

Aus dem Institut für Tierernährung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Funktionelle Untersuchung podozytärer Proteine des Nierenfilters in *Drosophila melanogaster* für Fragestellungen zum Nephrotischen Syndrom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Philipp Trachte**  
Tierarzt  
aus Hagen

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4126

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Klaus Männer  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Tobias B. Huber  
Dritter Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): drosophila melanogaster, animal models, nephrotic syndrome, proteinuria, genotypes, phenotypes, immunofluorescence, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy

Tag der Promotion: 15.06.2020

# *Meinen Eltern*

*"I am sailing  
Stormy waters  
To be free."  
(Gavin Sutherland)*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATUR .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Nephrotisches Syndrom .....</b>	<b>2</b>
1.1.    Aufbau des Harntrakts und des glomerulären Nierenfilters beim Menschen .....	2
1.2.    Definition des Nephrotischen Syndroms .....	4
1.3.    Ätiologie und Inzidenz .....	5
1.4.    Pathophysiologie .....	5
1.5.    Klinik und Diagnose .....	9
1.6.    Therapie und Prognose .....	10
<b>2. <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus .....</b>	<b>11</b>
2.1.    Bedeutung und Vorteile des Modellorganismus .....	11
<b>3. Genetische Werkzeuge .....</b>	<b>13</b>
3.1.    Das Gal4/UAS-System .....	13
3.2.    RNA Interferenz (RNAi) .....	14
<b>4. <i>Drosophila melanogaster</i> Nephrozyten als Forschungsmodell für den Nierenfilter .....</b>	<b>15</b>
4.1.    Aufbau des Exkretionstrakts und Filtersystems <i>Drosophilas</i> .....	15
4.2.    Struktureller Vergleich zum Harn- und Filtersystem des Menschen .....	16
4.3.    Molekularer Vergleich zur Schlitzmembran des Menschen .....	17
4.4.    Die Verbindung molekularer Schlitzmembranelemente mit der Bedeutung dieser Proteine im <i>Drosophila</i> Facettenauge .....	19
<b>5. Interessante podozytäre Proteine des Nierenfilters .....</b>	<b>20</b>
5.1.    ITM2B .....	22

5.2.	MERTK .....	22
5.3.	NPR3 .....	23
5.4.	FERMT2 .....	24
5.5.	BECN1 .....	26
5.6.	VASN .....	27
<b>6.</b>	<b>Hypothese und Fragestellung .....</b>	<b>28</b>
 <b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>		<b>29</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>29</b>
1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterial .....	29
1.2.	Chemikalien .....	31
1.3.	Medien und Lösungen .....	32
1.4.	Antikörper .....	34
1.5.	Fliegenstämme .....	34
1.6.	Software .....	36
1.7.	Online-Programme .....	37
<b>2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.1.	Bioinformatik: Auswahl geeigneter Genhomologe und Bestellung passender RNAi-Linien .....	38
2.2.	Arbeiten mit <i>Drosophila</i> .....	39
2.2.1.	Haltung von <i>Drosophila</i> .....	40
2.2.2.	Geschlechtsmorphologie und Erkennung .....	42
2.2.3.	Ansatz von Kreuzungen .....	43
2.2.4.	Gal4/UAS-System .....	43
2.2.5.	RNA-Interferenz (RNAi) .....	43
2.2.6.	Kombination des Gal4/UAS-Systems mit der RNAi .....	43
2.2.7.	Differenzierung von Entwicklungsstadien .....	43
2.2.8.	Auswahl des larvalen Entwicklungsstadiums .....	45
2.2.9.	Präparation der Nephrozyten .....	45
2.3.	Histologische Methoden .....	48
2.3.1.	Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment .....	48
2.3.2.	Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozyten .....	49
2.3.3.	Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche .....	50
2.3.4.	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	50
2.3.4.1.	Probenvorbereitung der Nephrozyten für die Untersuchung im REM .....	50

2.3.4.2. Probenvorbereitung adulter Fliegen für die Untersuchung des Facettenauges im REM .....	50
2.3.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	51
2.4. Statistische Methoden .....	54
2.4.1. Statistische Vorgehensweise und Auswertung der untersuchten Nephrozyten mit GraphPad Prism .....	54
2.4.2. Statistische Vorgehensweise und Auswertung des Facettenauges mit ImageJ und GraphPad Prism .....	54
<b>IV. ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>1. Molekulare Analysen .....</b>	<b>55</b>
1.1.    Bioinformatische Analyse: DNA-Sequenzhomologie .....	55
1.1.1. ITM2B .....	55
1.1.2. MERTK .....	56
1.1.3. NPR3 .....	56
1.1.4. FERMT2 .....	57
1.1.5. BECN1 .....	57
1.1.6. VASN .....	58
<b>2. Funktionelle Analyse: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment zur Beurteilung der Filtrationsleistung .....</b>	<b>59</b>
2.1.    Ergebnisse aus Konfokalmikroskopie und Quantifizierung .....	60
2.1.1. Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin .....	60
2.1.2. ITM2B .....	61
2.1.3. MERTK .....	61
2.1.4. NPR3 .....	62
2.1.5. FERMT2 .....	63
2.1.6. BECN1 .....	65
2.1.7. VASN .....	65
<b>3. Phänotypische Analyse .....</b>	<b>66</b>
3.1.    Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozyten .....	66
3.1.1. Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin .....	67
3.1.2. ITM2B .....	68
3.1.3. MERTK .....	69
3.1.4. NPR3 .....	71
3.1.5. FERMT2 .....	73

3.1.6.	BECN1 .....	74
3.1.7.	VASN .....	76
3.2.	Rasterelektronenmikroskopie der Nephrozyten .....	77
3.2.1.	Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin .....	77
3.2.2.	ITM2B .....	78
3.2.3.	MERTK .....	78
3.2.4.	NPR3 .....	79
3.2.5.	FERMT2 .....	80
3.2.6.	BECN1 .....	80
3.2.7.	VASN .....	81
3.3.	Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche .....	82
3.3.1.	Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin .....	83
3.3.2.	ITM2B .....	84
3.3.3.	MERTK .....	84
3.3.4.	NPR3 .....	85
3.3.5.	FERMT2 .....	86
3.3.6.	BECN1 .....	87
3.3.7.	VASN .....	88
3.4.	Transmissionselektronenmikroskopie der Nephrozytenschlitzmembran .....	90
3.4.1.	Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin .....	90
3.4.2.	ITM2B .....	92
3.4.3.	MERTK .....	94
3.4.4.	NPR3 .....	96
3.4.5.	BECN1 .....	98
3.4.6.	VASN .....	100
3.5.	Rasterelektronenmikroskopie des Facettenauges .....	102
3.5.1.	Validierungen der Positiv- und Negativkontrolle: Wildtyp Berlin und Kirre-RNAi .....	102
3.5.2.	ITM2B .....	103
3.5.3.	MERTK .....	105
3.5.4.	NPR3 .....	106
3.5.5.	FERMT2 .....	107
3.5.6.	BECN1 .....	108
3.5.7.	VASN .....	109
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung der generierten Ergebnisse .....</b>	<b>110</b>

<b>V. DISKUSSION .....</b>	<b>111</b>
<b>1. Diskussion der potentiellen Interaktoren der podozytären Schlitzmembran des Nierenfilters .....</b>	<b>112</b>
1.1. ITM2B .....	112
1.2. MERTK .....	115
1.3. NPR3 .....	120
<b>2. Diskussion der potentiellen Interaktoren biologischer Zellprozesse des Podozyten .....</b>	<b>123</b>
2.1. FERMT2 .....	123
2.2. BECN1 .....	128
2.3. VASN .....	131
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>135</b>
<b>VII. SUMMARY .....</b>	<b>136</b>
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>137</b>
<b>IX. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>152</b>
<b>X. DANKSAGUNG .....</b>	<b>153</b>
<b>XI. LEBENSLAUF .....</b>	<b>154</b>
<b>XII. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>155</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Nierenfilters des Menschen. ....	3
<b>Abbildung 2:</b> Molekulare Komponenten des Podozyten und der Schlitzmembran. ....	7
<b>Abbildung 3:</b> Das Gal4/UAS-System <i>Drosophilas</i> als genetisches Werkzeug. ....	14
<b>Abbildung 4:</b> Lokalisierung der Podozyten-ähnlichen Nephrozyten und Vergleich des Filterapparates zwischen Säuger und Fliege. ....	18
<b>Abbildung 5:</b> Arbeiten mit <i>Drosophila</i> . ....	40
<b>Abbildung 6:</b> Haltung <i>Drosophilas</i> . ....	41
<b>Abbildung 7:</b> Geschlechtsmorphologie und Erkennung. ....	42
<b>Abbildung 8:</b> Differenzierung von larvalen Entwicklungsstadien. ....	44
<b>Abbildung 9:</b> Larve des dritten Entwicklungsstadiums (L3). ....	45
<b>Abbildung 10:</b> Utensilien für die Präparation der Nephrozyten aus L3. ....	46
<b>Abbildung 11:</b> Vorgehensweise der Präparation. ....	47
<b>Abbildung 12:</b> Suchergebnis für das humane Gen <i>ITM2B</i> . ....	55
<b>Abbildung 13:</b> Suchergebnis der kommerziell verfügbaren RNAi-Linien für das humane Gen <i>MERTK</i> . ....	56
<b>Abbildung 14:</b> Suchergebnis für das humane Gen <i>NPR3</i> . ....	56
<b>Abbildung 15:</b> Suchergebnis für das humane Gen <i>FERMT2</i> . ....	57
<b>Abbildung 16:</b> Suchergebnis für das humane Gen <i>BECN</i> . ....	57
<b>Abbildung 17:</b> Suchergebnis für das humane Gen <i>VASN</i> . ....	58
<b>Abbildung 18:</b> Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment Wildtyp Berlin (WTB). Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	60
<b>Abbildung 19:</b> Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens <i>ITM2B</i> . Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	61
<b>Abbildung 20:</b> Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens <i>MERTK</i> . Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	62
<b>Abbildung 21:</b> Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens <i>NPR3</i> . Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ...	63

<b>Abbildung 22:</b> Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens FERMT2. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	64
<b>Abbildung 23:</b> Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens BECN1. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	65
<b>Abbildung 24:</b> Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens VASN. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	66
<b>Abbildung 25:</b> Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre des Wildtyp Berlins. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	68
<b>Abbildung 26:</b> Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens ITM2B. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	69
<b>Abbildung 27:</b> Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens MERTK. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	70
<b>Abbildung 28:</b> Darstellung der Morphologie der Nuclei im Rahmen der Kirre-Immunfluoreszenzfärbung nach KD des Gens MERTK. ....	71
<b>Abbildung 29:</b> Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens NPR3. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	72
<b>Abbildung 30:</b> Darstellung der Morphologie der Nuclei im Rahmen der Kirre-Immunfluoreszenzfärbung nach KD des Gens NPR3. ....	73
<b>Abbildung 31:</b> Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens FERMT2. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	74
<b>Abbildung 32:</b> Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens BECN1. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	75
<b>Abbildung 33:</b> Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens VASN. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. ....	76
<b>Abbildung 34:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten des Wildtyp Berlins. ....	77
<b>Abbildung 35:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens ITM2B. ....	78
<b>Abbildung 36:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens MERTK. ....	79

<b>Abbildung 37:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens NPR3. ....	79
<b>Abbildung 38:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens FERMT2. ....	80
<b>Abbildung 39:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens BECN1. ....	81
<b>Abbildung 40:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens VASN. ....	82
<b>Abbildung 41:</b> Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche des Wildtyp Berlins nach Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	83
<b>Abbildung 42:</b> Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens ITM2B mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	84
<b>Abbildung 43:</b> Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens MERTK mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	85
<b>Abbildung 44:</b> Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens NPR3 mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	86
<b>Abbildung 45:</b> Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens FERMT2 mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	87
<b>Abbildung 46:</b> Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens BECN1 mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	88
<b>Abbildung 47:</b> Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens VASN mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	89
<b>Abbildung 48:</b> Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten (Wildtyp Berlin) zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran. ....	91
<b>Abbildung 49:</b> Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens ITM2B zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran. ....	93
<b>Abbildung 50:</b> Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens MERTK zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran. ....	95

<b>Abbildung 51:</b> Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens <i>NPR3</i> zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran. ....	97
<b>Abbildung 52:</b> Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens <i>BECN1</i> zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran. ....	99
<b>Abbildung 53:</b> Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens <i>VASN</i> zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran. ....	101
<b>Abbildung 54:</b> Rasterelektronenmikroskopie des Auges zur Validierung der Positivkontrolle Wildtyp Berlin und der Negativkontrolle Kirre-RNAi. ....	103
<b>Abbildung 55:</b> Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens <i>ITM2B</i> . ..	104
<b>Abbildung 56:</b> Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens <i>MERTK</i> . ..	105
<b>Abbildung 57:</b> Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens <i>NPR3</i> . ...	106
<b>Abbildung 58:</b> Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens <i>FERMT2</i> . ..	107
<b>Abbildung 59:</b> Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens <i>BECN1</i> . .	108
<b>Abbildung 60:</b> Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens <i>VASN</i> . ...	109

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Ausgewählte Gene, deren Proteine in Zellprozesse involviert sind. ....	21
<b>Tabelle 2:</b> Allgemeine Laborgeräte und Arbeitsutensilien. ....	29
<b>Tabelle 3:</b> Spezielles Präparierwerkzeug und Mikroskope. ....	30
<b>Tabelle 4:</b> Geräte für Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie. ....	30
<b>Tabelle 5:</b> Allgemeine Verbrauchsmaterialien. ....	30
<b>Tabelle 6:</b> Auflistung verwendeter Chemikalien. ....	31
<b>Tabelle 7:</b> Auflistung verwendeter Medien und Lösungen. ....	32
<b>Tabelle 8:</b> Antikörper aufgeteilt in primär und sekundär. ....	34
<b>Tabelle 9:</b> Gal4-Treiberlinien. ....	34
<b>Tabelle 10:</b> UAS-RNAi-Linien für die humanen Gene unter Angabe der prozentualen Homologie. ....	35
<b>Tabelle 11:</b> Software. ....	36
<b>Tabelle 12:</b> Online-Programme mit dazugehöriger URL. ....	37
<b>Tabelle 13:</b> Gepulstes Experiment zur FITC-Albuminaufnahme. ....	48
<b>Tabelle 14:</b> Kirre-Immunfluoreszenzfärbung. ....	49
<b>Tabelle 15:</b> Einbettung der Proben für TEM-Aufnahmen. ....	53
<b>Tabelle 16:</b> Zusammenfassung des Ergebnisteils. ....	110

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erläuterung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer
AG	Arbeitsgruppe
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
ANG II	Angiotensin II
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDSC	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
BECN1	Beclin-1
BM	Basalmembran
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD2AP	CD2-associated protein (CD2-assoziiertes Protein)
CNI	Calcineurin-Inhibitoren
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Dihydrochlorid)
DEX	Dexamethason
Dmel	<i>Drosophila melanogaster</i>
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dsRNA	Double-stranded Ribonucleic Acid (doppelsträngige Ribonukleinsäure)
EGF	Epidermal Growth Factor
FAT1	Atypical Cadherin 1 (Atypisches Cadherin 1)
FERM	4.1 (Four-point-one), Ezrin, Radixin, Moesin

FERMT2	Fermitin2
FBD	Familiäre Britische Demenz
FDD	Familiäre Dänische Demenz
FN3	Fibronectin-3
FP	Foot Process (Fußfortsatz der Podozyten)
FSGS	Fokale und segmentale Glomerulosklerose
FS	Fettsäure
g	Gramm
Gal4	Transkriptionsfaktor aus der Hefe (Gen-Aktivatorprotein, Galaktose4)
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GCN	Garlandzellen
GFP	Green Fluorescent Protein (Grün Fluoreszierendes Protein)
GN	Glomerulonephritis
GPKR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
haf	Hattifattener
Hbs	Hibris
IgA-Nephropathie	Immunglobulin A-Nephropathie
IOC	Interommatidial Cells (Interommatidialzellen)
ITM2B	Integrales Transmembranprotein 2B
Kirre	Kind of Irre
KD	Knockdown
l	Liter
L1 / L2 / L3	Larven zugehörig dem 1., 2. oder 3. Larvenstadium
LRR	Leukin-reiche Region
MCD	Minimal-Change-Disease
MERTK	Mer Tyrosin Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMF	Mycophenolat Mofetil
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
ND	Nephrocyte Diaphragm (Nephrozytenmembran)
nm	Nanometer

NPR-A / NPR-B / NPR-C	Natriumpeptidrezeptor A / B / C
NPR3	Natriumpeptidrezeptor 3 (Natriumpeptidrezeptor C)
NS	Nephrotisches Syndrom
PB	Phosphate Buffer (Phosphatpuffer)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLA2R	Phospholipase-A2-Rezeptor (Phospholipase-A2-Rezeptor)
RAAS-Inhibitoren	Renin Angiotensin Aldosteron-Inhibitoren
REM	Rasterelektronenmikroskopie (Scanning Electron Microscopy)
RISC-Enzymkomplex	RNA-Induced Silencing Complex-Enzymkomplex
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
RP	Retinitis pigmentosa
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
siRNA	Small interfering Ribonucleic Acid (kleine eingreifende RNA)
Slit2	Slit-like 2
SM	Schlitzmembran (Slit Diaphragm)
SnS	Sticks and Stones
SRNS	Steroidresistentes Nephrotisches Syndrom
SSNS	Steroidsensitives Nephrotisches Syndrom
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta (Transformierender Wachstumsfaktor Beta)
TK	Tyrosinkinase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRPC6	Transient Receptor Potential Channel 6 (Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal C6)
UAS	Upstream Activating Sequence
VASN	Vasorin
VDRC	Vienna <i>Drosophila</i> Research Center
WTB	Wildtyp Berlin
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

# I. EINLEITUNG

Das Nephrotische Syndrom (NS) ist ein glomerulären Erkrankungen der Niere zugrunde liegender Symptomenkomplex, dessen treibende Kraft das Kardinalsymptom der Proteinurie ist. Definiert als erhöhter Verlust von Eiweißen über den Urin, stellt die Proteinurie das Resultat gesteigerter Permeabilität durch Schädigung des Nierenkörperchens (Glomerulus) dar (Radhakrishnan und Cattran, 2012). Negative, die Ätiologie umfassende Einflüsse auf die Feinstrukturen des Nierenfilters sind komplex und teilweise nicht vollständig geklärt. Resultierende Erkrankungen des Glomerulus sind eine der Hauptursachen für die Entstehung chronischer Nierenerkrankungen (Hsu und Powe, 2017). Die Intaktheit des Nierenfilters wird durch die Integrität des Podozyten und der Schlitzmembran sowie das dazwischenliegende engmaschige Signalnetzwerk bestimmt. Eine physiologische Funktionsweise vorausgesetzt, sorgen molekulare Bestandteile für Urin, der nur in geringen Mengen Proteine enthält und somit für das Verhindern der Ausbildung proteinurischer Nierenerkrankungen. Über die statische Filtrationsarbeit hinaus, kommt der Schlitzmembran eine fundamentale dynamische Schlüsselrolle zu, die Signaltransduktionswege zur Kommunikation mit dem Podozyten beinhaltet (Huber und Benzing, 2005; Grahammer et al., 2013). Einwandfrei funktionierende Zellprozesse innerhalb des Podozyten, der als post-mitotischer Zelltyp in Bezug auf seine Regenerationsfähigkeit deutlich eingeschränkt ist (Nagata et al., 1998), gewährleisten wiederum die Intaktheit der Schlitzmembran. Kommt es jedoch zu molekularen Unstimmigkeiten und Veränderungen, sind Pathologien in Form von Instabilität und Loslösung bis hin zum Verlust dieser Komponenten des Nierenfilters die Konsequenz (Kestilä et al., 1998; Huber et al., 2001; Huber et al., 2003).

## II. LITERATUR

### 1. Nephrotisches Syndrom

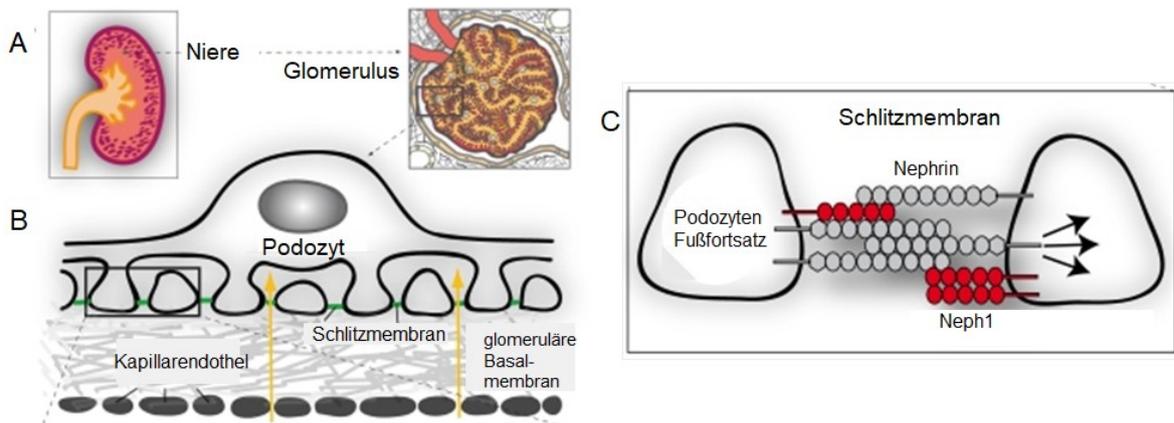
#### 1.1. Aufbau des Harntrakts und des glomerulären Nierenfilters beim Menschen

Der Harntrakt des Menschen besteht aus den beidseits retroperitoneal gelegenen Nieren sowie den paarigen Harnleitern, der Harnblase und der Harnröhre als harnableitende Wege. Die links und rechts der Wirbelsäule, dicht unter dem Zwerchfell gelegenen, bohnenförmigen Nieren sind durch eine bindegewebige Kapsel sowie einen Fettgewebsmantel geschützt und übernehmen überlebenswichtige Prozesse im Organismus aller Säugetiere (Schünke et al., 1956). Die Eliminierung von Endprodukten des Stoffwechsels im Rahmen der Harnproduktion ist gleichermaßen Aufgabe der Niere wie die Funktion als Entgiftungsorgan zur Ausscheidung von Toxinen. Darüber hinaus ist sie zentraler Regulator der gesamten Homöostase des Körpers. Die Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes, der Osmoregulation und des Säure-Basen-Gleichgewichtes sowie die Volumenregulation zur langfristigen Blutdruckregulierung werden von der Niere übernommen. Von gleicher Bedeutung ist die endokrinologische Funktion sowie die Produktion von Calcitriol (Lote, 2000).

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Ein einzelnes Nephron setzt sich zusammen aus dem Nierenkörperchen (Glomerulus und Bowman-Kapsel) und den sich anschließenden Nierenkanälchen (Tubuli) (Cohen et al., 2002). Das Malpighi-Körperchen übernimmt die Aufgabe der Ultrafiltration, das Tubulussystem ist verantwortlich für Absorption und Sekretion des filtrierten Primärharns (Lote, 2000). Jeder einzelne Tubulus besteht aus Proximal-, Intermediär- und Distaltubulus, wobei die geraden Tubulusabschnitte und der Intermediärtubulus die sogenannte Henle-Schleife bilden. Das Nierentubulussystem endet mit der Mündung der Sammelrohre in das Nierenbecken (Cohen et al., 2002).

In Form von täglich 1200 Litern, durchströmt 25% des Herzausstoßes die überaus gut durchbluteten renalen Komponenten. Schätzungsweise 20% des Plasmavolumens werden filtriert und charakterisieren sich als Primärurin durch die Abwesenheit von Zellen und einer geringen Konzentration an Proteinen (Pavenstädt et al., 2003). Diese enorme Effizienz der Filtrationsleistung beruht auf der Funktionsfähigkeit der Glomeruli, die die tadellose Retention überlebenswichtiger Serumproteine bestimmt. Der glomeruläre Nierenfilter besteht aus drei wesentlichen anatomischen Bestandteilen, die das Blutplasma auf seinem Weg der Filtration passieren muss: Das vaskuläre Endothel der Nierenkapillaren, die glomeruläre Basalmembran

und die podozytäre Schlitzmembran (Tryggvason, 2005). Die Retention des physiologischen Zellübertrittes durch die Blut-Harn-Schranke basiert auf Ladung, Form und Größe (Gagliardini et al., 2010).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Nierenfilters des Menschen.** Die Darstellung beginnt mit einer Übersicht über die Niere und den Glomerulus. Die zuführende Arteriole tritt in den Glomerulus ein, verzweigt sich zum Kapillarknäuel und verlässt das Nierenkörperchen als efferente Arteriole. (B) Der schematische Feinbau zeigt die Bestandteile des glomerulären Nierenfilters. Das Blut passiert auf seinem Filtrationsweg das fenestrierte Kapillarendothel, die glomeruläre Basalmembran und die Schlitzmembran. (C) Veranschaulicht werden zwei benachbarte Podozyten-Fußfortsätze, zwischen die sich die interagierenden, ineinandergreifenden Schlitzmembranmoleküle Nephrin und Neph1 spannen.

Modifiziert nach: Wanner et al. (2011). *Functional and Spatial Analysis of C. elegans SYG-1 and SYG-2, Orthologs of the Neph/Nephrin Cell Adhesion Module Directing Selective Synaptogenesis*. Figure 1. PLoS ONE; 6(8): e23598. Copyright © 2011. Wanner, Noutsou, Baumeister, Walz und Huber. Creative Commons Attribution License (CC BY).

Das renale Kapillarendothel erhält seinen Zufluss von der in den Glomerulus eintretenden Arteriola afferens. Sich dort zu einem Kapillarknäuel verzweigend, verlässt das Gefäß das Nierenkörperchen als Arteriola efferens. Mesangiumzellen stützen als interstitielles Gewebe der Niere die glomerulären Kapillaren (Lote, 2000). Als erste Filtrationsschicht sorgt das fenestrierte Endothel mit seinen 60-70 nm breiten Öffnungen für ein definiertes Zurückhalten der Blutbestandteile. Der selektive Effekt des Kapillarendothels beruht jedoch überwiegend auf der negativen Ladung, die durch das Überspannen einer Glykokalyx zustande kommt (Jeansson, 2006). Das Filtrat erreicht im weiteren Verlauf die glomeruläre Basalmembran, die sich aus der Basalmembran der Endothelzellen und jener der Podozyten zusammensetzt. Die ladungsselektive Retention dieser Schicht beruht auf Proteoglykanen, die sich in den Kollagenfasern des Typs IV als Hauptbestandteil befinden. Die Basalmembran mit ihrer negativen Ladung wird als Fokus der ladungsselektiven Filtration angesehen (Rohrbach,

1993). Der Podozyt breitet sich in Form seiner verflochtenen podozytären Fußfortsätze in regelmäßigen Abständen über die glomerulären Kapillarknäuel aus und bildet ein Netzwerk um diese (Pavenstädt et al., 2003). Podozyten sind hochspezialisierte, atypische Epithelzellen der Niere, die sich auf der Harnseite des Glomerulus befinden und drei grundlegende strukturelle Regionen aufweisen: Den Zellkörper, die Zellfortsätze und die Fußfortsätze (Quaggin und Kreidberg, 2008). Die Schlitzze, die sich zwischen die Fußfortsätze spannen, stellen die letzte, als zentral angesehene Barriere des glomerulären Filters dar. Mit einer Schlitzgröße von lediglich 30-40 nm erzielt die Schlitzmembran die stärkste größenbedingte Wirkung des Nierenfilters. Nach Passage ist das Lumen der Bowman-Kapsel, deren viszerale Blatt von den Podozyten, das parietale Blatt von einschichtigem Plattenepithel gebildet wird, für das Auffangen des Primärharns verantwortlich (Lote, 2000), bevor die Weiterleitung vom Kapselraum ins Tubulussystem erfolgt.

## **1.2. Definition des Nephrotischen Syndroms**

Der als NS bezeichnete Symptomenkomplex ist das Markenzeichen glomerulärer Erkrankungen der Niere und setzt sich zusammen aus der klinischen Präsenz der Proteinurie, gefolgt von den Kardinalsymptomen Hypoalbuminämie, Ödemen, Hyperlipidämie und Lipidurie (Radhakrishnan und Cattran, 2012). Per definitionem stellt die Proteinurie mit einem Wert über 3,0 g/d die erhöhte Ausscheidung von Proteinen im Urin dar und ist Resultat gesteigerter Permeabilität durch Schädigung des Nierenkörperchens. Im gesunden Organismus enthält der Urin geringfügige Mengen an Protein und ist mit einem Wert bis zu 1,5 g/d als physiologisch einzustufen (Radhakrishnan und Cattran, 2012). Als treibende Kraft des Symptomenkomplexes resultiert die Proteinurie erst mit der Überschreitung des Schwellenwertes in der Entstehung hypoalbuminämischer, ödematischer, hyperlipidämischer und lipidurischer Zustände. Als Folge des massiven Proteinverlustes über den defekten Nierenfilter kommt es zu einer verminderten Konzentration des Gesamteiweißes im Blutplasma (Hypoproteinämie). Mit 60% des gelösten Proteins stellt das überlebenswichtige Albumin den größten Bestandteil und folglich den höchsten Anteil des Verlustes dar (Hypoalbuminämie). Der Abfall des kolloidosmotischen Drucks resultiert im Übertritt von Wasser aus dem Gefäßsystem ins Interstitium. Hyperlipidämie und Lipidurie sind Folgen der Kompensationsreaktion der Leber, die sich in einer erhöhten Produktion von Lipoproteinen und in einem Anstieg an Blutfetten niederschlägt.

### 1.3. Ätiologie und Inzidenz

Das NS ist eine Pathologien des Nierenkörperchens und dessen Filterapparates zugrunde liegende Konstellation aus verschiedenen klinischen Symptomen. Glomeruläre Erkrankungen stellen eine der Hauptursachen für die Entstehung chronischer Nierenerkrankungen dar (Hsu und Powe, 2017). Prinzipiell wird in primäre, auf die Niere zurückzuführende und in sekundäre Formen unterteilt. Weiter muss zwischen dem Auftreten im Neugeborenen-, Kindes- oder Erwachsenenalter unterschieden werden. Das kongenitale NS beruht in den meisten Fällen auf einer Genmutation (Trautmann et al., 2015). Das NS im Kindesalter ist eines der häufigsten pädiatrischen Nierenerkrankungen (McKinney et al., 2001). Aus therapeutischer Sicht erfolgt eine Unterteilung in das Steroid-sensible (SSNS), das Steroid-abhängige und das Steroid-resistente (SRNS) NS. Per definitionem besteht ein SRNS, wenn nach achtwöchiger Kortikosteroidgabe kein vollständiger Rückgang der Proteinurie erzielt wird (Radhakrishnan und Cattran, 2012).

Der histopathologischen Diagnose entsprechend wird innerhalb der primären Formen des NS in die Minimal-Change-Disease (MCD), die fokale und segmentale Glomerulosklerose (FSGS) sowie die membranöse Glomerulonephritis (GN) unterteilt. Das Auftreten wird hierbei überwiegend vom Alter des Patienten bestimmt. Die MCD ist die dem NS im Kindesalter am häufigsten zu Grunde liegende Ursache, wohingegen Adulte im größeren Umfang von der membranösen GN betroffen sind (Gipson et al., 2016). Während in der kaukasischen Bevölkerung die membranöse GN überwiegt, besteht bei Afroamerikanern die weltweit höchste Frequenz diagnostizierter FSGS in Nierenbiopsien (Haas et al., 1997; Braden et al., 2000). Die jeweilige Histopathologie beruht auf einer primären oder sekundären Ätiologie. Primäre bzw. idiopathische Ursachen stellen undefinierte zirkulierende Faktoren dar, die durch Schädigung des Podozyten in einer abnormalen Filterfunktion münden. Sekundäre Ursachen umfassen genetische, infektiöse, immunologische (Lupus erythematodes) und metabolische (Diabetes mellitus, Amyloidose) Faktoren sowie maligne Tumorerkrankungen.

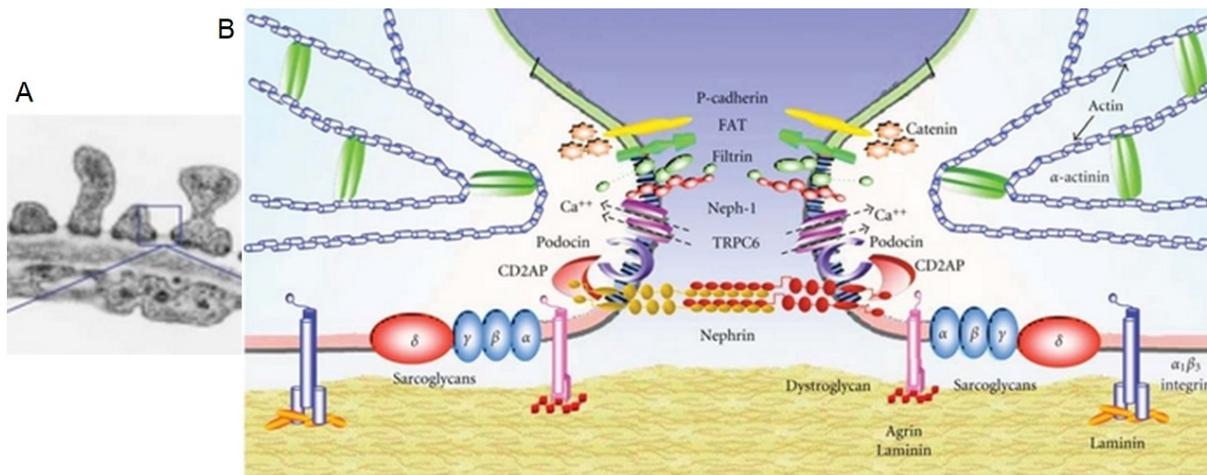
### 1.4. Pathophysiologie

Das NS sowie dessen zugrunde liegende Ursache (MCD, FSGS, GN) ist vergesellschaftet mit Verletzungen bzw. Veränderungen des Podozyten und/oder der Schlitzmembran, die sowohl genetischer als auch nicht-genetischer Natur sein können.

Die podozytäre Schlitzmembran, die erstmals im Jahre 1955 mittels Transmissionselektronenmikroskopie dargestellt wurde, überbrückt den Raum benachbarter Fußfortsätze (Yamada, 1955). Rodewald und Karnovsky gelang im Jahre 1974 die erste

Demonstration der Schlitzmembran als spezialisierte Zell-Zell-Verbindung. Die Forscher beschrieben die sich zwischen den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten ausbreitenden, interzellulären Erweiterungen als ineinandergreifende Elemente, die gemeinsam eine parallel zur Zellmembran gelegene Mittellinie bilden. Diese ausgespannten Zell-Zell-Verbindungen wurden als Reißverschlussähnliches Phänomen betitelt, dessen 4 x 14 nm großen Öffnungen eine gezielte Passage des Blotalbumins verhindern (Rodewald und Karnovsky, 1974).

Diese ausnahmslos fehlerfreie Retention ist unabdingbare Grundvoraussetzung für die Produktion nahezu proteinfreien Primärurins aus dem Blut. Mit der Entdeckung des für das autosomal rezessiv kongenitale NS vom Finnischen Typ verantwortliche Gen NPHS1 und dessen Genprodukt Nephrin, gelang die Entschlüsselung des ersten Schlitzmembranmoleküls (Kestilä et al., 1998; Ruotsalainen et al., 1999). Mit diesem einschneidenden Befund wurde nicht nur der Beweis erbracht, dass die Schlitzmembran im Zentrum der Funktionsfähigkeit des Nierenfilters steht, sondern zeitgleich auch ein Meilenstein für das Verständnis der Entstehung proteinurischer Nierenerkrankungen gesetzt (Kestilä et al., 1998). Mutationen von NPHS1 führen zum Scheitern der Entwicklung intakter Fußfortsätze und Schlitzmembranen, massiver Proteinurie und schließlich zum Nierenversagen bereits *in utero* (Putala et al., 2001). Mutationen des Gens NPHS1 stellen die weltweit häufigste Ursache für das kongenitale NS dar (Cil et al., 2015). Nur drei Jahre später wurde das Fehlen eines weiteren Bausteins mit dem Verursachen des NS in Verbindung gebracht: Neph1 als bedeutender Interaktor Nephrins (Wartiovaara et al., 2004) ist verantwortlich für die strukturelle Aufrechterhaltung der Schlitzmembran (Donoviel et al., 2001). Mutationen des für das Transmembranprotein Podocin kodierende Gen NPHS2 wurden erstmals an SRNS erkrankten Patienten beschrieben. Podocin ist notwendig für die Rekrutierung Nephrins an die Schlitzmembran (Boute et al., 2000). Fortlaufend wurden mit dem CD2-assoziierten Protein (CD2AP), dem Atypischen Cadherin 1 (FAT1) und dem Transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanal C6 (TRPC6) nicht nur weitere entscheidende Elemente der Schlitzmembran aufgedeckt (Freemont et al., 1999; Boute et al., 2000; Inoue et al., 2001; Reiser et al., 2006). Auch für diese Komponenten konnte gezeigt werden, dass Mutationen des jeweilig verantwortlichen Gens das NS verursachen und somit zweifelsfrei in der mitwirkenden Verantwortung der Bildung einer strukturellen, intakten Siebfunktion stehen (Freemont et al., 1999). CD2AP ist ein entscheidender Brückenbildner zwischen Schlitzmembran und Aktinzytoskelett (Shih et al., 1999; Huber et al., 2003; Kim et al., 2003). TRPC6 sorgt als im Fußfortsatz lokalisierter Kalziumkanal für die Interaktion mit Nephrin und Podocin (Reiser et al., 2006).



**Abbildung 2: Molekulare Komponenten des Podozyten und der Schlitzmembran.** (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der verschiedenen Teile des Nierenfilters. Blau umrahmt ist die Schlitzmembran, die den Spalt zwischen zwei Podozyten-Fußfortsätzen überbrückt. (B) Schematische Darstellung der miteinander in Kommunikation stehenden Schlitzmembranproteine, die die Filtrationsbarriere bilden. Darüber hinaus werden deren Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett, mit Proteinen des Podozyten-Fußfortsatzes sowie mit der glomerulären Basalmembran (GBM) veranschaulicht. Zu sehen sind zwei benachbarte Podozyten und die sich zwischen den Fußfortsätzen ausspannende Schlitzmembran. Der Verlust molekularer Komponenten führt zum Bruch des Nierenfilters und Proteinurie im Rahmen des Nephrotischen Syndroms. CD2AP: Cd2-assoziiertes Protein.

Modifiziert nach: Gigante et al. (2011). *Molecular and Genetic Basis of Inherited Nephrotic Syndromes*. Figure 1. *International Journal of Nephrology*. Copyright © 2011. Gigante, Piemontese, Gesualdo, Iolascon und Aucella. Creative Commons Attribution License (CC BY).

Bereits aus den genannten Interaktionen geht hervor, dass die Schlitzmembran mit Nephrin und assoziierenden Proteinen über eine statische Filteraufgabe hinaus, ein mit dem Podozyten im Einklang stehendes dynamisches Signalzentrum verkörpert. Mittels komplexer Signaltransduktionswege gewährleistet dieses die Aufrechterhaltung von Architektur und Funktion des Podozyten (Huber et al., 2001; Huber et al., 2003). Als Podozytopathien werden glomeruläre Erkrankungen bezeichnet, die in ihrem Ursprung der Proteinurie auf eine Schädigung oder Dysfunktion zurückzuführen sind. Das unterhalb der Plasmamembran gelegene kortikale Aktinnetzwerk formt die architektonische Struktur der Fußfortsätze und verankert darüber hinaus den Podozyten durch Bindung der Schlitzmembranproteine (insbesondere Nephrin, Podocin und Neph1). Um im Rahmen des dynamischen Filtrationsvorgangs auf Veränderungen kontraktile reagieren zu können, ist dieses hochorganisierte Aktinzytoskelett für die Aufrechterhaltung der Podozytenstruktur unabdingbar. Kommt es zur Schädigung des Podozyten, wirkt sich dies in der Regel durch den Zusammenbruch des Zytoskeletts auf die Morphologie der Fußfortsätze aus. Das resultierende Ausstreichen und Ausbreiten der Fortsätze mündet in einer Reduktion der Filtrationsintegrität (Shankland, 2006; Kriz et al., 2013). Mutationen zahlreicher Gene, deren

Proteine das Aktinzytoskelett regulieren, stehen in Zusammenhang mit dem SRNS (Kaplan et al., 2000; Gbadegesin et al., 2014). Darüber hinaus muss der Podozyt der glomerulären Basalmembran (GBM) eng anhaften, um den sich ändernden Filtrationskräften standzuhalten und die Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere zu gewährleisten. Das Integrin  $\alpha 3\beta 1$ , als Adhäsionsrezeptor des Podozyten, verbindet beispielsweise (bspw.) die GBM via fokalem Adhäsionskomplex mit dem Aktinzytoskelett (Sadowski et al., 2015).

Auslöser, die allgemein zur strukturellen und funktionellen Verletzung des Podozyten führen, sind in ihrer Anzahl weitgreifend. Intrinsische Faktoren beinhalten die bereits beschriebenen Genmutationen. Extrinsische Faktoren umfassen infektiöse, toxische und mechanische Reize gleichermaßen wie immunologische und metabolische Hintergründe. Im Rahmen der MCD wird postuliert, dass die Schädigung des Podozyten-Aktinzytoskeletts und der GBM aus einer Zirkulation überproduzierter Mediatoren bedingt durch eine T-Lymphozyten Dysregulation resultiert (Shalhoub, 1974). Bei der membranösen GN handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung gegen den Phospholipase-A2-Rezeptor (PLA2R) (Salant et al., 2010).

Der Podozyt als Zielscheibe des Nierenfilters für innere und äußere Einflüsse ist als hochspezialisierter, post-mitotischer Zelltyp durch seine begrenzte Fähigkeit zur Regeneration im besonderen Maße anfällig (Nagata et al., 1998). Verletzungen des Podozyten resultieren in Proteinurie und beeinflussen folglich das Fortschreiten glomerulärer Krankheits- und Alterungsprozesse. Effiziente Säuberungsmaßnahmen im Sinne der Autophagie und der Endozytose sind elementar, um den Podozyten von fehlgefalteten Proteinen und funktionslosen Organellen zu befreien und die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten. Charakteristisch ist die bereits unter basalen Bedingungen hohe Aktivität an Autophagie im Podozyten (Hartleben et al., 2010). Die ersten Schritte der Autophagie umfassen die Initiierung der Bildung einer doppelwandigen Isolierungsmembran (Phagophore) (Yang und Klionsky, 2010; Mizushima und Levine, 2010). Verantwortlich hierfür sind der (ATG13) -FIP 200 Komplex und der Beclin-1 interagierende Komplex, zu dem Vps34 sowie Vps15 gehören. Die Ausschaltung von Vps34 im Podozyten führt zur spontanen Entstehung von Glomerulosklerose (Bechtel et al., 2013a; Bechtel et al., 2013b). Als nächster Schritt erfolgt die Verlängerung der Phagophore, mediiert durch das ATG5-ATG12 sowie das LC3 Konjugationssystem (Yang und Klionsky, 2010; Mizushima und Levine, 2010). Abschließend erfolgt die Beladung mit Zellresten, die Reifung zum Autophagosom, die Verschmelzung zum Autolysosom und letztlich die Degradierung bzw. Wiederverwertung. Das Ausbleiben von Autophagie geht mit einer erhöhten Empfänglichkeit des Podozyten für verschiedene glomeruläre Erkrankungen einher, wohingegen eine funktionierende Autophagie protektive Effekte auf die Gesunderhaltung des Glomerulus und ein Fortschreiten von Podozytopathien wie bspw. der FSGS verlangsamt (Zeng et al., 2014). Das Ausschalten wichtiger Elemente der

Autophagiemaschinerie wird begleitet von allmählicher Podozytendegeneration sowie der Entstehung von Glomerulosklerose (Hartleben et al., 2010). Im Rahmen der FSGS kommt es durch den Podozytenverlust zu einem Gefäßverschluss der Kapillaren mit degenerativen Folgen. Diverse Studien zeigen, dass eine Störung der Autophagie glomerulären Erkrankungen zugrunde liegt. Histopathologische Ergebnisse von Patienten, die an der IgA-Nephropathie erkrankt sind, zeigen das Vorhandensein akkumulierender Autophagosomen (Sato et al., 2009). Erhöhte LC3-Werte bestehen in Biopsien bei Patienten mit membranöser GN (Hartleben et al., 2010).

## **1.5. Klinik und Diagnose**

Grundsätzlich wird mit den laboratorischen Befunden (Proteinurie, Hypoalbuminämie, Hyperlipidämie, Lipidurie) aus Urin- und Blutanalyse sowie Mikroskopie verknüpft mit einem ödematösen Erscheinungsbild, der klinische Verdacht auf das Bestehen eines NS bestätigt (Avner et al., 2016). Im Kindes- und Jugendalter stellen Ödeme das klinische Hauptsymptom dar, wohingegen ältere Patienten vermehrt mit Bluthochdruck vorstellig werden (Waldman et al., 2007). Charakteristisch sind die beginnenden periorbitalen Ödeme bis hin zur Entwicklung von Anasarka mit Aszites sowie pleuralen und perikardialen Ergüssen (Avner et al., 2016). Häufige begleitende Vorstellungsgründe sind ein aus den Ödemen resultierender abdominaler Schmerz und das Vorhandensein von Dyspnoe (Avner et al., 2016). Niedriger Blutdruck sowie kalte Extremitäten vervollständigen oftmals das klinische Erscheinungsbild (Avner et al., 2016). Weitere Folge des Proteinverlustes ist eine insbesondere bei Kindern erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infekten (Sepsis, Pneumonie, Peritonitis) (Shalhoub, 1974). Durch den Mangel an Antithrombin III besteht eine erhöhte Thromboseneigung (Kodner, 2009). Obwohl ein akutes Nierenversagen häufiger Erwachsene betrifft (Waldman et al., 2007), sind 50% der Kinder, die aufgrund des NS in eine Klinik eingewiesen wurden, gleichermaßen betroffen (Rheault et al., 2015). Um das dem NS zugrundeliegende Ausmaß an Veränderungen zu diagnostizieren und passende Therapieansätze einzuleiten, ist eine Nierenbiopsie im Erwachsenenalter unabdingbar (Waldman et al., 2007). Für Kinder wird ein genetischer Test als diagnostisches, weniger invasives Instrument empfohlen (Santín et al., 2011).

## 1.6. Therapie und Prognose

Die Wahl des Therapeutikums sowie die Prognose werden von der Ansprechbarkeit des NS auf Steroide (SSNS, SRNS), dem Alter des Patienten und der Tatsache, ob es sich um eine kongenitale, genetische oder erworbene Form handelt, bestimmt.

Unterstützende Maßnahmen wie blutdrucksenkende und antiproteinurische Medikation sowie diätetische Aspekte stellen die Basis der Therapie dar (Ruggenenti et al., 2008). Akute Maßnahmen in Form einer Salz- und Flüssigkeitsrestriktion sind zwingend notwendig für die Behandlung der Ödeme (Teoh et al., 2015; McCaffrey et al., 2016) und dem Entgegenwirken des Bluthochdrucks (Carrero et al., 2014). Als Diuretikum empfiehlt sich die Verwendung von Furosemid (Floege und Amann, 2016). Das Ausmaß der Proteinurie kann durch die nutritive Umgestaltung und Reduktion an gesättigten FS und dem Gehalt an Proteinen positiv begünstigt werden. Von Bedeutung ist eine hohe biologische Wertigkeit des Proteins oder ein hoher Gehalt an essentiellen Aminosäuren (AS) (Carrero et al., 2014). Eine hinreichende Nierenfunktion vorausgesetzt, sind Albumininfusionen zur Reduzierung der Ödeme, Steigerung der Urinproduktion sowie Verbesserung der Ernährung beim kongenitalen und infantilen NS üblich (Reynolds et al., 2015). Eine Therapie mit Antikoagulantien zur Behandlung der erhöhten Thromboseneigung sollte individuell entschieden werden (Glassock, 2007).

Zur initialen Behandlung des NS wird die mehrwöchige orale Gabe hochdosierter Kortikosteroide empfohlen (Radhakrishnan und Cattran, 2012). Die Prognose für Patienten, die nach Erstvorstellung ein auf die Behandlung ansprechendes SSNS zeigen, ist sehr gut (Trautmann et al., 2015). Das hingegen teilweise oder vollständig fehlende Ansprechen der Steroide ist mit einem bis zu 50%igen Risiko einer Progression zur Nierenerkrankung im Endstadium behaftet (Mekahli et al., 2009; Abrantes et al., 2006; Gipson et al., 2009; Trautmann et al., 2017) und mündet häufig in der Notwendigkeit einer Dialyse oder der Durchführung einer Nierentransplantation (Gipson et al., 2009). In diesen Fällen ist die Gabe von Calcineurin-Inhibitoren (CNI), wie Cyclosporin (Goumenos et al., 2006) oder Tacrolimus (Duncan et al., 2004), indiziert (Garin et al., 1988; Ponticelli et al., 1993). Der antiproteinurische Effekt beruht vielmehr auf der Stabilisierung des Aktinzytoskeletts des Podozyten, als auf der Immunmodulation der T-Lymphozyten (Faul et al., 2008). Bei den in der Regel häufigen Rezidiven (Trojanov et al., 2005) ist die Anwendung einer kombinierten Therapieform aus Cyclosporin und Steroid für Patienten mit SRNS als sinnvoll zu erachten (Hamasaki et al., 2009). Die Prognose wird durch die Langzeitgabe von Cyclosporin verbessert, da dieses eine Progression zum chronischen Nierenversagen deutlich entschleunigt (Ingulli et al., 1995). Für Patienten, bei denen Kortikosteroide kontraindiziert sind (z.B. Diabetes) oder zu starken

Nebenwirkungen führen, sollte grundsätzlich von Beginn an die Therapie mit CNI eingeleitet bzw. die Gabe von Kortikoiden durch Ergänzung mit CNI reduziert werden.

Sprechen die aufgeführten Medikationsmöglichkeiten nicht an, bestehen weitere, in bisherigen Studien jedoch begrenzte Therapeutika. Hierzu zählen RAAS-Inhibitoren (z.B. Fosinopril, Captopril) (Yi et al., 2006; Soliman et al., 2009), ACE-Hemmer (Bagga et al., 2004). Weitere Steroidsparende Alternativen stellen monoklonale Antikörper (Rituximab) (Suyama et al., 2016) sowie Mycophenolat Mofetil (MMF) (Radhakrishnan und Cattran, 2012) dar.

## **2. *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus**

### **2.1. Bedeutung und Vorteile des Modellorganismus**

Die Bedeutung der Taufliege *Drosophila melanogaster* in der naturwissenschaftlichen Forschung geht in ihrem Ursprung bereits auf das 20. Jahrhundert zurück. Zur Klärung genetischer Fragestellungen setzte der Zoologe und Genetiker Thomas Hunt Morgan mithilfe von *D. melanogaster* im Jahre 1910 wichtige Meilensteine in der Vererbungslehre. Aufgrund des einfachen Chromosomensatzes von 4 Chromosomen diente die Fruchtfliege anfänglich als Plattform für die Analyse genetischer Grundkenntnisse (Morgan, 1910). Die Verwendung als Modellorganismus erlangte erstmals Bedeutung durch den amerikanischen Entomologen Charles W. Woodworth. Im darauffolgenden Jahrhundert stand das Vorantreiben innovativer genetischer Werkzeuge maßgeblich im Fokus der zu gewinnenden Erkenntnisse. Den Meilenstein für die gegenwärtige Bedeutung des Modellorganismus, insbesondere für die biologische Grundlagenforschung sowie für neuartige Therapieansätze, setzten im Jahre 2000 Adams et al. (2000) in Form der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *D. melanogaster*. In Verbindung mit der endgültigen Entschlüsselung des humanen Genoms (Lander et al., 2001) und die aus einem Abgleich beider Genome hervorgehende enorme Sequenzhomologie, konnte die evolutionäre Brücke zwischen Vertebraten und Nicht-Vertebraten endgültig geschaffen werden. Die Homologie der Gene liegt auch nach 400 Millionen Jahren Evolution bei einem Prozentsatz von über 70%. Rund 65% der Krankheitsverursachenden Gene im Menschen weisen ein entsprechendes funktionelles Sequenzhomolog in *Drosophila* auf (Rubin et al., 2000; Chien et al., 2002; Yamamoto et al., 2014). Ein signifikanter Teil dieser Homologe ist wiederum in Geweben oder Organen *Drosophilas* exprimiert, die in ihrer Funktion der des äquivalenten Gewebes im Menschen entsprechen (Chintapalli et al., 2007).

Dieses Ausmaß an Errungenschaften zur Analogie öffnete Türen zur Untersuchung der funktionellen Rolle potentieller krankheitsauslösender Gene und forderte zeitgleich Ideen zur Schaffung innovativer Strategien. Mit dem Ziel der Kreation von Mutationen zur funktionellen Untersuchung eines Gens und dessen Phänotyp, wurde mit der Technologie der RNA-Interferenz (RNAi) die Möglichkeit der Stummschaltung eines Genhomologs geschaffen (Mohr, 2014). Meiotische Rekombination verhindernde Balancer-Chromosomen schafften die Realisierung des Ansetzens komplexer Kreuzungen, bei denen in einem Fliegenstamm über Generationen hinweg rezessiv letale Mutationen erhalten bleiben. Zahlreiche mutante Allele sowie dominante genetische Marker wurden geschaffen, die die Identifikation von Genotypen im Rahmen komplexer Kreuzungen erlauben. Mithilfe des sogenannten Gal4/UAS-Systems, welches die Expression von Transgenen in spezifischen Geweben als Ziel hat, wurde nicht nur die Weitläufigkeit des Methodenspektrums erheblich erweitert, sondern auch die Verwendbarkeit des Modellorganismus bekräftigt (Brand und Perrimon, 1993). Heutzutage ist in Form von Stammsammlungen ein umfangreicher Zugang zu unterschiedlichsten Fliegenlinien mit enthaltenen stabilen Mutationen gewährleistet. Internetplattformen bieten den unkomplizierten Zugang zur Bestellung RNAi ausgestatteter Linien (Vienna *Drosophila* Research Center (VDRC) und Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC)). Die Homepage Flybase.org ermöglicht den Zugang zu biologischen Informationen für die jeweiligen Linien.

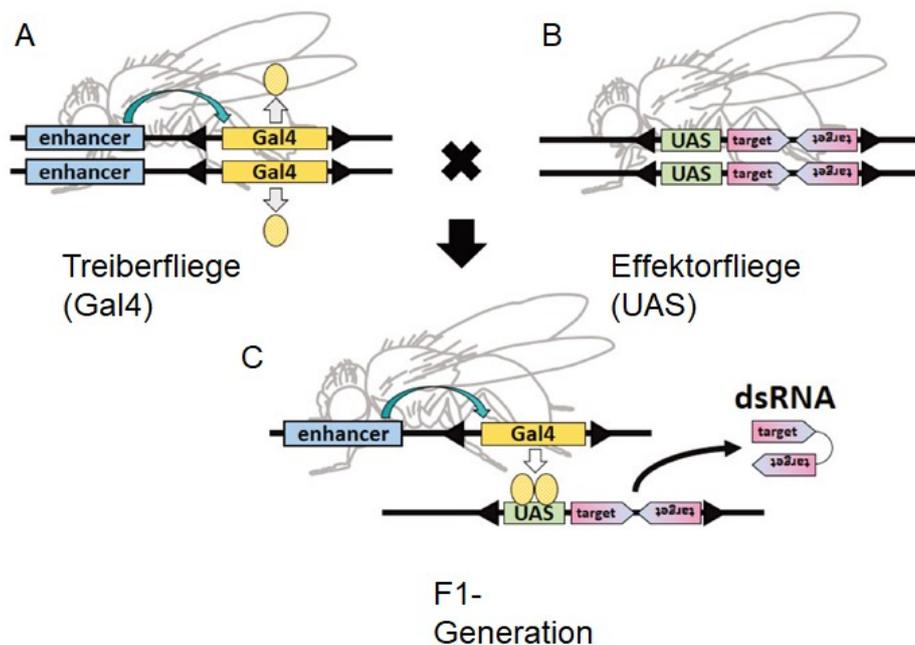
Die Verwendung *Drosophilas* als Modellorganismus charakterisiert sich zum einen durch eine simple und kosteneffektive Haltung, die überschaubarer Materialien und Gebrauchsgegenstände bedarf. Zum anderen ermöglicht die hohe Reproduktionsrate in Verbindung mit dem kurzen Generationszyklus eine erhebliche Zeitersparnis in Bezug auf die Möglichkeit durchzuführender Versuchsreihen. Pro weiblicher Fliege ist mit einer Produktion von bis zu 1000 Eiern auszugehen und der Entwicklungszyklus ist unter standardisierten Laborbedingungen nach 10 bis 12 Tagen bereits vollständig durchlaufen und abgeschlossen (Stocker und Gallant, 2008). Durch die für Vertebraten, aber nicht für *Drosophila* geltenden Tierschutzbestimmungen rückt insbesondere die ethische Vertretbarkeit der Nutzung als Versuchstier in den Vordergrund. Somit unterliegt die Fliege nicht den Gesetzesbestimmungen eines genehmigungspflichtigen Tierversuches, wie es bspw. bei der Verwendung der Maus als Modell der Fall ist. Obgleich durchaus Unterschiede zwischen Säuger und Fliege zu beachten sind, präsentiert sich *Drosophila* zusammenfassend als ein starkes Forschungsmodell, dessen Attraktivität auf der Vielzahl zur Verfügung stehender Werkzeuge in Verbindung mit der hohen Konservierung humaner Krankheits-assoziiierter Gene beruht (Wangler et al, 2015).

