Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)

im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung des Kollagenrezeptors α2β1- Integrin bei der Pathogenese und Prävention der Nierenfibrose in hereditären Typ- IV- Kollagenerkrankungen

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg- August- Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Maria Martin
aus
Leinefelde

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD. Dr. med. O. Gross

II. Berichterstatter/in: PD Dr. rer. nat. Hagos

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Mai 2011

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen einer Einzelförderung als DFG Projekt GR 1852/4-1 „Bedeutung der Kollagenrezeptoren DDR1 und α2β1- Integrin bei der Pathogenese und Prävention der Nierenfibrose in hereditären Typ- IV- Kollagen- Erkrankungen“ unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 KOLLAGEN TYP IV 1

1.1.1 GRUNDSTRUKTUR DER KOLLAGENE 1

1.1.2 MOLEKULAR- UND SUPRASTRUKTUR DES TYP- IV- KOLLAGENS 2

1.1.3 VERTEILUNG DER KOLLAGEN- IV- NETZWERKE 5

1.1.4 TYP- IV- KOLLAGENGENE 6

1.2 HEREDITÄRE KOLLAGEN- IV- BEDINGTE ERKRANKUNGEN 6

1.2.1 ALPORT- SYNDROM UND FAMILIÄRE BENIGNE HÄMATURIE (FBH) 6

1.2.2 GOODPASTURE- SYNDROM 8

1.2.3 DIABETISCHE NEPHROPATHIE 10

1.2.4 ANDERE KOLLAGEN- IV- ERKRANKUNGEN 11

1.2.5 PATHOPHYSIOLOGIE PROGRESSIVER NEPHROPATHIEN 13

1.2.5.1 Der Einstieg in den Kreislauf der Fibrose 13

1.2.5.2 Die Rolle der Podozyten 15

1.2.5.3 Die gemeinsame Endstrecke 16

1.3 INTEGRINE 17

1.3.1 GRUNDSTRUKTUR UND FUNKTIONEN 17

1.3.2 INTEGRIN α2β1 18

1.3.2.1 Aufbau 18

1.3.2.2 Expression in der Niere 20

1.3.2.3 Mechanismus der Kollagen- IV- Bindung 20

1.3.2.4 Beispiele wichtiger Signaltransduktionswege 22

1.3.2.5 Auswirkungen des Verlustes der α2- bzw. β1- Untereinheit 25

1.4. DAS ALPORT- MAUSMODELL 26

1.4.1 EIGENSCHAFTEN DES ALPORT- MAUSMODELLS 26

1.4.2 EINFLUSS VERSCHIEDENER GENETISCHER HINTERGRÜNDE AUF DEN KLINISCHEN VERLAUF UND DAS HISTOLOGISCHE BILD 27

1.5 HYPOTHESE 29

2 MATERIAL UND METHODEN 30

2.1 MATERIAL 30
2.1.1 GERÄTE 30
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN 31
2.1.3 CHEMIKALIEN 31
2.1.4 LÖSUNGEN UND PUFFER 32
2.1.5 ANTIKÖRPER 33
2.1.6 ENZYME, PROTEINE, NUKLEOTIDE UND SERA 34
2.1.7 MOLEKULARGEWICHTSMARKER 35
2.1.8 PCR- KIT 35
2.1.9 TIERSTAMM 36
2.1.10 HARD- UND SOFTWARE 36
2.2 METHODEN 37
2.2.1 PCR- AMPLIFIKATION UND AGAROSEGELELEKTROPHORESE 37
2.2.2 SDS- POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS- PAGE) 41
2.2.2.1 Probengewinnung 42
2.2.2.2 Proteinfällung 43
2.2.2.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese 43
2.2.2.4 Coomassie- Brillantblau- Färbung 44
2.2.3 HARNSTOFFANALYSE 45
2.2.4 HÄMATOXYLIN- EOSIN- FÄRBUNG 46
2.2.4.1 Anfertigung der histologischen Schnitte 46
2.2.5 IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE 47
2.2.5.1 Lamininfärbung 48
2.2.6 COMPUTERTOMOGRAFIE 50

3 ERGEBNISSE 51

3.1 GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE 51
3.2 GESAMTÜBERLEBEN 52
3.3 URINANALYTIK 54
3.4 HARNSTOFFBESTIMMUNG 66

3.5 HÄMATOXYLIN- EOSIN- FÄRBUNG **68**

3.6 IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE **72**

3.7 COMPUTERTOMOGRAFIE **82**

4 DISKUSSION **85**

4.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE **85**

4.2 EINORDNUNG DER ERGEBNISSE IN DEN KONTEXT VORHANDENER ERKENNTNISSE **94**

4.3 BEDEUTUNG DER ARBEIT UND AUSBLICK **101**

5 ZUSAMMENFASSUNG **104**

6 LITERATURVERZEICHNIS **106**

7 ANHANG **118**

Abbildungsverzeichnis **118**

Tabellenverzeichnis **119**

Abkürzungsverzeichnis **120**

Verwendete Einheiten und Symbole **122**

Veröffentlichungen zum Thema der Dissertation **123**

1 Einleitung

1.1 Kollagen Typ IV

Kollagen ist mit einem Anteil von etwa 30% das häufigste Protein des menschlichen Körpers. Es kommt nahezu ubiquitär im Organismus vor. Mit 6 kp/mm^2 überwiegt die Zugfestigkeit pro Masse die des Stahls (Schiebler 1996). Aufgrund seiner herausragenden mechanischen Eigenschaften hat Kollagen als Bestandteil der extrazellulären Matrix des Bindegewebes, der Gefäßwände und Basalmembranen, in Haut, Sehnen, Bändern, Knochen, in Cornea und Glaskörper des Auges und in vielen anderen Geweben vor allem eine strukturgebende und stützende Funktion. Eine entscheidende Rolle spielen die Moleküle aber insbesondere auch als Liganden an Rezeptoren der Zelle bei der Vermittlung von Signalkaskaden, die Zellfunktionen, Wachstums- und Differenzierungsprozesse beeinflussen (Deutzmann et al. 2003). Ein Beispiel ist die Interaktion von Typ- IV- Kollagen mit Integrinen der Zelle unter Induktion eines fibrotischen Umbaus, z.B. in der Niere, wie sie in der folgenden Arbeit beschrieben wird.

1.1.1 Grundstruktur der Kollagene

Kollagene bestehen aus drei Polypeptid- (α-) ketten, die ein Protomer bilden. Sie können gleich (Homotrimer) oder verschieden (Heterotrimer) aufgebaut sein (Abb. 1.3 A). Das darin enthaltene, allen Kollagenen gemeinsame, stereochemische Merkmal ist die Tripelhelix als essentielles Strukturelement. Bedingt durch die helikale Konformation ist jede dritte Aminosäure dort Glyzin ($[Gly – X – Y]_n$). In den anderen Positionen finden sich häufig Prolin und Hydroxyprolin. Als kleinste bekannte Aminosäure ist nur Glyzin geeignet, die Position im Inneren der Helix auszufüllen (Abb. 1.1). Hier auftretende Mutationen können die fehlerfreie Faltung der Tripelhelix stören. Die Länge der helikalen Abschnitte variiert zwischen den einzelnen Kollagentypen, ebenso wie der Aufbau und die Anzahl von nicht tripelhelikalen Anteilen und globulären Domänen als weiteren Hauptelementen. Durch Aggregation bestimmter Abschnitte der Protomere bilden sich bei einigen Kollagengruppen fibrilläre (z.B. Kollagen I, II, III) oder netzwerkähnliche (z.B. Kollagen IV, VIII, X) Suprastrukturen (Deutzmann et al. 2003).

Die Zahl der bekannten Kollagene wächst kontinuierlich an, ebenso wie die der bekannten Störungen und daraus resultierenden Erkrankungen. So konnte erst 2007 Kollagen XXIX gefunden werden, das vor allem in der Epidermis und Lunge sowie im Gastrointestinaltrakt vorkommt. Ihm wird in der derzeitigen Diskussion eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krankheiten des atopischen Formenkreises, sowie von Nahrungsmittelallergien zugeschrieben (Söderhäll et al. 2007).

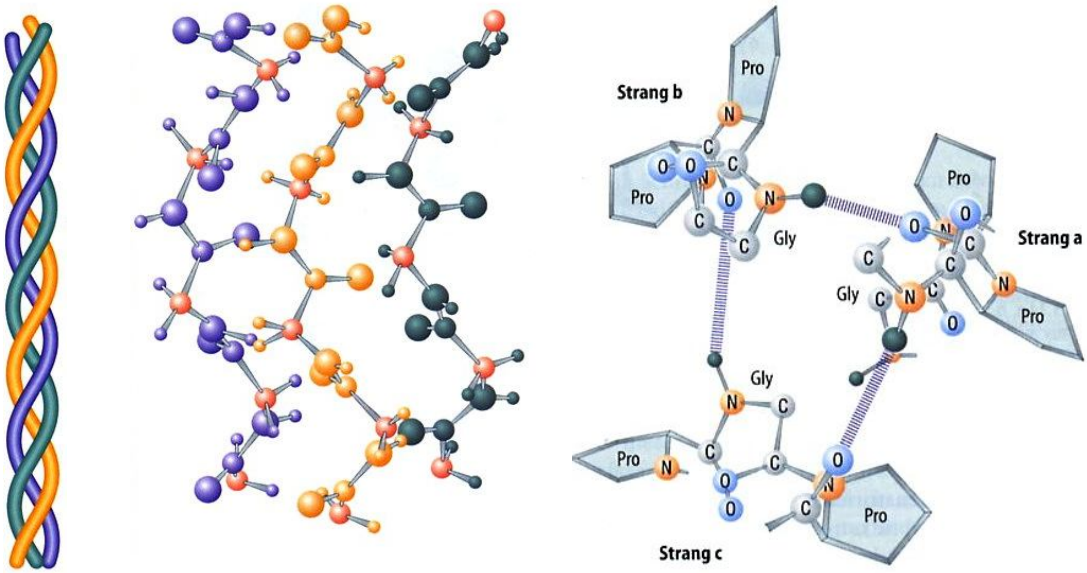


Abb. 1.1 Struktur der Kollagentripelhelix (Deutzmann et al. 2003, S. 76)

1.1.2 Molekular- und Suprastruktur des Typ- IV- Kollagens

Kollagen Typ IV wurde 1966 erstmals von Nicolas Kefalides in der glomerulären Basalmembran (GBM) von Hunden beschrieben. Seine Analysen hatten dort einen, zu den bis dahin bekannten Kollagentypen passenden, Anteil an Glyzin und Prolin ergeben. In Kombination mit der bereits zuvor von ihm aus Röntgendiffraktionsanalysen gewonnenen Erkenntnis des Vorkommens einer tripelhelikalen Struktur in Basalmembranen schloss er auf das Vorhandensein eines neuartigen Kollagens. Dieses unterschied sich insbesondere durch seinen hohen Gehalt an Hydroxyprolinen und -lysinen von den bisher bekannten Typen (Kefalides 1966). Im Laufe der Zeit wurden immer neue Details der Struktur des Typ- IV- Kollagens bekannt. Bisher konnten sechs verschiedene Polypeptidketten α1 (IV) - α6 (IV) identifiziert werden (Khoshnoodi et al. 2008). Ihre molekularen Eigenschaften zeigt Tabelle 1.1.

	α1	α2	α3	α4	α5	α6
Genlokalisation auf Chromosom	13	13	2	2	X	X
Aminosäuren nach Translation	1669	1712	1670	1690	1685	1691
Aminosäuren der fertigen Kette	1642	1676	1652	1652	1659	1670
Aminosäuren der Tripelhelix	1413	1449	1410	1421	1430	1417
Aminosäuren der NC1- Domäne	229	227	232	231	229	228
Unterbrechungen der Tripelhelix	21	23	23	26	22	25
Zysteinreste der NC1- Domäne	12	12	12	12	12	12
Zysteinreste 7S und Tripelhelix	8	9	12	20	8	9

Tab. 1.1 Eigenschaften der Kollagen- Typ- IV- α- Ketten (nach Khoshnoodi et al. 2008, S. 359)

Die drei essentiellen Elemente jeder α(IV)- Kette sind (Hudson et al. 1993):

1. die zirka 15 Aminosäuren lange N- terminale 7S- Domäne
2. die etwa 1400 Aminosäuren umfassende kollagentypische Tripelhelix mit $[Gly – X – Y]_n$ Sequenz und
3. die aus rund 230 Aminosäuren zusammengesetzte globuläre Domäne (***n**on **c**ollagenous*, NC1) am C- Terminus des Moleküls.

Am N - terminalen Ende jeder α (IV)- Kette befindet sich eine tripelhelikale Domäne, die durch ihre ausgeprägte Resistenz gegen den Verdau durch bakterielle Kollagenasen und eine Temperaturbeständigkeit bis zu 70°C auffällt. Diese Eigenschaften können durch den hohen Gehalt an Zystein und Disulfidbrückenbindungen erklärt werden (Timpl et al. 1979). Je vier Protomere verbinden sich, mit Hilfe der nach dem Sedimentationskoeffizienten als 7S- Domäne benannten Struktur, über Lysin – Hydroxylysin- und Disulfidbrückenbindungen zu einem Tetramer (Kühn et al. 1981). Die $[Gly – X – Y]_n$ Sequenz der zentralen Tripelhelix ist an mehreren Stellen unterbrochen. Die Zahl dieser charakteristischen Unterbrechungen reicht von 21 in den α1(IV)- Ketten bis zu 26 bei α4(IV). Sie dienen der Steigerung der molekularen Flexibilität bei der Ausbildung von Netzwerken (Khoshnoodi et al. 2008). Bei der C- terminalen NC1- Domäne handelt es sich um einen hochkonservierten Bereich. Sie setzt sich aus zwei strukturell sehr ähnlichen Untereinheiten zusammen. Jede besteht aus neun β- Strängen, wobei β1, β2 und β9 je ein vollständiges antiparalleles β- Faltblatt bilden. An der Untereinheit II formen β3, β4, β7, β8 ein unvollständiges β- Faltblatt. An der Untereinheit I entsteht dagegen aus β5 und β6 eine haarnadelähnliche Struktur,

die das unvollständige Faltblatt der NC1- Domäne der benachbarten α(IV)- Kette ergänzt. Nach dem gleichen Prinzip wird das eigene unvollständige Faltblatt durch die β5 – β6- Haarnadel der Nachbarkette komplettiert (Abb. 1.2). Die NC1- Domänen spielen so die entscheidende Rolle bei der Verknüpfung der α-Polypeptidketten zu einem Protomer (Than et al. 2002). Dieses Schlüssel – Schloss – Prinzip scheint maßgeblich mitverantwortlich dafür zu sein, dass aus der Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten der sechs bekannten α(IV)- Ketten bisher nur drei tatsächlich nachgewiesen werden konnten: α1α1α2, α3α4α5 und α5α5α6. Als weitere an dieser ausgeprägten Selektivität beteiligte Faktoren konnten hypervariable Regionen und Unterschiede in den Affinitäten der Ketten zueinander identifiziert werden (Khoshnoodi et al. 2008). Zwei Protomere lagern sich mit Hilfe der NC1- Domäne zu einem Dimer zusammen (entsprechend der Anzahl der beteiligten α(IV)- Ketten auch als Hexamer bezeichnet). Gemeinsam mit den Tetrameren an den 7S- Bereichen entsteht die typisch netzartige dreidimensionale Suprastruktur (Abb. 1.3 B, C), die Basalmembranen ihre nötige Stabilität und gleichzeitige Flexibilität verleiht (Timpl et al. 1981).

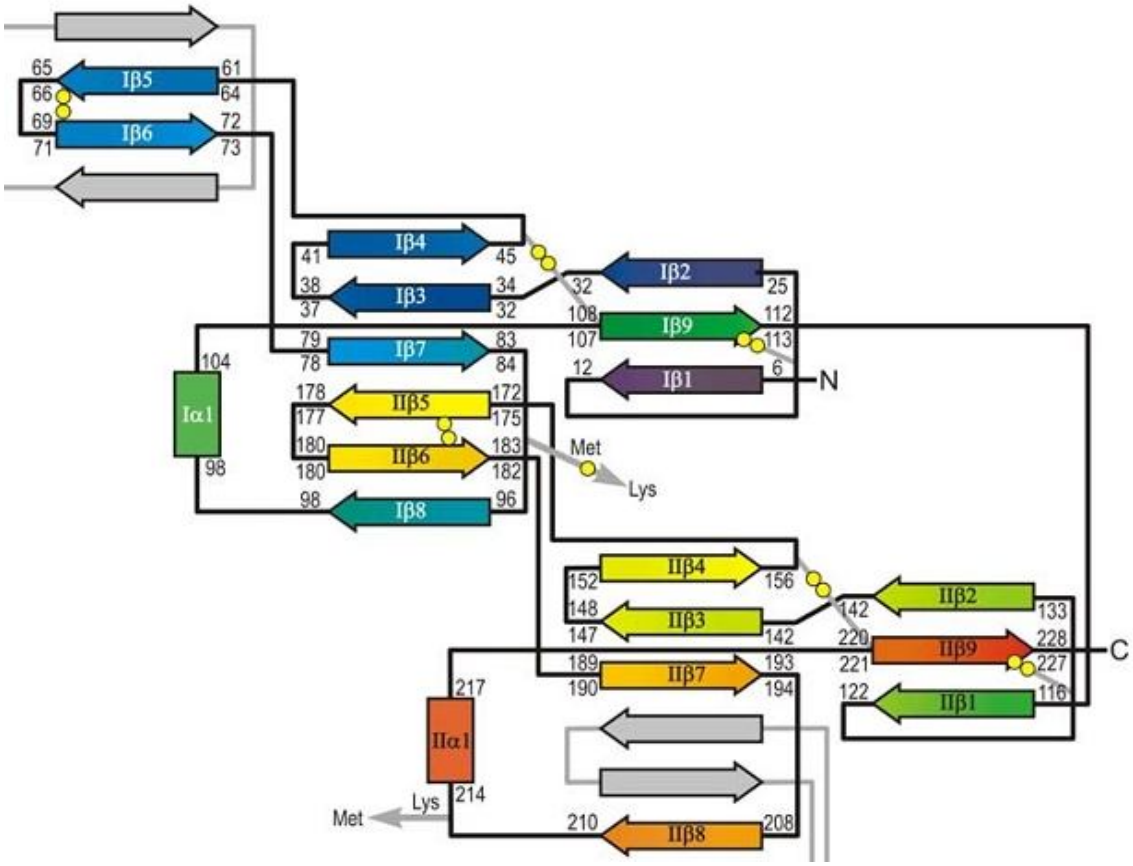


Abb. 1.2 α1(IV)- NC1- Domäne, vervollständigende β- Stränge benachbarter α(IV)- Ketten sind grau dargestellt, stabilisierende Disulfidbrückenbindungen mit gelbem Kreis (Than et al. 2002, S. 6610)

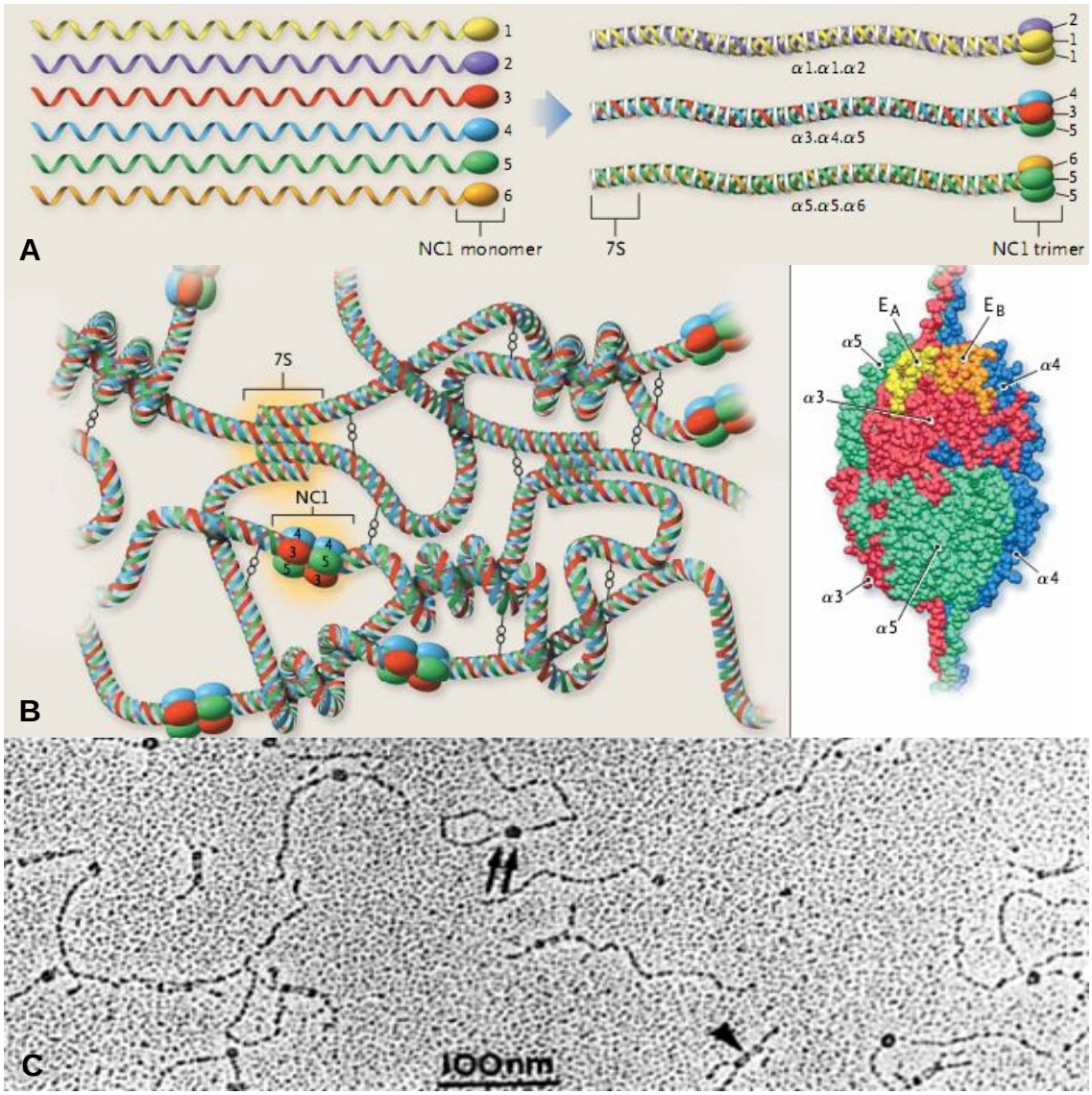


Abb. 1.3 Kollagensuprastruktur **A** α(IV)- Ketten und entstehende Protomere **B** Kollagen- IV- Suprastruktur (links) und Proteinstruktur (rechts) des α3α4α5- NC1- Hexamers/ Dimers/ Trimers mit Lage der Goodpasture- Epitope E_A und E_B (**A, B** aus Hudson et al. 2003, S.2544, S.2545) **C** EM- Aufnahme von Kollagenmolekülen nach Verdau durch bakterielle Kollagenase bei 20°C. Pfeil: Tetramerbildung an den 7S- Domänen. Doppelpfeil: NC1- Dimer (Timpl et al. 1981, S.209)

1.1.3 Verteilung der Kollagen- IV- Netzwerke

Trotz verschiedener theoretischer Möglichkeiten der Netzwerkbildung über die NC1- Domäne, konnten bisher nur drei Verknüpfungen tatsächlich gefunden werden: α1α1α2 – α1α1α2 (α1α2), α3α4α5 – α3α4α5 (α3α4) und α1α1a2 – α5α5α6 (α5α6). Während der Embryonalentwicklung kommt zunächst ausschließlich das α1α2- Netzwerk ubiquitär in allen Basalmembranen vor. Im weiteren Verlauf wird es schrittweise durch die α3α4- und α5α6- Netzwerke ersetzt, die eine spezifische Verteilung zeigen. Das α3α4- Netzwerk findet sich in der

GBM und einigen Tubulusbasalmembranen der Niere, sowie in Lunge, Hoden, Augen und Cochlea. α5α6- Netzwerke bilden sich als Bestandteile der Bowman`schen Kapsel der Niere, in Haut, glatter Muskulatur und Ösophagus aus. Das ursprüngliche α1α2- Netzwerk bleibt als Element vieler Basalmembranen bestehen, in der Niere unter anderem als Teil der Bowman`schen Kapsel, der mesangialen Matrix und der GBM (Hudson et al. 2003). Die Bedeutung der unterschiedlichen Verteilung der Netzwerke in den Organsystemen zeigt sich anhand der Symptomkonstellationen bei verschiedenen Kollagen- Typ- IV- assoziierten Erkrankungen. So führen Abweichungen in der α3 (IV)- Kette regelhaft zur Nierenbeteiligung, da der normale Aufbau des α3α4α5- Netzwerks gestört wird, welches insbesondere die Struktur der GBM maßgeblich bedingt.

