-Reaktion Ansätze in einem Thermocycler platzieren.
5. Protokoll des Thermocycler wie in Tabelle 9 einstellen und starten.
6. Amplifizierte DNA bei -20 °C eingefrieren oder direkt auf ein Agarose-Gel zur Gelelektrophorese aufgetragen.

Tabelle 8: Bestandteile Mastermix p-KLK

Bestandteil	Volumen [µl]
2X GoTaqGreen Master Mix (inkl. 2,0mM MgCl ₂ , 200µM dNTP)	6,25
Primer WT1 [10µM]	1,25
Primer WT2 [10µM]	1,25
Primer KO3 [10µM]	1,25
Primer KO4 [10µM]	1,25
Nuklease-freies Wasser	0,25

Tabelle 9: PCR-Protokoll p-KLK

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	
Initiale Denaturierung	94	4 Minuten	
30 Zyklen	Denaturierung	94	15 Sekunden
	Annealing	60	30 Sekunden
	Elongation	72	40 Sekunden
	Auffüllreaktion	72	10 Minuten
Kühlen	4	72 Stunden	

2.2.4.3 Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte aufzutrennen, folgte eine Gelelektrophorese. Die Moleküle wandern durch Anlegen einer elektrischen Spannung durch das Gel. Dabei bestimmen die Porengröße des Gels und die Molekülladung wie weit die Moleküle wandern. Durch eine Färbelösung können die Moleküle sichtbar gemacht werden und so unter UV-Licht als Banden abgelesen werden [98].

Herstellung des Gels:

1. 1,75 g Standardagarose in 100 ml Standardpuffer (1x TRIS-Acetat-EDTA) lösen, für fünf Minuten durch Rühren mischen.
2. Lösung wiegen und erhitzen, Gewichtsdefizit des verdampften Wassers durch erwärmtes, destilliertes Wasser wieder ausgleichen.
3. Lösung nach ungefähr zehnmütigem Abkühlen in eine Kammer gießen und für ungefähr 30 Minuten bei Raumtemperatur aushärten lassen.
4. Auffüllen der Kammer mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer über Gelniveau.

Durchführung:

1. Proben aus der PCR, inklusive Kontrollen und Leerprobe, zu je 6 µl in die Kammern des Gels pipettieren.
2. Marker aus 4µl ddH₂O, 1µl 6x Ladepuffer und 1µl (0,5µg) DNA-Leiter herstellen.
3. Zur Kennzeichnung der verschiedenen Bandenlängen eine Kammer mit 6 µl Marker beladen.
4. Auftrennung durch eine ungefähr einstündige Elektrophorese bei 120 V.
5. Gel danach oberhalb der Laufbanden abschneiden und ungefähr 20-30 Minuten in einer Färbelösung (15 µl GelRed 10 000x Stock Solution + 50 ml destilliertes Wasser) unter Schütteln inkubieren.
6. Auswertung des Gels unter UV-Licht.

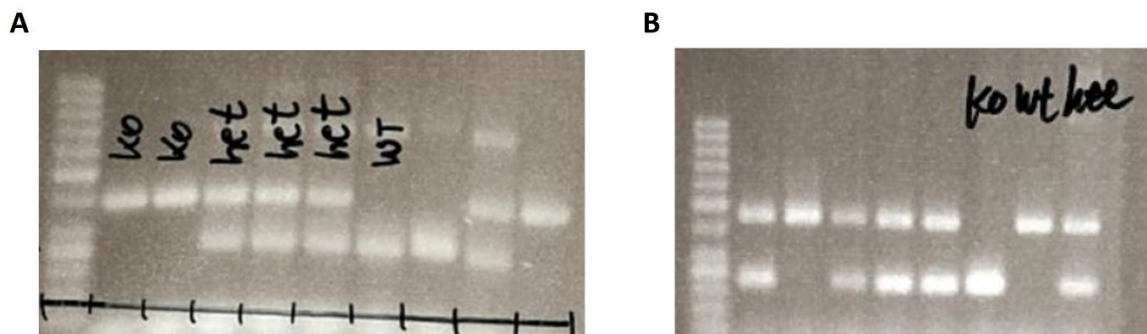


Abbildung 8: Repräsentative Bilder der Gelelektrophorese für p-KLK und Plg

A: Gelelektrophorese für p-KLK, wt (*klkb1^{+/+}*), het: (*klkb1^{+/-}*), ko: (*klkb1^{-/-}*)

B: Gelelektrophorese für Plg: wt (*Plg^{+/+}*), het: (*Plg^{+/-}*), ko: (*Plg^{-/-}*)

Bei *klkb1^{+/-}*-Tieren erhielt man eine Bande bei 245 bp und bei *klkb1^{-/-}*-Tieren eine Bande bei 391 bp, Proben heterozygoter Mäuse zeigten dementsprechend zwei Banden (245 bp und 391 bp). Die heterozygoten Tiere wurden allerdings in dieser Arbeit nicht genutzt.

Plg^{+/-}-Mäuse zeigten je eine Bande bei 450 bp und 230 bp. Das Wildtyp-Allel lag dabei bei 450 bp und das Allel der Knockout-Mäuse bei 230 bp.

2.2.5 Messungen

Im Folgenden werden die Messungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bezüglich ihres theoretischen Hintergrundes und der praktischen Durchführung aufgeführt.

2.2.5.1 Proteinurie nach Bradford

Die Proteinurie wurde photometrisch nach Bradford bestimmt. Dabei reagiert Coomassie-Brilliant-Blau bei saurem pH mit Proteinen. Dadurch schlägt die Farbe der Lösung von braun zu blau um. Die daraus folgende Extinktionsänderung dient anschließend zur Bestimmung der Proteinmenge [102].

Durchführung:

1. Herstellen der Bradford-Lösung durch Verdünnen des Protein Assay (Dye Reagent Concentrate 450 ml) mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5.
2. Befüllen der Küvetten mit 2 μ l des zu untersuchenden Urins beziehungsweise einer Leerprobe (Ampuwa).
3. 1 ml Bradford-Lösung in jede Küvette pipettieren, Inkubation für zehn Minuten.
4. Messung der Absorption nach 10 bis 30 Minuten bei 595 nm. Direkte Angabe der Proteinkonzentration durch das Photometer.
5. Bei Konzentrationen über 10 mg/ml erfolgte eine Verdünnung des Urins im Verhältnis 1:20 mit Ampuwa und eine Wiederholung der Messung. Anschließend wurde die angegebene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

6. Die Proteinkonzentration wurde abschließend durch die Krea-Konzentration geteilt.

2.2.5.2 Kreatinin aus dem Urin

Bei alkalischem pH kann Pikrinsäure an Kreatinin binden und bildet damit einen dunkelgelben Komplex. Die Intensität dieses Komplexes kann photometrisch bestimmt werden und lässt so einen Rückschluss auf die vorhandene Menge an gebundenem Kreatinin zu [103].

Durchführung:

1. Messlösung aus 625 μ l Pikrinsäure 8,7 mM, 2,5 ml NaOH (400 mM) und 1875 μ l Ampuwa herstellen.
2. Verdünnung des zu messenden Urins im Verhältnis 1:20 mit Ampuwa.
3. Küvetten mit jeweils 10 μ l des verdünnten Urins befüllen, sowie je zwei Küvetten mit Ampuwa (Leerwert) beziehungsweise Standardlösung (Krea 2 mg/dl).
4. Küvetten mit 200 μ l der Messlösung befüllen und Ausgangsextinktion nach zehn Sekunden (t_0) bei 492 nm im Photometer messen.
5. Acht Minuten (t_8) nach Ausgangsmessung Extinktion nochmal messen.

Die Urin-Kreatinin-Konzentration wird anschließend anhand folgender Formel ermittelt:

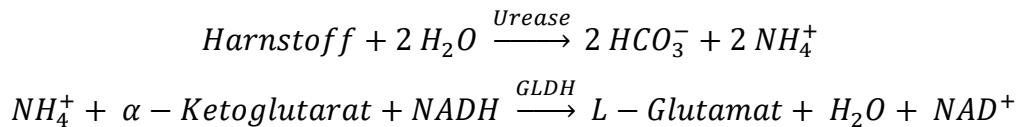
$$c_{Krea} \left[\frac{mg}{dl} \right] = \frac{\Delta E_{Probe} - \Delta E_{Leerwert}}{\Delta E_{Standard} - \Delta E_{Leerwert}} \times c_{Standard} \times DF$$

Mit ΔE = Differenz der Extinktion zum Zeitpunkt t_8 und t_0 ,

DF = Verdünnungsverhältnis

2.2.5.3 Harnstoff aus dem Plasma

Die Bestimmung des Harnstoffs aus dem Plasma erfolgte photometrisch auf Grundlage der Extinktionsabschwächung durch NAD^+ . Dessen Konzentration steigt bei erhöhter Harnstoff-Konzentration durch eine Reaktionskette, die mithilfe der Enzyme Urease und Glutamatdehydrogenase (GLDH) wie folgend abläuft [104]:



Durchführung:

1. Herstellen der Messlösung durch Lösung der Enzyme (Lyophilisierte Urease und GLDH) in 16 ml Puffer (TRIS-HCl-Puffer (pH 7,8) 100 mM, Ketoglutarat 6 mM, NADH 0,2 mM, ADP 2 mM, EDTA 4 mM, Stabilisatoren).
2. Küvetten mit jeweils 3 μl Plasma befüllen, sowie je zwei Küvetten mit Ampuwa (Leerwert) und Standardlösung (Harnstoff-Konzentration 40 mg/dl).
3. Küvetten mit 300 μl Messlösung befüllen und Ausgangsextinktion nach zehn Sekunden (t_0) bei 340 nm im Photometer messen.
4. Acht Minuten (t_8) nach Ausgangsmessung Extinktion nochmal messen.
5. Der Messbereich liegt bei 2 mg/dl bis 300 mg/dl. Bei Werten über 300 mg/dl erfolgte eine Verdünnung des Plasmas mit Ampuwa im Verhältnis 1:10 und eine Wiederholung der Messung. Anschließend wurde die angegebene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Ermittlung des Plasma-Harnstoff-Gehalts anhand folgender Formel:

$$c_{\text{Harnstoff}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}}{\Delta E_{\text{Standard}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}} \times c_{\text{Standard}} \times DF$$

Mit ΔE = Differenz der Extinktion zum Zeitpunkt t_8 und t_0 ,

DF = Verdünnungsverhältnis

2.2.5.4 Elektrolyte aus dem Urin

Zur Messung der Elektrolyte Na^+ , K^+ und Calcium (Ca^{2+}) aus dem Urin wurde ein Flammenphotometer genutzt. Dabei wird die Probe mithilfe von Druckluft zerstäubt und anschließend verbrannt. Die Farbe und Farbintensität der Flamme wird mit der Referenzflamme der Lithium-Verbrennung verglichen, sodass die jeweilige Ionen-Konzentration angegeben werden kann [105, 106].

Durchführung:

1. Urinproben durch Vortexen für zwei Sekunden mischen.
2. Proben in Haltevorrichtung des Flammenphotometers platzieren.
3. Einstellung des Photometers: Messung von „Urin“ und Probenanzahl.
4. Proben oberhalb der Grenzwerte wurden im Verhältnis 1:20 verdünnt und nochmals gemessen.
5. Abschließend Quotient aus Elektrolytkonzentration zu Krea-Konzentration.

Die Messbereiche lagen bei Konzentrationen von Na^+ : 10-300 mmol/l, K^+ : 5-200 mmol/l und Ca^{2+} : 0,5-20 mmol/l.

2.2.5.5 Plasminogen-Konzentration aus Plasma und Urin mittels ELISA

Zur Bestimmung der Plg-Konzentration im Urin und im Plasma wurde ein nicht-kompetitiver Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt. Ein ELISA ist dadurch gekennzeichnet, dass Antikörper, in diesem Fall Anti-Maus-Plg-Antikörper, auf einer Mikrotiterplatte fixiert sind, an die das Antigen (Plg) bindet. Anschließend wird bei einem nicht-kompetitiven ELISA ein weiterer Antikörper (Sekundär-Antikörper) hinzugegeben, der an den Komplex aus Antigen und fixiertem Antikörper bindet. An diesen Sekundär-Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches das Substrat Tetramethylbezidine (TMB) umsetzt und so einen Farbumschlag hervorruft. Dieser Farbumschlag ist proportional zur Menge des gebundenen Antigens. Ein kompetitiver ELISA hingegen funktioniert über die Konkurrenz des zu untersuchenden Analyts mit einem Enzym-konjugierten Stoff, der ebenfalls an die fixierten Antikörper binden kann. Je höher die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes zum konkurrierenden Stoff ist, desto geringer fällt somit die enzymatisch katalysierte Reaktion beziehungsweise die Extinktionsänderung aus [107].

Mit dem nicht-kompetitiven ELISA der Firma Loxo Molecular Innovations konnten sowohl Plg als auch Plasmin und Plasmin-Antiplasmin-Komplexe nachgewiesen werden. Für die Primärantikörper wurden Anti-Maus-Plg-Antikörper des Kaninchens und für die Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-Antikörper mit Meerrettichperoxidase-Konjugation verwendet.

Vorbereitung:

1. Herstellung Blockpuffer: Mischen der Trisgepufferten Saline (TBS) (0,1 M TRIS, 0,15 M NaCl, pH 7,4) mit 3% Bovines Serumalbumin (BSA).
2. Herstellung Standardreihe: Maus-Plg in 1 ml Blockpuffer lösen. Verdünnen dieser Ausgangslösung (Plg-Konzentration von 500 ng/ml) mit Blockpuffer für die gewünschten Konzentrationen der Standardreihe.
3. Herstellung Waschpuffer: Verdünnen des 10 x Waschpuffers mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10.
4. Herstellung Primärantikörper: Antikörper in 10 ml Blockpuffer lösen.
5. Herstellung Sekundärantikörper: 2 µl des Antikörpers mit 10 ml Blockpuffer mischen.
6. Präparation Urin: Mischen mit Blockpuffer im Verhältnis 1:50 für die Kontrollprobe und im Verhältnis 1:1000 bis 1:100000 im Urin, je nach angenommener beziehungsweise gemessener Plg-Konzentration. Bei Messwerten außerhalb des Referenzbereichs (0,49 ng/ml bis 500 ng/ml) erfolgte eine Anpassung der Verdünnung und eine erneute Messung.
7. Präparation Plasma: Mischen mit Blockpuffer im Verhältnis 1:50000.

Durchführung:

1. Wells mit jeweils 100 µl aller Standards, Kontrollen, Ampuwa (Leerwert) und Proben (Urin oder Plasma) befüllen.
2. Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur durch Schütteln bei 300 rpm.
3. Waschen der Wells durch 300 µl Waschpuffer, zweimalige Wiederholung.
4. Wells mit jeweils 100 µl des Primärantikörpers befüllen.
5. Wiederholung Schritt 2 und Schritt 3.
6. Wells mit jeweils 100 µl Sekundärantikörper befüllen.
7. Wiederholung Schritt 2 und Schritt 3.
8. Wells mit jeweils 100 µl TMB-Substrat befüllen.
9. Schütteln der Platte für ungefähr eine Minute. Sobald die Proben eine blaue Färbung annehmen, entsprechend der der Standardproben, Wells mit jeweils 50 µl Stop-Lösung (1 M HCl) befüllen. Anschließend Farbumschlag von Blau zu Gelb.

10. Messung der Extinktion bei 405 nm. Ermittlung der Plasmin(ogen)-Konzentration auf Basis der Standardreihe (Abbildung 9).
11. Der Messbereich liegt bei maximal 500 ng/ml, sodass bei Werten über dieser Grenze eine Verdünnung der Probe und eine erneute Messung erfolgte.
12. Abschließend Quotient aus Plg-Konzentration und Krea-Konzentration für die Urin-Proben. Die Plg-Konzentration im Blut wurde nicht normiert.

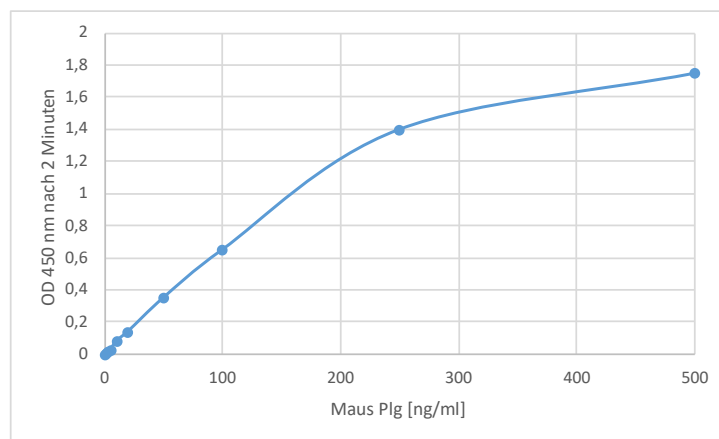


Abbildung 9: Beispielhafte Standardkurve des Plg-ELISAs

2.2.5.6 Proteasen-Aktivität im Urin

Zur Messung der Protease-Aktivität im Urin wurde den Urinproben das Peptid-Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA x 2 HCl) von Haemochrom zugegeben, welches sowohl von Plasmin als auch von p-KLK enzymatisch umgewandelt werden kann. Durch Gabe der Inhibitoren Antiplasmin für Plg und PKSI-527 für Kallikrein kann schrittweise die Aktivität der jeweiligen Protease inhibiert werden. Die Differenz der photometrisch gemessenen Urinaktivität nach Hinzugabe der Inhibitoren spiegelt dabei den jeweiligen Einfluss der Protease auf die Gesamtaktivität wider [108]. Um einen möglichen Einfluss der Plasminaktivität auszuschließen und zu hemmen, musste vor Gabe des PKSI-527 zunächst Antiplasmin gegeben werden, um die p-KLK-Aktivität sichtbar zu machen.

Durchführung:

1. Zu PKSI-527 1 ml PBS dazugeben (Endkonzentration 15 µg/ml).
2. Zu Antiplasmin 200µl PBS hinzugeben (Endkonzentration 20 µg/ml).
3. 11 µl Ampuwa (Leerwert) in ein Well pipettieren.
4. Urinproben nach Schema in Tabelle 10 pipettieren.
5. 50 µl Substrat (Chromogenix S-2302 2 mM) in jedes Well hinzugeben. Inkubation für 60 Minuten.
6. Aktivität/Extinktion photometrisch bei 405 nm messen. Differenzen zwischen Gesamtaktivität und der Aktivität der Wells mit den jeweils inhibierten Proteasen ergeben die jeweilige Proteasen-Aktivität. Zusätzlich Abzug der Aktivität des Leerwerts. Abschließend Quotient des Messwertes zur Krea-Konzentration der Probe bilden.

Tabelle 10: Pipettierschema Plasmin- und p-KLK-Aktivität für jeweils eine Urinprobe

Pipettierabfolge	Bedeutung
5 µl Urin + 6 µl Ampuwa	Gesamtaktivität
5 µl Urin + 3 µl Ampuwa + 3 µl Antiplasmin	Plasminaktivität
5 µl Urin + 3 µl Antiplasmin + 3 µl PKSI-527	Kallikreinaktivität

2.2.5.7 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen [109]. Im ersten Schritt werden die Proteine der zu untersuchende Probe per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Blotting stellt den nächsten Schritt dar, bei dem die Proteine durch ein elektrisches Feld, das senkrecht zum Gel steht, auf eine Trägermembran übertragen werden. Anschließend werden die freien Bindungsstellen der Membran geblockt und die Membran zuerst mit Primär- und danach mit Sekundär-Antikörpern, die an die Primär-Antikörper binden, inkubiert. Die Sekundär-Antikörper waren in diesem Western Blot mit Meerrettichperoxidase konjugiert (ab6741, abcam). Durch diese Konjugation kann nach Zugabe eines Substrats per Chemolumineszenz auf einem ChemiDoc System ein Bild erstellt werden. Weitere Methoden zur Darstellung der

Proteinbanden sind beispielsweise infrarot- oder radioaktiv-markierte Sekundär-Antikörper.

Als Primär-Antikörper für p-KLK kam ein Ziegen-Anti-Maus-Antikörper zum Einsatz, der sowohl gespaltenes als auch ungespaltenes p-KLK erkennt (AF2498, R&D Systems). Der Primär-Antikörper für Plg reagierte mit der schweren Kette des Plgs und detektierte daher das Plg-Zymogen und die schwere Kette selbst (ab154560, abcam).