### **3. Genetische Werkzeuge**

In der vorliegenden Arbeit kamen das Gal4/UAS-System in Verbindung mit der RNA Interferenz (RNAi) als genetische Werkzeuge zum Einsatz. Ziel dieser Kopplung ist der Knockdown (KD) des jeweils im Fokus der Untersuchung stehenden Gens innerhalb eines festgelegten Gewebes. Dadurch konnten gezielt Effekte und Reaktionen nach Stilllegung des Gens innerhalb der definierten Zelllinie untersucht werden, ohne dass die restlichen Anteile des Fliegenkörpers vom KD betroffen waren (Yamamoto-Hino und Goto, 2013).

#### **3.1. Das Gal4/UAS-System**

Wie eingangs dargestellt, handelt es sich bei dem Gal4/UAS-System um eine Methode, die das Ziel der zell- und gewebespezifischen Expression von Transgenen beinhaltet (Brand und Perrimon, 1993). Um dieses Ziel genetisch umzusetzen, bedarf es zweier unterschiedlicher Komponenten. Der Transkriptionsfaktor Gal4 charakterisiert sich dadurch, dass er unter der Kontrolle spezifischer Elemente steht. Durch diese reguliert, wird die Gal4-Expression initiiert. Hierfür bedarf es die zweite Komponente UAS (Upstream Activating Sequence), die entsprechende Bindungsstellen für den Faktor Gal4 besitzt. Nach erfolgter Bindung kommt es zur erwünschten Expression des beliebigen Zielgens. Diese beiden notwendigen Komponenten werden durch die Kreuzung zweier Fliegenlinien miteinander kombiniert. Mittels Klonierung beinhaltet die sogenannte Treiberlinie Gal4 als erstes Element des Zweikomponentensystems, wodurch der spezifische Ort der Expression bestimmt wird. Die zweite Fliegenlinie, die sogenannte Effektor- oder Responderlinie, ist in Besitz des Zielgens, welches unter der Kontrolle der UAS steht und das exprimierte Produkt festlegt. Als Ergebnis der Kreuzung beider Linien entsteht die sogenannte F1-Generation, die als Konsequenz beide Komponenten in ihrem Genom vereint. Das dem UAS nachgeschaltete Gen wird folglich nur in den Zellen exprimiert, in denen spezifisch Gal4 vorhanden ist. Restliche Zellen, die kein Gal4 enthalten, erfahren auch keine Expression des Zielgens, da die Bindung von Gal4 an UAS ausbleibt.



**Abbildung 3: Das Gal4/UAS-System *Drosophilas* als genetisches Werkzeug.** (A) Treiberlinie, die Gal4 beinhaltet. (B) Effektorlinie, die das UAS-Zielgen Konstrukt in sich trägt. (C) Als Ergebnis der Kreuzung entsteht die F1-Generation, die das Zweikomponentensystem vereint und folglich nur in spezifischem Gewebe Gal4 exprimiert. Durch Bindung von Gal4 an UAS erfolgt die nachgeschaltete Transkription des Zielgens.

Modifiziert nach: Yamamoto-Hino und Goto (2013). *In Vivo RNAi-Based Screens: Studies in Model Organisms*. Figure 1. *Genes (Basel)*; 4(4): 646–665. Copyright © 2013 Yamamoto-Hino und Goto. Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0).

### 3.2. RNA Interferenz (RNAi)

Die Verwendung der RNAi dient der zielgerichteten Abschaltung von Genen und entsprechend kodierten Proteinen, mit dem Ziel deren Funktion anhand ihres KD zu studieren. Dieses genetische Werkzeug wurde in Experimenten im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt, in denen gezeigt werden konnte, dass das Vorhandensein doppelsträngiger RNA (dsRNA) in einer Gen-Unterdrückung resultiert (Fire et al., 1998). Hammond et al. (2000) erforschten die Thematik kurz darauf im *Drosophila*-Modellorganismus und stellten fest, dass der Gehalt an mRNA bei Anwesenheit von dsRNA vermindert ist. Im Jahre 2004 folgte dann die Anwendung des RNAi-Instruments in *Drosophila*, mit dem Bestreben verschiedene Gene auf ihre Funktion hinweg zu untersuchen. Prinzipiell beruht die Stilllegung mittels RNAi darauf, dass zu übertragende Information zerstört oder die Translation des Proteins verhindert wird. Im Nachfolgenden wird die Funktionsweise der Kopplung des eingängig beschriebenen Gal4/UAS-Systems mit dem Prinzip der RNAi erklärt.

Die Transkription des Zielgens, das aus dem Gal4/UAS-System hervorgeht, ist so ausgelegt, dass für eine dsRNA kodiert wird. Im ersten Schritt sorgt das Ribonuklease-Enzym Dicer dafür, dass die dsRNA in kurze interferierende RNA-Stränge (siRNA; small interfering RNA) und somit in kleine Fragmente geschnitten wird (Zamore et al., 2000). Im zweiten Schritt erfolgt eine erneute Spaltung der siRNA, mit dem Ergebnis der Zerlegung in Einzelstränge. Als dritter Schritt dient der antisense Strang dieses Einzelstranges dem RISC-Enzymkomplex (RNA-Induced Silencing Complex) als Schablone zur Erkennung und anschließenden Spaltung einer sequenzkomplementären messenger RNA (mRNA). Durch dieses Prinzip wird die endogene komplementäre mRNA zerstört und der KD des Zielgens erreicht (Meister und Tuschl, 2004; Tomari und Zamore, 2005). Die UAS-RNAi-Linien, von denen in dieser Arbeit Gebrauch gemacht wurde, stammen aus dem VDRC.

## **4. *Drosophila melanogaster* Nephrozyten als Forschungsmodell für den Nierenfilter**

### **4.1. Aufbau des Exkretionstrakts und Filtersystem *Drosophilas***

Das exkretorische System *Drosophilas* setzt sich zusammen aus den Nephrozyten und den separat gelegenen Malpighischen Schläuchen (Hollande, 1921). Die Nephrozyten sind verantwortlich für die Filter- und Reinigungsfunktion der Bestandteile der Hämolymphe, die das fluide Äquivalent zum Säugerblut darstellt (Denholm und Skaer, 2009). Nach getätigter Toxinfiltration des Blutes fungieren sie durch Endozytose und intrazelluläre Aufnahme und Speicherung von Substraten als sogenannte „Speicherniere“ (Hollande, 1921). Basierend auf ihrer Lokalisation im Fliegenkörper können die Nephrozyten in zwei Gruppen unterteilt werden. Die zweikernigen sogenannten Garlandzellen gehören dem thorakalen Abschnitt an und liegen ihrer Namensgebung entsprechend in Form einer Girlande um den Oesophagus (Aggarwal und King, 1971). Die perikardialen Nephrozyten sind abdominal gelegen und charakterisieren sich durch zwei entlang des Herzens lokalisierter perlschnurartiger Zellreihen (Na und Cagan, 2013). Anterior und posterior paarig vertreten, münden die Malpighischen Schläuche zusammenlaufend in den Mitteldarm (Sözen et al., 1997). Trotz ihrer simpel gehaltenen Architektur sind die Funktionen der Malpighischen Gefäße für die Fliege überlebenswichtig. Die Nephrozyten unterstützend, sind sie für die Entfernung toxischer Bestandteile, die Harnsäurebildung und die Regulation des Elektrolyt-, Säuren- und Wasserhaushaltes verantwortlich (Beyenbach et al., 2010). Gleichzeitig sorgen sie durch die finale Exkretion für die Beseitigung von Toxinen und Stoffwechselendprodukten.

Das Filtrationssystem *Drosophilas* basiert auf dem zweischichtigen Aufbau einer außen gelegenen, negativ geladenen Basalmembran und einer sich darunter befindlichen Plasmamembran. Diese Nephrozytenmembran charakterisiert sich durch ihre Oberfläche vergrößernden Invaginationen und die daraus resultierenden extrazellulären Lakunen (Chang et al., 2002). Nachdem die Hämolymphe über die Filtrationsschichten hinweg filtriert wird, gelangen Proteine und andere Stoffe in diese Labyrinthgänge, wo sie abgebaut, wiederverwendet und durch aktive Endozytose in das Zellinnere transportiert werden.

## **4.2. Struktureller Vergleich zum Harn- und Filtersystem des Menschen**

Das Exkretionssystem *Drosophilas* und der Harntrakt des Menschen haben das Vorhandensein zweier funktioneller Untereinheiten gemeinsam: Die Nephrozyten als Analogie zu den Glomeruli und die Malpighischen Tubuli als Analogie zum renalen Tubulussystem. Im Vergleich zu dieser Übereinstimmung zwischen Vertebrat und Nichtvertebrat, stellt das humane Harnsystem jedoch eine geschlossene Einheit dar, was sich architektonisch von den exkretorischen Organen *Drosophilas* unterscheidet. Das Nephron, mit integriertem Glomerulus als Filterapparat und Tubulussystem sowie den harnableitenden Wegen gehen in räumlichem Kontakt ineinander über. Die Nephrozyten als Filtereinheit *Drosophilas* liegen separiert von den Malpighischen Gefäßen (Denholm und Skaer, 2009; Weavers et al., 2009).

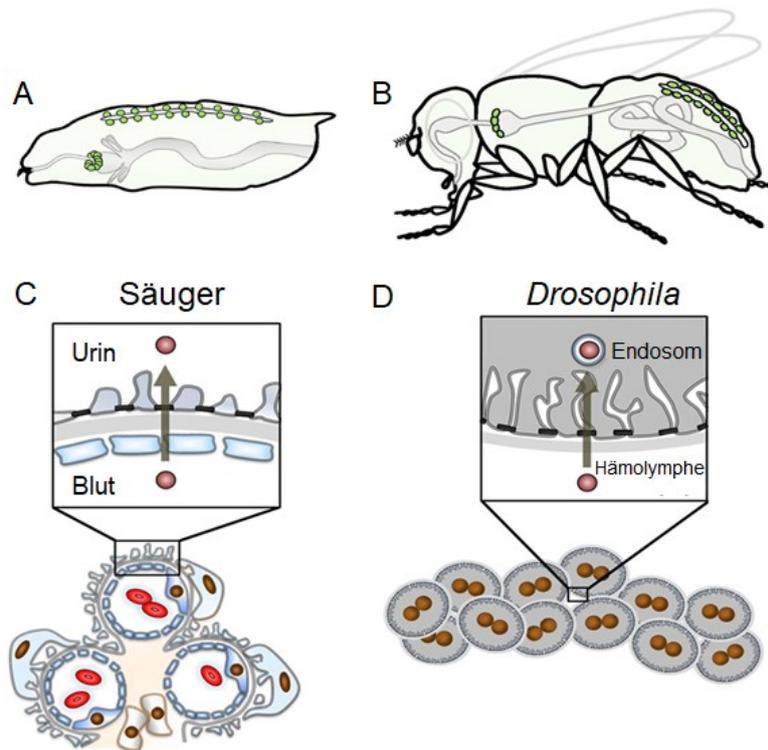
Anstelle von 3 Filtrationsanteilen, wie es beim Menschen der Fall ist, besitzt das Filtersystem *Drosophilas* 2 Schichten. Diese Tatsache ist auf dem Fehlen einer dem Endothelium äquivalenten Hämolymphe-Filtrationsbarriere begründet. Das Blut des Menschen sowie die Hämolymphe der Fliege werden auf dem Weg der Filtration gleichermaßen anhand von Größe und Ladung selektiert. In beiden Systemen übernimmt eine negativ geladene Basalmembran die ladungsselektive Aussonderung molekularer Bestandteile. Die überwiegend gröÙenselektive Wirkung der zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten ausgespannten Schlitzmembran ist auch im Filtersystem der Fliege vertreten. Ultrastrukturelle Aufnahmen der Nephrozytenmembran zeigen das Bestehen von Labyrinthähnlichen Verzweigungen in Form von Lakunen, zwischen denen wie beim Menschen ca. 40 nm breite schlitzartige Membranen ausgespannt sind. Das Filtern von Bestandteilen in die extrazellulären Lakunen erinnert an das Auffangen des Ultrafiltrates durch die Bowman-Kapsel. Die ebenfalls in den Lakunen stattfindende hohe Endozytoseaktivität gleicht jener der podozytären Fußfortsätze, die eine hohe Menge an Clathrin-bedeckten Invaginationen aufweisen. Im Gegensatz zum Podozyten des Säugers wird das produzierte Filtrat nicht in ein proximales Tubulussystem weitergeleitet, sondern vom Nephrozyten endozytiert und

gespeichert (Weavers et al., 2009; Zhuang et al., 2009; Na und Cagan, 2013). Somit verbindet der Nephrozyt zwei Funktionen in einer Zelle. Für die Proteinabsorption aus der Hämolymphe bestehen die gleichen zwei Hauptrezeptoren wie es im renalen Proximaltubulus der Fall ist: CG32702 als Homolog für Cubilin und CG11592 für Amnionless im Säuger (Boute et al., 2000; Storm et al., 2011; Wahlstedt-Fröberg et al., 2003). Die durch die Faltung der Nephrozytenmembran entstehenden Lakunen gleichen dem Bürstensaum der proximalen Tubuluszellen in seiner oberflächenvergrößernden Wirkung. Nephrozyten charakterisieren sich durch eine hohe Anzahl von Organellen in Form von Endosomen, Lysosomen und Vakuolen. Nicht zuletzt die hohe Endozytoseaktivität lässt darauf schließen, dass der Nephrozyt nicht nur analog zum Podozyten, sondern auch analog zum proximalen Tubulussystem ist (Zhang et al., 2013).

### **4.3. Molekularer Vergleich zur Schlitzmembran des Menschen**

Bereits embryonal, aus dem Mesoderm hervorgehend, zeigen Podozyten und Nephrozyten erste Gemeinsamkeiten (Mandal et al., 2004). Im Jahre 1972 wurde beschrieben, dass die Membranınvaginationen von einer auto-zellulären Membran überbrückt sind, die gezielt nach Größe selektierend die Passage kontrolliert (Crossley, 1972). Den ultratrukturellen Beweis dafür erbringend, gelang Weavers et al. (2009) die Entschlüsselung der molekularen Komponenten der Schlitzmembran *Drosophilas* und deren bemerkenswerte Konservierung. Mit der Betitelung der Nephrozyten als Podozyten-ähnliche Zelle war die Analogie der finalen Filtrationsbarriere zwischen *Drosophila* und Säuger geschaffen (Weavers et al., 2009).

Nephrozyten und Podozyten sind die einzigen bislang bekannten Zelltypen, in denen Sns und Kirre, bzw. Nephrin und Neph1, die für das Funktionieren der Filtrationsleistung maßgeblich sind, in einer Zelle vorkommen (Weavers et al., 2009). Wie beschrieben führt das Fehlen von Neph1 zum Schlitzmembranverlust und verursacht das NS (Donoviel et al., 2001, Liu et al., 2003). Analog zu diesen Erkenntnissen zeigen sich in *Drosophila* charakteristische strukturelle Defekte, die darauf schließen lassen, dass diese Proteine nicht nur in ihrer Existenz mit denen im Menschen übereinstimmen, sondern auch in ihrer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Schlitzmembran (Weavers et al., 2009; Zhuang et al., 2009; Hermle et al., 2017). Nephrozyten zeigen nach Ausschalten entsprechender Gene Verdickungen der Basalmembran, fehlende Labyrinthgänge sowie eine Glättung der Zelloberfläche bis hin zum vollständigen Verlust der Nephrozytenmembran (Weavers et al., 2009; Zhuang et al., 2009).



**Abbildung 4: Lokalisierung der Podozyten-ähnlichen Nephrozyten und Vergleich des Filterapparates zwischen Säuger und Fliege.** (A) Schematische Darstellung der Nephrozyten einer Larve des 3. Stadiums (L3). (B) Veranschaulichung der Lage der Nephrozyten in der adulten Fliege. Die Nephrozyten werden ihrer Lokalisation entsprechend in die Garlandzellen und in die perikardialen Nephrozyten unterteilt. Die Garlandzellen liegen als perlschnurartige Zellen um den Pharynx nahe des Proventrikulus. Die perikardialen Nephrozyten liegen zweireihig entlang des Herzens. (C) Die Filtrationsbarrieren des Säugers in schematischer Darstellung. Die Passage erfolgt über das fenestrierte Kapillarendothel, über die glomeruläre Basalmembran und als letzte Filtereinheit über die Schlitzmembran in Richtung Urinseite der Bowman-Kapsel. (D) Vergleichende Gegenüberstellung zum Filtrationsapparat Drosophilas. Aus der Hämolymphe erfolgt die Filtration über die Basalmembran und über die Schlitzmembran in Richtung Lakune.

Modifiziert nach: Helmstädter et al. (2017). Using the *Drosophila* nephrocytes to model podocytes function and disease. Figure 1. *Front. Pediatr*; 5:262. Copyright © 2017. Helmstädter, Hermle und Huber. Creative Commons Attribution License (CC BY).

Nicht zuletzt begründet auf der Tatsache, dass Zellkultursysteme eine Limitation der *in vivo* Untersuchung der Podozytenfunktion beinhalten (Pavenstädt et al., 2003; Yaoita et al., 2001), bezeichnen Simons und Huber (2009) die Nephrozyten als „fliegende Podozyten“. In Kombination mit den einschlägigen Vorteilen des Modellorganismus im Allgemeinen und der enormen Analogie zum humanen Nierenfilter im Speziellen, tritt der Nephrozyt als valides Modellsystem in den Fokus innovativer Studien zur Podozyten Biologie und Pathophysiologie sowie zur Nierengesundheit und Erkrankung.

#### 4.4. Die Verbindung molekularer Schlitzmembranelemente mit der Bedeutung dieser Proteine im *Drosophila* Facettenauge

Das Auge *Drosophilas* setzt sich in der Gestalt eines biologischen Kristalls aus zahlreichen einzelnen Bestandteilen, den sogenannten Ommatidien, zusammen. Rund 750 Ommatidien formen in ihrer Gesamtheit das Komplexauge der Fruchtfliege (Ready et al., 1976). Jedes dieser Einzelteile ist jeweils aufgebaut aus 8 Photorezeptoren (R1 bis R8), 4 Kristallkugeln, 3 Borstenzellen und 11 Pigmentzellen (Ready et al., 1976; Kumar, 2012). In der adulten wildtypischen Fliege zeigt sich das Facettenauge als gleichmäßig ausgebildetes Organ, in der die Ommatidien klar voneinander abgegrenzt und durch jeweils 3 im maximalen Abstand zueinanderstehenden Borstenzellen umgrenzt sind. Für diese erstaunlich präzise Geometrie sind die sogenannten Interommatidialzellen (IOC) und die primären Pigmentzellen verantwortlich, die im Laufe der Augenentwicklung die Separation benachbarter Ommatidien initiieren. Exakt diese Trennung ist essentiell für das Sehvermögen der Fliege (Bao et al., 2010). Bao et al. gelang im Jahre 2010 das Aufdecken eines Meilensteins, der für die fortlaufende *Drosophila* Forschung von prägender Bedeutung war. Während die primären Pigmentzellen für die Expression von Sns und Hbs (*Drosophila*-Homologe für Nephhrin) sorgen, konnte die Arbeitsgruppe entschlüsseln, dass die Interommatidialzellen Kirre und Rst (*Drosophila*-Homologe für Neph1) exprimieren. Mit dem Ziel Verständnis darüber zu erlangen, welche Auswirkungen die Expression auf die Entwicklung und Morphologie des Facettenauges hat, wurden die verschiedenen Adhäsionsmoleküle im KD untersucht. Die alleinige Reduktion von Sns oder Hbs ging mit milden Defekten des Auges in Form von Borstenfehlstellungen einher. Im Vergleich dazu zeigte der simultane KD eine fehlende Separation der Ommatidien, was als „rough eye“ Phänotyp betitelt wurde. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bezüglich Kirre und Rst verzeichnet werden. Der separate KD von Kirre oder Rst resultierte in minimalen Effekten. Wurden Kirre und Rst hingegen gemeinsam in ihrer Expression reduziert, war eine fehlende Teilung der Ommatidien die Folge. Mit diesem Zugewinn an Wissen konnte gezeigt werden, dass die *Drosophila*-Homologe für Nephhrin und Neph1 nicht nur für die Integrität der Schlitzmembran, sondern auch für die Integrität der separierten Ommatidien des Facettenauges verantwortlich sind. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass Kirre und Rst beziehungsweise Sns und Hbs im Zusammenspiel erforderlich sind, um im Laufe der Augenentwicklung separierte Ommatidien zu erhalten. Diese Annahme konnte in der selbigen Versuchsreihe durch die Visualisierung der Kolo-kalisation von Kirre und Rst bekräftigt werden (Bao et al., 2010). Diese Befunde im Facettenauge *Drosophilas* decken sich mit der Interaktion von Nephhrin und Neph1 im Rahmen der Integrität der Schlitzmembran. Die Möglichkeit die Auswirkungen des KD der Nephhrin und Neph1 Moleküle auch in einem weiteren Organsystem zu untersuchen, erweiterten Methodenspektrum und Interpretationskraft erheblich. Nach

durchgeführten Versuchen zu Funktionalität und Intaktheit der Nephrozytenschlitzmembran, kann diesen Untersuchungen die REM-Betrachtung des Auges nachgeschaltet werden.

## 5. Interessante podozytäre Proteine des Nierenfilters

Die nephrologische Arbeitsgruppe (AG) des Labors von Univ.-Prof. Dr. Tobias B. Huber unter der Leitung von PD Dr. Florian Grahammer setzt den Fokus ihrer Untersuchungen auf die molekularen Bestandteile der glomerulären Schlitzmembran, mit dem Ziel das Verständnis über Architektur und Interaktion des Nierenfilters zu fundieren und zu komplementieren. Die meisten der mutierten Gene, die eine Proteinurie verursachen, exprimieren für Genprodukte, die eine hohe Anreicherung im Podozyten aufweisen. Nach vorangegangener Präparation von Glomeruli aus Ratten und Mäusen und anschließender Extraktion, führte die AG daher mithilfe hochauflösender Massenspektrometrie Proteomanalysen des Podozyten durch (Rinschen et al., 2016). Ausgewählt aus diesen Proteomanalysen werden in der vorliegenden Arbeit die in der Zellmembran lokalisierten Proteine (Tsachaki et al., 2011; Lai und Lemke, 1991) der Gene ITM2B, MERTK und NPR3, da sie als potentielle Interaktoren der Schlitzmembran in Frage kommen. Aus anderen Forschungsgebieten ist bekannt, dass die Genprodukte von ITM2B, MERTK und NPR3 in diverse Zellprozesse involviert sind. Diese Tatsache macht die genannten Gene zusätzlich interessant, gerade weil es sich bei dem Podozyten um einen post-mitotischen Zelltyp mit limitierter Regenerationskapazität handelt (Nagata et al., 1998), der architektonisch sowie funktionell im besonderen Maße auf zelluläre Prozesse angewiesen ist.

Mit dem Ziel weitere für den Podozyten bedeutsame biologische Prozesse wie Aktinzytoskelettverlinkung, Zelladhäsion, Autophagie und Endozytose abzudecken, werden mit FERMT2, BECN1 und VASN zudem Gene aus dem Untersuchungsgebiet der verschiedenen AG unter der Leitung von Dr. Dr. Christoph Schell, Dr. Tillmann Bork und Dr. Pierre-Louis Tharaux beleuchtet. Darüberhinaus sind die Proteine in Signaltransduktionswege involviert, die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge (Proliferation, Apoptose, Inflammation) beeinflussen. Die verschiedenen AG beschäftigen sich intensiv mit den Effekten auf die jeweiligen Zellprozesse des Podozyten nach KO genannter Gene, deren podozytäre Proteinexpression in der nephrologischen Forschung bereits bekannt ist.

Die ausgewählten Gene und die dazugehörigen Proteine sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Im Anschluss sollen die genannten Gene und deren Proteine basierend auf aktueller Literatur und hinsichtlich bislang bekannter Eigenschaften und Funktionen vorgestellt werden, um im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Modellorganismus *Drosophila* untersucht zu werden.

Tabelle 1: Ausgewählte Gene, deren Proteine in Zellprozesse involviert sind.

Gen	Kodiertes Protein	Zelluläre Prozesse, in die die Proteine aus bislang bekannten Forschungsgebieten involviert sind
ITM2B	Integrales Membranprotein 2B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apoptose bei Genmutationen (Fleischer et al., 2002; Fleischer und Rebollo, 2004)</li> <li>- Wachstum und Differenzierung (Choi et al., 2004)</li> <li>- Großes Interaktom im Gehirn (Martins et al., 2018)</li> </ul>
MERTK	Mer Rezeptor-Tyrosinkinase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aktivierung von Signalwegen (Wachstum, Differenzierung, Migration) durch Tyrosinkinaseaktivität (Kolibaba und Druker, 1997)</li> <li>- Apoptotische Phagozytose, Homöostase und Gewebereparatur (Lu und Lemke, 2001; Rothlin et al., 2007; Cohen et al., 2002)</li> </ul>
NPR3	Natrium Peptid Rezeptor C	<ul style="list-style-type: none"> <li>- G-Protein gekoppelter Rezeptor mit Einfluss auf Homöostase und Aktinzytoskelett (Maack et al., 1987; Almeida et al., 1989)</li> </ul>
FERMT2	Fermitin2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verlinkung mit fokalen Adhäsionen sowie Einfluss auf Aktivität des Aktomyosinzytoskeletts und Migration (Yasuda-Yamahara et al., 2018)</li> <li>- Verlinkung des Zytoskeletts mit Transmembranproteinen (Chishti et al., 1998)</li> <li>- Zelladhäsion (Tu et al., 2003)</li> <li>- Regeneration von Gehirngewebe (Ellison et al., 1998)</li> </ul>
BECN1	Beclin-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protektive, antiapoptotische und antivirale Funktionen (Liang et al., 1998)</li> <li>- Autophagie, Endozytose und Phagozytose (Wirawan et al., 2012)</li> </ul>
VASN	Vasorin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wachstums- und Reparaturprozesse (Ikeda et al., 2004)</li> </ul>

## 5.1. ITM2B

Das Gen ITM2B kodiert für ein Glykoprotein, das zu der Familie der integralen Transmembranproteine des Typs II gehört (Deleersnijder et al., 1996; Vidal et al., 1999; Vidal et al., 2000). Ubiquitär im humanen Organismus exprimiert, verzeichnet ITM2B die höchsten Expressionsspiegel in der Niere und dem Gehirn (Vidal et al., 1999). Unter physiologischen Bedingungen stimuliert das Protein den Auswuchs von Axonen (Choi et al., 2004) und steht in direkter Interaktion mit dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) (Matsuda et al., 2005). Mutationen dieses auch als BRI2 bezeichneten Gens sind ursächlich für die Entstehung der Familiären Britischen Demenz (FBD) sowie der Familiären Dänischen Demenz (FDD) (Vidal et al., 1999; Vidal et al., 2000). Es handelt sich um ein Vorläuferprotein, das durch Spaltungsprozesse ein Peptid entlässt, das für die Inhibierung von Amyloidaggregationen verantwortlich ist (Matsuda et al., 2005; Fotinopoulou et al., 2005). Kommt es durch Mutationen zur Bildung eines längeren Peptids, formt dieses fehlgefaltete  $\beta$ -Strukturen, die sich in Form von Oligomeren und Fibrillen niederschlagen. Diese neurotoxischen Peptide stellen die Hauptkomponenten der sogenannten Amyloidplaques dar, die für die charakteristischen neurodegenerativen Ablagerungen bei Patienten mit FBD und FDD verantwortlich sind (Choi et al., 2004). Auch im *Drosophila*-Modellorganismus für Demenz gehen diese Peptide mit Neurotoxizität einher (Marcora et al., 2014). Eine Beteiligung von ITM2B wird ebenfalls für die Alzheimererkrankung postuliert (Del Campo et al., 2014). Im Rahmen von Missense-Mutationen, in denen der Einbau einer weiteren AS eine Punktmutation verursacht, konnten entsprechende Ablagerungen in Netzhaut- und Ganglienzellen von Patienten mit Retinadystrophie detektiert werden (Audo et al., 2014). Mutationen, die in Form von ITM2BS zu kurzen Formen des Proteins führen, sind in IL-2 stimulierten Zellen mit der Initiierung der Apoptose beschrieben (Fleischer et al., 2002; Fleischer und Rebollo, 2004). Eine Publikation aus dem Jahre 2013 rückt ITM2B in den Fokus nephrologischer Untersuchungen. Proteomische Analysen humanen Urins zur Identifizierung von Proteinen im Podozyten bestätigten, dass das Genprodukt von ITM2B renal lokalisiert ist (Prunotto et al., 2013).

## 5.2. MERTK

Bei MERTK handelt es sich um jenes Gen, das für die Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert, die der TAM-Familie innerhalb der Proteinkinasen angehört (Lai und Lemke, 1991). MERTK ist entsprechend der erstmalig identifizierten Expression in Monozyten, Epithelzellen und Reproduktionsorganen benannt (Graham et al., 1994). In der Zellmembran angesiedelt, stellen Tyrosinkinasen allgemein Rezeptoren dar, die intrazellulär über eine enzymatische Domäne, die sogenannte Tyrosinkinase (TK) verfügen. Durch Phosphorylierung werden Signalwege in

der Zelle aktiviert, die mit wichtigen Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Migration korrelieren. Die starke Expression in der Niere ist sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene bestätigt (Graham et al., 1994; Behrens et al., 2003). Bisherige Untersuchungen zu MERTK zeigen eine protektive Wirkung auf das Nierengewebe. Schwere Nephritiden und hochgradige Proteinurie sind bei KO-Mäusen im Rahmen einer nephrotoxisch induzierten Nephritis zu verzeichnen. Tiere ohne KO zeigen hingegen ein deutlich langsames Fortschreiten der Proteinurie (Shao et al., 2011). Die Korrelation zwischen KO und hochgradigen Glomerulonephritiden ist in weiterer Literatur beschrieben (Zhen et al., 2016). Außerhalb des Forschungsgebietes der Nephrologie ist bislang bekannt, dass MERTK in myeloiden Zellen wichtige Funktionen in der apoptotischen Phagozytose übernimmt. Durch Attenuierung von Entzündungsreaktionen steht MERTK in Verbindung mit der immunologischen Homöostase. Mittels Phagozytose sowie Hochregulierung von Suppressoren von Signalwegen und der Sekretion antiinflammatorischer Zytokine besteht eine wichtige Rolle für die Gewebereparatur (Lemke und Rothlin, 2008; Rothlin et al., 2007; Cohen et al., 2002; Lu, 2001). Der Wegfall dieser Signalwege steht mit einer unzureichenden Entfernung apoptotischer Zellreste und dem Fehlen inhibitorischer Wirkung auf das Immunsystem in Assoziation (Lu, 2001). Lupus-ähnliche autoimmune Funktionsstörungen zeigen sich im KO-Modell (Cohen et al., 2002; Lu, 2001). Im Pigmentepithel der Retina ist MERTK ebenfalls an der Regulierung der Phagozytose beteiligt. Mutationen führen zur Retinitis pigmentosa (RP) (Feng et al., 2002). CG2272 als homologes Gen in *Drosophila* ist im Zusammenspiel mit weiteren Komponenten Teil eines Signalkomplexes, der die Phagozytose im Gehirn initiiert (MacDonald et al., 2013).

### 5.3. NPR3

Das Gen NPR3 kodiert für den Natriumpeptidrezeptor C (NPRC), welcher zusammen mit den Natriumpeptidrezeptoren A und B (NPRA, NPRB) zu den Rezeptoren, die von der Familie der Natriuretischen Peptide (Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF), B-Typ Natriuretisches Peptid (BNP) und C-Typ Natriuretisches Peptid (CNP)) gebunden werden (Samson et al., 1998). Die Effekte Natriuretischer Peptide auf die Körperfunktionen im Allgemeinen und die Nierenfunktion im Speziellen beinhalten die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes sowie die Regulation des Blutdruckes. Studien zur Dexamethason-induzierten Hypertonie im Mausmodell entschlüsseln neben weiteren Genen das Vorhandensein von NPR3 im Zusammenhang der Blutdruckregulation (Sheen et al., 2015). Anhand von mRNA wurde NPR3 *in situ* in der Niere, im Herzen und im Gehirn detektiert (Wilcox et al., 1991). NPRC interagiert in seiner Rezeptorfunktion mit allen der drei Natriuretischen Peptide. Die stärkste Affinität besteht jedoch in der Bindung zu ANF, gefolgt

von jener zu CNP und BNP (Nashida et al., 1996). NPRA und NPRB gehören zu den Guanylcyclasen, wohingegen NPRC über keine Guanylcyclaseaktivität verfügt (Fuller et al., 1988), dafür aber einen G-Protein gekoppelten Rezeptor darstellt. Entgegengesetzt zu NPRA und NPRB, besteht die Funktion des NPRC in der Entfernung natriuretischer Peptide aus der Zirkulation und demnach in der Homöostase zirkulierender Peptide (Maack et al., 1987; Almeida et al., 1989). Diese natriuretischen Peptide spielen eine wichtige Rolle in der Abstimmung des intravaskulären Volumens sowie des vaskulären Tonus (Potter et al., 2006). Genmutation von NPR3 im Mausmodell gehen mit einer fehlenden Entfernung zirkulierender Peptide einher, führen zu einer herabgesetzten Fähigkeit der Konzentrierung des Urins sowie zu niedrigem Blutdruck (Matsukawa et al., 1999). Aktuelle Proteomik zeigt, dass NPRC der am opulentesten exprimierte Rezeptor in kultivierten Podozyten ist (Rinschen et al., 2016).

## 5.4. FERMT2

Das Genprodukt von FERMT2, auch als Kindlin-2 bezeichnet, gehört gemeinsam mit FERMT1 und FERMT3 der Familie der Kindlin-Proteine an, die sich durch ihre identische Architektur und durch das Vorhandensein einer C-terminalen FERM-Domäne charakterisiert (Siegel et al., 2003). Die FERM (4.1 (Four-point-one), Ezrin, Radixin, Moesin) -Domäne vermittelt die Verlinkung des Zytoskeletts mit Transmembranproteinen (Chishti et al., 1998). Das Gen kodiert für ein extrazelluläres Matrixprotein, dessen Gewebsexpression breit gefächert ist. Erstmalige Beschreibungen gehen auf das Vorhandensein von FERMT2 in Fibroblasten, Muskelzellen sowie in Endothel- und Epithelzellen zurück (Rogalski et al., 2000). Die subzelluläre Lokalisation im Bereich fokaler Adhäsionen (Ussar et al., 2006) geht einher mit der Rolle des Proteins auf dem Gebiet der Zelladhäsion (Tu et al., 2003). FERMT2 bindet die zytoplasmatische Seite von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3-Integrin (Harburger et al., 2009), die Verbindungen mit dem Aktinzytoskelett mediiert. Integrine sind Transmembranproteine, die als Adhäsionsrezeptoren wichtige Aufgaben in der Verbindung von Zellen untereinander sowie Zellen mit der extrazellulären Matrix (=Adhäsion) übernehmen (Harburger et al., 2009). Für die Zelle bedeutsame Schlüsselprozesse (Proliferation, Differenzierung, Apoptose) werden via Signalübertragung von der Matrix auf das Zytoskelett übermittelt. Dass FERMT2-defiziente Zellen nicht in der Lage sind, ihre Integrine zu aktivieren (Montanez et al., 2008), wird untermauert durch die Ausschaltung der F3-Untereinheit, die speziell für die Bindung verantwortlich ist (Garcia-Alvarez et al., 2003). Resultat dessen ist eine reduzierte Interaktion mit  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3-Integrin (Shi et al., 2007). Als Coaktivator von  $\beta$ 3-Integrin (Ma et al., 2008) ist FERMT2 in die Regeneration von Gehirngewebe nach einem Schlaganfall integriert (Ellison et al., 1998). In Schwann-Zellen, als Gliazellen des peripheren Nervensystems, ist FERMT2 essentiell für Adhäsion und Migration (Ji et al., 2012). Die Aufgabe besteht zudem im

Rekrutieren von Migfilin an die fokalen Adhäsionsbereiche. Migfilin verlinkt Zelladhäsionsstrukturen mit dem Aktinzytoskelett und reguliert die Umgestaltung von Aktin sowie die Morphologie und Motilität von Zellen (Tu et al., 2003). Erste klinische Relevanz ist für FERMT2 in Assoziation mit der Alzheimererkrankung beschrieben (Lambert et al., 2013). Autopsien zur Pathologie sind gekennzeichnet durch Ablagerungen, vornehmlich bestehend aus  $\beta$ -Amyloid und Tau-Protein. In *Drosophila*, ein für Alzheimerstudien etablierter Modellorganismus (Wittmann et al., 2001), ist das FERMT2 Homolog als ein an der Modulation der Neurotoxizität von Tau beteiligtes Gen beschrieben (Shulman et al., 2014). Der KD des Genhomologs Fit1 verstärkt im Facettenauge *Drosophilas* den durch Tau-KD initiierten rauen Augenphänotyp (Shulman et al., 2014). Neueste Untersuchungen zeigen, dass FERMT2 als Hauptmodulator des im Zentrum der Alzheimererkrankung stehenden APP fungiert und somit als entscheidender Risikofaktor für Amyloidmetabolismus und Produktion verantwortlich ist (Chapuis et al., 2017). Die Korrelation des Genlokus mit einer Abnahme kognitiver Leistung zeigt die Rolle von FERMT2 für degenerative Alzheimererkrankungen (Andrews et al., 2017). Insbesondere in der milden Entwicklungsstufe einer Verschlechterung der Wahrnehmungs- und Denkprozesse von Patienten ist FERMT2 mit einer Gehirn-Amyloidose assoziiert (Apostolova et al., 2018). Das ebenfalls zur Kindlin-Familie gehörende FERMT1 ist klinisch im sogenannten Kindler-Syndrom beschrieben, dass sich durch das Auftreten kongenitaler Hautbläschen charakterisiert (Has et al., 2011). Mutationen von FERMT3 sind an der Entstehung des Leukozyten-Adhäsionsdefizit vom Typ III beteiligt (Mory et al., 2008; Kuijpers et al., 2009).

Als Bestandteil der vorliegenden Arbeit beinhaltet die Publikation der AG Dr. Dr. Christoph Schell erste Erkenntnisse zu FERMT2 auf dem Bereich des Nierenfilters. Auf Basis der Ergebnisse aus dem Mausmodell, wurde in der vorliegenden Arbeit das FERMT2 Homolog in *Drosophila* untersucht (Yasuda-Yamahara et al., 2018). Im Podozyten hoch angereichert, überlappt die Expression von FERMT2 mit Proteinen, die in essentieller Verlinkung mit fokalen Adhäsionsrezeptoren und kortikalen Aktinproteinen stehen (Yasuda-Yamahara et al., 2018). Ein Fehlen resultiert für den Podozyten in verkleinerten fokalen Adhäsionen, einer Umorganisation des internen Aktinzytoskeletts sowie einer Reduktion der Geschwindigkeit der Zellmigration. Darüber hinaus zeigt die Blasenbildung der Plasmamembran des Podozyten nach KO, dass FERMT2 der Destabilisierung der Zellkortex vorbeugt. FERMT2 besitzt hochrelevante Aktin- und Integrinbindungsstellen für die Stabilisierung des kortikalen Aktinzytoskeletts. Weiter reguliert es die Aktivität des Aktomyosinzytoskeletts: Nach Verlust von FERMT2 zeigen Podozyten eine Hyperkontraktilität. Im Zebrafischmodellorganismus führt eine Suppression von FERMT2 zur Proteinurie (Yasuda-Yamahara et al., 2018).

## 5.5. BECN1

Das ubiquitär exprimierte humane Gen BECN1 kodiert für das Protein Beclin-1, mit einer Größe von 60 kDa (Liang et al., 1998) und ist auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert (Aita et al., 1999). Beclin-1 zeigt eine zelluläre Lokalisation nahe des trans-Golgi-Netzwerks, des ER und der Mitochondrien (Kihara et al., 2001; Pattingre et al., 2005). Die Funktion des evolutionär hochkonservierten Autophagieproteins ist in der Hefe (Kametaka et al., 1998), in *Dictyostelium discoideum* (Otto et al., 2004), in Pflanzen (Liu et al., 2005), in *Caenorhabditis elegans* (Melendez et al., 2003), im Mausmodell (Yue et al., 2003; Qu et al., 2003) sowie in humanen Zellen (Liang et al., 2001) beschrieben. Beclin-1 wurde erstmals im ZNS als Interaktor von Bcl-2 identifiziert, einem apoptotischen Zelltodregulator, in dessen Zusammenspiel Beclin-1 protektive, antiapoptotische und antivirale Funktionen einnimmt (Liang et al., 1998). Beclin-1 ist Kernkomponente des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K (III)) - Komplexes, der von Bedeutung ist für die Prozesse der Autophagie, der Endozytose und der Phagozytose (Wirawan et al., 2012). Gemeinsam mit Vps34, Vps15, UVRAG und Bif-1 bildet Beclin-1 einen Komplex, der die Autophagosombildung sowie die Fusion von Endosom zu Lysosom orchestriert (Liang et al., 2010; Juhász et al., 2008). Das Ausschalten von Vps34, das von Beclin-1 moduliert wird, hat die Blockade der Autophagosombildung sowie die Beeinträchtigung der Formation der späten Endosomen zur Folge (Jaber und Zong, 2013). Die Deletion von Vps34 im Podozyten resultiert in einer spontanen Glomerulosklerose (Bechtel et al., 2013a; Bechtel et al., 2013b) sowie der Degeneration des Podozyten und Proteinurie (Chen et al., 2013; Bechtel et al., 2013a). In *Drosophila* sind sowohl Vps34, als auch Vps15 notwendig für die Autophagieinduktion und das Überleben adulter Fliegen (Juhász et al., 2008; Lindmo et al., 2008). Der KD von Vps34 in Garlandzellen *Drosophilas* geht mit Veränderungen des endosomalen Transports, der Endozytose sowie der Reifung zu späten Endosomen einher (Bechtel et al., 2013a; Bechtel et al., 2013b). Die Reduktion via siRNA KD von Beclin-1, welches mit weiteren Autophagieproteinen in den Glomeruli hochangereichert ist, führt im Podozyten zur Inhibierung der Autophagie (Fang et al., 2013). Mutationen des entsprechenden Beclin-1 Homologes in *Drosophila* (Atg6) führen zu Beschädigungen der Funktion von Autophagie und Endozytose im Fettgewebe der Fliege (Shravage et al., 2013). Darüber hinaus ist Beclin-1 essentiell für den sogenannten UVRAG-Vps34 Komplex, der für die Regulation der Endozytose verantwortlich ist (McKnight et al., 2014). Die KO-Untersuchungen dieser AG zeigen, dass ein Verlust im Gehirn mit Störungen der Formation und Reifung von Endosomen einhergeht und eine Neurodegeneration zur Folge hat (McKnight et al., 2014). Studien zur Alzheimererkrankung belegen die neuroprotektive Rolle von Beclin-1 durch die Entfernung krankheitsverursachender Proteine wie APP (Pickford et al., 2008). Die Inhibierung von Atg6 in Neuronen der Fliege resultiert in einer herabgesetzten Lebensspanne sowie in einer

Reduktion der lokomotorischen Aktivität (M'Angale und Staveley, 2016). Zusätzlich steht das Fehlen von Beclin-1 in Verbindung mit der Tumorgenese (Liang et al., 2001) und ist von klinischer Bedeutung bei Brust-, Ovar- und Prostatakarzinomen (Aita et al., 1999).

## 5.6. VASN

Im Rahmen der Suche nach Molekülen, die im kardiovaskulären System potentiell für Wachstums- und Reparaturprozesse von Bedeutung sein könnten, entschlüsselten erstmals Ikeda et al. (2004) das in den vaskulären glatten Muskelzellen exprimierte Zelloberflächenprotein Vasorin, kodiert durch das Gen VASN (Ikeda et al., 2004). Bei Vasorin handelt es sich um ein Membran-Glykoprotein vom Typ I, bestehend aus einer C-terminalen Transmembrandomäne und einer extrazellulären Domäne, die über eine N-terminale Leukinreiche Region (LRR), eine EGF (epidermal growth factor) Region und eine Fibronectin-3 (FN3) Domäne verfügt (Ikeda et al., 2004). Aufgrund dieses strukturellen Aufbaus zählt Vasorin, das auch als Slit-like (Slit2) bezeichnet wird, zur Familie der Slitproteine, die bekannt sind für ihre Funktion in der neuronalen Entwicklung (Ypsilanti et al., 2010). Ob die Funktion von Vasorin mit den Aufgaben der Slit-Proteine überlappt, ist bislang jedoch unklar. Über die dominierende Expression in der Aorta hinaus ist Vasorin in den interstitiellen Zellen der Niere und in der Plazenta exprimiert (Ikeda et al., 2004). Zudem korreliert das Expressionsmuster in Abhängigkeit von Wachstums- und Differenzierungsprozessen (Ikeda et al., 2004). Im Zebrafischmodell charakterisiert es sich durch eine embryonale Expression im ZNS sowie im vaskulären System (Chen et al., 2005). In den sich entwickelnden Nieren im Mausmodell ist eine deutlich ansteigende Expression im Laufe der Embryogenese auffällig (Krautzberger et al., 2012). Durch Bindung von TGF- $\beta$  attenuiert Vasorin die durch TGF- $\beta$  initiierten Signalwege *in vitro* (Ikeda et al., 2004; Malapeira et al., 2011). Die TGF- $\beta$  Superfamilie umfasst in ihrer Initiierung essentielle Vorgänge wie die Embryonalentwicklung und die Gewebshomöostase (Wu und Hill, 2009). Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Entzündung sind zelluläre Prozesse, die durch TGF- $\beta$  Aktivierung reguliert werden (Massagué und Wotton, 2000). In der Niere spielt der Signalweg eine zentrale Rolle in der Pathogenese der renalen Fibrose (Verrecchia und Mauviel, 2007). Im Rahmen der diabetischen Nephropathie nimmt TGF- $\beta$  eine essentielle Stellung ein, da erhöhte Glukosespiegel die Freisetzung von TGF- $\beta$  stimulieren und die daraus resultierende gesteigerte Kollagensynthese zu einer fortschreitenden Nierenschädigung führt.

## 6. Hypothese und Fragestellung

Erkrankungen des Nierenkörperchens und dessen Filterapparates sind eine maßgebliche Ursache für chronische Nierenerkrankungen. Voraussetzung für das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge, die zum Symptomenkomplex des Nephrotischen Syndroms führen, sind molekulare Erkenntnisse zur präzisen Komposition und Maschinerie der finalen Selektionsbarriere. Mutationen bekannter Schlitzmembranmoleküle führen zum Wegfall der Intaktheit der Filtrationsbarriere und folglich zur Proteinurie. Werden Proteine, deren Anreicherung im Podozyten des Nierenfilters bekannt ist, mittels Gen-Knockdown in ihrer Funktionalität herunterreguliert, so ist es möglich, Erkenntnisse über entsprechende Auswirkungen auf die Filtereinheit zu gewinnen. Je mehr Einzelbausteine untersucht werden, desto besser kann auch die Interaktion aller molekularen Verbindungen der Filtrationsbarriere untereinander sowie deren Interaktion mit dem Podozyten verstanden werden. Dies ist gerade deswegen wichtig, weil es sich bei der Schlitzmembran viel mehr um ein dynamisches Signalzentrum handelt, als um einen statischen Filterapparat. Je mehr Ergebnisse zu Molekülen generiert werden können, desto eher können innovative Ausgangspunkte für Patientenorientierte Therapieansätze geschaffen werden. Dies spielt insbesondere für post-mitotische Zellen wie dem Podozyten, der über eine reduzierte Regenerationsfähigkeit verfügt, eine große Rolle. Durch die Ähnlichkeit der filtrierenden Nephrozyten *Drosophilas* mit den Podozyten des Säugers sowie durch die hohe Genhomologie zwischen Fliege und Mensch eignet sich das Fliegenmodell zur Beantwortung dieser nephrologischen Fragestellungen.

Untersucht werden in der vorliegenden Arbeit zum einen die *Drosophila*-Homologe für das Integrale Transmembranprotein 2B (ITM2B), die Mer Tyrosin Kinase (MERTK) und der Natrium Peptid Rezeptor 3 (NPR3) als potentielle Interaktoren der Schlitzmembran. Zum anderen soll die Bedeutung biologischer Zellprozesse innerhalb des Podozyten und die von dieser Seite ausgehende Beeinflussung der Filterarbeit der Schlitzmembran beleuchtet werden. Hierzu werden die Homologe für Fermitin2 (FERMT2), Beclin-1 (BECN1) und Vasorin (VASN) untersucht, die in diverse Zellprozesse verwickelt sind. Übergeordnetes Ziel ist es zu untersuchen, welche Auswirkungen das Knockdown der Homologe auf den funktionellen Filtrationsvorgang der Podozyten-ähnlichen Nephrozyten der Fruchtfliege sowie auf die Morphologie und Intaktheit der Schlitzmembran hat. Darüberhinaus stellt sich die Frage, ob es zu morphologischen Veränderungen der Nephrozyten kommt. Da die *Drosophila*-Homologe der Schlitzmembranmoleküle Nephrin und Neph1 nicht nur für deren Integrität, sondern auch für jene der Augenstruktur der Taufliege verantwortlich sind, soll abschließend beantwortet werden, ob der Einfluss auf die Entwicklung beider Organsysteme für die putativen Genhomologe konserviert ist.

### III. Material und Methoden

#### 1. Material

##### 1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Allgemeine Laborgeräte und Arbeitsutensilien.

Geräte	Hersteller
Bechergläser	Schott, Mainz, Deutschland
Binokular Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Flypad und CO <sub>2</sub> -Pistole	Genesee Scientific, San Diego, USA
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Inkubator 19 °C	Lucky Reptile, Import Export Peter Hoch, Waldkirch, Deutschland
Inkubator 29 °C	Sanyo, Moriguchi, Japan
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborabzug	Wesemann, Wangen im Allgäu, Deutschland
Laborflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
Magnetrührer	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Magnetrührplatte	Heidolph Instruments, MR Hei-Tec, Schwabach, Deutschland
Mikrowelle	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pinsel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Schnorchel für Fliegen	selbst gebaut, bestehend aus gekürzter Pasteurpipette, Schlauch (Gummi), Filter aus Ceaprenstopfen, Pipettenspitze
Stoppuhr	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer	VWR, Deutschland, VV3
Wärmeschrank	Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 3: Spezielles Drosophila Präparierwerkzeug und Mikroskope.

Geräte	Hersteller
Alu Rack	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Axiomager Z1, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland
Eismaschine	AF20, Scotsman Ice, Milan, Italien
Eisbank	Fischer Elektronik, Mittenwalde, Deutschland
Konfokales Mikroskop	TCS4D / Leica; A1 CLEM Eclipse TI. / Nikon Hecht Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Pinzetten	Nr. 5 und Nr. 7, Dumont, Montignez, Schweiz
Präparierschale aus Glas	Hecht Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland

Tabelle 4: Geräte für Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie.

Geräte	Hersteller
Laborabzug	Wesemann, Wangen im Allgäu, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop "LEO Modell 1450VP"	1450VP LEO Electron Microscopy, Cambridge, England
Sputter Coater	Cressington, Watford, England
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop, ZEISS LEO 912 OMEGA	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wärmeschrank	Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 5: Allgemeine Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
0,2 ml PCR-Gefäße	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Adhäsions-Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Akupunkturnadeln	Dongbang, Korea
Aluminiumprobenteller	Plano, Wetzlar, Deutschland
Alufolie	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ceaprenstopfen für <i>Drosophila</i> Gefäß	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen High Precision 22 x 22 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Drosophila</i> Gefäß 68 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz, Deutschland
Filterpapier Typ 714	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Haftaufkleber, leitfähig, 12 mm	Plano, Wetzlar, Deutschland
Kanülen, Sterican	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Latexhandschuhe	Ansell, Richmond, Australien
Nagellack Essence the gel	Cosnova, Sulzbach, Deutschland
Nitrilhandschuhe powderfree	Ansell, Richmond, Australien
Objektträger 76 x 26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Objektträgermappe	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Präzisionstücher, Kimtech Science	Kimberly-Clark Professional, Koblenz, Deutschland
Rasierklingen	American safety razor, Verona, USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rollrandgläser	Bruno Kummer, Freiburg, Deutschland
Skalpell	Surgical Disposable Scalpels, Braun, Deutschland
Spritzen Omnifix-F	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Spritzen, Insulin, U-100	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

## 1.2. Chemikalien

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Chemikalien.

Chemikalien	Herkunft
1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
25% Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, UltraPure™	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland

Backhefe, frisch	Edeka AG & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Bleicitrat	angesetzt nach Reynolds
Bouin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Durcupan verschiedene Komponenten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol (EtOH) 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FITC-Albumin Sigma-A9771	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glutardialdehyd 25%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mitespray (Milbenspray)	Genesee Scientific, San Diego, USA
Osmiumtetroxid 4% (in H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propylenoxid	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
Silica Gel Orange	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Uranyl Acetate Dihydrate Powder	Ted Pella, Redding, USA
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Vectashield	Vector Laboratories; Vertrieb Linaris, Wertheim, Deutschland

### 1.3. Medien und Lösungen

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Medien und Lösungen.

Bezeichnung Medium/Lösung	Zusammensetzung
0,1 M PB	Sigma, Steinheim, Deutschland
1% Osmiumtetroxid	Vermischen von 1 Teil Osmiumtetroxid (4% gelöst in H <sub>2</sub> O) mit 4 Teilen 6,86% Saccharosepuffer, unter dem Abzug
1% Uranylacetat in 70% Ethanol	Mischen von 1 g Pulver Uranylacetat mit 100 ml 70%igem Alkohol, anschließend lichtgeschützte Lagerung
4% PFA, 1% Glutaraldehyd in PBS	Frisches Ansetzen der Fixationslösung am Präparationstag. Teilproben mit 100 µl 4%igem PFA werden aus -20 °C entnommen. 4 µl 25%igem Glutardialdehyd werden in jede Teilprobe pipettiert; gut durchmischen am Vortexer
6,86% Saccharosepuffer	Ansatz von 0,1 M PB mit 6,86 g Saccharose
Agar für TEM-Einbettung	1,125 g UltraPure™ Agarose werden mit 25 ml Aqua ad iniectionem angesetzt; mehrere Stunden quellen

	lassen; unter Sichtkontrolle mehrfach in der Mikrowelle hochkochen lassen, in Reaktionsgefäße aliquotieren und bis zur Weiterverarbeitung auf 40 °C im Wärmerüttler halten
Bleicitrat	angesetzt nach Reynolds
Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90% und 100%)	Die jeweilige Verdünnung mit destilliertem Wasser und Ethanol ansetzen
Bouin-Lösung	75% Pikrinsäure (1,2%) 20% Formaldehyd (37%) 5% Essigsäure (Eisessig) Sigma, Steinheim, Deutschland
<i>Drosophila</i> Futtermedium	88 g Agarose in 7 l kochendes Leitungswasser einrühren; 2-3 min aufkochen; 686 g Hefeflocken, 560 g Maisgrieß und 756 g Sojamehl einrühren; 15 min kochen lassen; 280 g Zuckerrübensirup und 560 g Gerstenmalzextrakt einrühren; 30 ml Propionsäure und 7 g Nipagin in 70 ml Ethanol zugeben; In <i>Drosophila</i> -Gläser überführen; nach Erkalten mit Schaumstoffstopfen verschließen
Ethanol/ HDMS	Mischen von 1 Teil Ethanol mit 1 Teil HMDS unter dem Abzug
FITC-Albumin Lösung	0,2 mg/ml PBS 20 mg Pulver werden mit 100 ml PBS angesetzt, gut vermischt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert
Frische Hefe	Ein im -20 °C-Schrank gelagerter Hefe-Würfel wurde entnommen und bei 4 °C aufgetaut, Die Hefe wird mit wenigen Tropfen destilliertem Wasser vermischt bis ein zäher Brei entsteht. Dieser Brei wird für gute Portionierbarkeit in eine 30 ml Spritze gefüllt.
PBS	Sigma, Steinheim, Deutschland
PBST	PBS mit 0,4% Triton X-100
PFA 4%	40 g Paraformaldehydpulver 95% in 1 l PBS bei 65 °C im Wasserbad lösen. Aliquotieren und bei 20 °C lagern.
PFA 8%	PFA 32% mit PBS auf 8% verdünnt.

Propylenoxid/Durcupangemisch 2:1 2 Teile	Propylenoxid und 1 Teil Durcupan werden in einem Zentrifugenröhrchen gemischt bis eine schlierenfreie Lösung entsteht.
Propylenoxid/Durcupangemisch 1:1	1 Teil Propylenoxid und 1 Teil Durcupan werden in einem Zentrifugenröhrchen invertiert bis eine schlierenfreie zähe Lösung entsteht.

## 1.4. Antikörper

Tabelle 8: Antikörper aufgeteilt in primär und sekundär.

Primärantikörper	Tier	Konzentration	Herkunft
126i (anti-kirre)	Kaninchen	1:200	Labor Fischbach, Freiburg, Deutschland
Sekundärantikörper	Tier	Konzentration	Herkunft
Alexa Fluor® 488 anti-rabbit	Ziege	1:100	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## 1.5. Fliegenstämme

Der Übersicht halber werden die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme unterteilt in zwei Gruppen: Gal4-Treiberlinien und UAS-RNAi-Linien.

Tabelle 9: Gal4-Treiberlinien.

Lokalisation der Expression	Genotyp	Ursprung
GCN-Treiberlinie (Garlandzellen)	w[*]; P(Prospero-Gal4)	Barry Denholm, Edinburgh, Schottland
Augen-Treiberlinie (Augen- Immaginalscheiben)	w[*]; GAL4-ninaE.GMR	Bloomington 1104

Tabelle 10: UAS-RNAi-Linien für die humanen Gene unter Angabe der prozentualen Homologie.