1.1.4 Typ- IV- Kollagengene

Jede α(IV)- Kette wird durch ein eigenes Gen codiert. COL4A1 und COL4A2 liegen auf Chromosom 13, COL4A3 und COL4A4 auf Chromosom 2 und COL4A5 sowie COL4A6 auf dem X- Chromosom (Khoshnoodi et al. 2008) und zwar jeweils paarweise Kopf – an – Kopf aneinandergrenzend. Diese spezielle Anordnung, sowie aus Sequenzanalysen der α(IV)- Ketten gewonnene Erkenntnisse lassen auf ein gemeinsames Vorläufergen schließen. In drei Verdopplungsschritten sind daraus die sechs COL4- Gene entstanden. Mit ihren Vorläufergenen verbinden sie noch strukturelle Besonderheiten, die sie voneinander unterscheiden und damit Rückschlüsse bezüglich des Ursprungs erlauben (Zhou et al. 1994). Veränderungen in den Genen können weit reichende Folgen im Aufbau der Gewebe bedeuten und so Ursache für Erkrankungen sein.

1.2 Hereditäre Kollagen- IV- bedingte Erkrankungen

1.2.1 Alport- Syndrom und familiäre benigne Hämaturie (FBH)

Arthur Cecil Alport veröffentlichte 1927 einen Artikel über eine hereditäre kongenitale hämorrhagische Nephropathie. Seine Analyse diesbezüglich umfasste drei Generationen einer Familie. Er stellte fest, dass Proteinurie und Hämaturie überzufällig häufig mit Innenohrschwerhörigkeit auftraten und dass männliche Patienten vielfach einen schwereren Verlauf der Erkrankung zeigten als weibli-

che (Alport 1927). Bis heute konnten bereits einige Schritte in der Pathogenese des nach Alport benannten Syndroms aufgeklärt werden. Die Ursache sind Mutationen in Kollagen- IV- Genen. Bei Veränderungen im COL4A5- Gen, die 85% der Fälle ausmachen, liegt die X- chromosomal vererbte Form vor. Dagegen führen Abweichungen im COL4A3- bzw. COL4A4- Gen zum homozygoten oder compound- heterozygoten autosomal- rezessiven und seltener zum autosomal-dominanten Alport- Syndrom. Die Heterozygotenhäufigkeit für eine autosomale Form liegt bei unter 1:120, die Prävalenz des autosomal- rezessiven Alport-Syndroms damit bei etwa 1:50000. Prävalenzen für die X- chromosomale Form der Erkrankung werden mit 1: 5000 - 10000 angegeben. Das Alport- Syndrom ist damit die zweithäufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz durch vererbbare Erkrankungen und bei 1 - 2% der Dialysepatienten zu finden. Insgesamt konnten bereits über 300 verschiedene Mutationen charakterisiert werden, bis zu 15% sind Neumutationen. Kollagenstrukturveränderungen kommen am häufigsten durch Missensemutationen mit dem Austausch von Glyzin zu Stande. Der Proteinaufbau wird gestört, da nur Glyzin als kleinste Aminosäure den Platz im Inneren der Tripelhelix adäquat ausfüllen kann. Es kommt zu Abknickungen der Moleküle. Andere Mutationen verursachen z.B. eine Verkürzung. Patienten mit verminderter Länge der Moleküle zeigen dabei fast immer die juvenile Form des Alport- Syndroms. Diese mündet meist schon vor dem 20. Lebensjahr in eine terminale Niereninsuffizienz. Veränderungen der Proteinstruktur hingegen führen vielfach zu einer milderen Form. Eine dialysebedürftige Funktionseinschränkung wird hier im Durchschnitt mit 25 Jahren erreicht. Auch extrarenale Symptome sind bei dieser adulten Variante seltener (Gross et al. 2004 a). Geschädigte α3-, α4- oder α5- Ketten des Kollagen IV können sich nicht korrekt zusammenlagern und werden abgebaut. Die physiologisch ablaufende Umstellung vom α1α2- Netzwerk auf das α3α4- Netzwerk während der Nierenentwicklung ist damit nicht möglich. Die α1α2- Netzwerke sind anfälliger gegenüber proteolytischer Degradierung (Kalluri et al. 1997), da die α3α4α5- Protomere eine aufwendigere Suprastruktur aus Schleifen und Spiralen bilden, die über kovalente Disulfidbrückenbindungen zusätzlich stabilisiert wird (Gunwar et al. 1998). Das α3α4- Netzwerk ist in der reifen Niere vor allem in der GBM und in Tubulusbasalmembranen, sowie im Auge und der Cochlea vorhanden (Hudson et al. 2003). Hauptsymptome der Erkrankung, wie bereits von Alport beschrieben, sind somit Hämaturie, Proteinurie und Innenohrschwer-

hörigkeit in etwa 75% der Fälle. Hinzu kommen bei 20 - 45% der Patienten Augenveränderungen wie Lentikonus oder Fundus albipunctatus (Gross et al. 2004 a). α5α6- Netzwerke finden sich außerhalb der Niere z.B. in der glatten Muskulatur (Hudson et al. 2003). Bei Basenverlusten im COL4A5- oder dem direkt anliegenden COL4A6- Gen kann es so des Weiteren zur diffusen Leiomyomatose insbesondere des Ösophagus kommen (Gross et al. 2004 a).
Die Alport- GBM zeigt histologisch typische Veränderungen durch die Abweichungen in der molekularen Zusammensetzung. Die zunächst verdünnte Basalmembran wird laufend weiter verdickt. Multiple Schichtungen überdecken lückenhafte Sektoren und führen so zu Aufsplitterungen mit Bereichen verschiedener Dichtegrade (Hudson et al. 2003). Insgesamt entsteht eine korbgeflechtartige GBM. Eine verdünnte GBM lässt sich auch bei heterozygoten Mutationsträgern und bei der *f*amiliären *b*enignen *H*ämaturie (FBH) finden. Diese zunächst eigenständig definierte Kollagen- IV- Erkrankung imponiert klinisch durch eine Mikrohämaturie, die autosomal- dominant vererbt wird. Molekulargenetische Analysen konnten Genloci z.B. im COL4A4- Gen nachweisen, so dass vermutet wird, dass Patienten mit FBH eigentlich heterozygote Merkmalsträger des autosomal- rezessiven Alport- Syndroms sind (Gross et al. 2004 a).

1.2.2 Goodpasture- Syndrom

1919 veröffentlichte Ernest W. Goodpasture Untersuchungen über die Ursachen und Zusammenhänge Influenza- assoziierter Pneumonien. Dazu analysierte er die Lungen verstorbener Patienten sowohl makro- und mikroskopisch als auch bakteriologisch. Neben Veränderungen, die durch primäre oder sekundäre Erreger wie Strepto- und Pneumokokken erklärbar waren, fand er spezielle Läsionen, die nicht dem klassischen Bild entsprachen. Er beschrieb dilatierte Alveolarbereiche, die ganz oder teilweise mit hyalinen Membranen ausgekleidet waren. Begleitend bestanden Hämorrhagien, Gewebsödeme, Exsudate und fokale Nekrosen der Alveolarwände als Zeichen eines akuten Geschehens (Goodpasture 1919 a). Diese Veränderungen konnte er auch bei einem 18- jährigen Patienten finden, bei dem zuvor mit Husten, Brustschmerzen, hohem Fieber und blutigem Sputum Zeichen einer akuten Pneumonie bestanden hatten. Ergänzend diagnostizierte er eine Anämie und eine Albuminurie. Der rasch progrediente Verlauf führte über massive Hämoptoe und Dyspnoe schließlich zum

Tod des jungen Mannes nur drei Tage nach seiner stationären Aufnahme. Bei der Autopsie sah Goodpasture in beiden Lungenflügeln erneut die atypischen Läsionen, die er bereits zuvor beschrieben hatte. Auch in der Niere fanden sich bei normaler Größe hämorrhagische Bereiche im Kortex und ödematöse Veränderungen. Mikroskopisch bestand eine glomeruläre Nephropathie mit fibrinösen Exsudaten in der Bowman`schen Kapsel und zellulären Glomerulusproliferationen. Mikrobiologische Analysen lieferten keine Hinweise für einen bestimmten Organismus als Ursache der Erkrankung. Insgesamt entstand der Verdacht, dass die Symptomkonstellation von einer durch Influenzaviren oder superinfizierende Erreger verursachten Pneumonie unabhängig ist (Goodpasture 1919 b).
Das Goodpasture- Syndrom kommt in allen Rassen vor, wobei mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 1: 2 Millionen am häufigsten die kaukasischstämmige Bevölkerung Europas betroffen ist. Das Krankheitsbild kann sich in jedem Alter manifestieren. Erkrankungsgipfel finden sich jedoch um das 60. - 70. Lebensjahr, bei Männern zusätzlich um das 30. Lebensjahr. Kennzeichnend ist eine schnell progressive Glomerulonephritis die, insbesondere bei jungen Männern, von pulmonalen Hämorrhagien begleitet sein kann. Die differentialdiagnostische Abgrenzung von anderen Krankheiten mit ähnlicher Symptomatik, z.B. den ANCA- assoziierten Vaskulitiden wie der Wegener`schen Granulomatose oder dem systemischen Lupus erythematodes, gelingt mit Hilfe von Basalmembranantikörpern. Sie können als lineare Ablagerungen, klassischerweise an der GBM, nachgewiesen werden. In fast allen Fällen handelt es sich um IgG- Antikörper, seltener sind IgA und IgM beteiligt (Kluth und Rees 1999), die sich gegen zwei Epitope (E_A und E_B) an der NC1- Domäne der α3(IV)- Kette richten (Abb. 1.3 B). Die Region wird deshalb als Goodpasture- Autoantigen bezeichnet. Die Epitope liegen im α3α4- Netzwerk verborgen und sind dem Angriff durch die Antikörper normalerweise nicht zugänglich. Erst nach Strukturveränderungen und Dissoziation des Hexamers ist eine Bindung möglich (Bogdan Borza et al. 2002). Dabei konnten z.B. die Exposition gegen bestimmte Kohlenwasserstoffe und Rauchen als Wegbereiter identifiziert werden. Ebenso scheinen genetische Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen. Während HLA DR1 und DR7 als protektiv gelten, steigern HLA DRB1*1501 und DRB1*1502 das Risiko, am Goodpasture- Syndrom zu erkranken (Hudson et al. 2003, Kluth und Rees 1999). Die Bindung der Antikörper an die Epitope setzt eine akute Entzündungsreaktion in Gang. Durch T- Zell- vermittelte Kaskaden unter Mitwir-

kung des Komplement- und Monozyten- Makrophagen- Systems sowie zahlreicher Entzündungsmediatoren (Interleukin 12, Interferon γ, etc.) kommt es zur massiven Gewebsschädigung (Hudson et al. 2003). An der GBM resultiert eine rapid progressive Glomerulonephritis mit Mikro- und gegebenenfalls Makrohämaturie, sowie eine meist moderate Proteinurie (<3 g/d). Unbehandelt kann es zur renalen Fibrose mit fortschreitender Einschränkung der Nierenfunktion, wie unter 1.2.5 beschrieben, kommen (Kluth und Rees 1999). Obwohl auch Antikörper gegen die NC1- Domänen anderer α(IV)- Ketten existieren, rufen nur die gegen α3(IV) das Goodpasture- Syndrom hervor. Entsprechend konnte die Krankheit bisher nicht bei Patienten, die am Alport- Syndrom leiden, beobachtet werden, denen die α3(IV)- Kette aus verschiedenen Gründen fehlt. Damit erklärt sich die ausgeprägte Beteiligung von Lunge und GBM der Niere, da in diesen Geweben hauptsächlich das α3α4- Netzwerk zu finden ist (Hudson et al. 2003).

1.2.3 Diabetische Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist die weltweit häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz. Dass etwa 20 - 40% der Diabetiker eine Nephropathie entwickeln, wobei der Schweregrad oft stark variiert, ist nicht ausschließlich durch die Erkrankungsdauer, eine begleitende Hypertonie oder die Qualität der Blutzuckereinstellung erklärbar. Deshalb wird vor allem auch die Bedeutung genetischer Faktoren diskutiert. Dafür spricht, dass Diabetiker mit einem Zwilling oder einem Elternteil, der an diabetischer Nephropathie erkrankt ist, zu einem höheren Anteil selbst an einer Nierenbeteiligung leiden. Zu den vermuteten Genloci mit pathogenetischem Einfluss gehören Areale auf den Chromosomen 3, 9 und 20, sowie die Abschnitte 7q21.3, 10p15.3, 14q23.1 und 18q22.3.

Diabetes- assoziierte Hyperglykämie induziert eine Vielzahl metabolischer und hämodynamischer Veränderungen, die in Verbindung mit dem genetischen Hintergrund und Umweltfaktoren zur Schädigung der Niere führen können. Wichtig ist beispielsweise die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Sie aktiviert wiederum mit TGF- β1 einen Hauptverantwortlichen im Kreislauf der renalen Fibrosierung. Neben einer gestörten Autoregulation mit glomerulärer Hypertonie resultiert die Induktion der extrazellulären Matrixsynthese (siehe 1.2.5). PKC und TGF- β1 tragen auch zur Bildung des Wachstumsfaktors VEGF in Podozyten bei. Er führt neben der Freisetzung des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO)

aus Endothelzellen, der die glomeruläre Hypertonie weiter verstärkt, zur Stimulation der Produktion der Kollagen- IV- α3- Kette. Die Effekte sind synergistisch mit den TGF- β1- induzierten Prozessen. Das Resultat ist eine Verdickung der GBM durch Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine. Die GBM wird aber auch direkt verändert. Die hohe Glukosekonzentration führt zur Bindung freier Aminosäuren in zirkulierenden (Hämoglobin) oder gewebsständigen Proteinen (Kollagen IV). Durch diese nichtenzymatische Glykosylierung entstehen zunächst noch reversible early glycosylation end products (EGE) und durch Festigung der Bindung und Vernetzung im Verlauf irreversible advanced glycosylation end products (AGE). Podozyten besitzen einen Rezeptor (RAGE) mit dem sie die modifizierten Proteine wahrnehmen können (Dronavalli et al. 2008). Ähnlich wie beim Alport- Syndrom trägt die veränderte GBM dazu bei, dass der Fibrosekreislauf unterhalten wird. Welche Rolle genau bestimmte Gene spielen, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Dass die diabetische Nephropathie in einem multifaktoriellen Gefüge als, mindestens partiell hereditär bedingte, Kollagen- IV- Erkrankung aufgefasst werden kann, scheint jedoch unstrittig.

1.2.4 Andere Kollagen- IV- Erkrankungen

Neben Störungen, die durch Abweichungen der α3(IV)- Kette verursacht werden, wurden zuletzt auch insbesondere Mutationen der α1(IV)- Kette und daraus entstehende Symptome beschrieben. Veränderungen des α1α2- Netzwerks resultieren in systemischen Erkrankungen, da es Bestandteil nahezu aller Basalmembranen des Körpers ist (Hudson et al. 2003). 2005 konnte mit Hilfe eines Mausmodells gezeigt werden, dass Mutationen im Exon 40 des COL4A1-Gens dazu führen, dass Kollagenheterotrimere zwar gebildet, aber nicht in die Basalmembran eingebaut werden können. In der Folge erscheint sie ungleichmäßig strukturiert mit fokalen Unterbrechungen und wechselnden Dichtewerten (Abb. 1.4 B). Da vor allem Hirngefäße betroffen sind, prädispositionieren die Veränderungen zu enzephaloklastischer Porenzephalie und könnten auch beim Menschen im Zusammenhang mit dem Auftreten hämorrhagischer Insulte stehen (Gould et al. 2005). Weitere Studien belegten sowohl in der GBM als auch in retinalen und renalen Gefäßen COL4A1- bedingte Abweichungen (Gould et al. 2006). Einige durch autosomal- dominant vererbte Mutationen im Exon 24 und 25 des COL4A1- Gens bedingte Symptome wurden als HANAC- Syndrom

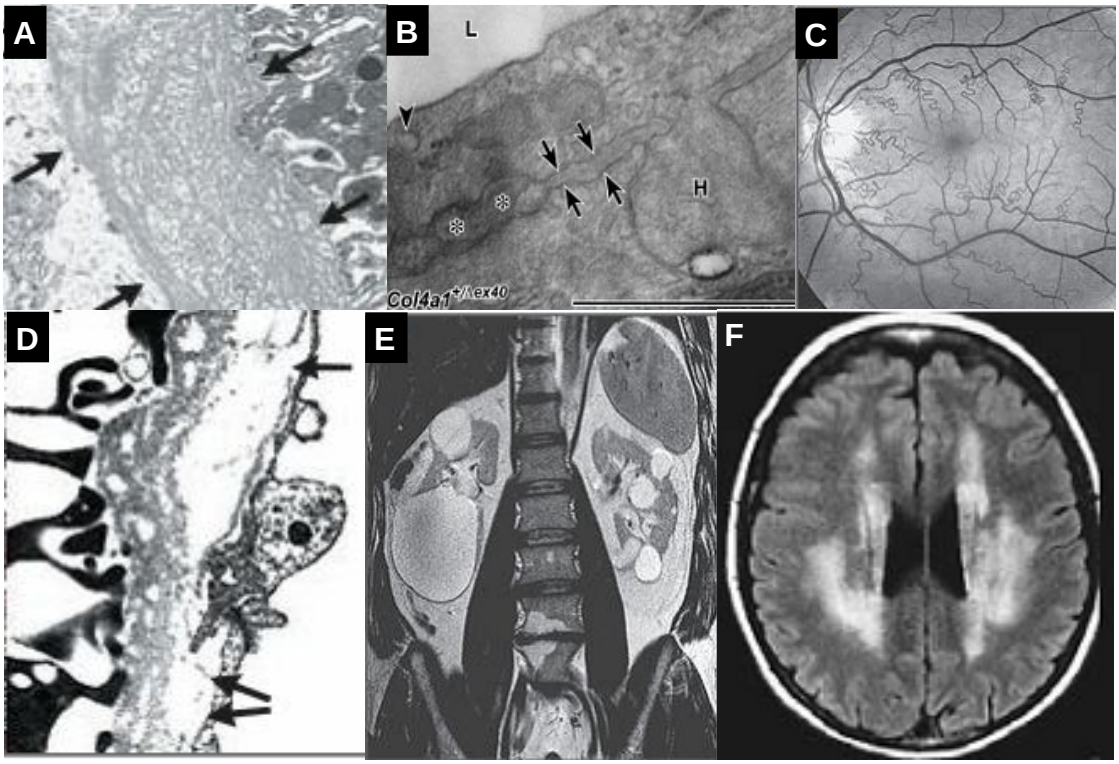


Abb. 1.4 Mutationen der α1(IV)- Kette **A** unregelmäßige tubuläre BM (EM) **B** Maus mit COL4A1- Exon 40- Mutation *L* Gefäßlumen *H* Herniation der defekten BM →► variable Dicke ►akkumulierte Vesikel in Endothelzellen als Zeichen der defizienten Kollagensekretion * fokale Unterbrechungen (EM) **C** Pathologische retinale Gefäße (Fluoreszeinangiografie) **D** Variabilität der tubulären BM, Unterbrechungen der kapillären BM (Pfeile) (EM) **E** Multiple bilaterale Nierenzysten (MRT) **F** Periventrikuläre Leukenzephalopathie (MRT) (**A** Plaisier et al. 2007, S. 2693, **C/D/E** Plaisier et al. 2007, S.2690 **B** Gould et al. 2005, S. 1169 **F** Gould et al. 2006, S. 1494)

(***h****ereditary* ***a****ngiopathy with* ***n****ephropathy,* ***a****neurysms, and muscle* ***c****ramps*) zusammengefasst. In allen untersuchten Fällen waren Glyzinreste der α1α1α2-Kollagentripelhelix verändert. Das mutierte Protein wird sezerniert, scheint aber mit der Sekretion und Integration des normalen Netzwerks zu konkurrieren und/oder dessen Interaktion mit anderen Bestandteilen zu beeinflussen. Die vor allem kleine Gefäße und große Arterien betreffende Angiopathie führt zu Leukenzephalopathie (Abb. 1.4 F), intrakraniellen Aneurysmen und pathologischer Windung der retinalen Gefäße (Abb. 1.4 C). Die Nierenbeteiligung zeigt sich in persistierender Hämaturie und beidseitiger ausgeprägter Zystenbildung (Abb. 1.4 E). Obwohl lichtmikroskopisch unauffällig erkennt man bei elektronenmikroskopischer Betrachtung weit reichende Veränderungen der renalen Basalmembranen. Zu sehen sind starke Variationen in Dicke und Dichte, wodurch sowohl verdickte als auch ausgedünnte Bereiche entstehen (Abb. 1.4 A, D). Weiterhin kommen Aufsplitterungen und multiple Schichtungen vor. Das Gesamtbild, ins-

besondere der tubulären BM, erinnert dabei an das korbgeflechtartige Aussehen der Alport- GBM (Plaisier et al. 2007). Die GBM ist durch die α1(IV)- Veränderungen kaum betroffen, da hier das α3α4- Netzwerk Struktur- bestimmend ist.