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese:

1. Gießen eines 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gels.
2. Proben in Taschen füllen: p-KLK: 20 µg Plasma bzw. 30 µg Urin pro Probe.
Plg: 30 µg Urin pro Probe.
3. Volumen Proteinmarker und leerer Taschen mit 1x-Laemmli-Puffer auf Volumen der Proben angleichen.
4. Beginn der Elektrophorese für 60 Minuten bei einer Spannung von 100 V.

Blotting:

1. Zuschneiden der Nitrocellulose-Transfermembran und Blottingpapier.
2. Schichtung auf schwarzer Transferplatte nach Tränkung in im Kühlschrank vorgekühltem 1x-Transferpuffer, in folgender Reihenfolge: Schwamm, Blottingpapier, Gel, Transfermembran (Nitrocellulose), Blottingpapier, Schwamm.
3. Füllung mit Transferpuffer.
4. Start Transfer bei 100 V bei Raumtemperatur und für 60 Minuten.
5. Gelrand und Leiterbanden markieren.

Blocking:

Membran in 5 % BSA für 60 Minuten inkubieren. Anschließend Abwaschen und Waschen in TBS-Tween für 5 Minuten.

Antikörper-Behandlung:

1. 10 ml der Primär-Antikörper-Lösung auf Membran geben. Inkubation über Nacht bei 4 °C bei leichtem Schwenken.
2. Waschen: Drei Mal für zehn Minuten unter kräftigem Schütteln mit TBS-Tween.
3. 10 ml der Sekundär-Antikörper-Lösung auf Membran geben.
4. Inkubation: 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken
5. Waschen: Drei Mal für zehn Minuten unter kräftigem Schütteln mit TBS-Tween.

ChemiDoc-Entwicklung:

1. Jede Membran mit 1-1,5 ml ECL-Substrat-Lösung komplett bedecken, Inkubation für fünf Minuten.
2. Aufnahme der ECL-bedeckten Membran.
3. Foto jeder Membran, um sichtbare Leitermarkierungen über späteres Bild legen zu können.
4. Auswertung und Export durch ImageLab Touch Software (Bio-Rad, Hercules, USA).

2.2.6 Histologie

Die gewonnenen Nieren wurden vom Pathologischen Institut Tübingen für die histologische Auswertung aufbereitet. Es wurden drei unterschiedliche Färbungen vorgenommen. Um die glomerulären Auswirkungen im Langzeitverlauf zu untersuchen erfolgte eine PAS-Färbung der Nieren, in der beispielweise mögliche Sklerosierungen dargestellt werden können. In der akuten Phase des nephrotischen Schadens, also innerhalb der ersten Stunden nach Injektion von Doxorubicin, wurden immunhistochemische Untersuchungen, inklusive Immunfluoreszenz, vorgenommen. Die Nieren wurden dafür in Formalin fixiert und in Paraffin eingelegt. Anschließend wurden diese Proben in 3-5 µm große Stücke geschnitten und gefärbt.

2.2.6.1 PAS-Färbung

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Doxorubicin-Gabe auf die Nierenbeziehungsweise Glomeruli-Architektur und -Morphologie erfolgte die histologische Aufbereitung. Die Tiere wurden dafür an Tag 80 geopfert, die Nieren wie beschrieben präpariert und anschließend per PAS-Reagenz gefärbt. Dabei werden Polysaccharide wie Glykogen, Glykolipide oder Glykoproteine angefärbt [110, 111].

2.2.6.2 Immunhistochemie

Es wurden Nieren vor Injektion von Doxorubicin sowie acht und 48 Stunden nach Injektion untersucht, um eine mögliche Plg-Anreicherung darzustellen. Für die Darstellung des Rezeptors Histon H2B erfolgten die Färbungen zusätzlich nach 24, 72 und 96 Stunden. Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Antikörper für Plg- beziehungsweise Histon H2B verwendet, die in Tabelle 11 aufgeführt sind. Die Verdünnungen lagen in diesem Fall allerdings bei 1:100 für den Plg-Antikörper und bei 1:50 für den Antikörper gegen Histon H2B. Die Färbung wurde durch einen Färbeautomat durchgeführt. Die Bilder wurden mit dem Mikroskop Axioskop 2 plus Zeiss mit Jenoptik ProgRes C10 plus erstellt. Die abschließende Bildbearbeitung geschah mit Adobe Photoshop CS6.

2.2.6.3 Immunfluoreszenz

Zur Immunfluoreszenz wurden die Proben zunächst entparaffiniert und für ungefähr zwei Minuten mit Citratpuffer unter Erhitzen in einem Dampfkochtopf demaskiert. Anschließend wurden die Proben abgekühlt und mit TBS beziehungsweise TBS/BSA/Tween gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte per Eselserum (1:20 mit TBS) geblockt und mit den in Tabelle 11 aufgeführten Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper sollten an Plg, Histon H2B, CD31 als Marker für das Endothel und an Podocin als Marker für die Podozyten binden. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den in Tabelle 12 aufgeführten Antikörpern zur Visualisierung der zuvor gebundenen Antikörper. Die Zellkerne wurden per 4',6-diamidino-2-Phenylindol (Verdünnung 1:10000 mit TBS/BSA/Tween, Sigma-Aldrich) gefärbt. Die Erstellung der Bilder geschah

mithilfe des Zeiss LSM 800 Immunfluoreszenz-Mikroskops und der Software ZEN 2.3.

Tabelle 11: Immunfluoreszenz Primärantikörper

Antikörper	Wirtstier	Hersteller - Seriennummer	Verdünnung (TBS/BSA/Tween)
Plasminogen	Hase (polyklonal)	Abcam - ab1544560	1:200
CD31	Ratte (monoklonal)	Dianova - DIA-310	1:25
Histon H2B	Maus (monoklonal)	E. F. P.	1:100
Podocin	Ziege (polyklonal)	Abcam - ab177242	1:50

Tabelle 12: Immunfluoreszenz Sekundärantikörper

Antikörper (1:2 vorverdünnt)	Verdünnung (TBS/BSA/Tween)
Cy3-donkey anti-rabbit serum (Dianova)	1:250
Alexa Fluor 647-donkey anti-rat serum (Dianova)	1:250
Alexa Fluor 488-donkey anti-mouse serum (Dianova)	1:250
Alexa Fluor 488-donkey anti-goat serum (Dianova)	1:250

2.2.7 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mithilfe von Microsoft Office Excel und GraphPad Prism 8 statistisch ausgewertet. Alle Daten wurden dabei zunächst mithilfe der folgenden Tests auf eine Normalverteilung geprüft: Kolmogorov-Smirnoff-Test, D'Agostino-Pearson-Test, Pearson-Omnibus-Test und den Shapiro-Wilk-Test. Sobald einer dieser Tests keine Normalverteilung anzeigte, wurden die Daten als nicht normalverteilt behandelt. Die Varianzanalyse für normalverteilte Daten wurde anschließend per one-way-ANOVA durchgeführt, für nicht-normalverteilte Daten per Kruskal-Wallis-Test. Bei Normalverteilung erfolgte die Signifikanzanalyse per Dunnett-Bonferroni-, Tuckey-Posttest- oder Student's-t-Test, bei fehlender Normalverteilung per Dunn-Posttest. Bei Kaplan-Maier-Kurven erfolgte ein Log rank (Mantel Cox) Test zur Signifikanzanalyse.

Die ermittelten Werte werden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Ab einem p-Wert $< 0,05$ wurde das jeweilige Ergebnis als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Plasma-Kallikrein-defiziente Mäuse

3.1.1 Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms

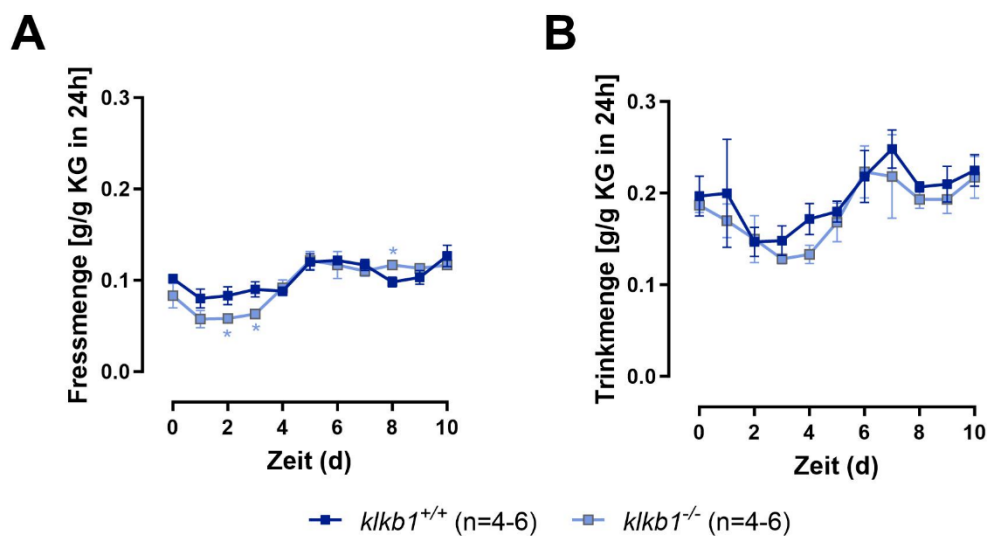


Abbildung 10: Fress- und Trinkmengen p-KLK-defizienter Mäuse, publiziert in [112]

Dargestellt sind folgende Parameter als Mittelwert \pm SEM: Fressmenge (A) und Trinkmenge (B) im Verlauf in der Einheit g/g KG in 24 Stunden.

*: $p < 0,05$ gegenüber *kllkb1*^{+/+}

Bezüglich der täglichen und auf das KG normierten Fress- und Trinkmengen, dargestellt in Abbildung 10, zeigten beide Gruppen einen zweiphasigen Verlauf. An den ersten Tagen nach Injektion von Doxorubicin sanken beide Parameter. Im Anschluss stiegen die Werte und lagen meist auf oder über dem Kontrollwert. Die Fressmenge der *kllkb1*^{+/+}-Mäuse fiel am ersten Tag nach der Doxorubicin-Injektion von $0,1 \pm 0,01$ g/g KG auf das Minimum von $0,08 \pm 0,01$ g/g KG ab, was einer Reduktion von 20 % entspricht. Ab Tag 5 fraßen die Tiere, abgesehen von Tag 8, mehr als am Kontrolltag, das Maximum lag an Tag 10 bei $0,13 \pm 0,01$ g/g KG. Dies entspricht einer Zunahme von ungefähr 30 % gegenüber dem Kontrolltag. Die *kllkb1*^{-/-}-Mäuse fraßen an den Tagen 2 und 3

signifikant weniger als *klkb1^{+/-}*-Tiere, den geringsten Wert verzeichneten sie aber wie auch die *klkb1^{+/+}*-Mäuse an Tag 1 bei $0,06 \pm 0,01$ g/g KG (Abnahme um 25 %). Auch deren Fressmenge nahm ab Tag 5 deutlich zu und befand sich stets über dem Kontrollwert. Das Maximum lag an Tag 5 bei $0,12 \pm 0,01$ g/g KG (50% Zunahme gegenüber dem Kontrollwert), während die *klkb1^{-/-}*-Tiere an Tag 8 signifikant mehr als die *klkb1^{+/+}*-Tiere fraßen.

Bezüglich der Trinkmenge ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Verlauf verhielt sich analog zur Fressmenge. Beide Gruppen tranken zunächst weniger als vor der Doxorubicin-Injektion. Die Minima lagen bei $0,15 \pm 0,02$ g/g KG (*klkb1^{+/+}*) beziehungsweise $0,13 \pm 0,01$ g/g KG (*klkb1^{-/-}*), was 75 % (*klkb1^{+/+}*) beziehungsweise 68 % (*klkb1^{-/-}*) des Ausgangswertes entspricht. Die erste Zunahme über den Ausgangswert erreichten beide an Tag 6, maximal tranken die *klkb1^{+/+}*-Mäuse $0,25 \pm 0,02$ g/g KG (125 % des Kontrollwertes) und die *klkb1^{-/-}*-Mäuse $0,22 \pm 0,03$ g/g KG (115 % des Kontrollwertes).

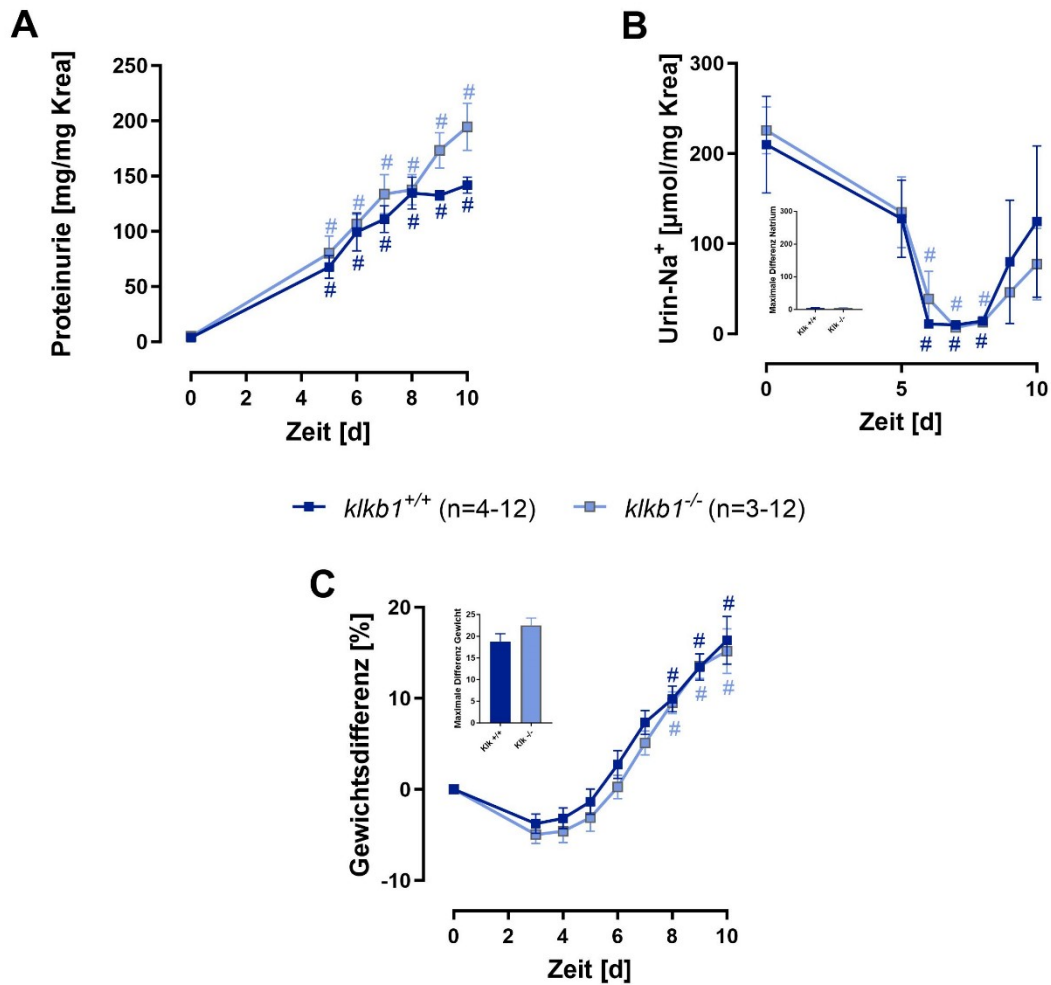


Abbildung 11: Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms bei p-KLK-defizienten Mäusen, publiziert in [112]

Dargestellt sind folgende Parameter als Mittelwert \pm SEM: Proteinurie (nach Bradford) in der Einheit mg/mg Krea (A), Na⁺-Ausscheidung im Urin im Verlauf sowie die minimale Na⁺-Ausscheidung in der Einheit μ mol/mg Krea (B), Gewichtsänderung zum Ausgangsgewicht im Verlauf sowie die Differenz des niedrigsten und höchsten Gewichtes in % (C).

#: p < 0,05 gegenüber Kontrollwert an Tag 0

Beide Genotypen zeigten den gleichen Verlauf bezüglich der erhobenen Parameter (siehe Abbildung 11) und unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Während vor der Injektion von Doxorubicin nahezu keine Proteinurie messbar war, hatten sowohl *kllb1*^{+/+}- als auch *kllb1*^{-/-}-Mäuse an Tag 5 eine signifikant erhöhte Proteinurie von 68 ± 10 mg/mg Krea (*kllb1*^{+/+}) beziehungsweise 80 ± 15 mg/mg Krea (*kllb1*^{-/-}) entwickelt. Bis Tag 10 erreichten

beide Gruppen ihre jeweils maximale Proteinurie mit 142 ± 7 mg/mg Krea (*klkb1^{+/+}*) beziehungsweise 195 ± 21 mg/mg Krea (*klkb1^{-/-}*).

Die Na⁺-Ausscheidung im Urin war an den Tagen 6 bis 8 bei beiden Genotypen signifikant gegenüber dem Ausgangswert von 210 ± 54 μ mol/mg Krea (*klkb1^{+/+}*) beziehungsweise 226 ± 26 μ mol/mg Krea (*klkb1^{-/-}*) erniedrigt und bei Minima von 5 ± 1 μ mol/mg Krea (*klkb1^{+/+}*) beziehungsweise 4 ± 1 μ mol/mg Krea (*klkb1^{-/-}*) ab ungefähr Tag 6 bis Tag 8 nahezu nicht mehr vorhanden. Ab Tag 9 stieg die Na⁺-Ausscheidung wieder und es lag keine signifikante Suppression mehr vor.

Nachdem sowohl *klkb1^{+/+}*- als auch die *klkb1^{-/-}*-Mäuse bis Tag 3 $3,8 \pm 1,1$ % (*klkb1^{+/+}*) beziehungsweise $5,0 \pm 1,0$ % (*klkb1^{-/-}*) ihres Ausgangsgewichtes verloren hatten, nahmen sie daraufhin kontinuierlich wieder zu. Ab Tag 8 hatten beide eine signifikante Gewichtszunahme zu Tag 0 entwickelt. Beide Gruppen erreichten ihr Maximalgewicht an Tag 10, welches jeweils einem Anstieg von $16,4 \pm 2,6$ % (*klkb1^{+/+}*) beziehungsweise $15,2 \pm 2,4$ % (*klkb1^{-/-}*) gegenüber dem Ausgangsgewicht entsprach. Die Differenz zwischen minimalem und maximalem Gewicht lag bei den *klkb1^{-/-}*-Mäusen bei $22,5 \pm 1,7$ % und bei den *klkb1^{+/+}*-Mäusen bei $18,8 \pm 1,8$ %. Die Gewichtsamplituden der beiden Genotypen unterschieden sich nicht signifikant.