<b>Drosophila Gen (Internes Symbol)</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Humanes Gen</b>	<b>Homologie der kodierenden Sequenz (BLAST)</b>	<b>Homologie der exprimierten Proteine (DIOPT DRSC)</b>
WTB	Wildtyp <sup>Berlin</sup>	Karl Friedrich Fischbach, Freiburg, Deutschland			
Kirre (C1)	UAS-CG3653-RNAi	CG3653 VDRC 27227/GD	KIRREL	93,55%	Identisch: 27% Ähnlich: 41%
Hattifattener (haf) (A10)	UAS-CG14351-RNAi	CG14351 VDRC Konstrukt: 106986 101124/KK	VASN	87,50%	Identisch: 24% Ähnlich: 37%
CG3662 (A12)	w[1118]; PBac{w[+mC]=RB}CG3662[e04640]	CG3662 VDRC Konstrukt: 18281	ITM2B	82,61%	Identisch: 24% Ähnlich: 44%
Slipper (A14)	UAS-CG2272-RNAi	CG2272 VDRC Konstrukt: 9771 33518/GD	MERTK I	95,83%	Identisch: 36%
Slipper (A15)	UAS-CG2272-RNAi	CG2272 VDRC Konstrukt: 100726 106449/KK	MERTK II	95,83%	Identisch: 36%
CG14877 (A17)	UAS-CG14877-RNAi	CG14877 VDRC 45324/GD	NPR3	95,24%	Identisch: 26% Ähnlich: 47%

Autophagy-related 6 (Atg6) (A20)	UAS-CG5429-RNAi	CG5429 BDSC Lager- nummer: 110197/KK	BECN1	75,57%	Identisch: 50% Ähnlich: 68%
Fermitin1 (Fit1)	UAS-CG14991-RNAi	CG14991 BDSC Lager- nummer: 46494/GD	FERMT2	69,23%	Identisch: 45% Ähnlich: 62%
Fermitin2 (Fit2)	UAS-CG7729-RNAi	CG7729 BDSC Lager- nummer: 37010/GD	FERMT2	75,27%	Identisch: 44% Ähnlich: 63%

Mithilfe der angegebenen CG-Nummer sowie der entsprechenden Konstrukt- oder Lagernummer ist es möglich, weitere Details zu den kommerziell erworbenen Fliegenstämmen zu erhalten. Sowohl die Plattform FlyBase als auch die Homepage des VDRC können hierzu verwendet werden.

## 1.6. Software

*Tabelle 11: Software.*

Name der Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems, München, Deutschland
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla, USA
ImageJ	Wayne Rasband (NIH), Bethesda, USA
NIS-Elements AR Analysis	Nikon, Tokio, Japan
NIS-Elements Viewer 4.20	Nikon, Tokio, Japan

## 1.7. Online-Programme

Tabelle 12: Online-Programme mit dazugehöriger URL.

Name des Programms	Verwendung	URL
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information (NCBI)	Homologabgleich	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
DIOPT - DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool, Harvard Medical School	Homologsuche	<a href="http://www.flyrnai.org/diopt">http://www.flyrnai.org/diopt</a>
FlyBase	Details zu Fliegenstämmen	<a href="http://www.flybase.org">www.flybase.org</a>
NCBI - National Center for Biotechnology Information	DNA-, RNA- und Proteindatenbank	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
The Human Gene Database	Details zu humanen Genen	<a href="http://www.genecards.org">www.genecards.org</a>

## 2. Methoden

### 2.1. Bioinformatik: Auswahl geeigneter Genhomologe und Bestellung passender RNAi-Linien

Vor Beginn der Arbeit mit *Drosophila* ist zunächst die bioinformatische Analyse zum Genabgleich zwischen Mensch und Fliege notwendig. Ziel ist es, für das jeweilige im Fokus der Untersuchungen stehende humane Gen, das maximale Äquivalent im Fliegen-genom aufzufinden, um dieses in den nachfolgenden Versuchsreihen im KD zu untersuchen.

Zur Erforschung der Homologie auf DNA-Ebene wurde das sogenannte *DIOPT DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool* der *Harvard Medical School* genutzt (Hu et al., 2011). Hierbei handelt es sich um eine Software, die beruhend auf Algorithmen zutreffende Homologe der Fliege für das humane Gen vorschlägt. Nach erfolgter Festlegung der Eingangsspezies (*Homo sapiens*), der Ausgangsspezies (*Drosophila melanogaster*) sowie der Nennung des im Interesse stehenden Gens, werden ein oder mehrere adäquate Homologe generiert. Als wegweisende Charakteristika in der Entscheidungsfindung für das am besten korrespondierende Homolog, ermittelt die Software diverse Informationen. „Best Score“, „Best Score Reverse“ sowie „Rank“ geben Auskunft über die Qualität der ermittelten Homologie. In Form von „Scores“ wird auf Basis der Anzahl von Algorithmen eine Punktzahl errechnet. Erhält ein Homolog den „Best Score“ so bedeutet dies, dass kein anderes Homolog als das vorgeschlagene eine höhere Punktzahl im genetischen Verwandtschaftsgrad von Mensch zu Fliege aufweist. Der „Best Score Reverse“ steht für den besten Treffer, wenn die Eingangs- und Ausgangsspezies in der Sucheinstellung umgekehrt werden. Aus der Verbindung von „Best Score“ und „Best Score Reverse“ wird abschließend der Rang („Rank“) analysiert, der je nach Punktzahl als niedrig, moderat oder hoch konkretisiert wird (Hu et al., 2011). Im generierten Suchergebnis wird neben dem humanen Symbol (z.B. ITM2B) das sogenannte Fliegensymbol (z.B. CG3662) angezeigt. Dieses steht für das Gen *Drosophilas* und ist im Nachfolgenden für die Suche geeigneter Bestellungen notwendig. Da Algorithmen einer Software kontinuierlich erweitert und aktualisiert werden, werden in der vorliegenden Arbeit jene Ergebnisse vorgestellt, die zum Zeitpunkt der Ermittlungen vorgeschlagen wurden. Desweiteren gibt die Software Auskunft über den Grad der Homologie zwischen den resultierenden Proteinen des humanen Gens und des Fliegengens. Unter „Alignment & Scores“ wird der Abgleich beider Proteine in Form einer prozentualen Angabe identischer sowie ähnlicher Aminosäuresequenzen angezeigt.

Zusätzlich zu der *DIOPT DRSC* Software, wurde im Rahmen der bioinformatischen Analyse das Programm *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) genutzt. Mithilfe von

*BLAST* erfolgt ein Sequenzabgleich mittels Eingabe des sogenannten FASTA-Formats. Hierbei handelt es sich um ein textbasiertes Format, das die Primärstruktur von wahlweise Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen in Form von Buchstaben darstellt. Zugang zum FASTA-Format findet man bspw. über die Datenbank der Homepage des zentralen Institutes für Datenverarbeitung und Datenspeicherung in der Molekularbiologie (NCBI; National Center for Biotechnology Information). Das Programm *BLAST* gibt abschließend die analysierte Homologie in Form einer prozentualen Auswertung an. Je höher hierbei der sogenannte „score“ ist, desto höher ist die Identität der miteinander verglichenden Sequenzen.

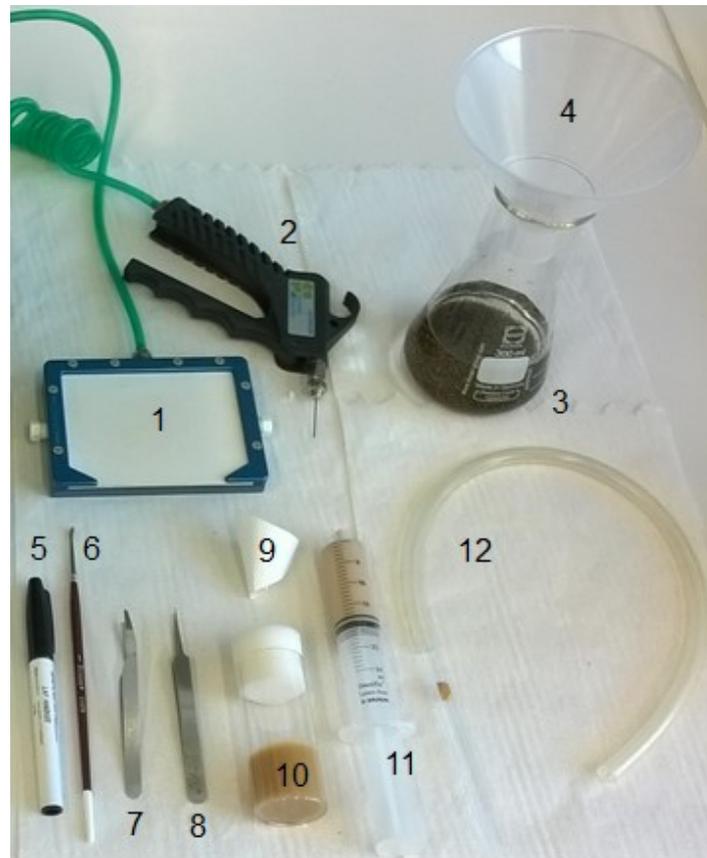
Nach Auswahl des homologen Fliegengens mithilfe der dargestellten Programme wird zur Untersuchung der Folgen eines KD eine RNAi-Linie benötigt. Die Bestellung der passenden RNAi-Linie erfolgt mithilfe des Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC). Beim VDRC handelt es sich um eine Online-Bibliothek, die es Forschern weltweit ermöglicht, Fliegenstämme kommerziell zu erwerben. Nach Eingabe des Fliegensymbols (z.B. CG3662) werden die zur Verfügung stehenden Bestellmöglichkeiten angezeigt. Transgene *Drosophila* Bestände werden durch dieses Ressource-Zentrum aufrechterhalten und die benötigten Fliegen durch Versendung an bestellende Labore verteilt. Nach Erhalt der bezogenen RNAi-Linie können die ausgewählten Fliegenstämme für die unterschiedlichen Experimente verwendet werden.

## **2.2. Arbeiten mit *Drosophila***

Für die Arbeit mit *Drosophila* ist ein übersichtliches Maß an speziellen Instrumenten notwendig, die in Abbildung 5 dargestellt sind. Wesentlich für den täglichen Gebrauch ist das Vorhandensein einer CO<sub>2</sub>-Pistole, mithilfe derer die Betäubung der Fliegen erfolgt und die Handhabung *Drosophilas*, bspw. im Rahmen von Kreuzungen, ermöglicht wird. Das Flypad, welches kontinuierlich mit CO<sub>2</sub> durchströmt wird, erlaubt wiederum die Ruhigstellung der Fliegen während der Untersuchung unter dem Mikroskop. Ein Pinsel erleichtert das vorsichtige Hantieren adulter Fliegen im Rahmen der Geschlechtsidentifizierung, auf die im Nachfolgenden eingegangen wird. Mithilfe eines selbstpräparierten Schnorchels erfolgt der Transfer gesammelter Fliegen in die zuvor mit Nahrungsbrei, Hefe und Filterpapier vorbereiteten Fliegengläser (Abbildung 6). Mithilfe der Pinzetten werden die für die Präparation notwendigen L3-Larven entnommen.

Im nachfolgenden Verlauf werden diese allgemein notwendigen *Drosophila* Instrumente mit der jeweiligen Methode in Verbindung gebracht. Es wird zunächst auf die Fliegenhaltung eingegangen, gefolgt von der geschlechtsspezifischen Erkennung mit dem Ziel des Ansatzes von Kreuzungen. Anschließend erfolgt die Differenzierung der

Entwicklungsstadien mit einhergehender Auswahl des larvalen Entwicklungsstadiums und der abschließenden Präparationsmethode der Nephrozyten.



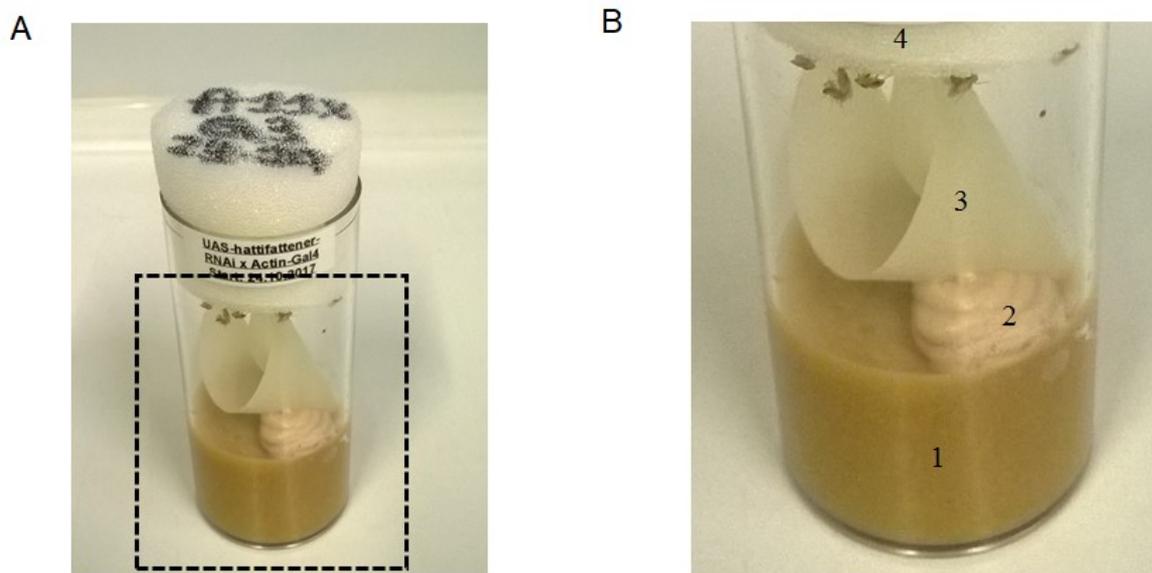
**Abbildung 5: Arbeiten mit *Drosophila*.** Die für die Arbeit mit *Drosophila* wesentlichen Utensilien bestehend aus (1) CO<sub>2</sub>-durchströmtes Flypad zur Betrachtung der Fliegen unter dem Mikroskop (2) CO<sub>2</sub>-Pistole zur Betäubung der Fliegen (3) Erlenmeyer-Kolben und (4) Trichter zum Verwerfen von Fliegen (5) wasserfester Stift zum Beschriften (6) Pinsel zur Handhabung der Fliegen (7) stumpfe Pinzette zur Entnahme von Larven (8) spitze Pinzette (9) Filterpapier (10) Fliegenglas mit Nahrungsmittel und Schaumstopfstopfen (11) 20 ml Spritze mit frisch angesetzter Hefe zur Befüllung der Fliegengläser (12) selbst gebauter Schnorchel bestehend aus gekürzter Pasteurpipette, Gummischlauch, Filter aus Ceaprenstopfen und Pipettenspitze zum Transfer. Eigene Aufnahme.

### 2.2.1. Haltung von *Drosophila*

Die einfache Haltung *Drosophilas* charakterisiert sich durch ein geringes Maß an notwendigen Materialien und ist zudem platzsparend. Die Fliegen werden in durchsichtigen Kunststoffgläsern gehalten, deren Boden zu ca. einem Drittel mit Nahrungsmittel bedeckt ist (Abbildung 6). Ein aus Filterpapier geformter Trichter wird im Medium platziert, um eine Vergrößerung der Oberfläche zu schaffen sowie gleichzeitig ein Aufsaugen überschüssiger Feuchtigkeit zu gewährleisten. Da der Nahrungsbrei hauptsächlich der Eiablage und anschließender Ernährung und Entwicklung der drei Larvenstadien dient, wird zusätzlich zur Fütterung Adulter ein Kegel frisch zubereiteter Hefe auf dem Boden des Mediums platziert.

Ein Schaumstoffstopfen ermöglicht den sauerstoffdurchlässigen Verschluss des Glases und beugt gleichzeitig der Gefahr eines Milbenbefalls vor. Durch regelmäßiges Einsprühen der Gläser mit Milbenspray wird zudem das Risiko reduziert. Die Gläser werden wiederum in Plastikbehältern gelagert, deren Boden mit Wasser und Spülmittel bedeckt ist. Durch diese Herabsetzung der Oberflächenspannung soll die Wanderung von Milben zwischen den Gläsern verhindert werden. Die Kontaminationsgefahr der Fliegenstämme wird somit erheblich minimiert.

Die Kunststoffgläser werden von außen mit einem wasserabweisenden Stift beschriftet und können somit entsprechend identifiziert werden. Die überwiegende Haltung der Gläser erfolgt bei Raumtemperatur (RT) im Labor oder in Inkubatoren bei 19 °C. Für Experimente angesetzte Gläser und die aus diesen Kreuzungen hervorgehenden Entwicklungsstadien werden in Inkubatoren mit einer Temperatur von 29 °C aufbewahrt. Der natürliche zirkadiane Rhythmus *Drosophila* wird mittels Zeitschaltuhr gesteuerter Beleuchtung gewährleistet. Nach spätestens 4 Wochen werden die Fliegen in ein frisch vorbereitetes Glas umgesetzt, um eine mit der Zeit ansteigende Infektionsgefahr zu umgehen.



**Abbildung 6: Haltung *Drosophila*.** (A) Übersichtsaufnahme eines Fliegenglases mit vollständiger Beschriftung (B) Bestandteile des Fliegenglases mit (1) Futtermedium, das zu einem Drittel den Boden des Glases ausfüllt (2) Kegel frisch mit Wasser angesetzter Hefe zur Ernährung adulter Fliegen (3) Trichterförmiges Filterpapier zur Vergrößerung der Oberfläche und Aufnahme überschüssiger Flüssigkeit (4) Schaumstoffstopfen. Eigene Aufnahmen.

## 2.2.2. Geschlechtsmorphologie und Erkennung

Die Differenzierung des Geschlechts erfolgt anhand verschiedener morphologischer Unterschiede und ist für das korrekte Ansetzen von Kreuzungen von wesentlicher Bedeutung. Das erste wichtige geschlechtsmorphologische Merkmal ist die Größe des Fliegenkörpers (Abbildung 7). Weibliche Fruchtfliegen sind deutlich größer als männliche. Für die präzise Identifizierung des Geschlechts ist die Betrachtung des Kaudalendes von Nutzen. Männliche adulte Fliegen weisen ein schmales und leicht gekrümmtes kaudales Ende auf, das sich durch prägnante Geschlechtsteile charakterisiert, die dunkel pigmentiert sind. Weibliche adulte Fliegen besitzen hingegen einen Unterleib, der oval und rundlich geformt ist. Zudem ist die Kutikula der Spitze seitlich sowie dorsal mit dunklen Streifen versehen. Ein dritter morphologischer Unterschied liegt in dem Besitz von Geschlechtskämmen an den Tibiakanten, die lediglich bei der männlichen Fliege vorkommen. Auch die Unterscheidung der weiblichen adulten von der jungfräulichen Fliege ist von Bedeutung. Um die F1-Generation eines bestimmten Genotyps zu erhalten, müssen männliche Adulte mit Weibchen gepaart werden, die zum Zeitpunkt des Sammelns unbefruchtet sind. Dies ist in den ersten 6 Stunden nach Schlupf aus dem Puppenstadium der Fall. Danach werden die weiblichen Fliegen geschlechtsreif. Diese sogenannten Jungfrauen können anhand ihrer überdurchschnittlichen Größe sowie ihrer hellen, fast durchsichtigen Körperfarbe erkannt werden (Abbildung 7). Zudem tragen sie einen abdominalen Mekoniumfleck. Dieser ist das Überbleibsel der letzten Mahlzeit der Larve und zeigt, dass die Fliege erst vor wenigen Stunden geschlüpft ist. Nach der Sammlung werden die Jungfrauen bis zum Ansatz der Kreuzung in 19 °C Inkubatoren aufbewahrt.



**Abbildung 7: Geschlechtsmorphologie und Erkennung.** Die Abbildung zeigt von links nach rechts eine adulte männliche Fliege, eine adulte weibliche Fliege und eine weibliche Jungfrau. Eigene Aufnahme.

### **2.2.3. Ansatz von Kreuzungen**

Zum Ansetzen der Kreuzung wird ein Kunststoffglas mit frisch zubereiteter Hefe befüllt und mit Filterpapier versehen. Zehn männliche adulte Fliegen des einen Stammes werden gesammelt und mit ebenfalls 10 Jungfrauen des anderen Stammes gekreuzt, in dem diese gemeinsam in das Glas transferiert werden. Nach Beschriften des Schaumstoffstopfens mit Nennung der Kreuzung sowie Datum, erfolgt die Aufbewahrung des Fliegenglases in einem Inkubator mit einer Temperatur von 29 °C.

### **2.2.4. Gal4/UAS-System**

Das Gal4-UAS-System ist in der Einleitung ausführlich beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde von diesem genetischen Werkzeug Gebrauch gemacht, um eine zelltypspezifische Verminderung der Expression des zu untersuchenden Proteins zu erlangen und entsprechende Auswirkungen auf die Filterbarriere zu untersuchen. Durch Verwendung des Treibers "Prospero" erfolgt die spezifische Expression von Gal4 in den Garlandzellen. Die Haltung der Kreuzungen auf 29 °C ermöglicht eine maximale Expression des temperaturabhängigen Gal4/UAS-Systems.

### **2.2.5. RNA-Interferenz (RNAi)**

Die Funktionsweise der RNAi ist in der Einleitung ausführlich beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und über das VDRC bezogenen UAS-RNAi-Linien, wurden mit Gal4-Linien gekreuzt. Als Ergebnis dieser Kreuzung entsteht die F1-Generation, in der beide Elemente des Zweikomponentensystems zusammenkommen.

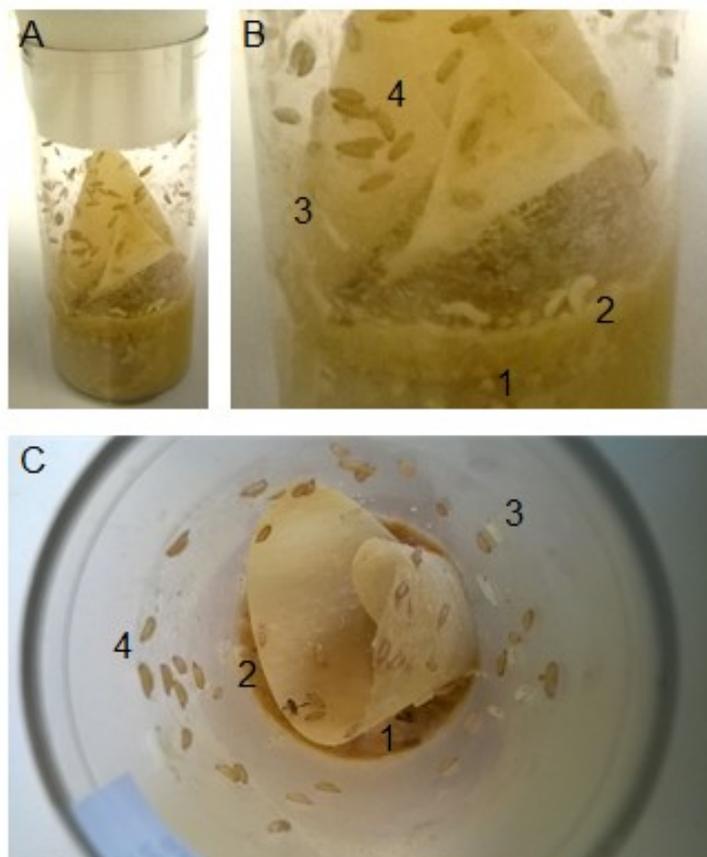
### **2.2.6. Kombination des Gal4/UAS-Systems mit der RNAi**

Die Schritte der Kombination der beiden genetischen Werkzeuge sind in der Einleitung ausführlich beschrieben. Sowohl für das Albuminaufnahme-Experiment und die Immunfluoreszenzfärbung, als auch für die REM- und TEM-Aufnahmen wurden Garlandzellen untersucht. Entsprechend wurden weibliche Jungfrauen des Reporterstammes Prospero-Gal4 mit Männchen des jeweiligen UAS-RNAi-Stammes gekreuzt.

### **2.2.7. Differenzierung von Entwicklungsstadien**

Nach Ansatz der Kreuzung kann von einem Entwicklungszyklus von 7 bis 10 Tagen ausgegangen werden. Hierbei werden unterschiedliche larvale Stadien durchlaufen, bis die adulte Fliege schließlich in ihrer Vollständigkeit entwickelt ist. Nach der Kreuzung erfolgt die

Eiablage ins Futtermedium des Fliegenglases. Larven des ersten Stadiums (L1) befinden sich prinzipiell im Medium, da die Nahrungsaufnahme und die damit einhergehende intensive Größenzunahme im Fokus stehen (Abbildung 8). Charakteristisch für Larven des zweiten Stadiums (L2) ist der Wechsel aus der stationären Phase in die Wanderphase. Dies zeigt sich deutlich dadurch, dass sie im Bereich des Überganges zwischen Futtermedium und der Wand des Glases aufzufinden sind. Larven des dritten Stadiums (L3) sind ihrem Entwicklungsfortschritt entsprechend größer und befinden sich weiter oben im Wandbereich des Glases. Präpupa sowie Puppenstadium charakterisieren sich durch die bräunliche Färbung.



**Abbildung 8: Differenzierung von larvalen Entwicklungsstadien.** (A) Fliegenglas nach 10-tägiger Haltung mit der vollständigen Entwicklung aller Stadien in der Übersichtsaufnahme (B) Fokussierte Aufnahme mit Beschreibung der unterschiedlichen Larvenstadien (1) Nahrungsmedium mit darin enthaltenen, sich entwickelnden L1 (2) Aus dem Nahrungsbrei in die Wanderphase austretende L2 (3) Larven der dritten Generation (L3) im höheren Wandbereich des Glases (4) Puppenstadium (C) Sicht von oben auf das Innere eines Fliegenglases nach 10 Tagen nach Entnahme des Schaumstoffstopfens. Eigene Aufnahmen.

### 2.2.8. Auswahl des larvalen Entwicklungsstadiums

Nach beschriebener Unterscheidung der verschiedenen larvalen und pupalen Entwicklungsstadien werden für die nachfolgenden Versuche stets Larven des dritten Stadiums verwendet (Abbildung 9). Insbesondere für die Präparation der Nephrozyten ist dies von Bedeutung, da die Garlandzellen der Larven des 1. und des 2. Stadiums noch nicht hinreichend entwickelt sind. Jene Zellen der L3 sind am besten geeignet für experimentelle Untersuchungen, was im weiteren Verlauf die Verwendung dieses Stadiums begründet.



**Abbildung 9: Larve des 3. Entwicklungsstadiums (L3).** Zur Präparation und sich anschließenden Experimenten eignet sich die Larve des 3. Entwicklungsstadiums (L3) am besten. Eigene Aufnahme.

### 2.2.9. Präparation der Nephrozyten

Die Präparation der Nephrozyten vereint alle nachfolgend beschriebenen Versuche in ihrem Beginn und wird daher im weiteren Verlauf ausführlich anhand verschiedener Abbildungen (Abbildungen 10 und 11) erläutert.

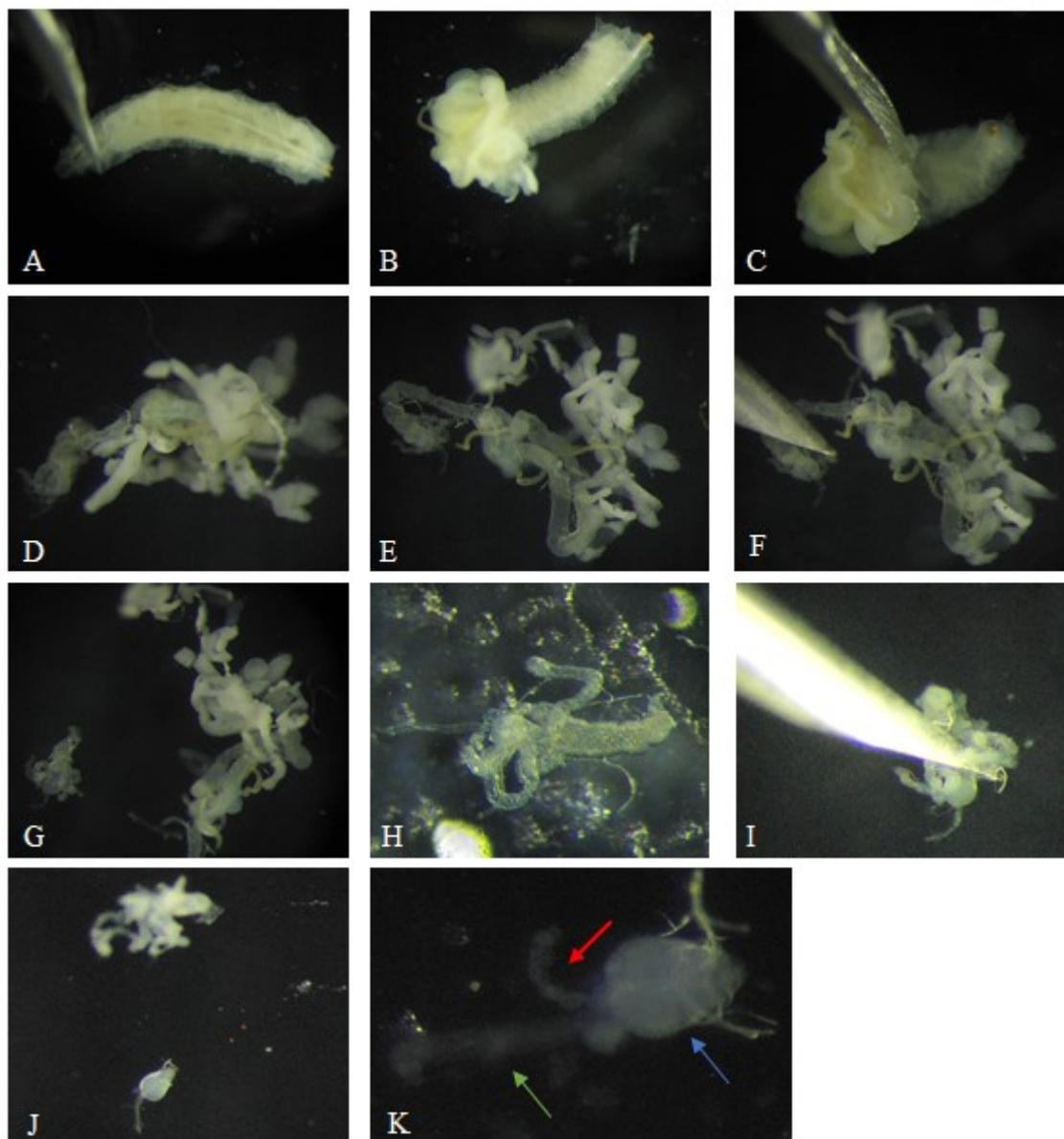
Die perlschnurartigen Garlandzellen wurden mithilfe einer 18 Gauge Kanüle am Binokularmikroskop aus dem 3. Larvenstadium präpariert. Mit einer stumpfen Pinzette wurde zunächst vorsichtig eine Larve aus dem Fliegenglas entnommen und in den mit frischem, eiskalten PBS befüllten Mikroskopiernapf überführt. Durch das zusätzliche Lagern auf einer Eisbank erfolgte die Betäubung der L3 sowie ein zeitgleiches Herabsetzen der larvalen Eigenbewegungen.



**Abbildung 10: Utensilien für die Präparation der Nephrozyten aus L3.** (1) PBS (2) Falcon mit eiskaltem PBS (3) Alu-Rack auf Eis für PCR-Gefäße (4) Binokularmikroskop (5) Mit PBS gefülltes Mikroskopierglas, Lagerung auf Eis (6) CO<sub>2</sub>-Pistole zur Betäubung der Fliegen und Larven (7) Becherglas mit Trichter (8) wasserabweisender Stift zur Kennzeichnung der PCR-Gefäße (9) stumpfe Pinzette (10) Pasteurpipette zum Transfer der präparierten Zellpakete (11) 1 ml Spritzen mit aufgesetzten Kanülen (16 G) als Präparierwerkzeug (12) Stoppuhr zur Kontrolle der Präparierzeit  
Eigene Aufnahme.

Ziel des ersten Präparationsschrittes war der Zugang zum Organkonvolut der Larve, da die Garlandzellen an der Basis des Proventrikulus gelegen sind. Hierzu wurde zunächst das Kopfende der Larve aufgesucht, welches sich durch die dunklen Fresswerkzeuge charakterisiert und so vom Hinterende unterschieden werden kann. Mithilfe der Kanüle wurde der Kopf senkrecht fixiert und in Form einer scherenartigen Schnittbewegung entfernt. Durch das Abtrennen des Kopfes trat das Organkonvolut hervor. Um das Konvolut nicht zu beschädigen, wurde es in einem scharfen Schnitt von der leeren Larvenhülle getrennt. Im nächsten Schritt lag das Ziel darin, das Gehirn, die Speicheldrüsen sowie den Fettkörper vom Mitteldarm zu trennen. Diese Separation gelang durch eine schnelle Bewegung, wodurch wiederum die Loslösung des Proventrikulus samt Garlandzellen erfolgte. Durch diesen rasch durchgeführten Schnitt wird die perlschnurartige Struktur der Garlandzellen nicht beschädigt.

Das fertig präparierte Garlandzellpaket wurde abschließend mithilfe einer Pipette vorsichtig in ein mit PBS gefülltes PCR-Gefäß oder direkt auf einen vorbereiteten Objektträger transferiert. Im Anschluss folgte die sofortige Fortführung des jeweils angewandten Protokolls.



**Abbildung 11: Vorgehensweise der Präparation.** (A) Fixation der L3 und anschließender Schnitt zur Entfernung des Kopfes (B) Hervortreten des Organkonvoluts nach Trennung des Kopfes (C) Entfernung der leeren Larvenhülle (D) Vollständiges Organkonvolut (E) Aufteilung des Organkonvolutes (F) Separation des Proventrikulus mit Garlandzellen von Kopfteil, Fettkörper und Malpighischen Schläuchen (G), (H) Oesophagus, Proventrikulus mit Girlandenzellen, Mitteldarm (I) Trennung des Proventrikulus mit Garlandzellen vom Darm (J) Vom Rest des Konvolutes separiertes Zellpaket (K) Nahaufnahme des Garlandzellpaketes bestehend aus Oesophagus (grüner Pfeil), Proventrikulus (blauer Pfeil) und Nephrozyten als girlandenförmige Zellkette (roter Pfeil) Eigene Aufnahmen.

## 2.3. Histologische Methoden

### 2.3.1. Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment

Garlandzellen aus L3-Larven werden wie beschrieben präpariert und mithilfe einer Pipette auf einen zuvor vorbereiteten Objektträger transferiert. Unter Einhaltung der Temperaturen sowie der festgelegten Inkubationsmenge, erfolgt der *ex vivo* Versuch an den präparierten Garlandzellen nach dem nachfolgend in der Tabelle dargestellten Schema.

Tabelle 13: Gepulstes Experiment mit FITC-Albumin.

Arbeitsschritt	Inkubation	Temperatur
Waschen mit PBS (RT)	1 x	Objektträger auf ungekühlter Box lagern
PBS abpipettieren, Rest mit Filterpapier abtrocknen		
20 µl FITC-Albumin (RT) auf Zellen geben Lichtschutz mittels Alufolie	30 s	
Waschen mit PBS (4 °C)	4 x	
20 µl PFA 8% (4 °C) als Stoppreaktion Lichtschutz mittels Alufolie	10 min	Lagerung auf Eisbank zur Unterstützung der Stoppreaktion
Waschen mit PBS (4 °C)	1 x	
PBS abpipettieren, Rest mit Filterpapier abtrocknen		
20 µl Vectashield auf Zellen geben Mithilfe einer Pinzette vorsichtig Deckgläschen auflegen		
Präparat in Objektträgermappe geben, trocknen lassen	2 h	

Sowohl zum Schutz vor Austrocknung, als auch zum mechanischen Schutz vor dem Öbobjektiv des Mikroskops, werden die Ränder des Deckgläschens vorsichtig mit Klarlack versiegelt. Die Lagerung erfolgt in einer Objektträgermappe bei 4 °C. Im Anschluss werden die Präparate im Konfokalmikroskop untersucht. Hierzu wird zunächst eine 10er Vergrößerung verwendet, um das Auffinden der Zellpakete leichter zu gestalten. Mit der 60er Vergrößerung werden im GFP-Kanal die Bilder angefertigt. Durchlichtaufnahmen ermöglichen zeitgleich das Überprüfen des Verlaufes der Zellgrenzen.

### 2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozyten

Die Garlandzellen werden wie beschrieben aus Larven des 3. Stadiums präpariert und im Anschluss in ein 0,2 ml PCR-Gefäß transferiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte der Antikörper-Färbung sind der Tabelle zu entnehmen.

*Tabelle 14: Kirre-Immunfluoreszenzfärbung.*

Arbeitsschritt	Inkubation	Temperatur
Fixierung der Nephrozyten mit 4% PFA	20 min	Auf Eis
Erster Waschschrift mit PBS	kurz	
Drei weitere Waschschrift mit 0,4% PBS-T	jeweils 5 min	
Hinzugabe Primärantikörper	über Nacht	4 °C
Abpipettieren Primärantikörper	1 d später	
Drei Waschschrift mit PBS-T	jeweils 5 min	
Hinzugabe Sekundärantikörper, Inkubation im Dunkeln	4 h	4 °C
Drei Waschschrift mit PBS	jeweils 5 min	
Vorbereitung und Beschriftung des Objektträgers Überführung der Nephrozyten auf Objektträger Entfernung überschüssiges PBS-T		

Im Anschluss werden die Präparate vorsichtig mit Vectashield HardSet mit DAPI eingedeckelt und für 2 Stunden in der Objektträgermappe getrocknet. Abgedichtet wird das Deckglas mit Klarlack. Die Lagerung bis zur Aufnahme erfolgt im Dunkeln bei 4 °C. Nach erfolgter Aushärtung des Klarlacks werden unmittelbar die Aufnahmen am Konfokalmikroskop in 10facher und 60facher Vergrößerung im GFP-Kanal angefertigt. Durchlichtaufnahmen ermöglichen das spätere Auffinden der Zellgrenzen. Zusätzlich werden Aufnahmen im DAPI-Kanal mit dem Ziel der Zellkerndarstellung angefertigt.

### **2.3.3. Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche**

Die Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche entspricht der obig beschriebenen Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung des Nephrozyten. Um jedoch den Abstand zwischen Konfokalmikroskop und Oberfläche des Objektträgers so gering wie möglich zu halten, wird die Verwendung von Klarlack ausgelassen. Dadurch kann im abschließenden Schritt die Darstellung der Oberfläche der Garlandzellen durchgeführt werden. Die Anfertigung der Aufnahmen erfolgt in 60facher Vergrößerung im GFP-Kanal.

### **2.3.4. Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

#### **2.3.4.1. Probenvorbereitung der Nephrozyten für die Untersuchung im REM**

Für die Verwendung zur REM werden Nephrozyten aus L3-Larven des entsprechenden Genotyps präpariert. Die Überführung der Zellpakete erfolgt in ein zuvor vorbereitetes 0,2 ml PCR-Gefäß mit darin enthaltender Bouin-Lösung (200 µl). Die Fixierung findet über einen Zeitraum von 2 bis 3 Tagen bei einer Temperatur von 4 °C statt. Im Anschluss folgt die Anwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe in den Konzentrationen 70%, 80%, 90% und 100%. Jeweils 200 µl Ethanol werden pro Schritt verwendet und mit einer jeweiligen Dauer von 1 Stunde inkubiert. Beginnend mit 70% Ethanol, der mehrfach ausgetauscht wird, wird das Herauslösen der in der Bouin-Lösung enthaltenen Pikrinsäure erzielt. Es folgen die Inkubationsschritte mit 80%igem und 90%igem Ethanol. Nach Inkubation mit 100%igem Ethanol, wird dieser im Anschluss abpipettiert und durch ein Gemisch aus gleichen Teilen Ethanol und Hexamethyldisilazan (HMDS) ersetzt. Nach einstündiger Inkubation wird die 50%ige HMDS/Ethanolmischung durch 100%iges HMDS ersetzt, die im Anschluss unter dem Abzug bei RT verdunstet. Nach vollständiger Verdunstung, werden die dehydrierten Nephrozyten mithilfe einer Akupunkturnadel auf die klebende Leitfolie eines Aluminiumprobentellers überführt. Hierbei werden die einzelnen Präparate so auf der Folie platziert, dass der Ventrikulus auf dem Grund befestigt ist und die Nephrozytengirlande dem Betrachter entgegenragt. Im Anschluss werden die Probenteller in einer mit Silica gefüllten

Box aufbewahrt, um eine Rehydrierung der Nephrozyten und somit eine negative Beeinflussung der Zelloberfläche zu verhindern. Die Lagerung erfolgte bei RT.

Abschließend erfolgte die Bedampfung mit Gold unter Argonatmosphäre mittels Sputter Coater sowie die Aufnahme der Bilder am Rasterelektronenmikroskop ("LEO Modell 1450VP") freundlicherweise durch Dr. Martin Helmstädter.

#### 2.3.4.2. Probenvorbereitung adulter Fliegen für die Untersuchung des Facettenauges im REM

Für die Untersuchung der Facettenaugen adulter Fliegen im REM werden zunächst Kreuzungen mit einem GMR-Gal4-Treiberstamm für die zelltypspezifische Expression im Auge mit der jeweils im Fokus der Untersuchung stehenden RNAi-Linie gekreuzt. Nach einwöchiger Inkubation im 29 °C Wärmeschrank und zu erkennender Entwicklung unterschiedlicher Larvenstadien, werden die Elterntiere verworfen. Dadurch wird sichergestellt, dass die später gesammelten Adulten ausschließlich der aus der angesetzten Kreuzung hervorgehenden F1-Generation angehören. Nach erfolgtem Schlupf werden die Fliegen mit CO<sub>2</sub> anästhesiert und in ein mit Bouin-Lösung vorbereitetes PCR-Gefäß transferiert. Die nachfolgenden Schritte der Vorbereitung für die REM entsprechen der oben geschilderten Vorgehensweise. Wichtig ist es, die Fliegenkörper abschließend so auf den Aluminiumproben Tellern zu platzieren, dass diese seitlich gelegen sind. Diese laterale Befestigung soll das vollständige Erfassen des gesamten Facettenauges im REM ermöglichen.

#### 2.3.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Vorbereitung von Proben für die TEM werden Garlandzellen wie beschrieben präpariert und auf Eis in ein 0,2 ml PCR-Gefäß überführt. Die Fixation der Nephrozyten erfolgt mittels einer zuvor frisch angesetzten Lösung mit 4% PFA in PBS und 1% Glutardialdehyd als Bestandteile. Daraufhin folgt eine Voreinbettung in niedrigschmelzender Agarose. Dieser Arbeitsschritt ermöglicht im weiteren Vorgehen der Probenbehandlung eine leichtere Handhabung der sehr kleinen Zellpräparate. Die Agarose wird hierfür mit Wasser für Injektionszwecke vermischt und unter Sichtkontrolle mehrfach in der Mikrowelle bei 450 Watt aufgeköcht. Da auf circa 90 °C erhitzt wird, erfolgt im Anschluss ein Herunterkühlen auf 40 °C mittels Wärmerüttler bei 400 Umdrehungen pro Minute (rpm). In der Zwischenzeit erfolgte ein einstündiges Waschen der Proben mit PBS bei 4 °C. Im Anschluss wurde in dreifacher Wiederholung jeweils für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Abschließend folgte ein letzter Waschschrift mit Aqua ad injectabilia für 5 Minuten. Hierdurch wird ein Ausfallen der Mineralstoffe des PBS im Agar verhindert. Die auf 40 °C temperierte Agarose wird im gerade

noch flüssigen Zustand in das PCR-Gefäß gegeben und abschließend die Nephrozyten mittels 27 G Kanüle so vom Boden des Gefäßes vorsichtig aufgewirbelt, dass diese etwa mittig liegen. Zur endgültigen Erstarrung der Agarose werden die Proben bei 4 °C auf Eis gelagert. Die Spitze der PCR-Gefäßes wird im Anschluss mithilfe einer Rasierklinge entfernt. Die vollständig erstarrten Agarosezylinder werden in kleinere Stücke geschnitten. Ziel dessen ist es, die Strecke der Diffusion für die unterschiedlichen Einbettungschemikalien zu verringern. In beschrifteten Rollrandgläsern erfolgt die Lagerung im Kühlschrank über Nacht. Die Einbettung der Proben erfolgt im jeweiligen Rollrandglas, in welchem die Proben verbleiben und lediglich die jeweiligen Chemikalien mithilfe von Transferpipetten ausgetauscht werden. Der detaillierte Ablauf ist dem Protokoll der Tabelle zu entnehmen. Nach durchgeführtem Protokoll erfolgt die Anfertigung von Ultradünnschnitten sowie die Nachkontrastierung der Proben mit Bleicitrat. Abschließend wurden die Aufnahmen der TEM-Bilder freundlicherweise durch Dr. Martin Helmstädter durchgeführt.

Tabelle 15: Einbettung der Proben für TEM-Aufnahmen.

Arbeitsschritt	Inkubation
1% Osmiumtetroxid in 6,86% Saccharosepuffer, Beachtung der Photosensitivität des Schwermetalls	1 h
Waschen in 0,1 M PB	3 x
50% Ethanol 60% Ethanol	jeweils 10 min
Stückkontrastierung in 1% Uranylacetat in 70% Ethanol, Abdeckung mit Alufolie wegen Lichtempfindlichkeit des Schwermetalls	1 h
80% Ethanol 90% Ethanol 96% Ethanol	jeweils 10 min
100% Ethanol	2 x 10 min
Propylenoxid	2 x 10 min
Propylenoxid/ Durcupangemisch 2:1 Propylenoxid/ Durcupangemisch 1:1	jeweils 1 h
Reines Durcupan, Rollrandgläser unter Abzug offenstehen lassen, damit restliches Propylenoxid verdampfen kann	mehrere Stunden
Wechsel in frisches reines Durcupan, Rollrandgläser mit Parafilm verschließen	über Nacht bei 4 °C lagern
Vorbereitung von Beschriftungszetteln für jeden Genotyp (Schriftgröße 5) und Platzierung in Vertiefungen einer Silikonform	
Übertragung der Agarstücke in die Vertiefungen einer Silikonform mithilfe eines Zahnstochers aus Holz Auffüllen einer jeden bestückten Vertiefung mit frischem Durcupan	
Silikonform in 55 °C-Wärmeschrank zur Auspolymerisation	48 h

## **2.4. Statistische Methoden**

### **2.4.1. Statistische Vorgehensweise und Auswertung der untersuchten Nephrozyten mit GraphPad Prism**

Für die Experimente der Albuminaufnahme und der Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozyten wurden grundsätzlich für jede Untersuchung jeweils 10 Larven (L3) zur Präparation verwendet und im Anschluss jeweils 10 konfokalmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Pro Aufnahme wurden 4 Nephrozyten zur Ausmessung der fluoreszierenden Zellgrenzen ausgewählt, sodass sich durch die Auswertung der 10 Aufnahmen eine Gesamtzahl von 40 Nephrozyten (n=40) zur Bildung des statistischen Mittelwertes ergab. Die aus den Experimenten hervorgegangenen Daten wurden mithilfe der Software GraphPad Prism objektiviert und statistisch aufbereitet. Um den jeweiligen Genotyp mit der Positivkontrolle, bzw. die Genotypen untereinander zu vergleichen, erfolgte ein ungepaarter t-Test für unabhängige Proben. Die statistische Signifikanz wurde ab einem P-Wert von  $< 0,05$  angenommen. Die jeweilige Signifikanz wurde durch Sterne in den Graphiken gekennzeichnet. In Form von Säulen wurden die Daten dargestellt.

$< 0,0001$  \*\*\*\* extrem signifikant,

0,0001 bis 0,001 \*\*\* extrem signifikant,

0,001 bis 0,01 \*\* sehr signifikant,

0,01 bis 0,05 \* signifikant,

$\geq 0,05$  n.s.; nicht signifikant

### **2.4.2. Statistische Vorgehensweise und Auswertung des Facettenauges mit ImageJ und GraphPad Prism**

Die REM-Aufnahmen des Facettenauges wurden mithilfe der Software ImageJ ausgewertet. Da wildtypische Facettenaugen über einzelnstehende Borsten verfügen, beinhaltet die Definition der Fehlstellung das Vorhandensein von mindestens 2, bis hin zu 5 zusammenstehenden Borsten. Hierbei erfolgte eine Auszählung ohne Beachtung wildtypischer Borstenstellungen von insgesamt 5 Augen pro Wild- und Genotyp, die von 5 adulten Fliegenkörpern stammen. Mithilfe der Software GraphPad Prism wurden die Auszählungen statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Es erfolgte ein ungepaarter t-Test für unabhängige Proben. Ab einem P-Wert von  $< 0,05$  wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen. Die Vergabe der jeweiligen Signifikanz und ihre entsprechende Kennzeichnung durch Sterne, entspricht der obig dargestellten Auswertung des gepulsten Albuminaufnahme-Experimentes sowie der Immunfluoreszenzfärbung mit GraphPad Prism.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Molekulare Analysen

#### 1.1. Bioinformatische Analyse: DNA-Sequenzhomologie

Eingeleitet wurde der Beginn der experimentellen Arbeit durch bioinformatische Analysen. Das grundlegende Ziel bestand darin, für die im Interesse der Untersuchung stehenden Gene des Menschen, entsprechende Homologe in *Drosophila* zu ermitteln. Beabsichtigt wird die Untersuchung des Gens im KD mithilfe unterschiedlicher Experimente. Notwendig ist hierfür die Bestellung einer RNAi-Linie, die sich an den vorgeschalteten Genabgleich anschließt. Für diesen wurde das sogenannte *DIOPT DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool* der *Harvard Medical School* genutzt (Hu et al., 2011). Auf DNA-Ebene generiert die Software ein oder mehrere Homologvorschläge zum humanen Gen, die entsprechend ihrer Übereinstimmung in verschiedene Ränge eingeteilt werden. Nach Auswahl des maximalen Äquivalents wird unter Angabe des jeweiligen Gensymbols der Fliege die entsprechende RNAi-Linie bestellt. Hierfür wurde die Online-Bibliothek VDRG verwendet, die den kommerziellen Erwerb erforderlicher Fliegenstämme ermöglicht. Die detaillierte Beschreibung und Verwendung zur Bioinformatik ist dem Methodenteil zu entnehmen.

Algorithmen einer Software werden stets aktualisiert und erweitert. Aufgrund dessen werden nachfolgend die Ergebnisse der Homologfindung nacheinander geordnet für die unterschiedlichen Gene erläutert, die zum Zeitpunkt der Ermittlungen vorgeschlagen wurden.

##### 1.1.1. ITM2B

Für das Gen ITM2B des Menschen besteht laut *DIOPT* das Sequenzhomolog CG3662, das sich durch einen hohen Rang in der Homologie auszeichnet. *DIOPT* gibt im Rahmen des Genabgleiches an, dass CG3662 den besten Treffer für das humane ITM2B darstellt.

Input Order	Search Term	Human GeneID	HGNCID	Human Symbol	Species	Fly GeneID	Fly Species Gene ID	Fly Symbol	DIOPT Score	Weighted Score	Rank	Best Score	Best Score Reverse
1	ITM2b	9445	<a href="#">6174</a>	ITM2B	Fly	<a href="#">33260</a>	<a href="#">FBgn0031285</a>	CG3662	7	6.808	high	Yes	Yes

**Abbildung 12: Suchergebnis für das humane Gen ITM2B.** Die Suche nach DNA-Homologen des humanen ITM2B ergibt das Fliegen Gen CG3662. Das Symbol für das humane Gen ist blau umrandet, das Symbol für das *Drosophila* Gen ist grün umrandet, Ergebnisse bezüglich Rang und Treffer sind rot umrandet.

### 1.1.2. MERTK

Die bioinformatische Analyse für das humane Gen MERTK schlägt das *Drosophila*-Homolog CG2272 vor. Für dieses Gen sind zwei unterschiedliche Arten von RNAi-Linien kommerziell erhältlich: 33518/GD und 106449/KK, die sich in ihrem Insertionsort im Genom sowie in der verwendeten Sequenz unterscheiden. 33518/GD hat eine unwillkürliche Insertion, wohingegen die definierte Insertionsstelle von 106449/KK auf dem Chromosom 2 liegt.



Information ▾ Resources ▾ Services ▾ Ordering ▾ MerTK						
Add All to Cart		Add Checked to Cart		Filter: GD Stocks (GD)		
	VDRC ID	Library	Construct ID	CG Number (r6.01)	Nearest Genes	Synonyms
<input type="checkbox"/>	33518	GD	9771	CG2272		slipper, Slipper, dMLK, D-MLK, dMLK2 ...
<input type="checkbox"/>	106449	KK	100726	CG2272		slipper, Slipper, dMLK, D-MLK, dMLK2 ...

**Abbildung 13: Suchergebnis der kommerziell verfügbaren RNAi-Linien für das humane Gen MERTK.** Für das *Drosophila*-Homolog CG2272 (rot umrandet) sind die RNAi-Linien 33518/GD (grün umrandet) und 106449/KK (blau umrandet) verfügbar.

### 1.1.3. NPR3

Im Rahmen der Homologsuche für das humane NPR3 ergeben sich insgesamt drei Vorschläge, von denen jedoch das Gen CG14877 deutlich hervorsticht. In Form der besten Punktzahl nimmt dieses Gen in der Homologie einen hohen Rang ein. Die anderen beiden aufgelisteten Homologe charakterisieren sich hingegen durch einen niedrigen Rang, da sie sich in der algorithmisch ermittelten Punktzahl nicht durch das beste Ergebnis auszeichnen.

Input Order	Search Term	Human GeneID	HGNCID	Human Symbol	Species 2	Fly GeneID	Fly Species Gene ID	Fly Symbol	DIOPT Score	Weighted Score	Rank	Best Score	Best Score Reverse
1	NPR3	4883	7945	NPR3	Fly	41929	FBgn0038380	CG14877	4	3.72	high	Yes	Yes
1	NPR3	4883	7945	NPR3	Fly	37376	FBgn0034568	CG3216	2	1.85	low	No	No
1	NPR3	4883	7945	NPR3	Fly	41927	FBgn0051183	CG31183	2	1.81	low	No	No

**Abbildung 14: Suchergebnis für das humane Gen NPR3.** Die Software schlägt für NPR3 (blau umrandet) das am höchsten in der Korrespondenz stehende *Drosophila*-Homolog CG14877 (grün umrandet) vor, das sich durch den besten Rang und Treffer (rot umrandet) charakterisiert.

### 1.1.4. FERMT2

Für das Gen FERMT2 des Menschen können mithilfe des *DIOPT* Softwaretools zwei Sequenzhomologe in *Drosophila* gefunden werden: CG14991 (FBgn0035498) und CG7729 (FBgn0036688). Bei dem Homolog CG14991 handelt es sich um Fit1, welches die beste analysierte Punktzahl erreicht (invers und revers) und somit dem Homolog einen hohen Rang verschafft. Bei dem zweiten Homolog CG7729 handelt es sich um Fit2, welches im Vergleich zu Fit1 einen moderaten Rang, jedoch nur in reverser Abfolge den besten Treffer aufweist.

Input Order	Search Term	Human GeneID	HGNCID	Human Symbol	Species 2	Fly GeneID	Fly Species Gene ID	Fly Symbol	DIOPT Score	Weighted Score	Rank	Best Score	Best Score Reverse
1	FERMT2	10979	<u>15767</u>	FERMT2	Fly	<u>38488</u>	<u>FBgn0035498</u>	Fit1	11	10.719	high	Yes	Yes
1	FERMT2	10979	<u>15767</u>	FERMT2	Fly	<u>39907</u>	<u>FBgn0036688</u>	Fit2	8	7.705	moderate	No	Yes

**Abbildung 15: Suchergebnis für das humane Gen FERMT2.** Die zwei für die nachfolgenden Untersuchungen in Frage kommenden Homologe zum humanen FERMT2 (blau umrandet) sind Fit1 (grün umrandet) und Fit2 (hellgrün umrandet). Im Vergleich zu den Ergebnissen für Fit2 (rosa umrandet), nimmt Fit1 aufgrund einer höheren Punktzahl den besten Rang ein (rot umrandet).

### 1.1.5. BECN1

Laut *DIOPT* wird für das humane BECN1 ausschließlich ein Sequenzhomolog vorgeschlagen: CG5429 (FBgn0264325). Bei CG5429 handelt es sich um Atg6, welches sich durch die beste algorithmische Trefferzahl auszeichnet und somit einen hohen Rang in der genetischen Vergleichsanalyse einnimmt.

Input Order	Search Term	Human GeneID	HGNCID	Human Symbol	Species 2	Fly GeneID	Fly Species Gene ID	Fly Symbol	DIOPT Score	Weighted Score	Rank	Best Score	Best Score Reverse
1	ATG6	8678	<u>1034</u>	BECN1	Fly	<u>42850</u>	<u>FBgn0264325</u>	Atg6	12	11.669	high	Yes	Yes

**Abbildung 16: Suchergebnis für das humane Gen BECN1.** Die Software *DIOPT* ermittelt für das humane BECN1 (blau umrandet) einen eindeutigen Vorschlag: Atg6 (CG5429; FBgn0264325). Das Homolog (grün umrandet) zeichnet sich bezüglich Rang und Punktzahl durch eine bestmögliche Wertung (rot umrandet) aus.

### 1.1.6. VASN

Für das humane VASN schlägt die Homologsoftware basierend auf aktuellen Algorithmen zum Zeitpunkt der Anfrage folgendes *Drosophila* Gen vor: CG14531 (FBgn0261509). Synonym für das ermittelte Gen ist hattifattener, bzw. die Abkürzung haf. Als Ergebnis der Analyse erzielt haf einen vergleichsweise niedrigen Rang. Dennoch zeichnet sich CG14531 durch eine am höchsten ermittelte Punktzahl aus und nimmt mit diesem Ergebnis einhergehend in der Liste vorgeschlagener Homologien erste Stelle ein.