1.2.5 Pathophysiologie progressiver Nephropathien

Bei Nierenerkrankungen, die mit Proteinurie einhergehen, verläuft die Entwicklung einer renalen Fibrose mit terminaler Niereninsuffizienz in charakteristischer Weise. Der mit Einsetzen der Proteinurie in der gemeinsamen Endstrecke der progredienten Fibrose mündende Verlauf chronischer Nephropathien wie z.B. dem Goodpasture- oder dem Alport- Syndrom und der diabetischen Nephropathie kann durch verschiedene Auslöser initiiert werden. Die Podozyten sind dabei ein wichtiger Knotenpunkt für die Wahrnehmung und Weiterleitung der Signalkaskaden und die Synthese der Matrixbestandteile. Es entsteht ein sich selbst unterhaltender Kreislauf, bei dem sich die Fibrose bedingten Nephronverluste und die folgenden Kompensationsversuche gegenseitig verstärken.

1.2.5.1 Der Einstieg in den Kreislauf der Fibrose

Eine veränderte Zusammensetzung der GBM kann direkt von den Podozyten wahrgenommen werden und zu Umgestaltungen führen. Bei der Vermittlung der Signale spielen dabei Zell- Matrix- Rezeptoren wie z.B. die Gruppe der Integrine eine entscheidende Rolle (Shankland 2006). Ein Einstieg in den Circulus vitiosus ist auch durch primären Nephronverlust (posttraumatisch, postoperativ, postinflammatorisch, etc.) oder eine durch Hypertonie oder -glykämie induzierte gestörte Autoregulation mit Freisetzung vasoaktiver Substanzen (z.B. NO aus Endothelzellen) und folgender präglomerulärer Vasodilatation möglich. Oft ist die Kombination mehrerer Auslöser verantwortlich, wie z.B. bei der diabetischen Nephropathie. Bei Schäden der Glomeruli und dem Verlust von Nephronen versuchen die verbleibenden Glomeruli durch Hypertrophie eventuellen Einschränkungen der GFR entgegenzuwirken. Die Steigerung des renalen Blutflusses führt gleichzeitig zur kompensatorischen Hyperperfusion. Es kommt zur Abnahme des Widerstands in den Arteriolen, wobei die Reaktion in den affarenten Gefäßen stärker ausgeprägt ist als in Efferenten. Dadurch erhöht sich der Druck in den glomerulären Kapillaren. Diese glomeruläre Hypertonie führt zur Zunahme

der Filtrationsrate der Einzelnephrone (Abb. 1.5). An der Macula densa wird durch die Hyperfiltration eine gesteigerte Chloridkonzentration registriert, wodurch es zur Reninfreisetzung aus den myoepithelialen Zellen des Vas affarens kommt. Es spaltet Angiotensin I aus Angiotensinogen ab, aus dem durch das Angiotensin- Converting- Enzym (ACE) Angiotensin II (ANG II) gebildet wird. Podozyten und Tubuluszellen besitzen AT_1- Rezeptoren für Angiotensin II (Stelzer und Köhler 1999). Die Veränderungen dieser Zellen sind so eng mit der Aktivierung des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems (RAAS) verknüpft (Abb.1.6 A).

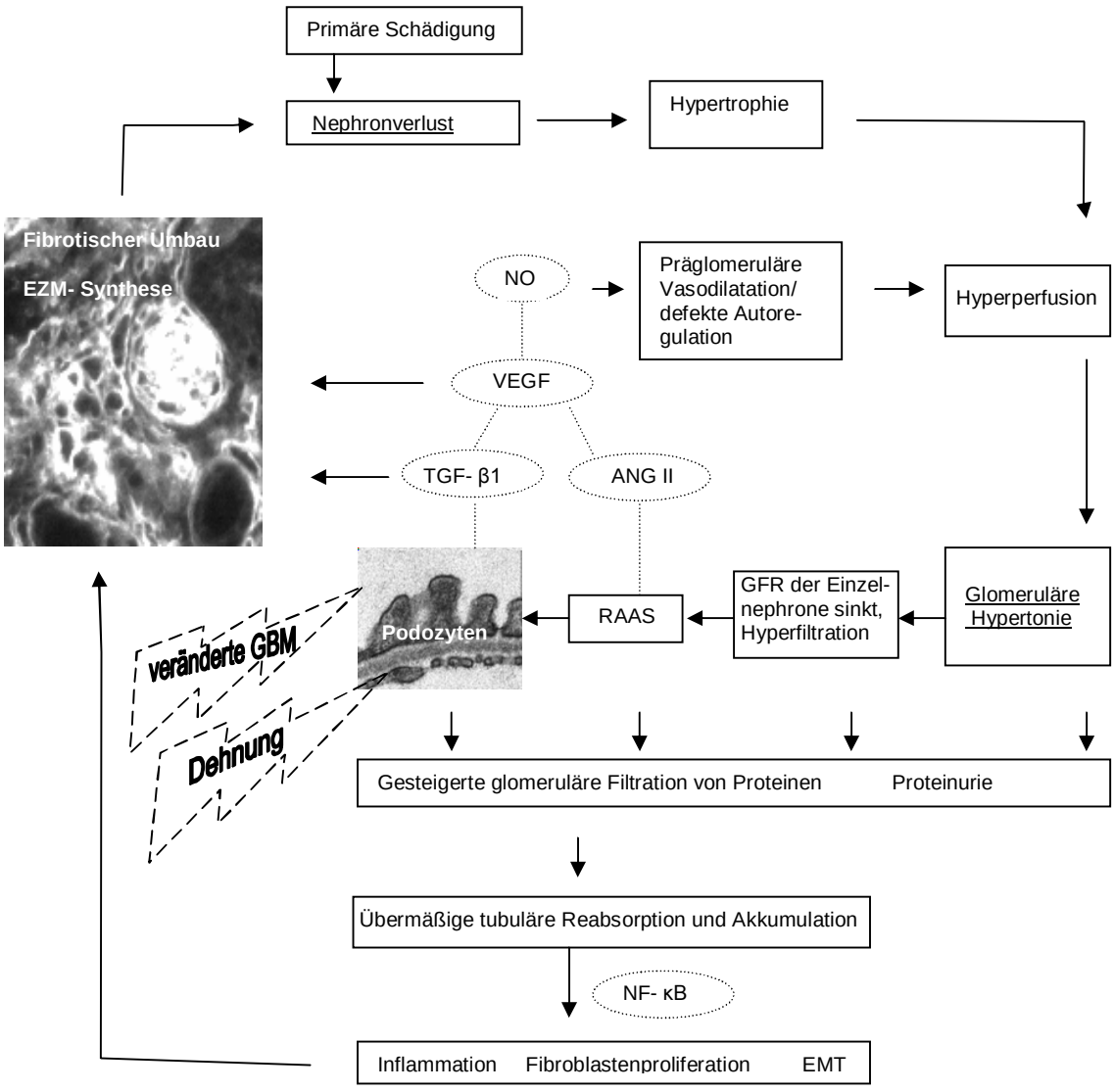


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der an der Nierenfibrose beteiligten Prozesse. Erläuterungen im Text.

1.2.5.2 Die Rolle der Podozyten

Podozyten sind Sensoren für Signale ihrer Umwelt. Sie besitzen Rezeptoren, z.B. für AT_1 und TGF- β1, solche zur Wahrnehmung von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) oder für die extrazelluläre Matrix wie DDR1 und Integrine. Des Weiteren sind sie Verarbeitungszentrum für eingehende Signale, die in zahlreiche Kaskaden zur Modulation von Prozessen der Zelldifferenzierung und Genaktivierung umgewandelt werden. Außerdem sind sie Effektoren, z.B. bei der Vermittlung der Fibrose, indem sie ihre Form verändern und Mediatoren sezernieren, die auf sie selbst und viele anderer Zelltypen einwirken. Durch die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix tragen sie direkt zur Verdickung der GBM und zum Fortschreiten fibrotischer Vorgänge bei. Die z.B. durch AT_1 induzierten Veränderungen können Gestalt und Anzahl der Zellen betreffen. Der Formwandel (*Effacement*) stellt eine uniforme Reaktion auf Schädigungen dar. Die Fußfortsätze verkürzen sich dabei bis zu 70% und verbreitern sich bis zu 60% durch Umgestaltungen im Aktinzytoskelett. Die Fortsätze sind aufgrund dieser Retraktion zunächst funktionell, später durch die Ausbildung von *tight junctions* verschmolzen. Die Zahl der Filtrationsschlitze zwischen ihnen wird stark reduziert und die GBM wirkt wie von einer einzigen Zytoplasmaschicht überzogen. Dadurch kann es zur Verminderung der GFR kommen. Außerdem finden Verschiebungen und Veränderungen der Schlitzmembran, die den Abstand zwischen zwei benachbarten Fußfortsätzen überbrückt, statt. Da sie der maßgebliche ladungs- und größenselektive Filter für Proteine ist, führt ihre Schädigung zur Proteinurie, ebenso wie die Abnahme der Podozytenzahl durch Apoptose. Proapoptotische Einflüsse haben z.B. Angiotensin II, TGF- β1, Hyperglykämie und mechanischer Stress durch Dehnung. Die Ursachen induzieren sich zum Teil gegenseitig. Die Einschränkung der Proliferationsrate der Zellen kann darüber hinaus ebenso zur Reduktion der Zellzahl führen wie eine mangelnde Befestigung an ihrer Unterlage. Dies geschieht z.B. durch Veränderungen von α3β1- Integrinen im Rahmen der diabetischen Nephropathie. Die Zellen sind dann im Urin nachweisbar. Der Verlust wirkt sich auch auf die Stabilität der glomerulären Kapillaren aus. Da die Zellen ein Widerlager gegen den intrakapillären Druck bilden, kommt es bei reduzierter Zellzahl zum Formverlust der Gefäße. Es resultiert der Kontakt der GBM mit parietalen epithelialen Zellen und damit ein Funktionsverlust (Shankland 2006).

1.2.5.3 Die gemeinsame Endstrecke

Verschiedene Mechanismen steigern die Durchlässigkeit der GBM und führen so zur gesteigerten Proteinkonzentration im Harn:

- die Erweiterung des Durchmessers der Poren des glomerulären Filters durch Dehnung und
- der erhöhte Filtrationsdruck, beides verursacht durch glomeruläre Hypertonie (Remuzzi und Bertani 1998), sowie
- strukturelle Umgestaltungen und Mediatorsekretion in den Podozyten z.B. durch das RAAS und/oder veränderte Zell- Matrix- Interaktionen mit der GBM verursacht (Shankland 2006).

Wichtige Mediatoren dieses Umbaus sind Zytokine. Sie werden von Entzündungszellen aber auch von epithelialen Zellen wie Podozyten oder dem Tubulusepithel sezerniert. Insbesondere TGF- β1 wird eine führende Rolle bei der Vermittlung von Prozessen die in glomerulärer und tubulointerstitieller Nierenfibrose münden zugeschrieben. Es ist durch seine Fähigkeit zur Modulation der Aktivität bestimmter Gene, mit resultierender vermehrter Sekretion von Mediatoren wie VEGF und Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen IV durch Podozyten, maßgeblicher Schrittmacher der Progredienz des Verlaufs. Unter anderem vermittelt TGF- β1 auch die Proliferation von Fibroblasten im Interstitium, z.B. durch Induktion von CTGF und FGF- 2 (Abb. 1.6 B). Außerdem können die Tubuluszellen unter seinem Einfluss hypertrophieren oder eine epitheliale mesenchymale Transformation (EMT) in Fibroblasten durchlaufen was ebenfalls maßgeblich zur renalen Fibrose beizutragen scheint (Zeisberg et al. 2001). Die erhöhte Filtration von Plasmaproteinen führt parallel zu einer exzessiven tubulären Reabsorption. Die Verarbeitungskapazität des endoplasmatischen Retikulums und der Lysosomen der Tubuluszellen wird dadurch überschritten und es kommt zur Akkumulation der Proteine bis ins Zytoplasma. Die übermäßige Ansammlung führt zur verstärkten Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κB der proinflammatorische Gene reguliert (Abb. 1.5). Im Folgenden kommt es zur verstärkten Sekretion von z.B. Endothelin 1, *Monocyte chemoattractant protein 1* oder RANTES (***r**egulated upon **a**ctivation **n**ormal **T**- cell **e**xpressed and **s**ecreted*), die Makrophagen und T- Zellen aktivieren und deren Ansammlung im Interstitium fördern. Deren Chemokine können dann die Proli-

feration von Fibroblasten anregen und so zur Auslösung inflammatorischer Kaskaden und zur vermehrten Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten, insbesondere Kollagen Typ IV, beitragen (Remuzzi und Bertani 1998).

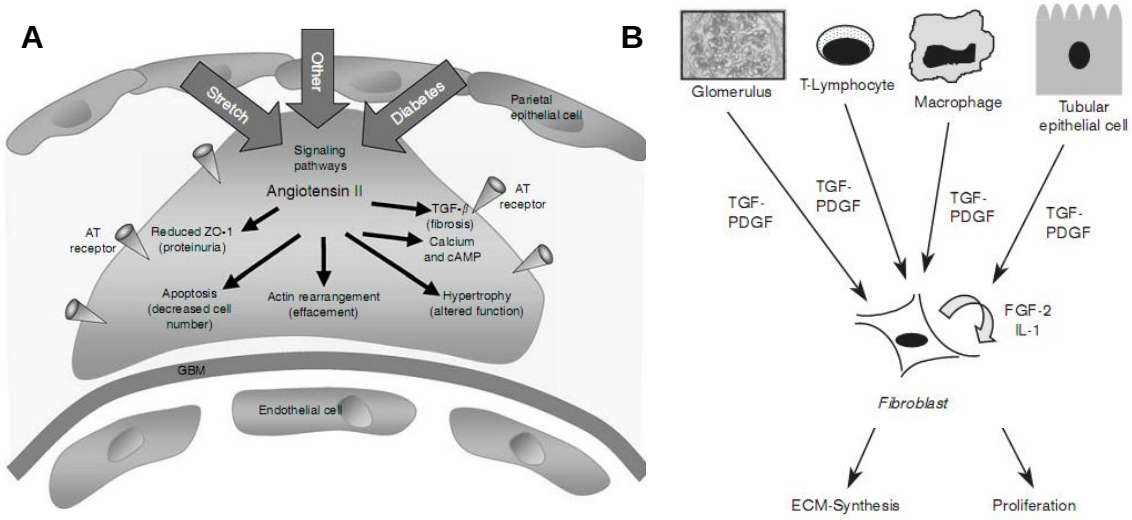


Abb. 1.6 A Mögliche Wirkungen von Angiotensin II auf Podozyten (Shankland 2006, S. 2143)
B An der Nierenfibrose beteiligte Zellen und Mediatoren (nach Zeisberg et al. 2001, S. 317)

1.3 Integrine

1.3.1 Grundstruktur und Funktionen

Seit der Entdeckung 1987 zählen die Integrine bis heute zu einer der am besten erforschten Rezeptorfamilien. Sie sind selbst in den einfachsten mehrzelligen Organismen wie Schwämmen zu finden, was ihre zentrale Bedeutung unterstreicht. Insbesondere in Wirbeltieren dienen sie neben der Herstellung des Kontaktes zwischen Zellen und Proteinen wie denen der extrazellulären Matrix auch als wichtige interzelluläre Verbindungspfeiler. Über sie kann eine Vielzahl von Signalkaskaden aktiviert werden, die Entwicklungs- und Migrationsprozesse von Zellen beeinflussen (Hynes 2002). Strukturell sind Integrine Heterodimere aus einer α- und einer β- Untereinheit, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verknüpft sind. Es sind 18 α- Untereinheiten und acht unterschiedliche β- Untereinheiten in Säugetieren bekannt, aus denen sich 24 verschiedene Integrine zusammenlagern können. Die Untereinheiten zeigen eine weitestgehend übereinstimmende Grundstruktur. Den größten Teil mit über

90% macht die glykosylierte extrazelluläre Domäne aus. Hier erfolgt die Bindung spezifischer Liganden. Über einen, die Lipiddoppelschicht einfach durchziehenden, transmembranen Anteil besteht die Verbindung ins Innere der Zellen. Der zytoplasmatische Abschnitt umfasst nur 20 - 50 Aminosäuren bei den α- Ketten bzw. 15 - 65 bei den β- Ketten (mit Ausnahme von β4, das dort um die 1000 Aminosäuren zählt). Dennoch ist er Interaktionszentrum für eine Vielzahl intrazellulärer Partner. Obwohl Integrine selbst keine katalytische Funktion haben, können sie vielschichtiger Signalkaskaden initiieren. Die Moleküle vermitteln die Kommunikation zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix dabei bidirektional. So haben Signale aus dem Zellinneren über Integrine Folgen für die Bindung der Matrixbestandteile. Umgekehrt können diese über Integrine Signalwege im Intrazellularraum beeinflussen (Berman et al. 2003).

1.3.2 Integrin α2β1

1.3.2.1 Aufbau

Die α2- Untereinheit des Menschen besitzt eine zytoplasmatische Domäne aus 27 Aminosäuren, ein 22 Aminosäuren langes Transmembransegment und einen 1103 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Anteil. Die Sequenz leitet ein Signalpeptid am NH- Terminus mit 29 Aminosäuren ein (uniprot P17301). Der gesamte Abschnitt wird vom ITGA2- Gen auf Chromosom 5q23 - 31 codiert (Jaspers et al. 1991). Der extrazelluläre Anteil beinhaltet sieben homologe Domänen. Sie bestehen aus 28 bis 41 Aminosäuren und sind jeweils 23 bis 32 Aminosäuren voneinander entfernt. Die Domänen V, VI und VII besitzen eine Sequenz zur Bindung von zweiwertigen Kationen. Zwischen den Abschnitten II und III liegt des Weiteren noch eine eingeschobene (***i**nserted*) I- Domäne aus 191 Aminosäuren (Takada und Hemler 1989). Sie bildet in ihrer Sekundärstruktur einen Kern aus fünf parallelen β- Faltblättern sowie einem Antiparallelen (Abb. 1.7 B, rot). Dieser Bereich ist in allen I- Domänen und dem von- Willebrand- Faktor (vWF) hochkonserviert (Emsley et al. 1997). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit kollagenbindenden Domänen des vWF oder des *Cartilage matrix proteins* wurde schon früh ein Zusammenhang mit der Ligandenbindung vermutet (Takada und Hemler 1989). Umgeben ist das Zentrum dann von sieben α- Helices, die sehr variabel sind (Abb. 1.7 B, grün).

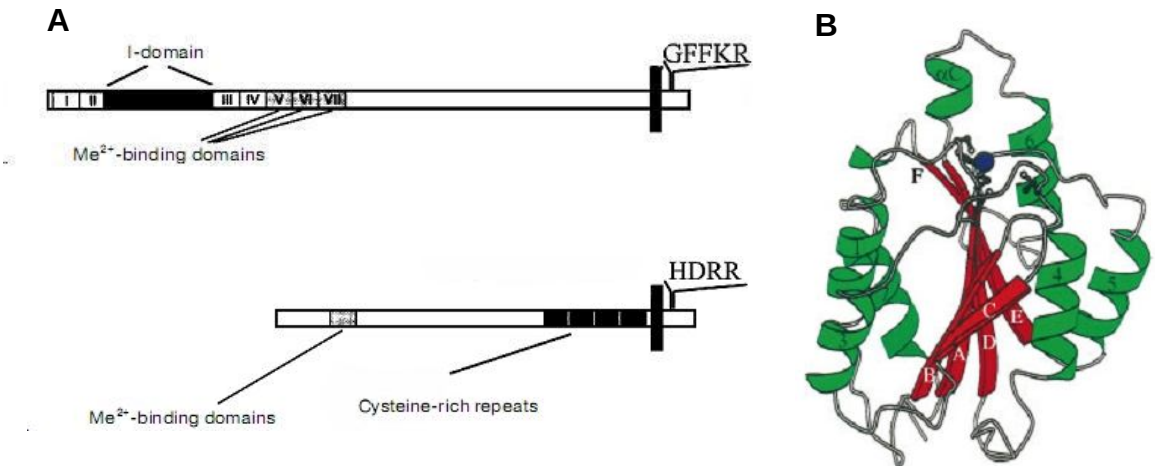


Abb. 1.7 **A** Grundstrukturen der α2- (oben) und der β1- (unten) Untereinheiten der Integrine (Berman et al. 2003, S. 1285) **B** Struktur der I- Domäne der α2- Integrinuntereinheit (Emsley et al. 1997, S. 28514)

Eine weitere stark konservierte Region der α2- I- Domäne ist das MIDAS (***m**etal **i**on **d**ependent **a**dhesion **s**ite*)- Motiv, das ein Magnesiumion bindet (Abb. 1.7 B, blau). Es ist für eine reguläre Kollagenanlagerung ebenso essentiell wie die auch in der I- Domäne gelegene C- Helix (Emsley et al. 1997). Der zytoplasmatische α2- Anteil beinhaltet das hochkonservierte GFFKR- Motiv, sowie variable Bereiche. Sein Fehlen führt zum vollständigen Verlust der Bindungsaktivität des Moleküls (Santoro und Zutter 1995). Neben der Bedeutung in der Ligandenbindung sind die zytoplasmatischen Domänen die maßgeblichen Partner für die Interaktion mit intrazellulären Molekülen.