3.1.2 Protease-Aktivität im Urin

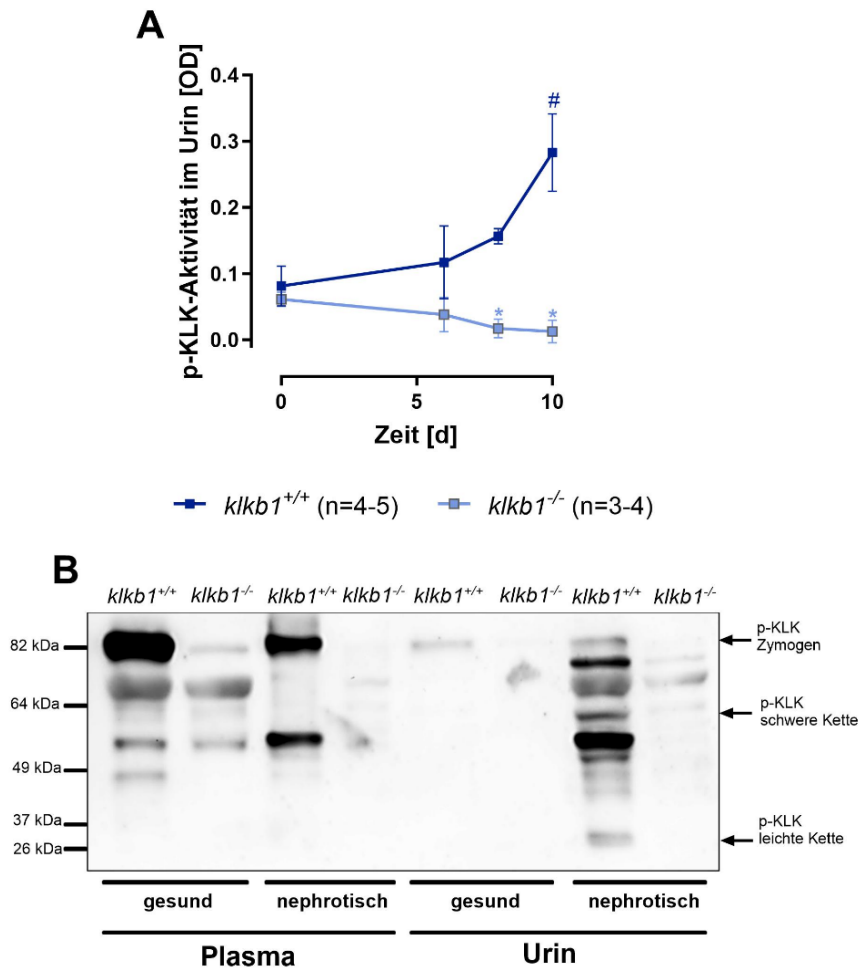


Abbildung 12: Verlauf der p-KLK-Aktivität im Urin nephrotischer Mäuse und Nachweis von p-KLK in Plasma und Urin gesunder und nephrotischer *klkb1*^{+/+}- und *klkb1*^{-/-}-Mäuse im Western Blot, publiziert in [112]

Dargestellt sind folgende Parameter und Messungen:

P-KLK-Aktivität im Urin über zehn Tage als Mittelwert \pm SEM (A).

Western Blot für p-KLK im Urin und Blut gesunder und nephrotischer Mäuse (B): Eine Spalte steht für eine Plasma- oder Urinprobe des jeweiligen Tieres an Tag 8. Auf der Höhe von ungefähr 82 kDa Nachweis des p-KLK-Zymogens, auf der Höhe von ungefähr 64 kDa Nachweis der schweren Kette des p-KLKs, auf der Höhe von ungefähr 30 kDa Nachweis der leichten Kette des p-KLKs, auf der Höhe von ungefähr 69 kDa am ehesten Nachweis von Albumin. Zwischen diesen Bandenhöhen Nachweis multipler Spaltprodukte des p-KLKs. Herstellung des Western Blots durch Matthias Wörn.

#: $p < 0,05$ gegenüber Tag 0 beziehungsweise vor Injektion von Doxorubicin

*: $p < 0,05$ gegenüber *klkb1*^{+/+}

Die p-KLK-Aktivität gegen das Substrat S-2302, dargestellt in Abbildung 12A, unterschied sich im Urin der *klkb1^{+/-}*- und *klkb1^{-/-}*-Mäuse am Kontrolltag nicht signifikant und lag bei $0,08 \pm 0,03$ OD (*klkb1^{+/-}*) beziehungsweise $0,06 \pm 0,01$ OD (*klkb1^{-/-}*). Die *klkb1^{+/-}*-Mäuse entwickelten im Verlauf eine steigende p-KLK-Aktivität. An Tag 10, an dem mit $0,28 \pm 0,06$ OD das Maximum erreicht wurde, war die p-KLK-Aktivität um das ungefähr 3,5-fache des Kontrollwertes erhöht und damit signifikant angestiegen. Die *klkb1^{-/-}*-Mäuse hielten sich dagegen ungefähr auf dem Ausgangsniveau, mit leicht sinkender Tendenz, und es konnte an den Tagen 8 und 10 eine signifikant niedrigere p-KLK-Aktivität als im Urin der *klkb1^{+/-}*-Mäuse festgestellt werden.

Im Western Blot des Urins und des Plasmas der gesunden *klkb1^{+/-}*-Mäuse konnte vor allem im Plasma das p-KLK-Zymogen mit einer Größe von etwa 82 kDa deutlich nachgewiesen werden, während sich im Urin eine schwächere Bande des Zymogens darstellte (Abbildung 12B). Im Urin der nephrotischen *klkb1^{+/-}*-Mäuse zeigten sich mehrere Banden und Spaltprodukte zwischen 30 und 82 kDa. Darunter befanden sich bei 30 kDa und 52 kDa die leichte sowie die schwere Kette des p-KLKs, die in sämtlichen weiteren Proben nicht oder nur sehr schwach sichtbar waren. Außerdem konnte im nephrotischen Zustand das p-KLK-Zymogen bei 82 kDa im Urin detektiert werden, während diese Bande im Plasma der nephrotischen *klkb1^{+/-}*-Mäuse deutlich schwächer als im gesunden Zustand war. Allgemein zeigte sich eine Abnahme der Bandenzahl und -intensität im Plasma beim Vergleich des gesunden zum nephrotischen Zustand. In den Proben der *klkb1^{-/-}*-Mäuse konnten keine spezifischen Banden für p-KLK nachgewiesen werden. Im Plasma gesunder *klkb1^{-/-}*-Mäuse zeigten sich, wie im Plasma der gesunden *klkb1^{+/-}*-Mäuse, mehrere unspezifische Banden, wie auf der Höhe von etwa 69 kDa mutmaßlich Albumin. Im nephrotischen Zustand hatte sich sowohl die Anzahl als auch die Intensität der Banden im Plasma gegenüber dem gesunden Zustand verringert. Im Urin zeigte sich ein ähnliches Bild, es konnten keine p-KLK-spezifischen Banden dargestellt werden. Die schwachen, unspezifischen Banden, die zu sehen waren, verhielten sich invers zum Plasma, sodass diese im nephrotischen Zustand prominenter waren als im gesunden.

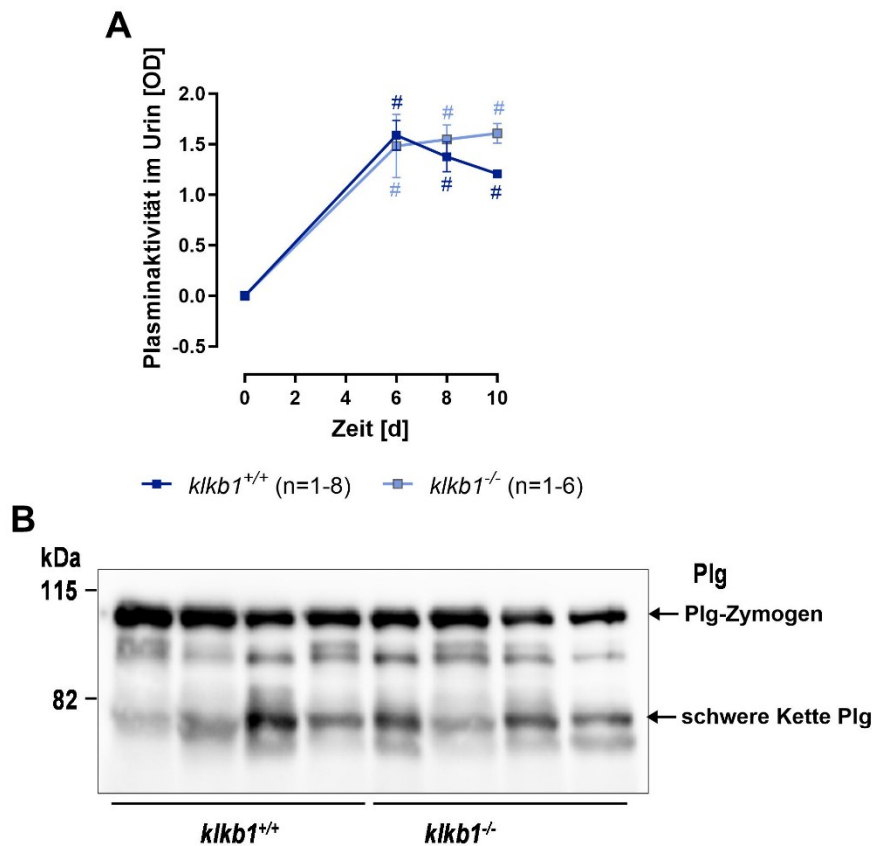


Abbildung 13: Verlauf der Plasminaktivität im Urin nephrotischer Mäuse und Nachweis von Plg im Urin nephrotischer Mäuse im Western Blot, publiziert in [112]

Dargestellt sind folgende Parameter und Messungen:

Plasminaktivität im Urin über zehn Tage als Mittelwert \pm SEM (A).

Western Blot für Plg im Urin nephrotischer *klkb1*^{+/+}- und *klkb1*^{-/-}-Mäuse Eine Spalte steht für eine Urinprobe des jeweiligen Tieres an Tag 8. Auf der Höhe von ungefähr 105 kDa Nachweis des Plgs als Zymogen, auf der Höhe von ungefähr 75 kDa Nachweis der schweren Kette. Herstellung des Western Blots durch Matthias Wörn.

#: $p < 0,05$ gegenüber Tag 0 beziehungsweise vor Injektion von Doxorubicin

Bei beiden Genotypen konnte am Kontrolltag keine Plasminaktivität gegen das Substrat S-2302 im Urin festgestellt werden (siehe Abbildung 13). Sechs Tage nach Induktion eines nephrotischen Syndroms war die Plasminaktivität in beiden Gruppen signifikant angestiegen. Auch an den Tagen 8 und 10 befand sich die Plasminaktivität auf diesem Niveau. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand nicht.

Im Western Blot nephrotischen Urins verschiedener *klkb1*^{+/+}- und *klkb1*^{-/-}-Mäuse konnte kein Unterschied festgestellt werden. Bei beiden Genotypen konnte sowohl das Zymogen bei ca. 105 kDa als auch die schwere Kette des Plgs, bei ca. 75 kDa, nachgewiesen werden. Die schweren Ketten und die teilweise zu erkennende Doppelbanden waren mutmaßlich Spaltprodukte, welche beispielsweise bei der Aktivierung von Plg zu Plasmin anfallen könnten.

3.2 Plasminogen-defiziente Mäuse

3.2.1 Plasminogen-Konzentration unter Kontroll-Bedingungen

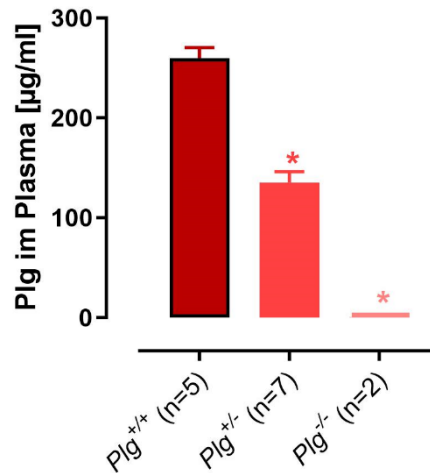


Abbildung 14: Plg-Konzentration im Plasma bei *Plg*^{+/+}, *Plg*^{+/-} und *Plg*^{-/-}-Mäusen

Dargestellt sind folgende Parameter als Mittelwert ± SEM: Plasminogen-Konzentrationen im Plasma unter Kontrollbedingungen in der Einheit µg/ml.

*: $p < 0,05$ gegenüber *Plg*^{+/+}

Unter Kontrollbedingungen spiegeln sich die drei verschiedenen Genotypen in der Plasma-Plg-Konzentration, dargestellt in Abbildung 14, wider. Die Plg-Konzentration der *Plg*^{+/+}-Mäuse lag bei 260 ± 11 µg/ml. Die heterozygoten Mäuse mit nur einem funktionstüchtigen Allel des Plg-Gens wiesen eine Plg-Konzentration von 136 ± 11 µg/ml auf, was ungefähr 50 % der Konzentration der *Plg*^{+/+}-Mäuse entspricht. Im Plasma der *Plg*^{-/-}-Mäusen konnte mittels ELISA kein Plg nachgewiesen werden.

3.2.2 Wachstumskurve der Mäuse

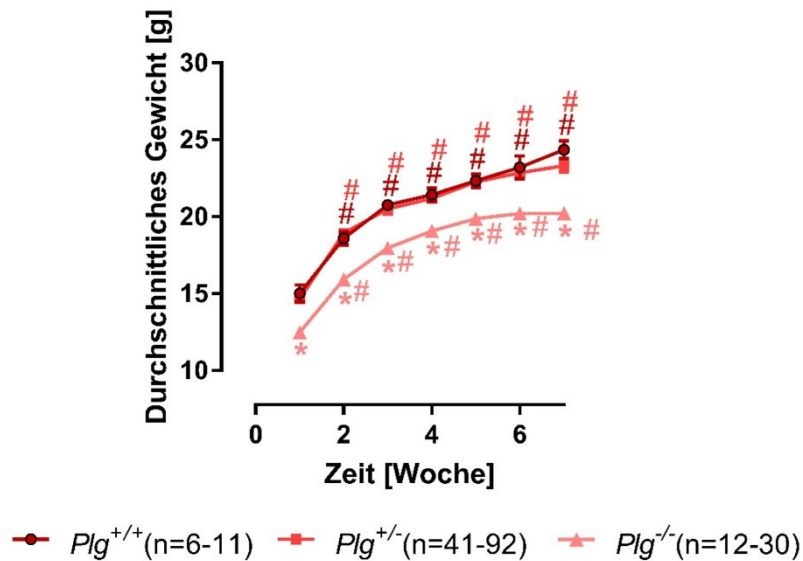


Abbildung 15: Wachstumskurve von $Plg^{+/+}$, $Plg^{+/-}$ und $Plg^{-/-}$ -Mäusen

Dargestellt sind folgende Parameter als Mittelwert \pm SEM: Durchschnittliches, wöchentliches Gewicht ab Woche 4 nach Geburt in g.

#: $p < 0,05$ gegenüber der Vorwoche

*: $p < 0,05$ gegenüber $Plg^{+/+}$

Das durchschnittliche Gewicht, dargestellt in Abbildung 15, der $Plg^{+/+}$ - und $Plg^{+/-}$ -Mäuse lag vier Wochen nach Geburt auf einem ähnlichen Niveau von $15,0 \pm 0,5$ g ($Plg^{+/+}$) beziehungsweise $14,7 \pm 0,3$ g ($Plg^{+/-}$), während die $Plg^{-/-}$ -Mäuse mit $12,5 \pm 0,4$ g signifikant leichter waren. Alle Gruppen nahmen kontinuierlich zu und hatten am Ende des Beobachtungszeitraumes ein Gewicht von über 20 g erreicht ($Plg^{+/+}$ $24,4 \pm 0,6$ g; $Plg^{+/-}$ $23,3 \pm 0,4$ g; $Plg^{-/-}$ $20,2 \pm 0,4$ g). Das Gewicht der $Plg^{-/-}$ -Mäuse war dabei stets signifikant niedriger als das der $Plg^{+/+}$ -Mäuse. Außerdem konnten bei den $Plg^{+/+}$ -Mäusen und den $Plg^{+/-}$ -Mäusen in den Wochen 2 und 3 ($Plg^{+/+}$) beziehungsweise 2, 3 und 5 ($Plg^{+/-}$) signifikante Gewichtsunterschiede zur Vorwoche festgestellt werden. Die $Plg^{-/-}$ -Mäuse zeigten dies in den Wochen 2, 3 und 4. Die wöchentliche Zunahme flachte über den Beobachtungszeitraum in allen Gruppen zunehmend ab.

3.2.3 Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms in der Akutphase

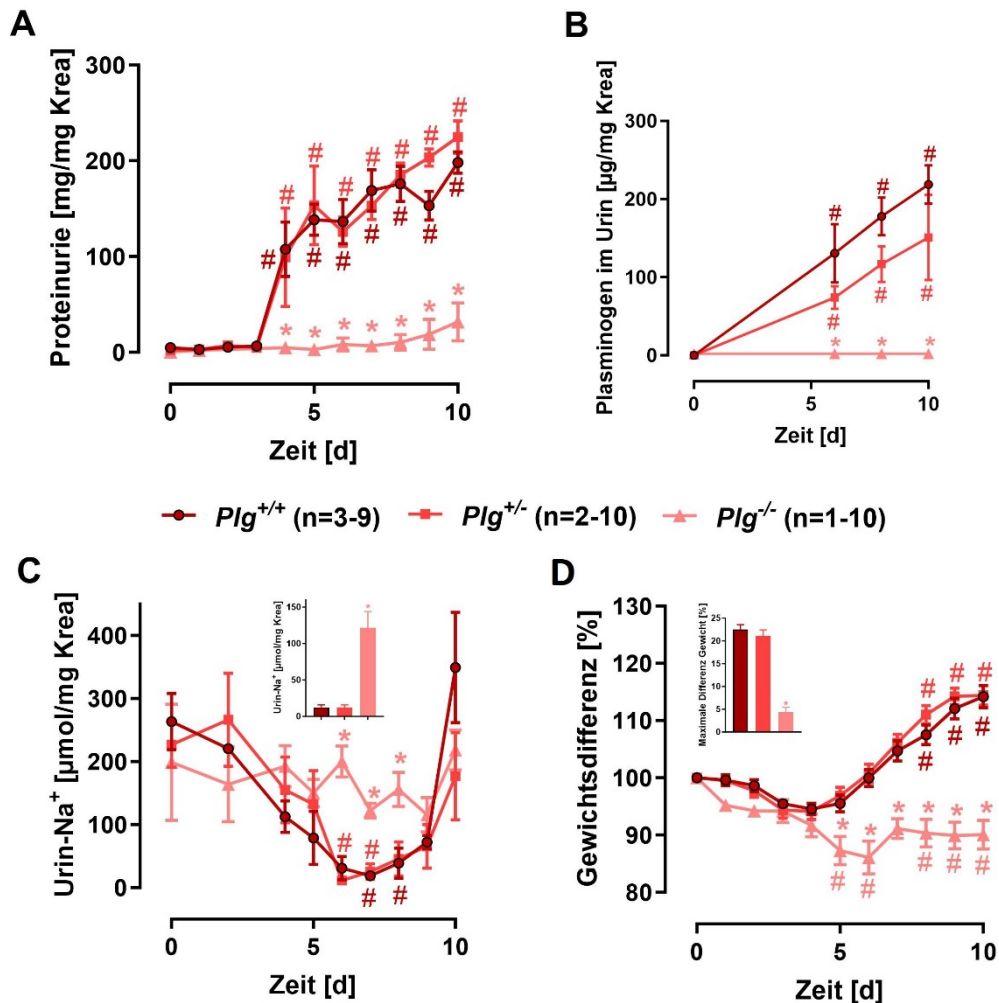


Abbildung 16: Akuter klinischer Verlauf von *Plg*^{+/+}, *Plg*^{+/-} und *Plg*^{-/-}-Mäusen, publiziert in [113]

Dargestellt ist der Verlauf folgender Parameter, jeweils als Mittelwert \pm SEM: Proteinurie (Bradford) in der Einheit mg/mg Krea (A), Plasminogenurie in der Einheit μ g/mg Krea (B), Na⁺-Ausscheidung im Urin im Verlauf sowie die minimale Na⁺-Ausscheidung in der Einheit μ mol/mg Krea (C), Gewichtsänderung zum Ausgangsgewicht im Verlauf sowie die Differenz des niedrigsten und höchsten Gewichtes *post injectionem* in % (D).