Search Term	Human Gene		Human Symbol	Species	Fly Gene		Fly Symbol	Score	Weighted Score	Best Score		
	ID	HGNC			ID	FlyBase				Rank	Best Score?	Reverse Search?
Vasorin	114990	18517	VASN	Fly	33339	FBgn0261509	haf	1	1.1	Low	Yes	Yes

**Abbildung 17: Suchergebnis für das humane Gen VASN.** Die Homologsuche für VASN (blau umrandet) ergibt das Auffinden von haf (CG14531) (grün umrandet). Hattifattener (haf) erzielt zwar lediglich einen niedrigen Rang, erhält aber dennoch in der Liste der gefundenen Homologien die beste Trefferzahl (rot umrandet).

## **2. Funktionelle Analyse: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment zur Beurteilung der Filtrationsleistung**

Nach erfolgter Auswahl geeigneter Homologe auf Grundlage bioinformatischer Analysen, folgte im nächsten Schritt die funktionelle Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Gene auf die Intaktheit der Schlitzmembran. Verwendet wurde hierzu der gepulste Albuminaufnahme-Versuch.

Grundlegendes Ziel des Experimentes ist die Untersuchung der Filtrationsleistung der Nephrozyten. Appliziertes FITC-Albumin wird von den Garlandzellen als Entgiftungsorgan *Drosophila*s vollständig von der Schlitzmembran filtriert. Dadurch dass Albumin fluoreszenzmarkiert ist, kann die Filtration dieses Proteins im 488 nm Kanal konfokalmikroskopisch dargestellt und die Filtrationsleistung anhand der subjektiven sowie objektiven Analyse der Fluoreszenzintensität abgeleitet werden.

Einheitlich festgelegte Applikationsmengen des Albumins sollen Vergleichbarkeit und Gegenüberstellbarkeit der aus diesem Experiment hervorgehenden Ergebnisse garantieren. Ebenso erfolgte eine festgesetzte Zeitspanne der Inkubation, die nach exakt 30 Sekunden durch 8%iges PFA gestoppt wurde. Es handelt sich somit um ein gepulstes Experiment, das gezielt die Aufnahmeleistung der Entgiftungszellen in einem definierten Zeitintervall widerspiegelt und somit einen ersten Eindruck über Intaktheit und Funktionalität des Filtrationsprozesses liefern soll. Die detaillierten Arbeitsschritte sind dem Methodenteil zu entnehmen.

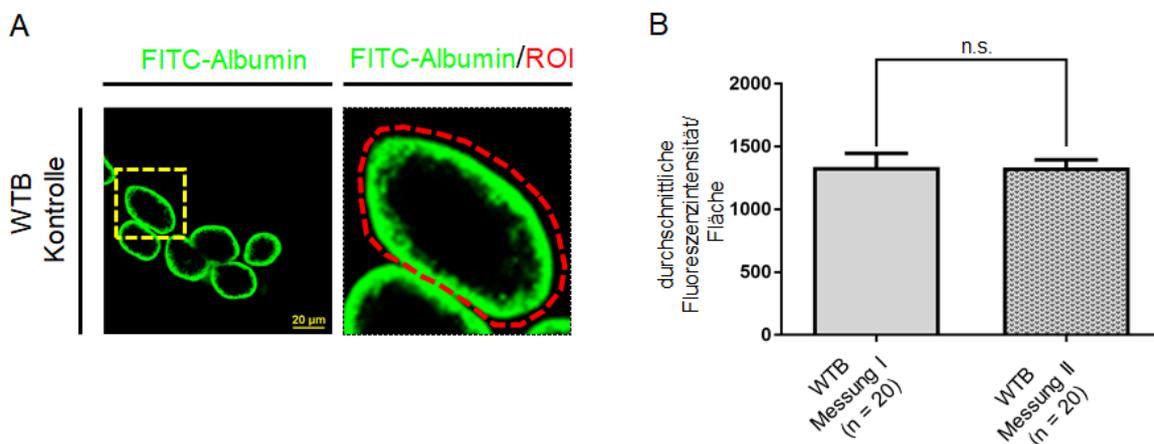
Pro Durchgang wurden 10 Larven aus dem 3. Stadium der zu untersuchenden F1-Generation des jeweiligen Genotyps präpariert und der Versuch angewandt. Im unmittelbaren Anschluss wurden in der konfokalmikroskopischen Untersuchung pro Durchführung 10 qualitativ verwendbare Aufnahmen angefertigt. Insgesamt wurde dieses Vorgehen für jedes Gen mindestens zweimal, in der Regel dreimal wiederholt. Um den ersten subjektiven Eindruck einer Veränderung in der Filtrationsleistung im Anschluss zu objektivieren, erfolgte mithilfe des Programms NIS-Elements Analysis eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität pro Fläche von insgesamt 40 Nephrozyten aller Garlandzell-Ringe. Anhand der Messungsergebnisse können zusammenfassend Rückschlüsse auf die Funktionalität der Schlitzmembran gezogen werden. Mittels der Software GraphPad Prism wurden die generierten Daten abschließend graphisch visualisiert.

## 2.1. Ergebnisse aus Konfokalmikroskopie und Quantifizierung

### 2.1.1. Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin

Ziel ist es zunächst eine valide Positivkontrolle zu schaffen, um Vergleichbarkeit und Interpretation der im Fokus der Untersuchung stehenden Genotypen zu gewährleisten. Hierzu wurde im ersten Schritt der sogenannte Wildtyp Berlin in Bezug auf seine Verwendbarkeit als funktionierendes Filtrationsmodell geprüft (Abbildung 18 A und B).

Die wildtypischen Nephrozyten charakterisieren sich in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen durch einen kräftigen und deutlich darstellbaren Albuminsaum. Es zeigt sich eine einheitlich starke und über die vollständige Zirkumferenz verlaufende Intensität.



**Abbildung 18: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment Wildtyp Berlin (WTB). Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A) Übersichts- und Nahaufnahme zeigen die kräftige fluoreszenzintensive Zirkumferenz mit Ausziehungen ins zytoplasmatische Zellinnere. (B) Validierung des Wildtyp Berlins als Positivkontrolle. Zwei unabhängige Präparationen mit anschließenden Quantifizierungen bestätigen die hohe Albuminaufnahme des Wildtyp Berlin. Es besteht kein signifikanter Unterschied.**

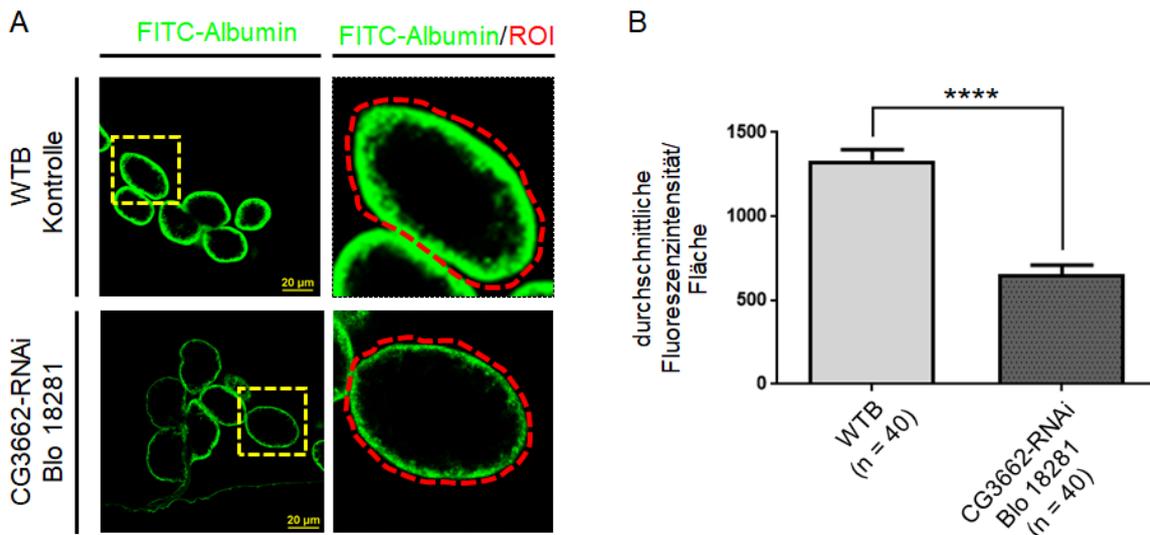
Genotyp: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*

ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), Größenbalken: 20µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), n.s. = nicht signifikant

Der erste subjektive Eindruck einer starken Aufnahme fluoreszenzmarkierten Albumins kann durch die Quantifizierung eindeutig objektiviert werden. Demnach kann der Wildtyp Berlin als Referenz für eine intakte Filtrationsbarriere validiert und als Vergleichs- und Interpretationsmöglichkeit für die Untersuchungen fortlaufend als Positivkontrolle herangezogen werden.

### 2.1.2. ITM2B

Beginnend mit der Untersuchung des Einflusses des KD von CG3662 auf die Funktionalität der Filtration, fallen Nephrozyten mit einer deutlich abgeschwächten fluoreszierenden Zirkumferenz im Vergleich zum kräftigen Saum der wildtypischen Zelle auf (Abbildung 19 A). Die Fluoreszenzintensität ist in ihrer Reduktion gleichmäßig.



**Abbildung 19: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens ITM2B. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A) Es besteht ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Positivkontrolle. (B) Die Quantifizierung bestätigt, dass sich die ITM2B-RNAi signifikant von der Positivkontrolle unterscheidet.**

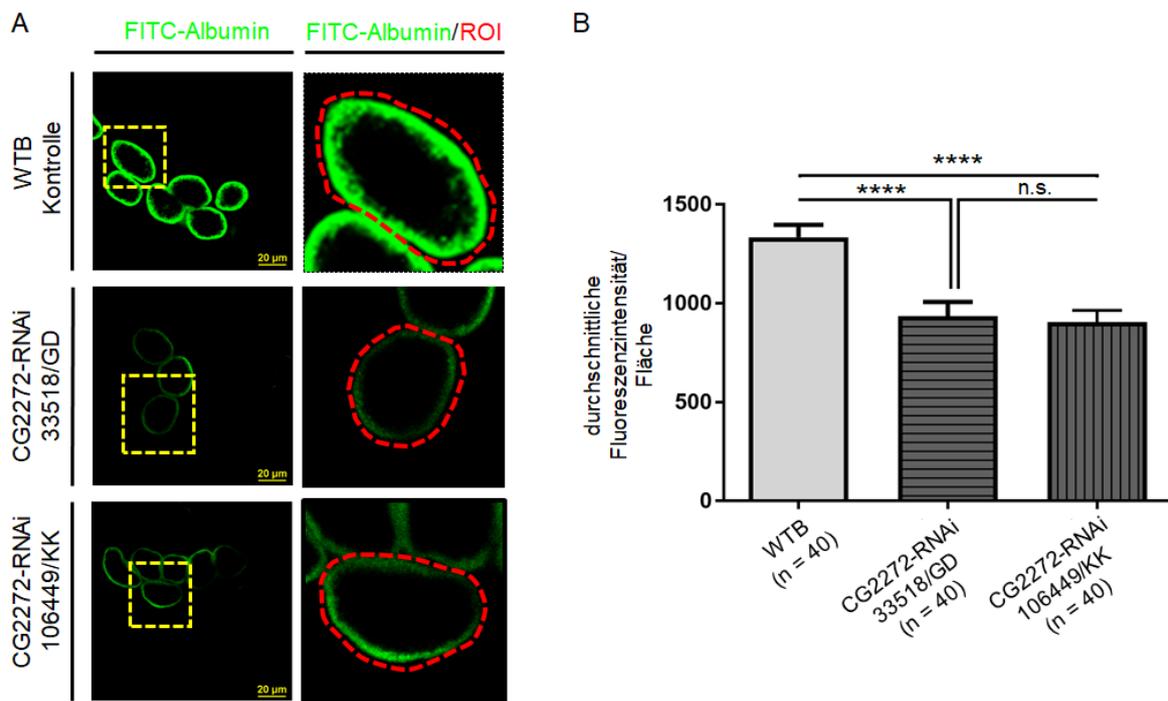
Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG3662-RNAi (Blo 18281)  
ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
Größenbalken: 20  $\mu$ m, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

Dieser erste sich aus den lichtmikroskopischen Aufnahmen ergebende Eindruck einer herabgesetzten Filtration kann durch die quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität (Abbildung 19 B) bestätigt werden. Die Aufnahme des GFP-gekoppelten Albumins ist signifikant verringert.

### 2.1.3. MERTK

Im Rahmen der Leistungsuntersuchung der Filtration vom Gen MERTK, zeigen beide RNAi-Linien (33518/GD; 106449/KK) des homologen *Drosophila* Gens CG2272 eine deutliche Verringerung der Aufnahme fluoreszenzmarkierten Albumins. Ein einheitlich schwacher Saum

filtrationspflichtiger Substanz umgibt die Nephrozyten beider KD-Linien in ihrer Gesamtheit (Abbildung 20 A). Auch quantitativ findet dies Bestätigung in Form stark signifikant herabgesetzter Fluoreszenzmesswerte (Abbildung 20 B). Da für alle auffälligen Gene die nachfolgenden Untersuchungen anhand einer RNAi-Linie durchgeführt werden und eine gleichsam verringerte Menge filtrierten Albumins für beide Linien vorliegt, wird ohne weitere Begründung die Fliegenlinie 33518/GD ausgewählt.



**Abbildung 20: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens MERTK. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal.** (A) Beide RNAi-Linien des Gen-Äquivalents (CG2272) zu MERTK charakterisieren sich durch eine gleich starke Verminderung der Fluoreszenzintensität. (B) Die Quantifizierung der Fluoreszenzmenge bestätigt für beide KD-Linien eine signifikant verringerte Aufnahme im Vergleich zur Positivkontrolle. Zwischen den beiden untersuchten Kandidaten besteht kein signifikanter Unterschied.

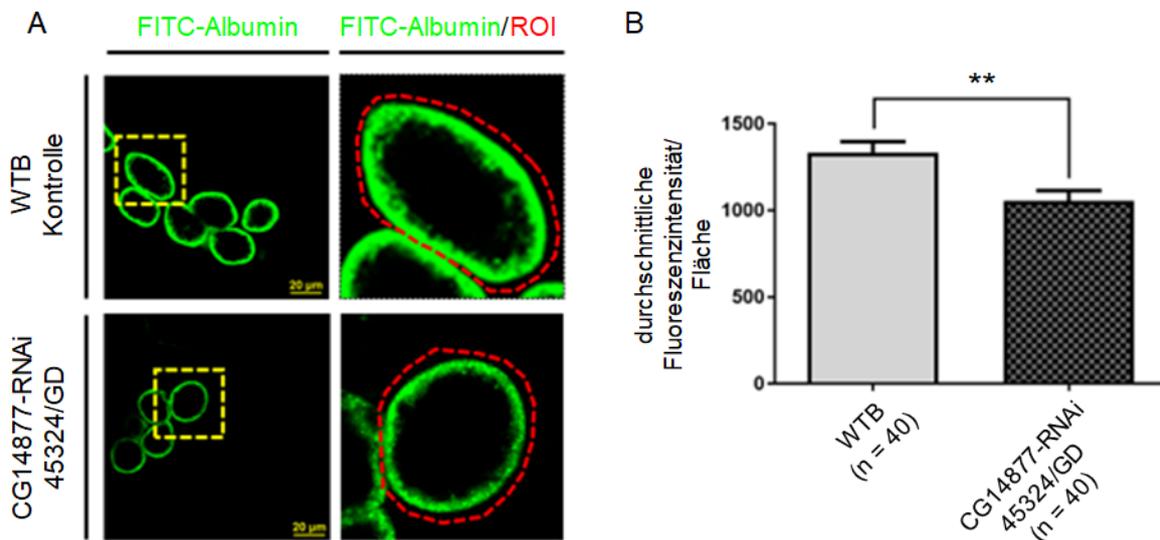
Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG2272-RNAi (33518/GD)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG2272-RNAi (106449/KK)*

ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

#### 2.1.4. NPR3

Der KD des Gens NPR3 charakterisiert sich in der Untersuchung der Filtrationsleistung durch eine gut erkennbare Fluoreszenz, die dennoch im Vergleich zur wildtypischen Zelle deutlich verringert ist (Abbildung 21 A). Die Zirkumferenz ist breit, in ihrer Darstellung

fluoreszenzmarkierter Filtrationsprodukte jedoch sichtbar abgeschwächt. Die beschriebene subjektive Verminderung der Fluoreszenzmenge kann durch die Messung der Intensität pro Fläche objektiviert werden (Abbildung 21 B). Es besteht eine signifikante Reduktion des fluoreszenzmarkierten Albumins im Vergleich zur Positivkontrolle.



**Abbildung 21: Geflügeltes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens NPR3. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A) Übersichts- und Nahaufnahme zeigen eine mittlere Reduktion des fluoreszenzmarkierten Albumins der Nephrozyten in Form einer ausgeprägten, aber dennoch sichtbaren Zirkumferenz. (B) Ausmessung und Quantifizierung des Saums objektivieren die Reduktion der Filtrationsleistung. Es besteht ein signifikanter Unterschied der aufgenommenen Menge an Albumin im Vergleich zum Wildtyp.**

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14877-RNAi (45324/GD)*  
 ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
 Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken  
 bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*: 0,001 bis 0,01

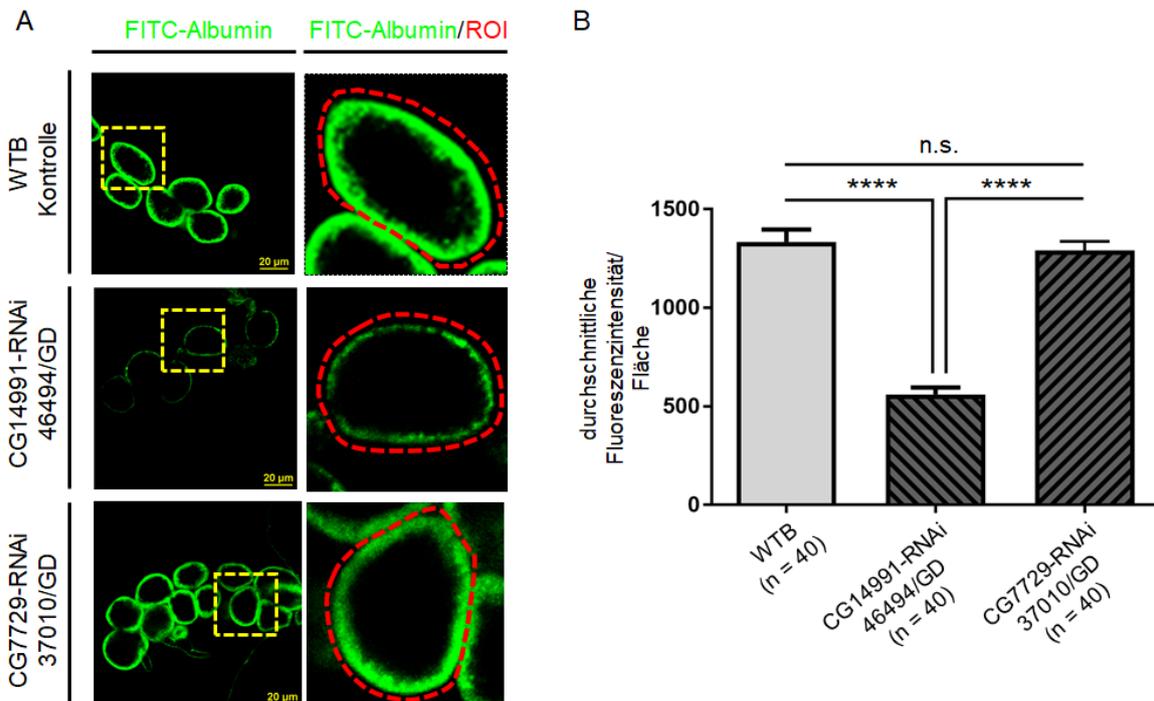
### 2.1.5. FERMT2

Aufgrund des als hoch eingeschätzten Homologes zum humanen FERMT2, rückte zunächst der KD des Gens *Fit1* (CG14991; 46494/GD) in den Fokus der Untersuchungen. *Fit1*-RNAi charakterisiert sich in den konfokalmikroskopischen Bildern durch eine deutlich wahrnehmbare Reduktion fluoreszenzmarkierten Albumins (Abbildung 22 A). Die Zirkumferenz der Nephrozyten ist in ihrer Darstellung dünn und lässt sich teilweise nicht vollständig darstellen. Einige Zellen lassen sich sogar nur so abgeschwächt visualisieren, dass eine Überprüfung der verlaufenden Zellgrenzen im Durchlichtmodus notwendig ist.

Ganz im Gegensatz zu dem im Ranking hocheingeschätzten *Fit1*, zeigt das als moderat zum humanen FERMT2 bezeichnete Homolog *Fit2* (CG7729; 37010/GD) einen kräftig und durchgängig ausgeprägten Zirkumferenzbereich, vergleichbar mit dem des Wildtyps (Abbildung 22 A). Die fluoreszenzmarkierten Bereiche der Filtrationsbarriere des

Nephrozyten entsprechen in ihrer Darstellung einer voll funktionsfähigen Wildtypzelle. Zytoplasmatische Ausziehungen zeigen sich ebenfalls wildtypähnlich und lassen laut Literatur auf eine an die Filtration anschließende intakte Endozytose schließen, sodass für Fit2 keine weiteren Untersuchungen erfolgen.

Sowohl die subjektive Einschätzung des KD von Fit1, als auch die des KD von Fit2 können quantitativ bestätigt werden (Abbildung 22 B). Die Quantifizierung des ersten Homologes Fit1 deckt sich in Form einer signifikant reduzierten Filtrationsmenge mit der Visualisierung einer vermindert darstellbaren Zirkumferenz. Ausmessung sowie Quantifizierung des zweiten FERMT2 Homologes Fit2 ergeben eine nicht signifikante Reduktion des fluoreszenzmarkierten Albumins, was sich ebenfalls mit der subjektiven Einschätzung einer unveränderten, wildtypähnlichen Zirkumferenz verbindet.



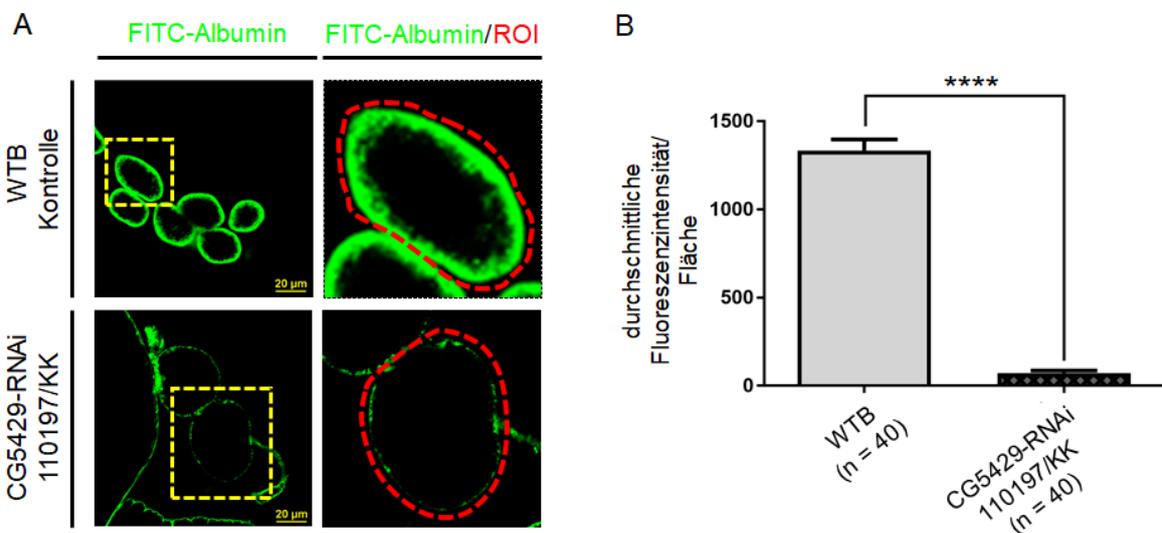
**Abbildung 22: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens FERMT2. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal.** (A) Die Filtrationsergebnisse der verschiedenen KD-Linien unterscheiden sich. Fit1 (CG14991) zeigt einen deutlich abgeschwächten Saumbereich im Vergleich zum Wildtyp. Fit2 (CG7729) hingegen weist eine kräftige Zirkumferenz in Folge filtrierten fluoreszenzmarkierten Albumins auf. (B) Messungen des KD von Fit1 bestätigen eine deutlich signifikante Reduktion der Filtration. Die Fluoreszenzmenge des KD von Fit2 zeigt hingegen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Positivkontrolle.

Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14991-RNAi (46494/GD), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG7729-RNAi (37010/GD)

ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), n.s. = nicht signifikant, \*\*\*\*: <0,0001

### 2.1.6. BECN1

Die Untersuchung der Garlandzellen aus der Kreuzung mit Atg6-RNAi zeigt eine deutlich sichtbar verminderte Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Albumins (Abbildung 23 A). Der die Zelle umgebende Saum ist sehr dünn und lässt eine unregelmäßige Struktur in Form von Punkten entlang der Zirkumferenz vermuten. Unabhängig von der Fluoreszenzintensität ist eine variierende Zellgröße der dargestellten Nephrozyten auffällig. Quantitativ bestätigt lässt sich diese starke sichtbare Reduktion durch ein deutlich signifikantes Messungsergebnis (Abbildung 23 B).



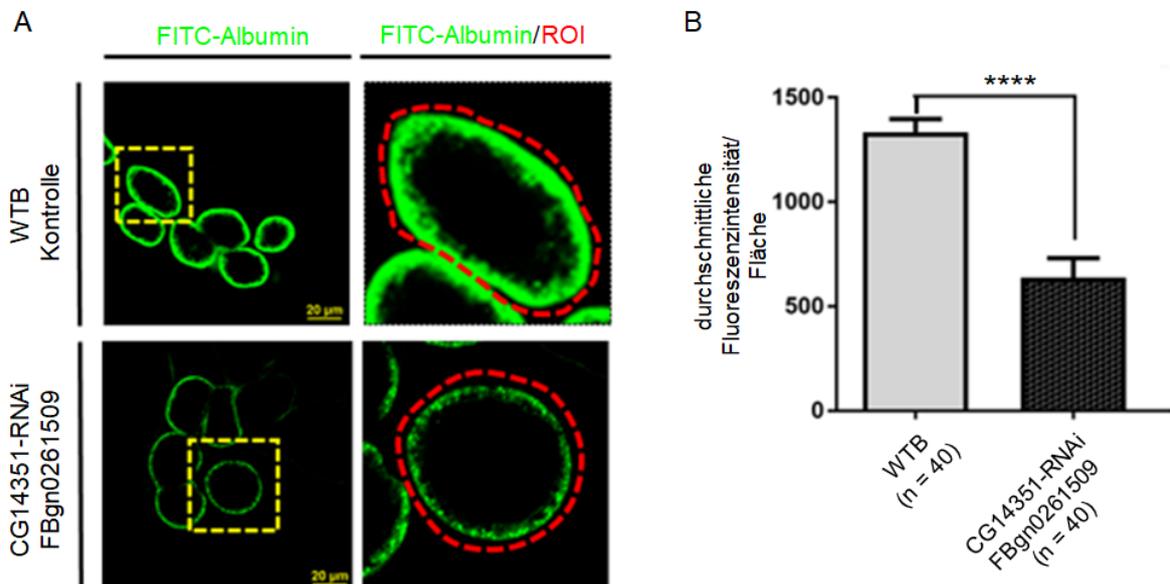
**Abbildung 23: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens BECN1. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal.** (A) Eine deutlich subjektiv visualisierbare Reduktion der Fluoreszenzmenge zeigt die RNAi-Linie CG5429. Teilweise ist das fluoreszenzmarkierte Albumin auf punktförmige Ausprägungen entlang der Zirkumferenz reduziert. (B) Die Quantifizierung bestätigt eindeutig eine signifikante Verminderung der Filtration.

Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG5429-RNAi (110197/KK)  
 ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
 Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <math>p < 0,0001</math>

### 2.1.7. VASN

Im Rahmen der Untersuchung der Auswirkungen des KD des *Drosophila*-Homologes zu VASN, wurde das Gen CG14351 analysiert. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine deutliche Reduktion des filtrierten fluoreszenzmarkierten Albumins (Abbildung 24 A). Die Zirkumferenz von haf lässt sich in ihrer Ausprägung sichtbar schwach darstellen. Die Ergebnisse aus der Quantifizierung decken sich mit den Aufnahmen der Konfokalmikroskopie

(Abbildung 24 B). Die Verringerung der Fluoreszenzaufnahme des Genotyps lässt sich quantitativ in Form eines signifikanten Ergebnisses bestätigen.



**Abbildung 24: Gepulstes FITC-Albuminaufnahme-Experiment nach KD des Gens VASN. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A) Vergleichende Darstellung der KD-Linie für das humane VASN und der Wildtypkontrolle. Die RNAi-Linie zeigt eine deutliche Abschwächung der Fluoreszenzmenge im Zirkumferenzbereich. (B) Die Quantifizierung bestätigt, dass die Aufnahme im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant reduziert ist.**

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14351-RNAi (FBgn0261509)*

ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

### 3. Phänotypische Analysen

#### 3.1. Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozyten

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine biochemische Methode, die es ermöglicht ein gezieltes Antigen sichtbar zu machen. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um das Antigen Kirre. Kirre ist das *Drosophila*-Homolog für das humane Neph1, welches als Element und Schlüsselkomponente der podozytären Schlitzmembran maßgeblich und im Zusammenspiel mit weiteren Interaktoren verantwortlich für die Intaktheit und demnach die Funktionalität der Schlitzmembran ist. Dezimierung oder gar Defizite im Vorhandensein von Kirre führen zu Fragilität der Filtrationseinheit. Mithilfe des primären Antikörpers 126i erfolgt zunächst eine gezielte Bindung gegen Kirre. Die prinzipiellen Anforderungen an einen Antikörper in Form hoher Spezifität sowie Affinität gegenüber dem Antigen sind durch den primären Antikörper 126i gewährleistet. Zur abschließenden Sichtbarmachung des zuvor

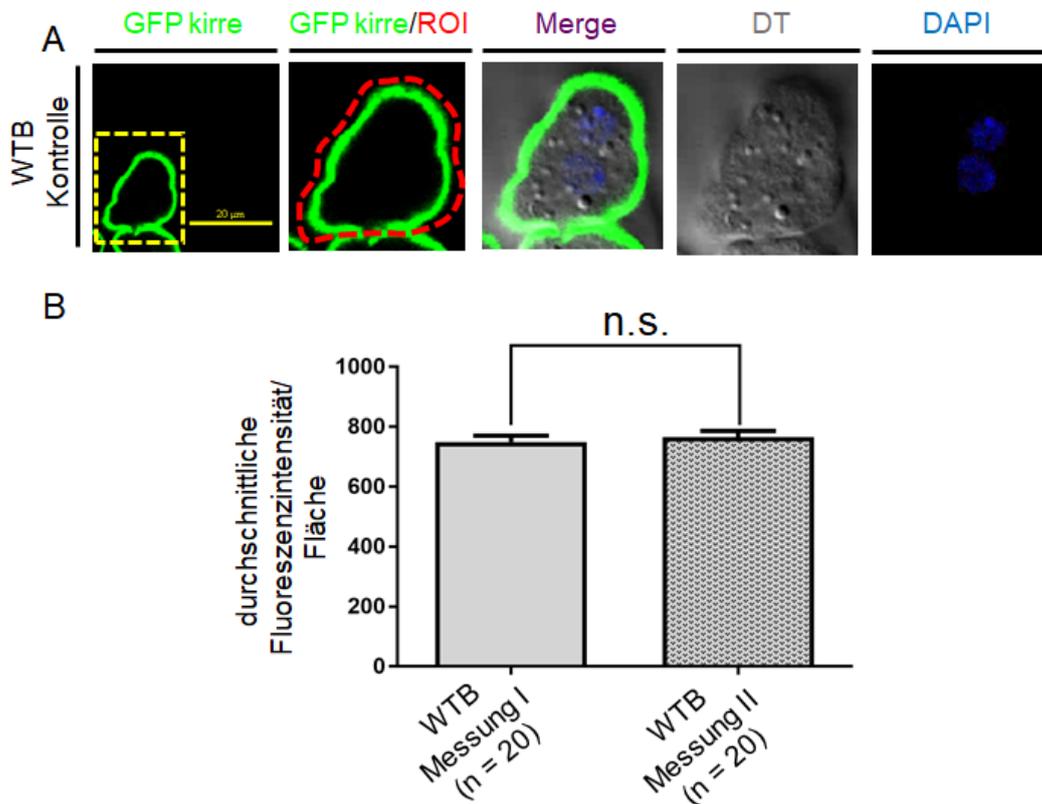
erfolgreich markierten Antigens, ist im zweiten Schritt ein Sekundärantikörper mit fluoreszierenden Eigenschaften notwendig. Dieser bindet wiederum an den Primärantikörper und ermöglicht somit die Visualisierung im Konfokalmikroskop wellenlängenspezifisch (Alexa rab488). Durch abschließende Quantifizierung der Fluoreszenzmenge kann das Vorhandensein des markierten Antigens darüber hinaus nicht nur subjektiv, sondern auch objektiv beurteilt werden. Die detaillierten Arbeitsschritte sowie Inkubationszeiten sind dem Methodenteil zu entnehmen.

Zusätzlich zur Immunfluoreszenzfärbung dienen die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Beurteilung der Zellgröße und des Zellkerns. Hierzu wird der Fluoreszenzfarbstoff DAPI verwendet, der an die DNA bindet. Nach lichtmikroskopischer Anregung fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich in blauer Farbe.

### **3.1.1. Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin**

Zur Überprüfung einer validen Positivkontrolle wurde zunächst der Wildtyp Berlin untersucht. Es erfolgte die Durchführung von zwei unabhängigen Präparationen. Anschließend wurden jeweils 20 Nephrozyten quantifiziert. Diese erste Voraussetzung ermöglicht im weiteren Verlauf die Gegenüberstellung sowie die Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse.

Der Wildtyp Berlin verzeichnet ein starkes Fluoreszenzsignal, was sich in Form eines kräftigen Saumes entlang der Nephrozyten widerspiegelt (Abbildung 25 A). Die Verteilung von Kirre kann anhand der Immunfluoreszenzfärbung als durchgängig ausgeprägt beschrieben werden. Die Nephrozyten erscheinen einheitlich in ihrer Größe und in ihrer Form und weichen somit in der Morphologie nicht von dem Erscheinungsbild der wildtypischen Zelle ab. Die Färbung der Nuclei mittels DAPI zeigt ausschließlich zweikernige Nephrozyten. Die Quantifizierung bestätigt darüber hinaus die subjektive Wahrnehmung einer starken Immunfluoreszenzfärbung der Wildtypkontrolle (Abbildung 25 B). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchungsergebnisse den Aufführungen der Literatur entsprechen und der Wildtyp Berlin somit als valide Positivkontrolle nachfolgend herangezogen werden kann.



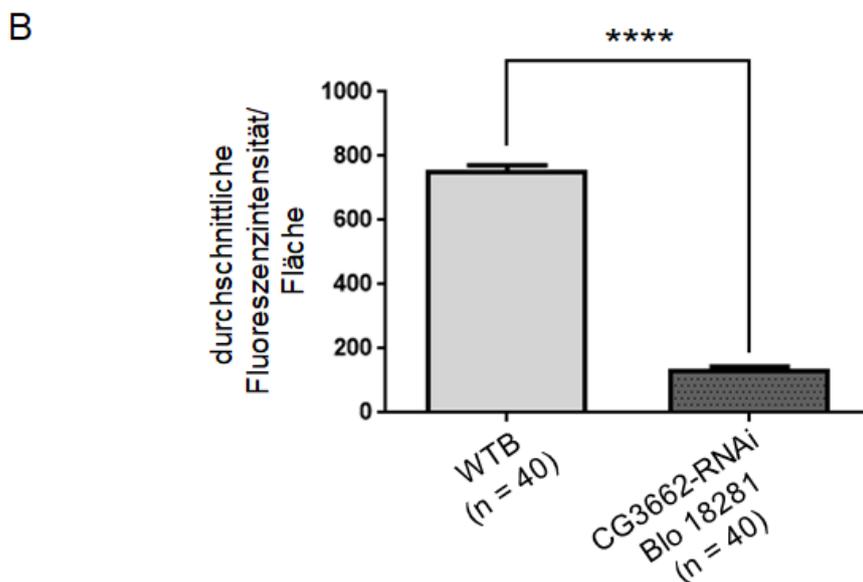
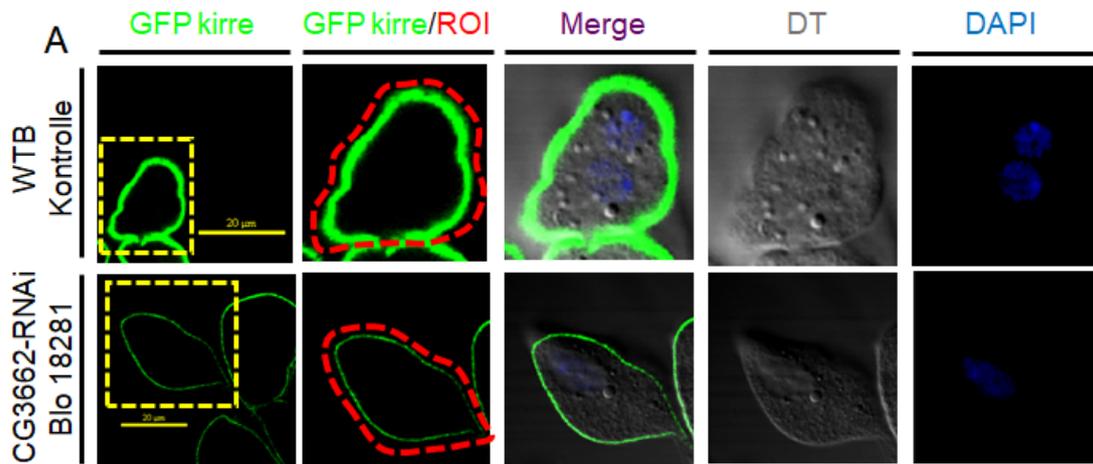
**Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre des Wildtyp Berlins. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal.** (A) Übersichts- und Nahaufnahme des wildtypischen Nephrozyten. Die Fluoreszenzintensität der Zirkumferenz stellt sich in Form eines kräftigen Saumes entlang des Nephrozyten dar. Merge und Durchlichtmodus (DT) zeigen die Zellmorphologie und die Ausbildung von zwei kräftigen Zellkernen (DAPI). (B) Es besteht keine Signifikanz in der Fluoreszenzaufnahme, was den Wildtyp Berlin als solide Positivkontrolle für eine intakte Filtrationsbarriere validiert.

Genotyp: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*

ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), Größenbalken: 20µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), n.s. = nicht signifikant

### 3.1.2. ITM2B

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach CG3662-KD charakterisiert sich durch eine Zirkumferenz, die im Vergleich zur Positivkontrolle sichtbar schwach ausgeprägt ist (Abbildung 26 A). Im DT- und DAPI-Kanal zeigen sich neben zweikernigen Nephrozyten vereinzelt einkernige Zellen. Der subjektive Eindruck eines reduzierten Färbungsergebnisses lässt sich anhand der durchgeführten Quantifizierung objektiv bestätigen. Die Fluoreszenzintensität ist signifikant reduziert im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Abbildung 26 B).



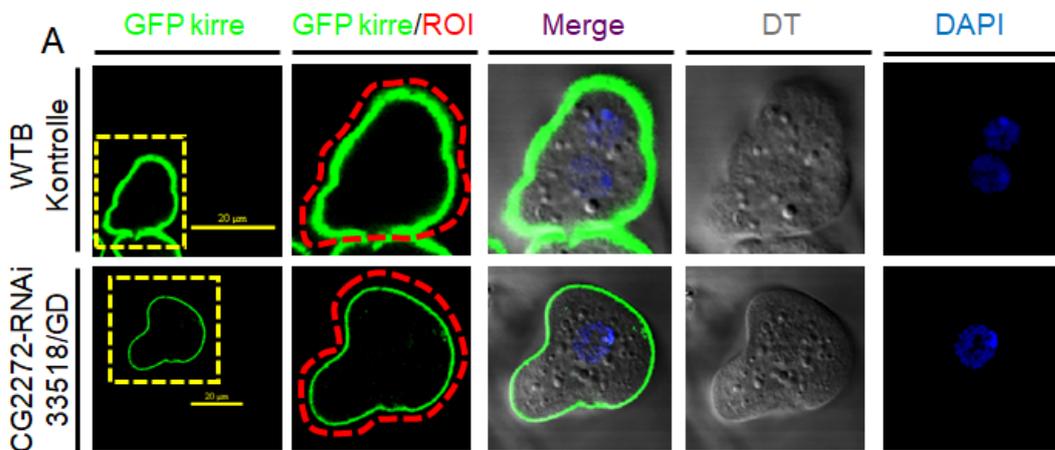
**Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens ITM2B. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen nach KD im GFP-Kanal. (A) Die Aufnahmen zeigen eine sichtbar verringerte Fluoreszenzintensität und vereinzelt vorkommende einkernige Nephrozyten. (B) Die statistische Auswertung ergibt ein signifikant reduziertes Ergebnis der Fluoreszenzmenge, verglichen zur Intensität des Wildtyp Berlins.**

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG3662-KO (Blo 18281)*  
 ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
 Größenbalken: 20 μm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken  
 bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

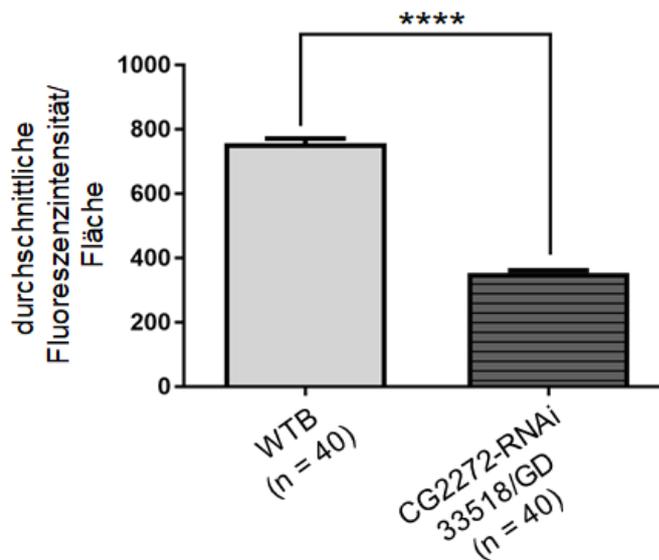
### 3.1.3. MERTK

Der KD von CG2272 als Homolog für das humane MERTK zeigt in der Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre eine deutlich schwache Zirkumferenz (Abbildung 27 A). Die Zirkumferenz entlang des Nephrozyten erscheint gleichmäßig schmal und ist im Vergleich zum kräftigen Saum der wildtypischen Zelle auffallend verringert. Die Quantifizierung der Intensität bestätigt dies in Form einer signifikanten Reduktion (Abbildung 27 B). Auffällig ist im

Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung die hohe Anzahl von Nephrozyten mit nur einem Zellkern (Abbildung 28).



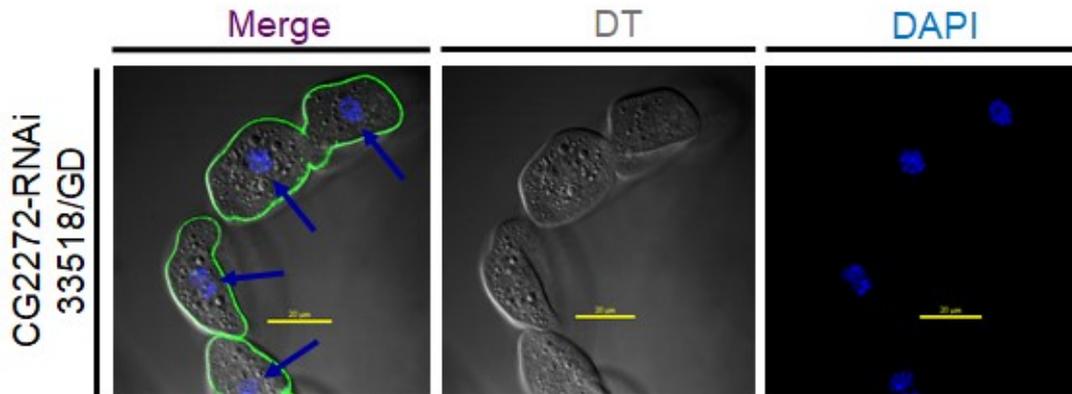
B



**Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens MERTK. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A)** Sowohl die Übersichts- als auch die Nahaufnahme lassen bereits eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzmenge vermuten. Auffällig ist auch die hohe Anzahl einkerniger Garlandzellen. **(B)** Die Reduktion der Immunfluoreszenzfärbung lässt sich in Form eines signifikant verringerten Ergebnisses bestätigen.

Genotypen: *Pros-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG2272-RNAi* (33518/GD)

ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x ÖI-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

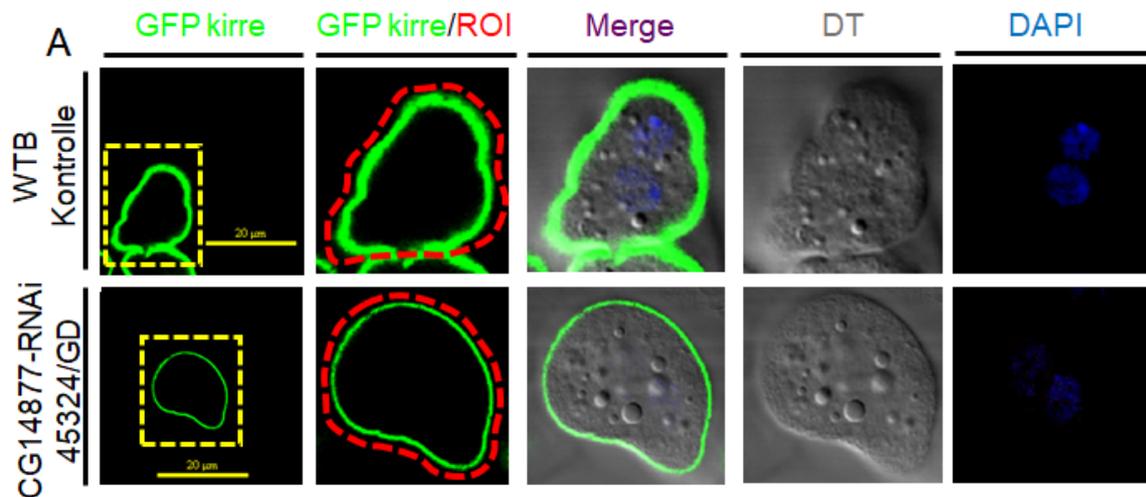


**Abbildung 28: Darstellung der Morphologie der Nuclei im Rahmen der Kirre-Immunfluoreszenzfärbung nach KD des Gens *MERTK*.** Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen lassen eine hohe Anzahl einkerniger Nephrozyten verzeichnen. Darstellungen neben dem Merge-Kanal auch im Durchlichtmodus (DT), um die Zellgrenzen zu bestätigen. Die dunkelblauen Pfeile markieren den Nucleus der jeweiligen Zelle.

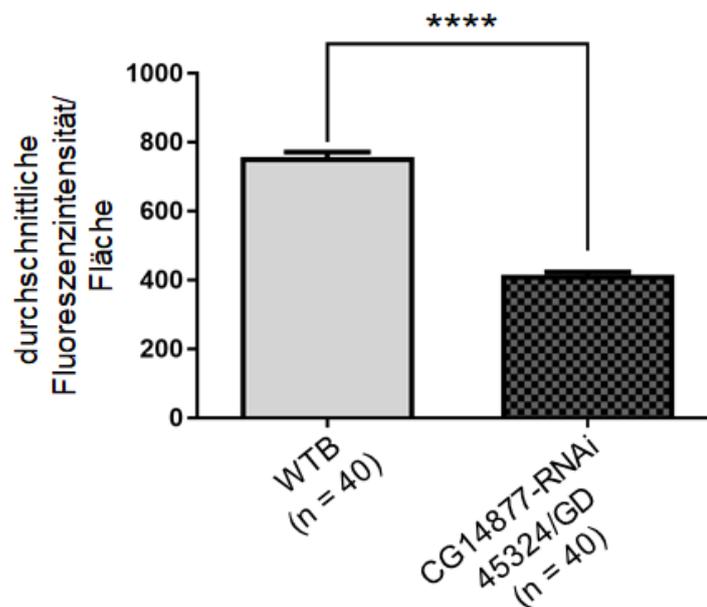
Genotypen: *Pros-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG2272-RNAi* (33518/GD)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv,  
 Probenanzahl: 40 (n = 40)

#### 3.1.4. NPR3

Auch die Untersuchung des KD des Gens *CG14877* charakterisiert sich durch die Auffälligkeit einer abgeschwächten Immunfluoreszenz (Abbildung 29 A). Die im GFP- und Merge-Modus dargestellte Intensität der Färbung gegen Kirre ist im Vergleich zu jener der wildtypischen Zelle deutlich verringert. Die Quantifizierung bestätigt diesen Eindruck in Form eines signifikanten Ergebnisses (Abbildung 29 B). Neben der Reduktion der Kirre-Ausprägung, zeigen die Aufnahmen der Konfokalmikroskopie darüber hinaus eine Vielzahl von Nephrozyten mit nur einem Nucleus (Abbildung 30 A-A“). Zudem zeigen sich Zellen, die im Vergleich zur wildtypischen Größe auffallend klein sind (Abbildung 30 B-B‘).

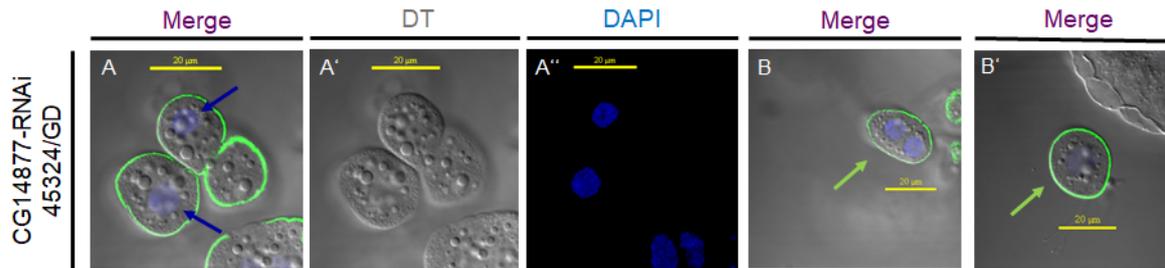


**B**



**Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens NPR3. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A) Darstellung einer deutlichen Verringerung des anwesenden Kirre. Die Intensität ist erheblich abgeschwächt. (B) Das Resultat der Quantifizierung zeigt, dass die Fluoreszenzmenge signifikant reduziert ist.**

Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14877-RNAi (45324/GD)  
 ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
 Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

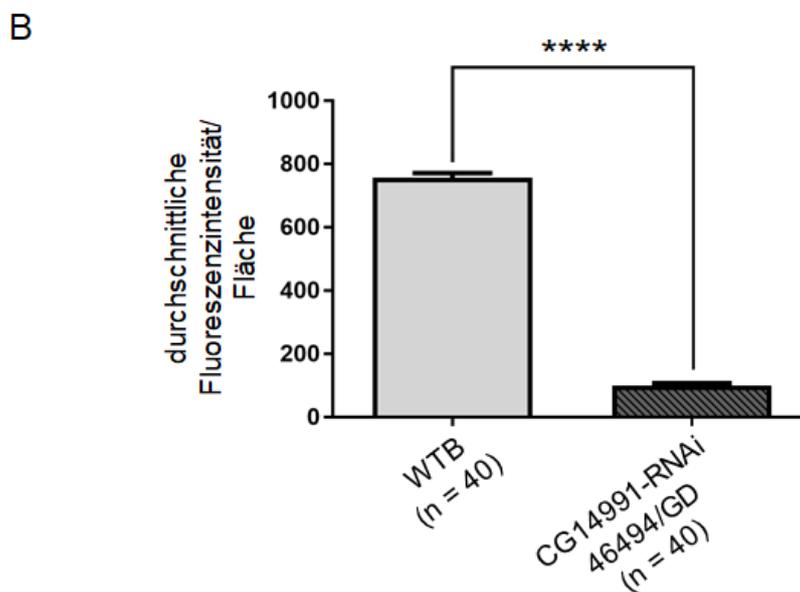
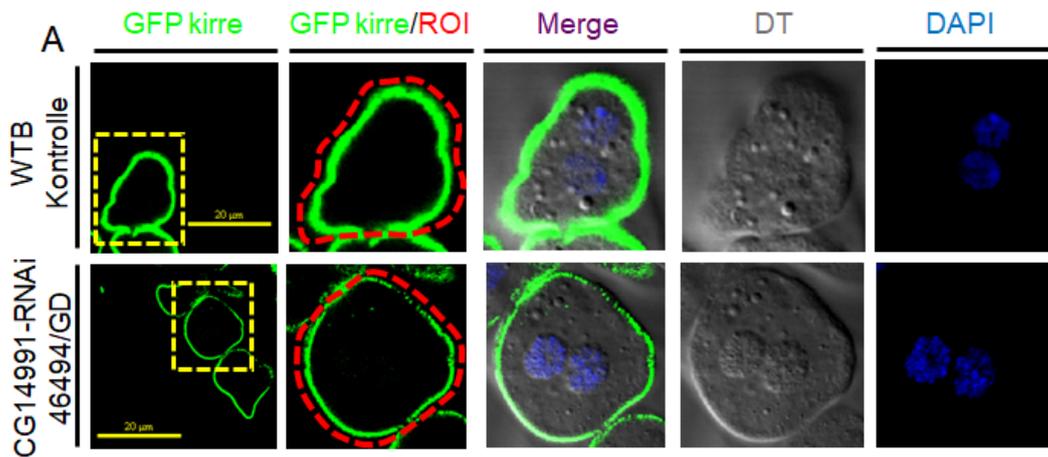


**Abbildung 30: Darstellung der Morphologie der Nuclei im Rahmen der Kirre-Immunfluoreszenzfärbung nach KD des Gens NPR3.** (A-A'') Aufnahmen der Konfokalmikroskopie zeigen eine hohe Menge an Garlandzellen mit nur einem Nucleus, anstelle einer wildtypischen Anzahl zweier Zellkerne pro Nephrozyt. Dunkelblaue Pfeile weisen auf die Einkernigkeit der Zellen hin. (B-B') Ebenfalls auffällig ist das Vorhandensein vergleichbar kleiner Zellen. Die grünen Pfeile weisen auf Zellen hin, die in ihrer Größe deutlich reduziert sind im Vergleich zur wildtypischen Positivkontrolle.

Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14877-RNAi (45324/GD)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv,  
 Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.1.5. FERMT2

Die immunhistologische Untersuchung des KD des Genhomologes zum humanen FERMT2 zeigt eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität vorhandenen Kirres (Abbildung 31 A). Die Zirkumferenz, die den Nephrozyten in seiner Gesamtheit umgibt ist in seiner Ausprägung dünn. Zudem fallen punktförmige Aussparungen des Saumes auf, die Hinweis auf ein vollständiges Fehlen des Antigens an diesen Stellen geben. Die Messergebnisse der Quantifizierung bestätigen diesen Eindruck einer deutlichen Reduktion der dargestellten Immunfluoreszenz. Die CG14991-RNAi zeigt eine signifikant reduzierte Intensität im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Abbildung 31 B).

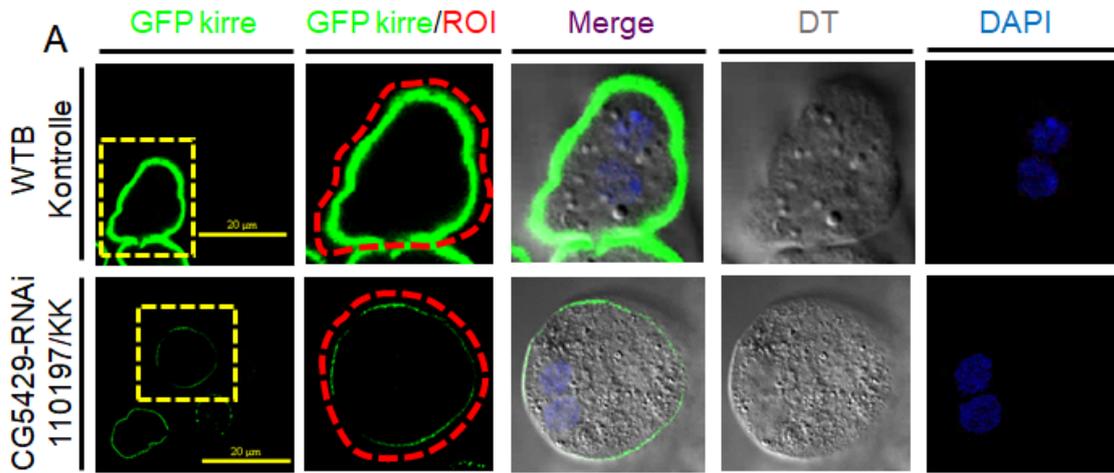


**Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens FERMT2. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A)** Die Zirkumferenz der Garlandzellen ist im Vergleich zum kräftigen Saum der Wildtypzelle abgeschwächt und an vereinzelt Stellen fehlend. **(B)** Messergebnisse der Quantifizierung bestätigen die deutliche Reduktion dargestellter Immunfluoreszenz. Die Intensität ist signifikant reduziert.