Die 798 Aminosäuren lange β1- Untereinheit liegt beim Menschen in der Region p11.2 auf Chromosom 10 (ncbi). Eingeleitet von einem 20 Aminosäuren umfassenden aminoterminalen Signalpeptid folgt die extrazelluläre Domäne aus 708 Aminosäuren. Sie enthält unweit des Transmembransegments eine Sequenz die viermal mit hoher Homologie wiederholt wird (Argraves et al. 1987) und 170 Aminosäuren lang ist (uniprot P05556), 31 davon sind Zysteinreste. Diese und 25 weitere in der extrazellulären Domäne (Argraves et al. 1987). Sie ist Grundlage für zahlreiche Disulfidbrückenbindungen, die die Tertiärstruktur des Moleküls maßgeblich prägen. Außerdem kommt im extrazellulären Teil noch eine Bindungsstelle für zweiwertige Kationen vor (Berman et al. 2003). Der zytoplasmatische Abschnitt besteht aus 47 Aminosäuren (Argraves et al. 1987). Ähnlich wie bei den α- Untereinheiten verfügen auch die β- Ketten hier mit HDRR über ein hochkonserviertes Motiv (Abb. 1.7 A), das für die Dimerbildung essentiell ist

(Berman et al. 2003). Die hydrophoben transmembranen Bereiche von α2 und β1 bestehen aus 22 (uniprot P17301) bzw. 23 Aminosäuren (Argraves et al. 1987) und durchspannen die Lipiddoppelschicht jeweils einfach (Berman et al. 2003). Die α2- Untereinheiten von Mensch und Maus zeigen im Aminosäuresequenzvergleich über 80% Übereinstimmungen (uniprot Align PQ), die β1- Ketten gleichen sich in ihrer Primärstruktur sogar zu über 90% (uniprot Align PP).

1.3.2.2 Expression in der Niere

Integrin α2β1 wird auf vielen endothelialen und epithelialen Zellen als Kollagen- und zum Teil auch Lamininrezeptor exprimiert (Elices und Hemler 1989). In der Niere vermittelt es auf Podozyten und mesangialen Zellen (Aggeli et al. 2009), glomerulären Endothelzellen und vor allem auch in den Epithelzellen der proximalen und distalen Tubuli und der Sammelrohre die Interaktion mit der extrazellulären Matrix. In der reifenden Niere ist der Rezeptor in den späteren proximalen Tubuli und in den Endothelzellen der glomerulären Kapillarschlingen zu finden. Seine Bedeutung zeigt sich beispielsweise bei der hereditären polyzystischen Nierenerkrankung. Dort ist eine veränderte Expression von Integrin α2β1 und anderen β1- Integrinen in den zystisch formierten Tubulusepithelzellen nachweisbar. Eine Störung der Interaktion zwischen der tubulären Basalmembran und den Integrinen der Zellen spielt wahrscheinlich eine kausale Rolle in der Pathogenese der Erkrankung, die mit einem progressiven Verlust funktionellen Nierengewebes einhergeht (Kreidberg und Symons 2000).

1.3.2.3 Mechanismus der Kollagen- IV- Bindung

Integrin α2β1 dient als Rezeptor für Bestandteile der extrazellulären Matrix. Unter den Kollagenen besteht die höchste Affinität zum Typ I, gefolgt von Typ IV (Kern et al. 1993, Nykvist et al. 2000). Beim Laminin sind Bindungen zu den Isoformen 1 (Pfaff et al. 1994) und 5 (Orian- Rousseau et al. 1998) bekannt. Die Möglichkeit, diese Liganden zu binden, variiert zwischen verschiedenen Zelltypen. Während Fibroblasten und Thrombozyten mit Kollagenen in Wechselwirkung treten, agieren α2β1- Integrine endothelialer und epithelialer Zellen auch als Lamininrezeptoren (Elices und Hemler 1989). Kollagen IV bindet unter anderem mit Hilfe des ***c****yanogen* ***b****romide derived* (CB3)- Fragments, das 100 nm vom aminoterminalen Ende entfernt liegt. Eine Blockade des Fragments durch

Antikörper schränkt die Bindung von Zellen an Kollagen IV um bis zu 80% ein. CB3 weist eine durch Disulfidbrücken stabilisierte tripelhelikale Konformation auf. Diese Helixstruktur ist essentiell für die Erkennung und Bindung des Moleküls (Vandenberg et al. 1991). Im CB3- Fragment konnten zwei Bindungsstellen für α2β1 und eine für α1β1 gefunden werden (Kern et al. 1993). Ein wichtiges Bindungsmotiv, das sich zum Teil auch in den CB3- Regionen befindet, ist GxxGER. Während das Triplett GER essentieller Bestandteil ist, sind bei den drei weiteren beteiligten Aminosäuren verschiedene Kombinationen möglich. In Kollagen IV finden sich in der α2- Kette GAOGER (Aminosäuren 1251- 1256) sowie GFOGER in den Ketten α1 (AS 385- 390), α3 (AS 756- 761), α4 (AS 915- 920) und α5 (AS 400- 405). Die Affinität zu GFOGER ist vielfach höher als die zu GAOGER (Siljander et al. 2004). Die Kollagentripelhelix liegt in einer Art Rinne der I- Domäne des Integrins (Abb. 1.8 A, B). Ihre Rotationsfreiheit wird durch die C- Helix eingeschränkt. So wird das Kollagenmolekül passend gelagert um eine direkte Bindung des Glutamats (E) der GxxGER- Sequenz an das Metallion des α2- MIDAS- Motivs zu ermöglichen. Der Ligandenbindung folgen Strukturveränderungen. Es entsteht eine Art „offene“ Konformation, um Kollagen mit hoher Affinität zu binden (Emsley et al. 2000). Neben den speziellen Sequenzen im tripelhelikalen Teil ist auch die NC1- Domäne an der Bindung durch α2β1 beteiligt. Ihre Blockade durch spezifische Antikörper reduziert die Anlagerung an Kollagen IV um etwa 15% (Setty et al. 1998). Podozyten binden beispielsweise über Integrin α2β1 und andere Integrine an der α3(IV)- NC1- Domäne, mesangiale Zellen nutzen fast ausschließlich die α1(IV)- NC1- Domäne. Auch die Bindungsstellen außerhalb des tripelhelikalen Bereichs sind in der Lage über Integrine intrazelluläre Signalwege zu aktivieren (Aggeli et al. 2009).

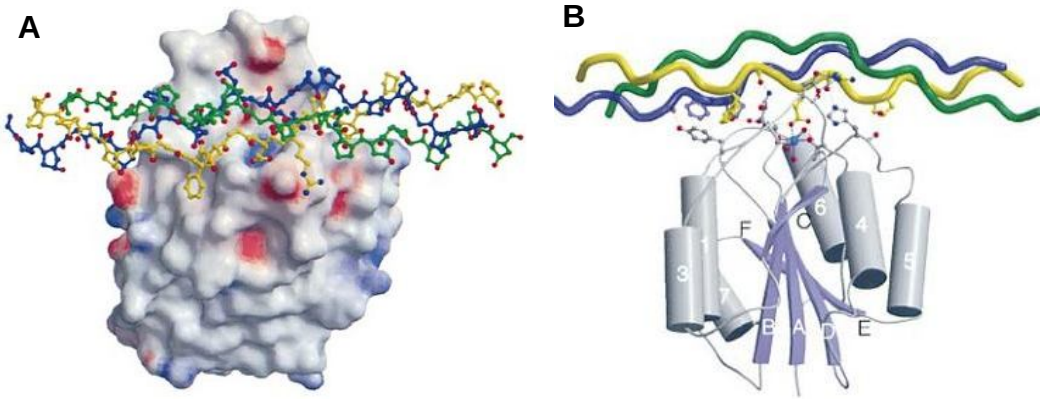


Abb. 1.8 A I- Domäne, die ein Kollagenmolekül gebunden hat. **B** Detailansicht der an der I-Domäne des Integrins gebundenen Kollagentripelhelix (**A/B** Emsley et al. 2000 S. 49, 50)

1.3.2.4 Beispiele wichtiger Signaltransduktionswege

Integrine verfügen selbst über keine katalytische Aktivität, interagieren aber mit vielen intrazellulären Molekülen, wie Talin, Paxillin, den Proteinkinasen FAK und ILK oder Transkriptionskofaktoren. Diese sind in der Lage unterschiedlichste Kaskaden in Gang zu setzen. Die meisten Proteine binden an den zytoplasmatischen Teil von β1. Jedoch kann auch die α2- Untereinheit Bindungspartner z.B. für Aktin sein (Berman et al. 2003). Aus der Vielzahl vermittelter Signalwege sollen an dieser Stelle zwei ausführlicher erläutert werden:

- der Mitogen- activated Protein- Kinase (MAPK)- Weg als Beispiel für die Beteiligung an der Steuerung von Differenzierungs- und Proliferationsprozessen der Zellen und der Matrix
- der Integrin- linked Kinase (ILK)- Weg als Beispiel der Beeinflussung des Zellzyklus und des Überlebens der Zelle.

Der MAPK- Signalweg

Zahlreiche Integrin- vermittelte Signalwege nutzen die MAP- Kinase. Die Aktivierung wird oft über die ***F**ocal **A**dhesion **K**inase* (FAK) eingeleitet, die z.B. Paxillin, Talin oder p130 Cas binden kann. Die Tyrosinkinase befindet sich in Zellen gehäuft im Bereich integrinreicher (fokaler) Adhäsionen. Nach Kontakt mit der extrazellulären Matrix wird FAK dort verstärkt rekrutiert und autophosphoryliert. Es entsteht eine Anlagerungsmöglichkeit für Src, das das Enzym weiter phosphoryliert und so die Bindung des Adapterproteins Grb 2 ermöglicht.

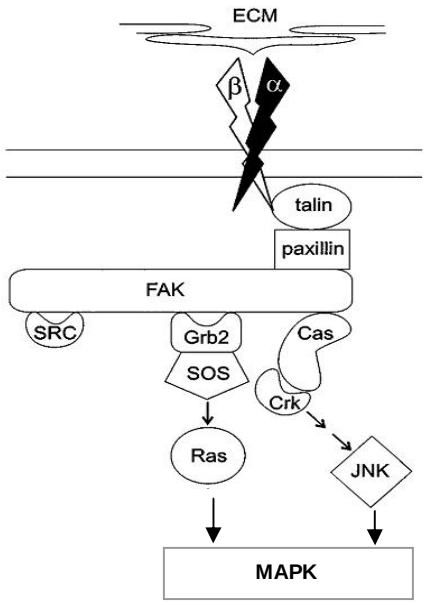


Abb. 1.9 MAP- Kinase- Kaskade, Erläuterungen im Text (modifiziert nach Juliano 2002, S. 290)

Dessen Partnermolekül Sos kann Ras aktivieren, das die MAPK- Kaskade startet. Auch p130 Cas kann von FAK und Src phosphoryliert werden und führt über die Adaptoren Crk und JNK ebenso zur Aktivierung (Abb. 1.9) (Juliano 2002). MAPK- Wege sind bei der Regulation von Genen der extrazellulären Matrix beteiligt. Die Aktivierung via FAK und Src spielt beispielsweise in intestinalen Epithelzellen eine Rolle. Nach Kontakt mit dem Kollagen IV der Basalmembran wird die Kaskade über Integrin α2β1 eingeleitet. Auch ein Weg über p130 Cas ist beschrieben (Sanders und Basson 2004). Der Cas- Crk- Komplex kann Rho G- Proteine wie Cdc42 beeinflussen (Berman et al. 2003). Über Cdc42 und verschiedene MAP- Kinasen aktiviert Integrin α2β1 p38α. P38α führt wiederum zur Transkription von Kollagengenen, z.B. für Kollagen I (Ivaska et al. 1999) und bestimmt so die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix mit.

Der ILK- Signalweg

Ein weiteres wichtiges Signalmolekül ist die ILK. Durch Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils der β1- Untereinheit am Serinrest 790 ermöglicht sie Beziehungen zu vielen anderen Struktur- und Signalproteinen und ihren Reaktionswegen. Die ILK ist wichtig für die Aufrechterhaltung eines normalen Zellzyklus und damit für das Überleben der Zelle (Berman et al. 2003). Ihre besondere Bedeutung konnte auch in den Podozyten der Glomeruli bereits gezeigt werden. Bei Erkrankungen, die mit Proteinurie einhergehen, ist eine ILK- Überexpression nachweisbar. Die gesteigerte Transkriptionsrate konnte in murinen und humanen Podozyten in zeitlichem Zusammenhang mit dem Auftreten einer

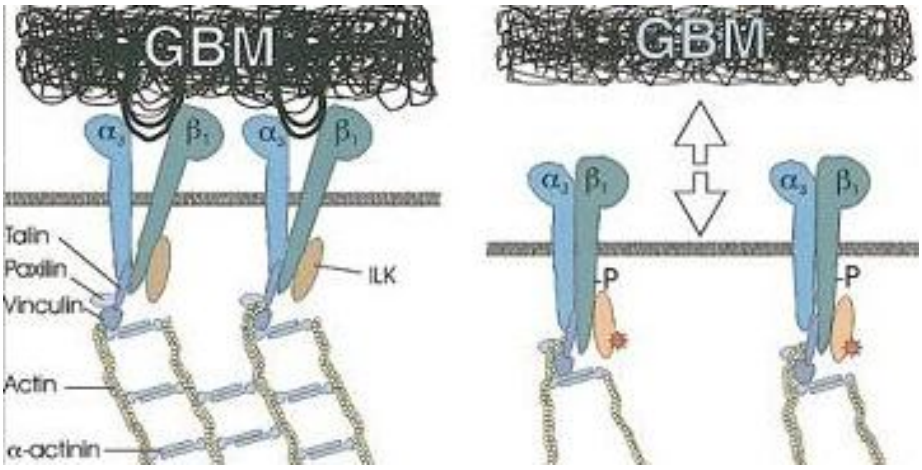


Abb. 1.10 ILK- abhängige Veränderung der Podozyten - GBM - Interaktion bei intakter Filtrationsbarriere (links) und bei Schädigung der Podozyten (rechts) (Kretzler et al. 2001, S. 1845)

Proteinurie gebracht werden. Werden Zellen beispielsweise durch eine selektive Proteinurie erzeugendes Puromycin geschädigt, führt dies zu einer messbar erhöhten Aktivität der Kinase. Eine Schädigung der Podozyten scheint daher direkt mit einer ILK- Induktion zu korrelieren. Geschädigte Podozyten wiederum stellen keine intakte glomeruläre Filtrationsbarriere mehr dar und ermöglichen Proteinurie und letztendlich fibrotische Prozesse. In ILK- überexprimierenden Podozyten findet sich ein hoch proliferativer Phänotyp mit kopfsteinpflasterartiger Morphologie der Zellen. Außerdem ist das Ausmaß der Adhäsion an die GBM deutlich reduziert. Ursache ist die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne der β1- Untereinheit durch die ILK, die eine reduzierte Affinität zu extrazellulären Matrixkomponenten bewirkt (*Detachment*, Abb. 1.10). Auch die Wahrnehmung der extrazellulären Matrix beeinflusst das Enzym. Sowohl auf Kollagen I und IV als auch auf Fibronektin- beschichteten Oberflächen resultiert eine verminderte Aktivität der ILK. Die Störung der Bindung von Integrinen an ihre extrazellulären Liganden kann somit zu einer Erhöhung der Enzymaktivität führen. Da die ILK- Kontakte zum Zytoskelett hat, sind hier Ursachen für das *Effacement* von Podozyten denkbar (Kretzler et al. 2001). Mäuse mit ILK- defizienten Podozyten entwickeln schwere strukturelle und funktionelle Nierenschäden. Die anfänglich gesund erscheinenden Tiere erleiden im Verlauf eine fokale segmentale Glomerulosklerose, die sich später diffus manifestiert und mit tubulointerstitieller Inflammation und Fibrose einhergeht. Es finden sich irreguläre Verdickungen der GBM mit elektronenschwächeren Arealen in der Lamina densa und Aufsplitterungen. Die Podozyten durchlaufen *Effacement*. Dazu passend resultieren klinisch eine progrediente Proteinurie, sowie hohe Serumharnstoffwerte. Die Lebenserwartung ist aufgrund der terminalen Niereninsuffizienz deutlich verkürzt. Mit 12 Wochen zeigen die ILK -/- Mäuse eine klar erhöhte Transkriptionsrate der Gene für Kollagen α1(I) und Fibronektin, während die Expression von α3(IV), α4(IV) und α5(IV) signifikant abnimmt. Als mögliche Erklärung für die GBM- Aufsplitterungen, die denen des Alport- Syndroms ähneln, wird eine veränderte Zusammensetzung der GBM mit einer weniger starken Dichte der Ablagerung von Matrixbestandteilen diskutiert. Ursache dafür könnte die fehlende Kommunikation der ILK über ihre β1- Integrine sein (El-Aouni et al. 2006). Da sowohl die Überexpression des Enzyms als auch das Fehlen schwere Nierenfunktionsstörungen bewirken, ist eine zentrale Rolle in essentiellen Steuerungs- und Adhäsionsprozessen wahrscheinlich.

1.3.2.5 Auswirkungen des Verlustes der α2- bzw. β1- Untereinheit

Chen et al. und Holtkötter et al. haben 2002 an Mausmodellen Auswirkungen des Verlustes des ITGA2- Gens auf den Phänotyp beschrieben. Aufgrund der fehlenden α2- Untereinheit kann kein α2β1- Integrin exprimiert werden. Übereinstimmend finden sich lebens- und reproduktionsfähige Tiere, die keine auffallenden anatomischen und histologischen Abweichungen zeigen. Eine normale Entwicklung ist daher nicht zwingend ITGA2- abhängig. Veränderungen sind in der Brustdrüse in Form einer verminderten Verzweigung der Drüsenanteile zu finden. Eine ausreichende Laktation und somit die Möglichkeit die Nachkommen adäquat zu stillen ist dennoch gewährleistet. Eine verminderte α2β1- Expression ist jedoch stark mit der Entstehung weniger differenzierter Phänotypen in Karzinomen der Brust korreliert. Thrombozyten der ITGA2 -/- Tiere sind nicht in der Lage Kollagen Typ I, das durch eine Verletzung der Gefäßwand freigelegt wird zu binden. Eine Aggregation kann beobachtet werden, sie tritt jedoch verzögert ein und ist durch eine Kompensation über weniger wirkungsstarke Korezeptoren erklärbar (Chen et al. 2002). Klinisch sind bei normaler Blutungszeit und Thrombozytenzahl insgesamt keine schweren Hämostasestörungen zu finden (Holtkötter et al. 2002). Die Nieren der α2- defizienten Mäuse zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten (Chen et al. 2002). Der komplette Verlust der β1- Untereinheit ist bereits um den Zeitpunkt der Implantation letal (Hynes 2002). Eine selektive Ausschaltung ausschließlich in den Podozyten führt zu lebensfähigen Tieren, jedoch mit schwerwiegenden Konsequenzen für die Integrität glomerulärer Strukturen. Schon bei der Geburt sind strukturelle Podozytenfußfortsatzveränderungen erkennbar, die sich bereits im Alter von zehn Tagen zu massivem *Effacement* und segmentaler Aufsplitterung der GBM ausdehnen. Es findet auch zunehmend Apoptose in den Podozyten statt, wodurch die Anzahl der Zellen kontinuierlich schwindet. Das Resultat der Schädigung des glomerulären Filters ist eine ausgeprägte Proteinurie und damit der Eintritt in den Kreislauf der renalen Fibrose mit terminaler Niereninsuffizienz und einem Überleben von maximal sechs Wochen. Der ausgeprägtere Schweregrad der Nierenschädigung beim β1- Verlust gegenüber dem von α2 kann dadurch erklärt werden, dass sich die β1- Untereinheit mit einer Vielzahl anderer α- Einheiten zusammenlagert. Daher entfällt eine große Anzahl an Kommunikationspartnern zwischen Podozyten und der GBM (Pozzi et al. 2008).

1.4. Das Alport- Mausmodell

1.4.1 Eigenschaften des Alport- Mausmodells

Nierenerkrankungen bei denen es zur Proteinurie kommt, wie auch das Alport-Syndrom, verlaufen in typischer Weise. Sowohl für autosomale, als auch für X-chromosomale Formen existieren Tiermodelle an Hunden und Mäusen, die die Möglichkeit bieten, Pathomechanismen zu analysieren und therapeutische Interventionen zu erarbeiten (Cosgrove et al. 2007). Das COL4A3- Alport- Mausmodell bietet einige Vorteile:

- eine kurze Generationsdauer
- eine ausreichende Anzahl an Nachkommen
- hohe Fallzahlen und Kontrollindividuen
- einheitlicher und beeinflussbarer Genotyp
- Verlauf der Erkrankung innerhalb weniger Wochen
- schnelle Erkenntnisse über Spontanverläufe und den Nutzen bzw. die unerwünschten Wirkungen von Interventionen
- einfache Unterbringung und dadurch kontinuierliche Beobachtung
- standardisierte Diagnose- und Behandlungskonzepte anwendbar
- gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
- gute Korrelation zum humanen Verlauf (Cosgrove et al. 1996).

Mutationen im COL4A3-, COL4A4- oder COL4A5- Gen führen jeweils zum Fehlen aller drei Ketten in der GBM. Cosgrove et al. beschreiben 1996 ein Mausmodell bei dem durch Manipulationen im COL4A3- Gen die Expression des gesamten α3α4- Netzwerkes unterdrückt wird und die betroffenen Individuen am Vollbild des autosomalen Alport- Syndroms erkranken. Während bei COL4A3 +/- der Phänotyp immunhistochemisch dem gesunder Kontrollen entspricht, lassen sich bei homozygoten Knockouts weder α3(IV)-, noch α4(IV)- oder α5(IV)-Ketten in der GBM anfärben (Abb. 1.11 A). α1(IV)- und α2(IV)- Ketten sind dort dagegen verstärkt zu lokalisieren. Klinisch kommt es bereits früh zur Mikrohämaturie und mit etwa 35 Tagen auch zur Proteinurie, die progredient verläuft und schließlich bei 10 - 15 mg/ml konstant bleibt. Der Serumharnstoffwert steigt ab Woche zehn kontinuierlich an. Die Tiere versterben durchschnittlich im Alter von 14 Wochen an terminaler Niereninsuffizienz. Makroskopisch fallen bis auf

die Hälfte des normalen Volumens geschrumpfte Nieren auf. Elektronenmikroskopisch sind die charakteristischen Veränderungen sichtbar (Abb. 1.11 C). Die Zusammensetzung der GBM verändert sich. Proteine wie Laminin, Fibronektin und Heparansulfat Proteoglykan akkumulieren. Möglich ist eine spezifische Genexpression, z.B. in Podozyten, nach Kontakt mit der veränderten GBM über Rezeptoren wie Integrine. Vergleiche mit humanen Verläufen zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung bezüglich des Ablaufes und den ultrastrukturellen Veränderungen. Erkenntnisse aus dem Mausmodell erlauben so Rückschlüsse auf Ablauf und Beeinflussbarkeit beim Menschen (Cosgrove et al. 1996).