#: $p < 0,05$ gegenüber Tag 0 beziehungsweise vor Injektion von Doxorubicin

*: $p < 0,05$ gegenüber *Plg*^{+/+}

Nach Injektion von Doxorubicin an Tag 0 konnten zwischen *Plg*^{+/+}-, *Plg*^{+/-}- und *Plg*^{-/-}-Mäusen zwei Verlaufsformen beobachtet werden (siehe Abbildung 16). So zeigten die *Plg*^{+/+}- und *Plg*^{+/-}-Mäuse einen ähnlichen Verlauf und keine signifikanten Unterschiede. Die *Plg*^{-/-}-Mäuse erreichten dagegen das zentrale

Einschlusskriterium einer Proteinurie von mindestens 120 mg/mg Krea nicht. Auch in den weiteren Parametern zeigten die *Plg^{-/-}*-Mäuse einen anderen Verlauf als die *Plg^{+/+}*- und *Plg^{+/-}*-Mäuse. Vor der Injektion von Doxorubicin fand sich bei jedem Genotyp nur eine minimale Proteinurie und auch bis Tag 3 veränderte sich die Proteinurie zunächst in keiner Gruppe signifikant. Während sowohl die *Plg^{+/+}*- als auch die *Plg^{+/-}*-Mäuse an Tag 4 einen signifikanten Anstieg auf 108 ± 28 mg/mg Krea (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise $99,0 \pm 52$ mg/mg Krea (*Plg^{+/-}*) verzeichneten, überschritt die Proteinurie der *Plg^{-/-}*-Tiere das Ausgangsniveau nie signifikant. Die als nephrotisch beobachtete Schwelle von 120 mg/mg Krea überschritten die *Plg^{+/+}*- und *Plg^{+/-}*-Mäuse ab einschließlich Tag 5 durchgehend. Ihre Maxima erreichten alle drei Gruppen an Tag 10, welche bei 198 ± 11 mg/mg Krea (*Plg^{+/+}*), 225 ± 17 mg/mg Krea (*Plg^{+/-}*) und 32 ± 20 mg/mg Krea (*Plg^{-/-}*) lagen.

Analog zur Proteinurie entwickelte sich die Plg-Konzentration im Urin. Während am Kontrolltag kein Plg nachweisbar war, konnte an Tag 6 bei den *Plg^{+/+}*- und *Plg^{+/-}*-Mäusen ein signifikanter Anstieg auf 131 ± 37 µg/mg Krea (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise 74 ± 15 µg/mg Krea (*Plg^{+/-}*) verzeichnet werden. Die Maxima erreichten beide an Tag 10 mit 219 ± 24 µg/mg Krea (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise 151 ± 54 µg/mg Krea (*Plg^{+/-}*). Im Urin der *Plg^{-/-}*-Mäuse war zu keinem Zeitpunkt Plg nachweisbar.

Die Natriurese sank im Verlauf bei den *Plg^{+/+}*- und *Plg^{+/-}*-Mäusen auf signifikant niedrige Werte an den Tagen 7 und 8 (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise 6 und 7 (*Plg^{+/-}*) und erreichte ein Minimum von 12 ± 3 µmol/mg Krea (*Plg^{+/+}* und *Plg^{+/-}*). Dies entspricht einem Anteil von ungefähr 5 % der Na⁺-Konzentration des Urins am Kontrolltag (264 ± 45 µmol/mg Krea (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise 227 ± 36 µmol/mg Krea (*Plg^{+/-}*)). Die *Plg^{-/-}*-Mäuse schieden dagegen nie signifikant weniger Na⁺ als am Kontrolltag aus. Zudem war die Natriurese der *Plg^{+/+}*-Mäuse an den Tagen 6 bis 8 signifikant niedriger als die der *Plg^{-/-}*-Mäuse.

Bei allen Genotypen sank das Gewicht gegenüber dem Ausgangsgewicht bis Tag 4 ab (*Plg^{+/+}* 94,2 %; *Plg^{+/-}* 94,6 %; *Plg^{-/-}* 91,7 %). Während die *Plg^{+/+}*- und *Plg^{+/-}*-Mäuse anschließend kontinuierlich zunahmen, sank das Gewicht der *Plg^{-/-}*-

-Mäuse weiterhin bis Tag 6 auf ein Minimum von $86,1 \pm 2,9$ %. Anschließend stieg das Gewicht der *Plg^{-/-}*-Mäuse wieder an, aber war ab Tag 5, abgesehen von Tag 7, stets signifikant niedriger als das Ausgangsgewicht. Ab Tag 5 waren die *Plg^{-/-}*-Mäuse zudem signifikant leichter als die *Plg^{+/+}*-Mäuse. Einen signifikanten Anstieg des Gewichts gegenüber Tag 0 hatten die *Plg^{+/-}*- und *Plg^{+/+}*-Mäuse an den Tagen 8 bis 10 erreicht. Die maximale Gewichtsamplitude im Beobachtungszeitraum lag bei den *Plg^{+/-}*- und *Plg^{+/+}*-Mäusen bei $22,5 \pm 1,1$ % (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise $21,1 \pm 1,3$ % (*Plg^{+/-}*) und unterschied sich nicht signifikant.

3.2.4 Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms im Langzeitverlauf

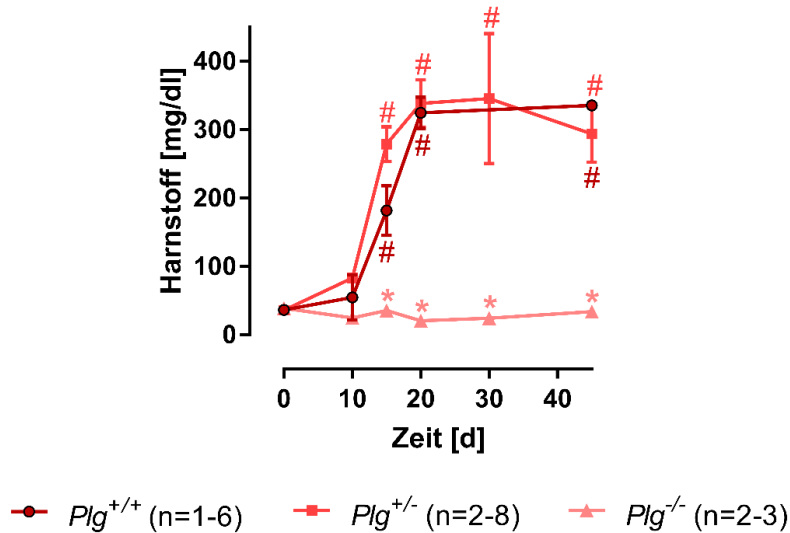


Abbildung 17: Harnstoff-Konzentration im Langzeitverlauf, publiziert in [113]

Dargestellt sind folgende Parameter als Mittelwert \pm SEM: Harnstoff-Konzentrationen im Plasma nach Injektion von Doxorubicin.

#: $p < 0,05$ gegenüber Tag 0

*: $p < 0,05$ gegenüber *Plg*^{+/+}

Die *Plg*^{+/-}- und *Plg*^{-/-}-Mäuse zeigten bis Tag 10 einen nicht-signifikanten Anstieg der Harnstoff-Konzentration auf 55 ± 33 mg/dl (*Plg*^{+/+}) beziehungsweise 83 ± 5 mg/dl (*Plg*^{+/-}) (siehe Abbildung 17). Innerhalb der nächsten zehn Tage bis Tag 20 stieg die Harnstoff-Konzentration auf die signifikant erhöhten Werte von 325 ± 23 mg/dl (*Plg*^{+/+}) beziehungsweise 339 ± 35 mg/dl (*Plg*^{+/-}). Gegenüber dem Kontrolltag hatte sich dieser Wert auf das ungefähr 9- (*Plg*^{+/+}) beziehungsweise 9,4-fache (*Plg*^{+/-}) erhöht. Im weiteren Verlauf wurde dieses Niveau gehalten. Die *Plg*^{-/-}-Mäuse befanden sich dagegen stets auf dem gesunden Ausgangslevel. Ab Tag 15 war deren Harnstoff-Konzentration mit 35 ± 7 mg/dl signifikant niedriger als die der *Plg*^{+/+}-Mäusen.

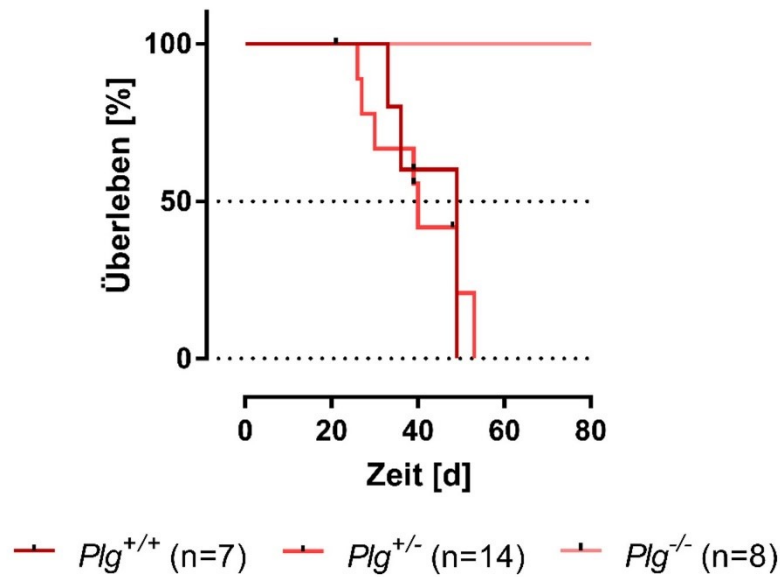


Abbildung 18: Überlebensraten über 80 Tage, publiziert in [113]

Dargestellt sind die Überlebensraten der drei Genotypen als Kaplan-Meier-Kurven in %. Ein senkrecht Absinken der Kurven bedeutet jeweils den Tod von mindestens einem Versuchstier.

ˆ: Tier vorzeitig geopfert, aufgrund von Organentnahmen oder stark reduziertem Allgemeinzustand

*: $p < 0,05$ gegenüber $Plg^{+/+}$

Auch bei der Betrachtung wieviele Mäuse den Endpunkt von 80 Tagen nach Injektion von Doxorubicin erreichten, zeigten sich zwei Verlaufsformen, welche in Abbildung 18 dargestellt sind. Die Hälfte der Populationen der $Plg^{+/+}$ - und $Plg^{+/-}$ -Mäuse waren nach 49 Tagen ($Plg^{+/+}$) beziehungsweise 40 Tagen ($Plg^{+/-}$) gestorben oder mussten aufgrund des Erreichens eines der definierten Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen werden. Alle $Plg^{-/-}$ -Mäuse überlebten dagegen den vollständigen Beobachtungszeitraum von 80 Tagen. Dieser Unterschied zwischen $Plg^{+/+}$ - und $Plg^{-/-}$ -Mäusen, bezüglich der medianen Überlebensrate, war signifikant.

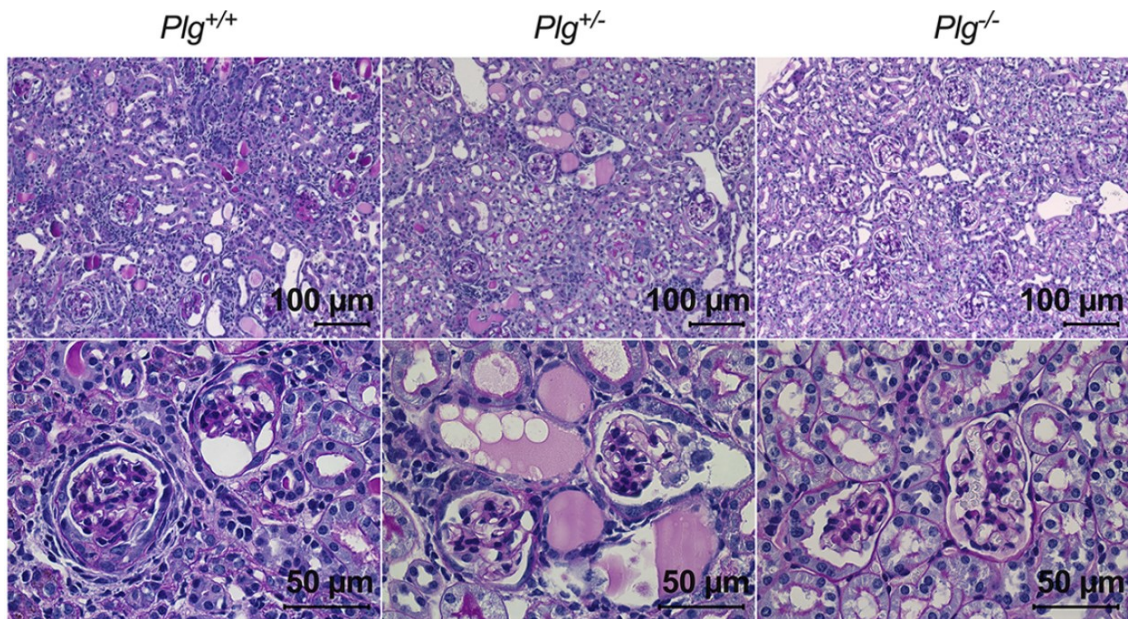


Abbildung 19: Lichtmikroskopie von Nieren 80 Tage nach Doxorubicin, publiziert in [113]
Dargestellt sind beispielhafte mikroskopische Bilder des Nierenparenchyms nach PAS-Färbung, in der zweiten Reihe zur näheren Betrachtung der Glomeruli in zusätzlicher Vergrößerung.

Zur allgemeinen histologischen Beurteilung des Zustandes der Nieren und der Fibrose wurden an Tag 80 entnommene Nieren mithilfe der PAS-Färbung (siehe Abbildung 19) analysiert. Es zeigte sich bei den *Plg*^{+/+}- und *Plg*^{+/-}-Mäusen das Bild einer Glomerulosklerose. Die Nieren der *Plg*^{-/-}-Tiere waren dagegen morphologisch unauffällig.

3.2.5 Immunhistologie

3.2.5.1 Immunhistochemie bezüglich Plasminogen

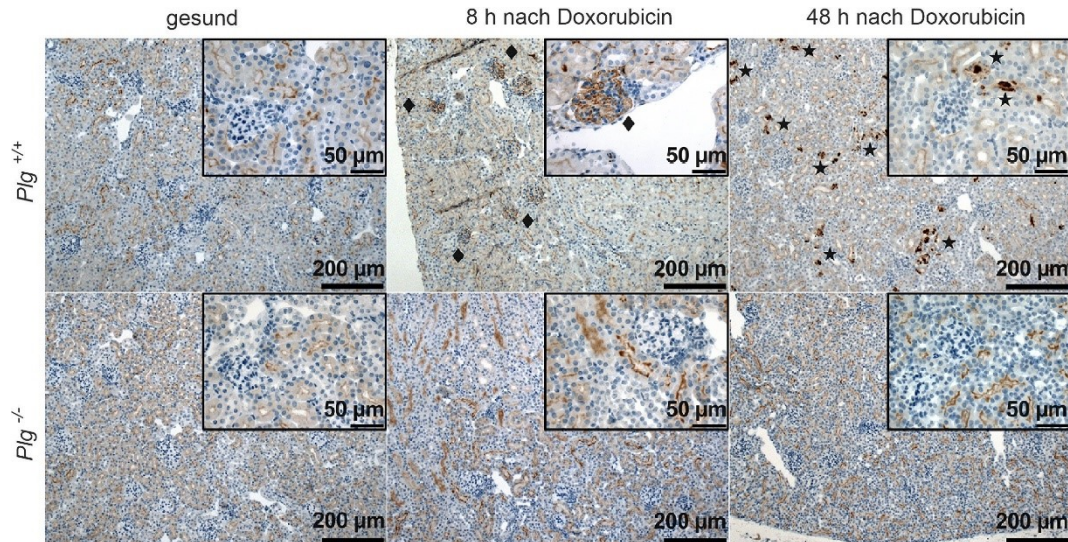


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung der Nieren für Plg, publiziert in [113]

Dargestellt sind beispielhafte immunhistochemische Schnitte der Nieren mit Fokus auf die Glomeruli von $Plg^{+/+}$ - und $Plg^{-/-}$ -Mäusen vor der Injektion von Doxorubicin, sowie acht und 48 Stunden danach.

Raute: Plg-Ansammlung in Glomeruli
Stern: Plg-Ansammlung in Tubuli

In der immunhistochemischen Färbung wurden Nieren von $Plg^{+/+}$ - und $Plg^{-/-}$ -Mäusen vor der Injektion von Doxorubicin, acht Stunden sowie 48 Stunden *post injectionem* untersucht (siehe Abbildung 20). Der Fokus lag dabei auf möglichen Anreicherungen von Plg in den Glomeruli. Plg konnte dabei zu keinem Zeitpunkt in den Glomeruli der $Plg^{-/-}$ -Mäuse nachgewiesen werden. Vor Injektion von Doxorubicin fand sich auch bei den $Plg^{+/+}$ -Mäusen kein Plg in den Glomeruli. Acht Stunden nach Injektion konnte Plg in den Glomeruli der $Plg^{+/+}$ -Mäuse nachgewiesen werden. Nach weiteren 40 Stunden zeigte sich keine glomeruläre Ansammlungen von Plg mehr.

3.2.5.1.1 Interventionsversuch

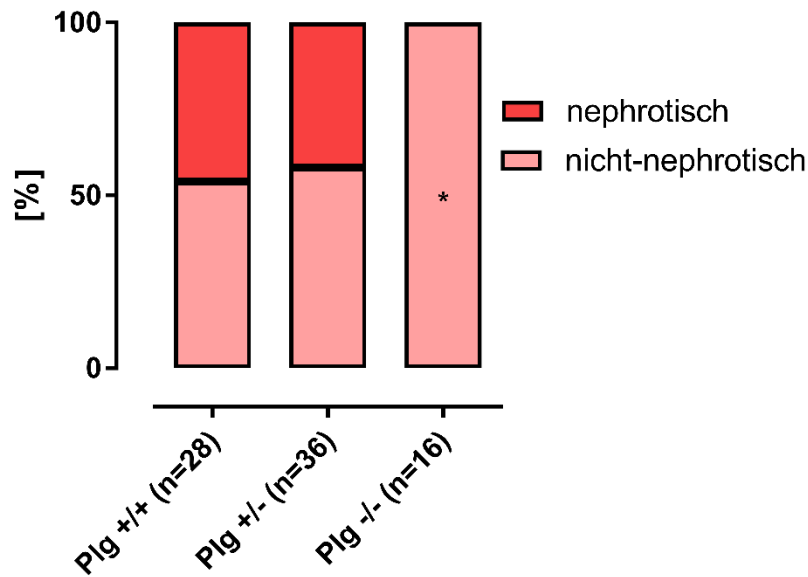


Abbildung 21: Ansprechen der verschiedenen Genotypen nach Injektion von Doxorubicin
 Dargestellt sind die Anteile an Tieren für jeden Genotyp, die nach Gabe von Doxorubicin eine nephrotische Proteinurie von mindestens 120 mg/mg Krea an mindestens zwei Tagen erreichten gegenüber den Tieren, die keine oder eine nicht-nephrotische Proteinurie entwickelten.

*: $p < 0,05$ gegenüber *Plg*^{+/+}

Die Auswertung der Häufigkeit bezüglich der Entwicklung eines nephrotischen Syndroms je nach Genotyp (siehe Abbildung 21) ergab einen Unterschied der *Plg*^{-/-}-Tiere zu den *Plg*^{+/-}- und *Plg*^{+/+}-Tieren. Während bei *Plg*^{+/-} und *Plg*^{+/+} ungefähr die Hälfte der Mäuse eine nephrotische Proteinurie entwickelten, konnte dies bei keiner *Plg*^{-/-}-Maus erreicht werden. Diese unterschiedlichen Ansprechraten waren signifikant.

Daher wurde in einem weiteren Versuch den *Plg*^{-/-}-Mäusen murines Plg intravenös verabreicht. Dadurch sollte untersucht werden, ob bei den *Plg*^{-/-}-Mäusen durch injiziertes Plg eine glomeruläre Schädigung und eine nephrotische Proteinurie erzeugt werden kann. Die intravenöse Applikation von bis zu 1 mg murinen Plgs kurz vor Injektion des Doxorubicins sollte zu einer kurzzeitigen Überbrückung der Plg-Defizienz führen. Jedoch zeigte die Plg-Substitution keinen Effekt auf die Proteinurie, keine der fünf behandelten Mäuse erreichte eine Proteinurie über 10 mg/mg Krea.

In der immunhistochemischen Färbung (siehe Abbildung 22) zeigte sich acht Stunden nach Injektion von Doxorubicin unter Gabe murinen Plgs keine Ansammlung des Plgs in den Glomeruli, allerdings in den Tubuli.