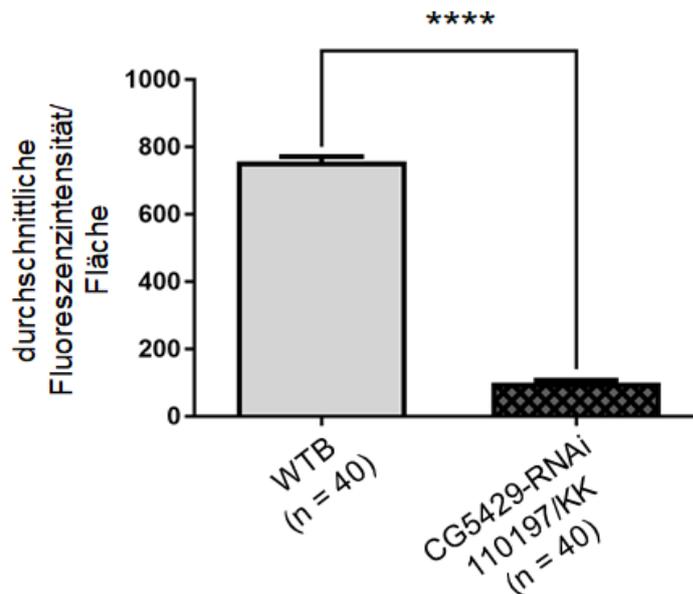
Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14991-RNAi (46494/GD)  
 ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
 Größenbalken: 20 μm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken  
 bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

### 3.1.6. BECN1

Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung zeigen im Fall von CG5429-RNAi eine auffällig herabgesetzte Intensität im Vergleich zu jener der Wildtypzelle (Abbildung 32 A). Im GFP-Kanal ist eine dünne Zirkumferenz charakteristisch, die sich im Merge-Kanal kaum noch darstellen lässt. Messungen im Rahmen der Quantifizierung decken sich signifikant mit den Darstellungen einer abgeschwächten Färbung der Zirkumferenz (Abbildung 32 B).



B

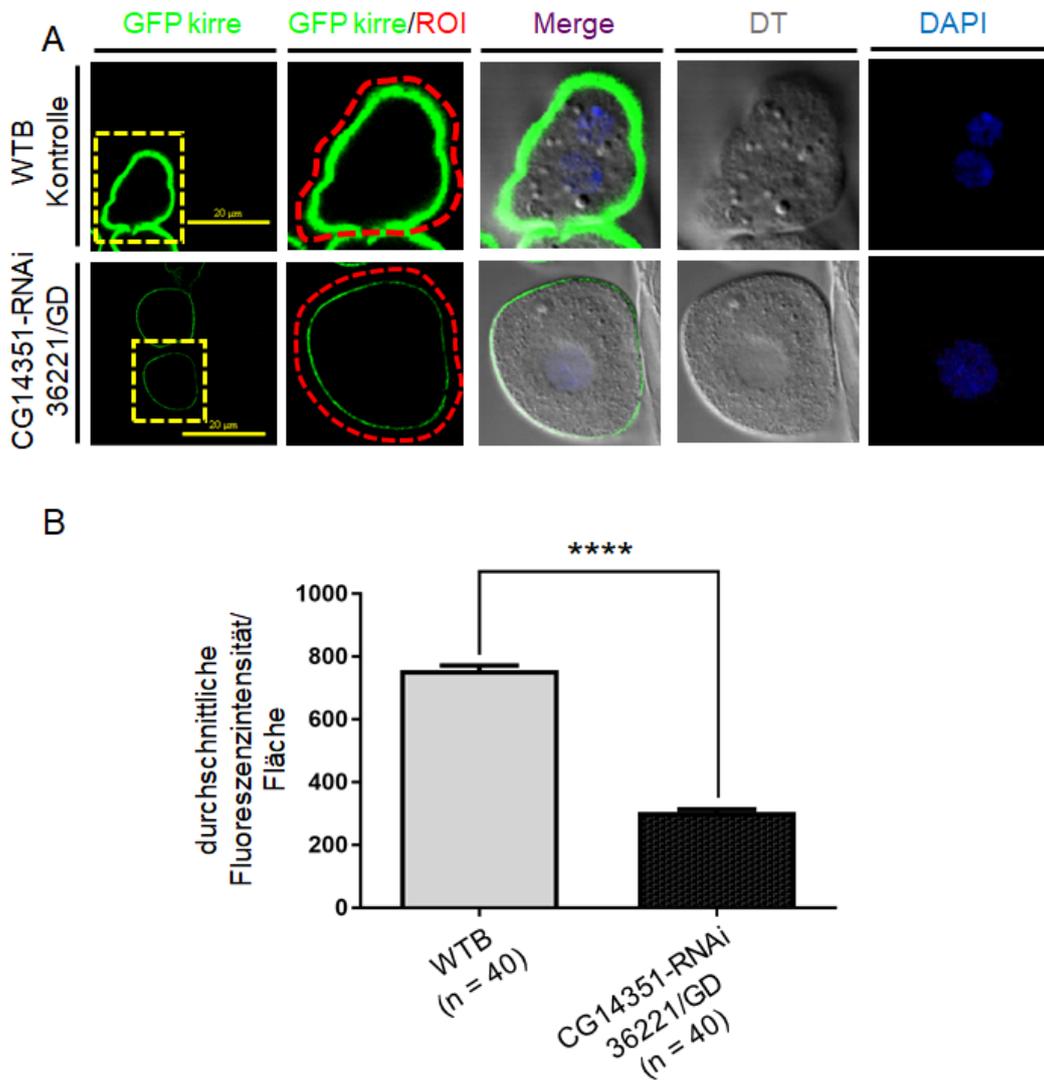


**Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens BECN1. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A) Die Garlandzellen charakterisieren sich durch eine dünne Zirkumferenz. Im Vergleich zu Aufnahmen im GFP-Kanal, ist die Darstellung im Merge-Kanal fast nicht mehr möglich. (B) Die Quantifizierung bestätigt, dass die Intensität pro Fläche im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant reduziert ist.**

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG5429-RNAi (110197/KK)*  
 ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
 Größenbalken: 20  $\mu$ m, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 ( $n = 40$ ), Fehlerbalken  
 bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*:  $<0,0001$

### 3.1.7. VASN

Die Immunfluoreszenzfärbung des KD für das Gen VASN erscheint in den unterschiedlichen Kanälen der konfokalmikroskopischen Aufnahmen dünn und deutlich verringert im Gegensatz zur Positivkontrolle (Abbildung 33 A). Die Quantifizierung deckt sich mit diesem Eindruck und repräsentiert ein signifikant reduziertes Messergebnis (Abbildung 33 B).



**Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre nach KD des Gens VASN. Konfokale lichtmikroskopische Aufnahmen von Garlandzellen im GFP-Kanal. (A) Die Immunfluoreszenz ist in ihrem Gehalt deutlich verringert. Die Zirkumferenz erscheint blass und dünn im Vergleich zum Fluoreszenzsaum der Wildtypzelle. (B) Die Immunfluoreszenzfärbung ist signifikant reduziert.**

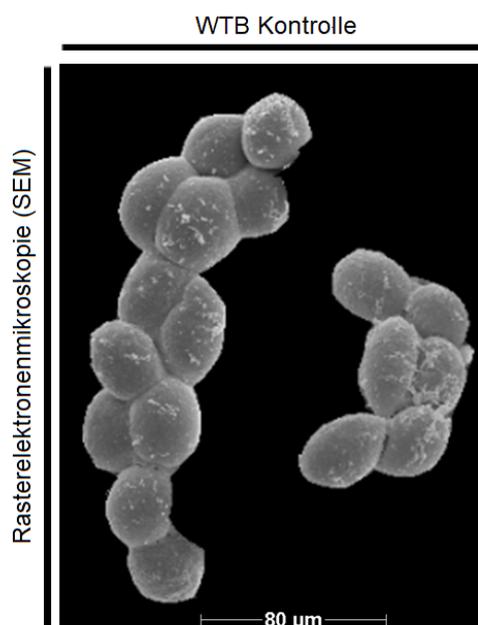
Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB), Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14351-RNAi (36221/GD)  
 ROI: Bereich von Interesse (Region of Interest), KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz,  
 Größenbalken: 20 µm, Vergrößerung: 60x Öl-Objektiv, Probenanzahl: 40 (n = 40), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*\*\*: <0,0001

## 3.2. Rasterelektronenmikroskopie der Nephrozyten

Die weiterführende Untersuchung auf Ebene der Rasterelektronenmikroskopie dient der morphologischen Darstellung der Nephrozyten jener Gene, die im Albuminaufnahme-Experiment eine Verringerung der Filtrationsleistung aufweisen und wurde in Kooperation mit Dr. Martin Helmstädter durchgeführt. Im Fokus der zellmorphologischen Analyse steht hierbei die Beurteilung von Größe und Form. Auch im Rahmen dieser Untersuchungsmethode wird zunächst die Morphologie des Wildtyp Berlins untersucht und auf die Verwendbarkeit als valide Positivkontrolle geprüft. Wie dem Methodenteil zu entnehmen ist, wurden hierfür grundsätzlich präparierte Garlandzellen aus Larven der 3. Generation verwendet.

### 3.2.1. Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin

Die Garlandzellen des Wildtyp Berlins charakterisieren sich in Bezug auf Größe und Form durch ihre Gleichmäßigkeit. Ihrer Namensgebung entsprechend sind die Garlandzellen in Form einer Girlande um den Oesophagus gelegt (Abbildung 34). Diese morphologischen Eigenschaften entsprechen der Aufführung und Darstellung in der Literatur (Zhung et al., 2009) und bestätigen somit die geeignete Verwendbarkeit als vergleichsorientierende Positivkontrolle.

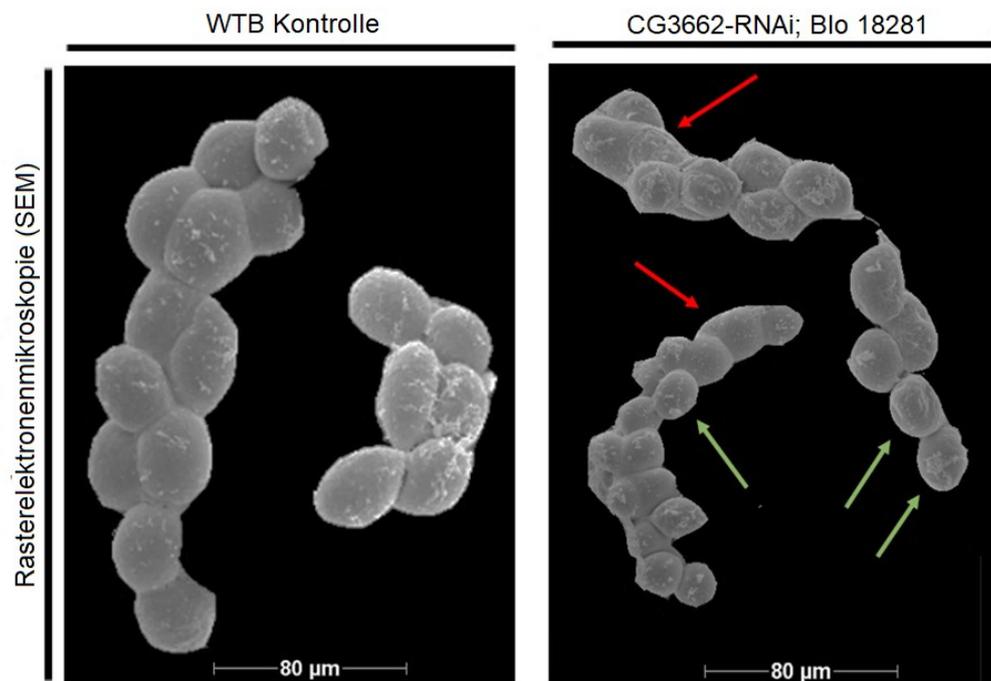


**Abbildung 34: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten des Wildtyp Berlins.** Dargestellt ist die charakteristische Zellgirlande, zusammengesetzt aus gleich großen Nephrozyten. Die wildtypischen Zellen kennzeichnen sich durch eine beständige Morphologie und können in Anlehnung an die Darstellung in der Literatur als valide Positivkontrolle bestätigt werden.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2)* → *Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*  
Größenbalken: 80 μm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.2.2. ITM2B

Die Garlandzellen des KD für das humane Gen ITM2B weisen unterschiedliche Auffälligkeiten auf. Zum einen charakterisiert sich CG3662-RNAi durch eine Vielzahl deutlich kleinerer Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle. Zum anderen kommen zum Größenunterschied der Zellen auftretende Agglutinationen hinzu (Abbildung 35).

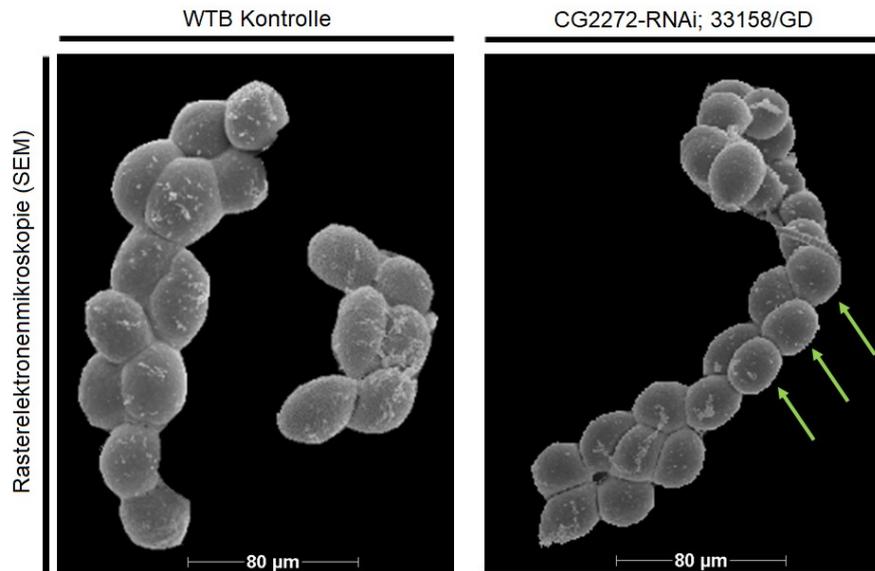


**Abbildung 35: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens ITM2B.** Im Vergleich zum WTB fallen die Größenunterschiede im Verlauf der glockenförmigen Zellkette auf. Hellgrüne Pfeile markieren Beispiele für Zellen, die auffällig klein sind. Rote Pfeile weisen auf Zellagglutinationen hin, die das morphologische Bild des untersuchten Genotyps prägen.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG3662-RNAi (Blo 18281)*  
KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 80 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.2.3. MERTK

Auch der KD des Gens CG2272 als Vertreter des humanen MERTK fällt durch das Vorhandensein von Zellen auf, die deutlich kleiner sind und in dieser Form nicht in der Morphologie der wildtypischen Positivkontrolle vorkommen (Abbildung 36).

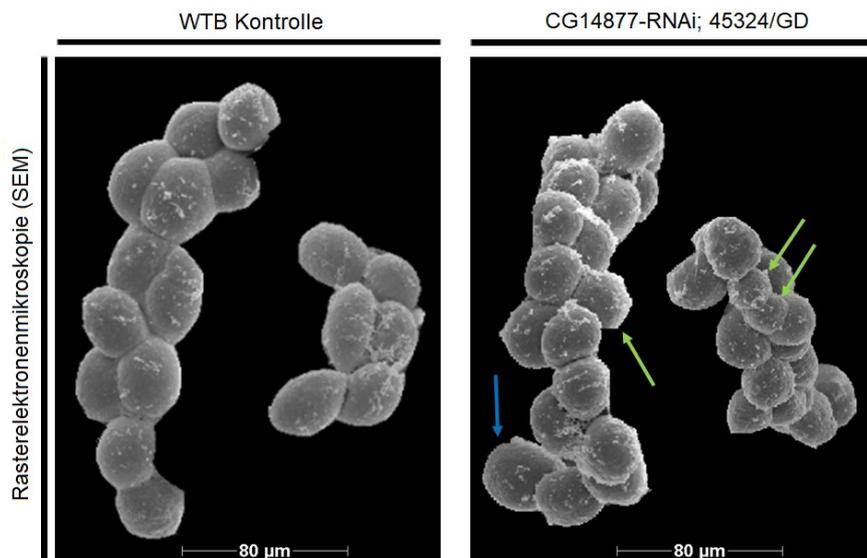


**Abbildung 36: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens *MERTK*.** Hellgrüne Pfeile markieren kleine Nephrozyten im Verlauf der Zellgirlande.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG2272-RNAi (33158/GD)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 80  $\mu\text{m}$ , Probenanzahl: 40 ( $n = 40$ )

### 3.2.4. NPR3

In der Untersuchung der Garlandzellen der RNAi-Linie CG14877 fallen im Vergleich zur Positivkontrolle die schwankenden zellmorphologischen Größenunterschiede auf. Zum einen beinhaltet die Zellgirlande sehr kleine Nephrozyten. Zum anderen zeigen sich Zellen, die in ihrer Größe über jener der wildtypischen Ausprägung liegen (Abbildung 37).

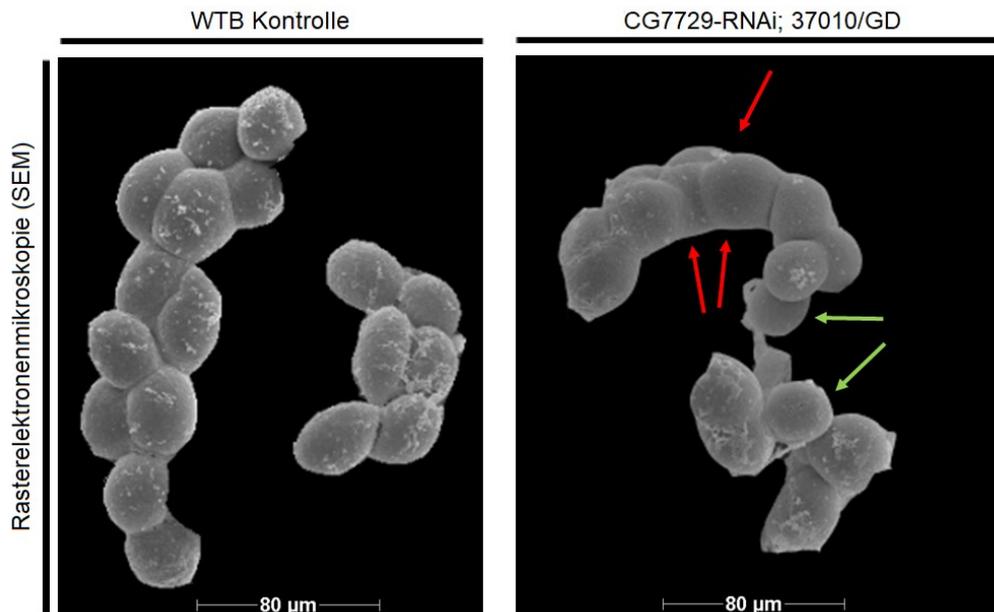


**Abbildung 37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens *NPR3*.** Kleinere Zellen (grüne Pfeile) sowie vergrößerte Nephrozyten (blaue Pfeile) fallen auf.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14877-RNAi (45324/GD)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 80  $\mu\text{m}$ , Probenanzahl: 40 ( $n = 40$ )

### 3.2.5. FERMT2

Im Vergleich zur wildtypischen Positivkontrolle kennzeichnet sich der KD des Homologes zum humanen FERMT2 durch Garlandzellen, die in ihrer Größe stark variieren, wodurch ein unregelmäßiges Erscheinungsbild entsteht. Auffällig kleine Nephrozyten reihen sich in der girlandenförmigen Zellkette aneinander. Die morphologische Untersuchung des Gens charakterisiert sich darüber hinaus durch auftretende Agglutinationen (Abbildung 38).

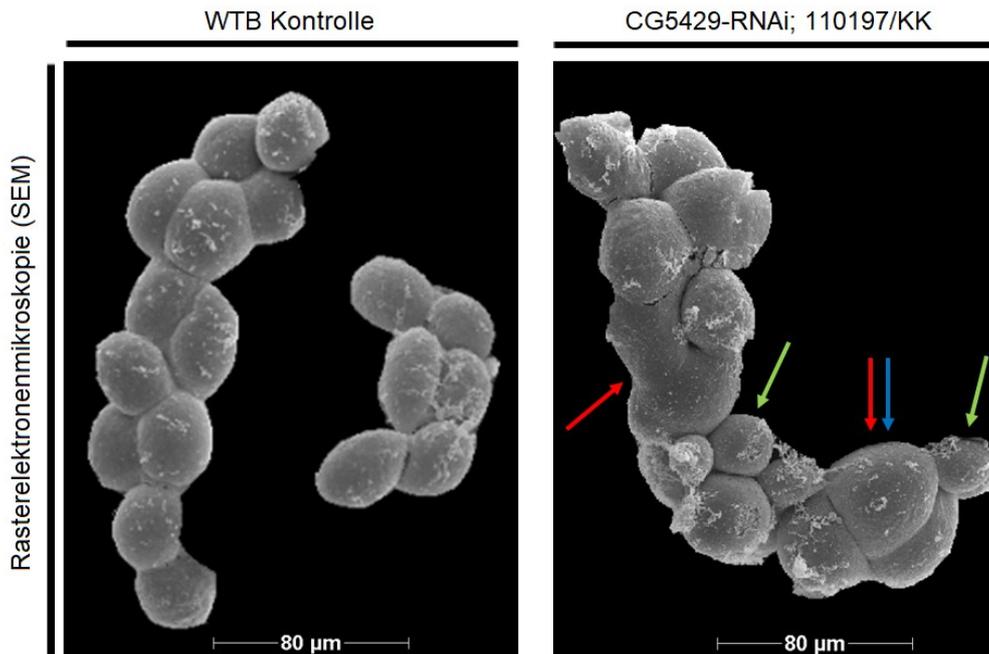


**Abbildung 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens FERMT2.** In der morphologischen Untersuchung ist das Auftreten kleiner Nephrozyten im Vergleich zur Größe der wildtypischen Zelle (grüne Pfeile) hervorzuheben. Das Vorhandensein von Agglutinationen wird in Form von roten Pfeilen markiert.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG7729-RNAi (37010/GD)*  
KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 80 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.2.6. BECN1

Der KD des Homologs zum humanen BECN1 fällt in der zellmorphologischen Untersuchung durch seine Unterschiede hinsichtlich der Größe auf. Sehr kleine sowie gleichermaßen sehr große, über dem Maß der wildtypischen Zellgröße liegende Nephrozyten, kennzeichnen die Gestalt der zellulären Girlande. Hinzukommend zu dieser unregelmäßigen Größenverteilung sind Agglutinationen benachbarter Garlandzellen ein Merkmal der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung nach KD des Gens BECN1 (Abbildung 39).

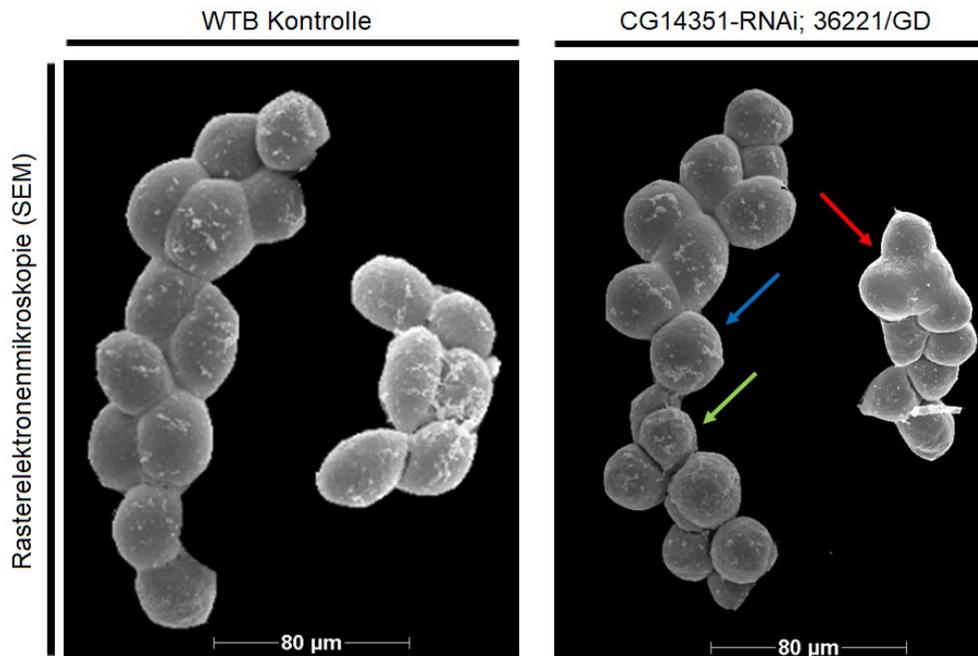


**Abbildung 39: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens *BECN1*.** Dargestellt werden verschiedene morphologische Auffälligkeiten innerhalb der frei präparierten Zellgirlande der CG5429-RNAi. Auffällig kleine Zellen (grüne Pfeile) sowie vergleichsweise große Zellen (blaue Pfeile) charakterisieren das rasterelektronenmikroskopische Erscheinungsbild. Rote Pfeile markieren bestehende Zellagglutinationen im Vergleich zum Wildtyp.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG5429-RNAi (110197/KK)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 80 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.2.7. VASN

Die REM-Darstellung der Nephrozyten aus dem KD des Gens CG14351 liefert unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der morphologischen Eigenschaften. Die Zellgirlande weist auffällig große sowie auffällig kleine Garlandzellen auf. Darüber hinaus zeigen sich im Vergleich zur Wildtypkontrolle vielfache Zellagglutinationen (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Nephrozyten nach KD des Gens VASN.** Größenunterschiede sowie Agglutinationen charakterisieren das morphologische Bild der untersuchten Nephrozyten im Vergleich zum Wildtyp Berlin. Grüne Pfeile markieren kleine Zellen des Genotyps. Als Hinweis für vergleichsweise große Zellen dienen blauunterlegte Pfeile. Agglutinationen werden mithilfe von roten Pfeilen markiert.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14351-RNAi (36221/GD)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 80 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.3. Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche

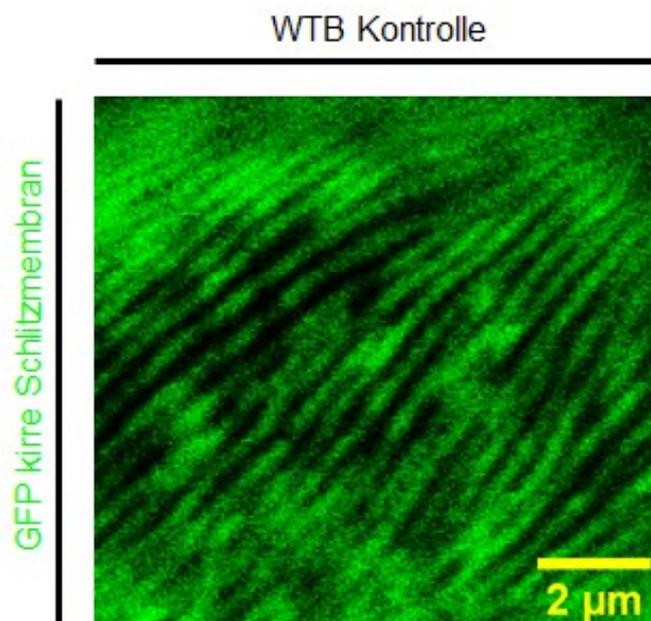
Nach vorangegangenen molekularen, funktionellen sowie phänotypischen Experimenten, steht abschließend die morphologische Untersuchung der Intaktheit der Filtrationsbarriere im Fokus des Interesses.

Im Jahre 2017 gelang es Hermle et al. (2017) die Anordnung von Kirre und Sns an der Oberfläche der Nephrozyten in hochauflösender Vergrößerung im REM darzustellen. Als Resultat dieses erstmals durchgeführten Versuches konnten Kirre und Sns in Form parallel angeordneter Linien, die an das Muster eines Fingerabdruckes erinnern, dargestellt werden. Bei Verlust des jeweiligen Interaktionspartners ist die Morphologie der Schlitzmembran gestört und stellt sich anhand der Anordnung verklumpter Punkte dar (Hermle et al., 2017). Die Arbeitsschritte entsprechen jenen der Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre, lediglich die Durchführung der Aufnahmen der konfokalmikroskopischen Bilder unterscheidet sich. Anstelle der Aufnahme als Schnitt durch die Zelle, werden die Aufnahmen direkt über der Oberfläche der Nephrozyten angefertigt (Hermle et al., 2017).

Diese im nachfolgenden Verlauf der Arbeit angewandten Erkenntnisse erlauben eine innovative Methode zum Erlangen eines ersten Eindruckes über den Zustand der Schlitzmembran. Es wird an vorangegangene Untersuchungen angeknüpft, noch vor dem Schritt der anspruchsvollen Anfertigung transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen der Filtrationsbarriere.

### 3.3.1. Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin

Zur Untersuchung des fingerabdruckähnlichen Musters der Zelloberfläche der Nephrozyten der unterschiedlichen Genotypen ist die Validierung einer Positivkontrolle von Bedeutung. Die Abbildung 41 zeigt das Ergebnis der Anfärbung gegen Kirre in hoher konfokalmikroskopischer Vergrößerung für den Wildtyp Berlin. Kirre stellt sich charakteristisch in parallelen Linien angeordnet in Form eines Fingerabdruckes dar. Dieses Erscheinungsbild der angefärbten Oberfläche umgibt den Nephrozyten in seiner Gesamtheit, sodass die Verwendung des Wildtyp Berlins als valide Positivkontrolle zur Gegenüberstellung und zur Vergleichbarkeit nachfolgender Untersuchungen bestätigt werden kann.

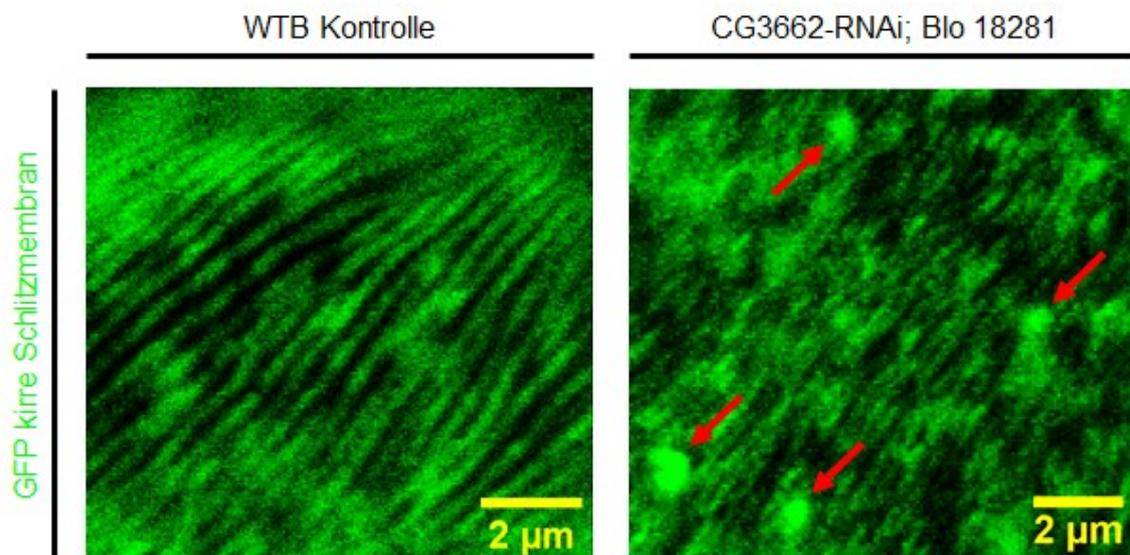


**Abbildung 41: Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche des Wildtyp Berlins nach Kirre-Immunozytochemie.** Die Schlitzmembran ist durch die Anordnung Kirres in Form paralleler Linien Fingerabdruckähnlich ersichtlich und erlaubt die Verwendung als valide Positivkontrolle.

Genotyp: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)  
Größenbalken: 2 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.3.2. ITM2B

Die Darstellung der Oberfläche der Nephrozyten nach KD des Gens ITM2B zeigt einerseits eine Fingerabdruckähnliche Anordnung Kirres in Form parallel gelegener Linien. Andererseits fallen im Vergleich zur Wildtypkontrolle zahlreiche einzelne Punkte in der Immunfluoreszenzfärbung der Oberfläche auf (Abbildung 42). Auf den konfokalmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die vollständige Filterzelle von einem abwechselnden Muster aus parallelen Linien und angehäuften Punkten umgeben ist.

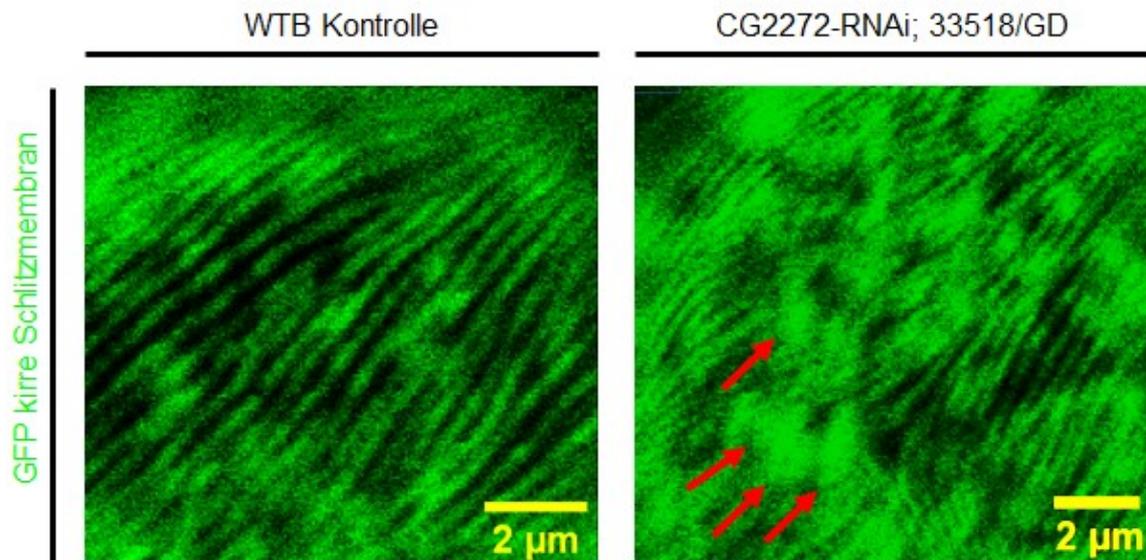


**Abbildung 42: Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens ITM2B mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung.** Das Fingerabdruckähnliche Muster wird im Vergleich zur Positivkontrolle auf der gesamten Nephrozytenoberfläche von einer auffälligen Anhäufung zahlreicher Punkte unterbrochen (markiert durch rote Pfeile).

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG3662-RNAi (Blo 18281)*  
KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 2 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.3.3. MERTK

Die Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens CG2272 charakterisiert sich mithilfe hochauflösender konfokalmikroskopischer Aufnahmen gleichermaßen durch die streifenförmige Anordnung Kirres sowie durch das Vorhandensein zahlreicher Punkte (Abbildung 43). Auf der einen Seite entspricht die parallele Darstellung durch die Anordnung von Kirre dem wildtypischen Erscheinungsbild eines Fingerabdrucks. Auf der anderen Seite ergibt sich ein unregelmäßiges Muster durch das sich wiederholende Auftreten vermehrter Punkte entlang der gesamten untersuchten Oberfläche.

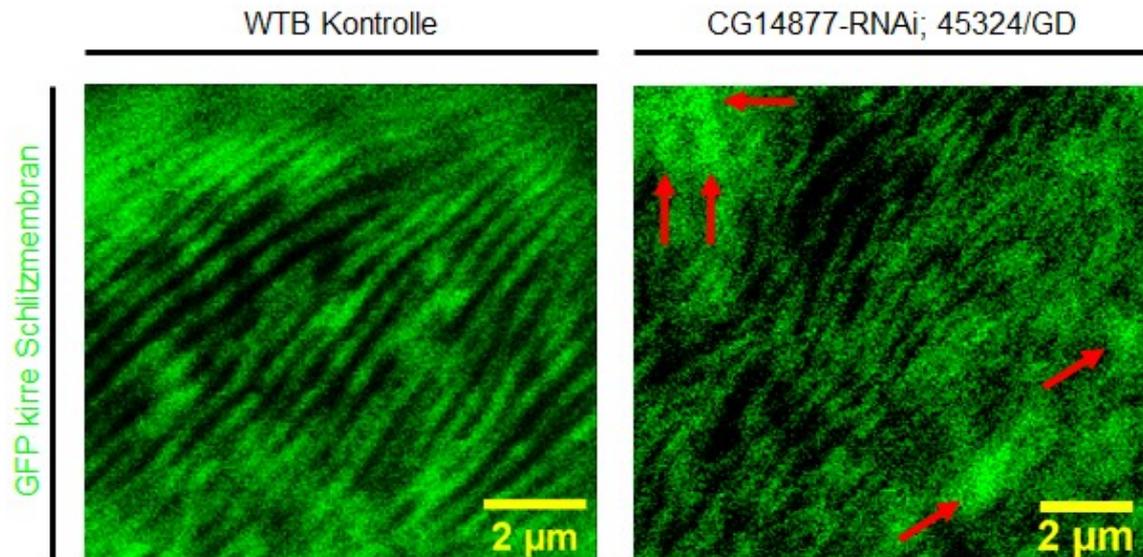


**Abbildung 43: Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens MERTK mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung.** Die Nephrozyten charakterisieren sich durch eine gestreifte Oberfläche des Nephrozyten. Gleichzeitig fallen zahlreiche Punkte (markiert durch rote Pfeile) entlang der gesamten, untersuchten Oberfläche auf.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG2272-RNAi (33518/GD)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 2  $\mu\text{m}$ , Probenanzahl: 40 ( $n = 40$ )

### 3.3.4. NPR3

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Zelloberfläche nach KD des Gens NPR3, die mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre sichtbar gemacht wurden, zeigen sowohl eine Anordnung Kirres in Form paralleler Linien sowie das Auftreten zahlreicher Punkte (Abbildung 44). Das an einen Fingerabdruck erinnernde Muster der Nephrozytenoberfläche der Filterzellen deckt sich zum einen mit den Oberflächendarstellungen des Wildtyp Berlins und beinhaltet zum anderen von der Positivkontrolle abweichende punktförmige Anordnungen. Die Überprüfung der Oberfläche zeigt im Laufe der angefertigten Aufnahmen, dass dieses Muster die gesamte Zelloberfläche umfasst.

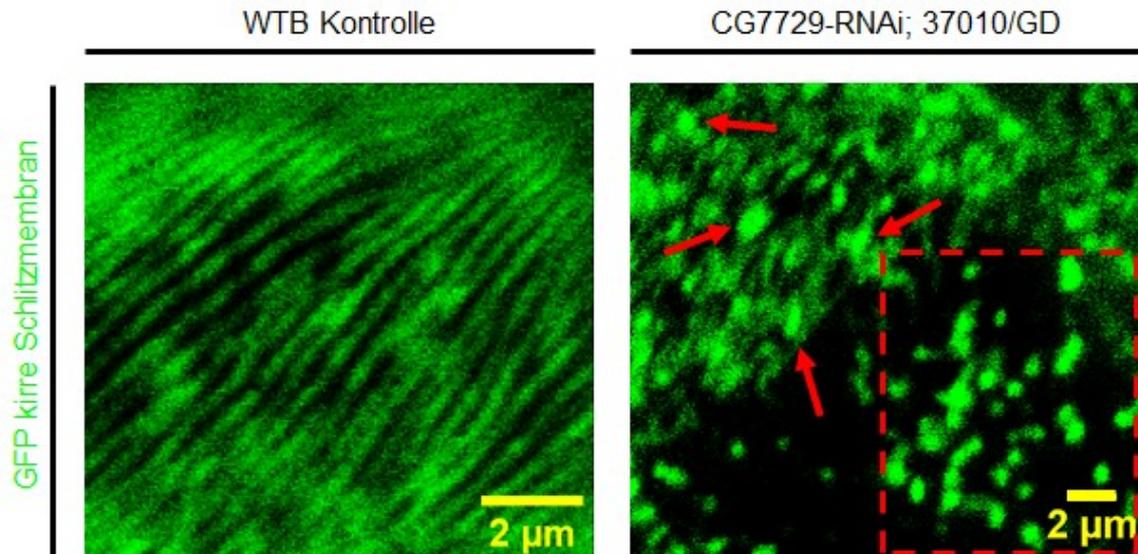


**Abbildung 44: Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens NPR3 mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung.** Die Oberfläche der Nephrozyten zeigt zum einen eine Fingerabdruckähnliche Anordnung, unterscheidet sich in ihrer Ausprägung jedoch von der Wildtypkontrolle durch das Vorhandensein von Punkten (markiert durch rote Pfeile).

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14877-RNAi (45324/GD)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 2 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.3.5. FERMT2

Nach KD des Gen Homologes für FERMT2 ergibt sich nach Anfärbung der Nephrozytenoberfläche eine von dem wildtypischen Muster abweichende Darstellung. Zum einen zeigen sich erkennbare parallele Linien, die begleitet sind von zahlreichen Punkten (Abbildung 45). Andere Bereiche charakterisieren sich in Form fehlender Schlitzmembranen durch das Ausbleiben einer Fingerabdruckähnlichen Anordnung und weisen stattdessen eine Vielzahl an Punkten auf. Daraus resultiert im Laufe der Anfertigung konfokalmikroskopischer Aufnahmen ein unruhiges und ungleichmäßiges Erscheinungsbild der Nephrozytenoberfläche, welches die Zelle in ihrer Gesamtheit umgibt.

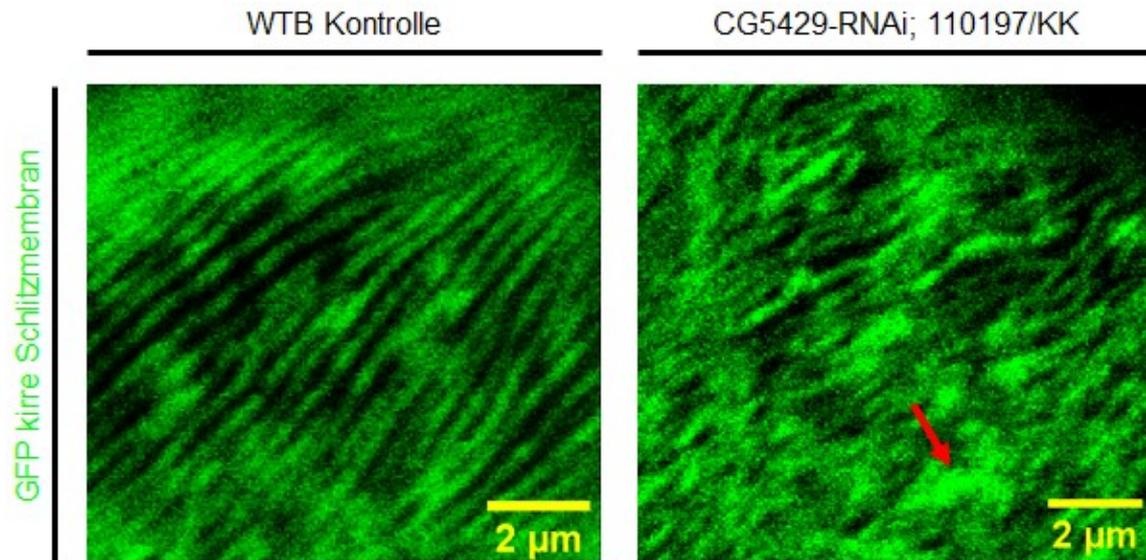


**Abbildung 45: Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens *FERMT2* mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung.** Die roten Pfeile markieren die auffälligen, von der Norm abweichenden Punkte, die die teilweise erkennbaren, Wildtyp entsprechenden Fingerabdruckähnlichen Muster der Oberfläche überschatten. Die rot gestrichelte Umrandung stellt das ausschließliche Vorhandensein von Punkten ohne erkennbare Schlitzmembranen dar.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG7729-RNAi (37010/GD)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 2 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.3.6. BECN1

Die durch Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre sichtbar gemachte Oberfläche der Nephrozyten nach Herunterregulierung des BECN1 Homologes zeigt ein dem Wildtyp Berlin ähnliches Muster eines Fingerabdruckes (Abbildung 46). Es fällt auf, dass die Anordnung der Oberfläche von den parallelen Linien der Positivkontrolle abweicht und nicht der gleichmäßigen Ausprägung des Wildtyps entspricht. Das Muster erscheint stattdessen teilweise wellenförmig und beinhaltet vereinzelte von der Norm abweichende Punkte. Die gesamte Oberfläche der Filterzellen zeigt sich in der Untersuchung via Konfokalmikroskopie in Form dieses Erscheinungsbildes.

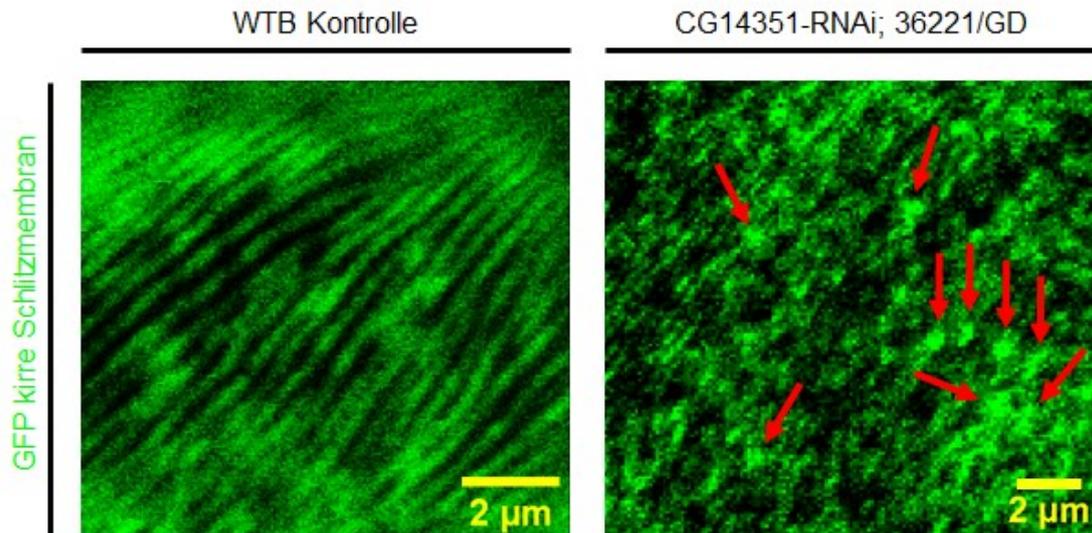


**Abbildung 46: Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens *BECN1* mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung.** Wellenförmige Linien und vereinzelt punktförmige Anordnungen (roter Pfeil) kennzeichnen die Oberfläche, die sich deutlich von der Kontrolle abhebt.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG5429-RNAi (110197/KK)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 2 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.3.7. VASN

Im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre charakterisiert sich die Oberfläche der Nephrozyten nach KD von *CG14351* durch schwer darstellbare parallel angeordnete Linien, die der Form eines Fingerabdruckes und somit der Morphologie der Positivkontrolle entsprechen. Auffällig ist die Vielzahl an Punkten, die dieses wildtypische Muster in seiner Gleichmäßigkeit vollständig unterbrechen (Abbildung 47). Die Aufnahmen zeigen eine Oberfläche, die gleichmäßig diesen Auffälligkeiten entspricht.



**Abbildung 47: Konfokalmikroskopie der Nephrozytenoberfläche nach KD des Gens VASN mittels Kirre-Immunfluoreszenzfärbung.** Schwer darstellbare, parallel angeordnete Linien formen die Oberfläche des Nephrozyten. Auffällig sind die das Muster prägende punktförmige Anordnungen, die durch rote Pfeile markiert sind.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*, *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14351-RNAi (36221/GD)*  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 2 µm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### **3.4. Transmissionselektronenmikroskopie**

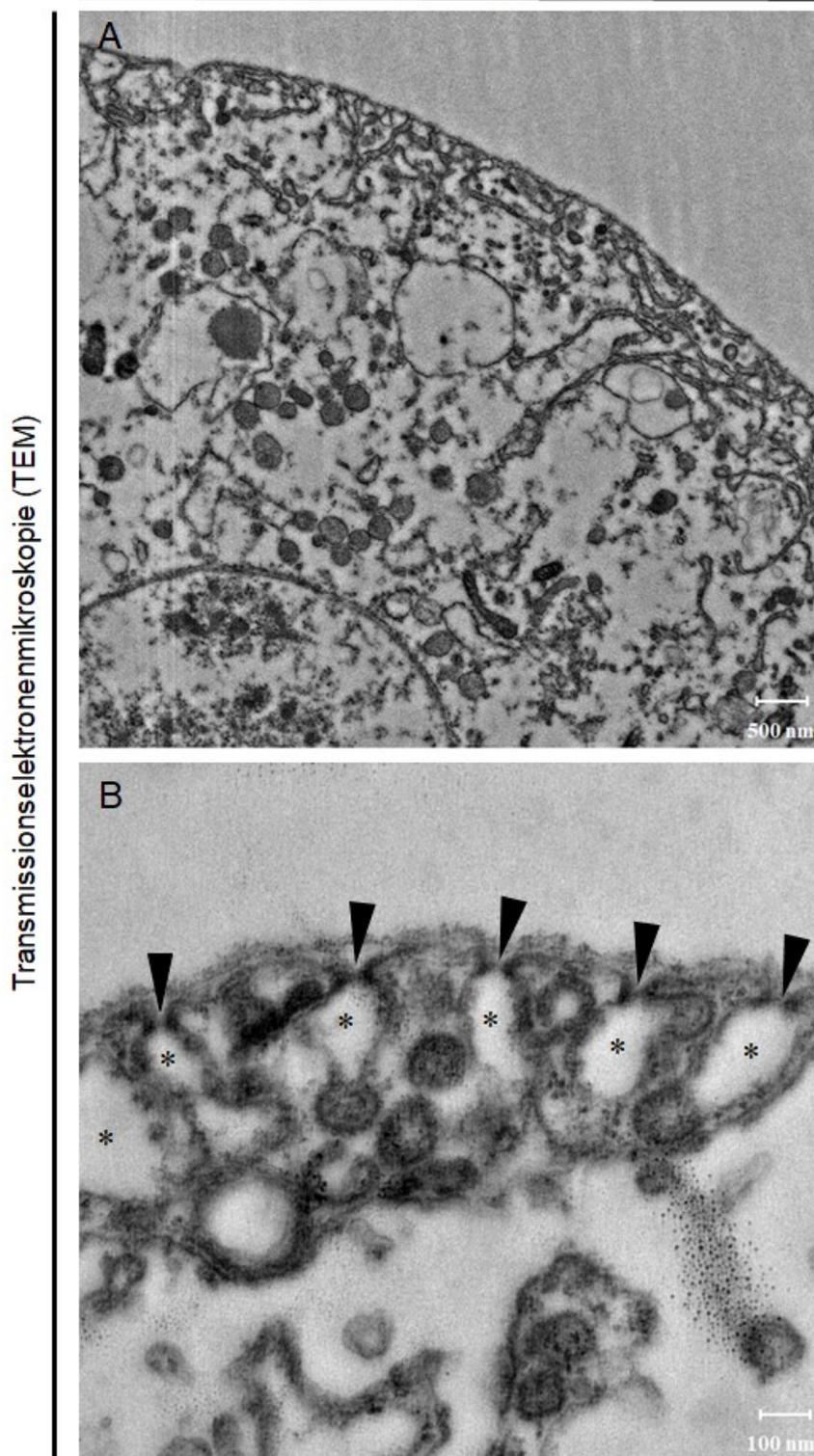
#### **Nephrzytenschlitzmembran**

**der**

#### **3.4.1. Validierung der Positivkontrolle: Wildtyp Berlin**

Im Rahmen der TEM-Untersuchungen wurde einleitend der Wildtyp Berlin auf seine Validität als Positivkontrolle für eine intakte Filtrationsbarriere untersucht. Die Übersichtsaufnahme zeigt den ultrastrukturellen Aufbau eines Nephrzyten, der den Wildtyp charakteristischen Eigenschaften entspricht (Abbildung 48). Die äußerste Umgrenzung des Nephrzyten gegenüber der Hämolymphe in Form der Basalmembran lässt sich als gleichmäßig dick und vollständig ausgebildet darstellen. Die darunter gelegene Nephrzytenmembran formt charakteristische Membraneinstülpungen in Form von Lakunen. Diese von Schlitzmembranen überspannten Lakunen, in denen der Hauptvorgang der Filtration in Form von Endozytose des Nephrzyten stattfindet, stellen sich gleichmäßig in ihrer Verteilung dar. Sie sind als einzeln gelegene Erweiterungen unterhalb der Schlitzmembran erkennbar und somit klar voneinander abgegrenzt. Aufgrund dieser ultrastrukturellen Eigenschaften kann der Wildtyp Berlin als valide Positivkontrolle bestätigt und für die nachfolgende Gegenüberstellung mit dem jeweilig zu untersuchenden Genotyp herangezogen werden.

WTB Kontrolle



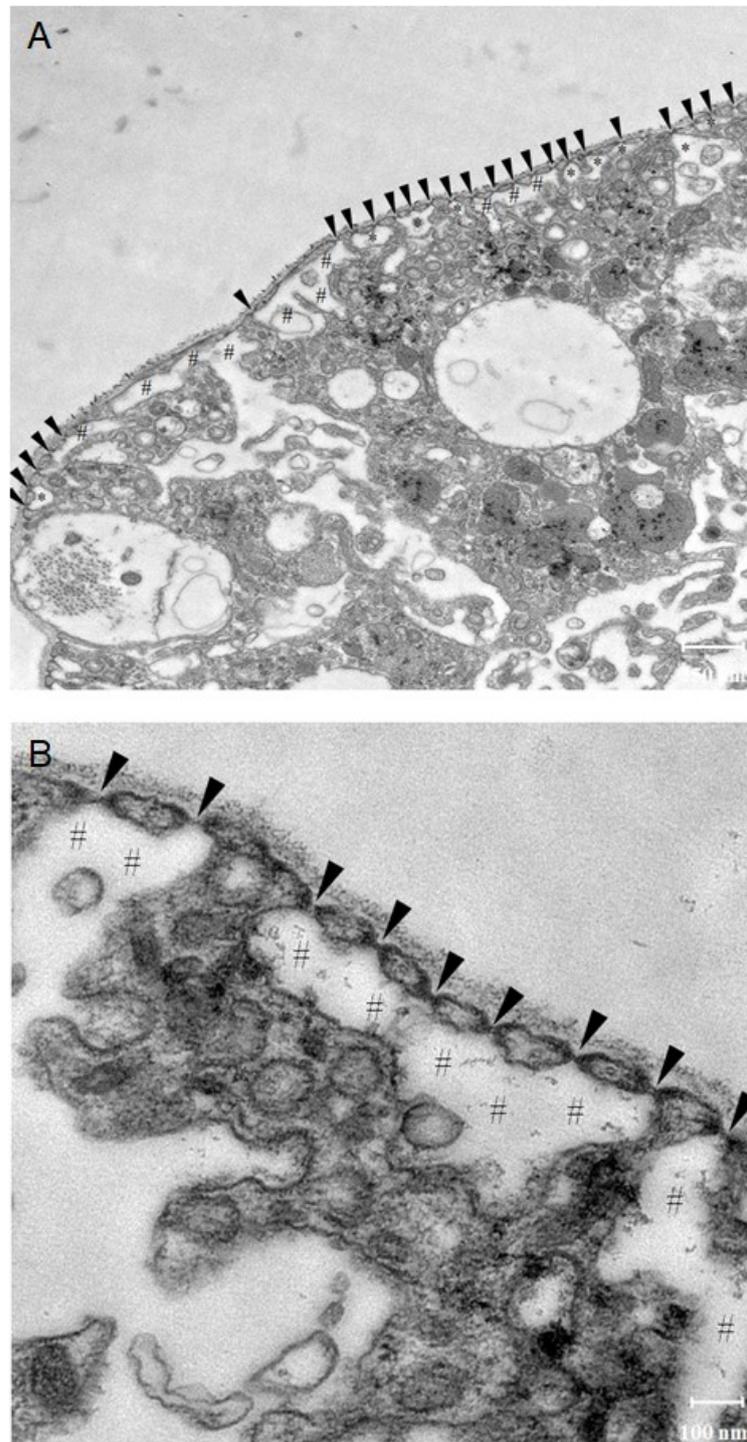
**Abbildung 48: Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten (Wildtyp Berlin) zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran. (A) Übersichtsaufnahme der als Positivkontrolle validierten Filterzelle. (B) Nahaufnahme der wildtypischen Ultrastruktur: Basalmembran, darunter gelegene Nephrozytenmembran und Lakunen (durch Sterne markiert), überspannt von Schlitzmembranen (durch Pfeile markiert).**

Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)

Größenbalken: (A) 500 nm; (B) 100 nm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.4.2. ITM2B

Die Abbildung 49 zeigt die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Nephrozyten *Drosophilas* aus dem KD des Gen Homologes für ITM2B. Die Basalmembran stellt sich gleichmäßig dick und vollständig ausgebildet dar und unterscheidet sich nicht von jener der Wildtypzelle. Die Ultrastruktur der Schlitzmembran ist konserviert, zeigt sich in ihrer Ausbildung jedoch nur streckenweise vorhanden. Es zeigen sich Abschnitte, in denen die Schlitzmembran ebenso wie die Membranausstülpungen in ihrer Morphologie konserviert sind. In diesen Abschnitten zeigen sich nur wenige Fusionen der Lakunen. Andere Abschnitte charakterisieren sich jedoch durch eine auffällige Reduktion an Schlitzmembranen. Insbesondere in diesen Bereichen fehlender Filtermembranen zeigen sich eine Vielzahl miteinander verschmolzen erscheinender Membraneinstülpungen.