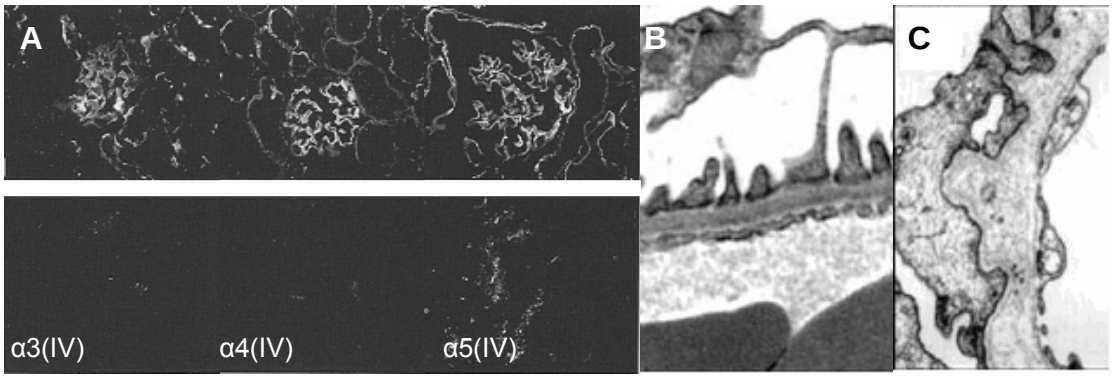


Abb. 1.11 A Expression der α- Ketten in den Glomeruli (Immunfluoreszenz) oben: COL4A3 ++ unten: 129/SvJ COL4A3 -- (Cosgrove et al. 1996, S. 2983) **B** normale GBM **C** COL4A3 -- GBM mit korbgeflechtartigen Aufsplitterungen und Verdickung der Lamina densa (B, C Gross et al. 2004 b, S. 107)

1.4.2 Einfluss verschiedener genetischer Hintergründe auf den klinischen Verlauf und das histologische Bild

Für das autosomale Alport- Syndrom existiert neben dem ursprünglich im 129/ SvJ- Hintergrund angelegten Mausmodell (Cosgrove et al. 1996) ein weiteres im C57BL/6- Hintergrund. Vergleiche zeigen, dass sich der genetische Hintergrund auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt (Andrews et al. 2002). Das Einsetzen einer nachweisbaren Proteinurie ist mit 100 Tagen bei C57BL/6- Tieren deutlich gegenüber den 129/SvJ- COL4A3 -/- Mäusen (35 Tage) verzögert, ebenso wie der Anstieg der Serumharnstoff- und Kreatininwerte im Blut (150 gegenüber 50 Tagen). Damit verschiebt sich das Einsetzen der terminalen Niereninsuffizienz auf 194 gegenüber 66 Tagen. Passend dazu können in beiden Gruppen histopathologisch Aufsplitterungen der GBM ab der zweiten Lebenswoche gefunden werden, jedoch deutlich vermehrt in 129/SvJ- Tieren. Der Um-

bau läuft in beiden Modellen ab, in C57BL/6- COL4A3 -/- Mäusen jedoch verlangsamt. Gene die zum unterschiedlichen Verlauf beitragen werden auf Chromosom 9 und 16 vermutet (Andrews et al. 2002). Unter anderem führt eine veränderte Expression der α5(IV)- und α6(IV)- Ketten zu einer verlangsamten Progression. Über die Möglichkeit einer alternativen Umstellung wird die Unfähigkeit zum Ersatz des embryonalen α1α2- Netzwerks durch α3α4, z.B. in der GBM der adulten Niere, aufgrund der Defekte in den entsprechenden Ketten, durch den verstärkten Einbau des α5α6- Netzwerkes teilkompensiert. In der GBM von C57BL/6- COL4A3 -/- Mäusen ist diese ektope Deposition der α5(IV)- und α6(IV)- Ketten am stärksten ausgeprägt. In 129/SvJ- Tieren ist sie nur schwach nachzuweisen (Abb. 1.12). Beim Menschen ist bisher keine alternative Isoformumstellung bekannt. Ergebnisse beider Hintergründe unterscheiden sich vom zeitlichen Verlauf und in der Übertragbarkeit auf humane Verläufe. Unabhängig vom genetischen Hintergrund resultiert früher oder später die Fibrose durch die Wahrnehmung einer veränderten GBM (Cosgrove et al. 2007).

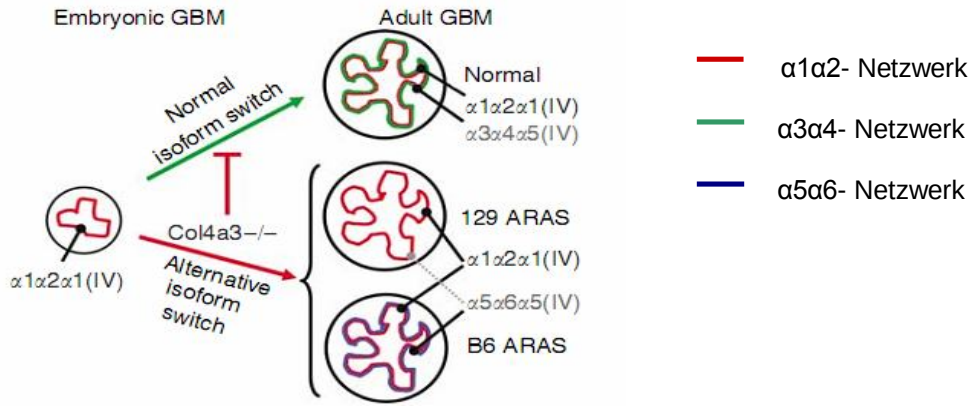


Abb. 1.12 genotypabhängige Netzwerkexpression in der GBM, 129 = 129/SvJ, B6 = C57BL/6, ARAS = autosomal- rezessives Alport- Syndrom (Cosgrove et al. 2007, S. 616)

Die Vorteile des C57BL/6- COL4A3 -/- Modells sind (Cosgrove et al. 2007):

- ein erweitertes Zeitfenster für die Analyse der zur glomerulären Schädigung führenden Schritte aufgrund der verlangsamten Progression
- damit mehr Zeit in der die Möglichkeit zur Fortpflanzung und Kreuzung homozygoter Individuen besteht, was die Zucht vereinfacht
- das Vorhandensein vieler Knockoutmodelle im C57BL/6- Hintergrund, so dass sich leicht Tiere die multiple Mutationen tragen generieren lassen um Wechselwirkungen auf die Pathogenese zu analysieren

- das C57BL/6- Modell existiert auch für die X- chromosomale Form; wegen der Mutationen in der α5(IV)- Kette besteht, anders als beim autosomalen Alport- Syndrom, keine Möglichkeit zur alternativen Expression des α5α6- Netzwerkes was Untersuchungen über den Einfluss der Zusammensetzung der GBM bei der Pathogenese erlaubt.

1.5 Hypothese

Kollagen Typ IV ist ein essentieller Bestandteil der GBM der Niere. Zahlreiche hereditäre Erkrankungen führen durch verändertes Kollagen IV zu schwerwiegenden Abweichungen der renalen Morphologie und Einschränkungen der Nierenfunktion. Von großem Interesse sind deshalb die Rezeptoren und Kaskaden, die zur Wahrnehmung der extrazellulären Matrix durch die Zellen beitragen. In der Niere weit reichend exprimiert ist Integrin α2β1. Aufgrund der Vielzahl seiner bekannten Interaktionsmöglichkeiten, insbesondere mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ IV und Laminin, sowie mit anderen Rezeptoren und der Fähigkeit zur Beeinflussung essentieller zellulärer Signalwege, die wiederum die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix modellieren, stellt es eine potentielle Schnittstelle in der Pathogenese der Erkrankungen dar. Es erscheint deshalb aussichtsreich die Rolle des Rezeptors genauer zu untersuchen. ***Aufgrund seiner Einbindung in der Zell- Matrix- Kommunikation wird davon ausgegangen, dass Integrin α2β1 in der Lage ist, das in hereditären Typ- IV- Kollagenerkrankungen aus verschiedenen Gründen veränderte Kollagen IV wahrzunehmen und Signale in den Zellen zu initiieren, die zur renalen Fibrose führen. Die Abwesenheit des Rezeptors sollte im Umkehrschluss zu einem günstigeren Krankheitsverlauf führen.*** In der vorliegenden Arbeit sollen Auswirkungen des Fehlens des Integrins α2β1 auf den Verlauf des Alport- Syndroms als stellvertretendes Modell für hereditäre Nierenerkrankungen die über Veränderungen der extrazellulären Matrix zur renalen Fibrose führen, analysiert werden. Über die Ausschaltung des zur Expression notwendigen ITGA2- Gens können am etablierten C57/BL6- Alport- Mausmodell Erkenntnisse zu verschiedenen Parametern erhoben werden. Die Ergebnisse erlauben Rückschlüsse, ob Integrin α2β1 tatsächlich einen ausreichend starken Einfluss auf die Initiierung profibrotischer Kaskaden hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank MOV 112 F	*Sanyo, Moriguchi (Japan)*
Eismaschine	*Scotsman, Mailand (Italien)*
Elektrophoresekammer Horizon 58	*Gibco BRL, Karlsruhe*
Elektrophoreseset XCell SureLock Mini cell	*Invitrogen, Karlsruhe*
Electrophoresis Power Supply E 835	*Consort, Turnhout (Belgien)*
Electrophoresis Power Supply PS 304	*Gibco BRL, Karlsruhe*
Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 TV	*Zeiss, Jena*
Gefrierschrank Medical Freezer	*Sanyo, Moriguchi (Japan)*
Kühlblock	*Kunz, Nynäshamn (Schweden)*
Kühlschränke Liebherr Comfort / Economy	*Liebherr, Ochsenhausen*
Lichtmikroskop Diavert	*Leica, Bensheim*
Microtom 2040 Autocut	*Reichert Jung, Depew (USA)*
Mikrowelle Y53 700W	*Moulinex, Eigeltingen*
Paraffinstreckbad	*Medax, Neumünster*
Pipetten Physio Care Concept	*Eppendorf, Hamburg*
Rüttelplatte Rotamax 120	*Heidolph, Schwabach*
Stoppuhr SKT 338	*Oregon Scientific, Neu-Isenburg*
Thermocycler T Professional/Standard	*Biometra, Göttingen*
Thermomixer Comfort	*Eppendorf, Hamburg*
Tissue Block Dispenser PAG 12	*Medite, Burgdorf*
UV Imaging Fluor S Multi Imager	*Bio Rad, München*
Vibrationsmischer Vortex VF2	*Janke und Kunkel, Staufen*
Waage LA 620 S – OCE	*Sartorius, Göttingen*
Wasserbad GFL 1002	*Krannich, Göttingen*
Wasserfilteranlage Milli Q RG	*Millipore, Schwalbach*
Werkbank Bio GARD Hood	*Baker Company, Sanford (USA)*
Zentrifuge Z 233 M	*Hermle, Wehingen*

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alufolie	*Papstar, Kall*
Bis Tris Mini Gel NuPage® Novex	*Invitrogen, Karlsruhe*
Bromopropanstift Dako Pen	*Dako Cytomation*, *Glostrup (DK)*
Deckgläser : 18 x 18 mm	*Roth, Karlsruhe*
24 x 24 mm	*Menzel Gläser, Braunschweig*
Einmalhandschuhe Peha soft	*Hartmann, Heidenheim*
Einmalpipetten 10ml,20ml	*Sarstedt,* Nümbrecht
Eppendorf- Reaktionsgefäße 0,5ml/1ml/1,5ml	*Eppendorf, Hamburg*
Glaswaren	*Fisher Scientific, Schwerte*
	Duran Schott, Mainz
	VitLab, Großostheim
Labortücher Kimtech Science	*Kimberly Clark, Koblenz*
Objektträger	*Menzel Gläser, Braunschweig*
Pipettenspitzen	*Sarstedt,* Nümbrecht
Reagenz- und Zentrifugenröhren 15ml, 50ml	*Sarstedt,* Nümbrecht
Wägepapier MN 226	Macherey Nagel, Düren

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in den Qualitätsstufen für die Mikroskopie bzw. höchster Reinheitsgrad/ pro analysi verwendet.

Aceton	*Merck, Darmstadt*
Agarose	*Invitrogen, Karlsruhe*
Aqua bidest	*Millipore, Schwalbach*
Aqua ad injectabilia, Ampuwa	*Fresenius Kabi, Bad Homburg*
Chloroform	*Merck, Darmstadt*
Coomassie- Brillantblau R 250	*Merck, Darmstadt*
Entellan	*Merck, Darmstadt*
Eosin G	*Roth, Karlsruhe*
Essigsäure (Eisessig) 100%	*Merck, Darmstadt*
Ethanol, rein	*Roth, Karlsruhe*
Ethanol 99%, vergällt	*GeReSo mbH, Einbeck*

Ethidiumbromid 1%	*Merck, Darmstadt*
Fluorescent Mounting Medium	*Dako Cytomation*, *Glostrup (DK)*
Formaldehyd 4%	*Sigma Aldrich, Steinheim*
Hämalaunlösung nach Mayer pH 3	*Merck, Darmstadt*
Methanol	*Sigma Aldrich, Steinheim*
Silane	*Sigma Aldrich, Steinheim*
Tris [Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan]	*Sigma Aldrich, Steinheim*
Xylol	*Merck, Darmstadt*

2.1.4 Lösungen und Puffer

Die Chemikalien zum Ansetzen der Lösungen und Puffer wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma Aldrich (Steinheim) bezogen und in höchstem Reinheitsgrad/ pro analysi verwendet.

Puffer	**Zusammensetzung**	**Menge**
LDS Sample Buffer 4x	Tris HCl	106 mM
NuPage®	Tris	141 mM
Invitrogen	Lithiumdodecylsulfat (LDS)	2%
pH 8.5	Glycerol	10%
	EDTA	0.51 mM
	Coomassie Blue G250	0.22 mM
	Phenolrot	0.175 mM
Coomassie-Färbelösung	Coomassie R 250	0,1%
	Eisessig	20%
	Methanol	40%
	Aqua dest.	40%
PBS	KH_2PO_4 (1,06 mM)	144 mg/l
Gibco	NaCl (155,2 mM)	9000 mg/l
pH 7,4	Na_2HPO_4-$7H_2O$ (2,97 mM)	795 mg/l

MOPS SDS- Laufpuffer 20x NuPage® *Invitrogen* pH 7.7	Morpholinopropansulfon- säure (MOPS) Tris SDS EDTA	50 mM 50 mM 0.1% 1 mM
PCR- Probenpuffer	Glycerol Xylencyanol Ampuwa	30 ml 250 mg 100ml
Reaktionspuffer S 10x *Peqlab*	Tris-HCl pH 8.8 KCl Tween 20 $MgCl_2$	100 mM 500 mM 0.1% 15 mM
TAE	Tris EDTA (250mM), pH 8 Essigsäure Aqua dest.	121 g 100 ml 29 ml 500 ml
TBS (10x) pH 7,5 *Sigma Aldrich*	Tris, pH approx. 7.4, NaCl	0.9%

Tab. 2.1 Übersicht der verwendeten Puffer und ihre Zusammensetzung

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper

Kaninchen- anti- Laminin- IgG
Abcam, Cambridge (UK)

Sekundärantikörper

Ziege- anti- Kaninchen- IgG Cy3- konjugiert
Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. über Dianova, Hamburg

2.1.6 Enzyme, Proteine, Nukleotide und Sera

Bovines Serum Albumin Fraktion V	*PAA Laboratories GmbH, Cölbe*
dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM je Nukleotid)	*Peqlab, Erlangen*
Proteinase K	*Qiagen, Hilden*
Sawady Taq DNS- Polymerase (5 U/µl)	*Peqlab, Erlangen*
Ziegenserum NGS	*Gibco BRL, Karlsruhe*

Oligonukleotidprimer — *Eurofins MWG, Ebersberg*

Name	**Sequenz (5´→ 3´)**
COL4A3 neo - mutant	ATTCGCCAATGACAAGACG
COL4A3 Exon 5 reverse	CCTGCTAATATAGGGTTCGAGA
COL4A3 Exon 5 wild	CCAGGCTTAAAGGGAAATCC
ITGA2 forward	AAGTTGCTCGCTTGCTCTA
ITGA2 wild reverse	AATATCCGTAGAAGCTCAGC
ITGA2 mutant reverse	TGGCTTTTCTTCCTCCTATGG

Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidprimer

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

DNS- Molekulargewichtsmarker

Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder *Fermentas, St. Leon-Rot*

Proteinmolekulargewichtsmarker

See Blue® Plus 2 Prestained Standard *Invitrogen, Karlsruhe*

Proteinbande	Molekulargewicht (kDa)
Myosin	191
Phosphorylase	97
Bovines Serumalbumin	64
Glutamic Dehydrogenase	51
Alkohol Dehydrogenase	39
Carbonic Anhydrase	28
Myoglobin rot	19
Lysozym	14
Aprotinin	keine Angabe
Insulin, ß- Kette	keine Angabe

Tab. 2.3 Zuordnung der Banden des verwendeten Molekulargewichtsmarkers zu den entsprechenden Proteinen und Molekulargewichten (Herstellerangaben Invitrogen)

2.1.8 PCR- Kit

DNeasy Blood & Tissue Kit *Qiagen, Hilden*

AE- Puffer, AL- Puffer, ATL- Puffer, AW- 1- Puffer, AW- 2- Puffer

DNEasy Mini Spin Columns mit 2 ml Sammelröhrchen

Proteinase K

2.1.9 Tierstamm

COL4A3- Knockoutmäuse in reinem C57BL/6- Hintergrund wurden kommerziell erworben (*Jackson Immuno Research Laboratories*, Westgrove, PA, USA). ITGA2- Knockoutmäuse, ebenfalls in einem reinen C57BL/6- Hintergrund, wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Beate Eckes (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Klinikum der Universität Köln). Zur Generierung der Versuchsgruppen wurden doppelt heterozygote Tiere zunächst über mindestens acht Generationen verpaart. Die Tiere befanden sich in Tierställen der Universität Göttingen bzw. des Max- Planck- Instituts/Göttingen in pathogenfreier Umgebung. Die Unterbringung unter Einhaltung eines adäquaten Tag- Nacht- Rhythmus, sowie hygienisch einwandfreien Bedingungen und eines ausreichenden Nahrungs- und Flüssigkeitsangebotes wurde durch qualifiziertes Personal der Einrichtungen überwacht. Die Haltung entspricht den Richtlinien des §12 der Deklaration von Helsinki (Weltärztebund, Revision Seoul, Oktober 2008) sowie des „Guide for the care and use of laboratory animals“ (NIH, 1996). Die Anzeige der Tierzucht ist erfolgt. Für die Arbeit wurden keine genehmigungspflichtigen Tierversuche durchgeführt.

2.1.10 Hard- und Software

Software:	analySIS 3.2	*Soft Imaging System, Münster*
	Kodak ds 1D 2.0.3	*Kodak Scientific Imaging Systems, Rochester, NY (USA)*
	Microsoft Office 2003 mit Microsoft Windows XP 5.1 Professional, Service Pack 3	*Microsoft, Redmond, WA (USA)*
	Multi Analyst PC 1.1	*Bio Rad, Hercules, CA (USA)*
	Photo Studio 5.5	*ArcSoft, Fremont, CA (USA)*
	Statistica 8.0	*StatSoft, Hamburg*
	SigmaPlot 5.0	SPSS Inc., *Chicago, IL (USA)*
Drucker:	LaserJet P 2015	*Hewlett Packard, Böblingen*
	Ecosys FS 1020D	*Kyocera Mita, Meerbusch*
Scanner:	Cano Scan 5200 F	*Canon, Krefeld*

2.2 Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Methoden selbstständig, nach vorheriger Aneignung theoretischer Kenntnisse und praktischer Fähigkeiten bis zur sicheren Beherrschung, durchgeführt, um möglichst standardisierte Arbeitsabläufe zu gewährleisten. Bereits kurz nach der Geburt wurden Tiere festgelegt, die im Alter von 100 bzw. 150 Tagen für die histologische Aufarbeitung der Nieren mittels HE- Färbung (siehe 2.2.4) bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe 2.2.5) mechanisch getötet wurden. Die Auswahl erfolgte ausschließlich anhand des Kriteriums Genotyp nach PCR bezüglich COL4A3 und ITGA2. Da die Tiere in diesem Alter noch keine krankheitsbedingten Auffälligkeiten zeigen, konnte keine bewusste Selektion erfolgen, die die Ergebnisse verfälschen könnte. Innerhalb der verschiedenen untersuchten Gruppen stammen sie des Weiteren aus Würfen, die in kurzem zeitlichen Abstand (< sieben Tage) aufeinander folgten, um eventuelle Unterschiede durch saisonale Einflüsse zu minimieren. Für die weiteren histologischen Untersuchungen wurde unmittelbar postmortal Blut abgenommen um die Serumharnstoffkonzentration zu den entsprechenden Zeitpunkten zu bestimmen (siehe 2.2.3). Außerdem erhielten ebenfalls zu Beginn der Einteilung dafür festgelegte Tiere direkt vor ihrer Tötung eine Computertomografie (siehe 2.2.6) um die histologischen Bilder durch vergleichende Schnittbilder zu ergänzen.

2.2.1 PCR- Amplifikation und Agarosegelelektrophorese

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (***p****olymerase* ***c****hain* ***r****eaction*, PCR) dient zur Amplifikation eines definierten, durch spezifische Oligonukleotide (*Primer*) begrenzten, DNS- Abschnitts. Nach Hitzedenaturierung der DNS kommt es beim Absinken der Temperatur zunächst zur Anlagerung spezieller Primer (*Annealing*). Von ihnen ausgehend synthetisiert dann eine hitzestabile Taq DNS- Polymerase, unter Zugabe geeigneter Nukleotide, einen dem Matrizenstrang komplementären Strang (Elongation). Durch Wiederholung dieses Zyklus, wird der entsprechende DNS- Abschnitt exponentiell vermehrt.
Die Versuchstiere wurden bezüglich COL4A3 und ITGA2 genotypisiert. Die DNS- Extraktion für die PCR erfolgte unter Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kit (*Qiagen, Hilden)* nach den Angaben des Herstellers.