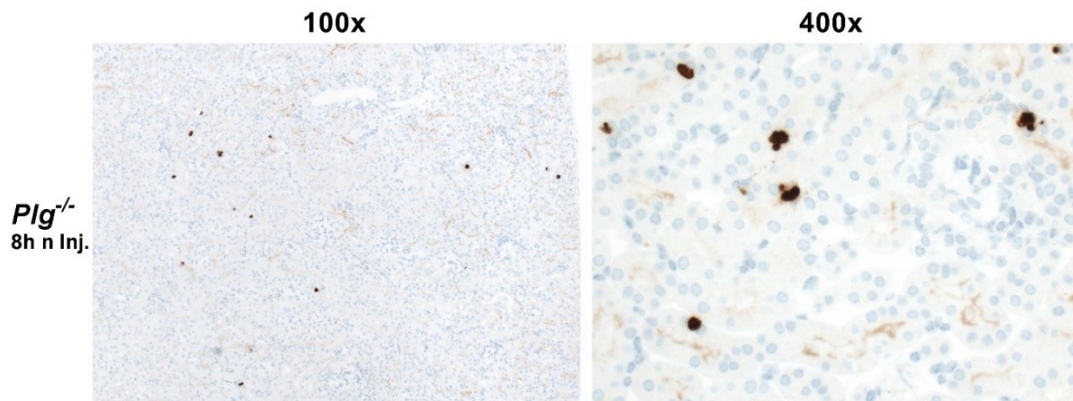


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung der Nieren von *Plg*^{-/-}-Mäusen unter Substitution von murinem Plg

Dargestellt ist die mikroskopische Aufnahme eines Nierenparenchyms einer *Plg*^{-/-}-Maus acht Stunden nach Injektion von Doxorubicin und murinen Plgs in verschiedenen Vergrößerungen.

3.2.5.2 Immunfluoreszenz

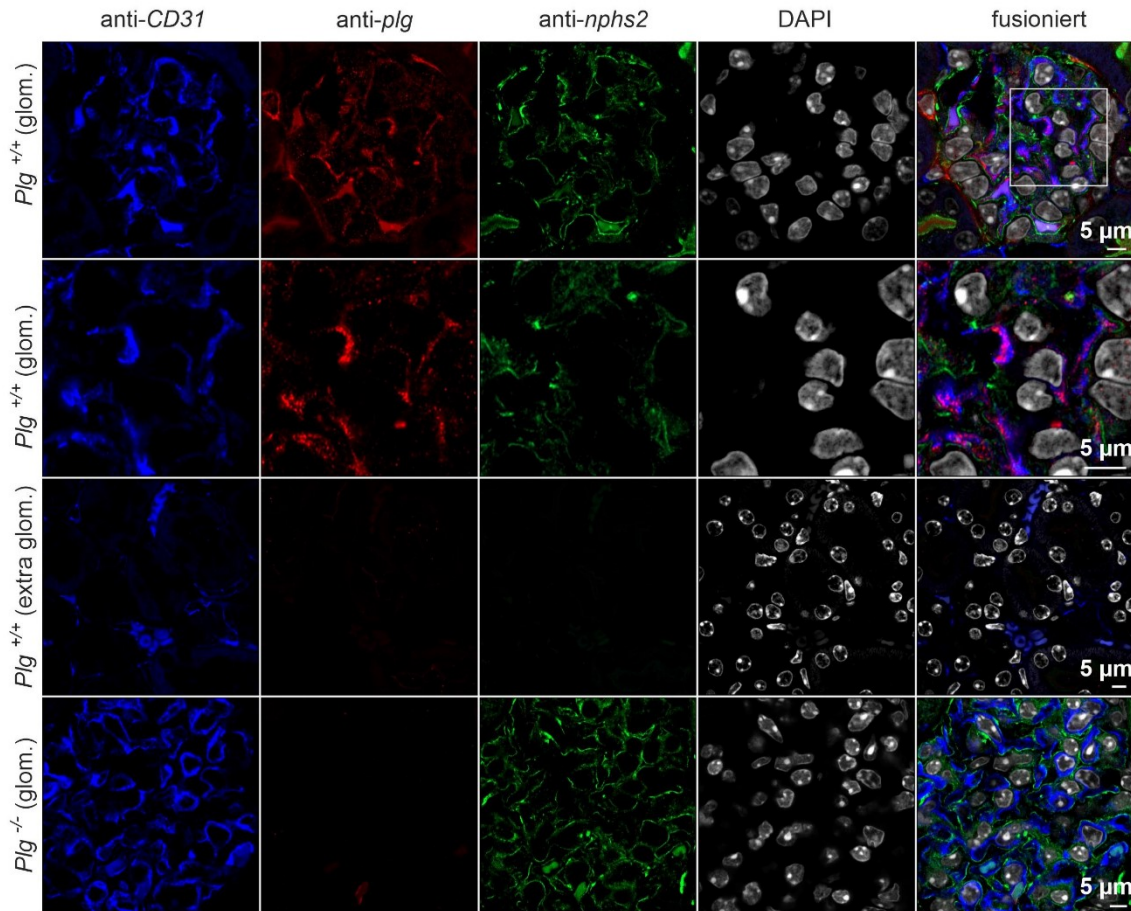


Abbildung 23: Immunfluoreszenz-Färbung der Nieren für Plg acht Stunden nach Doxorubicin-Gabe, publiziert in [113]

Dargestellt sind immunfluoreszenz-Färbungen in der Niere. Erste Spalte: Blaue Färbung von CD31 im Sinne des Endothels. Zweite Spalte: Rote Färbung der Plg-Anreicherung. Dritte Spalte: Grüne Färbung des Podocins im Sinne der Podozyten. Vierte Spalte: Weiße Färbung der Nuclei durch 4',6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI). Fünfte Spalte: Zusammengeführtes Bild der einzelnen Färbungen. Erste und zweite Reihe: Glomerulum einer *Plg*^{+/+}-Maus in unterschiedlichen Vergrößerungen. Dritte Reihe: Extraglomerulärer Raum einer *Plg*^{+/+}-Maus. Vierte Reihe: Glomerulum einer *Plg*^{-/-}-Maus.

Die Immunfluoreszenz, in Abbildung 23 dargestellt, ergab ähnliche Befunde wie die Immunhistochemie bezüglich des glomerulären Nachweises von Plg. In den Glomeruli der *Plg*^{+/+}-Mäuse konnte Plg acht Stunden nach Injektion von Doxorubicin nachgewiesen werden. Im glomerulären System der *Plg*^{-/-}-Mäuse war zu diesem Zeitpunkt kein Plg zu finden. Extraglomerulär beziehungsweise im Tubulussystem der *Plg*^{+/+}-Mäuse war ebenfalls kein Plg nachweisbar. Bei näherer Betrachtung der glomerulären Plg-Anreicherungen fiel zudem auf, dass

sich Plg auf der Seite des durch CD31 gefärbten Endothels befand, während es auf der podozytären Seite der Basalmembran nicht nachgewiesen werden konnte. Auch an extraglomerulärem Endothel konnte kein Plg nachgewiesen werden.

3.2.5.3 Immunhistochemie auf Histon H2B

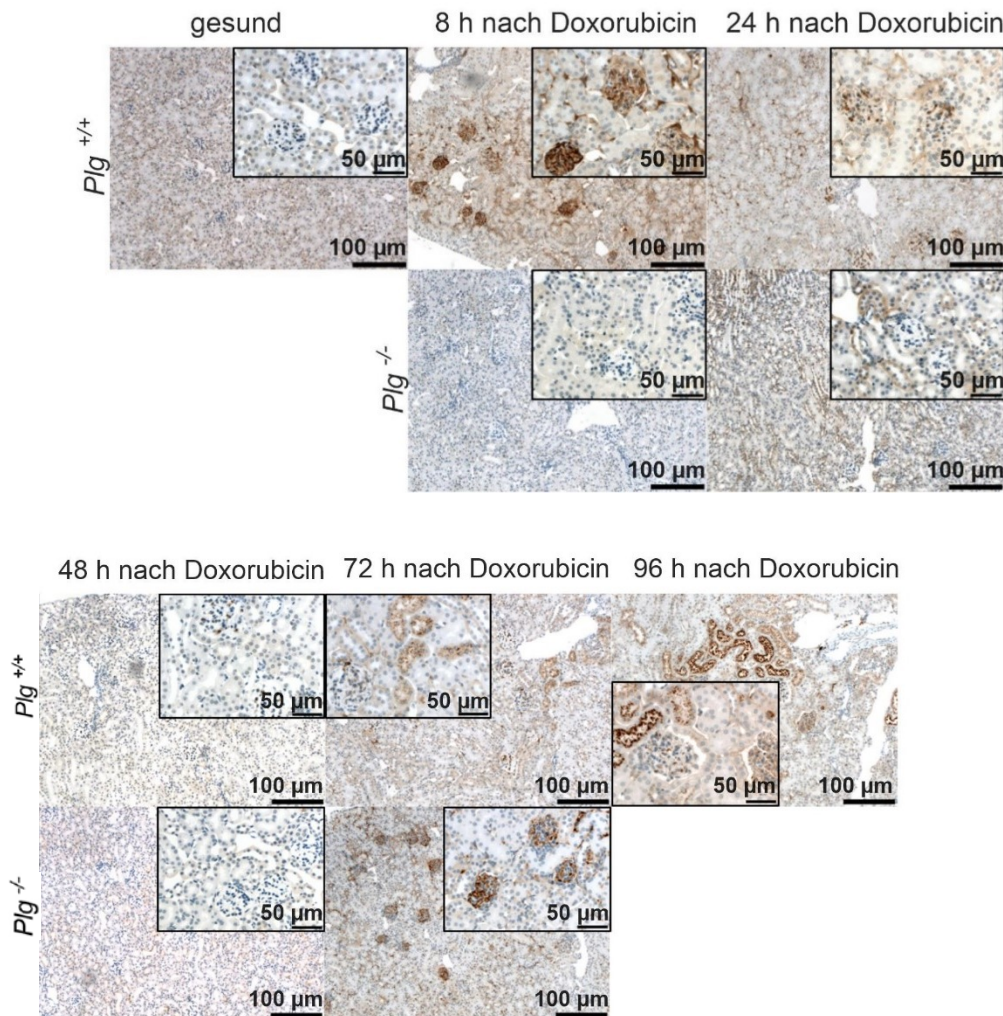


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung der Nieren für Histon H2B, publiziert in [113]

Dargestellt sind beispielhafte immunhistochemische Schnitte der Nieren mit Fokus auf die Glomeruli von *Plg^{+/+}*- und *Plg^{-/-}*-Mäusen vor der Injektion von Doxorubicin, sowie acht, 24, 48, 72 und 96 Stunden danach.

In dieser immunhistochemischen Färbung wurden Nieren von *Plg^{+/+}*- und *Plg^{-/-}*-Mäusen vor der Injektion von Doxorubicin, acht Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden sowie 96 Stunden *post injectionem* untersucht (siehe Abbildung 24). Der Fokus lag in diesem Ansatz auf der Darstellung des Rezeptors Histon H2B in den Glomeruli. Vor Injektion von Doxorubicin konnte bei den *Plg^{+/+}*-Mäusen keine relevante Menge des Rezeptors nachgewiesen werden. Dies war jedoch acht Stunden nach Injektion des Doxorubicins der Fall. Ähnlich

wie beim Nachweis des Plgs in der Immunhistochemie zeigte sich eine deutliche glomeruläre Anreicherung. Im weiteren Verlauf war die Konzentration 24 Stunden nach Verabreichung des Doxorubicins deutlich gesunken und zu den weiteren Zeitpunkten Histon H2B nicht mehr nachweisbar. Die *Plg*^{-/-}-Mäuse zeigten hingegen 72 Stunden nach Injektion des Doxorubicins einen deutlich späteren Anstieg des Histon H2B in den Glomeruli.

3.2.5.4 Immunfluoreszenz und Kollokationsanalyse auf Histon H2B

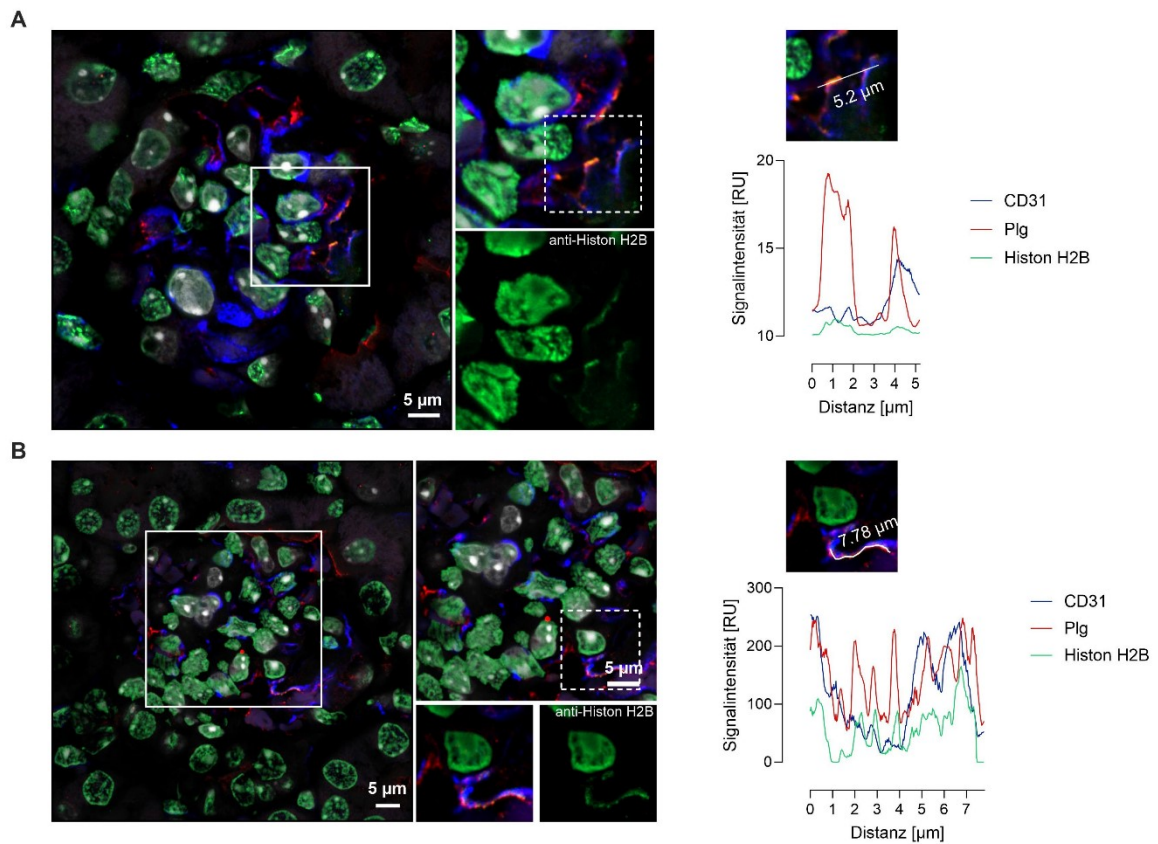


Abbildung 25: Immunfluoreszenz der Nieren für Plg und Histon H2B acht Stunden nach Doxorubicin-Gabe, publiziert in [113]

Dargestellt sind Aufnahmen per Immunfluoreszenz aus unterschiedlichen Nierenschnitten. Blaue Färbung von CD31 im Sinne des Endothels, rote Färbung der Plg-Anreicherung, grüne Färbung des Histon H2Bs, weiße Färbung der Nuclei durch DAPI. Das linke Bild in jeder Zeile ist das jeweilige Ausgangsbild. Ausschnitt mit durchgezogener Linie: Jeweils oberes Bild in der zweiten Spalte. Ausschnitt mit gestrichelter Linie: Jeweils Bild in dritter Spalte, zudem in zweiter Zeile linkes Bild in zweiter Spalte. Zusätzlich in zweiter Spalte Bild des reinen Signals für Histon H2B. Ergänzend in dritter Spalte Darstellung der Signalintensitäten für Plg, CD31 und Histon H2B.

Die Immunfluoreszenz in Abbildung 25 zeigt zwei Glomeruli einer *Plg^{+/+}*-Maus acht Stunden nach Injektion von Doxorubicin. Für die drei zentralen Signale Plg, Histon H2B und CD31 fand sich in beiden Beispielen ein sehr ähnliches Bild. So findet sich wiederum Plg im Bereich des Endothels (CD31) und durch die zusätzliche Darstellung des Histon H2Bs kann auch dessen Signal in diesem Bereich festgestellt werden. Dieser optische Eindruck konnte durch den Vergleich der jeweiligen Signalintensitäten bestätigt und unterstrichen werden.

4 Diskussion

4.1 Plasma-Kallikrein-defiziente Mäuse

4.1.1 Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms

Die p-KLK-defizienten Mäuse zeigten, wie auch die Wildtypen, die vorbeschriebene Entwicklung eines nephrotischen Syndroms nach Injektion von Doxorubicin [96]. Die *klkb1^{-/-}*-Mäuse und *klkb1^{+/+}*-Mäuse entwickelten dementsprechend eine massive Proteinurie und generalisierte Ödeme [112]. Nachdem die Proteinurie nach ungefähr fünf Tagen von nahezu keiner Proteinausscheidung im Urin signifikant angestiegen war, folgte eine massive Abnahme der renalen Na⁺-Ausscheidung an den Tagen 6 bis 8. Der Urin war in diesem Zeitraum praktisch frei von Na⁺ und die Retention damit maximal angestiegen. Damit ging eine signifikante Gewichtszunahme und Ödembildung, vor allem in Form von Aszites, einher. In all diesen Parametern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Der biphasische Verlauf der Fress- und Trinkmengen beider Genotypen ist am ehesten als Nebenwirkung des injizierten Doxorubicins anzusehen, da Doxorubicin eine Inappetenz bewirkt [85]. Der dadurch hervorgerufene Flüssigkeits- und Kalorienmangel führte mutmaßlich zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme gegenüber den Kontrollbedingungen bei Nachlassen der Doxorubicin-Wirkung ab ungefähr Tag 5. Hinsichtlich der zentralen Fragestellung der Ödementwicklung durch die mutmaßliche proteolytische ENaC-Aktivierung unterschieden sich die beiden Genotypen *klkb1^{+/+}* und *klkb1^{-/-}* im nephrotischen Zustand nicht. Dies könnte jedoch in anderen experimentellen Modellen des nephrotischen Syndroms, in denen die nephrotische Proteinurie durch einen anderen Pathomechanismus erreicht wird, dennoch der Fall sein. Diese Arbeit relativiert außerdem *in vitro* erhobene Ergebnisse an *Xenopus* Oozyten (siehe Kapitel 1.2.4.2). Dabei konnte gezeigt werden, dass Gewebe-Kallikrein 1 zur Aktivierung des ENaCs und dadurch zu einer gesteigerten Na⁺-Retention führt [78, 114]. Diese Aktivierung konnte durch unsere Arbeitsgruppe *in vitro* auch für p-KLK belegt werden [112].

In vivo hat die p-KLK-Aktivierung des ENaCs, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, allerdings keinen signifikanten Effekt. Andere Proteasen mit der Fähigkeit den ENaC *in vitro* zu aktivieren, sind beispielsweise Plasmin, der uPA oder Prostasin [61, 73]. Durch den Protease-Inhibitor Aprotinin konnte die Ödementstehung im Doxorubicin-induzierten Modell zudem unterdrückt werden [80]. Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen allerdings nicht aus, dass auch mehrere Proteasen, gegebenenfalls in Wechselwirkung oder Kombination, für die Ödementstehung verantwortlich sein könnten. So ist auch eine additive ENaC-Aktivierung durch mehrere Proteasen denkbar. Zudem muss weiterhin die Underfill-Theorie bedacht werden, in der der Anstieg des Aldosterons durch einen intravasalen Volumenmangel als begünstigender permissiver Faktor für die Ödembildung angesehen wird [63]. In weiteren Untersuchungen der Proben aus dieser Arbeit konnten diesbezüglich deutlich erhöhte Aldosteron-Konzentrationen im Blut der nephrotischen Tiere nachgewiesen werden [112]. Angesichts dessen ist anzunehmen, dass zumindest ein Teil der gesteigerten Na⁺-Retention der Aldosteron-Wirkung geschuldet ist. Zusammenfassend muss zudem festgehalten werden, dass die Under- und Overfill-Theorien sich nicht gegenseitig ausschließen und beide Mechanismen parallel stattfinden und zur Ödementwicklung beitragen könnten [63].