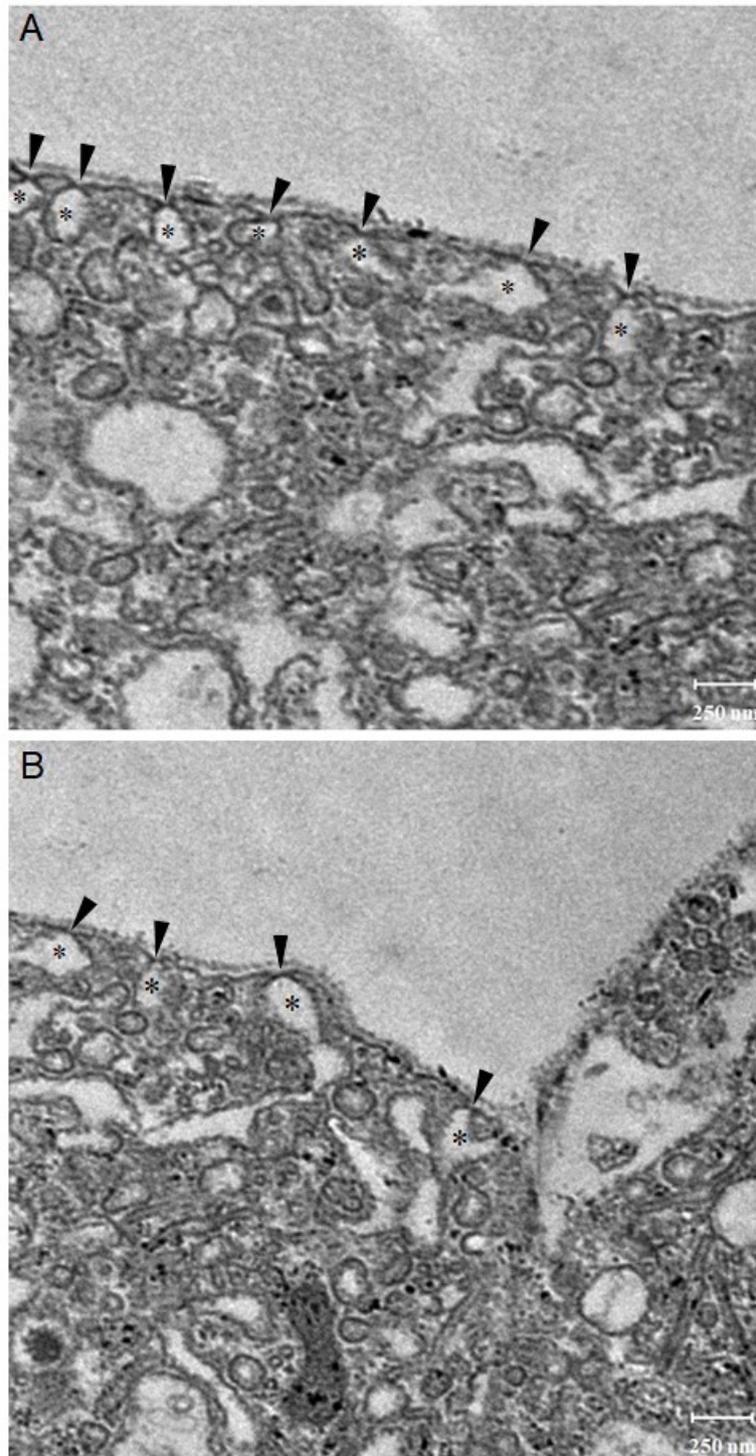


**Abbildung 49: Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens *ITM2B* zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran.** (A) Während Pfeile das Vorhandensein wildtypisch ausgebildeter Schlitzmembranen kennzeichnen, fallen fehlende Bereiche sowie wenige wildtypische Lakunen (durch Sterne markiert) bereits in der Übersichtsaufnahme auf. (B) Die Nahaufnahme zeigt überwiegend fusionierte Lakunen (durch Rauten markiert) sowie eine intakte Basalmembran.

Genotypen: *Pros-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB); *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG3662-KO* (Blo 18281)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: (A) 250 nm; (B) 100 nm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### **3.4.3. MERTK**

Der ultrastrukturelle Aufbau der in der Abbildung 50 dargestellten Schlitzmembran des Nephrozyten aus dem KD des Gens MERTK entspricht den wildtypischen Charakteristika. Auch die Membraneinstülpungen unterscheiden sich morphologisch nicht von den Lakunen des Wildtyp Berlins. Ebenso stellt sich die Basalmembran als gleichmäßige und einheitlich dicke Struktur dar. Es fällt jedoch auf, dass die Anzahl ausgebildeter Schlitzmembranen deutlich reduziert ist. Dort wo Schlitzmembranen nicht ausgebildet sind, fehlen ebenfalls Lakunen. Im Vergleich zur Positivkontrolle liegen die Schlitzmembranen nicht dicht benachbart nebeneinander, sondern fehlen streckenweise. Dadurch entstehen Lücken zwischen den nebeneinander gelegenen Filtermembranen.



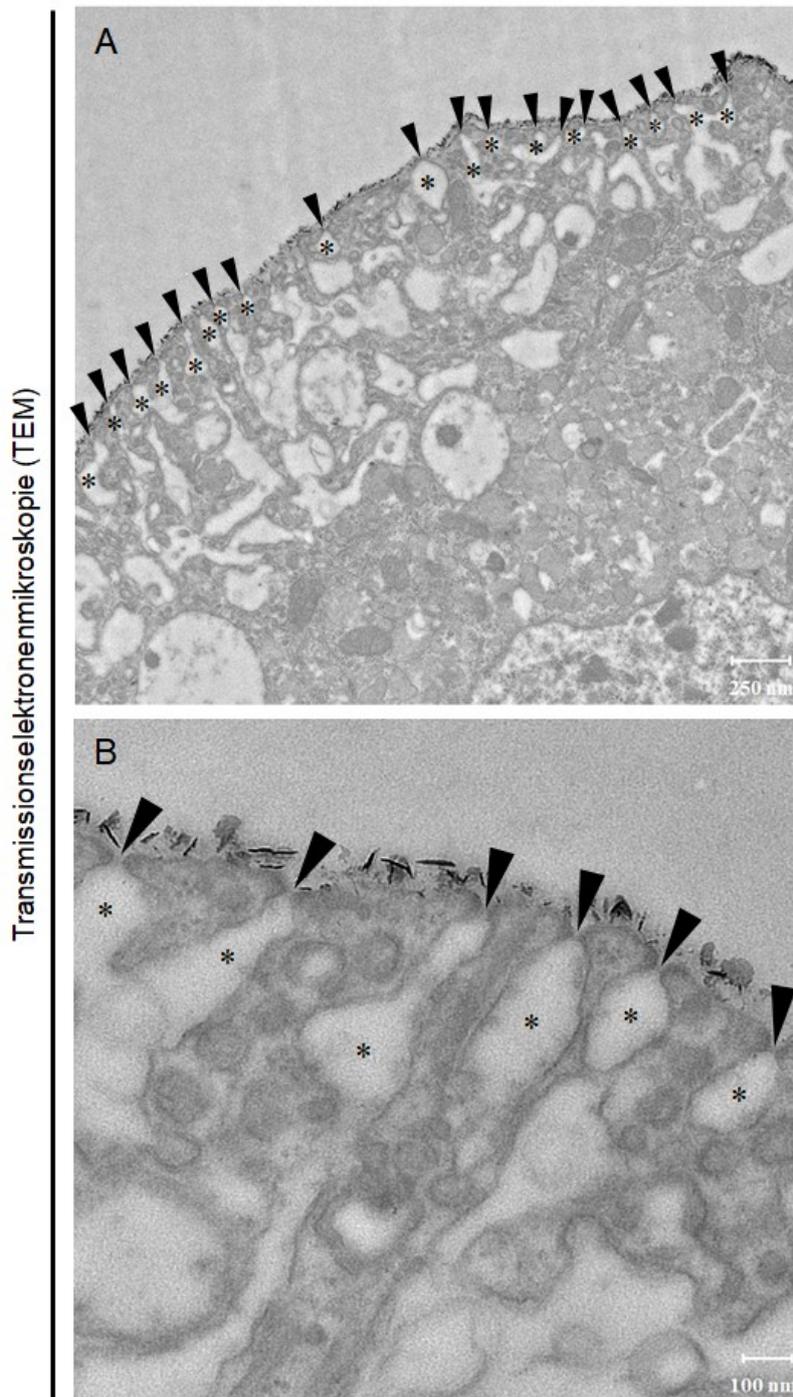
**Abbildung 50: Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens MERTK zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran.** (A) Die Übersichtsaufnahme zeigt konservierte Schlitzmembranen (markiert durch Pfeile) und wildtypische Lakunen (markiert durch Sterne), die in ihrer Anzahl deutlich reduziert sind. (B) Auffällig sind die Lücken zwischen benachbarten Schlitzmembranen. Lakunen fehlen dort, wo Schlitzmembranen nicht ausgebildet sind. Die Basalmembran ist unverändert.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*; *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG2272-RNAi (33158/GD)*; KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: (A) 250 nm; (B) 250 nm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

#### **3.4.4. NPR3**

Auch in den Nephrozyten des KD des Gens NPR3 fällt auf, dass die Anzahl an Schlitzmembranen verringert ist (Abbildung 51). Neben Abschnitten, in denen die Membranen und Membraneinstülpungen der Nephrozyten in Form von Lakunen wildtypisch ausgebildet sind, reihen sich Abschnitte ein, in denen weniger Schlitzmembranen zu erkennen sind. Die Basalmembran stellt sich als solide ausgebildete Struktur dar, die in ihrer Erscheinung gleichmäßig ist und demnach den wildtypischen Charakteristika entspricht.

CG14877-RNAi; 45324/GD

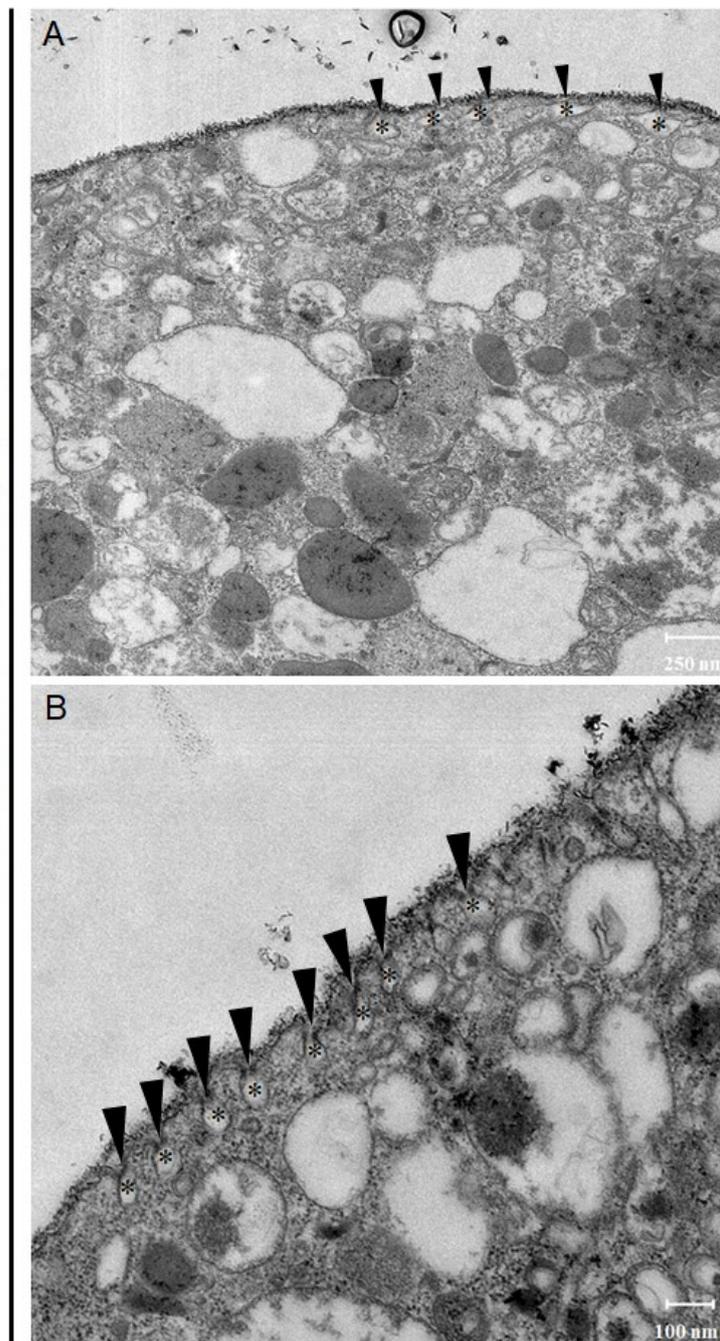


**Abbildung 51: Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens NPR3 zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran.** (A) Pfeile markieren die in der Übersichtsaufnahme zu sehenden konservierten Schlitzmembranen. Sterne markieren die darunter gelegenen Membraneinstülpungen. Abschnittsweise fehlen Schlitzmembranen in ihrer Ausbildung. (B) Auch in der Nahaufnahme zeigen sich die Schlitzmembranen ebenso wie die Lakunen in ihrem Vorhandensein konserviert. Elektronendichte Nadeln überlagern teilweise die Basalmembran, deren Beurteilung als gleichmäßig dicke Struktur dennoch möglich ist.

Genotypen: Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB); Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14877-RNAi (45324/GD)  
KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken:(A) 250 nm; (B) 100 nm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

### 3.4.5. BECN1

Die TEM-Aufnahmen der Nephrozyten aus dem KD des Gens BECN1 zeigen eine konservierte Struktur der Schlitzmembran, die jedoch in ihrem Vorkommen deutlich reduziert ist (Abbildung 52). Neben wildtypisch ausgebildeten Abschnitten reihen sich Bereiche weniger Schlitzmembranen und Lakunen ein. Die Membraneinstülpungen der Nephrozytenmembran sind dem Wildtyp entsprechend einzeln und voneinander getrennt ausgebildet. Es fällt jedoch auf, dass die Lakunen in ihrer Ausprägung sehr klein sind und regelrecht ineinander gefallen erscheinen. Auffällig sind die zahlreichen, akkumulierten Endosomen im Zytoplasma des ultrastrukturell dargestellten Nephrozyten. Elektronendichte, spitze Nadeln überlagern die Basalmembran, sodass diese in den vorliegenden Aufnahmen nicht beurteilt werden kann.



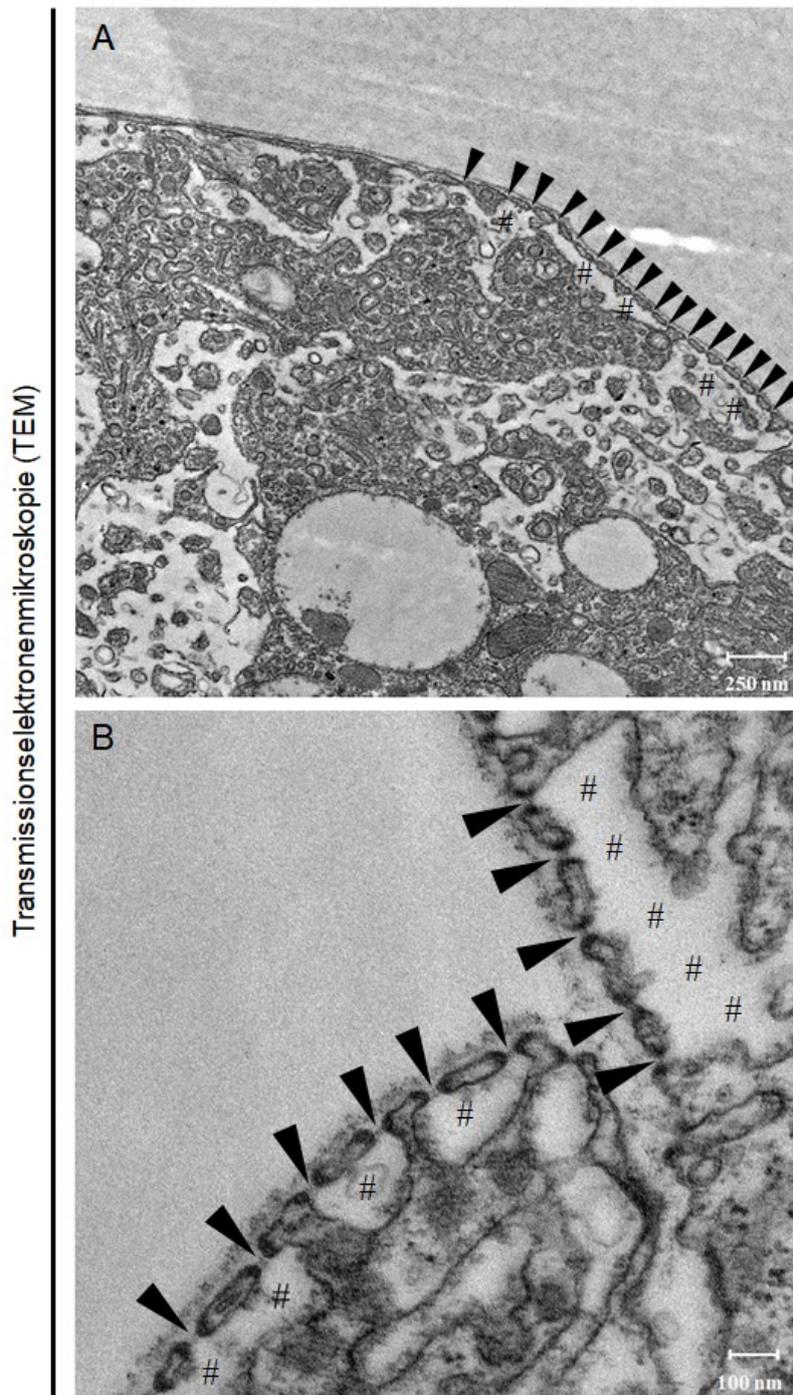
**Abbildung 52: Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens *BECN1* zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran.** (A) Durch Pfeile markierte Schlitzmembranen sind zwar konserviert, in ihrer Anzahl jedoch deutlich reduziert. Auffällig sind zudem die unterhalb der Filtrationsbarrieren gelegenen stark verkleinerten Lakunen (durch Sterne markiert). Das Zytoplasma charakterisiert sich durch eine erhöhte Anzahl an Endosomen. (B) Markant ist zusätzlich zu der reduzierten Menge an Schlitzmembranen (durch Pfeile markiert) die hohe Anzahl akkumulierter Endosomen im Zytoplasma. Die Beurteilung der Basalmembran wird durch das starke Vorhandensein elektronendichter Nadeln erschwert und ist aufgrund dessen nicht möglich.

Genotypen: *Pros-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB); *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG5429-RNAi* (110197/KK)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: (A) 250 nm; (B) 100 nm, Probenanzahl: 40  
 (n = 40)

### **3.4.6. VASN**

Die Nephrozyten des Gens VASN charakterisieren sich nach KD zum einen durch Abschnitte, in denen die Basalmembran zwar unauffällig ist und auch die Schlitzmembran sich in ihrer wildtypischen Ausbildung zeigt (Abbildung 53). Jedoch fällt auf, dass die Membraneinstülpungen uneinheitlich sind und nicht klar voneinander abgegrenzt sind. Weite Abschnitte der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen enthalten unterhalb der Schlitzmembran gelegene deutlich miteinander fusionierte Lakunen. Zum anderen zeigen sich benachbarte Abschnitte, in denen Schlitzmembranen und Lakunen in ihrer Anzahl deutlich reduziert sind. Unabhängig davon erscheint die Basalmembran durchgängig dick und einheitlich und entspricht der wildtypischen Positivkontrolle.

CG14351-RNAi; 36221/GD



**Abbildung 53: Transmissionselektronenmikroskopie des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten nach KD des Gens VASN zur Darstellung der Morphologie der Schlitzmembran.** (A) Die unterhalb der konservierten Schlitzmembranen (durch Pfeile markiert) gelegenen Lakunen sind in hoher Anzahl miteinander fusioniert (durch Rauten markiert). Zahlreiche Bereiche verfügen über keine Schlitzmembranen. (B) Lakunen sind nicht klar voneinander abgegrenzt, sondern miteinander verschmolzen. Die Basalmembran unterscheidet sich nicht von der Positivkontrolle.

Genotypen: *Pros-Gal4 (2) → Wildtyp<sup>Berlin</sup> (WTB)*; *Pros-Gal4 (2) → UAS-CG14351-RNAi (36221/GD)*  
KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: (A) 250 nm; (B) 100 nm, Probenanzahl: 40 (n = 40)

## 3.5. Rasterelektronenmikroskopie des Facettenauges

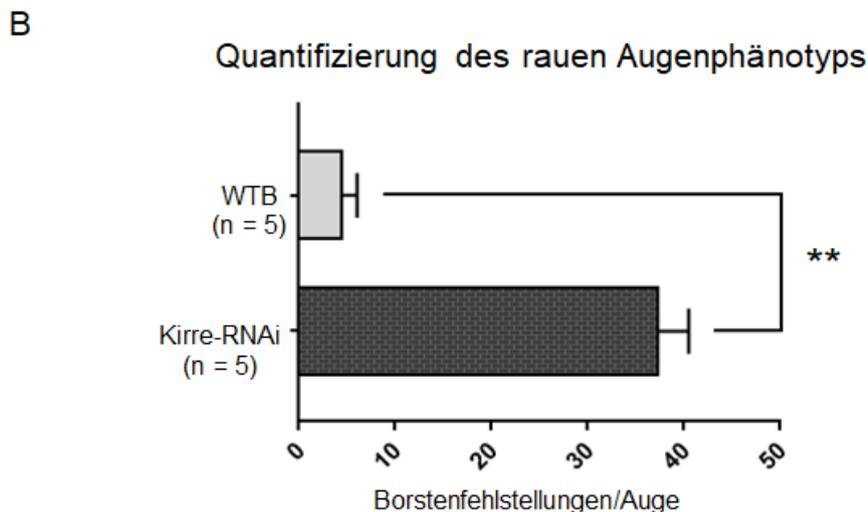
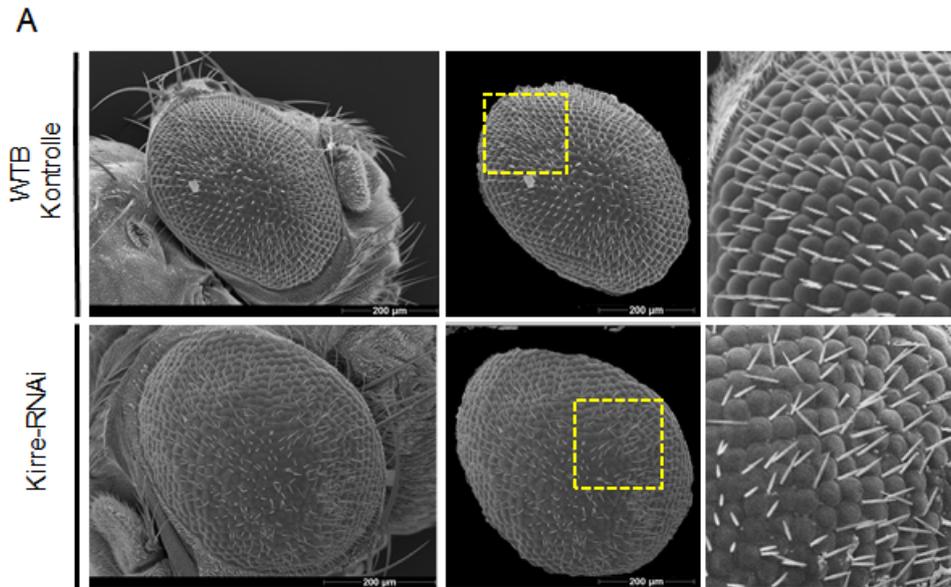
### 3.5.1. Validierung der Positiv- und Negativkontrolle: Wildtyp Berlin und Kirre-RNAi

Die Interaktion der *Drosophila*-Homologe für Neph rin und Neph1 ist über die Bedeutung für die Integrität der Schlitzmembran hinaus, für die funktionierende Separation der Ommatidien des Facettenauges verantwortlich. Nach erfolgten Untersuchungsschritten auf Ebene der Schlitzmembran folgt anhand der Untersuchung des Facettenauges die Beleuchtung eines weiteren Organsystems, in dem Neph rin und Neph1 von Bedeutung sind. Durch die Kreuzung einer Augen-Treiberlinie mit der jeweiligen RNAi-Linie wird die Untersuchung des Einflusses des jeweiligen Gens nach KD auf die Entwicklung des Auges untersucht. Durch diese molekulare Verbindung zwischen Schlitzmembran und Facettenauge können potentielle Rückschlüsse auf die Konservierung des Gens gezogen werden.

Zur Auswertung der Ergebnisse aus der rasterelektronischenmikroskopischen Untersuchung des Facettenauges ist das Heranziehen einer validen Positivkontrolle sowie einer validen Negativkontrolle notwendig. Im Zuge dessen wird zunächst die Kreuzung der Augen-Treiberlinie (GMR-Gal4) mit dem Wildtyp Berlin sowie mit der Kirre-RNAi-Linie auf Verwendbarkeit untersucht.

Die Ommatidien, die als einzelne, voneinander abgegrenzte Elemente in ihrer Gesamtheit das Komplexauge *Drosophilas* bilden, sind in den Aufnahmen des Wildtyp Berlins gleichmäßig ausgebildet und vollständig voneinander abgegrenzt. Jedes Ommatidium ist im überwiegenden Maße von alleinstehenden Borsten umgeben, die sich im maximalen Abstand zueinander platzieren (Abbildung 54 A). Pro Auge zeigen sich durchschnittlich weniger als ein Dutzend Borstenfehlstellungen. Diese morphologischen Eigenschaften entsprechen der in der Literatur beschriebenen wildtypischen Ausprägung, sodass der Wildtyp Berlin als valide Positivkontrolle zur Gegenüberstellung und Interpretation herangezogen werden kann.

Im Vergleich zum wildtypischen Erscheinungsbild zeigt sich in der Analyse des Facettenauges der Kirre-RNAi eine deutlich erhöhte Anzahl an zusammenstehenden Borsten (Abbildung 54 A). Alle Veränderungen ab dem Vorhandensein von 2 Borsten werden generell als Fehlstellung betitelt. Die Quantifizierung dieser Borstenfehlstellungen ergibt eine insgesamt Anzahl von 187 Fehlfaltungen innerhalb von 5 ausgezählten Augen (Abbildung 54 B). Die Kreuzung mit der Kirre-RNAi-Linie kann insofern als valide Negativkontrolle fungieren und im Nachfolgenden zur Interpretation herangezogen werden.



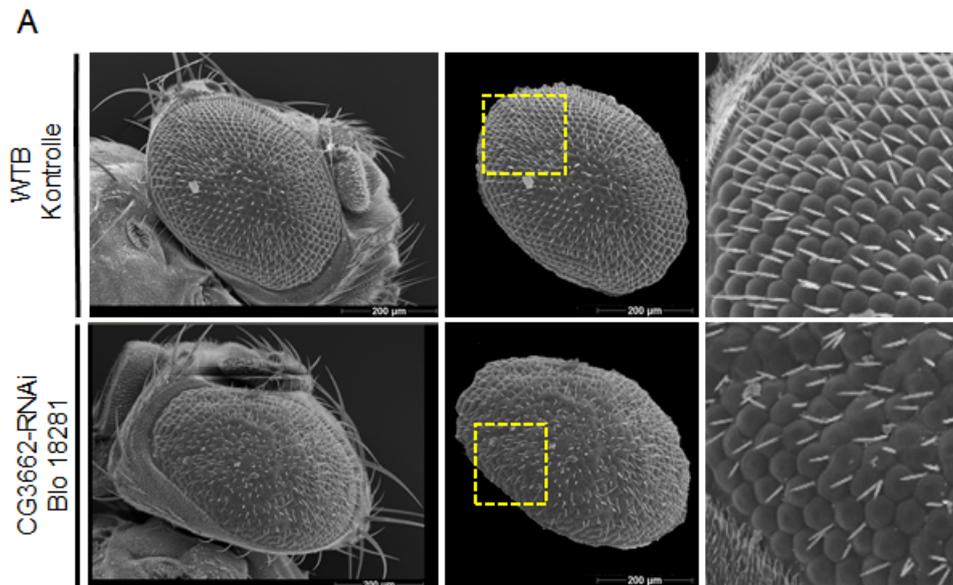
**Abbildung 54: Rasterelektronenmikroskopie des Auges zur Validierung der Positivkontrolle Wildtyp Berlin und der Negativkontrolle Kirre-RNAi.** (A) Übersichtsaufnahmen zeigen jeweils das Facettenauge in seiner Gesamtheit, Nahaufnahmen veranschaulichen die Morphologie im Detail. Das wildtypische Auge charakterisiert sich durch einzelnstehende Borsten, wohingegen das Auge der Kirre-RNAi eine hohe Anzahl an zusammenstehenden Borsten aufweist. (B). Durch die Quantifizierung kann der Wildtyp als Positivkontrolle und die Kirre-RNAi als Negativkontrolle bestätigt werden. Die Augen des Wildtyp Berlins charakterisieren sich durch eine geringe Anzahl an Fehlstellungen, wohingegen die Augen der Kirre-RNAi eine signifikant hohe Anzahl vorhandener zusammenstehender Borstenfehlstellungen aufweisen.

Genotypen: *GMR-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG3653* (27227/GD)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 200  $\mu\text{m}$ , Probenanzahl: 5 (n = 5), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*: 0,001 bis 0,01

### 3.5.2. ITM2B

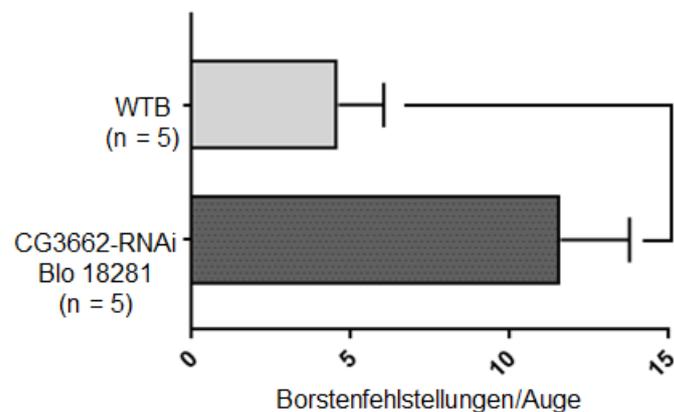
Die REM-Untersuchung des Facettenauges aus dem KD des Gens *CG3362* zeigt Ommatidien, die im Vergleich zur Positivkontrolle nicht vollständig voneinander getrennt sind (Abbildung 55 A). Es zeigt sich ein insgesamt unregelmäßiges, miteinander verschmolzenes

Erscheinungsbild der Ommatidien. Abweichend von der wildtypischen Ausprägung weist das Komplexauge zudem eine erhöhte Anzahl zusammenstehender Borsten auf. Dieses Vorhandensein von Fehlstellungen zwischen den Ommatidien kann durch die Quantifizierung von insgesamt 5 Facettenaugen bestätigt werden (Abbildung 55 B).



**B**

### Quantifizierung des rauen Augenphänotyps

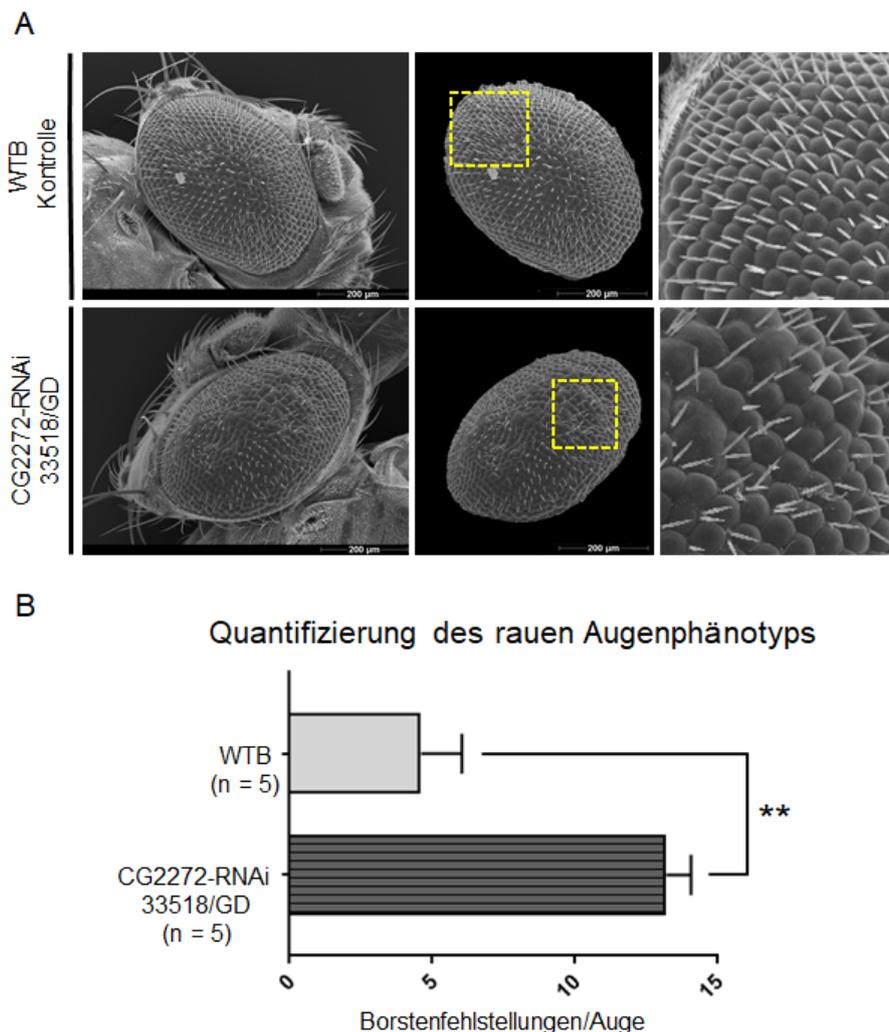


**Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens *ITM2B*.** (A) Das Auge erscheint sowohl in der Übersichts- als auch in der Nahaufnahme durch die partiell auftretenden Verschmelzungen der Ommatidien unregelmäßig. Auffällig sind die erhöhte Anzahl an 2 zusammenstehenden Borsten im Vergleich zur Positivkontrolle. (B) Die quantitative Auszählung der Borstenfehlstellungen untermauert den Eindruck eines erhöhten Aufkommens. Das Vorhandensein von Fehlstellungen ist signifikant erhöht.

Genotypen: *GMR-Gal4* (2) → *Wildtyp*<sup>Berlin</sup> (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG3662-RNAi* (Blo 18281)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 200 µm, Probenanzahl: 5 (n = 5), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*: 0,01 bis 0,05

### 3.5.3. MERTK

Im Rahmen der Untersuchung des Facettenauges des Genotyps für das humane MERTK zeigen sich in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen Ommatidien, die abschnittsweise nicht vollständig ausgebildet und voneinander abgegrenzt sind. Auffällig erscheinen zusätzlich die zahlreichen Abschnitte mit einer erhöhten Anzahl zusammenstehender Borsten (Abbildung 56 A). Im Vergleich zur Auszählung der Positivkontrolle weisen die Komplexaugen des KD des Gens CG2272 eine fast dreifach so hohe Anzahl an Borstenfehlstellungen (n=5) auf. Der subjektive Eindruck einer Vielzahl zusammenstehender Borsten kann quantitativ bestätigt werden (Abbildung 56 B).

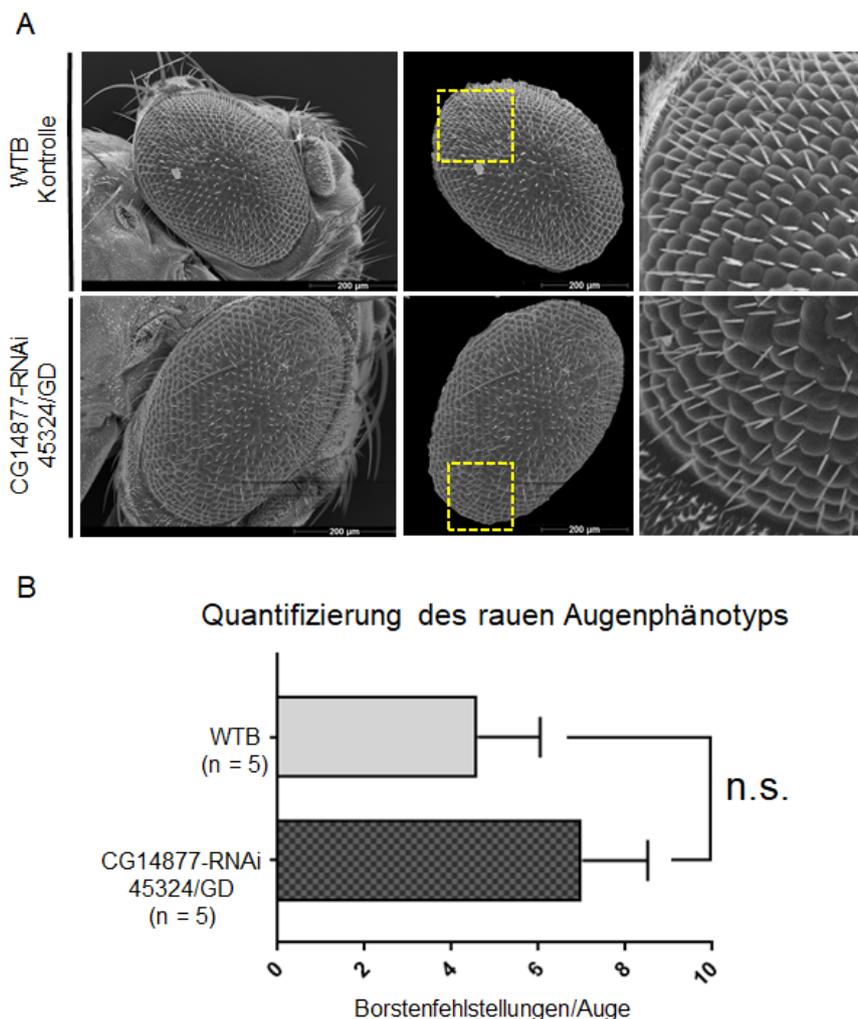


**Abbildung 56: Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens MERTK.** (A) Darstellung des rauen Augenphänotyps im Sinne einer erhöhten Menge an 2 zusammenstehenden Borsten im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Auffällig sind zudem unregelmäßige Abschnitte verschmolzener Ommatidien. (B) Die Fehlstellungen sind in ihrer Menge signifikant erhöht.

Genotypen: *GMR-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG2272-RNAi* (33518/GD)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 200 µm, Probenanzahl: 5 (n = 5), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*: 0,001 bis 0,01

### 3.5.4. NPR3

Die Facettenaugen aus dem KD des Gens CG14877 charakterisieren sich durch eine überwiegend wildtypische Ausprägung. Im Großteil der Bereiche erscheinen die Ommatidien klar voneinander abgegrenzt (Abbildung 57 A). Mit einer Gesamtzahl von 34 Borstenfehlstellungen innerhalb von 5 quantifizierten Komplexaugen besteht keine Signifikanz gegenüber der Positivkontrolle (Abbildung 57 B). Die REM-Aufnahmen zeigen einzelstehende Borsten, die in ihrem Erscheinungsbild dem Wildtyp Berlin entsprechen.

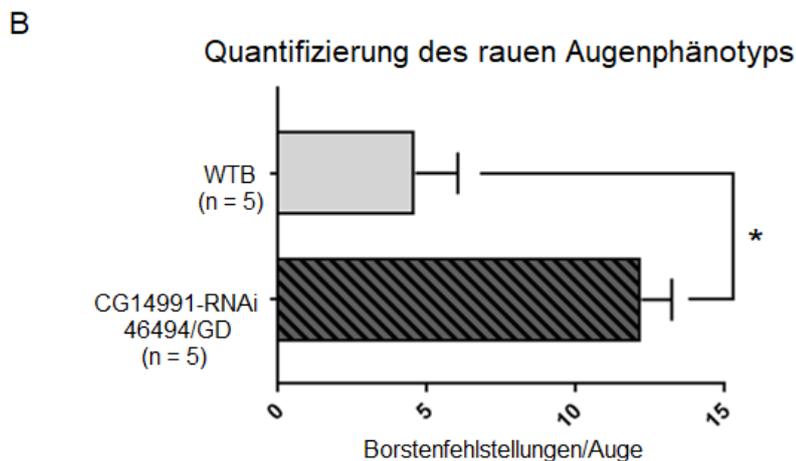
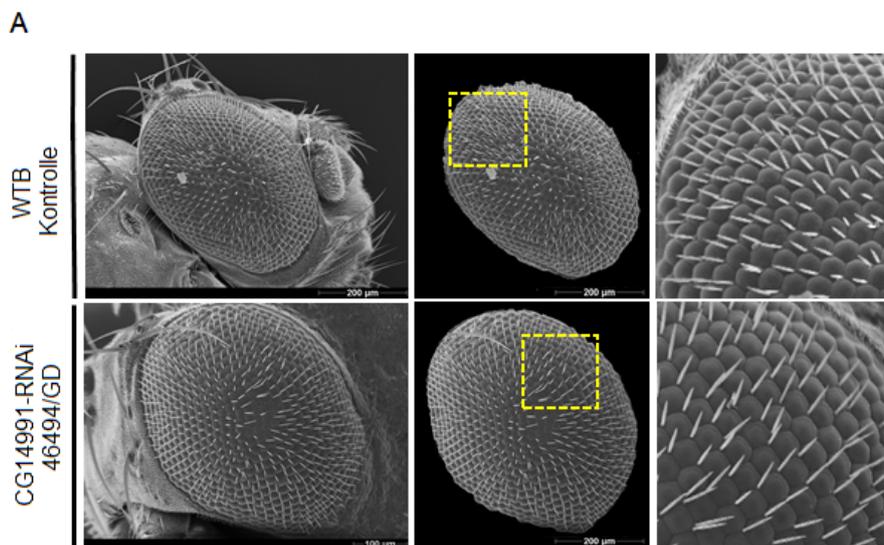


**Abbildung 57: Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens NPR3.** (A) Im überwiegenden Maße sind einzelstehende Borsten und klar abgegrenzte Ommatidien erkennbar, was dem charakteristischen Erscheinungsbild des wildtypischen Facettenauges entspricht. Wenige doppeltstehende Borsten sind zu verzeichnen. (B) Es besteht kein signifikanter Unterschied in dem Aufkommen von Fehlstellungen im Vergleich zum Wildtyp Berlin.

Genotypen: *GMR-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG2272-RNAi* (33518/GD)  
KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 200 µm, Probenanzahl: 5 (n = 5), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), n.s. = nicht signifikant

### 3.5.5. FERMT2

Nach KD des Homologs für das Gen FERMT2 fallen im Rasterelektronenmikroskop zusammenstehende Augenfehlstellungen auf, die in ihrem Ausmaß jedoch limitiert sind (Abbildung 58 A). Neben vereinzelt Borsten, charakterisiert sich das Facettenauge im überwiegenden Maße durch ein homologes Erscheinungsbild. Dieses ist geprägt von klar getrennten Ommatidien, die dem Wildtyp gleichen und Borsten, die nur geringgradig alleinstehend sind. Die Auszählung von 5 Augen ergibt eine Gesamtzahl von 51 Fehlstellungen. Schlussfolgernd daraus besteht im Vergleich zur Positivkontrolle eine geringgradige Signifikanz (Abbildung 58 B).

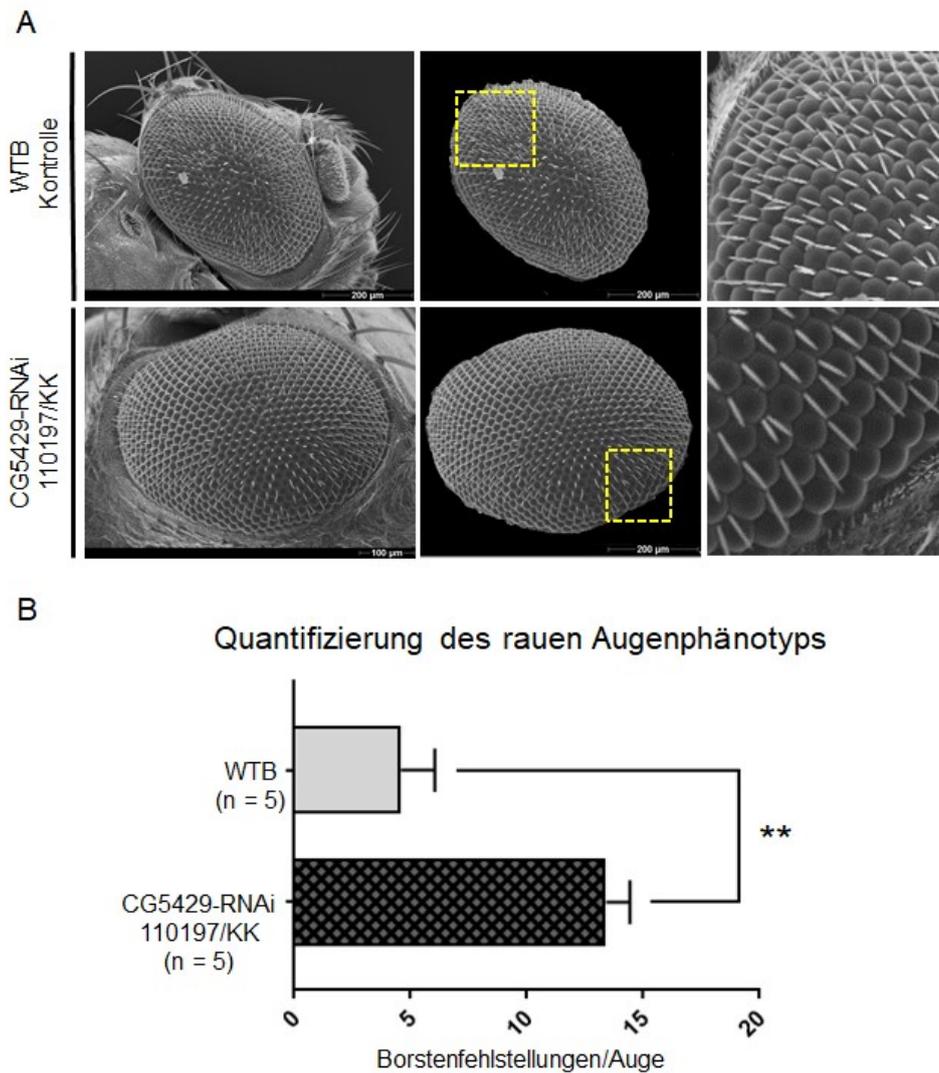


**Abbildung 58: Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens FERMT2.** (A) Es zeigen sich vereinzelt zusammenstehende Borsten, wobei der Großteil in einzelstehender Ausprägung zu sehen ist. Die Morphologie der Ommatidien weicht nicht von jener der Positivkontrolle ab. (B) Die Quantifizierung bestätigt eine geringgradige Signifikanz gegenüber dem WTB.

Genotypen: *GMR-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG14991* (46494/GD)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 200  $\mu\text{m}$ , Probenanzahl: 5 (n = 5), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*: 0,01 bis 0,05

### 3.5.6. BECN1

Das Facettenauge nach KD von CG5429 weist vollständig voneinander getrennte Ommatidien auf, die in ihrer gleichmäßigen Ausbildung der Positivkontrolle entsprechen (Abbildung 59 A). Das Auge erscheint in der Gesamtheit unverändert, weist jedoch Bereiche zusammenstehender Borsten auf. Die Quantifizierung von insgesamt 5 Facettenaugen ergibt eine Gesamtzahl von 67 Fehlstellungen. Im Vergleich zum wildtypischen Auge ist die Anzahl an Fehlstellungen signifikant verändert (Abbildung 59 B).

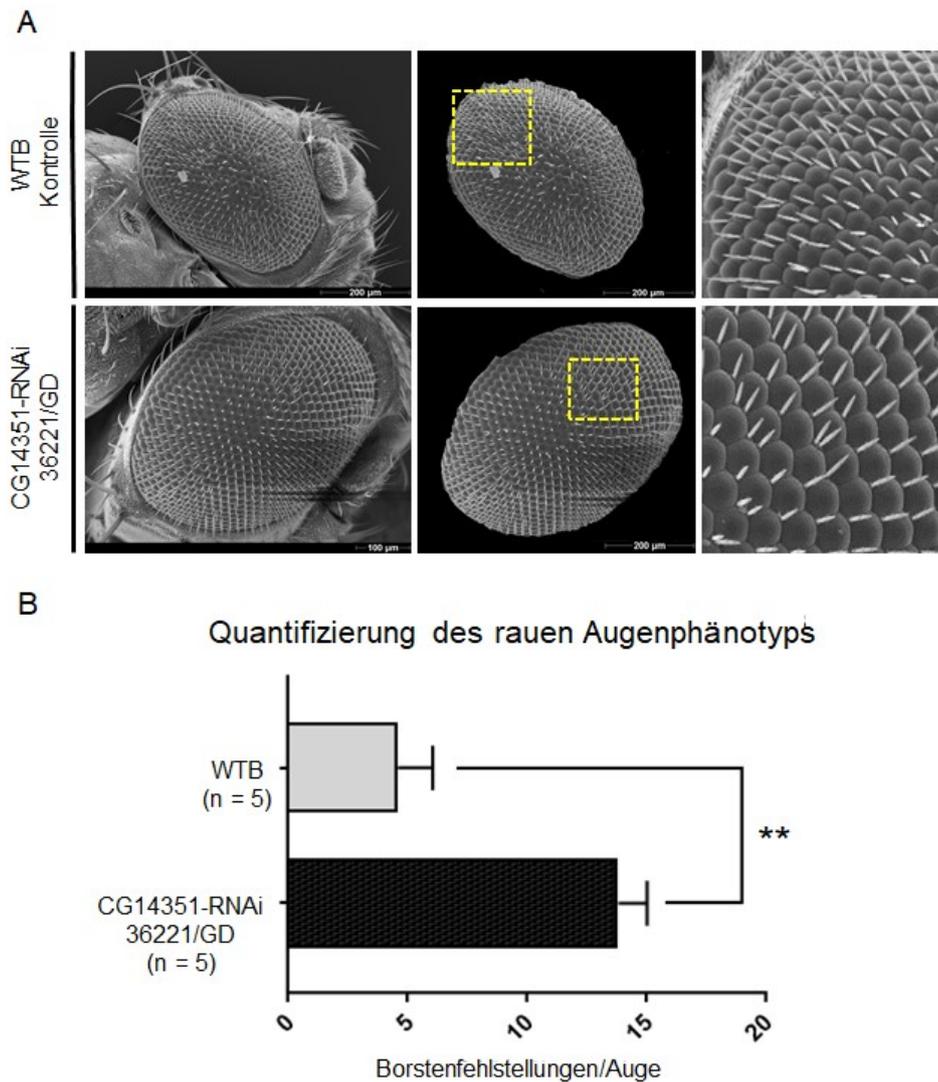


**Abbildung 59: Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens BECN1.** (A) Das Facettenauge charakterisiert sich durch eine Vielzahl zusammenstehender Borsten. In der Gesamtheit erscheint das Auge in der Ausprägung seiner Ommatidien unverändert im Vergleich zum wildtypischen Auge. (B) Die Quantifizierung bestätigt das Bestehen einer signifikant erhöhten Anzahl an Borstenfehlstellungen pro Auge.

Genotypen: *GMR-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG5429-RNAi* (110197/KK)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 200  $\mu\text{m}$ , Probenanzahl: 5 ( $n = 5$ ), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*: 0,001 bis 0,01

### 3.5.7. VASN

Die das Facettenauge bildenden Ommatidien erscheinen nach KD des Homologes für VASN morphologisch unauffällig. Identisch mit der Positivkontrolle, sind die Ommatidien klar voneinander abgegrenzt. Auffällig sind die Borstenfehlstellungen, die einzelne Bereiche des Auges betreffen (Abbildung 60 A). Dieser subjektive Eindruck kann durch die Quantifizierung von 5 Facettenaugen signifikant bestätigt werden (Abbildung 60 B).



**Abbildung 60: Rasterelektronenmikroskopie des Auges nach KD des Gens VASN.** (A) Übersicht- und Nahaufnahme des Facettenauges zeigen unverändert ausgebildete Ommatidien. Auffällig sind Bereiche des Auges, die sich durch zusammenstehende Fehlbildungen der Borsten charakterisieren. (B) Im Vergleich zum Auge des Wildtyps, sind die Fehlstellungen der CG14351-RNAi signifikant erhöht.

Genotypen: *GMR-Gal4* (2) → *Wildtyp<sup>Berlin</sup>* (WTB), *Pros-Gal4* (2) → *UAS-CG14351-RNAi* (36221/GD)  
 KD: Knockdown, RNAi: RNA Interferenz, Größenbalken: 200 µm, Probenanzahl: 5 (n = 5), Fehlerbalken bezeichnet SEM: Standardfehler (Standard Error of the Mean), \*\*: 0,001 bis 0,01

## 4. Zusammenfassung der generierten Ergebnisse

Die generierten Ergebnisse können abschließend der nachfolgenden Tabelle entnommen werden. Hierbei werden die jeweiligen Befunde der insgesamt sechs durchgeführten Experimente für die einzelnen Gene zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung des Ergebnisteils.

GEN	Filtrationsleistung mittels Albuminaufnahme	Immunfluoreszenzfärbung Nephrozyt	REM Nephrozyt	Immunfluoreszenzfärbung Oberfläche Nephrozyt	TEM Schlitzmembran Nephrozyt	REM Facettenauge
ITM2B	deutlich reduziert	deutlich reduziert, vereinzelt einkernige Zellen	Zellen deutlich kleiner, Zellen agglutiniert	Fingerabdruckähnliches Muster unterbrochen	Abschnittsweise fehlend, unterhalb gelegene Lakunen fusioniert	Milder Augenphänotyp, Fehlstellungen
MERTK	deutlich reduziert	deutlich reduziert, viele einkernige Zellen	Zellen deutlich kleiner	Fingerabdruckähnliches Muster unterbrochen	Schlitzmembranen deutlich reduziert	Milder Augenphänotyp Fehlstellungen
NPR3	reduziert	deutlich reduziert, viele einkernige Zellen	Zellen deutlich kleiner bzw. größer	Fingerabdruckähnliches Muster unterbrochen	Schlitzmembranen reduziert	n.s. = nicht signifikant
FERMT2	deutlich reduziert	deutlich reduziert	Zellen deutlich kleiner, Zellen agglutiniert	Fingerabdruckähnliches Muster unterbrochen	-	Milder Augenphänotyp, Fehlstellungen
BECN	deutlich reduziert	deutlich reduziert	Zellen deutlich kleiner bzw. größer	Fingerabdruckähnliches Muster unterbrochen	Anzahl deutlich reduziert, verkleinerte Lakunen, akkumulierte Endosomen	Milder Augenphänotyp, Fehlstellungen
VASN	deutlich reduziert	deutlich reduziert	Zellgröße schwankt, Zellen agglutiniert	Fingerabdruckähnliches Muster unterbrochen	Anzahl reduziert, unterhalb gelegene Lakunen fusioniert	Milder Augenphänotyp, Fehlstellungen

## V. DISKUSSION

Das NS stellt einen Symptomenkomplex dar, der durch die vorherrschende Anwesenheit von Proteinurie geprägt ist und die meisten glomerulären Erkrankungen in ihrem Bestehen begleitet. Die Ursachen für den Verlust von Proteinen über den menschlichen Nierenfilter sind breit gefächert. Der Podozyt und die sich zwischen den Fußfortsätzen ausspannende Schlitzmembran sind in ihrer Stabilität und Funktionalität Grundvoraussetzung für die nahezu proteinfreie Urinproduktion. Gemeinsam bilden sie eine Architektur, die in ihrer Funktionsfähigkeit vielmehr dynamisch als statisch agiert (Huber und Benzing, 2005; Grahammer et al., 2013). Instabilität, Loslösung sowie Verlust jener Strukturen stellen Prozesse dar, die auf molekularen Unstimmigkeiten und Veränderungen in der Signaltransduktion beruhen. Da der Podozyt und die Schlitzmembran eine dynamische Einheit verkörpern, kann die Initiierung der Proteinurie sowohl auf der Labilität des einen, als auch des anderen Bausteins beruhen. Das teilweise oder vollständig fehlende Ansprechen von Steroiden erschwert die therapeutischen Erfolgsaussichten und erleichtert die Progression zur Nierenerkrankung im Endstadium. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einerseits in Form von ITM2B, MERTK und NPR3 potentielle Interaktoren der Schlitzmembran zu untersuchen. Genmutationen von Elementen der Schlitzmembran führen zum Bruch der Filterbarriere mit der Folge klinisch manifester Proteinurie. Andererseits bestand die Intention darin, mit den Genkandidaten FERMT2, BECN1 und VASN die potentielle Bedeutung des Einflusses biologischer Zellprozesse für den Podozyten und folglich die Filtrationsbarriere zu beleuchten.