Vorbereitungen

Puffer AW- 1 sowie AW- 2 wurden vor der ersten Benutzung die erforderlichen Mengen an Ethanol, entsprechend der Kennzeichnung, zugesetzt.

Probenverdau

Pro Versuchstier wurden ein bis zwei Schwanzbiopsien mit einer Länge von etwa 0,5 cm in einem 1,5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß je 180µl ATL- Puffer und 20 µl Proteinase K zugegeben. Zum vollständigen Verdau der Proteine wurde der Ansatz bei 55°C für 5 Stunden im Schüttelwasserbad inkubiert.

DNS- Extraktion

Das Proteinase K behandelte Probenmaterial wurde nach Durchmischung fünf Minuten lang mit einer Drehzahl von 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Haarrückstände in Eppendorf- Reaktionsgefäße pipettiert und für mindestens 15 Sekunden per Vortex gemischt. An die Zugabe von 400 µl ALE je Probe (200 µl AL- Puffer + 200 µl Ethanol) schloss sich die Übertragung in die DNeasy Mini Spin Columns an. Nach Zentrifugation mit 8000 rpm für eine Minute wurden 500 µl AW- 1- Puffer auf die Säulen pipettiert und erneut zentrifugiert. Anschließend konnten je 500 µl AW- 2- Puffer zugesetzt werden. Nach dem Trocknen der enthaltenen Membran bei 14000 rpm für drei Minuten erfolgte das Umsetzen der DNeasy Mini Spin Columns auf frische 1,5 ml Gefäße. Zum Abschluss der DNS- Extraktion wurden 200 µl AE- Puffer auf die Membran pipettiert, die Proben anschließend für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend bei 8000 rpm eine Minute lang zentrifugiert.

PCR- Reaktionsansatz

Aus dem gewonnenen DNS- Extrakt wurden je 1,7 µl entnommen und in 0,5 ml Eppendorfgefäßen pipettiert. Für die PCR wurde ein Mastermix angesetzt, der pro Probe folgende Reagenzien enthält:

20 µl	Wasser (steril)
2, 5 µl	Reaktionspuffer S (10x)
0, 5 µl	dNTP Mix
0, 5 µl	Primer 1
0, 5 µl	Primer 2
0, 5 µl	Primer 3

Nach sorgfältiger Durchmischung dieser Komponenten konnten dem Ansatz 0,15 µl Taq DNS- Polymerase (5 U/µl) je Probe zugesetzt und erneut vermischt werden. Je 23 µl des Reaktionsansatzes wurden zu den Proben gegeben. Der Zeitabstand vom Zusetzen der Taq DNS- Polymerase zum Mastermix bis zum Pipettieren des vollständigen Reaktionsansatzes auf die DNS- Extrakte wurde so gering wie möglich zu halten, um die Funktion des Enzyms nicht zu beeinträchtigen. Das Gemisch wurde dann mit minimaler zeitlicher Verzögerung in den auf 95°C vorgeheizten Thermocycler gestellt.

Thermocycler

Die Denaturierung der DNS erfolgte je bei 95 °C, das Anlagern der *Primer* bei etwa 60 °C und die Elongation durch die Polymerase bei Temperaturen um 70 °C. Zur Genotypisierung (COL4A3 oder ITGA2) wurden zwei modifizierte Programme entsprechend der folgenden Protokolle im Thermocycler durchlaufen:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	
1	95	3:00	
2	62	1:00	
3	72	1:00	
4	95	1:00	
5	60	1:00	
6	72	1:00	
7	95	1:00	
8	58	1:00	
9	72	1:00	
10	95	1:00	
11	56	1:00	
12	72	1:00	
13	95	1:00	
14	54	1:00	
15	72	1:00	37x
16	95	1:00	
17	52	1:00	
18	72	5:00	
19	10	Pause	

Tab. 2.4 Programmschritte des Thermocyclers für die PCR ITGA2

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	
1	95	3:00	
2	60	1:30	
3	72	2:30	
4	95	0:50	
5	58	1:20	
6	72	2:30	
7	95	0:50	
8	56	1:10	
9	72	2:30	
10	95	0:50	40x
11	54	1:00	
12	72	2:30	
13	72	5:00	
14	10	Pause	

Tab. 2.5 Programmschritte des Thermocyclers für die PCR COL4A3

Gelelektrophorese

Zur Identifikation der DNS- Fragmente wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das hierzu verwendete 1,2 % Gel bestand aus 600 mg Agarose, gelöst in 50 ml TAE- Puffer (1x). Nach dem Aufkochen in der Mikrowelle wurden 70 µl Ethidiumbromid (0,02%) zugesetzt, das flüssige Gel in die dafür vorgesehene Kammer der Elektrophoreseapparatur (*Horizon 58, Gibco*) gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation abgewartet. Vor dem Einfüllen der Proben wurde die Elektrophoresekammer mit TAE aufgefüllt. Anschließend konnten die Taschen des Gels mit je 15 µl Material, zusammengesetzt aus 12,5 µl PCR-Produkt und 2,5 µl Probenpuffer, beladen werden. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 mV und einer Stromstärke von ca. 90 mA (*Elektrophoresis Power Supply PS 304, Gibco*) für etwa 30 Minuten (ITGA2) bzw. 40 Minuten (COL4A3). Zur Auswertung wurden die Banden der PCR- Produkte unter UV- Beleuchtung sichtbar gemacht und das Ergebnis mit Hilfe des Programms Multi Analyst (*Bio Rad*) dokumentiert und weiterverarbeitet.

2.2.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE)

Als ein wichtiger Parameter zur Beurteilung einer Nierenschädigung kann der Grad der Proteinurie herangezogen werden. Anhand des Molekulargewichts der ausgeschiedenen Proteine lassen sich glomeruläre und/oder tubuläre Schäden differenzieren. Die Gelelektrophorese ist eines der wichtigsten Verfahren zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekülmasse (Deutzmann et al. 2003). Die Wanderung der Moleküle im elektrischen Feld wird dabei durch saure bzw. basische Gruppen der Aminosäuren ermöglicht, die in Lösungen, abhängig vom pH- Wert, dissoziiert vorliegen und damit eine positive oder negative Gesamtladung des Proteins bedingen (Michov 1995). Eine besondere Form stellt die Elektrophorese unter Verwendung eines Polyacrylamidgels als Trägermedium und des Detergens Natriumdodecylsulfat (***s**odium **d**odecyl **s**ulfat*, SDS) dar. Häufig findet das Verfahren als diskontinuierliche Elektrophorese, also mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und pH- Werten der beteiligten Puffersysteme, Anwendung. Die theoretischen Grundlagen dafür wurden 1964 von Leonard Ornstein gelegt. Ihre praktische Umsetzung gelang Baruch J. Davis im gleichen Jahr. Laemmli kombinierte die Verfahren und führte eine diskontinuierliche SDS- ***P**oly**a**crylamid**g**el**e**lektrophorese (SDS- PAGE) durch (Laemmli 1970). SDS, ein Sulfatester des Dodekanols (C_{12}), lagert sich mit seinem hydrophoben Schwanz an das Protein, während der hydrophile Kopf nach außen zeigt. Durch die Komplexbildung mit SDS (Abb. 2.1) werden hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine aufgehoben und Wasserstoffbrückenbindungen gespalten. Es resultiert der Verlust der Quartärstruktur unter Bildung von denatu-

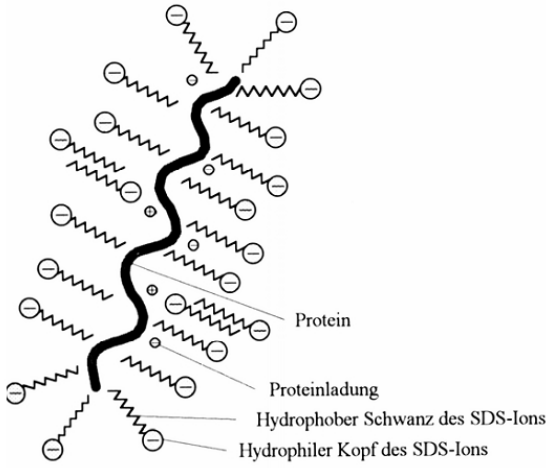


Abb. 2.1 SDS- Proteinkomplex (Michov 1995, S. 151)

rierten Untereinheiten, sowie die Aufhebung der Ladungsunterschiede zwischen den einzelnen Proteinen. Durch SDS homogen negativ geladen, wandern sie bei der Elektrophorese zur positiven Anode. Da sich Ladung und Gestalt der denaturierten Proteine nahezu gleichen, hängt ihre Wanderung im elektrischen Feld maßgeblich nur noch von ihrer Molekülmasse ab. Kleine, niedermolekulare Proteine können dabei eher die Poren des aus Monomeren vernetzten Polyacrylamidgels passieren und sind am Ende der Auftrennung der Anode deshalb näher als Hochmolekulare. Durch Modifikation der Zusammensetzung des Gels kann die Porengröße variiert und die Auftrennung dadurch optimiert werden. Neben SDS sind auch andere ionische Verbindungen zur Denaturierung von Proteinen geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit ***L***ithium***d***odecyl***s***ulfat (LDS) ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der anionischen Detergenzien verwendet. Dabei ist lediglich das endständige Na^+ des SDS durch Lithium (Li^+) ersetzt. Die Wirkung basiert auf dem gleichen Prinzip (Michov 1995).

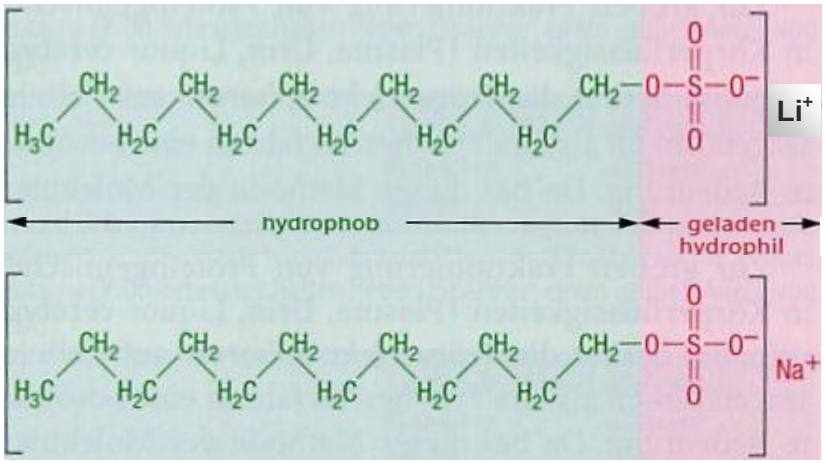


Abb. 2.2 Strukturformeln von LDS (oben) und SDS (unten) (nach Deutzmann et al. 2003, S.65)

2.2.2.1 Probengewinnung

Zur Analyse wurde der Spontanurin der Doppelknockout- und Kontrollmäuse, provoziert durch Festhalten der Tiere, in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gesammelt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bis zu ihrer Auswertung tiefgekühlt bei ca. -18 °C. Als Zeitpunkte der Messung wurde ein Alter von 80, 100, 120, 140 und 150 Tagen festgelegt, wobei Abweichungen von bis zu vier Tagen vor und maximal 10 Tagen nach dem Messzeitpunkt toleriert wurden.

2.2.2.2 Proteinfällung

Im ersten Schritt wurden je 80 µl Urin mit 400 µl Methanol versetzt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Chloroform und 300 µl Aqua bidest mit anschließender Vermischung der Reagenzien. Nach Zentrifugation mit 14000 rpm für eine Minute sammelte sich das denaturierte Protein zwischen der wässrigen und der Chloroformphase. Die obere Phase wurde abpipettiert und dem verbliebenen Material 400 µl Methanol zugesetzt. Es folgte die Zentrifugation bei 14000 rpm für zwei Minuten, woran sich erneut das Abheben der oberen Phase anschloss. Zum Abschluss der Proteinfällung wurden die Schritte Methanolzugabe, Zentrifugieren und Abheben der Oberphase ein weiteres Mal wiederholt.

2.2.2.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese

Präparation der Proben

Im Anschluss an die Proteinfällung wurden die Proben unter einem Abzug getrocknet, bis der verbliebene Methanolgehalt sich weitestgehend verflüchtigt hatte, ohne dass eine vollständige Austrocknung des Proteinaggregats eintrat. Nach Zugabe von 15 µl des NuPage® LDS Sample Buffer (1x) und ausreichender Vermischung erfolgte die Denaturierung der Bestandteile für fünf Minuten in einem, bereits auf 95 °C vorgeheizten, Thermomixer (*Eppendorf*). Die Proben wurden anschließend in Crusheis abgekühlt und für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Bis zum Auftragen im Gel verblieben die Proben auf Eis.

Elektrophorese

Der Aufbau der XCell SureLock Mini Cell- Elektrophoresekammer (*Invitrogen*) erfolgte nach Angaben des Herstellers. NuPage® MOPS SDS Running Buffer (20 x) und NuPage® LDS Sample Buffer (4x) wurden bereits fertig angesetzt bezogen (*Invitrogen*). Sie wurden jeweils bis zur Konzentrationsstufe 1x mit Aqua bidest verdünnt. Für die Auftrennung der Proteine wurden Fertiggele (NuPage® Novex Bis Tris Mini Gel, 4 - 12 % Acrylamidanteil, Dicke 1 mm, *Invitrogen*) verwendet. Die Füllung der Kammern der Elektrophoresekammer erfolgte mit NuPage® MOPS SDS Running Buffer (1x). An das Entfernen des Geltaschenkamms schloss sich das Beladen der entstandenen Taschen nach folgendem Schema an:

Lane	Menge	Material
1	10 µl	Molekulargewichtsmarker See Blue® Plus 2 Pre-stained Standard (*Invitrogen*)
2	15 µl	LDS (1x)
3 – 14	15 µl	Proben
15	15 µl	LDS (1x)

Jede nicht mit Probenmaterial beladene Lane wurde mit 15 µl LDS (1x) befüllt, um eine gleichmäßige Wanderung der Proteine im elektrischen Feld zu gewährleisten. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von zunächst 80 V für 30 Minuten, dann mit 150 V für weitere 50 Minuten (*Electrophoresis Power Supply E 835, Consort*).

Auswertung

Das fertige Gel wurde mit Coomassie- Brillantblau gefärbt, wie unter 2.2.2.4 beschrieben. Zur Auswertung und Dokumentation wurde das Gel zunächst unter Verwendung des Programms Photo Studio 5.5 mit einer Auflösung von 400 dpi gescannt (*Cano Scan 5200 F, Canon*). Die quantitative Auswertung erfolgte dann mit der Software ds 1D 2.0.3 (*Kodak Scientific Imaging Systems*).

2.2.2.4 Coomassie- Brillantblau- Färbung

Die Coomassie- Brillantblau- Färbung stellt eine zuverlässige Methode zur Anfärbung von Proteinen dar. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie bindet sowohl über van- der- Waals- Kräfte, als auch über elektrostatische Wechselwirkungen seiner SO_3^- - Gruppe mit positiv geladenen Amingruppen (NH_3^+) der Proteine (Fazekas de St. Groth et al. 1963). Mit Coomassie R 250 können bereits Proteinmengen von 0,1 µg nachgewiesen werden (Choi et al. 1996).

Ablauf

Die Färbelösung wurde durch Zugabe von 20 ml Coomassie- Brillantblau R 250 zu 20 ml Methanol und 60 ml Aqua dest. angesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit möglichst geringer Verzögerung in eine Schale mit der Lösung gelegt und über Nacht auf eine Rüttelplatte gestellt (*Rotamax 120, Heidolph*). Sie wurde anschließend verworfen und das Gel dreimal für eine Stunde in Leitungswasser gewaschen, bis keine Farbrückstände mehr sichtbar waren.

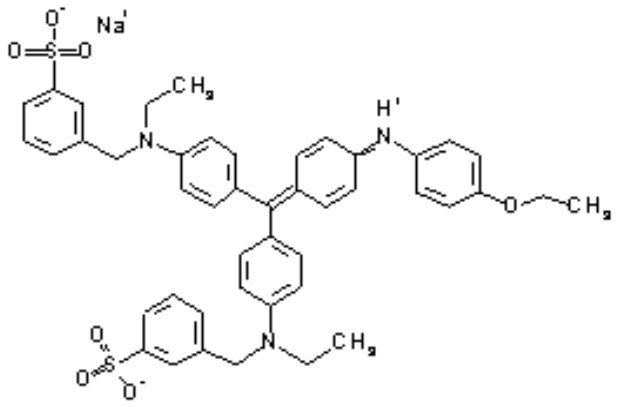


Abb. 2.3 Strukturformel Coomassie R 250 (merck)

2.2.3 Harnstoffanalyse

Im Alter von 100 und 150 Tagen gewonnenes Blut der Mäuse wurde bezüglich des Harnstoffgehaltes analysiert. Dafür erfolgte unmittelbar post mortem eine retroorbitale Blutentnahme durch entsprechend qualifizierte Mitarbeiter der zentralen tierexperimentellen Einrichtungen der Universitätsmedizin Göttingen an den Tieren, die für die histologische Aufarbeitung der Nieren mittels HE- Färbung bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie getötet wurden waren. Die Begründung dafür ist die, bezogen auf das Gesamtblutvolumen der Maus, relativ hohe benötigte Menge von etwa 1 ml Blut. Insbesondere bei einer gleichzeitig bereits bestehenden renalen Anämie mit der bei Tieren die zudem an einer Nierenerkrankung leiden jederzeit gerechnet werden muss, wäre der zusätzliche Blutverlust vor allem in fortgeschrittenem Alter schlecht bzw. nicht kompensierbar. Es kann somit eine deutliche Beeinflussung des Gesamtüberlebens resultieren. Schmerzen und Stress durch die Entnahme können die Kompensationsfähigkeit der unter Umständen bereits deutlich geschwächten Tiere ebenfalls überschreiten. Auf Grundlage dieser Überlegungen wurde entschieden den Tieren einen anämisch hypoxischen Status, sowie die aufwendige Blutabnahme zu Lebzeiten zu ersparen um ein eventuell aus den Versuchen entstehendes Leiden zu vermeiden oder zumindest zu minimieren. Die Serumharnstoffkonzentration ermittelte das Zentrallabor der Universitätsmedizin Göttingen.

2.2.4 Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung der histologischen Schnitte wurde die Hämatoxylin- Eosin (HE)- Färbung angewandt. Sie beruht auf dem Prinzip elektrostatischer Anziehungskräfte zwischen den zwei Farbstoffen und den Zellbestandteilen. Hämatoxylin, ein aus Blauholz gewonnener farbloser Pflanzenfarbstoff, der durch Oxidation in saures Hämatein überführt wird, bildet eine Komplexverbindung z.B. mit Aluminiumionen (Mayers Hämalaun). Dem Prinzip der Zellkernfärbung liegt die Anlagerung der positiv geladenen Komplexe an negativ geladene Phosphatgruppen von Nukleinsäuren zu Grunde, wobei sich die Kerne blau darstellen. Die Rotfärbung des Zytoplasmas hingegen wird durch Zusatz von Eosin G, einem vom Fluoreszein abgeleiteten Xanthenfarbstoff (Triphenylmethanfarbstoffe), erreicht, der aufgrund seiner überwiegend negativen Ladungen insbesondere an positive geladene Proteingruppen bindet (labor).

2.2.4.1 Anfertigung der histologischen Schnitte

Nach einem Zeitraum von 100 und 150 Tagen wurden Tieren der Versuchsgruppen Nieren zur histologischen Aufarbeitung entnommen und für mindestens 24 Stunden in 4% Formaldehyd fixiert. Jeweils eine Organhälfte wurde dann mit heißem Paraffin überzogen und bis zur Aushärtung auf einem Kühlblock gelagert. Nach dem Anschneiden mit 10- fachen und anschließend 5- fachen der Schichtdicke wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm mit Hilfe des Mikrotoms angefertigt. Zur optimalen Ausdehnung erfolgte die Aufbewahrung in einem Rundwasserbad bei etwa 45 °C. Als Träger dienten saubere und trockene Objektträger, die für etwa zwei Minuten in eine Lösung aus 10 ml Silane und 500 ml Aceton getaucht und im Anschluss mit Aqua dest. abgespült und im Heißluftofen bei 60 °C getrocknet wurden. Die mit den Schnitten versehen beschichteten Objektträger wurden abschließend auf einer Thermoplatte bei 37 °C erwärmt und geeignet gelagert. Es folgte die HE- bzw. Lamininfärbung.

Vorbereitungen

Zur Herstellung von Eosin 0,5 % wurde Eosin G in Aqua bidest gelöst und mit einem Tropfen Eisessig versetzt. Die Paraffinschnitte wurden im Brutschrank bei 80 °C für 40 Minuten erwärmt.

Färbung

Die Schnitte wurden zunächst für sechs Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100 %, 96 %, 70 % je vier Minuten) sowie Aqua dest. (vier Minuten) rehydriert. Dann folgte die Färbung der Kerne mit Hämalaunlösung nach Mayer (pH 3) für fünf Minuten. Es schloss sich das Bläuen der Schnitte mit Leitungswasser für zwölf Minuten an, um den Farbkomplex durch Anhebung des pH auf etwa 7 zu festigen. Das vorläufige Ergebnis wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zytoplasmafärbung erfolgte mit Eosin 0,5 % für fünf Minuten. Zur Entfernung überschüssiger Farbreste wurden die Schnitte mit Aqua dest. abgespült. Der Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 80 %, 96 %, 100 % je eine Minute) schloss sich die Klärung mit Xylol für sechs Minuten an. Im letzten Schritt wurden die gefärbten Schnitte nach Eindeckung mit Entellan unter einem Deckglas fixiert.

Auswertung

Die Auswertung der HE- gefärbten Schnitte erfolgte mit einem konventionellen Lichtmikroskop (*Diavert, Leica)*. Zur Dokumentation wurden des Weiteren an einem geeigneten Mikroskop (*Axiovert S 100 TV, Zeiss*) Fotografien angefertigt.