4.1.2 Protease-Aktivität im Urin

Des Weiteren wurden die Proteasen hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität im Urin untersucht. Die Wildtypen zeigten im Verlauf einen signifikanten Anstieg der p-KLK-Aktivität, parallel zur zunehmenden Proteinurie. Durch den p-KLK-Knockout ließ sich erwartungsgemäß eine signifikant niedrigere p-KLK-Aktivität der nephrotischen *klkb1*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den *klkb1*^{+/+}-Mäusen nachweisen. Dass überhaupt eine Aktivität im Urin der *klkb1*^{-/-}-Mäuse erfasst wurde, liegt mutmaßlich an Kreuzreaktionen des Substrats mit anderen Proteasen wie Faktor XIa oder Gewebe-Kallikreinen [114-116]. Im Verlauf wurden diese Proteasen mutmaßlich durch andere Proteasen, die keine Kreuzreaktionen auslösen, im nephrotischen Urin verdrängt, was die Abnahme der p-KLK-Aktivität verglichen mit dem Ausgangswert erklären könnte. Diese

Abnahme war allerdings nicht signifikant. Die nephrotischen *klkb1^{-/-}*- und *klkb1^{+/-}*-Mäuse zeigten zudem einen signifikanten Anstieg der Plasmin-Aktivität im Urin, ebenfalls passend zur entwickelten Proteinurie. Zwischen den Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Außerdem erfolgten Western Blots für p-KLK und Plg im Plasma und Urin gesunder und nephrotischer Tiere beider Genotypen. Im Urin der nephrotischen Wildtypen konnte dabei im Vergleich mit dem Urin gesunder Wildtypen eine deutliche Signalzunahme auf Höhe des p-KLK-Zymogens und der Spaltprodukte nachgewiesen werden. Im Plasma nephrotischer *klkb1^{+/-}*-Tiere fiel hingegen eine Signalabschwächung der Bande auf Höhe des p-KLK-Zymogens gegenüber dem Plasma gesunder Tiere auf, das zudem deutlich schwächere Signale für die Spaltprodukte zeigte. Dieser Befund passt zum Verlust des p-KLKs über den Urin. P-KLK liegt dort sowohl gemäß des Western Blots als auch der Aktivitätsmessung dieser Arbeit im aktiven Zustand vor. In den Proben der *klkb1^{-/-}*-Mäuse fand sich im Western Blot kein relevantes p-KLK-Signal. Im Urin nephrotischer *klkb1^{+/-}*- und *klkb1^{-/-}*-Mäuse ergaben sich parallel zur Plg-Aktivität auch im Western Blot keine Unterschiede der Plg-Signale. So konnte sowohl das Zymogen Plg als auch die schwere Kette nach Spaltung nachgewiesen werden. Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse der Western Blots die Aktivitätsmessungen der Proteasen. Auch auf eine relevante Rolle des p-KLKs in der Plg-Aktivierung fanden sich keine Hinweise. Aus diesen Resultaten ergibt sich allerdings die Frage, was zur Aktivierung der beiden Proteasen im Tubulussystem führt. In Untersuchungen an uPA-Knockout-Mäusen konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass der uPA hauptsächlich für die Plg-Konversion zu Plasmin verantwortlich zu sein scheint [117]. Ein möglicher Aktivator des p-KLKs ist Faktor XIIa [118]. Zu bedenken ist, dass bei der Vielzahl an Proteinen und Proteasen, die beim nephrotischen Syndrom aberrant in das Tubulussystem gelangen, viele Interaktionen möglich sind und viele Kaskaden bezüglich der Proteasen-Aktivierung parallel ablaufen könnten. In Gesamtschau der Untersuchungen der Proteasen ergibt sich, dass im Rahmen der nephrotischen Proteinurie sowohl Plg beziehungsweise Plasmin als auch p-KLK in das Tubulussystem der Niere gelangen und dort auch in aktiver Form vorliegen, entsprechend einer Proteasurie. Dass die Plasminaktivität im

nephrotischen Urin der *klkb1*^{-/-}-Tiere keinen signifikanten Unterschied zu den *klkb1*^{+/+}-Tieren aufwies, spricht dafür, dass p-KLK eine untergeordnete Rolle in der tubulären Plg-Aktivierung spielt. Dies ist deshalb von besonderer Relevanz, da Plasmin als möglicher Hauptakteur in der proteolytischen ENaC-Aktivierung angesehen wird und die Plg-Konversion durch p-KLK möglich ist [21, 22, 65, 77].

4.2 Plasminogen-defiziente Mäuse

4.2.1 Kontrollbedingungen

Die drei unterschiedlichen Genotypen (*Plg*^{+/+}, *Plg*^{+/-}, *Plg*^{-/-}) spiegelten sich in der Plasmakonzentration des Plgs wider. Während die *Plg*^{+/+}-Mäuse eine Konzentration von 260 ± 11 µg/ml aufwiesen, besaßen die *Plg*^{+/-}-Tiere mit einer Konzentration von 136 ± 11 µg/ml ungefähr die halbe Plg-Konzentration. Im Blut der *Plg*^{-/-}-Mäuse ließ sich erwartungsgemäß kein Plg nachweisen. Somit ist jedes Allel jeweils für die Hälfte des vorhandenen Plgs in gesunden Mäusen verantwortlich.

Bezüglich der Gewichtsentwicklung in den ersten Lebenswochen zeigte sich, dass die *Plg*^{-/-}-Mäuse signifikant leichter waren als die *Plg*^{+/+}- und *Plg*^{+/-}-Mäuse, welche zu jedem Zeitpunkt praktisch gleich schwer waren. Diese Beobachtung deckt sich mit bisherigen Untersuchungen. In diesen entsprachen *Plg*^{-/-}-Mäuse bei zusätzlicher Fibrinogen-Defizienz konstitutionell den Wildtyp-Mäusen. Das eingeschränkte Gedeihen ist demnach vor allem den spontan entstanden Thromben geschuldet, deren Fibrinolyse durch die Plg-Defizienz deutlich eingeschränkt ist. Gleichzeitig entstanden bei fehlendem Fibrinogen auch weniger Thromben, sodass die reduzierte Fibrinolyse nicht mehr zum Tragen kam [92, 93]. Die *Plg*^{+/-}-Mäuse in dieser Arbeit besaßen noch genug Plg, um unter Kontrollbedingungen keine konstitutionelle Einschränkung gegenüber den *Plg*^{+/+}-Mäusen aufzuweisen. Die Hälfte der physiologischen Plg-Konzentration reichte dementsprechend immer noch aus, um der Thrombenbildung und weiteren kritischen Folgen genügend vorzubeugen.

4.2.2 Verlauf des experimentellen nephrotischen Syndroms in der Akutphase und in der Langzeitbeobachtung

In der Untersuchung der Plg-defizienten Mäuse konnten zwei Verläufe festgestellt werden. Während die *Plg^{+/-}*- und *Plg^{-/-}*-Mäuse keine signifikanten Unterschiede zeigten, grenzten sich die *Plg^{-/-}*-Mäuse von den beiden anderen Genotypen ab. Die *Plg^{+/-}*- und *Plg^{-/-}*-Mäuse entwickelten nach Injektion von Doxorubicin eine massive Proteinurie und deutliche Ödeme beziehungsweise Aszites, im Sinne eines nephrotischen Syndroms. Im Rahmen der Proteinurie kam es zudem zu einer massiven Plasmin(ogen)urie, die bei den *Plg^{-/-}*-Mäusen niedriger war. Die Plasmin(ogen)urie der *Plg^{+/-}*- und *Plg^{-/-}*-Mäuse unterschied sich nicht signifikant, obwohl die *Plg^{-/-}*-Mäuse nur ungefähr die Hälfte der Plg-Menge der *Plg^{+/-}*-Mäuse im Plasma aufwiesen. Dies ist mutmaßlich einer zu geringen Anzahl an Proben, in denen die Plasmin(ogen)urie erhoben wurde, geschuldet. Auch bezüglich ihres sonstigen klinischen Verlaufs unterschieden sich die beiden Genotypen nicht. Nachdem die Proteinurie signifikant angestiegen war, folgte eine Steigerung der Na⁺-Retention, sodass der Urin dieser Mäuse an den Tagen 6 bis 8 praktisch frei von Na⁺ war. Die erhöhte Na⁺-Retention führte wiederum zu einer Wasserretention, sodass sich Ödeme und ein deutlicher Aszites entwickelten. Dem anfänglichen Gewichtsverlust von ungefähr 5% des Ausgangsgewichtes folgte, durch die gesteigerte Na⁺-Resorption, eine deutliche Gewichtszunahme. Die Wildtypen und die heterozygoten Tiere erreichten an Tag 10 das Maximum der Gewichtsamplitude mit $22,5 \pm 1,1$ % (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise $21,1 \pm 1,3$ % (*Plg^{+/-}*) ihres Ausgangsgewichtes. Die initiale Abnahme ist am ehesten eine Folge der Inappetenz, die als Nebenwirkung von Doxorubicin bekannt ist [85]. Im weiteren Verlauf stieg die Harnstoff-Konzentration im Plasma innerhalb der Tage 10 bis 20 signifikant gegenüber dem Ausgangswert an und hielt sich auf diesem stark erhöhten Niveau. Ab diesem Zeitpunkt waren die Mäuse somit niereninsuffizient, sodass bis Tag 49 (*Plg^{+/+}*) beziehungsweise Tag 40 (*Plg^{+/-}*) die Hälfte der Ausgangspopulation gestorben war. In den Nieren zeigte sich 80 Tage nach Injektion des Doxorubicins in der PAS-Färbung das Bild einer FSGS, wie sie beim Doxorubicin-induzierten nephrotischen Syndrom vorbeschrieben ist [96, 119].

Die *Plg*^{-/-}-Mäuse entwickelten dagegen maximal eine Proteinurie von 32 ± 20 mg/mg Krea. Eine Abnahme der Na⁺-Ausscheidung im Urin blieb aus und auch das Gewicht der Mäuse hielt sich auf dem Niveau der Inappetenz-Phase. Entsprechend des Plg-Knockouts konnte im Plasma und im Urin kein Plg nachgewiesen werden. Auch im Langzeitverlauf ergaben sich keine pathologischen Auffälligkeiten. So stieg die Harnstoff-Konzentration im Plasma nicht an und es verstarb auch keine Maus im Beobachtungszeitraum von 80 Tagen. In der PAS-Histologie waren, im Gegensatz zu den *Plg*^{+/+}- und *Plg*^{+/-}-Tieren, keine fibrotischen Veränderungen zu sehen. Plg ist somit ein essenzieller Faktor, damit Mäuse nach Injektion von Doxorubicin ein nephrotisches Syndrom in all seinen vorbeschriebenen Ausprägungen entwickeln. *In vitro* konnte dazu passend gezeigt werden, dass bei Fehlen von Plg grundsätzlich eine podozytäre Schädigung geschieht, diese jedoch in der Gegenwart von Plg signifikant höher ist [54]. So scheint Plg eine Art katalytische Wirkung auf den podozytären Schaden zu besitzen und einen erhöhten oxidativen Stress auszulösen. *In vivo* konnte im PAN-Modell an Ratten ebenfalls festgestellt werden, dass vermehrt Plg beziehungsweise Plasmin in den Glomeruli nachgewiesen werden konnte und Marker für den oxidativen Stress erhöht waren. In der Folge entwickelte sich auch in diesem Modell eine ausgeprägte Proteinurie und Plasmin(ogen)urie [56]. Außerdem hatte die Gabe von Amilorid einen protektiven Effekt auf die podozytäre Schädigung, den oxidativen Stress und die Proteinurie. Dies wurde am ehesten im Rahmen der Inhibition des uPA durch Amilorid und der damit verbundenen reduzierten Aktivierung von Plg zu Plasmin interpretiert [56]. Die These, dass der uPA hauptsächlich für die Umsetzung von Plg zu Plasmin verantwortlich ist, konnte durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe gestützt werden. Dabei wurden uPA-Knockout-Mäuse untersucht, bei welchen keine Plasminaktivität mehr im Urin nachgewiesen werden konnte. Da diese Mäuse jedoch nach der Gabe von Doxorubicin das klassische nephrotische Bild entwickelten, scheint die Konversion von Plg zu Plasmin durch den uPA im Doxorubicin-Modell keine essenzielle Rolle zu spielen [120]. Im Anti-GBM-Modell bei Ratten wurde die Rolle von Plasmin ebenfalls untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ϵ -Aminocapronsäure (EACA) und der Serinproteaseinhibitor

Aprotinin die Proteinurie und den oxidativen Stress supprimieren [121-123]. EACA besitzt die Fähigkeit Plg-Rezeptoren zu blockieren und damit die Konversion zu Plasmin zu verhindern [27]. Neben der Bedeutung des Plgs in murinen Krankheitsmodellen konnte auch bei Menschen mit einer FSGS eine erhöhte Plg-Konzentration sowohl in den Glomeruli als auch im Urin festgestellt werden [56].

4.2.3 Glomeruläre Bindung von Plasminogen

Um die pathogene Wirkung des Plgs am glomerulären Filtrationsapparat genauer zu untersuchen, erfolgten weitere histologische Färbungen aus Nieren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Doxorubicin-Gabe entnommen wurden. In den immunhistochemischen Färbungen konnte acht Stunden nach der Doxorubicin-Injektion eine Bindung von Plg in den Glomeruli der *Plg^{+/+}* und *Plg^{+/-}*-Tiere nachgewiesen werden. Dies war 48 Stunden nach Injektion nicht mehr der Fall, hier befand sich das Plg im Tubulussystem, jedoch nicht mehr in den Glomeruli. Auch per Immunfluoreszenz war Plg acht Stunden *post injectionem* in den Glomeruli zu finden. Zu beachten ist, dass Plg nahezu ausschließlich an glomerulären Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Es ergaben sich weder Hinweise auf eine podozytäre Bindung des Plgs noch auf eine Bindung mit anderen Endothelzellen, beispielsweise im Bereich der Vasa recta. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine entscheidende Interaktion des Plgs innerhalb der ersten 48 Stunden nach Gabe von Doxorubicin an den glomerulären Endothelzellen stattfindet. Auch Jeansson et al. stellten die Bedeutung des glomerulären Endothels in den Vordergrund und konnten im Rahmen der Doxorubicin-induzierten Proteinurie eine deutliche Reduktion der endothelialen Glykokalyx feststellen [90]. In diesem Modell wurde zudem die toxische Wirkung per Schädigung der DNA sowohl für die glomerulären Endothelzellen wie auch für die Podozyten festgestellt. Die Endothelzellen stellten dabei die Zellen dar, an denen diese toxische DNA-Schädigung zuerst stattfindet [89]. Untersuchungen der diabetischen Nephropathie widmeten sich ebenfalls der pathophysiologischen Bedeutung des glomerulären Endothels und ob dieses den Ausgangspunkt der glomerulären Schädigung darstellt. Die Autoren merken

dabei an, dass das Endothel und die Podozyten zusammen für die Aufrechterhaltung einer intakten Filtrationsbarriere nötig sind und stellen die Vermutung auf, dass auch ihre pathophysiologischen Rollen nicht klar voneinander zu trennen sind [124]. Denn zwischen diesen zwei Zellarten findet eine ständige Kommunikation statt, sodass sowohl das Endothel als auch die Podozyten als primäre Zielzellen dienen und sich wechselseitig beeinflussen könnten [125]. VEGF oder auch suPAR sind Beispiele für Stoffe, durch die diese Kommunikation geschehen kann [51, 55]. Dass nur eine der zwei Zellarten für die Etablierung eines glomerulären Schadens verantwortlich ist, ist deshalb unwahrscheinlich. Es muss dementsprechend bedacht werden, dass die histologischen Untersuchungen dieser Arbeit nur Momentaufnahmen sind. Eine Assoziation von Plg und Endothelzellen schließt weitere Interaktionen zu einem anderen Zeitpunkt nicht aus. Daher wäre eine spätere, direkte Wirkung von Plg auf die Podozyten ebenfalls denkbar, da die Plg-Bindung bereits lange vor der Proteinurie nachweisbar ist. So muss Plg auch entsprechend der Filtrationsrichtung zunächst die Schicht der Endothelzellen räumlich überwinden, um die Podozyten zu erreichen. Auszuschließen ist zudem nicht, dass der Nachweis von Plg auf der Seite des Endothels auf einer Plg-Produktion der Endothelzellen beruht.

In einem weiteren Ansatz sollte durch die Applikation murinen Plgs untersucht werden, ob substituiertes Plg glomerulär gebunden wird und die induzierte Proteinurie, als Ausdruck der glomerulären Schädigung, dadurch gesteigert werden könnte. Dazu erfolgte eine intravenöse Injektion murinen Plgs, kurz vor Gabe des Doxorubicins. Immunhistologisch ließ sich jedoch kein Plg in den Glomeruli nachweisen und auch die Proteinurie stieg nicht an. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Substitution murinen Plgs keinen Effekt zeigte, könnte die geringe Dauer sein, in der das murine Plg vorhanden war. So wurde auch *in vitro* beschrieben, dass eine langfristige beziehungsweise „chronische“ Wirkung von Plg für den Podozytenschaden notwendig ist [54]. Die artifizielle Erhöhung der Plg-Konzentration in dieser Arbeit war dabei möglicherweise zu weit von der physiologischen, kontinuierlichen Plg-Konzentration im Plasma entfernt. Außerdem könnte ein Teil des injizierten Plgs bei der Fibrinolyse der

bereits, in Folge der Plg-Defizienz, spontan entstandenen Thromben verbraucht worden sein und die Glomeruli somit gar nicht erreicht haben.

4.2.4 Rolle des Plasminogen-Rezeptors Histon H2B

Die histologischen Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der endothelialen Plg-Lokalisation führte zu der Frage, an welchen Rezeptor Plg bindet. Der Histon H2B ist ein Plg-Rezeptor, der an glomerulären Endothelzellen vorkommt [30, 31]. Zudem ist der Histon H2B mit Zellschäden assoziiert [32, 33].

Sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Immunfluoreszenz konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu einer gesteigerten Expression des Histon H2Bs nach Gabe von Doxorubicin kommt. So kam es nach 8 Stunden zu einer deutlichen glomerulären Histon H2B Ansammlung. Diese war transient und anschließend nicht mehr nachweisbar. Bei Plg-Defizienz fand dies deutlich später statt, sodass wiederum eine beschleunigende Komponente der Auswirkungen des Doxorubicins durch Plg suggeriert wird. Dass die *Plg*^{-/-}-Mäuse ebenfalls eine deutliche Zunahme des Histon H2Bs zeigten, spricht daher dafür, dass die zellschädigende primäre Doxorubicin-Wirkung stattfindet, in der Folge jedoch die pathologische Kaskade gehemmt ist. Da die Expression des Histon H2B durch Zellschäden induziert werden kann, könnte Plg als Teil eines *circulus vitiosus* fungieren [32, 33]. So könnte Doxorubicin die Zelle primär schädigen, anschließend Plg an die Zelle binden und den Zellschaden verstärken, was wiederum zu einer erhöhten Expression des Histon H2Bs führt. Die Immunfluoreszenz ergab, dass Plg und Histon H2B eine deutliche Signalüberlagerung und somit Kolokalisation an der Oberfläche der Endothelzellen zeigen. Dass Plg also im Rahmen der glomerulären Schädigung durch den Histon H2B mit den Endothelzellen interagiert und an diesen Rezeptor bindet, ist anzunehmen. Allerdings schließen auch diese Ergebnisse wiederum nicht aus, dass auch andere Plg-Rezeptoren und andere Zellen an den pathophysiologischen Abläufen beteiligt sein könnten. An den Histon H2B gebundenes Plg könnte durch die Assoziation des Histon H2B mit dem uPAR in aktives Plasmin umgesetzt werden. Ein solches zellgebundenes Plasmin kann

unter anderem zum Abbau der extrazellulären Matrix und Zellmigration beitragen [32].

