



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Transgene Überexpression von TGF- β Rezeptoren in Podozyten der Ratte

Autor: Rebecca Walz
Institut / Klinik: Zentrum für Medizinische Forschung
Doktorvater: Prof. Dr. N. Gretz

TGF- β spielt aufgrund seiner stark profibrotischen Eigenschaften eine Schlüsselrolle bei der Progression chronischer Nierenerkrankungen. *In-vitro* Studien zeigten, dass TGF- β auch entscheidend das Schicksal glomerulärer Podozyten bestimmt, indem es apoptotische und survival pathways reguliert. Die Bedeutung von TGF- β für die Podozytenfunktion im Rahmen pathogener Prozesse ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Die podozytenspezifische Überexpression von TGF- β Rezeptoren kann einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung molekularer TGF- β abhängiger Mechanismen, welche zum chronischen Nierenversagen führen, liefern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die *in-vivo* Funktion von TGF- β in Podozyten untersucht.

Mittels pronukleärer Mikroinjektion in fertilisierte Eizellen von Sprague Dawley Ratten wurden vier unabhängige transgene Rattenlinien generiert, die den nativen TGF- β II Rezeptor (TGRPdT β R11-His/385 und TGRPdT β R11-His/389) beziehungsweise einen konstitutiv aktiven TGF- β I Rezeptor (TGRPdTAlk5-mut-HA/383 und TGRPdTAlk5-mut-HA/391) unter Kontrolle des Podocinpromotors spezifisch in Podozyten überexprimieren.

Die Transgenexpression wurde mittels quantitativer RT-PCR und Westernblot quantifiziert, die spezifische Transgenexpression in den glomerulären Podozyten mittels In-Situ Hybridisierung verifiziert. Die transgenen Linien TGRPdT β R11-His/385 und TGRPdTAlk5-mut-HA/383 zeigten sowohl auf RNA- als auch Proteinniveau die jeweils höchste Transgenexpression und wurden für weiterführende Untersuchungen verwendet.

Wachstum und Entwicklung waren in beiden transgenen Rattenlinien normal. In der Linie TGRPdTAlk5-mut-HA/383 entwickelten 83 %, in der Linie TGRPdT β R11-His/385 40 % der Männchen im Alter von fünf Monaten eine Albuminurie mit einer maximalen Albuminausscheidung im 24 h Urin von 21 mg/24h (TGRPdTAlk5-mut-HA/383) und 2,2 mg/24h (TGRPdT β R11-His/385).

Die stärkere Ausprägung des klinischen Phänotyps in der Linie TGRPdTAlk5-mut-HA/383 wurde auf die Unabhängigkeit des transgenen konstitutiv aktiven Alk5 Rezeptors von der lokalen TGF- β Konzentration zurückgeführt. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung des transgenen nativen TGF- β II Rezeptors in der Linie TGRPdT β R11-His/385 von der lokalen TGF- β Konzentration abhängig. In Tieren dieser Linie wurde deshalb ein STZ-Diabetes induziert, um die lokale glomeruläre TGF- β Konzentration zu steigern, was zur Folge hatte, dass transgene Männchen der Linie TGRPdT β R11-His/385 unter der diabetischen Stoffwechsellage früher eine Albuminurie als Wildtypatten entwickelten, die zudem in diesen Transgenen stärker ausgeprägt war.

Morphometrische Untersuchungen zeigten bereits im Alter von acht Wochen eine reduzierte Podozytenzahl pro Glomerulus in transgenen Tieren die mit einer verringerten Podozytendichte assoziiert war. Dies ist vermutlich auf eine erhöhte glomeruläre Apoptoserate in den transgenen Ratten zurückzuführen, was mittels TUNEL Assay belegt werden konnte.

Verschiedene Gene des TGF- β Signalwegs wurden in Glomeruli sechs Monate alter Tiere (Wildtyp und TGRPdTAlk5-mut-HA/383) mittels quantitativer RT-PCR untersucht. In Transgenen lagen die Expressionen der TGF- β Zielgene P21 und Pai1 im Gegensatz zum Wildtyp mehr als viermal, beziehungsweise dreimal höher. Die Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 war stark

vermindert, sodass das Verhältnis der proapoptischen Gene P53 und Bax zu Bcl-2 stark erhöht war. Interessant war hierbei die Tatsache, dass der Grad der Albuminausscheidung in den einzelnen Tieren mit diesem Verhältnis zu korrelieren schien.

Die glomeruläre Expression der podozytenspezifischen Gene Synaptopodin, Podocin und Nephrin relativiert auf GAPDH als auch zum Podozytenmarker WT-1 war in der Linie TGRPodAlk5-mut-HA/383 im Vergleich zu nicht transgenen Wurfgeschwistern signifikant vermindert, während sich die Expression von Cd2ap, VEGF und Smad7 nicht unterschied. Es ist bekannt, dass Mutationen beziehungsweise Knockout von Synaptopodin, Podocin und Nephrin zu massiven glomerulären Schäden und zur Albuminurie führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig *in-vivo*, dass die TGF- β Signaltransduktion in Podozyten maßgeblich Podozytenschäden initiieren und zum Fortschreiten glomerulärer Erkrankungen sowie der diabetischen Nephropathie beitragen kann.