Mit der Absicht einen möglichst hohen Verwandtschaftsgrad der humanen Genkandidaten zu denen *Drosophilas* zu erzielen, wurden einleitend bioinformatische Analysen durchgeführt. Ausgewählt wurden Homologe, die sich als maximal adäquat erwiesen. Mithilfe des Albuminaufnahme-Experimentes lag die Absicht im Detektieren einer potentiellen Funktionsstörung der Podozyten-ähnlichen Nephrozyten *Drosophilas* (Weavers et al., 2009). Im Falle einer signifikant verringerten Fluoreszenz als Widerspiegelung einer verminderten Filterleistung wurde das Gen bzw. das Protein in die Prozedur einer stufenweisen Analyse aufgenommen. Dieses beinhaltete eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre, das Homolog zum humanen Neph1. Ziel dieser Untersuchung war es, die Verminderung Kirres als molekularen Bestandteil des Nierenfilters zu detektieren und mögliche Interaktionen des untersuchten Proteins mit Filterkomponenten in Betracht zu ziehen. Im zweiten Schritt erfolgte die Visualisierung der Morphologie der Filterzellen mittels REM. Der Fokus wurde im nächsten Schritt auf die finale Betrachtung der Ultrastruktur der Filtrationsbarriere gelegt. Der Untersuchung mittels TEM wurde eine Anfärbung der Nephrozytenoberfläche vorgeschaltet, dass die Darstellung der Schlitzmembran bereits im

Konfokalmikroskop erlaubt. Diese Methode stellt insofern eine Vorstufe zur aufwendigeren TEM dar, da eine erste Beurteilung direkt an die REM angeknüpft werden kann. Mit dem Ziel die Auswirkungen des KD auf die Schlitzmembranmoleküle auch in einem weiteren Organsystem zu untersuchen, dessen Entwicklung ebenfalls von jenen Komponenten abhängt, erfolgte im finalen Schritt die REM-Darstellung des Facettenauges.

## **1. Diskussion der potentiellen Interaktoren der podozytären Schlitzmembran des Nierenfilters**

### **1.1. ITM2B**

Für das erste aus dem entschlüsselten Proteom des Nierenfilters hervorgehende Genprodukt Integrales Membranprotein 2B wurde im Rahmen der einleitenden Homologsuche das Gen CG3662 detektiert. Zum Zeitpunkt des Abgleiches charakterisierte sich CG3662 in Form bester Punktzahl dadurch, dass kein anderes Homolog in *Drosophila* einen höheren Verwandtschaftsgrad zum humanen Gen aufweist und wurde aus diesem Grund für die nachfolgenden Experimente ausgewählt. Genmutationen von ITM2B im Menschen führen zu einer von der Norm abweichenden Spaltung des Proteins in neurotoxische Amyloide, die  $\beta$ -Strukturen formen und die Demenz verursachenden Oligomer- und Fibrillenablagerungen bilden (Vidal et al., 1999; Vidal et al., 2000). Untersuchungen im *Drosophila*-Modell für Britische und Dänische Demenz konnten zeigen, dass diese Amyloide neurotoxische Wirkungen hervorrufen (Marcora et al., 2014). Akkumulierende Ablagerungen, die eine Zerstörung der Gewebearchitektur nach sich ziehen, können prinzipiell zur Schädigung der Funktion eines jeden Organs führen. Als sekundäre Ätiologie des NS ist die Erkrankung der Amyloidose neben Diabetes mellitus führend auf dem Bereich stoffwechselbedingter Pathologien der Niere. Da ITM2B eine starke Expression in der Niere aufzeigt (Vidal et al., 1999), ist es denkbar, dass es auch auf Ebene des Nierenfilters zu entsprechenden toxischen Ablagerungen kommt, die die intakte Filtrationsbarriere beeinträchtigen.

Das Integrale Membranprotein 2B führt mithilfe des Enzyms ADAM10 zur Freisetzung der sogenannten BRICHOS-Domäne. Diese Domäne verfügt über Disulfidbrücken, die in Vorläuferproteinen für das Sortieren von Peptiden im Rahmen von sekretorischen Signalwegen verantwortlich sind (Krömer et al., 1998; Glombik et al., 1999). Die BRICHOS-Domäne ist *in vitro* zudem für den intrazellulären Transport des Proteins in Richtung Zelloberfläche und für deren beständige Lokalisation in der Plasmamembran von Bedeutung (Tsachaki et al., 2011). Es ist vorstellbar, dass der KD von ITM2B mit einem Fehlen dieser Rekrutierung in Richtung Plasmamembran einhergeht. Im Falle dessen, dass das Protein als

potentieller Interaktor der Schlitzmembran agiert, würde eine verminderte Präsenz entsprechende Veränderungen der Filtrationsbarriere nach sich ziehen. Um die Filterzellen auf diese beeinträchtigende Beeinflussung hinweg zu untersuchen, erfolgte die Anwendung des Albuminaufnahme-Experimentes. Die Filtrationsleistung nach KD von CG3662 fiel durch eine massive Reduktion auf. Mittels Quantifizierung konnte die subjektive Verminderung filtrierten Albumins in Form hoher Signifikanz objektiviert werden. Es ist bekannt, dass die Reduktion des für den Aufbau der Schlitzmembran *Drosophilas* wichtigen Elements Kirre zu einer schweren Verminderung der Anzahl an Nephrozytenschlitzmembranen führt (Weavers et al., 2009). Als Resultat der Antikörperfärbung ergab sich eine deutliche Schmälerung der Zirkumferenz als Folge einer reduzierten Anzahl Kirres. Durch diese starke Reduktion wird der Verdacht eines Zusammenspiels mit Neph1, aber auch mit anderen Elementen des Nierenfilters, bekräftigt. Interessant wären an diesem Punkt weiterführende Untersuchungen zu weiteren Interaktionspartnern, wie bspw. Sns. Diese Interaktion von Neph1 und Nephrin geht wie ausführlich in der Einleitung beschrieben, über die Schlitzmembran hinaus und ist für die intakte Entwicklung des Facettenauges verantwortlich (Bao et al., 2010). Eine alleinige Reduktion von Kirre (Neph1) führt zu geringgradigen Veränderungen des Erscheinungsbildes des Auges (Bao et al., 2010). Die vorliegenden REM-Aufnahmen nach KD von ITM2B zeigen milde Defekte des Auges in Form partieller Verschmelzungen der Ommatidien sowie einer erhöhten Anzahl an Borstenfehlstellungen. Diese Ergebnisse in Verknüpfung mit der starken Reduktion der Kirre-Immunfluoreszenzfärbung unterstreichen die Annahme, dass das Integrale Membranprotein 2B mit dem Neph1 Homolog interagiert. Durch diese in zwei unterschiedlichen Organsystemen der Fliege auftretenden Beobachtungen kann auf eine funktionelle Konservierung von ITM2B geschlossen werden. Da Kirre auch die Fusion von Nephrozyten vermittelt, daraus normalerweise zweikernige Zellen resultieren und ein Verlust mit einem erhöhten Auftreten einkerniger Zellen einhergeht (Zhuang et al., 2009), ist die Betrachtung der REM-Aufnahmen besonders interessant. Nach KD zeigen sich auffällig kleine Zellen, die ein Anzeichen ausbleibender Fusion darstellen, sowie agglutinierte Zellen, die für eine nicht vollständig abgeschlossene Verschmelzung sprechen. Beide Resultate bekräftigen ein Fehlen von Kirre, decken sich mit den reduzierten Messungen aus Albuminaufnahme und Immunfluoreszenzfärbung und sprechen erneut für eine bestehende Interaktion. Vereinzelt im Rahmen der Anfärbung auffindbare einkernige Zellen unterstreichen zudem die Annahme einer Reduktion Kirres. Zhuang et al. (2009) beschreiben die Reduktion an Schlitzmembranen nach Fehlen von Kirre, was sich mit den Untersuchungen der Oberflächenanfärbung und der TEM deckt. Nach KD zeigt die Immunfluoreszenzfärbung der Oberfläche der Nephrozyten ein abwechselndes Muster aus Fingerabdruckgleichen, parallelen Linien und zahlreichen einzelnen Punkten. Sns und Kirre, Orthologe zu Nephrin und Neph1 (Zhuang et al., 2009) kolokalisieren in Form eines Fingerabdruckes (Hermle et al., 2017). Bei Fehlen einer der

beiden Interaktionspartner zeigt die Oberfläche ein punktförmiges Muster (Hermle et al., 2017). Der Wegfall von Nephrin führt zu massiver Proteinurie (Putala et al., 2001) und das Fehlen von Nephrin, das verantwortlich ist für die strukturelle Aufrechterhaltung der Schlitzmembran, verursacht das NS (Donoviel et al., 2001). Die Bereiche, die einem Fingerabdruck gleichen, sprechen in den vorliegenden Ergebnissen für das Vorhandensein ausgebildeter Schlitzmembranen, wohingegen die punktförmigen Bereiche auf einen Verlust der Integrität der Filtrationsbarriere hinweisen. Da die Immunfluoreszenzfärbung einen ersten Eindruck über die Intaktheit der Schlitzmembran ermöglicht, lag das nachfolgende Ziel in der Darstellung via Transmissionselektronenmikroskopie der Filterzellen nach KD. Interessanterweise decken sich die Ergebnisse mit dem zuvor beschriebenen gemischten, unregelmäßigen Muster der Nephrozytenoberfläche. Abschnittsweise ist die Ultrastruktur konserviert, zeigt sich jedoch streckenweise vollständig fehlend. Zusätzlich fällt auf, dass dort wo die Anzahl an Schlitzmembranen reduziert ist, deutlich verschmolzene Membraneinstülpungen vorliegen. Dieser Befund bekräftigt fortlaufend, dass Kirre nach ITM2B KD reduziert ist, da der Verlust von Kirre neben dem Fehlen von Schlitzmembranen auch in einer Auflösung der Labyrinthgänge resultiert (Weavers et al., 2009). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die zusammenpassenden Ergebnisse aus Oberflächenanfärbung und TEM mit der funktionellen Reduktion der Filtrationsleistung decken. Das Mischergebnis aus konservierten und deutlich reduzierten Schlitzmembranen könnte erklären, warum die Filtration erheblich reduziert ist, eine geringe Menge jedoch weiterhin von den Nephrozyten filtriert wird.

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der vorliegenden Ergebnisse könnte darin liegen, dass Genveränderungen zudem durch alternatives Spleißen zu langen und kurzen Versionen des Proteins (ITM2BL, ITM2BS) führen können. Es ist beschrieben, dass ITM2BS in IL-2 stimulierten Zellen die Apoptose initiiert und somit ein Regulator des Zelltodes ist (Fleischer et al., 2002; Fleischer und Rebollo, 2014). Die im Rahmen der Apoptose folgende Schrumpfung der Zelle könnte die auffällig kleinen Zellen in der REM-Darstellung der Nephrozyten, die Beeinträchtigung der Filterfunktion und die Reduktion an Schlitzmembranen erklären. ITM2B ist in der Maus auf dem Chromosom 14 lokalisiert. Interessanterweise befinden sich zahlreiche proapoptotische Proteine ebenfalls auf dem 14. Chromosom, teilweise sogar auf dem gleichen Locus. Aufgrund der hohen genetischen Ähnlichkeit des Homologes CG3662 für ITM2B wären weiterführende Experimente von großem Interesse, um Antwort darauf zu erhalten, ob diese in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse sowohl auf *Drosophila* als auch auf die Niere übertragen werden können. Dies gilt auch für die Studie aus dem Jahre 2018, in der das Interaktom von ITM2B im Gehirn des Mausmodells identifiziert wurde. Insgesamt 511 Interaktoren von ITM2B wurden entschlüsselt, wovon knapp 50% für die Differenzierung von Neuronen verantwortlich sind. Interessanterweise zeigte sich, dass der Großteil dieser

Interaktoren zytoskeletale Proteine, Transporterproteine und Membrantransportproteine beinhaltet, was die Bedeutung von ITM2B für die neuronale Differenzierung bekräftigt (Martins et al., 2018). Neuronen und Podozyten haben gemeinsam, dass es sich bei ihnen um ausdifferenzierte Zellen handelt. Es ist möglich, dass ITM2B im gleich hohen Maße auf dem Bereich des Nierenfilters über eine Bandbreite an Interaktoren verfügt, die unter anderem für die Differenzierung verantwortlich sind und dies die funktionellen Einschränkungen der Filtrationsleistung nach KD erklärt. Eine potentielle Interaktion, insbesondere mit den Homologen zu Nephrin und Neph1, ist sehr wahrscheinlich und würde wie obig beschrieben erklären, warum Kirre in der Antikörperfärbung erheblich reduziert ist und das Facettenauge *Drosophila*s entwicklungsbedingte Fehlstellungen aufweist. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Augen nach KD zeigen unregelmäßige Trennungen der Ommatidien sowie Borstenfehlstellungen. Die Separation der Ommatidien ist essentiell für das Sehvermögen *Drosophila*s, vergleichbar mit der Notwendigkeit der intakten Netzhaut für das Augenlicht des Säugetieres. In Untersuchungen an Patienten mit retinaler Dysfunktion und einem fortschreitenden Verlust des Sehvermögens konnte eine Missense-Mutation von ITM2B detektiert werden (Feng et al., 2002). Überwiegend in Retina- und Ganglienzellen auffindbar kolokalisiert das Integrale Membranprotein 2B ebenfalls mit dem bereits aus der Alzheimererkrankung bekannten Interaktor APP. Die Autoren postulieren, dass eine Assoziation mit FBD und FDD, in denen längere Amyloidfragmente ursächlich sind, denkbar ist, die Missense-Mutation jedoch für einen Retina-begrenzten Phänotyp verantwortlich ist (Audo et al., 2014). Es ist denkbar, dass Mutationen des *Drosophila*-Homologes zu ähnlichen Ablagerungen fehlexprimierter Proteine führen, die einen Einfluss auf die adäquate Entwicklung des Facettenauges haben und somit den vorliegenden Augenphänotyp aus einer weiteren Sichtweise rechtfertigen.

In der vorliegenden Arbeit konnte für das Gen ITM2B anhand mehrerer Methoden eine Beeinträchtigung der Filtrationsleistung und der Architektur der Schlitzmembran nach KD im *Drosophila*-Modell demonstriert und bewiesen werden. Eine Weiterarbeit im Mausmodell ist vielversprechend und insofern von Bedeutung, die Stellung als Glied im Nierenfilter auf die Entstehung glomerulärer Störungen hinweg zu untersuchen, um daran anknüpfend Türen zu innovativen Patientenspezifischen Therapieansätzen zu öffnen.

## 1.2. MERTK

Das Gen MERTK kodiert für das nächste Protein, das aus dem durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Florian Grahammer detektierten Proteoms potentieller Interaktoren des Nierenfilters hervorgeht. Prinzipiell ist die hohe Expression der Tyrosinkinase Mer in Untersuchungen im Mausmodell auf mRNA-Basis (Graham et al., 1994) sowie auf

Proteinebene (Behrens et al., 2003) beschrieben. Der bioinformatische Abgleich für das humane Gen resultierte in dem Vorschlag für das *Drosophila*-Homolog CG2272. Die Suche nach kommerziell erhältlichen RNAi-Linien ergab die verfügbaren Linien 33518/GD und 106449/KK, die sich in ihrem Insertionsort im Genom sowie in der verwendeten Sequenz unterscheiden. Um beide Linien auf ihre Funktion hinweg zu untersuchen, erfolgte für das MERTK Homolog die Bestellung zweier RNAi-Linien. Interessanterweise zeigte die einleitende Albuminaufnahme für beide Linien eine vergleichbar starke Reduktion. Da für alle auffälligen Gene die Durchführung der Untersuchungen anhand einer Fliegenlinie erfolgte, musste entschieden werden, mit welcher RNAi-Linie fortgefahren wird. Aufgrund dessen, dass die Linien gleichermaßen in ihrer Filtration minimiert waren, wurde ohne weitere Begründung 33518/GD ausgewählt.

In der Literatur ist MERTK als Rezeptor-Tyrosinkinase aus der Familie der Proteinkinasen beschrieben (Lai und Lemke, 1991). Rezeptor-Tyrosinkinasen sind in der Zellmembran lokalisierte Rezeptoren, die in ihrer intrazellulären Domäne über das Enzym der Tyrosinkinase verfügen und für die Phosphorylierung von Tyrosinresten von Proteinen verantwortlich sind. Dadurch werden Signalwege aktiviert, die wiederum in der Zelle wichtige Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Migration vermitteln (Kolibaba und Druker, 1997). Interessanterweise verfügen Nephrin und Neph1 als elementare Proteine der Schlitzmembran in ihrer kurzen zytoplasmatischen Domäne über Tyrosinreste, deren Bindung entscheidend für die Signalübertragung im Podozyten und folglich für dessen Funktion und Überleben ist (Benzing, 2004). Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass MERTK genau diese Tyrosinreste bindet und daraus resultierend eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Kommunikation mit dem Podozyten und folglich der Integrität der Schlitzmembran einnimmt. Mit dem Ziel, diese Interaktion zu untersuchen, erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre, die sowohl subjektiv als auch quantitativ erheblich verringert war. Dieses Ergebnis lässt auf einen potentiell verminderten Gehalt an Kirre bzw. Neph1 in der Filtrationsbarriere schließen. Bereits intensiv studierte *in vivo* und *in vitro* Beispiele für die Bedeutung von Tyrosinkinasen für Nierenerkrankungen stellen der Insulinrezeptor und der IGF-Rezeptor in der Entwicklung der Diabetischen Nephropathie dar. Im Jahre 2003 wurde fyn als eine für die Phosphorylierung Nephrins verantwortliche Tyrosinkinase entschlüsselt (Verma et al., 2003), die die Podozytenbindung und die Signalübertragung Nephrins nachweislich erhöht (Li et al., 2004). Die Ausschaltung von fyn im Mausmodell geht mit einer signifikanten Verringerung der Phosphorylierung Nephrins einher und hat Veränderungen der Fußfortsätze und Proteinurie zur Folge (Verma et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit diesen Konsequenzen für die Intaktheit der Barriere sowie für die Funktionalität der Filterfunktion im Mausmodell nach Ausschaltung

der Phosphorylierung. Es ist denkbar, dass eine verringerte Phosphorylierung von Kirre (Neph1) und Sns (Nephrin) auch im Fliegenmodell eine herabgesetzte Signalübertragung und folglich eine Instabilisierung der Filtrationsfunktion zur Folge hat. Dies würde die geringe Albuminaufnahme erklären. Die reduzierte Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre könnte dafürsprechen, dass die Tyrosinkinase im stärkeren Maße Neph1 phosphoryliert. Dies kann in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden, da keine Antikörperfärbung gegen Sns durchgeführt wurde. Es erscheint möglich, dass die reduzierte Phosphorylierung von Neph1 und Nephrin die Signalwege und die Architektur derart beeinflusst, dass eine Störung in der Filtration die Folge ist. Die Bedeutung der beiden Schlitzmembranelemente für die Entstehung des NS ist in der Literatur weitreichend bestätigt (Putala et al., 2001; Donoviel et al., 2001). Dass der KD des MERTK Homologes auch Auswirkungen auf die Entwicklung eines weiteren Organsystems nach sich zieht, konnte anhand der REM-Untersuchung des Facettenauges bewiesen werden. Abschnittsweise nicht vollständig voneinander abgegrenzte Ommatidien lassen den Verdacht aufkommen, dass eine Beeinflussung der Entwicklung des Facettenauges durch die Tyrosinkinase besteht. Die zahlreichen Borstenfehlstellungen untermauern das Vorhandensein eines milden Augenphänotyps. Es ist möglich, dass eine verringerte Phosphorylierung die Interaktion in so weit beeinträchtigt, dass eine störungsfreie Ausbildung verhindert wird und Missbildungen, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnten, die Folge sind. Gemeinsam mit der Anfärbung sprechen die Ergebnisse für einen Einfluss auf die Interaktion durch das Protein. Kirre orchestriert die Fusion der Filterzellen *Drosophilas* und es entstehen als Ergebnis zweikernige Nephrozyten (Zhuang et al., 2009). Die REM zeigte eine auffällige Menge an kleinen Zellen. Bereits in der Immunfluoreszenzfärbung fiel eine hohe Anzahl einkerniger Nephrozyten auf, die einen ersten Hinweis auf eine ausbleibende Fusion gaben. Die Verknüpfung der identischen Beobachtungen aus zwei angewandten Versuchen untermauert das Vorhandensein einer gestörten Verschmelzung. In Verbindung mit den Resultaten aus Antikörperfärbung und Mikroskopie des Auges konnte die postulierte Beeinflussung Kirres durch die Tyrosinkinase in der vorliegenden Arbeit bekräftigt werden.

Das Fehlen von Kirre wirkt sich auf die Fusion der Nephrozyten, aber auch auf den Gehalt an Schlitzmembranen aus (Zhuang et al., 2009). Um die Auswirkungen des KD auf die Schlitzmembran *Drosophilas* zu visualisieren, erfolgte die Anfärbung der Nephrozytenoberfläche sowie die Anfertigung von TEM-Aufnahmen. Beginnend mit der Betrachtung der Zelloberfläche fiel ein die gesamte Zelle umgebendes, gemischtes Muster auf. Die Immunfluoreszenzfärbung charakterisierte sich zum einen durch parallele Linien, die einen Fingerabdruck formen und den Eigenschaften der Positivkontrolle entsprechen. Unterbrochen wurde dieses Muster jedoch zum anderen durch mehrere Punkte.

Normalerweise kolokalisieren Sns und Kirre in Form eines Fingerabdruckes, der in dreidimensionaler Betrachtung die vollständige Zelle umgibt. Punktförmige Darstellungen stellen das Ergebnis des Fehlens eines der Schlitzmembranelemente dar (Hermle et al., 2017). Die punktförmigen Bereiche ließen den Verdacht aufkommen, dass die Integrität der Filtrationsbarriere verändert ist. In der tieferegreifenden Betrachtung mittels TEM zeigten sich Schlitzmembranen und darunter gelegene, unveränderte Lakunen, die in ihrer Ausbildung der Positivkontrolle entsprechen. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Abschnitten des Fingerabdruckähnlichen Musters. Diesen Beobachtungen entgegengesetzt, zeigten die TEM-Aufnahmen zahlreiche Abschnitte mit fehlenden Schlitzmembranen, die sich wiederum mit den punktförmigen Bereichen der Zelloberfläche deckten. Zusammenfassend sprechen diese Befunde für eine Veränderung der Filtrationsbarriere *Drosophilas* nach KD von MERTK und erklären, warum in dem einleitenden Versuch der Albuminaufnahme eine Verminderung in der Filtrationsleistung verzeichnet wurde. Es wären Untersuchungen interessant und notwendig, in denen die Auswirkungen auf die Integrität der Filtrationsbarriere über einen längeren Zeitraum hinweg untersucht würden.

Welche klinischen Folgen der funktionelle Wegfall von Tyrosinkinase auf die Nierenfiltration hat, ist zahlreich in Literatur auf dem Gebiet der Onkologie und Nephrologie beschrieben. Tyrosinkinaseinhibitoren, die therapeutisch für die Behandlung diverser maligner Tumore erfolgreich eingesetzt werden, verursachen in einer Vielzahl von Patienten das NS. Interessanterweise kommt es nach Absetzen der Medikation zu einem Ausklingen, was den Zusammenhang zwischen Tyrosinkinaseinhibition und Proteinurieauslösung bekräftigt.

Darüber hinaus ist es denkbar, dass der Wegfall der Tyrosinkinase auch Auswirkungen auf die Apoptose im Podozyten hat. Es ist bekannt, dass MERTK in myeloiden Zellen durch apoptotische Phagozytose sowie durch Sekretion antiinflammatorischer Zytokine zur Gesunderhaltung von Gewebe beiträgt (Lemke et al., 2008; Rothlin et al., 2007; Cohen et al., 2002; Lu und Lemke, 2001). Inhibition von Proteinen der TAM-Familie, zu der MERTK gehört, führen folglich zu chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (Lu und Lemke, 2001). Diese Hauptfunktionen korrelieren mit Untersuchungen, in denen milde bis schwerwiegende Lupus-ähnliche autoimmune Funktionsstörungen bei Wegfall der Tyrosinkinase verzeichnet werden konnten (Cohen et al., 2002). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass MERTK KO-Mäuse unter entzündlichen Bedingungen ein hohes Maß an proinflammatorischen Mediatoren (IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ ) produzieren (Shao et al., 2011; Guttridge et al., 2002; Camenisch et al., 1999). Zahlreiche Studien belegen das Vorhandensein des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  in der Pathogenese glomerulärer Nierenschädigung. Ergebnisse aus Studien des Gehirn *Drosophilas* zeigen, dass MERTK auch in der Taufliège Bedeutung in der Pathologie von Signalwegen der Phagozytose hat. Im

Fliegenhomolog zu MERTK (CG2272), jenes Homolog, das auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, konnte im Rahmen axonaler Schäden ein durch MERTK und weitere Komponenten initiiertes Signaltransduktionsweg entschlüsselt werden, der die Phagozytose aktiviert. Ein KD dieses Komplexes führt in Gliazellen zu einer signifikanten Dämpfung der Säuberung durch Phagozytose (MacDonald et al., 2013). Es kann postuliert werden, dass MERTK auch im Bereich der Schlitzmembran *Drosophilas* ähnliche mit Phagozytose gekoppelte Signaltransduktionswege initiiert und ein Wegfall der Funktionalität Auswirkungen auf die Intaktheit der Filtrationsleistung hat. Es wäre interessant, ob diese Beobachtungen in zukünftigen Untersuchungen auf die Nephrozyten *Drosophilas* übertragbar sind. Neben den bereits beschriebenen Erkenntnissen in der Verbindung zwischen MERTK und Phagozytose, konnte auch im Organsystem des Auges gezeigt werden, dass die Tyrosinkinase an der Regulierung der Phagozytose beteiligt ist. Im Pigmentepithel der Retina übernimmt das Protein entsprechende Säuberungsfunktion und Mutationen von MERTK führen zur Retinitis pigmentosa (RP) (Feng et al., 2002). Es ist fraglich, inwiefern auch im Facettenauge *Drosophilas* wichtige Phagozytoseaufgaben übernommen werden und ob eine Fehlfunktion die Entwicklung des Auges beeinflussen würde. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen Zellen des Gehirns und des Auges und aufgrund der Tatsache, dass MERTK in *Drosophila* Gliazellen Phagozytosefunktion einnimmt (MacDonald et al., 2013), wären Untersuchungen zur Reinigungsfunktion durch die Tyrosinkinase im Auge vielversprechend. Entsprechende Befunde würden den Augenphänotyp nach KD erklären. Es kann aus dem Untersuchungsergebnis der vorliegenden Arbeit prinzipiell geschlossen werden, dass der KD im Facettenauge zu morphologischen Veränderungen führt. Fortführende Experimente sind jedoch notwendig, um ein klareres Verständnis darüber zu erlangen, inwiefern das Protein exakt mit Kirre und Sns im Laufe der Entwicklung des Auges und auch der Schlitzmembran interagiert.

Untersuchungen zur Rolle von MERTK bezüglich chronischer Nierenerkrankungen und deren Entwicklung und Fortschreiten zeigten im Mausmodell, dass KO-Tiere bei induzierter nephrotoxischer Nephritis eine deutlich reduzierte Protektion besitzen. Folgen waren erhöhte Mortalität, hochgradige Nephritiden sowie eine rapide hochgradige Proteinurie, wohingegen die Tiere mit erhaltener MERTK-Funktion einen nur langsam fortschreitenden Krankheitsverlauf mit stufenweise entstehender Proteinurie verzeichneten. Eine höhere Empfänglichkeit für Nierenschäden durch die fehlende Suppression körpereigener Abwehr durch MERTK und die demnach protektive Wirkung gegenüber dem Nierengewebe konnten durch diese Studien bestätigt werden (Shao et al., 2011). Schwerwiegende Glomerulonephritiden und erhöhte Mortalität bei KO-Mäusen konnten ebenfalls detektiert werden (Zhen et al., 2016). Lee et al. (2015) gelang es interessanterweise, nicht nur die

Expression zellfester, sondern auch freilöslicher MERTK-Rezeptoren (sMERTK) im Plasma von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zu ermitteln. Die Expression von MERTK in Monozyten war deutlich reduziert, wohingegen Werte der löslichen Variante signifikant erhöht waren. Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass funktionelle Defizite des Rezeptors MERTK maßgeblich an der Entstehung chronischer Entzündungen in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beteiligt sind (Lee et al., 2015). Diese bestehende Literatur befürwortet allgemein die Bedeutung von MERTK für die Niere und folglich auch für den Nierenfilter. Die Untersuchung langzeitiger Effekte auf die Filtrationsbarriere nach KD wären in diesem Zusammenhang interessant und erforderlich. Allgemein konnten die durchgeführten Experimente die Rolle von MERTK als potentiellen Interaktor des Nierenfilters fundieren. Die Ergebnisse befürworten weiterführende, Therapieorientierte Untersuchungen in weiteren Tiermodellen, die anhand der generierten Ansätze in *Drosophila* vielversprechend sind.

### 1.3. NPR3

Anhand des Natriumpeptidrezeptors C (NPRC), der durch das Gen NPR3 kodiert wird, erfolgte die Untersuchung des dritten potentiellen Schlitzmembraninteraktors. Für Experimente in *Drosophila* wurde das Genhomolog CG14877 ermittelt. Neben weiteren zwei Vorschlägen charakterisierte es sich zum Zeitpunkt der Analyse durch die höchste genetische Übereinstimmung und wurde schlussfolgernd daraus für die nachfolgenden Experimente ausgewählt. Das Resultat der Prüfung der Filterfunktionalität war eine deutliche Reduktion der Filtrationsmenge durch die Schlitzmembran der Nephrozyten. Inwiefern eine potentielle interagierende Rolle besteht, die die verminderte Filtrationsleistung begründen könnte, soll der nachfolgende auf aktueller Literatur basierende Erklärungsansatz veranschaulichen.

NPRC gehört zusammen mit NPRA und NPRB zu jenen Rezeptoren, die von Natriuretischen Peptiden (ANF, BNP, CNP) gebunden werden. Überwiegend wird NPRC von ANF (Atrialer Natriuretischer Faktor) gebunden (Suga et al., 1992). Vorrangig in den Myozyten des Atriums gebildet und in Form von Granula gespeichert, ist ANF in geringeren Konzentrationen stets in den Herzkammern und in der Niere präsent, wohingegen BNP und CNP neben dem kardialen Aufkommen, insbesondere im Gehirn von Bedeutung sind. Die Bindung von ANF an die Guanylcyclasen NPRA und NPRB geht mit einer cGMP-abhängigen Proteinkinase aktivierenden Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration einher. Als Folge dessen werden ATP-abhängige Calciumpumpen phosphoryliert, dadurch die Calciummenge intrazellulär verringert und die glatte Muskulatur relaxiert. Dieser wichtige vasodilatatorische Effekt stellt die Reaktion auf erhöhten Druck in der Herzhofwand dar (Edwards et al., 1988). Entgegengesetzt zu NPRA und NPRB, stellt NPRC, der in der vorliegenden Arbeit im KD untersucht wurde, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPKR)

dar, der durch Bindung von ANF nicht zu einer cGMP-Erhöhung führt. Hingegen wird postuliert, dass NPRC durch Bindung und anschließenden intrazellulären Abbau von ANF eine Beseitigungsfunktion und somit entgegenwirkenden Effekt hat (Maack et al., 1987; Almeida et al., 1989). Interessanterweise sind die dargestellten Regulationswege auf den Podozyten dank zahlreicher Studien der vergangenen Jahre übertragbar. Appliziertes ANF im Podozytenmodell der Ratte zeigt eine Verminderung der Intensität der F-Aktinfluoreszenz sowie eine Umsortierung von Aktin, was für die Initiierung der Relaxation des Podozyten bedingt durch cGMP-Signaltransduktion spricht (Sharma et al., 1992). Angiotensin II hat die gleiche Wirkung auf den Podozyten, wie auf den Tonus der glatten Muskulatur und die myokardiale Kontraktilität (Saleem et al., 2008). Auch im Podozytenmodell der Maus konnte die Reorganisation des Aktinzytoskeletts induziert durch Angiotensin II bestätigt werden (Hsu et al., 2008). Diese bestehenden entgegengesetzten Systeme aus Relaxation und Kontraktilität scheinen eine entscheidende Rolle für die Balance des Podozyten zu spielen, was nicht zuletzt bekräftigt wird durch einen daraus ermittelten potentiellen Ultrafiltrationskoeffizienten (Lewko et al., 2006). Kultivierte Podozyten zeigen ein hohes Maß an exprimierten endogenen Rezeptoren. Unter den G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Podozyten ist NPRC hierbei der stärkste Vertreter (Rinschen et al., 2016). Kommt es wie in der vorliegenden Arbeit zu einem KD des Gens NPR3 und folglich zu einer reduzierten Expression des NPRC Rezeptors, könnte geschlussfolgert werden, dass ANF-Peptide weniger Möglichkeit zur Bindung dieses Rezeptors haben, nicht abgebaut werden können und somit potentiell im Blutsystem akkumulieren und zirkulieren. Diese Annahme kann durch eine Studie im Mausmodell bekräftigt werden, in der Mutationen des Gens zu einer fehlenden Entfernung zirkulierender Peptide führen (Matsukawa et al., 1999). Es ist denkbar, dass durch die mangelnde Beseitigung eine verstärkte Bindung der verfügbaren Rezeptoren NPRA und NPRB stattfindet, deren cGMP-Signalwege in die Wege geleitet werden und eine gesteigerte Relaxation des Podozyten bzw. des Nephrozyten die Folge ist. Da davon ausgegangen werden kann, dass es sich um ein fein abgestimmtes System aus Relaxation und Kontraktion handelt, kann postuliert werden, dass durch den KD genau dieses Netzwerk außer Balance gerät, was zu einer Labilisierung der Schlitzmembran führt. Dies könnte die herabgesetzte Filtrationsleistung im Albuminaufnahme-Experiment erklären.

Das sich anschließende Ziel bestand in der Klärung der Fragestellung, inwiefern der KD von NPR3 tatsächlich die Stabilität der Filtrationsbarriere beeinflusst. Hierzu erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung, die durch eine starke Verminderung der Fluoreszenzmenge auffiel. Dieses Ergebnis bekräftigte den Verdacht, dass nach KD eine Labilisierung der Filtrationsbarriere des Nephrozyten die Folge ist. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde durch Verwendung von DAPI zusätzlich genutzt, um die Zellkerne anzufärben. Interessanterweise

fiel eine hohe Anzahl einkerniger Nephrozyten auf. Normalerweise charakterisieren sich die Filterzellen *Drosophilas* durch ihre Zweikernigkeit, die aus der durch Kirre orchestrierten Fusion zweier Zellen resultiert (Zhuang et al., 2009). Darüber hinaus zeigten die Aufnahmen eine Vielzahl an kleinen Zellen. Auch anhand der REM der Filterzellen konnte bewiesen werden, dass die Anzahl kleiner Zellen erhöht ist. Diese Beobachtungen stärken den Verdacht einer herabgesetzten Zellverschmelzung. Vermehrt einkernige Zellen sprechen für dieselbige Verminderung des Gehaltes an Kirre, wie es in der Immunfluoreszenzfärbung signifikant messbar war. Aus diesen Resultaten kann zusammenfassend die Postulation bekräftigt werden, dass der KD einen signifikanten Einfluss auf das Schlitzmembranelement Kirre im *Drosophila*-Modell hat. Dass die Filtrationsbarriere dadurch negativ in ihrer Funktionsweise beeinträchtigt wird, zeigte die deutlich verminderte Filterleistung. Unterschiedliche Literatur bekräftigt die Bedeutung des Natriumpeptidrezeptors C für den Nierenfilter. Im obig genannten Mausmodell, in dem Genmutationen von NPR3 zu einer fehlenden Entfernung zirkulierender Peptide führen, ist eine herabgesetzte Fähigkeit der Konzentrierung des Urins sowie ein niedriger Blutdruck beschrieben (Matsukawa et al., 1999). Das Gen NPR1, das verwandt ist zu NPR3, ist im Rahmen stressinduzierter Bedingungen von Bedeutung für die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen des Podozyten (Staffel et al., 2017). Interessanterweise scheint zudem eine Beziehung zwischen der Erkrankung des kongestiven Herzversagens, bei dem ANF Werte stark erhöht sind (Cody et al., 1986) und dem Podozyten zu bestehen. Es wird postuliert, dass das Initiieren von Albuminurie im Rahmen des kongestiven Herzversagens auf der Beteiligung der ANF-Signalwege im Podozyten beruht und somit eine sogenannte mögliche Herz-Nieren-Achse besteht (Braam et al., 2014).

Dass das Fehlen von Bausteinen der Schlitzmembran zum NS bzw. zu Filtrationsstörungen führt, ist für den Säuger gleichermaßen wie für den Fliegenorganismus bestätigt (Putala et al., 2001; Donoviel et al., 2001; Weavers et al., 2009; Zhuang et al., 2009). Im Laufe der Visualisierung der Nephrozytenschlitzmembran nach KD von NPR3 zeigte sich eine Oberfläche, die ein uneinheitliches Muster im Vergleich zur Wildtypkontrolle aufwies. Die aus der parallelen Anordnung der Schlitzmembranmoleküle resultierenden Fingerabdruckähnlichen Charakteristika wurden begleitet von punktförmigen Anordnungen. Dieses Erscheinungsbild umfasste die gesamte Zelloberfläche. Wie bereits beschrieben, bilden Kirre und Sns normalerweise eine die Oberfläche bildende Filtrationsbarriere in Form eines Fingerabdruckes, wohingegen das Fehlen eines Elements in einer punktartigen Darstellung resultiert (Hermlé et al., 2017). Interessant war, dass die der Untersuchung nachgeschalteten TEM-Aufnahmen ein identisches Erscheinungsbild zeigten und somit die vorangegangenen Versuche in ihrer Aussagekraft unterstützen. Bereiche konservierter Schlitzmembranen wechselten sich mit Abschnitten fehlender Filtereinheiten ab. Diese

Kombination deckt sich zum einen mit der Filtrationsleistung, die deutlich, aber nicht vollständig reduziert ist und zum anderen mit der herabgesetzten Anfärbung sowie den zahlreichen, einkernigen Zellen. Um zu kontrollieren, ob ein Einfluss auf ein weiteres Organsystem besteht, erfolgte die REM des Facettenauges. Der KD schien die Interaktion mit Kirre und Sns in der Entwicklung jedoch nicht zu beeinflussen. Das Auge war morphologisch unauffällig. Um zu schlussfolgern, dass die Konservierung der Interaktion durch das Protein auf die Niere beschränkt ist, müssten weitere, das Auge betreffende Versuche durchgeführt werden. Bislang ist das Vorhandensein für NPR3 für die Niere, das Herz und das Gehirn beschrieben (Wilcox et al., 1991).

Grundsätzlich muss gesagt werden, dass das Gebiet zum Verständnis der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPKR) noch lange nicht ausreichend erforscht ist. Interessanterweise steht der GPKR Gpr124 im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Cullen et al., 2011). Die mögliche Korrelation zwischen Podozyt und Neuron (Kobayashi et al., 2002; Rastaldi et al., 2006) lässt auch hier erneut die Frage aufkommen, inwiefern diese Erkenntnisse der Neurologie auf die Blut-Harn-Schranke übertragen werden können. Obgleich weiterführende Untersuchungen notwendig wären, insbesondere aus therapeutischer Sicht, kann zusammengefasst werden, dass in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden konnte, dass der KD-Effekt des Gens NPR3 sowohl die negative Beeinflussung der Funktion, als auch der Architektur der Filtrationsbarriere des *Drosophila* Nephrozyten umfasst.

## **2. Diskussion der potentiellen Interaktoren biologischer Zellprozesse des Podozyten**

### **2.1. FERMT2**

Die simultane Stabilität und Flexibilität, die es dem Podozyten ermöglicht den vorherrschenden Kräften der Filtration standzuhalten, sind auf seine intakte Verlinkung zu zellulären Strukturen zurückzuführen. Zum einen sind es die Zell-Zell-Verbindungen (v.a. Nephrin, Neph1) benachbarter Fußfortsätze in Form der Schlitzmembran, die via Signaltransduktion die Aktinorganisation des Podozyten aktivieren. Veränderungen der Fußfortsatzarchitektur, zurückführend auf das Zusammenspiel von Aktin und Schlitzmembranproteinen, sind häufig in glomerulären Erkrankungen anzutreffen. Zum anderen ist der Podozyt mithilfe Integrin-mediierter fokaler Adhäsion durch Interaktion mit der glomerulären Basalmembran an das Aktinzytoskelett verankert. Die Loslösung des Podozyten von der GBM mit einhergehendem Verlust der Filtrationsbarriere ist einer der entscheidend

beeinflussenden Faktoren des Fortschreitens glomerulärer sowie chronischer Nierenerkrankungen.

Yasuda-Yamahara et al. (2018) konnten zeigen, dass sich das hoch im Podozyten exprimierte FERMT2 durch seine überlappende Expression mit Proteinen, die im Zusammenhang mit fokaler Adhäsion sowie kortikalem Aktin stehen, charakterisiert. Bekräftigt werden konnte dies durch das Vorhandensein verkleinerter fokaler Adhäsionen nach KO. FERMT2-defiziente Podozyten zeigen eine Destabilisierung der Zellkortex, eine Blasenbildung der Plasmamembran sowie eine Beeinträchtigung des inneren Aktinzytoskeletts (Yasuda-Yamahara et al., 2018). Als Bestandteil dieser Publikation lag das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, *Drosophila* als *in vivo* Organismus auf übertragbare Konsequenzen nach KD hinweg zu studieren. Hierzu wurde im ersten Schritt ein Homologabgleich durchgeführt, mit dem Ziel das passende Äquivalent zum humanen FERMT2 zu eruieren. Die Analyse ergab mit CG14991/Fit1 und CG7729/Fit2 zwei vielversprechende Vorschläge. Fit1 nahm hierbei einen hohen und Fit2 einen moderaten Rang ein. Aufgrund der Tatsache, dass Fit2 keine signifikante Verminderung in der einleitenden Prüfung der Filtrationsleistung zeigte und dem Homolog eine geringere Übereinstimmung mit dem humanen Gen vorausgesagt wurde, erfolgten für CG7729 keine weiteren Untersuchungen. Für Fit1, das als bester Treffer für FERMT2 vorgeschlagen wurde, zeigte sich hingegen eine starke Reduktion des filtrierten Albumins. Interessanterweise zeigten die Untersuchungen der AG Muraleedharan et al. (2018), dass eine Labilisierung des Aktingerüsts *Drosophilas* zu einer Destabilisierung der Filtrationsbarriere führt. Dies konnte in Form einer signifikant reduzierten Filtrationsleistung im Dextranaufnahme-Experiment gezeigt werden. Analog zum Säuger sind die Nephrozytenschlitzmembranproteine für die Regulation des Aktinzytoskeletts der Nephrozyten verantwortlich und deren Verlinkung für die Notwendigkeit der *Drosophila* Filtrationsfunktion unabdingbar (Muraleedharan et al., 2018). Um im nachfolgenden Verlauf zu untersuchen, ob die *Drosophila* Schlitzmembranproteine möglicherweise in die Aktindestabilisierung durch FERMT2 integriert sind, erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre. Es konnte eine deutliche Reduktion der Anfärbung des Proteins verzeichnet werden, was die Annahme einer möglichen verlinkenden Funktion von Transmembranproteinen an das Zytoskelett durch FERMT2 bestärkt. Muraleedharan et al. (2018) konnten darüber hinaus in ihrer Publikation zeigen, dass Kirre und Sns mit Aktin im Bereich der Zellkortex kolokalisieren und ein Verlust mit einer verstärkten Aktinorganisation einhergeht. Dies bekräftigt die Annahme der Bedeutung von FERMT2 für das Aktinzytoskelett sowie für die Funktionalität der Filtrationsbarriere in *Drosophila* und kann als Erklärung für die vorliegende Reduktion von Antikörperfärbung und Filtrationsleistung herangezogen werden. Es ist weiterführend davon auszugehen, dass die Labilisierung des Aktinzytoskeletts neben der Beeinträchtigung der

Filtereinheit auch mit einer allgemeinen Schwächung der Zellstabilität einher geht. Dieser Möglichkeit auf den Grund gehend, wurden die Nephrozyten im REM untersucht und auffällig kleine Zellen detektiert. Zudem konnte eine hohe Anzahl an Zellagglutinationen verzeichnet werden. Diese Beobachtung untermauert die Annahme der Bedeutung für das Nephrozyten Aktinzytoskelett und würde erklären, warum die Zellen in ihrem Erscheinungsbild abnorm sind.

Diese beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen auch im Modellorganismus *Drosophila* die Bedeutung von FERMT2 für das Aktinzytoskelett und den Nierenfilter und decken sich mit vorliegender Literatur. Prinzipiell ist bekannt, dass FERM-Domäne beinhaltende Proteine für die Verlinkung von Transmembranproteinen mit dem Zytoskelett verantwortlich sind (Chishti et al., 1998). FERMT2 ist auf dem Gebiet der Zelladhäsion beschrieben (Tu et al., 2003). Mithilfe von FERMT2 wird das sogenannte Migfilin an die fokalen Adhäsionsbereiche rekrutiert. Migfilin ist für die Verlinkung von Zelladhäsionsstrukturen mit dem Aktinzytoskelett verantwortlich und reguliert die Umgestaltung von Aktin sowie die Morphologie und Motilität von Zellen (Tu et al., 2003). In Endothelzellen, Skelett- und Herzmuskelzellen subzellulär in Nachbarschaft zu fokalen Adhäsionen lokalisiert, partizipiert FERMT2 in der Kopplung von Integrinen an das Aktinzytoskelett (Ussar et al., 2006). Reduzierte Gehalte von FERMT2 in Endothelzellen nach KD im Mausmodell gehen mit einer Dysorganisation des Aktinzytoskeletts einher (Bledzka et al., 2016). Die Bindung des Proteins erfolgt an die zytoplasmatische Seite von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3-Integrin (Harburger et al., 2009). Die Ausschaltung der F3-Untereinheit von FERMT2, die für die Bindung verantwortlich ist (Garcia-Alvarez et al., 2003), resultiert in einer reduzierten Interaktion mit  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3-Integrin (Shi et al., 2007). Weitere Literatur bestätigt, dass FERMT2-defiziente Zellen nicht in der Lage sind, ihre Integrine zu aktivieren (Montanez et al., 2008). In Form von EPB41L5 rückte erstmals ein Protein mit FERM-Domäne, das Teil der fokalen Adhäsion ist, in den klinischen Zusammenhang zwischen Proteinurie und Ablösung des Podozyten (Schell et al., 2017).

In klinischen Zusammenhängen ist FERMT2 bislang überwiegend auf dem Gebiet der Neurologie beschrieben. Diverse Literatur schlägt mit der Beschreibung der Schlitzmembran als eine der neuronalen Synapse ähnlichen Struktur, eine Brücke zwischen Podozyt und Neuron (Kobayashi et al., 2002; Rastaldi et al., 2006) und lässt eine Übertragbarkeit möglich erscheinen. Als Hauptmodulator von APP nimmt FERMT2 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimererkrankung ein (Chapuis et al., 2017), steht bekräftigend dazu in Korrelation mit der Abnahme kognitiver Leistung (Andrews et al., 2017) und ist als Coaktivator von  $\beta$ 3-Integrin (Ma et al., 2008) in die Regeneration von Gehirngewebe nach einem Schlaganfall involviert (Ellison et al., 1998). Interessanterweise konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass das FERMT2 Homolog in *Drosophila* (Fit1) scheinbar mit dem

neurotoxischen Tau, das in die Entwicklung der Alzheimererkrankung involviert ist, interagiert. Der durch Tau-KD initiierte raue Augenphänotyp konnte durch RNAi von Fit1 deutlich verstärkt werden. Zwar initiiert der alleinige KD keine rauen Augen, scheint aber in interagierender Funktion für die fortschreitende Entwicklung eines Phänotyps verantwortlich zu sein (Shulman et al., 2014). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass FERMT2 an der Progression pathologischer Zustände, die durch Tau initiiert sind, beteiligt ist. Es ist denkbar, dass FERMT2 auch mit weiteren Komponenten wie bspw. Neph1 und Nephrin interagiert und die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Fehlstellungen im Facettenauge nach KD erklären lässt. Interessanterweise konnten Shulman et al. (2014) für das *Drosophila*-Homolog zu CD2AP die gleiche robuste Verstärkung des Augenphänotyps beobachten. CD2AP ist ein mit der Alzheimererkrankung assoziiertes Gen (Naj et al., 2011), gleichzeitig elementar für die Verankerung der Schlitzmembran mit dem Aktinzytoskelett und führt in defizienten Mäusen zum NS (Shih et al., 1999). Ebenfalls interessant ist in diesem Kontext die Assoziation von Tau und Aktin in der Modulation neurodegenerativer Geschehnisse (Fulga et al., 2007). Fulga et al. (2007) konnten zeigen, dass eine Tau-induzierte Neurodegeneration begleitet wird von Veränderungen im Aktinzytoskelett. Abnormale Aktinbündel sowie Formationen aktinreicher Stäbchen im Gehirn *Drosophilas* und im Mausmodell konnten verzeichnet werden (Fulga et al., 2007). Diese Erkenntnisse scheinen vielversprechend für eine zukünftige Untersuchung der Übertragbarkeit der Bedeutung von FERMT2 für das Aktinzytoskelett des Podozyten (Yasuda-Yamahara et al., 2018) auf die Nervenzelle zu sein. Die vorliegenden Ergebnisse in Form eines ausbleibenden rauen Phänotyps, aber vorhandenen milden Fehlstellungen des Auges nach KD decken sich mit den Erkenntnissen von Shulman et al. (2014) und lassen in Kombination mit den Ergebnissen durch Fulga et al. (2007) eine Beteiligung von FERMT2 auch im Aktinzytoskelett des Auges möglich erscheinen. Die Bedeutung der FERMT2 vermittelten Adhäsion für die Pathogenese des primären Engwinkelglaukoms wurde im Rahmen Genomweiter Studien durch Khor et al. (2016) postuliert. FERMT2 wurde als eines von 5 innovativen, in Assoziation mit dieser Form des Glaukoms stehenden Genloki detektiert (Khor et al., 2016). Glaukome sind die weltweit häufigste Ursache irreversibler Erblindung (Thylefors et al., 1995). Interessanterweise sind sich die Borstenfehlstellungen nach KD des Gens FERMT2 und jene des bereits vorgestellten Gens ITM2B sehr ähnlich. Wie einleitend beschrieben steht ITM2B in Assoziation mit der Demenzerkrankung, die verursacht wird durch Ablagerungen von  $\beta$ -Amyloid. Über die bereits genannten Erkenntnisse hinaus, konnten Fulga et al. (2007) zeigen, dass  $\beta$ -Amyloide synergistisch verstärkende Wirkungen auf Veränderungen des Aktinzytoskeletts im Tau WT haben (Fulga et al., 2007). Es ist denkbar, dass analog zu der Bedeutung zwischen Tau und FERMT2, auch  $\beta$ -Amyloid und ITM2B in Verbindung zueinanderstehen und ähnliche Phänotypen im Auge generieren.

Im Rahmen der Beurteilung der Schlitzmembran war eine von dem wildtypischen Muster stark abweichende Darstellung auffällig. Es zeigten sich Abschnitte, in denen parallele Linien in Form eines Fingerabdrucks in direkter Nachbarschaft zu Bereichen mit zahlreichen Punkten lagen. Erst genannte Abschnitte sprechen für einen Anteil konservierter Schlitzmembranen, wohingegen die hohe Anzahl an punktförmigen Anfärbungen die Postulation einer fehlenden Intaktheit der Filterbarriere untermauert. Funktionell ließe sich damit erklären, warum sowohl die Filterleistung als auch die Anfärbung stark, aber nicht vollständig reduziert waren. Die Beurteilung der Ultrastruktur via TEM wäre für die abschließende Beurteilung von Bedeutung. Die Durchführung der Experimente für die FERMT2-RNAi erwies sich grundsätzlich als erschwert, da die Anzahl der aus den Kreuzungen hervorgehenden L3 limitiert war. Von Beginn an konnte dieses Phänomen beobachtet werden, verstärkte sich jedoch im Laufe der Kreuzungen und Versuchsreihen, sodass die Larvenmenge für die abschließende TEM nicht ausreichend war. Es ist denkbar, dass sich die Labilität der Aktinarchitektur nach KD bereits auf die Entwicklung der Larvenstadien auswirkt und den reduzierten Ertrag erklärt. Eine Betrachtung der Ultrastruktur mit finaler Beurteilung des Filters konnte in diesem Fall nicht durchgeführt, jedoch anhand der deutlich veränderten Oberflächenanfärbung der Filterzellen ein erster, intensiver Eindruck ermöglicht werden.

Welche Bedeutung FERMT2 für das Aktinzytoskelett und folglich für die Intaktheit des Podozyten hat, konnte anhand der Untersuchungen durch Yasuda-Yamahara et al. (2018) gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte als Bestandteil dieser Publikation das Ziel erfüllt werden, das bestmögliche Homolog zu FERMT2 in den Filterzellen *Drosophilas* auf einen Effekt auf die Barrierefunktion hinweg zu untersuchen. Dadurch dass die Filtrationsleistung enorm reduziert war und die Bedeutung des Aktinzytoskeletts für den Nephrozyten beschrieben ist (Muraleedharan et al., 2018), kann von einer Übertragbarkeit der Bedeutung des Proteins ausgegangen werden. Die aus der vorliegenden Arbeit hervorgehenden Ergebnisse beweisen, dass FERMT2 im *Drosophila*-Modellorganismus eine ausschlaggebende Rolle für die Funktionalität und die Morphologie des Filterapparates einnimmt. Mit den generierten Daten konnte ein Beitrag zu der Suche nach vielversprechenden Patientenorientierten Therapieansätzen geschaffen werden, da bekannt ist, dass der antiproteinurische Effekte von Medikamenten auf der Stabilisierung des Aktinzytoskeletts des Podozyten beruht (Faul et al., 2008). Die vorliegenden Ergebnisse untermauern die Bedeutung des Aktinzytoskeletts für den Podozyten-ähnlichen Nephrozyten *Drosophilas* (Weavers et al., 2009). Fortführende Untersuchungen zu FERMT2 im Fliegenorganismus, wie bspw. die exakte Lokalisation in Nachbarschaft zum Aktinzytoskelett im Nephrozyten durch Immunfluoreszenz, wären in diesem Zusammenhang interessant.

Interaktoren der Adhäsion und deren Bedeutung für die Filterfunktion in der Fliege sind weitestgehend ungeklärt und für zukünftige Untersuchungen von großer Bedeutung.

## 2.2. BECN1

Die biologische Funktionsfähigkeit kataboler Zellprozesse wie der Autophagie und der Endozytose sind für den Podozyten als begrenzt differenzierungsfähige, post-mitotische Zelle von großer Bedeutung, da sein Potential zur Regeneration limitiert ist (Nagata et al., 1998). Beclin-1, kodiert durch BECN1, bildet mit Vps34, Vps15, UVRAG und weiteren Elementen den für die Initiierung der Autophagozytose notwendigen PI3K(III)-Interaktionskomplex (Liang et al., 2008; Juhász et al., 2008). Die Hemmung der Autophagie als Resultat des Fehlens von Beclin-1 im Podozyten unterstreicht die Bedeutung des Autophagieproteins (Fang et al., 2013), dessen Funktion evolutionär hochkonserviert ist.

Im Fettgewebe der Fliege kommt es nach KD von BECN1 zur funktionellen Störung von Autophagie und Endozytose (Shravage et al., 2013). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der Autophagie und der Endozytose für die Barrierefunktion nach KD von BECN1 zu beleuchten. Mittels bioinformatischer Analysen wurde einleitend das passende Homolog zu BECN1, dessen Genprodukt in den Glomeruli hochangereichert ist (Fang et al., 2013), gesucht. CG5429 erwies sich durch die hohe genetische Gemeinsamkeit als geeignet für die Anwendung der nachfolgenden Versuche im *Drosophila*-Modell.

In der Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Filtration, zeigte sich eine nach KD sehr stark verringerte Aufnahme applizierten Albumins. Der subjektive Eindruck eines nahezu nicht darstellbaren Fluoreszenzsaums konnte durch die nachfolgende Quantifizierung bestätigt werden. Diese Beobachtungen erweckten den möglichen Verdacht, dass Beclin-1 und somit die Funktionalität der Autophagie für den Filtrationsvorgang des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten (Weavers et al., 2009) von Bedeutung sind. Interessanterweise decken sich die vorliegenden Ergebnisse im Nephrozyten mit der in der Literatur beschriebenen Hemmung der Autophagozytose durch Stilllegung von Beclin-1 im Podozyten, die zu einer Beeinträchtigung der Filtrationsbarriere führt (Fang et al., 2013). Die Inhibierung der basalen Autophagie, die prinzipiell im Podozyten sehr hoch ist (Hartleben et al., 2010), ist mit einem Anstieg des Albuminverlustes über die Filterbarriere verbunden (Fang et al., 2013). Dieser beschriebene Einfluss der Autophagie auf die architektonische Intaktheit untermauert die Annahme der Bedeutung von Beclin-1 für die Filterfunktion. Fang et al. (2013) konnten in der gleichen Versuchsreihe feststellen, dass die Hemmung der Autophagie durch Ausschaltung von Beclin-1 mit einer parallelen Unterdrückung von Podocin einhergeht (Fang et al., 2013). Interessanterweise erwies sich in der vorliegenden Arbeit die Immunfluoreszenzfärbung als

enorm reduziert und konnte mittels Quantifizierung als hoch signifikant bestätigt werden. Es ist denkbar, dass Beclin-1 eine interagierende Bedeutung mit Bestandteilen des Nierenfilters, wie bspw. Podocin und anderen Elementen besitzt und ein Fehlen folglich die Konstellation und Funktionalität der Filterbarriere negativ beeinflusst. Die Untersuchung des Einflusses von Beclin-1 auf die Entwicklung des Facettenauges konnte jedoch eine potentielle Bedeutung in der Interaktion zu Proteinen des Nierenfilters nicht bestätigen. Zwar konnte ein signifikant erhöhtes Aufkommen von Fehlstellungen beobachtet werden, jedoch zeigte sich keine Störung in der adäquaten Ausbildung der Ommatidien, die das Facettenauge in ihrer Gesamtheit auskleiden. Es ist möglich, dass Beclin-1 eine kommunikative Rolle auf dem Bereich des Nierenfilters einnimmt, die jedoch in anderen Organsystemen nicht konserviert ist.