Auch weitere Faktoren des Plg-Systems wie andere Rezeptoren, Aktivatoren und Inhibitoren wurden bereits hinsichtlich ihrer Rolle im Rahmen der glomerulären Schädigung untersucht [24]. Einer der diskutierten Rezeptoren ist der uPAR, der an den Podozyten und an den Endothelzellen zu finden ist [24, 54, 126]. Der uPAR wurde in einer Studie hinsichtlich seiner Rolle in der glomerulären Schädigung und dem Zusammenhang mit dem Plg-Aktivator-Inhibitor PAI-1 untersucht. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass PAI-1 mit uPA einen Komplex bildet, welcher an Podozyten an den uPAR binden kann. Dieses Signal induzierte in den Podozyten die Endozytose von β 1-Integrin, wodurch es zur Ablösung der Podozyten kam. Zusätzlich kam es zur vermehrten PAI-1-Produktion durch das glomeruläre Endothel, was die podozytäre Schädigung und Ablösung weiter förderte. Dass die endotheliale PAI-1-Produktion gesteigert wurde, wurde mit der verminderten podozytären Produktion von VEGF erklärt. VEGF schien die endotheliale PAI-1-Produktion im physiologischen Zustand gehemmt zu haben. Durch die podozytäre Schädigung entstand ein *circulus vitiosus*. Diese Studie unterstreicht neben der Rolle des Plg-Systems zudem den Aspekt der interzellulären Kommunikation in der Pathophysiologie des glomerulären Schadens [125]. Der PAI-1 wird in pathologischen Zuständen vom glomerulären Epithel und den Podozyten vermehrt produziert [127]. PAI-1-Knockout-Mäuse in diabetischen Proteinurie-Modellen zeigten zudem eine verminderte Krankheitsprogression [128, 129]. Da aus einer PAI-1-Defizienz eine geringere Inhibition der Plg-Aktivatoren und damit eine höhere Plasminaktivität resultieren sollten, stehen die Untersuchungen an PAI-1-Knockout-Tieren in Widerspruch mit der Theorie, dass vor allem das aktive Plasmin eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie spielt. Die lösliche Form des uPARs (suPAR) ist im Zusammenhang mit verschiedenen Entitäten wie der FSGS, MCGN oder allgemein der chronischen Niereninsuffizienz aufgefallen [130, 131]. Der suPAR wurde zudem auch im Zusammenhang mit der Zellmotilität im Rahmen von Tumorerkrankungen untersucht [132]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der suPAR β 3-Integrine in den Podozyten aktiviert. Dadurch kam es zur

Reduktion der Fußfortsätze, anschließend zur Proteinurie und einem FSGS-ähnlichen Bild [133]. Bezüglich der intrazellulären und zytoskelettalen Vorgänge kristallisiert sich eine zentrale Rolle der bereits genannten Integrine $\beta 1$ und $\beta 3$ heraus. Integrine sind unter anderem für die Zelladhäsion verantwortlich. Mäuse mit genetisch induzierter $\beta 1$ -Defizienz entwickelten innerhalb der ersten drei Wochen nach Geburt eine massive podozytäre Dysfunktion [134].

Es existiert mit dem Rezeptor Plg-Rkt eine weitere Bindungsmöglichkeit für Plg. Dieser Rezeptor wurde unter anderem auf Makrophagen, Thrombozyten aber auch auf Podozyten nachgewiesen [135]. Der Plg-Rkt ist zudem im Glomerulus räumlich mit dem uPAR assoziiert [27, 28]. So könnte Plg zunächst an den Plg-Rkt binden und so auf den uPAR oder auch direkt auf die jeweilige Zelle Einfluss haben. Ein weiterer Rezeptor, der im Rahmen der Doxorubicin-induzierten Nephropathie untersucht wurde, ist der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1). Die Blockade des PAR1 führte zu einer Verminderung des Podozyten-Schadens und einer geringeren Supprimierung der Expression der zytoskelettalen Bestandteile Nephrin und Podocin [136]. Außerdem wurde bei *in vitro* Untersuchungen am PAR1 festgestellt, dass dessen Aktivierung zu einer Erhöhung der Podozyten-Motilität führt [137]. Die Aktivierung gelang dabei durch Plasma von Patienten mit einer FSGS. Es wird diskutiert, dass in diesem Plasma manche Proteasen aktiver sein und in der Folge zur FSGS führen könnten. Es wurde dabei herausgefunden, dass durch die PAR1-Aktivierung vermehrt das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) phosphoryliert wird [137]. Dies führte zur Desorganisation des Aktins und störte die zytoskelettale Struktur. Sowohl die PAR1-Inhibition als auch eine genetisch induzierte Funktionseinschränkung von Podocin erwiesen sich als protektiv. Somit scheint Podocin eine Verbindung zwischen PAR1-Signal und VASP-Phosphorylierung darzustellen. Diese Ergebnisse stehen mit den erhobenen Ergebnissen der *Plg*^{-/-}-Mäuse nach Doxorubicin-Injektion grundsätzlich in Einklang. Allerdings bleibt die fehlende Differenzierung zwischen Plg- und Plasminwirkung ein Diskussionspunkt. Sowohl eine denkbare Aktivierung durch Plasmin als auch eine direkte Signalwirkung über einen Plg-Rezeptor würde durch die Plg-Defizienz im Doxorubicin-Modell dieser Arbeit unterbunden werden. Die bisher

untersuchten Rezeptoren sind jedoch entweder selbst fähig Plg zu Plasmin umzusetzen oder sind mit entsprechenden aktivierenden Rezeptoren assoziiert. Kitching et al. untersuchten diesbezüglich die Rolle des Plg-Systems im Modell der unilateralen Ureterobstruktion der Maus. Auch sie kamen zu dem Schluss, dass das Plg-System einen verstärkenden Effekt auf die Pathogenese hat. Neben dem Ergebnis, dass Plasmin die Inflammation durch Makrophagen förderte, kamen sie zu dem Schluss, dass andere Komponenten des Plg-Systems wie der PAI-1, der uPAR oder der tPA unabhängig von einer Plg-Aktivierung zu Plasmin, einen fibrosierenden Effekt haben [138]. Anzumerken ist, dass eine vorherige Studie dieser Arbeitsgruppe Hinweise auf protektive Effekte des Plg-Systems bezüglich der Fibrosierung und der glomerulären Inflammation in einem Modell der Rapid-progressiven Glomerulonephritis ergab [139]. Diese Ergebnisse relativierten die Autoren jedoch durch die genannte Folgestudie und betonten die schädigende Funktion des Plgs durch eine Förderung der Fibrosierung [138].

4.2.5 Zusammenschau der Ergebnisse

In der Zusammenschau führt dies zu der Vermutung, dass die Funktionen einzelner Bestandteile des Plg-Systems in der Pathophysiologie der glomerulären Schädigung nicht zwingend mit den Funktionen im Rahmen der Fibrinolyse übereinstimmen müssen. Es müssen die unterschiedlichen Studien zur Rolle des Plg-Systems hinsichtlich mehrerer Faktoren differenziert werden, um die Ergebnisse besser bewerten zu können. So ergeben sich bereits durch die verschiedenen Modelle mögliche Unterschiede. Im Rahmen der Anthrazyklin-induzierten Nephropathien ist die Rolle der DNA-Schädigung von zentraler Bedeutung. So konnte durch unsere Arbeitsgruppe im Anschluss an die Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die gewünschten renalen Auswirkungen neben der Plg-Wirkung obligat vom Einzelnukleotid-Polymorphismus im Prkdc-Gen abhängig sind, das für ein DNA-Reparaturenzym codiert [113]. In den genannten anderen Studien wurden teilweise andere pathophysiologische Grundprinzipien zur Induktion des glomerulären Schadens genutzt, wie beispielsweise die diabetische Nephropathie oder antikörperbasierte

Modelle wie das Anti-GBM-Modell. So werden jeweils eigene pathophysiologische Kaskaden zu Grunde liegen, deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede es zu identifizieren gilt.

Hinsichtlich des ursprünglichen Ziels, die Rolle des Plgs im Rahmen der Ödementstehung zu untersuchen, kann entsprechend der Plg-Abhängigkeit des Doxorubicin-Modells festgehalten werden, dass die *Plg^{+/-}*-Mäuse den gleichen Verlauf wie die Wildtypen zeigten. Eine Halbierung der Plg-Konzentration im Blut führt zu einer geringeren Plasmin(ogen)urie, die Na⁺-Retention und die Gewichtszunahme im Rahmen des nephrotischen Syndroms waren allerdings gleichermaßen ausgeprägt. Allerdings konnte im nephrotischen Urin der *Plg^{+/-}*-Mäuse auch keine signifikant niedrigere Plg-Konzentration als bei den Wildtypen festgestellt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass sich dieser Unterschied bei größerer Probenzahl als signifikant herausgestellt hätte, da ein signifikanter Unterschied der Plg-Konzentration im Plasma vorlag. Des Weiteren ist ein Ergebnis dieser Arbeit, dass die Halbierung der Plg-Konzentration im Blut der *Plg^{+/-}*-Tiere keinen Einfluss auf die induzierte Proteinurie, als zentralen Marker des glomerulären Schadens, hatte. Indirekte Hinweise dafür, dass Plg und Plasmin nicht die entscheidenden Faktoren in der Ödementstehung sind, finden sich bei uPA-Knockout-Mäusen im Doxorubicin-Modell. Im nephrotischen Urin dieser Tiere konnte nahezu keine Plasminaktivität festgestellt werden, sie zeigten aber dennoch die ausgeprägte Gewichtszunahme der Wildtyp-Tiere. Dies unterstreicht zudem die Bedeutung des uPA in der Plg-Aktivierung [117].

4.3 Ausblick

Um die genauen Abläufe zu verstehen, die von der initialen Doxorubicin-Injektion zum letztendlichen Untergang der glomerulären Filtrationsbarriere und der Entwicklung des nephrotischen Syndroms und der Ödeme führen, ist für weitere Arbeiten eine Differenzierung der einzelnen Faktoren notwendig. Zu bedenken sind unter anderem die vielen möglichen Rezeptoren, an die Plg binden kann. Eine gesteigerte endotheliale Expression von Histon H2B als Folge des Doxorubicins und eine anschließende Bindung des Plgs kann postuliert werden.

Weitere Rezeptoren und die weiteren Mechanismen, die die jeweilige Rezeptor-Bindung bewirken, gilt es zu untersuchen. In diesem Kontext ergibt sich die schon aufgeworfene Frage der Relevanz der Plg-Aktivierung zu Plasmin. Um dies zu untersuchen könnten Versuche erfolgen, in denen parallel zur Gabe des Doxorubicins auch die Plasmin-Inhibitoren wie Aprotinin oder Amilorid verabreicht werden, die in anderen Arbeiten die glomeruläre Schädigung signifikant senken konnte. Zentral ist zudem die Rolle des Endothels und der Podozyten näher zu beleuchten. Vorstellbar wäre zum Beispiel auch eine Bindung des Plgs an die Podozyten zu anderen Zeitpunkten, als die in dieser Arbeit gewählt, zu untersuchen. Weitere Fragen ergeben sich bezüglich der gegenseitigen Kommunikation der genannten Zellen und der intrazellulären Abläufe, insbesondere die Auswirkungen auf das Zytoskelett. Außerdem sollten die einzelnen Komponenten des Plg-Systems (Plg, Rezeptoren, Aktivatoren, Inhibitoren) für jedes Modell getrennt betrachtet werden, um jeweils eine möglichst spezifische Rolle in der pathophysiologischen Kaskade zuweisen zu können.

Bezüglich der Ödementstehung sollte in Zukunft die Rolle weiterer Proteasen, beispielsweise durch genetische Defizienz, *in vivo* untersucht werden. P-KLK allein spielt nach den Ergebnissen dieser Arbeit keine entscheidende Rolle. Bezüglich der Rolle von Plg/Plasmin bei der Ödementstehung muss auf Plg-unabhängige Modelle bezüglich der Induktion des nephrotischen Syndroms zurückgegriffen werden. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe war Plg in einem genetischen Modell per induzierbarem Podocin-Knockout beispielsweise nicht entscheidend für die Ödementstehung [140]. Zu bedenken ist außerdem die Möglichkeit, dass mehrere Proteasen zusammen für die Ödementwicklung verantwortlich sein könnten. Potenzielle Proteasen sind die, bei denen die Fähigkeit den ENaC zu aktivieren schon *in vitro* nachgewiesen wurde. Ein weiteres Charakteristikum stellt die Inhibierbarkeit durch Aprotinin dar, da durch dessen Gabe die Ödembildung verhindert werden konnte [80]. Um weitere mögliche Proteasen zu finden, könnten zudem Proteom-Analysen nephrotischen Urins sowohl von Menschen als auch von Mäusen hilfreich sein [62].

5 Zusammenfassung

Die zentralen Befunde des nephrotischen Syndroms stellen eine massive Proteinurie durch einen Podozytenniedergang sowie eine ausgeprägte Ödembildung dar. Aberrant filtrierte Proteasen geraten hinsichtlich der Pathomechanismen dabei vermehrt in den Fokus. Diese Dissertation befasste sich mit den Serinproteasen Plasminogen und Plasma-Kallikrein im Rahmen des Doxorubicin-induzierten nephrotischen Syndroms der Maus. Beide Proteasen können *in vitro* die Na⁺-Retention durch Aktivierung des ENaCs steigern. Daher wurde durch Knockout-Mäuse für die jeweilige Protease untersucht, ob eine Proteasen-Defizienz zu einer geringeren Retention und Gewichtszunahme führt. Da das Plg-System zudem zunehmend mit dem glomerulären Schaden in Verbindung gebracht wird, lag auf diesem Aspekt ein weiteres Augenmerk.

Die *klkb1*^{-/-}-Mäuse zeigten den typischen Verlauf des nephrotischen Syndroms, sodass geschlussfolgert werden konnte, dass p-KLK kein essenzieller Faktor in der Ödementstehung ist. Auch zur Aktivierung des Plgs zu Plasmin trug p-KLK keinen signifikanten Anteil bei. Die *Plg*^{-/-}-Mäuse hingegen entwickelten nicht die notwendige Proteinurie, um von einem nephrotischen Syndrom zu sprechen. Die Rolle des Plgs in der Ödementstehung konnte daher nicht untersucht werden. Dass die *Plg*^{-/-}-Mäuse vor der Wirkung des Doxorubicins geschützt waren, zeigte sich auch im Langzeitverlauf und deutet auf eine signifikante Rolle des Plgs im Rahmen der glomerulären Schädigung hin. Eine Interaktion zwischen Plg und Glomerulus konnte histologisch auf der Seite des Endothels nachgewiesen werden. Diese Bindung konnte durch eine kurzzeitige Plg-Substitution nicht erreicht werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Plg-Rezeptor Histon H2B nach Gabe von Doxorubicin vermehrt im Glomerulus exprimiert wird. Die Lokalisation des Histon H2B an der endothelialen Zelloberfläche entsprach dabei der des Plgs, sodass von einer Bindung an diesem Rezeptor auszugehen ist. Doxorubicin setzt somit eine Kaskade in Gang, die Plg und die glomerulären Endothelzellen miteinbezieht und letztlich zum Podozytenuntergang und dem Auftreten einer nephrotischen Proteinurie führt.

6 Literaturverzeichnis

1. Rassow, J., et al., *Duale Reihe Biochemie*. 2016: Thieme.
2. López-Otín, C. and J.S. Bond, *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease*. The Journal of biological chemistry, 2008. 283(45): p. 30433-30437.
3. Page, M.J., E.J.C. Di Cera, and M.L. Sciences, *Serine peptidases: Classification, structure and function*. 2008. 65(7): p. 1220-1236.
4. Di Cera, E., *Serine proteases*. IUBMB life, 2009. 61(5): p. 510-515.
5. Barrett, A.J., *Proteases*. Curr Protoc Protein Sci, 2001. Chapter 21: p. Unit 21.1.
6. Bhoola, K.D., C.D. Figueroa, and K. Worthy, *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*. Pharmacological Reviews, 1992. 44(1): p. 1.
7. Clements, J., et al., *The Expanded Human Kallikrein (KLK) Gene Family: Genomic Organisation, Tissue-Specific Expression and Potential Functions*, in *Biological Chemistry*. 2001. p. 5.
8. Weiser, P., et al., *Activated Contact System and Abnormal Glycosaminoglycans in Lupus and other Auto- and Non-Autoimmune Diseases*, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, L. Zhang, Editor. 2010, Academic Press. p. 443-472.
9. Levinsky, N.G., *The renal kallikrein-kinin system*. Circ Res, 1979. 44(4): p. 441-51.
10. Sharma, J.N., *Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system*. Arch Med Res, 2006. 37(3): p. 299-306.
11. Colman, R.W., *Role of the Light Chain of High Molecular Weight Kininogen in Adhesion, Cell-Associated Proteolysis and Angiogenesis*. Biological Chemistry, 2001. 382(1): p. 65-70.
12. Blais, C., Jr., et al., *The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins*. Peptides, 2000. 21(12): p. 1903-40.
13. Silbernagl, S., *Taschenatlas Physiologie*. 2012: Thieme.
14. Ponticelli, C. and P.L. Meroni, *Kallikreins and lupus nephritis*. The Journal of clinical investigation, 2009. 119(4): p. 768-771.
15. Girolami, A., et al., *Congenital prekallikrein deficiency*. Expert Rev Hematol, 2010. 3(6): p. 685-95.
16. Selvarajan, S., et al., *A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation*. Nature cell biology, 2001. 3(3): p. 267-275.
17. Miyashita, C., E. Wenzel, and M. Heiden, *Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function*. Haemostasis, 1988. 18 Suppl 1: p. 7-13.
18. Andreasen*, P.A., et al., *The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis*. 2000. 57(1): p. 25-40.
19. Raum, D., et al., *Synthesis of human plasminogen by the liver*. Science (New York, N.Y.), 1980. 208(4447): p. 1036-1037.

20. Castellino, F.J. and V.A. Ploplis, *Structure and function of the plasminogen/plasmin system*. Thromb Haemost, 2005. 93(04): p. 647-654.
21. Colman, R.W., *Activation of plasminogen by human plasma kallikrein*. Biochem Biophys Res Commun, 1969. 35(2): p. 273-9.
22. Miles, L.A., J.S. Greengard, and J.H. Griffin, *A comparison of the abilities of plasma kallikrein, beta-Factor XIIIa, Factor XIa and urokinase to activate plasminogen*. Thromb Res, 1983. 29(4): p. 407-17.
23. Sappino, A.P., et al., *Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney*. The Journal of Clinical Investigation, 1991. 87(3): p. 962-970.
24. Svenningsen, P., et al., *Physiology and pathophysiology of the plasminogen system in the kidney*. 2017. 469(11): p. 1415-1423.
25. Thunø, M., B. Macho, and J. Eugen-Olsen, *suPAR: the molecular crystal ball*. Dis Markers, 2009. 27(3): p. 157-72.
26. Wei, C., et al., *Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor*. Nature Medicine, 2008. 14(1): p. 55-63.
27. Andronicos, N.M., et al., *Proteomics-based discovery of a novel, structurally unique, and developmentally regulated plasminogen receptor, Plg-RKT, a major regulator of cell surface plasminogen activation*. Blood, 2010. 115(7): p. 1319-1330.
28. Lighvani, S., et al., *Regulation of macrophage migration by a novel plasminogen receptor Plg-R KT*. Blood, 2011. 118(20): p. 5622-5630.
29. Miles, L.A., et al., *New insights into the role of Plg-RKT in macrophage recruitment*. Int Rev Cell Mol Biol, 2014. 309: p. 259-302.
30. Plow, E.F., L. Dœuvre, and R. Das, *So many plasminogen receptors: why?* J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: p. 141806.
31. Herren, T., et al., *Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor*. Biochemistry, 2006. 45(31): p. 9463-74.
32. Izem, L., et al., *Plasminogen-induced foam cell formation by macrophages occurs through a histone 2B (H2B)-PAR1 pathway and requires integrity of clathrin-coated pits*. J Thromb Haemost, 2021. 19(4): p. 941-953.
33. Ploplis, V.A., et al., *Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice*. Blood, 1998. 91(6): p. 2005-9.
34. Bai, H., S. Nangia, and R.J. Parmer, *The plasminogen activation system and the regulation of catecholaminergic function*. J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: p. 721657.
35. Urano, T., F.J. Castellino, and Y. Suzuki, *Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin*. J Thromb Haemost, 2018. 16(8): p. 1487-97.
36. Wang, C.S. and L.A. Greenbaum, *Nephrotic Syndrome*. Pediatr Clin North Am, 2019. 66(1): p. 73-85.
37. Kasper, D.L., et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine, Twentieth Edition (Vol.1 & Vol.2)*. 2018: McGraw-Hill Education.
38. Barisoni, L., H.W. Schnaper, and J.B. Kopp, *A Proposed Taxonomy for the Podocytopathies: A Reassessment of the Primary Nephrotic Diseases*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2007. 2(3): p. 529.