2.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Immunhistochemische Methoden beruhen auf dem Prinzip der Antigen- Antikörperreaktion. Ein spezifischer Antikörper bindet an antigene Epitope der Zielstruktur. Durch Kopplung dieses Antikörpers, z.B. an einen Farbstoff oder ein Enzym, das eine chemische Reaktion katalysiert, kann das spezifisch gebundene Antigen nachgewiesen werden. Bereits 1942 legten Coons et al. den Grundstein der Immunhistochemie mit der Beschreibung einer Methode zur Darstellung von Säugetiergewebe mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern. Es handelte sich um eine direkte Immunfluoreszenzmethode, bei der ein geeigneter Detektionsfarbstoff unmittelbar am Primärantikörper gebunden ist. Des Weiteren besteht die Möglichkeit des indirekten Nachweises. Dabei bindet der spezifische Primärantikörper zunächst an Epitope des Antigens. Anschließend wird ein Sekundärantikörper zugesetzt, der z.B. farbstoff- oder enzymmarkiert ist und den Primärantikörper bindet. Indirekte Methoden, wie auch in der vorliegenden Arbeit angewendet, erreichen eine höhere Sensitivität, da das Antigen zwar

nur eine begrenzte Zahl an Antikörpern binden kann, jedoch eine viel höhere Zahl Sekundärantikörper wiederum an diesen Antigen- Antikörper- Komplex binden (Schiebler 1996).

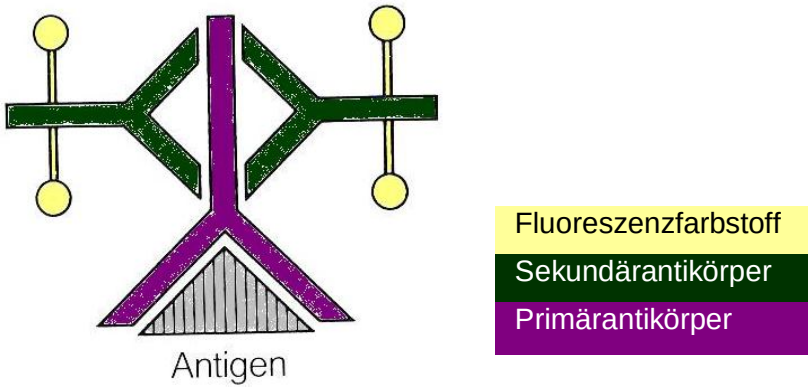


Abb. 2.4 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung (Schiebler 1996, S. 31)

2.2.5.1 Lamininfärbung

Vorbereitungen

Die Paraffinschnitte (Herstellung siehe 2.2.4.1) wurden im Brutschrank bei 80 °C 40 Minuten erwärmt und anschließend zweimal je fünf Minuten in Xylol entparaffiniert. Es schloss sich die Rehydrierung unter Verwendung einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 99 %, 96 %, 90 %, 70 %, je 5 Minuten) sowie Leitungswasser (fünf Minuten) und Aqua bidest (drei Minuten) an. Um ein Verlaufen der Reagenzien auf den Objektträgern zu verhindern, wurden die Schnitte mit einem Bromopropanstift (*Dako® Pen, Dako Cytomation*) eng umfahren.

Andauung

Die Andauung erfolgte mit Proteinase K. Dazu wurde das Enzym im Verhältnis 1:100 mit 50 mM Tris (pH 7,4) verdünnt, je 100 µl auf das Gewebestück aufgetragen und für zehn Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte drei Mal jeweils zehn Minuten in TBS (1x) gewaschen.

1. Blocken

Die Blocklösung setzte sich aus 5 % BSA gelöst in TBS (1x), zusammen. Auf die Schnitte wurden je 100 µl BSA/TBS aufgetragen und sie für 60 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Primärantikörper

Als Primärantikörper kam polyklonales Kaninchen- anti- Laminin- IgG (*abcam 11575*) 1:25 mit TBS (1x) verdünnt zur Anwendung. Der Antikörper kann an verschiedene Epitope des im Gewebe enthaltenen Laminins binden. Je 100 µl wurden auf die Schnitte aufgetragen, wobei ein Schnitt als Negativkontrolle ausgespart und lediglich mit 100 µl TBS (1x) benetzt blieb. Die Präparate lagen über Nacht in einer feuchten Kammer bei etwa 4 °C inkubiert.

2. Blocken

Anschließend wurden die Schnitte drei Mal jeweils zehn Minuten mit TBS (1x) gewaschen. Dann wurden jeweils 100 µl Blocklösung aus 0,8 % BSA und 3 % NGS, in TBS (1x) gelöst aufgetragen und für 20 Minuten feucht inkubiert.

Sekundärantikörper

Um das Ergebnis der Lamininfärbung fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen wurde Cy3- konjugiertes Ziege- anti- Kaninchen- IgG (*Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.*) als Sekundärantikörper gewählt und in einer Verdünnung von 1:200 mit TBS (1x) verwendet. Alle Gewebsschnitte einschließlich der Negativkontrolle wurden mit 100 µl benetzt und strikt lichtdicht für 60 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Vermeidung des Verlustes der fluoreszierenden Eigenschaften des verwendeten Sekundärantikörpers wurden alle Schritte unter möglichst minimaler Lichtexposition durchgeführt.

Einbettung

Zunächst erfolgten drei Waschschritte in TBS (1x) für je fünf Minuten in verdunkelten Gefäßen, bevor die Gewebsschnitte eingebettet werden konnten. Dazu wurden sie mit *Fluorescent Mounting Medium* (*Dako Cytomation*) benetzt und mit einem Deckglas versiegelt. Die fertigen Schnitte wurden sofort lichtdicht gelagert und bis zu ihrer Auswertung bei 4 °C aufbewahrt.

Auswertung

Zur Auswertung und Dokumentation wurden die gefärbten Gewebsschnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss) bei 10-, 20- und 40- facher Vergrößerung mit Hilfe der Software analySIS 3.2 (*Soft Imaging System GmbH*) betrachtet.

2.2.6 Computertomografie

Im Alter von 150 Tagen erhielten eine Doppelknockoutmaus und ein entsprechendes Wildtypkontrolltier eine Computertomografie um die anatomischen Verhältnisse und eventuelle Veränderungen des Urogenitalsystems am Schnittbild beurteilen zu können. Die Auswahl der Tiere für das Verfahren erfolgte bereits kurz nach deren Geburt ausschließlich anhand ihres Genotyps (siehe 2.2). Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des flächendetektorbasierten Volumencomputertomografen (*fp VCT*, *General Electric (GE) Global Research Centers*, Niskayuna, NY, USA) des Zentrums für Radiologie, Klinik für Diagnostische Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen angefertigt. Bei einer Elementendichte der zwei Flächendetektoren von 1,024 x 1,024 ermöglicht das Gerät die Darstellung untersuchter Bereiche mit einer Ortsauflösung von ca. 0,2 mm. Zugunsten einer verbesserten Beurteilbarkeit von Nierengröße und -morphologie wurden die Aufnahmen auf das Urogenitalsystems fokussiert. Für möglichst artefaktfreie Bilder, erhielten die Tiere über die gesamte Dauer eine Narkose mit Isofluran (Forene® 0,8 - 1 %, *Abbott AG*, Baar, CH) durch Frau Dr. med. vet. Sarah Kimmina (Zentrale Tierexperimentelle Einrichtungen der Universitätsmedizin Göttingen). Die Anfertigung der Bilder inklusive einer dreidimensionalen Rekonstruktion mit entsprechenden Größen- und Volumenmessungen erfolgte durch Frau Ann - Christin Busse (Zentrum für Radiologie, Klinik für Diagnostische Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen), die auch für die Interpretation der Aufnahmen beratend tätig war.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) jeweils bezüglich COL4A3 und ITGA2. Begrenzt durch die verwendeten *Primer* wurde eine Sequenz der isolierten DNS amplifiziert. In der anschließenden Agarosegelelektrophorese ist bei den Wildtypmäusen ein DNS- Fragment im Bereich von rund 800 bp (COL4A3 +/+) bzw. rund 200 bp (ITGA2 +/+) sichtbar, während homozygote COL4A3- Knockouts (-/-) eine Bande im Bereich um 900 bp bzw. homozygote ITGA2- Knockouts (-/-) bei etwa 300 bp zeigen. Bei den heterozygoten Tieren (+/-) finden sich jeweils entsprechend beide Fragmente (Abb. 3.1).

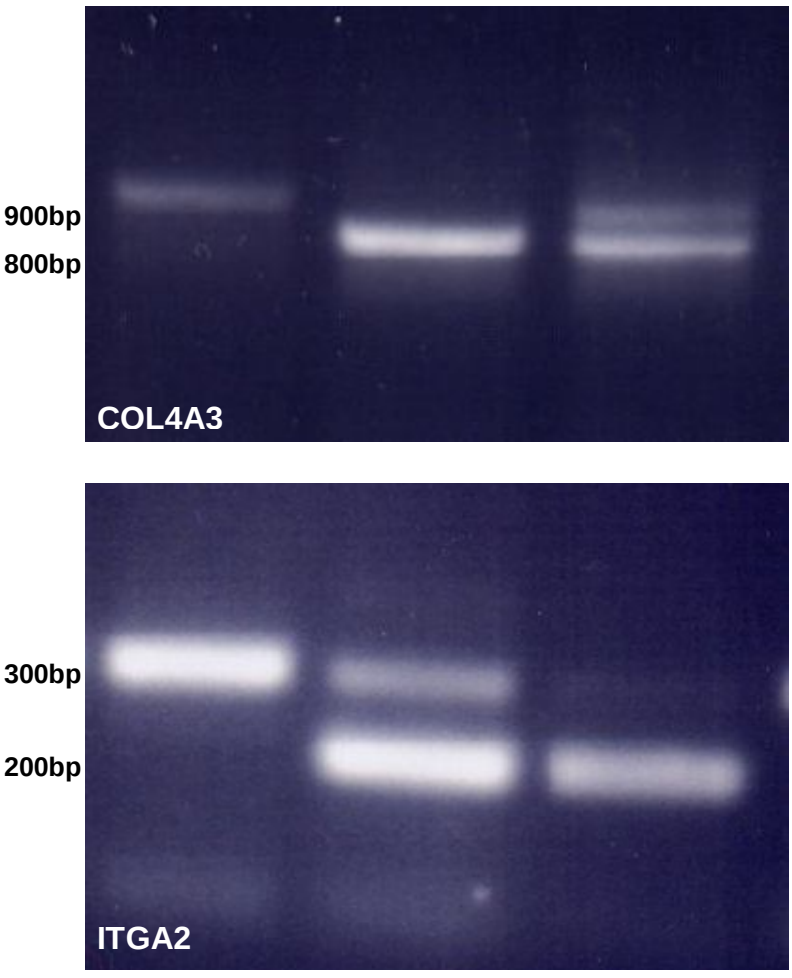


Abb. 3.1 COL4A3- bzw. ITGA2 PCR- Ergebnis für die verschiedenen Genotypen

3.2 Gesamtüberleben

Um den Einfluss des Vorhandenseins des Integrin- α2β1- Rezeptors auf die Überlebenszeit bei Alportmäusen zu untersuchen, wurde täglich der Bestand bezüglich verstorbener Tiere kontrolliert und das Gesamtüberleben genotypbezogen ermittelt (Abb. 3.2). Die Gruppe der für ITGA2 homozygot positiven Alporttiere (COL4A3 -- / ITGA2 ++) weist dabei mit einem Mittelwert von 168,5 Tagen (n=13, SD 11,1) die kürzeste Überlebensdauer auf. Die Alportgruppe mit heterozygot positivem ITGA2- Status (COL4A3 -- / ITGA2 +-) zeigt ein mittleres Überleben von 192,7 Tagen (n=11, SD 44,6). Die Individuen leben damit durchschnittlich 24 Tage länger als die homozygot Rezeptorpositiven, was 14,4 % entspricht (p 0,07). Mit 208,3 Tagen im Mittel am längsten leben die homozygot ITGA2- negativen Alporttiere (n=11, SD 46,9). Es kann demzufolge in dieser Gruppe ein nochmals um 8,1 % gesteigertes Gesamtüberleben gegenüber heterozygot rezeptorpositiven Tieren mit gleicher Erkrankung bestimmt werden (p 0,44). Im Vergleich zu homozygot rezeptorpositiven Tieren liegt die Steigerung damit sogar bei 23,6 %. Die mittlere Überlebenszeit ist gegenüber der COL4A3 -- / ITGA2 ++ Gruppe signifikant erhöht (p 0,01).

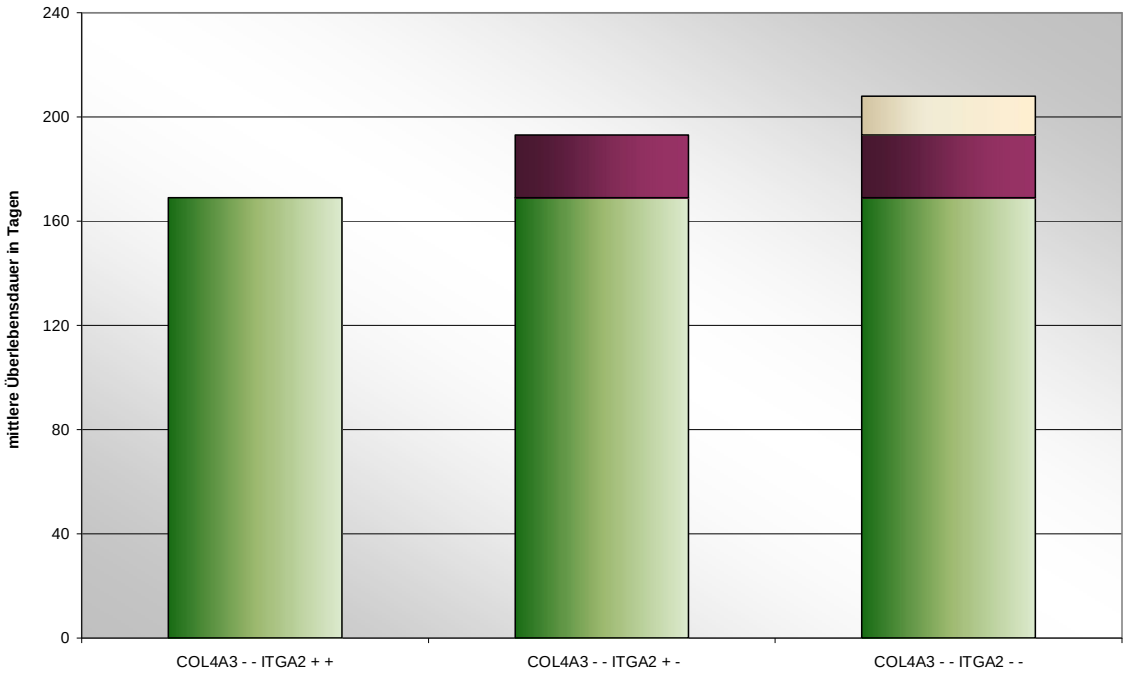


Abb. 3.2 Darstellung der mittleren Überlebensdauer in Abhängigkeit vom Genotyp. Anhand der Säulenstapel lässt sich der Zuwachs an Lebenszeit in den jeweiligen Gruppen ablesen.

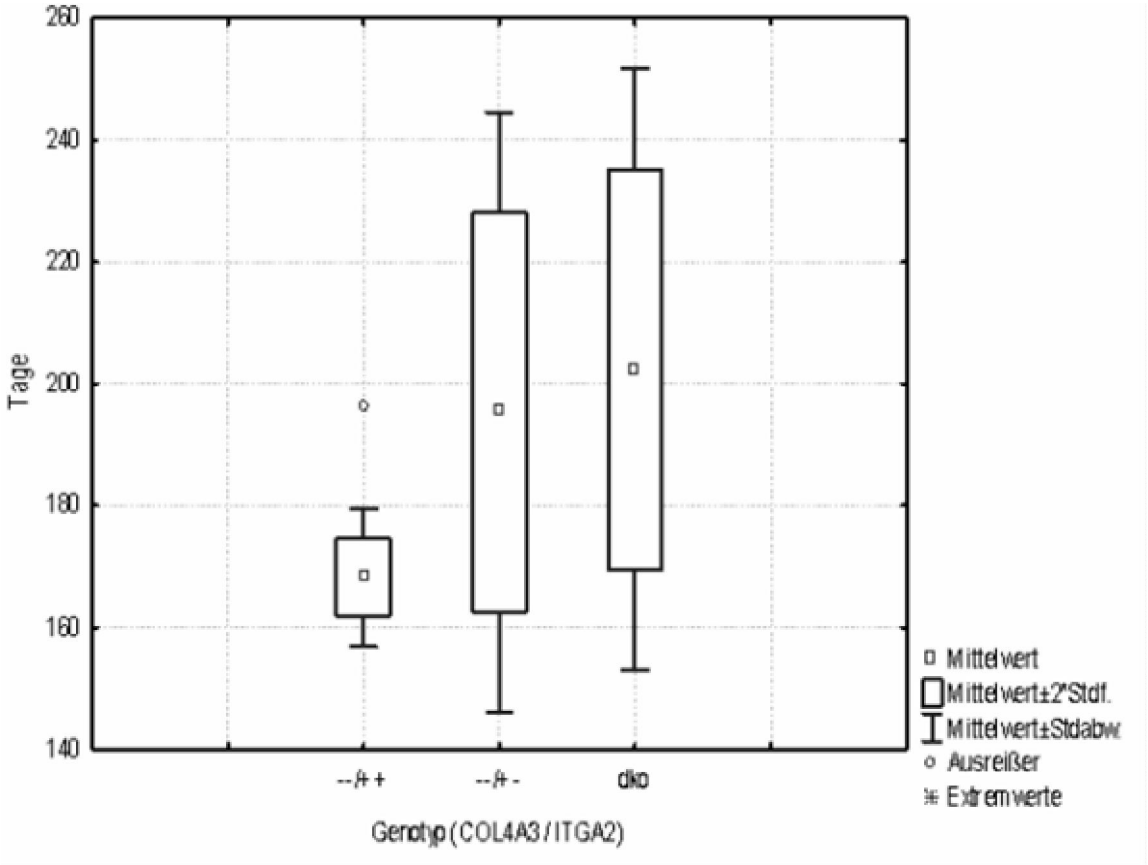


Abb. 3.3 Box Plot der mittleren Gesamtüberlebensdauer in den drei Gruppen

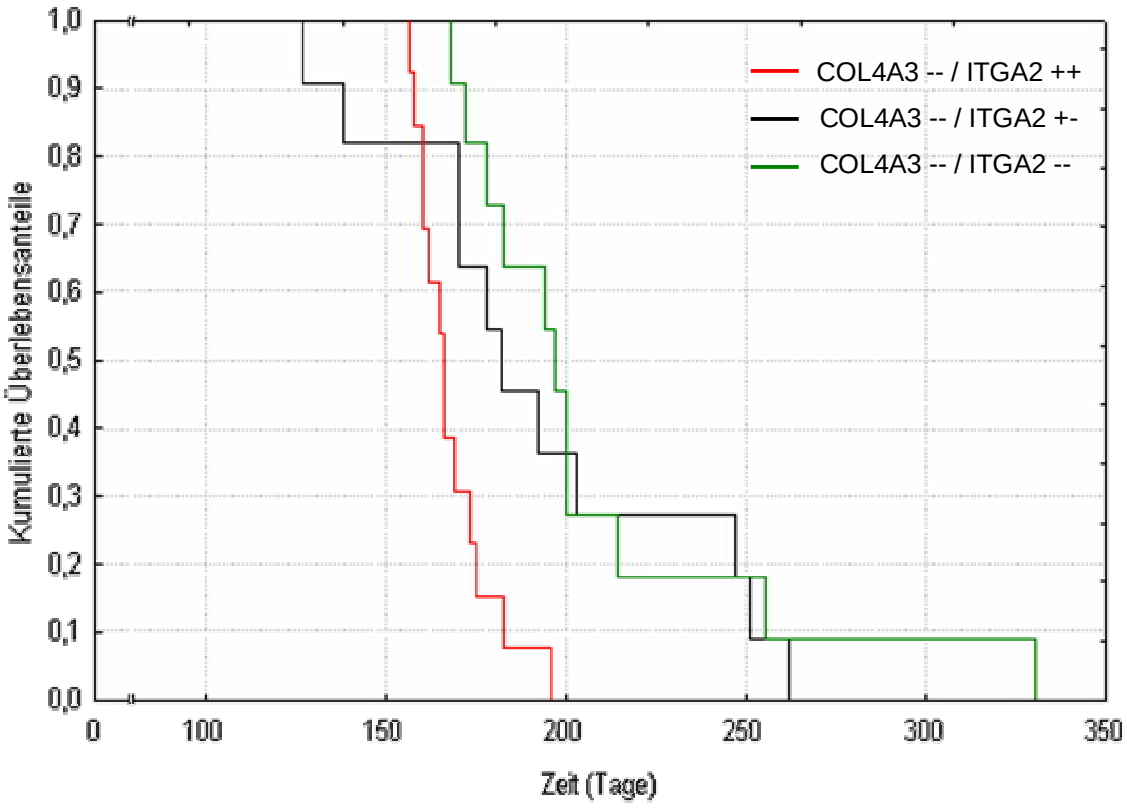


Abb. 3.4 Kaplan- Meier- Kurve der kumulierten Überlebensanteile

3.3 Urinanalytik

Um die Ausscheidung von Proteinen im Urin als Indiz für das Vorhandensein einer Nierenschädigung zu prüfen, wurden im Alter von 80, 100, 120, 140 und 150 Tagen Urinproben der Mäuse mit Hilfe der SDS- PAGE untersucht. Dabei ist sowohl in der Gruppe der Doppelknockouttiere als auch bei den Alportmäusen mit heterozygot positivem α2β1- Rezeptorstatus eine verstärkte Proteinurie vor allem im Bereich oberhalb von 45 kDa erkennbar. Bereits bei 80 Tagen bestehen deutliche Unterschiede zu den Kontrollen, die sich auch in den höheren Altersstufen finden. Die Differenzen sind schon bei einfacher Betrachtung der Gele nach der Elektrophorese zu sehen (Abb. 3.5). Die Konzentration der Proteine insbesondere im hochmolekularen Bereich lässt auf einen glomerulären Schaden schließen. Neben den Abweichungen von den Kontrolltieren zeigen die anderen zwei Gruppen auch untereinander deutliche Unterschiede. Während sich bei den Doppelknockouttieren einzelne verstärkte Banden abgrenzen lassen, erscheint die Ablagerung von höhermolekularen Proteinen im Gel bei den heterozygot rezeptorpositiven Alportmäusen bis zum Bereich von Prealbumin nahezu homogen gesteigert. Sowohl im Alter von 100 Tagen, als auch mit 150 Tagen ist diese flächige Zunahme der Farbintensität mit starker Verbreiterung der Banden aufgrund der erhöhten Proteinmenge feststellbar.