Um Klarheit darüber zu erhalten, inwiefern die funktionelle Reduktion der Filterarbeit tatsächlich in Verbindung steht mit einem Defekt der Autophagie, erfolgte im nächsten Schritt die Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche sowie die TEM-Untersuchung der Filterzellen. Die Oberfläche zeigte sich in der Anfärbung gegen Kirre zwar in Form eines Fingerabdruckähnlichen Musters, erschien jedoch wellenförmig. Normalerweise ordnen sich die Schlitzmembrankomponenten so an, dass parallele Linien das Erscheinungsbild prägen. Ebenfalls von der wildtypischen Kontrolle abweichend, zeigten sich entlang der gesamten Oberfläche vereinzelt Punkte. Wie bereits beschrieben, stellt sich die Schlitzmembran in Form eines Fingerabdruckes, nicht aber in Form von Punkten dar (Hermle et al., 2017). Interessanterweise zeigten sich übertragbare Veränderungen der Filtrationsbarriere in den TEM-Aufnahmen. Neben konservierten Bereichen fielen Abschnitte mit einer reduzierten Anzahl an Schlitzmembranen auf. Diese Ergebnisse decken sich mit der Reduktion, die sowohl die Filtrationsleistung, als auch die Anfärbung von Kirre betrifft. Darüber hinaus fielen deutlich verkleinerte Lakunen unterhalb der Schlitzmembranen auf. Ebenfalls auffällig waren die zahlreichen, im Zytoplasma gelegenen Vakuolen. Normalerweise werden Moleküle von der Nephrozytenmembran in die Lakunen aufgenommen und dort via Endozytose in Vesikel verpackt. Im Anschluss werden die Vesikel in primäre Endosomen aufgenommen, die sich wiederum zu sekundären Endosomen entwickeln und abschließend mit Lysosomen zu Endolysosomen verschmelzen. Die Vakuolen des Nephrozyten können im TEM prinzipiell in drei Schichten unterteilt werden. Die erste, periphere Schicht unterhalb der äußeren Membran umfasst die frühen Endosomen (Rab5-positiv). Die darunter gelegene Schicht beinhaltet die späten Endosomen (Rab7-positiv), auch alpha-Vakuolen genannt, die in Besitz eines dichten Kerns sind. Die letzte Schicht besitzt die sogenannten beta-Vakuolen, die die Lysosomen (Lamp1-positiv) darstellen (Rusten et al., 2006). Besteht eine Beeinträchtigung im Ablauf der Endozytose ist die Anhäufung von Vesikeln die Folge. Auffällig war die erhöhte Anzahl später Endosomen in den TEM-Aufnahmen. Diese Beobachtung beweist, dass die Endozytose in

ihrem Ablauf gestört ist, was ebenfalls durch die verkleinerten Vakuolen bekräftigt wird. Regelrecht zusammengefallene, verkleinerte Vakuolen befürworten die Verminderung der Endozytoseaktivität und könnten die minimierte Filtrationsleistung, die im Experiment zur Albuminaufnahme beobachtet wurde, erklären. Die auffällig reduzierte Anzahl an Schlitzmembranen unterstreicht die Annahme, dass ein Defekt der Endozytose die Filterbarriere beeinflusst und würde folglich die Verminderung der Filtration erklären. Diese Auffälligkeiten decken sich mit in der Literatur beschriebenen Defekten der Endozytose nach Ausschalten von BECN1 (McKnight et al., 2014; Shrivage et al., 2013). Da Neuronen viele Verknüpfungspunkte mit Podozyten besitzen (Kobayashi et al., 2002; Rastaldi et al., 2006) ist es interessant, dass der KO von BECN1 im Gehirn zu Störungen der Formation und der Reifung der Endosomen führt und neurodegenerative Folgen mit sich bringt (McKnight et al., 2014). Untersuchungen im Alzheimermodell zeigen, dass Beclin-1 durch die Entfernung krankheitsverursachender Proteine wie APP diesen degenerativen Veränderungen protektiv vorbeugt (Pickford et al., 2008). Durch die ebenfalls beschränkte Regenerationsfähigkeit des Podozyten (Nagata et al., 1998) ist es denkbar, dass es zu vergleichsweise schädigenden Veränderungen nach Wegfall von BECN1 kommt. Dies scheint auch im *Drosophila*-Modell der Fall zu sein. Wird BECN1 in den Neuronen der Fliege herunterreguliert, können eine reduzierte Überlebensfähigkeit sowie eine Verminderung der lokomotorischen Aktivität beobachtet werden (M'Angale und Staveley, 2016). Die Tatsache, dass Mutationen von BECN1 eine Störung der Autophagie und der Endozytose im Fettgewebe der Fliege verursachen (Shrivage et al., 2013), lässt die Übertragbarkeit der Bedeutung von Beclin-1 allgemein für *Drosophila* plausibel erscheinen. Beclin-1 steht als Kernkomponente des PI3K-Komplexes in Interaktion mit diversen Elementen wie Vps34, Vps15 und UVRAG (Liang et al., 2008; Juhász et al., 2008; Ruck et al., 2011). Vps34, das von Beclin-1 moduliert wird, ist essentiell für die Bildung des Autophagosoms sowie für die Formation der späten Endosomen (Jaber und Zong, 2013) und ein Defekt führt zur Podozytendegeneration sowie zur Entstehung von Proteinurie (Chen et al., 2013; Bechtel et al., 2013a). Auch in *Drosophila* ist Vps34, ebenso wie Vps15, unabdingbar für Autophagiefunktionalität und Überlebensfähigkeit (Juhász et al., 2008; Lindmo et al., 2008) und ein Wegfall der Funktion wird begleitet von Einschränkungen der Endozytose und der Endosomenreifung (Bechtel et al., 2013a; Bechtel et al., 2013b). Weiter ist Beclin-1 essentiell für den sogenannten UVRAG-Vps34-Komplex, der die Endozytose reguliert (McKnight et al., 2014). Es ist wahrscheinlich, dass der KD Auswirkungen auf die funktionierende Interaktion mit diesen Kommunikationspartnern des PI3K-Komplexes hat und folglich die Autophagie und die Endozytose der Zelle stört. Die Aufrechterhaltung der Homöostase durch diese katabolen Prozesse ist für die Zellgesundheit unabdingbar und eine Fehlregulation ist für multiple Krankheitsprozesse beschrieben (Mizushima und Levine, 2010). Das Funktionieren der Autophagie impliziert das Fernbleiben der Akkumulation toxischer oder fehlgefalteter Proteine

sowie geschädigter Organellen und schützt durch diese Säuberungsprozesse die Zelle vor Alterung. Die Inhibierung der Autophagie und der Endozytose durch BECN1 KD würde in diesem Zusammenhang die auffällig kleinen bzw. auffällig großen Zellen erklären. Es erscheint plausibel, dass die Akkumulation nicht abgebauter Zellreste verantwortlich dafür ist, dass ein Teil der Nephrozyten hypertroph ist. Folge ist eine verfrühte, durch ausbleibende Entfernung schädlicher Elemente initiierte Apoptose mit Zellniedergang, was durch den Anteil zu kleiner Zellen bestätigt werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass der KD von BECN1 zahlreiche Folgen für die Filterzellen der Fliege nach sich zieht. Diese betreffen die Funktionalität der Barriere, aber auch deren Architektur. Die beobachteten Veränderungen akkumulierter Endosomen erscheinen vielversprechend für weiterführende Untersuchungen zur Endozytose und den daraus resultierenden Effekt auf die Filterfunktion. Dies gilt für das *Drosophila*-, aber auch das Mausmodell. Durch die hohe genetische Übertragbarkeit auf den Menschen erscheint es zuversichtlich, dass sich durch die in der vorliegenden Arbeit generierten Ansätze Möglichkeiten bezüglich neuartiger therapeutischer Ansätze für Patienten, die vom NS betroffen sind, ergeben.

### **2.3. VASN**

Die Balance zwischen Initiierung und Attenuierung von Signaltransduktionswegen charakterisiert den Begriff der Homöostase, deren Bedeutung alle Zellen, Gewebe und Organsysteme in ihrer Funktionalität umfasst. Von Vasorin, einem Transmembran- und Glykoprotein, dessen Expression durch VASN erstmals in den vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben wurde, ist bislang bekannt, dass es den TGF- $\beta$ -Signalweg hemmt (Ikeda et al., 2004; Malapeira et al., 2011). Das funktionierende Ein- und Ausschalten dieses Netzwerkes ist für die Embryonalentwicklung sowie für die Gewebshomöostase von essentieller Bedeutung (Wu und Hill, 2009). Die intakte Feinabstimmung der Beeinflussung der TGF- $\beta$ -Signalwege bestimmt Zellprozesse wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Entzündung (Massagué und Wotton, 2000). Wie bereits beschrieben, ist der Podozyt als post-mitotische Zelle, im Gegensatz zu bspw. Tubulusepithelzellen, in seiner Fähigkeit zur Regeneration begrenzt (Nagata et al., 1998). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand des *Drosophila*-Homologes den Einfluss von Entwicklung und Homöostase auf die Filterfunktion des Podozyten-ähnlichen Nephrozyten zu untersuchen. Neben dem hohen Aufkommen in der Aorta, ist bislang die Expression in der Niere beschrieben (Ikeda et al., 2004). Im Rahmen der renalen Entwicklung im embryonalen Mausmodell besteht eine gesteigerte Expression (Krautzberger et al., 2012). Diese Daten sprechen dafür, dass Vasorin eine potentiell

interessante Rolle sowohl für die adulte, als auch für die sich entwickelnde Niere einnimmt. Um die Effekte eines KD in *Drosophila* zu betrachten, erfolgte die Suche nach dem Homolog mit höchster genetischer Übereinstimmung. Zum Zeitpunkt der Analyse war dies für CG14531 (hattifattener) der Fall, welches folglich für die angewandten Experimente ausgewählt wurde.

Nach Kreuzung der Gal4-Linie mit der UAS-RNAi fiel auf, dass der Filtrationsvorgang in seinem Leistungsumfang deutlich vermindert war. Die filtrierte Menge an Albumin war auffällig reduziert, was anhand des dünnen Saums entlang des Nephrozyten wahrgenommen werden konnte. Die statistische Analyse ergab ein Ergebnis mit deutlicher Signifikanz, welches bestätigt, dass der KD des VASN Homologes die Filtrationsbarriere negativ beeinflusst. Zur Erklärung des vorliegenden funktionellen Phänotyps können anhand bislang bekannter Literatur verschiedene Möglichkeiten herangezogen werden.

Es ist zum einen denkbar, dass die Herunterregulierung des VASN Homologes Auswirkungen auf die bereits embryonale Entwicklung der Fliege und folglich auch auf die Anatomie des Filterorgans hat. Ikeda et al. (2004) beschrieben erstmals, dass der Gehalt an exprimierten Vasin mit Wachstum und Differenzierung korreliert. Dies spricht dafür, dass Vasin eine funktionelle Rolle in Entwicklungsprozessen einnimmt. Krautzberger et al. konnten im Jahre 2012 bestätigen, dass Vasin in Wachstumsprozesse involviert ist. In den sich entwickelnden Nieren des Mausmodells konnte gezeigt werden, dass der Verlauf der Embryogenese mit einem parallel ansteigenden Expressionsgehalt einhergeht (Krautzberger et al., 2012). Auch ein weiteres Forschungsmodell bekräftigt die potentielle Rolle von Vasin in Entwicklungsvorgängen. Im sich entwickelnden Zebrafisch ist das Protein sowohl im Zentralnervensystem sowie im vaskulären System in seinem Vorhandensein gesteigert (Chen et al., 2005). Befürwortend für die Bedeutung von Vasin für Wachstumsprozesse ist auch die hohe Expression in der Plazenta, die durch Untersuchungen von humanem Gewebe via Northern Blot detektiert wurde (Ikeda et al., 2004). Basierend auf der architektonischen Analogie zählt Vasin zur Familie der Slit-Proteine, die eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung spielen (Ypsilanti et al., 2010). Eine funktionelle Übereinstimmung mit den Slit-Proteinen ist jedoch in der Literatur bislang nicht bestätigt. Es ist ebenfalls denkbar, dass eine negative Beeinflussung durch das Fehlen von Vasin auf einer verringerten Attenuierung der TGF- $\beta$ -Signalwege beruht, die unter anderem für embryonale Entwicklungsprozesse von Bedeutung sind (Wu und Hill, 2009). Im Rahmen der für die Experimente notwendigen angesetzten Kreuzungen fiel prinzipiell auf, dass der Gehalt an sich entwickelnden Larvenstadien im Vergleich zum Wildtyp verringert war. Die in der Literatur beschriebenen Einflüsse des Expressionsgehaltes auf die Entwicklung lassen es denkbar erscheinen, dass entsprechende Effekte auch auf die Filtrationsbarriere übertragen werden können. Dies würde erklären, warum die vorliegenden Ergebnisse eine stark reduzierte Filtrationsleistung durch

die Nephrozytenschlitzmembran aufweisen. Eine Beeinträchtigung der Entwicklungsvorgänge könnte sich auch auf die verschiedenen Komponenten des Podozyten und der Schlitzmembran auswirken und über die Albuminaufnahme hinaus erklären, warum die Immunfluoreszenzfärbung gegen Kirre erheblich reduziert war. Welche Bedeutung Nephrin und Neph1 sowohl für die Entwicklung als auch für die Funktionalität des Podozyten und der Schlitzmembran haben, zeigen die Folgen bei einem Defizit jener Moleküle. Ein Fehlen führt zur Instabilität der Filtrationsbarriere und folglich zum NS (Tryggvason, 2005; Donoviel et al., 2001). Es ist möglich, dass sich der reduzierte Gehalt an Kirre durch eine potentielle, interagierende Rolle von Vasorin in Entwicklungsprozessen erklären lässt. Grundsätzlich bedeutet eine verminderte Immunfluoreszenzfärbung gegen eines der Schlitzmembranmoleküle, dass potentiell auch der Gehalt an intakten Filtrationsbarrieren reduziert sein muss. Dies deckt sich wiederum mit den Befunden aus der Immunfluoreszenzfärbung der Nephrozytenoberfläche sowie aus der TEM-Untersuchung. Die Visualisierung der Zelloberfläche beinhaltete parallel angeordnete Linien in Form eines Fingerabdruckes, die jedoch schwer dargestellt werden konnten. Eine Vielzahl an Punkten unterbrach zudem das Erscheinungsbild. Normalerweise ordnen sich die Elemente der Filterbarriere ausschließlich als Fingerabdruck an (Hermle et al., 2017). Diese Befunde untermauern eine potentielle Verringerung konservierter Schlitzmembranen im *Drosophila*-Modell und decken sich mit den generierten Daten der TEM. Die Anzahl ausgebildeter Schlitzmembranen und Lakunen war in den Aufnahmen auffällig reduziert. Markant war zudem, dass die Lakunen unterhalb der ausgebildeten Schlitzmembranen regelrecht miteinander verschmolzen erschienen, was möglicherweise auf einen Defekt in der Entwicklung schließen lässt. Prinzipiell decken sich zum einen die reduzierte Anfärbung gegen Kirre und die verminderte Anzahl an Schlitzmembranen miteinander und erklären zum anderen, warum die Filtrationsleistung im Albuminaufnahme-Experiment Einbußen verzeichnen ließ. Diese Befunde bekräftigen die potentielle Bedeutung von Vasorin für die Filterfunktion im Podozyten-ähnlichen Nephrozyten (Weavers et al., 2009). Die Ergebnisse der REM-Untersuchung der Filterzellen *Drosophilas* lassen eine Involvierung von Vasorin in Wachstums- und Entwicklungsprozesse ebenfalls plausibel erscheinen. Es zeigten sich eine Vielzahl an Nephrozyten unterschiedlicher Größe sowie agglutinierte Zellen. Diese Beobachtungen lassen ebenfalls auf eine Störung in der physiologischen Ausbildung schließen. Über die Entwicklung des Nierenfilters hinaus, wurde bereits beschrieben, dass Nephrin und Neph1 involviert sind in die Entwicklung des Facettenauges (Dworak et al., 2001; Ramos et al., 1993). Mit dem Ziel, die Bedeutung von Vasorin in diesem Kontext genauer zu beleuchten, wurde das Auge nach KD von VASN untersucht. Aufgrund vollständig und klar voneinander abgegrenzter Ommatidien konnte ein starker Defekt in der Entwicklung des Auges der Fliege nach Herunterregulierung jedoch nicht detektiert werden. Es zeigte sich

allerdings eine signifikante Erhöhung an Borstenfehlstellungen, die auf einen milden Augenphänotyp und eine geringgradige Interaktion durch Vasorin schließen lässt.

Zum anderen könnte neben der Beeinflussung von Entwicklungsvorgängen, die Abschwächung der attenuierenden Wirkung auf den TGF- $\beta$ -Signalweg durch KD von VASN die vorliegenden Ergebnisse erklären. Ikeda et al. (2004) beschrieben erstmals, dass Vasorin durch Bindung von TGF- $\beta$  zu einer Hemmung der Signalwege *in vitro* führt. Malapeira et al. (2011) bestätigten die attenuierende Wirkung von Vasorin auf TGF- $\beta$ . Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass ein ausbleibender Attenuierungseffekt zu einer gesteigerten, aus dem Gleichgewicht geratenen Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalwege führt. Die Signalwege beinhalten Zellprozesse, die Proliferation, Apoptose, Differenzierung sowie Inflammation umfassen. Es ist denkbar, dass ein Wegfall von Vasorin die Homöostase, die durch eine Balance aus Attenuierung und Initiierung reguliert wird, derart stört, dass es durch überaktivierte Prozesse zu Zellschädigungen bis hin zu Zellverlust kommt. Der Podozyt als post-mitotischer Zelltyp mit limitierter Kapazität zur Regeneration kann sich diesen schädigenden Einflüssen kaum entziehen (Nagata et al., 1998). Dies könnte erklären, warum sich die analogen Nephrozyten in der REM in variierenden Größen dargestellt haben, die Filterfunktion im Albuminaufnahme-Experiment beeinträchtigt und der Gehalt an Schlitzmembranen im TEM reduziert war. Der TGF- $\beta$ -Signalweg nimmt unter physiologischen Bedingungen durch die Aktivierung der Kollagensynthese eine wichtige Rolle in Reparatur- und Heilungsprozessen ein. Insbesondere der Podozyt ist auf diese Regenerationsvorgänge angewiesen. Kommt es jedoch zu einer Überaktivierung der Signalinduktion, ist eine Überproduktion von Kollagen die Folge. Im Rahmen der diabetischen Nephropathie verursachen erhöhte Glukosespiegel eine gesteigerte Freisetzung von TGF- $\beta$ . Durch die gesteigerte Kollagensynthese sind Schädigungen der Niere die Folge. Auch in der Pathogenese der renalen Fibrose spielt die Überaktivierung der TGF- $\beta$ -Signalwege eine bedeutende Rolle (Verrecchia und Mauviel, 2007). Darüber hinaus ist es denkbar, dass eine gesteigerte Apoptose, initiiert durch übermäßige TGF- $\beta$ -Stimulation erklärt, warum es zu Einbußen in Leistung und Anzahl der Filterzellen *Drosophilas* nach VASN KD kommt.

Zusammenfassend konnte anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulicht und bewiesen werden, dass die Herunterregulierung von VASN die Filterleistung und die Intaktheit der Barriere negativ beeinflusst. In Verknüpfung mit bestehender Literatur ist die Bedeutung Vasorins für die Initiierung und Attenuierung von TGF- $\beta$ -Signaltransduktionswegen denkbar. Weiterführende Versuche im Mausmodell sowie in *Drosophila* sind für die Zukunft ebenso interessant und vielversprechend, wie neuartige, spezifische Therapieansätze für Patienten, die vom Nephrotischen Syndrom betroffen sind.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden podozytäre Proteine des Nierenfilters im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* untersucht und zu Fragestellungen zum Nephrotischen Syndrom (NS) genutzt. Das NS, als glomerulären Erkrankungen der Niere zugrunde liegender Symptomenkomplex, ist geprägt durch das Kardinalsymptom Proteinurie. Die Intaktheit des Nierenfilters, die durch die Integrität von Podozyt und Schlitzmembran und das dazwischenliegende engmaschige Signalnetzwerk bestimmt wird, beugt dem pathologischen Eiweißverlust vor. ITM2B, MERTK und NPR3 und deren Proteine repräsentierten potentielle Interaktoren der Schlitzmembran. Die Genprodukte von FERMT2, BECN1 und VASN dienten der Untersuchung potentieller Interaktoren biologischer Zellprozesse innerhalb des Podozyten.

Eingeleitet wurde die Arbeit durch bioinformatische Genabgleiche zwischen Mensch und *Drosophila*. Nach adäquater Homologfindung für jedes Gen sowie Bezug der jeweiligen UAS-RNAi-Linien, erfolgte die Anwendung des Albuminaufnahme-Experiments zur Untersuchung der Beeinflussung des Knockdowns (KD) auf die Filtrationsleistung. Es reihten sich Immunfluoreszenzfärbung sowie Rasterelektronenmikroskopie des Nephrozyten ein. Zur Darstellung der Schlitzmembran wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Oberfläche sowie transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zur Beurteilung eines weiteren Organsystems erfolgte die Rasterelektronenmikroskopie des Facettenauges der Fliege.

Der KD aller untersuchten Gene resultierte dabei in stark reduzierten Funktionseinschränkungen sowie auffällig verminderten Immunfluoreszenzfärbungen gegen das *Drosophila* Schlitzmembranmolekül Kirre. Die REM-Aufnahmen der Nephrozyten aller Gene charakterisierten sich durch abweichende Zellmorphologien nach KD. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen der Oberflächen sowie TEM-Aufnahmen konnte für alle Gene bewiesen werden, dass die Filterbarrieren verändert sind. Milde Augenphänotypen, ausgenommen für NPR3, konnten die Bedeutung konservierter Interaktionen unterstreichen.

Mit Erfüllung der Zielsetzung wurden innovative Interaktoren der Schlitzmembran sowie der Zellprozesse des Podozyten im *Drosophila*-Modell aufgedeckt, deren Herunterregulierungen negative Effekte auf Funktionsweise und Morphologie der Filterbarriere nach sich zogen. Basierend auf diesen Befunden eröffnet sich die Möglichkeit für weiterführende Experimente, die das Ziel beinhalten, spezifische Therapieansätzen für Patienten mit Nephrotischen Syndrom zu entwickeln.

## VII. SUMMARY

### **Functional investigation of podocyte proteins of the kidney filter in *Drosophila melanogaster* regarding the issue of Nephrotic Syndrome**

In this work, podocyte proteins of the kidney filter were investigated in *Drosophila melanogaster* as model organism and were applied for questions regarding Nephrotic Syndrome. NS, as a complex of symptoms based on glomerular diseases of the kidney, is strongly ruled by proteinuria. The integrity of the kidney filter, determined by the intact podocyte and slit diaphragm as well as the tightly regulated signaling hub in between, prevents the pathological loss of proteins. Expressed proteins of ITM2B, MERTK and NPR3 present potential slit diaphragm interactors. The gene products of FERMT2, BECN1 and VASN serve as potential interactors for the investigation of biological cell processes within the podocyte.

Bioinformatical gene comparisons between human and *Drosophila* were used to initiate the work. After detection of appropriate homologues for each gene and suitable supply of RNAi-knockdownlines, the albumin uptake experiment was applied. The aim was to study the effects on the filtration activity after knockdown. Following investigations included the immunofluorescence staining and scanning electron microscopy. For presenting the slit diaphragm, immunofluorescence stainings of the cell surface as well as transmission electron microscopy were used. For the evaluation of a further organ system, the scanning electron microscopy of the compound eye of the fly presents another method applied in this work.

As a result of the KD, all investigated genes showed a highly reduced functional restriction as well as strikingly reduced immunofluorescence stainings against kirre as *Drosophila* slit diaphragm molecule. REM findings of all genes were characterized by nephrocytes that differ from cell morphology after KD. Via immunofluorescence stainings of the cell surface and transmission electron microscopy, altered filtration barriers were demonstrated. Mild phenotypes of the compound eye, except for NPR3, underlined the meaning of highly conserved interactions.

By performance of the objective target, innovative interactors of the slit diaphragm and podocyte cell processes were revealed in *Drosophila*, whose knockdown resulted in negative effects regarding functionality and morphology of the filtration barrier. The novel discoveries of this work can serve as a platform for further investigations for potentially innovative therapy options in the future, that can be used for treatment approaches based on the specific need of patients suffering from Nephrotic Syndrome.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrantes MM, Cardoso LSB, Lima EM, Silva JMP, Diniz JS, Bambirra EA, Oliveira EA. Clinical course of 110 children and adolescents with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2006;21(4):482–9.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 2000;287(5461):2185–95.
- Aggarwal SK, King RC. An electron microscopic study of the corpus cardiacum of adult *Drosophila melanogaster* and its afferent nerves. *J Morphol.* 1971;134(4):437–45.
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 1999;59(1):59–65.
- Almeida FA, Suzuki M, Scarborough RM, Lewicki JA, Maack T. Clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor in rats. *Am J Physiol.* 1989;256(2 Pt 2):R469-75.
- Andrews SJ, Das D, Anstey KJ, Eastel S. Late Onset Alzheimer's Disease Risk Variants in Cognitive Decline: The PATH Through Life Study. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(2):423–36.
- Apostolova LG, Risacher SL, Duran T, Stage EC, Goukasian N, West JD, et al. Associations of the Top 20 Alzheimer Disease Risk Variants With Brain Amyloidosis. *JAMA Neurol.* 2018;75(3):328–41.
- Audo I, Bujakowska K, Orhan E, El Shamieh S, Sennlaub F, Guillonneau X, et al. The familial dementia gene revisited: a missense mutation revealed by whole-exome sequencing identifies ITM2B as a candidate gene underlying a novel autosomal dominant retinal dystrophy in a large family. *Hum Mol Genet.* 2014;23(2):491–501.
- Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N, Emma F, Goldstein SL, editors. *Pediatric Nephrology*. 7th ed. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
- Bagga A, Mudigoudar BD, Hari P, Vasudev V. Enalapril dosage in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2004;19(1):45–50.
- Bao S, Fischbach K-F, Corbin V, Cagan RL. Preferential adhesion maintains separation of ommatidia in the *Drosophila* eye. *Dev Biol.* 2010;344(2):948–56.
- Bechtel W, Helmstädter M, Balica J, Hartleben B, Kiefer B, Hrnjic F, et al. Vps34 deficiency reveals the importance of endocytosis for podocyte homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2013;24(5):727–43.
- Bechtel W, Helmstädter M, Balica J, Hartleben B, Schell C, Huber TB. The class III phosphatidylinositol 3-kinase PIK3C3/VPS34 regulates endocytosis and autophagosome-autolysosome formation in podocytes. *Autophagy.* 2013;9(7):1097–9.
- Beck LH, Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int.* 2010;77(9):765–70.
- Behrens EM, Gadue P, Gong S-y, Garrett S, Stein PL, Cohen PL. The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur J Immunol.* 2003;33(8):2160–7.

Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;15(6):1382–91.

Beyenbach KW, Skaer H, Dow JAT. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu Rev Entomol*. 2010;55:351–74.

Bledzka K, Bialkowska K, Sossey-Alaoui K, Vaynberg J, Pluskota E, Qin J, Plow EF. Kindlin-2 directly binds actin and regulates integrin outside-in signaling. *J Cell Biol*. 2016;213(1):97–108.

Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2000;24(4):349–54.

Braam B, Joles JA, Danishwar AH, Gaillard CA. Cardiorenal syndrome--current understanding and future perspectives. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(1):48–55.

Braden GL, Mulhern JG, O'Shea MH, Nash SV, Ucci AA, Germain MJ. Changing incidence of glomerular diseases in adults. *Am J Kidney Dis*. 2000;35(5):878–83.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993;118(2):401–15.

Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol*. 1999;162(6):3498–503.

Carrero JJ, Evans M, Szummer K, Spaak J, Lindhagen L, Edfors R, et al. Warfarin, kidney dysfunction, and outcomes following acute myocardial infarction in patients with atrial fibrillation. *JAMA*. 2014;311(9):919–28.

Chang HC, Newmyer SL, Hull MJ, Ebersold M, Schmid SL, Mellman I. Hsc70 is required for endocytosis and clathrin function in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2002;159(3):477–87.

Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysert F, Pottiez V, Deloison G, et al. Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol*. 2017;133(6):955–66.

Chen J, Chen MX, Fogo AB, Harris RC, Chen J-K. mVps34 deletion in podocytes causes glomerulosclerosis by disrupting intracellular vesicle trafficking. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(2):198–207.

Chen X, Agate RJ, Itoh Y, Arnold AP. Sexually dimorphic expression of trkB, a Z-linked gene, in early posthatch zebra finch brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(21):7730–5.

Chien S, Reiter LT, Bier E, Gribskov M. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):149–51.

Chintapalli VR, Wang J, Dow JAT. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet*. 2007;39(6):715–20.

Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, et al. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences*. 1998;23(8):281–2.

- Choi S-I, Vidal R, Frangione B, Levy E. Axonal transport of British and Danish amyloid peptides via secretory vesicles. *FASEB J.* 2004;18(2):373–5.
- Cil O, Besbas N, Duzova A, Topaloglu R, Peco-Antić A, Korkmaz E, Ozaltin F. Genetic abnormalities and prognosis in patients with congenital and infantile nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(8):1279–87.
- Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, et al. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest.* 1986;78(5):1362–74.
- Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RAS, et al. Delayed Apoptotic Cell Clearance and Lupus-like Autoimmunity in Mice Lacking the c-mer Membrane Tyrosine Kinase. *J Exp Med.* 2002;196(1):135–40.
- Crossley AC. The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect: *Calliphora erythrocephala*. *Tissue and Cell.* 1972;4(3):529–60.
- Cullen M, Elzarrad MK, Seaman S, Zudaire E, Stevens J, Yang MY, et al. GPR124, an orphan G protein-coupled receptor, is required for CNS-specific vascularization and establishment of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(14):5759–64.
- Del Campo M, Teunissen CE. Role of BRI2 in dementia. *J Alzheimers Dis.* 2014;40(3):481–94.
- Deleersnijder W, Hong G, Cortvrindt R, Poirier C, Tylzanowski P, Pittois K, et al. Isolation of Markers for Chondro-osteogenic Differentiation Using cDNA Library Subtraction. *J. Biol. Chem.* 1996;271(32):19475–82.
- Denholm B, Skaer H. Bringing together components of the fly renal system. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(5):526–32.
- Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol.* 2001;21(14):4829–36.
- Duncan N, Dhaygude A, Owen J, Cairns TDH, Griffith M, McLean AG, et al. Treatment of focal and segmental glomerulosclerosis in adults with tacrolimus monotherapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(12):3062–7.
- Dworak HA, Charles MA, Pellerano LB, Sink H. Characterization of *Drosophila hibris*, a gene related to human nephrin. *Development.* 2001;128(21):4265–76.
- Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res.* 1988;62(2):191–5.
- Ellison JA, Velier JJ, Spera P, Jonak ZL, Wang X, Barone FC, Feuerstein GZ. Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke.* 1998;29(8):1698-706; discussion 1707.
- Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med.* 2008;14(9):931–8.

- Feng W, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM, Vollrath D. Merck triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002;277(19):17016–22.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806–11.
- Fleischer A, Ayllon V, Rebollo A. ITM2BS regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. *Eur J Immunol.* 2002;32(12):3498–505.
- Fleischer A, Rebollo A. Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. *FEBS Letters.* 2004;557(1-3):283–7.
- Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. *Lancet.* 2016;387(10032):2036–48.
- Fotinopoulou A, Tsachaki M, Vlavaki M, Pouloupoulos A, Rostagno A, Frangione B, et al. BRI2 interacts with amyloid precursor protein (APP) and regulates amyloid beta (Abeta) production. *J. Biol. Chem.* 2005;280(35):30768–72.
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol.* 2007;9(2):139–48.
- Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, et al. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 1988;263(19):9395–401.
- Gagliardini E, Conti S, Benigni A, Remuzzi G, Remuzzi A. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2010;21(12):2081–9.
- García-Alvarez B, Pereda JM de, Calderwood DA, Ulmer TS, Critchley D, Campbell ID, et al. Structural Determinants of Integrin Recognition by Talin. *Molecular Cell.* 2003;11(1):49–58.
- Garin EH, Orak JK, Hiott KL, Sutherland SE. Cyclosporine therapy for steroid-resistant nephrotic syndrome. A controlled study. *Am J Dis Child.* 1988;142(9):985–8.
- Gbadegesin RA, Hall G, Adeyemo A, Hanke N, Tossidou I, Burchette J, et al. Mutations in the gene that encodes the F-actin binding protein anillin cause FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2014;25(9):1991–2002.
- Gigante M, Piemontese M, Gesualdo L, Iolascon A, Aucella F. Molecular and genetic basis of inherited nephrotic syndrome. *Int J Nephrol.* 2011;2011:792195.
- Gipson DS, Massengill SF, Yao L, Nagaraj S, Smoyer WE, Mahan JD, et al. Management of childhood onset nephrotic syndrome. *Pediatrics.* 2009;124(2):747–57.
- Gipson DS, Troost JP, Lafayette RA, Hladunewich MA, Trachtman H, Gadegbeku CA, et al. Complete Remission in the Nephrotic Syndrome Study Network. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(1):81–9.
- Glasscock RJ. Prophylactic anticoagulation in nephrotic syndrome: a clinical conundrum. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2007;18(8):2221–5.

Glombik MM, Krömer A, Salm T, Huttner WB, Gerdes HH. The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *EMBO J.* 1999;18(4):1059–70.

Goumenos DS, Tsagalis G, El Nahas AM, Shortland JR, Davlouros P, Vlachojannis JG, Brown CB. Immunosuppressive treatment of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis: a five-year follow-up study. *Nephron Clin Pract.* 2006;104(2):c75-82.

Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ.* 1994;5(6):647–57.

Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(10):587–98.

Guttridge KL, Luft JC, Dawson TL, Kozłowska E, Mahajan NP, Varnum B, Earp HS. Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J. Biol. Chem.* 2002;277(27):24057–66.

Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis.* 1997;30(5):621–31.

Hamasaki Y, Yoshikawa N, Hattori S, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, et al. Cyclosporine and steroid therapy in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(11):2177–85.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000;404(6775):293–6.

Harburger DS, Bouaouina M, Calderwood DA. Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *J. Biol. Chem.* 2009;284(17):11485–97.

Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Köbler S, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1084–96.

Has C, Castiglia D, del Rio M, Diez MG, Piccinni E, Kiritsi D, et al. Kindler syndrome: extension of FERMT1 mutational spectrum and natural history. *Hum Mutat.* 2011;32(11):1204–12.

Helmstädter M, Simons M. Using *Drosophila* nephrocytes in genetic kidney disease. *Cell Tissue Res.* 2017;369(1):119–26.

Hermle T, Braun DA, Helmstädter M, Huber TB, Hildebrandt F. Modeling Monogenic Human Nephrotic Syndrome in the *Drosophila* Garland Cell Nephrocyte. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2017;28(5):1521–33.

Hollande A. La cellule péricardiale des insectes. *Cytologie, histochemie, role physiologique.* *Archiv Anat Mic.* 1921;18:85–307.

Hsu H-H, Hoffmann S, Endlich N, Velic A, Schwab A, Weide T, et al. Mechanisms of angiotensin II signaling on cytoskeleton of podocytes. *J Mol Med.* 2008;86(12):1379–94.

- Hsu RK, Powe NR. Recent trends in the prevalence of chronic kidney disease: not the same old song. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26(3):187–96.
- Hu Y, Flockhart I, Vinayagam A, Bergwitz C, Berger B, Perrimon N, Mohr SE. An integrative approach to ortholog prediction for disease-focused and other functional studies. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:357.
- Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J. Biol. Chem*. 2001;276(45):41543–6.
- Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(3):211–6.
- Huber TB, Hartleben B, Kim J, Schmidts M, Schermer B, Keil A, et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol*. 2003;23(14):4917–28.
- Ikeda Y, Imai Y, Kumagai H, Nosaka T, Morikawa Y, Hisaoka T, et al. Vasin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10732–7.
- Ingulli E, Singh A, Baqi N, Ahmad H, Moazami S, Tejani A. Aggressive, long-term cyclosporine therapy for steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1995;5(10):1820–5.
- Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int*. 2001;59(3):1003–12.
- Itoh H, Suga S, Ogawa Y, Tanaka I, Nakao K. Molecular biology and pharmacology of natriuretic peptide system. *Nippon Rinsho*. 1993;51(6):1548–56
- Jaber N, Zong W-X. Class III PI3K Vps34: essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1280:48–51.
- Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(1):F111-6.
- Ji Y, Shen M, Wang X, Zhang S, Yu S, Chen G, et al. Comparative proteomic analysis of primary schwann cells and a spontaneously immortalized schwann cell line RSC 96: a comprehensive overview with a focus on cell adhesion and migration related proteins. *J Proteome Res*. 2012;11(6):3186–98.
- Juhász G, Hill JH, Yan Y, Sass M, Baehrecke EH, Backer JM, Neufeld TP. The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2008;181(4):655–66.
- Kametaka S, Okano T, Ohsumi M, Ohsumi Y. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 1998;273(35):22284–91.
- Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*. 2000;24(3):251–6.

- Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein—Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. *Molecular Cell*. 1998;1(4):575–82.
- Khor CC, Do T, Jia H, Nakano M, George R, Abu-Amero K, et al. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for primary angle closure glaucoma. *Nat Genet*. 2016;48(5):556–62.
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2001;152(3):519–30.
- Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science*. 2003;300(5623):1298–300.
- Kobayashi N. Mechanism of the process formation; podocytes vs. neurons. *Microsc Res Tech*. 2002;57(4):217–23.
- Kodner C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2009;80(10):1129–34.
- Kolibaba KS, Druker BJ. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1997;1333(3):F217-F248.
- Krautzberger AM, Kosiol B, Scholze M, Schrewe H. Expression of vasorin (Vasn) during embryonic development of the mouse. *Gene Expr Patterns*. 2012;12(5-6):167–71.
- Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(4):F333-47.
- Krömer A, Glombik MM, Huttner WB, Gerdes HH. Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *J Cell Biol*. 1998;140(6):1331–46.
- Kuijpers TW, van de Vijver E, Weterman MAJ, Boer M de, Tool ATJ, van den Berg TK, et al. LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood*. 2009;113(19):4740–6.
- Kumar JP. Building an ommatidium one cell at a time. *Dev Dyn*. 2012;241(1):136–49.
- Lai C, Lemke G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron*. 1991;6(5):691–704.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2013;45(12):1452–8.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860–921.
- Lee BT, Ahmed FA, Hamm LL, Teran FJ, Chen C-S, Liu Y, et al. Association of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 with chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2015;16:77.

- Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):327–36.
- Lewko B, Gołos M, Latawiec E, Angielski S, Stepinski J. Regulation of cGMP synthesis in cultured podocytes by vasoactive hormones. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(4):599–610.
- Li H, Lemay S, Aoudjit L, Kawachi H, Takano T. SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;15(12):3006–15.
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*. 1998;72(11):8586–96.
- Liang XH, Yu J, Brown K, Levine B. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res*. 2001;61(8):3443–9.
- Lindmo K, Brech A, Finley KD, Gaumer S, Contamine D, Rusten TE, Stenmark H. The PI 3-kinase regulator Vps15 is required for autophagic clearance of protein aggregates. *Autophagy*. 2008;4(4):500–6.
- Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Nephrin and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*. 2003;112(2):209–21.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*. 2005;121(4):567–77.
- Lote CJ. Principles of renal physiology. 4th ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publ; 2000.
- Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001;293(5528):306–11.
- Ma Y-Q, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol*. 2008;181(3):439–46.
- Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science*. 1987;238(4827):675–8.
- Macdonald JM, Doherty J, Hackett R, Freeman MR. The c-Jun kinase signaling cascade promotes glial engulfment activity through activation of draper and phagocytic function. *Cell Death Differ*. 2013;20(9):1140–8.
- Malapeira J, Esselens C, Bech-Serra JJ, Canals F, Arribas J. ADAM17 (TACE) regulates TGFβ signaling through the cleavage of vasorin. *Oncogene*. 2011;30(16):1912–22.
- Mandal L, Banerjee U, Hartenstein V. Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet*. 2004;36(9):1019–23.
- M'Angale PG, Staveley BE. Inhibition of Atg6 and Pi3K59F autophagy genes in neurons decreases lifespan and locomotor ability in *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res* 2016.

- Marcora MS, Fernández-Gamba AC, Avendaño LA, Rotondaro C, Podhajcer OL, Vidal R, et al. Amyloid peptides ABri and ADan show differential neurotoxicity in transgenic *Drosophila* models of familial British and Danish dementia. *Mol Neurodegener.* 2014;9:5.
- Martins F, Marafona AM, Pereira CD, Müller T, Loosse C, Kolbe K, et al. Identification and characterization of the BRI2 interactome in the brain. *Sci Rep.* 2018;8(1):3548.
- Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000;19(8):1745–54.
- Matsuda S, Giliberto L, Matsuda Y, Davies P, McGowan E, Pickford F, et al. The familial dementia BRI2 gene binds the Alzheimer gene amyloid-beta precursor protein and inhibits amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* 2005;280(32):28912–6.
- Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7403–8.
- McCaffrey J, Lennon R, Webb NJA. The non-immunosuppressive management of childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(9):1383–402.
- McKinney PA, Feltbower RG, Brocklebank JT, Fitzpatrick MM. Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(12):1040–4.
- McKnight NC, Zhong Y, Wold MS, Gong S, Phillips GR, Dou Z, et al. Beclin 1 is required for neuron viability and regulates endosome pathways via the UVRAG-VPS34 complex. *PLoS Genet.* 2014;10(10):e1004626.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004;431(7006):343–9.
- Mekahli D, Liutkus A, Ranchin B, Yu A, Bessenay L, Girardin E, et al. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(8):1525–32.
- Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010;12(9):823–30.
- Mohr SE. RNAi screening in *Drosophila* cells and in vivo. *Methods.* 2014;68(1):82–8.
- Montanez E, Ussar S, Schifferer M, Bösl M, Zent R, Moser M, Fässler R. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 2008;22(10):1325–30.
- Morgan TH. Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science.* 1910;32:120–122.
- Mory A, Feigelson SW, Yarali N, Kilic SS, Bayhan GI, Gershoni-Baruch R, et al. Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood.* 2008;112(6):2591.
- Mundel P. Podocyte Biology and Response to Injury. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2002;13(12):3005–15.
- Muraleedharan S, Sam A, Skaer H, Inamdar MS. Networks that link cytoskeletal regulators and diaphragm proteins underpin filtration function in *Drosophila* nephrocytes. *Exp Cell Res.* 2018;364(2):234–42.

- Na J, Cagan R. The *Drosophila* nephrocyte: back on stage. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(2):161–3.
- Nagata M, Nakayama K-i, Terada Y, Hoshi S, Watanabe T. Cell Cycle Regulation and Differentiation in the Human Podocyte Lineage. *The American Journal of Pathology*. 1998;153(5):1511–20.
- Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L-S, Vardarajan BN, Buross J, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011;43(5):436–41.
- Nashida T, Imai A, Shimomura H. Characterization of natriuretic peptide receptors in the rat parotid. *Biochem Mol Biol Int*. 1996;40(1):111–8.
- Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. *Dictyostelium* macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J. Biol. Chem*. 2004;279(15):15621–9.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005;122(6):927–39.
- Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003;83(1):253–307.
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2190–9.
- Ponticelli C, Rizzoni G, Edefonti A, Altieri P, Rivolta E, Rinaldi S, et al. A randomized trial of cyclosporine in steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 1993;43(6):1377–84.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*. 2006;27(1):47–72.
- Prunotto M, Farina A, Lane L, Pernin A, Schifferli J, Hochstrasser DF, et al. Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. *J Proteomics*. 2013;82:193–229.
- Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet*. 2001;10(1):1–8.
- Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development*. 2008;135(4):609–20.
- Radhakrishnan J, Cattran DC. The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines--application to the individual patient. *Kidney Int*. 2012;82(8):840–56.
- Ramos RG, Igloi GL, Lichte B, Baumann U, Maier D, Schneider T, et al. The irregular chiasm C-roughest locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Genes Dev*. 1993;7(12B):2533–47.
- Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Calvaresi N, Corbelli A, Giardino LA, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J*. 2006;20(7):976–8.

- Ready DF, Hanson TE, Benzer S. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol*. 1976;53(2):217–40.
- Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*. 2005;37(7):739–44.
- Reynolds BC, Pickles CW, Lambert HJ, Ognjanovic M, Crosier J, Johnson SA, Tse Y. Domiciliary administration of intravenous albumin in congenital nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2015;30(11):2045–50.
- Rheault MN, Zhang L, Selewski DT, Kallash M, Tran CL, Seamon M, et al. AKI in Children Hospitalized with Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(12):2110–8.
- Rinschen MM, Schroeter CB, Koehler S, Ising C, Schermer B, Kann M, et al. Quantitative deep mapping of the cultured podocyte proteome uncovers shifts in proteostatic mechanisms during differentiation. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2016;311(3):C404-17.
- Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*. 1974;60(2):423–33.
- Rogalski TM, Mullen GP, Gilbert MM, Williams BD, Moerman DG. The UNC-112 gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane. *J Cell Biol*. 2000;150(1):253–64.
- Rohrbach DH, Timpl R. Molecular and cellular aspects of basement membranes. San Diego: Academic Press; 1993
- Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007;131(6):1124–36.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. 2000;287(5461):2204–15.
- Ruck A, Attonito J, Garces KT, Núñez L, Palmisano NJ, Rubel Z, et al. The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*. 2011;7(4):386–400.
- Ruggenti P, Peticucci E, Cravedi P, Gambarà V, Costantini M, Sharma SK, et al. Role of remission clinics in the longitudinal treatment of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(6):1213–24.
- Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):7962–7.
- Rusten TE, Rodahl LMW, Pattni K, Englund C, Samakovlis C, Dove S, et al. Fab1 phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase controls trafficking but not silencing of endocytosed receptors. *Mol Biol Cell*. 2006;17(9):3989–4001.
- Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, Pabst WL, Gee HY, Kohl S, et al. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;26(6):1279–89.

Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, et al. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(4):F959-70.

Samson WK, Murphy TC, Resch ZT. Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin-derived peptides in conscious rats. *Am J Physiol*. 1998;274(5):R1505-9.

Santín S, Tazón-Vega B, Silva I, Cobo MÁ, Giménez I, Ruíz P, et al. Clinical value of NPHS2 analysis in early- and adult-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(2):344–54.

Sato S, Yanagihara T, Ghazizadeh M, Ishizaki M, Adachi A, Sasaki Y, et al. Correlation of autophagy type in podocytes with histopathological diagnosis of IgA nephropathy. *Pathobiology*. 2009;76(5):221–6.

Schell C, Rogg M, Suhm M, Helmstädter M, Sellung D, Yasuda-Yamahara M, et al. The FERM protein EPB41L5 regulates actomyosin contractility and focal adhesion formation to maintain the kidney filtration barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(23):E4621-E4630.

Schünke M. Hals und innere Organe: 78 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2005.

Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet*. 1974;2(7880):556–60.

Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006;69(12):2131–47.

Shao W-H, Zhen Y, Rosenbaum J, Eisenberg RA, McGaha TL, Birkenbach M, Cohen PL. A protective role of Mer receptor tyrosine kinase in nephrotoxic serum-induced nephritis. *Clin Immunol*. 2010;136(2):236–44.

Sharma R, Lovell HB, Wiegmann TB, Savin VJ. Vasoactive substances induce cytoskeletal changes in cultured rat glomerular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1992;3(5):1131–8.

Sheen J-M, Yu H-R, Tiao M-M, Chen C-C, Huang L-T, Chang H-Y, Tain Y-L. Prenatal dexamethasone-induced programmed hypertension and renal programming. *Life Sci*. 2015;132:41–8.

Shi X, Ma Y-Q, Tu Y, Chen K, Wu S, Fukuda K, et al. The MIG-2/integrin interaction strengthens cell-matrix adhesion and modulates cell motility. *J. Biol. Chem*. 2007;282(28):20455–66.

Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*. 1999;286(5438):312–5.

Shravage BV, Hill JH, Powers CM, Wu L, Baehrecke EH. Atg6 is required for multiple vesicle trafficking pathways and hematopoiesis in *Drosophila*. *Development*. 2013;140(6):1321–9.

Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D, et al. Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):870–7.

Siegel DH, Ashton GHS, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, et al. Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am J Hum Genet.* 2003;73(1):174–87.

Simons M, Huber TB. Flying podocytes. *Kidney Int.* 2009;75(5):455–7.

Soliman NA, Francis M, Heeringa SF, Chernin G. Complete remission of nephrotic syndrome in an infant with focal segmental glomerulosclerosis: is it renin-angiotensin blockade? *Pediatr Nephrol.* 2009;24(5):1065–70.

Sözen MA, Armstrong JD, Yang M, Kaiser K, Dow JA. Functional domains are specified to single-cell resolution in a *Drosophila* epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5207–12.

Staffel J, Valletta D, Federlein A, Ehm K, Volkmann R, Fuchsl AM, et al. Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A in Podocytes is Renoprotective but Dispensable for Physiologic Renal Function. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2017;28(1):260–77.

Stocker H, Gallant P. Getting started : an overview on raising and handling *Drosophila*. *Methods Mol Biol.* 2008;420:27–44.

Storm T, Emma F, Verroust PJ, Hertz JM, Nielsen R, Christensen EI. A patient with cubilin deficiency. *N Engl J Med.* 2011;364(1):89–91.

Suga S, Nakao K, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Ogawa Y, Imura H. Characterization of natriuretic peptide receptors in cultured cells. *Hypertension.* 1992;19(6 Pt 2):762–5.

Suyama K, Kawasaki Y, Miyazaki K, Kanno S, Ono A, Suzuki Y, et al. Rituximab and low-dose cyclosporine combination therapy for steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Int.* 2016;58(3):219–23.

Teoh CW, Robinson LA, Noone D. Perspectives on edema in childhood nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;309(7):F575-82.

Thylefors B, Négrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. *Bull World Health Organ.* 1995;73(1):115–21.

Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 2005;19(5):517–29.

Trautmann A, Bodria M, Ozaltin F, Gheisari A, Melk A, Azocar M, et al. Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(4):592–600.

Trautmann A, Schnaidt S, Lipska-Ziętkiewicz BS, Bodria M, Ozaltin F, Emma F, et al. Long-Term Outcome of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Children. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2017;28(10):3055–65.

Troyanov S, Wall CA, Miller JA, Scholey JW, Cattran DC. Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2005;16(4):1061–8.

Tryggvason K, Wartiovaara J. How does the kidney filter plasma? *Physiology (Bethesda).* 2005;20:96–101.

- Tsachaki M, Serlidaki D, Fetani A, Zarkou V, Rozani I, Ghiso J, Efthimiopoulos S. Glycosylation of BRI2 on asparagine 170 is involved in its trafficking to the cell surface but not in its processing by furin or ADAM10. *Glycobiology*. 2011;21(10):1382–8.
- Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, Wu C. Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation. *Cell*. 2003;113(1):37–47.
- Ussar S, Wang H-V, Linder S, Fässler R, Moser M. The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Exp Cell Res*. 2006;312(16):3142–51.
- Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, et al. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J. Biol. Chem*. 2003;278(23):20716–23.
- Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2007;13(22):3056–62.
- Vidal R, Frangione B, Rostagno A, Mead S, Révész T, Plant G, Ghiso J. A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature*. 1999;399(6738):776–81.
- Vidal R, Revesz T, Rostagno A, Kim E, Holton JL, Bek T, et al. A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(9):4920–5.
- Wahlstedt-Fröberg V, Pettersson T, Aminoff M, Dugué B, Gräsbeck R. Proteinuria in cubilin-deficient patients with selective vitamin B12 malabsorption. *Pediatr Nephrol*. 2003;18(5):417–21.
- Waldman M, Crew RJ, Valeri A, Busch J, Stokes B, Markowitz G, et al. Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(3):445–53.
- Wangler MF, Yamamoto S, Bellen HJ. Fruit flies in biomedical research. *Genetics*. 2015;199(3):639–53.
- Wanner N, Noutsou F, Baumeister R, Walz G, Huber TB, Neumann-Haefelin E. Functional and spatial analysis of *C. elegans* SYG-1 and SYG-2, orthologs of the Neph/nephrin cell adhesion module directing selective synaptogenesis. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23598.
- Wartiovaara J, Ofverstedt L-G, Khoshnoodi J, Zhang J, Mäkelä E, Sandin S, et al. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1475–83.
- Weavers H, Prieto-Sánchez S, Grawe F, Garcia-López A, Artero R, Wilsch-Bräuninger M, et al. The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature*. 2009;457(7227):322–6.
- Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol*. 1991;11(7):3454–62.
- Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*. 2012;22(1):43–61.

- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*. 2001;293(5530):711–4.
- Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell*. 2009;16(3):329–43.
- Yamada E. The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1955;1(6):551–66.
- Yamamoto S, Jaiswal M, Charng W-L, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, et al. A *drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell*. 2014;159(1):200–14.
- Yamamoto-Hino M, Goto S. In Vivo RNAi-Based Screens: Studies in Model Organisms. *Genes (Basel)*. 2013;4(4):646–65.
- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010;12(9):814–22.
- Yaoita E, Kurihara H, Sakai T, Ohshiro K, Yamamoto T. Phenotypic modulation of parietal epithelial cells of Bowman's capsule in culture. *Cell Tissue Res*. 2001;304(3):339–49.
- Yasuda-Yamahara M, Rogg M, Frimmel J, Trachte P, Helmstaedter M, Schroder P, et al. FERMT2 links cortical actin structures, plasma membrane tension and focal adhesion function to stabilize podocyte morphology. *Matrix Biol*. 2018;68-69:263–79.
- Yi Z, Li Z, Wu X-C, He Q-N, Dang X-Q, He X-J. Effect of fosinopril in children with steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2006;21(7):967–72.
- Ypsilanti AR, Zagar Y, Chédotal A. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development*. 2010;137(12):1939–52.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi. *Cell*. 2000;101(1):25–33.
- Zeng C, Fan Y, Wu J, Shi S, Chen Z, Zhong Y, et al. Podocyte autophagic activity plays a protective role in renal injury and delays the progression of podocytopathies. *J Pathol*. 2014;234(2):203–13.
- Zhang F, Zhao Y, Chao Y, Muir K, Han Z. Cubilin and amnionless mediate protein reabsorption in *Drosophila* nephrocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(2):209–16.
- Zhen Y, Priest SO, Shao W-H. Opposing Roles of Tyrosine Kinase Receptors Mer and Axl Determine Clinical Outcomes in Experimental Immune-Mediated Nephritis. *J Immunol*. 2016;197(6):2187–94.
- Zhuang S, Shao H, Guo F, Trimble R, Pearce E, Abmayr SM. Sns and Kirre, the *Drosophila* orthologs of Neph1 and Neph3, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. *Development*. 2009;136(14):2335–44.

## IX. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

**Ergebnisse dieser Dissertation sind Bestandteil der folgenden Publikation:**

Yasuda-Yamahara M, Rogg M, Frimmel J, **Trachte P**, Helmstaedter M, Schroder P, Schiffer M, Schell C, Huber TB. FERMT2 links cortical actin structures, plasma membrane tension and focal adhesion function to stabilize podocyte morphology. *Matrix Biol.* 2018;68-69:263–79. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.003.

## X. DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit der Promotion gilt Prof. Dr. Tobias B. Huber mein herzlichster Dank. Auf Scharfsinn und schnelle Reaktion war steter Verlass. Die Gelegenheit zur Erweiterung des eigenen Blickes in einem hochmotivierten Team wird mich zeitlebens positiv begleiten.

Prof. Dr. Klaus Männer danke ich herzlichst für das Interesse, für die Zuverlässigkeit und für die Begleitung im Rahmen der veterinärmedizinischen Übernahme des Erstgutachtens meiner Arbeit. Gleichmaßen möchte ich mich bei PD Dr. Christoph Gabler für die gewissenhafte Übernahme des Drittgutachtens bedanken.

Dr. Martin Helmstädter danke ich vielmals für die Gestaltungsfreiheit und für die vertrauensvolle Zusammenarbeit im Rahmen der Betreuung der experimentellen Phase dieser Arbeit sowie für alle Rücksprachemöglichkeiten im Laufe der schriftlichen Anfertigung.

Ein gemeinsamer Dank gilt Dr. Nicola Wanner und Dr. Martin Helmstädter für die Organisation im ZBSA. Für die telefonische Erreichbarkeit zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen spreche ich vielmals PD Dr. Florian Grahammer und Dr. Tillmann Bork meinen Dank aus. Ebenso danke ich Dr. Mako Yasuda-Yamahara für den interessanten Austausch und die Möglichkeit jederzeit Rückfragen zu stellen. Mein Dank gilt ebenso Dr. Dr. Christoph Schell und Dr. Pierre-Louis Tharaux. Vielen Dank an jene Kolleginnen und Kollegen, die durch berufliche sowie menschliche Gespräche Fußstapfen auf meinem Weg wertvoller Begegnungen hinterlassen haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern,  
denen diese Dissertation in Liebe gewidmet ist.  
Euren Schatz über die wahren Werte trage ich in mir.

Für die väterliche Freundschaft und die familiäre Rückendeckung auf allen Pfaden, die in ihrer Bedeutung für mich nicht auszudrücken sind, danke ich Hans August von Herzen.  
Mein inniger Dank für die wertvollen Traditionen und für jede einzelne Erinnerung gilt meinen Großeltern Witte in Hochachtung.  
Vielfachen Dank an jene Freunde der Familie, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Meiner Frau Rocio Maricel danke ich in ewiger Liebe für Ihre Seelenverbundenheit.  
Vielen Dank für Deine Stärke, Deinen Freigeist und Deine Wärme - in allen Lebenslagen.  
Nicht zuletzt für Deine fachliche Unterstützung und Diskussionsmöglichkeit meiner Arbeit.

## **XI. LEBENSLAUF**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **XII. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 15.06.2020

Philipp Trachte