39. Wang, C.-s. and L.A. Greenbaum, *Nephrotic Syndrome*. Pediatric Clinics of North America, 2019. 66(1): p. 73-85.
40. Vivarelli, M., et al., *Minimal Change Disease*. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2017. 12(2): p. 332-345.
41. Bomback, A.S. and F.C. Fervenza, *Membranous Nephropathy: Approaches to Treatment*. American Journal of Nephrology, 2018. 47(suppl 1)(1): p. 30-42.
42. Campbell, K.N. and J.A. Tumlin, *Protecting Podocytes: A Key Target for Therapy of Focal Segmental Glomerulosclerosis*. American journal of nephrology, 2018. 47 Suppl 1(Suppl 1): p. 14-29.
43. Lüllmann-Rauch, R. and F. Paulsen, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2012: Thieme.
44. Garg, P., *A Review of Podocyte Biology*. American Journal of Nephrology, 2018. 47(suppl 1)(1): p. 3-13.
45. Simic, I., M. Tabatabaeifar, and F.J.P.N. Schaefer, *Animal models of nephrotic syndrome*. 2013. 28(11): p. 2079-2088.
46. Pape, H.C., A. Kurtz, and S. Silbernagl, *Physiologie*. 2023: Thieme.
47. Pollak, M.R., et al., *The glomerulus: the sphere of influence*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. 9(8): p. 1461-9.
48. Obeidat, M., M. Obeidat, and B.J. Ballermann, *Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier*. Exp Cell Res, 2012. 318(9): p. 964-72.
49. Ballermann, B.J., *Glomerular endothelial cell differentiation*. Kidney Int, 2005. 67(5): p. 1668-71.
50. Ballermann, B.J., *Contribution of the endothelium to the glomerular permselectivity barrier in health and disease*. Nephron Physiol, 2007. 106(2): p. p19-25.
51. Daehn, I.S. and J.S. Duffield, *The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies*. Nat Rev Drug Discov, 2021. 20(10): p. 770-788.
52. Tryggvason, K. and J. Wartiovaara, *Molecular basis of glomerular permselectivity*. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2001. 10(4).
53. Mundel, P. and S.J. Shankland, *Podocyte Biology and Response to Injury*. Journal of the American Society of Nephrology, 2002. 13(12): p. 3005.
54. Raji, L., et al., *Podocyte injury: the role of proteinuria, urinary plasminogen, and oxidative stress*. 2016. 311(6): p. F1308-F1317.
55. Fu, J., et al., *Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease*. American journal of physiology. Renal physiology, 2015. 308(4): p. F287-F297.
56. Egerman, M.A., et al., *Plasminogenuria is associated with podocyte injury, edema, and kidney dysfunction in incident glomerular disease*. Faseb j, 2020. 34(12): p. 16191-16204.
57. Hull, R.P. and D.J.A. Goldsmith, *Nephrotic syndrome in adults*. BMJ (Clinical research ed.), 2008. 336(7654): p. 1185-1189.
58. Doiron, S., et al., *Association between circulating PCSK9 and proteinuria in nephrotic syndrome: A cross-sectional study*. Clinical Biochemistry, 2022. 109-110: p. 51-56.

59. Artunc, F., *Kidney-derived PCSK9-a new driver of hyperlipidemia in nephrotic syndrome?* *Kidney Int*, 2020. 98(6): p. 1393-1395.
60. Artunc, F., et al., *Proteasuria-The impact of active urinary proteases on sodium retention in nephrotic syndrome.* *Acta Physiol (Oxf)*, 2019. 225(4): p. e13249.
61. Svenningsen, P., et al., *Urinary serine proteases and activation of ENaC in kidney—implications for physiological renal salt handling and hypertensive disorders with albuminuria.* 2015. 467(3): p. 531-542.
62. Wörn, M., et al., *Proteasuria in nephrotic syndrome-quantification and proteomic profiling.* *J Proteomics*, 2021. 230: p. 103981.
63. Bockenhauer, D.J.P.N., *Over- or underfill: not all nephrotic states are created equal.* 2013. 28(8): p. 1153-1156.
64. Cadnapaphornchai, M.A., et al., *The nephrotic syndrome: pathogenesis and treatment of edema formation and secondary complications.* *Pediatric Nephrology*, 2014. 29(7): p. 1159-1167.
65. Svenningsen, P., et al., *Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel.* *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2009. 20(2): p. 299-310.
66. Canessa, C.M., et al., *Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits.* *Nature*, 1994. 367(6462): p. 463-467.
67. Snyder, P.M., et al., *Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel.* 1994. 269(39): p. 24379-24383.
68. Wang, Y.-B., et al., *Sodium Transport Is Modulated by p38 Kinase–Dependent Cross-Talk between ENaC and Na,K-ATPase in Collecting Duct Principal Cells.* *Journal of the American Society of Nephrology*, 2014. 25(2): p. 250.
69. Palmer, L.G., et al., *Regulation and dysregulation of epithelial Na⁺ channels.* 2012. 16(1): p. 35-43.
70. Masilamani, S., et al., *Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β , and γ subunit proteins in rat kidney.* *The Journal of Clinical Investigation*, 1999. 104(7): p. R19-R23.
71. Firsov, D., et al., *Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. 93(26): p. 15370-15375.
72. Kelly, O., et al., *Characterization of an amiloride binding region in the α -subunit of ENaC.* *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2003. 285(6): p. F1279-F1290.
73. Hughey, R.P., et al., *Epithelial Sodium Channels Are Activated by Furin-dependent Proteolysis.* *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(18): p. 18111-18114.
74. Vallet, V., et al., *An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel.* *Nature*, 1997. 389(6651): p. 607-610.
75. Passero, C.J., et al., *Plasmin activates epithelial Na⁺ channels by cleaving the gamma subunit.* *The Journal of biological chemistry*, 2008. 283(52): p. 36586-36591.
76. Caldwell, R.A., R.C. Boucher, and M.J. Stutts, *Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na⁺ channels and increases airway*

- epithelial Na⁺ transport*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2005. 288(5): p. L813-L819.
77. Passero, C.J., R.P. Hughey, and T.R. Kleyman, *New role for plasmin in sodium homeostasis*. Current opinion in nephrology and hypertension, 2010. 19(1): p. 13-19.
78. Patel, A.B., J. Chao, and L.G. Palmer, *Tissue kallikrein activation of the epithelial Na channel*. American journal of physiology. Renal physiology, 2012. 303(4): p. F540-F550.
79. Bruns, J.B., et al., *Epithelial Na⁺ Channels Are Fully Activated by Furin- and Prostaticin-dependent Release of an Inhibitory Peptide from the γ -Subunit*. Journal of Biological Chemistry, 2007. 282(9): p. 6153-6160.
80. Bohnert, B.N., et al., *Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome*. Kidney International, 2018. 93(1): p. 159-172.
81. Liebeskind, D.S., *Chapter 26 - Nephrotic syndrome*, in *Handbook of Clinical Neurology*, J. Biller and J.M. Ferro, Editors. 2014, Elsevier. p. 405-415.
82. Davin, J.C. and N.W. Rutjes, *Nephrotic syndrome in children: from bench to treatment*. International journal of nephrology, 2011. 2011: p. 372304-372304.
83. Faul, C., et al., *The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A*. Nature medicine, 2008. 14(9): p. 931-938.
84. Xing, C.Y., et al., *Direct effects of dexamethasone on human podocytes*. Kidney International, 2006. 70(6): p. 1038-1045.
85. Pereira, W.d.F., et al., *The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update*. 2015. 64(5): p. 287-301.
86. Wang, Y., et al., *Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events*. Kidney International, 2000. 58(4): p. 1797-1804.
87. Mizutani, H., et al., *Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper(II) and NADPH-cytochrome P450 reductase*. Cancer Sci, 2003. 94(8): p. 686-91.
88. Zheng, Z., et al., *An Ancestral Haplotype Defines Susceptibility to Doxorubicin Nephropathy in the Laboratory Mouse*. Journal of the American Society of Nephrology, 2006. 17(7): p. 1796.
89. Papeta, N., et al., *Prkdc participates in mitochondrial genome maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice*. The Journal of clinical investigation, 2010. 120(11): p. 4055-4064.
90. Jeansson, M., et al., *Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria*. J Am Soc Nephrol, 2009. 20(1): p. 114-22.
91. LEE, V.W. and D.C. HARRIS, *Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis*. 2011. 16(1): p. 30-38.
92. Bugge, T.H., et al., *Loss of Fibrinogen Rescues Mice from the Pleiotropic Effects of Plasminogen Deficiency*. Cell, 1996. 87(4): p. 709-719.
93. Bugge, T.H., et al., *Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction*. 1995. 9(7): p. 794-807.

94. Green, K.A., et al., *Lack of plasminogen leads to milk stasis and premature mammary gland involution during lactation*. *Developmental Biology*, 2006. 299(1): p. 164-175.
95. Wang, B., et al., *The Plasma Kallikrein-Kininogen Pathway Is Critical in the Pathogenesis of Colitis in Mice*. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 21.
96. Artunc, F., et al., *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome*. 2008. 295(6): p. F1624-F1634.
97. Bohnert, B.N., 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*. *Lab Anim*, 2019. 53(6): p. 564-576.
98. Vuong, S. and P. Delgado-Olguin, *Mouse Genotyping*, in *Mouse Embryogenesis: Methods and Protocols*, P. Delgado-Olguin, Editor. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 1-9.
99. Dubois, V.A., et al., *gDNA extraction from Candida albicans and Candida dubliniensis in subgingival samples in Argentina. Evaluation of different methods*. *Acta Odontol Latinoam*, 2023. 36(2): p. 78-85.
100. Tan, S.C. and B.C. Yiap, *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present*. *J Biomed Biotechnol*, 2009. 2009: p. 574398.
101. Canene-Adams, K., *General PCR*. *Methods Enzymol*, 2013. 529: p. 291-8.
102. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
103. Hervey, G.R., *Determination of creatinine by the Jaffé reaction*. *Nature*, 1953. 171(4364): p. 1125.
104. Fawcett, J.K. and J.E. Scott, *A rapid and precise method for the determination of urea*. *J Clin Pathol*, 1960. 13(2): p. 156-9.
105. Tisi, R., E. Martegani, and R.L. Brandão, *Total Cellular Ca²⁺ Measurements in Yeast Using Flame Photometry*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015. 2015(2): p. pdb.prot076869.
106. Macintyre, I., *Flame photometry*. *Adv Clin Chem*, 1961. 4: p. 1-28.
107. Tabatabaei, M.S. and M. Ahmed, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. *Methods Mol Biol*, 2022. 2508: p. 115-134.
108. Ito, R. and B.E. Statland, *Centrifugal analysis for plasma kallikrein activity, with use of the chromogenic substrate S-2302*. *Clin Chem*, 1981. 27(4): p. 586-93.
109. Hnasko, T.S. and R.M. Hnasko, *The Western Blot*, in *ELISA: Methods and Protocols*, R. Hnasko, Editor. 2015, Springer New York: New York, NY. p. 87-96.
110. Gomori, G., *The periodic-acid Schiff stain*. *Am J Clin Pathol*, 1952. 22(3): p. 277-81.
111. Abreu Velez, A.M., Y.A. Upegui Zapata, and M.S. Howard, *Periodic Acid-Schiff Staining Parallels the Immunoreactivity Seen By Direct Immunofluorescence in Autoimmune Skin Diseases*. *N Am J Med Sci*, 2016. 8(3): p. 151-5.

112. Haerteis, S., et al., *Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice*. 2018. 224(1): p. e13060.
113. Bohnert, B.N., et al., *Essential role of DNA-PKcs and plasminogen for the development of doxorubicin-induced glomerular injury in mice*. Dis Model Mech, 2021. 14(9).
114. Picard, N., et al., *Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice*. J Biol Chem, 2008. 283(8): p. 4602-11.
115. Orthner, C.L., *Characterization of proteases in AHF concentrates: effect on factor VIII: von Willebrand protein as assessed by high-pressure gel permeation chromatography*. J Lab Clin Med, 1984. 104(5): p. 816-28.
116. Tans, G., et al., *Studies on the effect of serine protease inhibitors on activated contact factors. Application in amidolytic assays for factor XIIa, plasma kallikrein and factor XIa*. Eur J Biochem, 1987. 164(3): p. 637-42.
117. Bohnert, B.N., et al., *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome*. Acta Physiologica, 2019. 227(4): p. e13286.
118. Song, D.Y., et al., *Activation of Factor XII and Kallikrein-Kinin System Combined with Neutrophil Extracellular Trap Formation in Diabetic Retinopathy*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2021. 129(8): p. 560-565.
119. Bertani, T., et al., *Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events*. Lab Invest, 1982. 46(1): p. 16-23.
120. Bohnert, B.N., et al., *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome*. Acta Physiol (Oxf), 2019. 227(4): p. e13286.
121. Hruby, Z., et al., *Mechanism of antinephritic effect of proteinase inhibitors in experimental anti-GBM glomerulopathy*. 1999. 199(5): p. 295-307.
122. Hruby, Z., et al., *Effect of antiproteolytic drugs: epsilon-aminocaproic acid (EACA) and aprotinin on experimental anti-GBM nephritis*. Nephrol Dial Transplant, 1996. 11(1): p. 32-9.
123. Westaby, S., *Aprotinin in perspective*. Ann Thorac Surg, 1993. 55(4): p. 1033-41.
124. Maestroni, S. and G.J.A.D. Zerbini, *Glomerular endothelial cells versus podocytes as the cellular target in diabetic nephropathy*. 2018. 55(11): p. 1105-1111.
125. Kobayashi, N., et al., *Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via uPAR-mediated β 1-integrin endocytosis*. American journal of physiology. Renal physiology, 2015. 308(6): p. F614-F626.
126. Ma, J., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits podocyte uPAR expression and reduces proteinuria*. PLoS One, 2013. 8(5): p. e64912.
127. Revelo, M.P., et al., *Chronic allograft nephropathy: expression and localization of PAI-1 and PPAR- γ* . Nephrology Dialysis Transplantation, 2005. 20(12): p. 2812-2819.

128. Collins, S.J., et al., *Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficiency Has Renal Benefits but Some Adverse Systemic Consequences in Diabetic Mice*. Nephron Experimental Nephrology, 2006. 104(1): p. e23-e34.
129. Nicholas, S.B., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency retards diabetic nephropathy*. Kidney International, 2005. 67(4): p. 1297-1307.
130. Sinha, A., et al., *Serum-soluble urokinase receptor levels do not distinguish focal segmental glomerulosclerosis from other causes of nephrotic syndrome in children*. Kidney International, 2014. 85(3): p. 649-658.
131. Hayek, S.S., et al., *Soluble Urokinase Receptor and Chronic Kidney Disease*. The New England journal of medicine, 2015. 373(20): p. 1916-1925.
132. Rao, J.S., M. Gujrati, and C. Chetty, *Tumor-associated soluble uPAR-directed endothelial cell motility and tumor angiogenesis*. Oncogenesis, 2013. 2(6): p. e53.
133. Wei, C., et al., *Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis*. Nature medicine, 2011. 17(8): p. 952-960.
134. Pozzi, A., et al., *Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity*. Developmental biology, 2008. 316(2): p. 288-301.
135. Whyte, C.S., et al., *Exposure of plasminogen and a novel plasminogen receptor, Plg-RKT, on activated human and murine platelets*. Blood, 2021. 137(2): p. 248-257.
136. Guan, Y., et al., *A protease-activated receptor-1 antagonist protects against podocyte injury in a mouse model of nephropathy*. Journal of Pharmacological Sciences, 2017. 135(2): p. 81-88.
137. Harris, J.J., et al., *Active proteases in nephrotic plasma lead to a podocin-dependent phosphorylation of VASP in podocytes via protease activated receptor-1*. 2013. 229(5): p. 660-671.
138. Edgton, K.L., et al., *Plasmin is not protective in experimental renal interstitial fibrosis*. Kidney Int, 2004. 66(1): p. 68-76.
139. Kitching, A.R., et al., *Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis*. J Exp Med, 1997. 185(5): p. 963-8.
140. Xiao, M., et al., *Plasminogen deficiency does not prevent sodium retention in a genetic mouse model of experimental nephrotic syndrome*. Acta Physiol (Oxf), 2021. 231(1): p. e13512.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Ausarbeitung des Studiendesigns erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ferruh Artunc.

Sämtliche Versuche wurden von mir, nach Einarbeitung durch Herrn Prof. Dr. med. Ferruh Artunc und Herrn Dr. med. Bernhard Bohnert, selbstständig durchgeführt. Die Genotypisierung der Mäuse führte ich, nach Einarbeitung durch Frau Andrea Janessa (MTA), ebenfalls selbstständig durch. Sämtliche histologische Färbungen wurden durch das pathologische Institut Tübingen durchgeführt. Die Western Blots erfolgten durch Herrn Matthias Wörn.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, die schriftliche Ausarbeitung selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren Quellen als die von mir angegebenen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Poster:

„Mäuse mit Plasminogen-Defizienz sind vor Doxorubicin-induziertem nephrotischen Syndrom geschützt“

T. Dörffel, B. Bohnert, F. Grahammer, R. Das, E. F. Plow, F. Artunc

und

„Plasma-Kallikrein ist für die Ödementstehung bei experimentellem nephrotischen Syndrom nicht essenziell“

B. Bohnert, T. Dörffel, M. Wörn, E. Feener, A. H. Schmaier, F. Artunc

Auf der

9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie vom 14. - 17. September 2017 in Mannheim

„Die glomeruläre Bindung von Plasminogen ist für die podozytäre Toxizität von Doxorubicin bei 129S1- Mäusen essenziell“

B. Bohnert, I. Gonzalez Menendez, T. Dörffel, E. F. Plow, F. Grahammer, L. Quintanilla-Martinez, F. Artunc; Tübingen, Cleveland/USA, Hamburg

Auf der

10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie vom 27.- 30. September 2018 in Berlin

Paper:

„Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice“

S. Haerteis, A. Schork, T. Dörffel, B. N. Bohnert, R. Nacken, M. Wörn, M. Xiao, D. Essigke, A. Janessa, A. H. Schmaier, E. P. Feener, H.-U. Häring, M. Bertog, C. Korbmacher, F. Artunc

in

Acta Physiol (Oxf). 2018 Sep;224(1):e13060. doi: 10.1111/apha.13060. Epub 2018 Mar 25.

„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, Ferruh Artunc

In

Dis Model Mech. 2021 Sep 1;14(9):dmm049038. doi: 10.1242/dmm.049038. Epub 2021 Sep 15.

Danksagung

Am Ende dieser Dissertation sollen nun alle Erwähnung finden, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Der größte Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Professor Ferruh Artunc. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können. Du hast mich durchweg motiviert und warst stets zur Stelle bei Fragen oder Problemen. Du hast es geschafft in Deiner Arbeitsgruppe ein familiäres Umfeld zu schaffen, in der es Spaß gemacht hat zu arbeiten.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Herrn Doktor Bernhard N. Bohnert. Es war immer eine Freude mit Dir zusammenzuarbeiten und Du warst eine riesige Hilfe, egal um welche Fragen es ging. Vor allem freut es mich aber auch, dass ich mit Dir einen echten Freund gefunden habe.

Auch meinen lieben Kollegen und Kolleginnen möchte ich danken. Danke für die Einarbeitung, die Zusammenarbeit und nicht zuletzt die stets gute Stimmung! Besonders zu erwähnen ist zudem Frau Andrea Janessa, die als langjähriges Mitglied des Labors eine zentrale Rolle in der täglichen Arbeit einnahm.

Dem IZKF möchte ich für das Vertrauen, die Unterstützung auf allen Ebenen und das gute Promotionsprogramm danken.

Und zu guter Letzt tausend Mal Danke an meine Eltern, die mir all das überhaupt erst ermöglicht haben. Und natürlich meiner Freundin Ailinn Scheidl und meinen Freunden (insbesondere Lars Schiwietz und Marius Braun), die mich schon so lange begleiten.