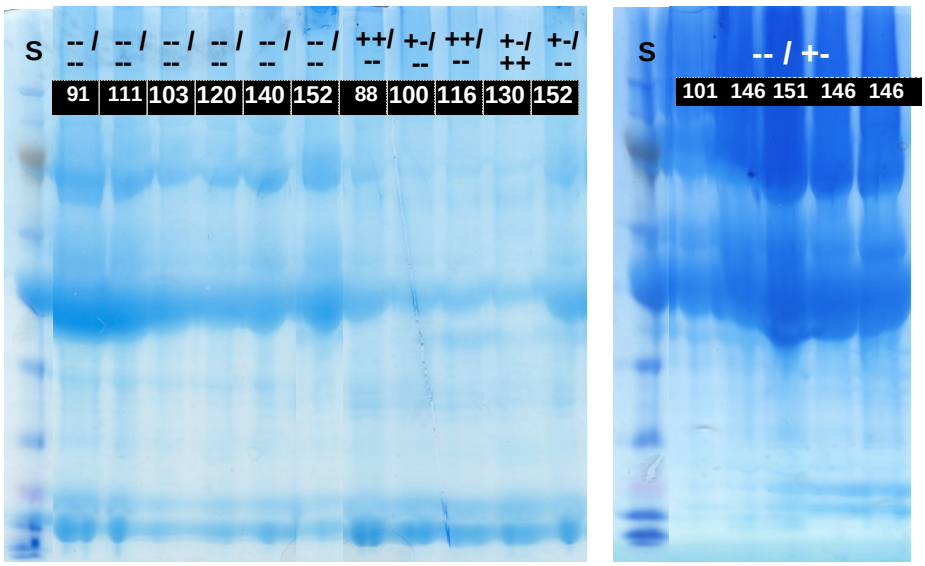


Abb. 3.5 Gel nach SDS- PAGE zur Auftrennung der Proteine im Urin und anschließender Coomassie- Brillantblau- Färbung. Die oberen Angaben bezeichnen den Genotyp in der Form COL4A3 / ITGA2, die darunter stehende Zahl das Alter des Tieres bei der Urinabnahme. Unter S ist jeweils der Proteinlängenstandard abgebildet (Zuordnung siehe Kapitel 2.1.7).

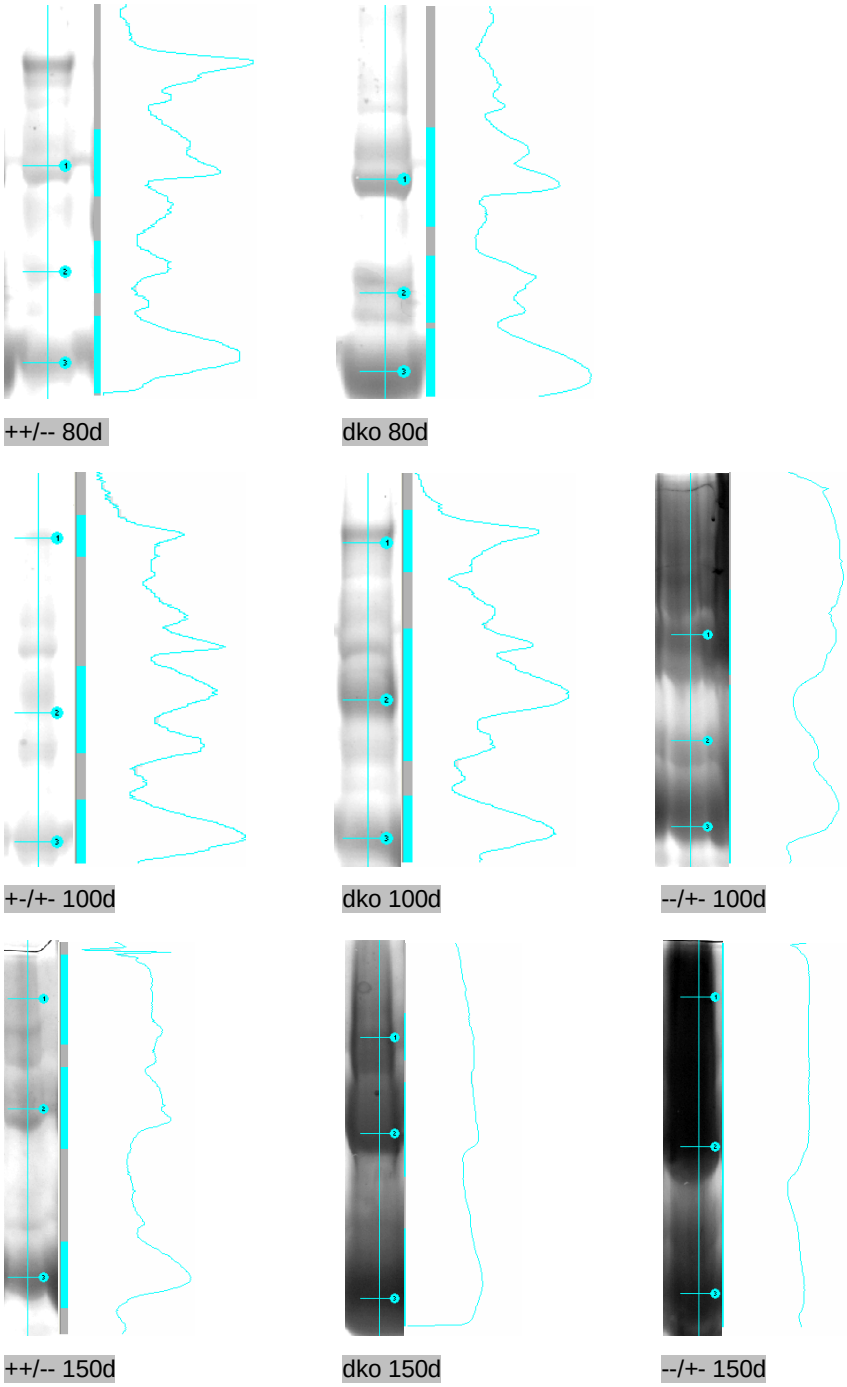


Abb. 3.6 SDS- PAGE zur Auftrennung der Proteine im Urin bei Kontrollen (COL4A3 ++ bzw. +- / ITGA2 -- bzw. +-, linke Spalte), Doppelknockouttieren (COL4A3 -- / ITGA2 --, Mitte) und Alportmäusen mit heterozygotem ITGA2- Rezeptorstatus (COL4A3 -- / ITGA2 +-, rechte Spalte) verschiedenen Alters (oben: 80 Tage, Mitte: 100 Tage, unten: 150 Tage). Dargestellt sind Ausschnitte über die Breite der Lane und die Länge bis zu einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa, die in der jeweiligen Altersgruppe vom selben Gel stammen. Die Markierungen entsprechen Proteinen um 100 kDa (1), Proteinen mit der Größe von Albumin um 70 kDa (2) und dem Bereich für Prealbumin um 50 kDa (3). Neben jeder Lane finden sich Kennzeichnungen der für die Berechnungen von Mittel- und Maximalwerten zu Grunde gelegten Bereiche (▬), sowie jeweils die Darstellung der Proteinmengen über den gesamten Bereich in Kurvenform.

Auch bei der Übertragung der gemessenen Proteinintensität in einen Kurvenverlauf (Abb. 3.6) werden die Unterschiede unter den Gruppen deutlich. Bei den Doppelknockouttieren zeigt sich zu den Zeitpunkten 80 und 100 Tage ein der Kontrollgruppe (COL4A3 ++ bzw. +-, ITGA2 -- bzw. +-) nahezu identisches Kurvenprofil dessen Maximalwerte an den Messpunkten etwas höher ausfallen. Dagegen verläuft die Kurve der Alportmäuse mit heterozygot positivem ITGA2-Rezeptorstatus über die gesamte Messstrecke hinweg auf einem weniger variablen und hohen Niveau mit nur einem leichten Abfall bei etwa 75 - 80 kDa. Bei 150 Tagen findet sich in allen Gruppen eine Zunahme der Proteinmenge. Die Kurven der Kontrollen zeigen noch Schwankungen mit Maximalwerten. Die der Doppelknockouttiere und Alportmäuse mit heterozygot positivem ITGA2-Rezeptorstatus bewegen sich dagegen auf einem stetig hohen Niveau. Während dieses bei der COL4A3 -- / ITGA2 -- Gruppe über Anstiege erreicht wird, hat es bei den COL4A3 -- / ITGA2+- Tieren eine konstante Höhe, die oberhalb der von der Doppelknockoutgruppe erreichten Werte liegt.

Anhand der Kurvenprofile und den entsprechend zugehörigen Zahlenwerten können die Maximal- und Durchschnittswerte der Intensitäten verschiedener Bereiche der Gele gemessen werden. Da eine erhöhte Proteinmenge auch eine gesteigerte Färbung und somit Intensität bewirkt, können die bereits sichtbaren Unterschiede so quantifiziert und verglichen werden. Es werden die Werte der Doppelknockouttiere (COL4A3 -- / ITGA2 --), der Gruppe der heterozygot positiven ITGA2- Alportmäuse (COL4A3 --/ ITGA2 +-) und einer Kontrollgruppe einander gegenübergestellt. Die Kontrollgruppe setzt sich aus Tieren zusammen, die für COL4A3 homo- oder heterozygot positiv sind, unabhängig vom Integrin-α2β1- Rezeptorstatus. Grundlage ist die Tatsache, dass ebenso wie die nierengesunden Tiere (COL4A3 ++) auch die an einer familiären benignen Hämaturie (COL4A3 +-) leidenden Tiere bis zum Zeitpunkt von 150 Tagen, sowohl mit als auch ohne Integrin α2β1 Werte aufweisen, die sich nur in geringem Ausmaß unterscheiden. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass das Fehlen des Integrinrezeptors bei gesunden Tieren bzw. denen mit FBH nicht zu einer deutlichen Verschlechterung in der Nierenmorphologie und Proteinurie führt (Chen et al. 2002). Eine vereinfachende Unterteilung der Tiere in eine Kontrollgruppe, sowie eine (heterozygot) rezeptorpositive Alportgruppe und eine rezeptornegative Alportgruppe erscheint daher gerechtfertigt.

Durchschnittliche Intensität (MeanInt) an drei Messpunkten

Zunächst wurde in drei Bereichen (hochmolekulare Proteine ca. 90 kDa, Albumin ca. 70 kDa und Prealbumin ca. 50 kDa) jeder Lane eines Bildes ein Messpunkt gesetzt, von dem aus die Breite der Bande erfasst wurde und ein Wert für die durchschnittlich gemessene Intensität (MeanInt) in diesem Abschnitt ermittelt (Abb. 3.6). Daraus wurde, gruppiert nach Genotyp und Alter bei der Urinabnahme, für jeden der drei Bereiche ein Gruppenmittelwert gebildet. Für jeden Messbereich können bei der Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten die niedrigsten Werte gefunden werden. Es ergeben sich entsprechend auch die niedrigsten Summenwerte aus den drei Messungen. Ebenfalls konstant ist die Doppelknockoutgruppe oberhalb der Kontrollen und unterhalb der rezeptorpositiven Alporttiere zu finden. Während die Abweichungen vom Niveau der Kontrollen bis zum Zeitpunkt 140 Tage mit maximal 32 (Albumin 120 Tage) noch relativ gering sind, zeigt sich im Alter von 150 Tagen ein größerer Abstand der Intensitäten. Die größte Differenz ist im Bereich der hochmolekularen Proteine vorhanden (47,3), die niedrigste beim Prealbumin (29,2). Zusammen mit der Albumindifferenz von 43 ergibt sich in der Gesamtsumme ein Abstand von 119,5.

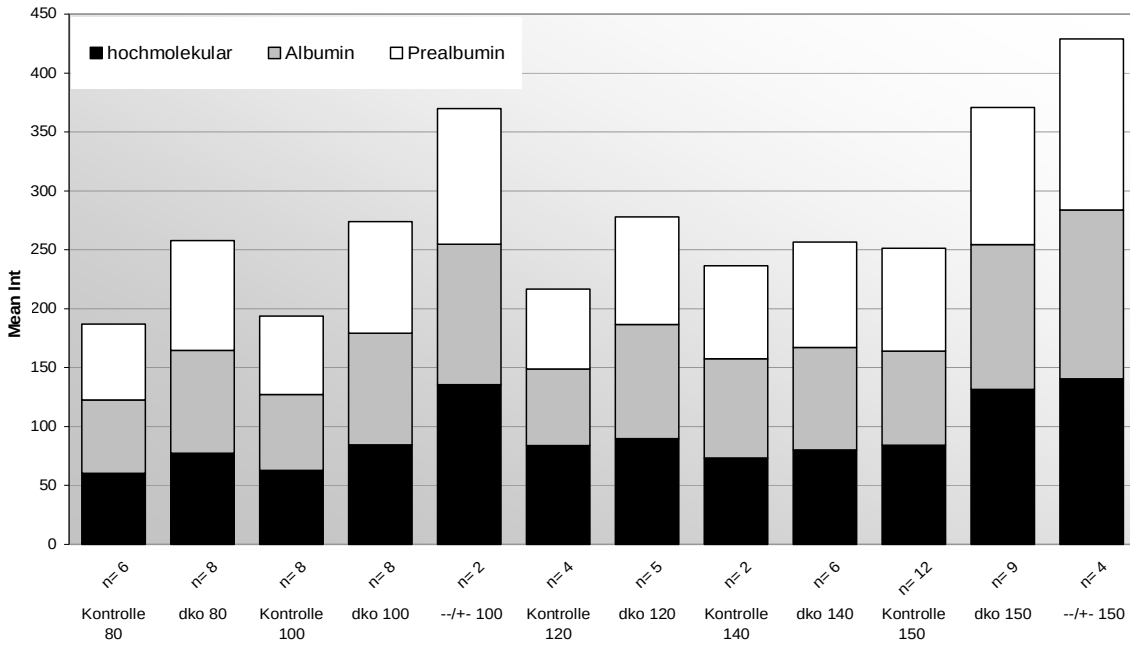


Abb. 3.7 Darstellung der im Durchschnitt gemessenen Intensitäten (MeanInt) in den drei Messbereichen hochmolekulare Proteine, Albumin und Prealbumin als gestapelte Säulen. Die Werte sind Gruppenmittelwerte aus den für jede Probe gemessenen Durchschnittsintensitäten. Die Höhe der Säulen entspricht der Gesamtsumme. Unterhalb der einzelnen Säulen finden sich die Angaben zum Genotyp, das Alter in Tagen, sowie die untersuchte Fallzahl n.

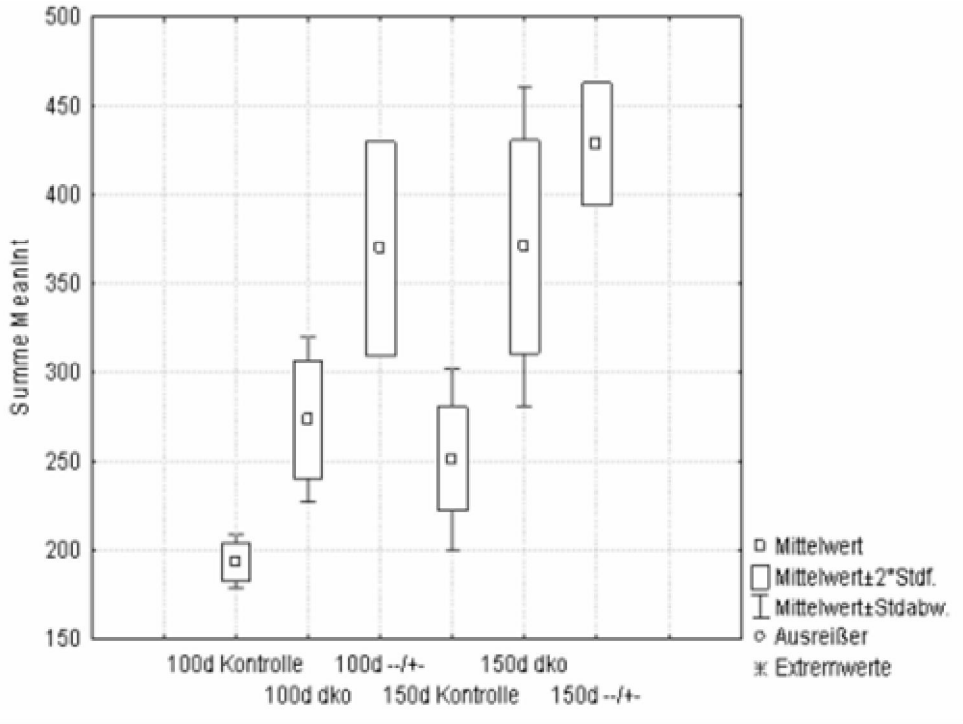


Abb. 3.8 Box Plot für die aus den mittleren Intensitäten der Bereiche hochmolekulare Proteine, Albumin und Prealbumin errechneten Summenwerte in Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp.

Die Höchstwerte erreicht somit die rezeptorpositive Alportgruppe, deren Werte mit Abstand über denen der anderen Gruppen liegen (Abb. 3.9). Bereits zum Zeitpunkt 100 Tage besteht ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen (Differenz 72,9, p< 0,001) und zu den Doppelknockouttieren (Differenz 51,2, p< 0,001) im hochmolekularen Bereich. Der geringste Abstand liegt beim Prealbumin mit 48,4 zu den Kontrollen (p< 0,001) und 20,5 zu den Doppelknockouts (p 0,13). Der Summenwert ist mit 369,8 damit 1,9- mal so hoch wie der der Kontrollgruppe (193,8) und beträgt das 1,4- fache der COL4A3 --/ ITGA2 -- Summe (273,8). Auch zum Zeitpunkt 150 Tage bestehen deutliche Differenzen. Der Abstand zu den Kontrollen ist mit 56,3 für hochmolekulare Proteine (84,1 zu 140,4, p< 0,001), 63,4 für Albumin (79,9 zu 143,3, p< 0,001) und 57,9 für Prealbumin (87,4 zu 145,3, p< 0,001) auf einem konstant hohen Niveau mit geringen Schwankungen, was damit den bereits in der Ansicht der Kurven gewonnenen Eindruck bestätigt (Abb. 1.9). Es ergibt sich mit der Gesamtsumme von 429 eine Erhöhung des Kontrollwertes von 177,6. Im Vergleich mit den Doppelknockouttieren besteht im hochmolekularen Bereich ein geringer Abstand von 9, bei Albumin von 20,4 und bei Prealbumin von 28,7 – in der Summe eine Differenz von 58,1. Der Summenwert weist somit eine 1,7- fache Steigerung zur Kontrollgruppe und eine 1,2- fache Steigerung zur rezeptornegativen Alportgruppe auf.

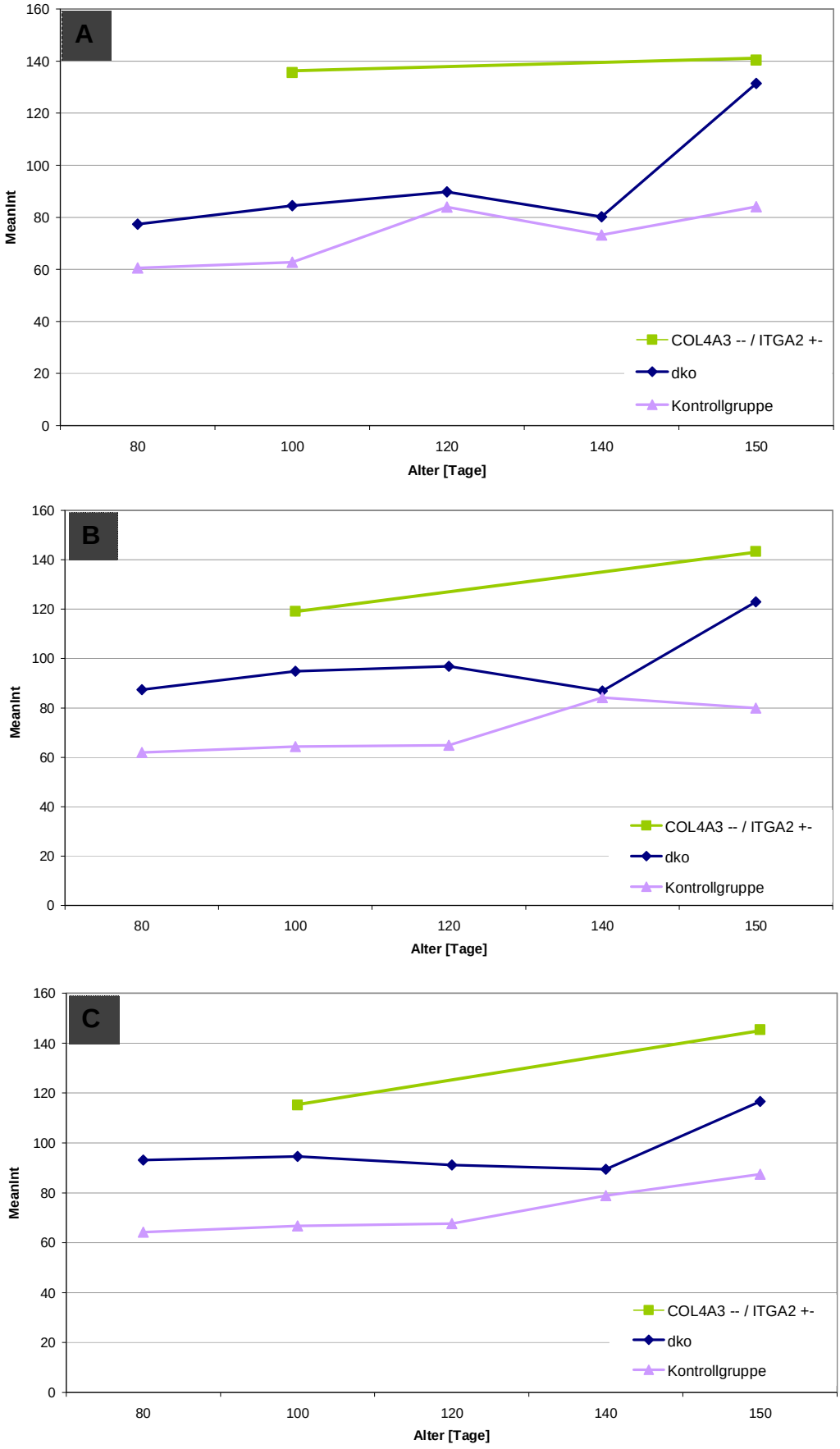


Abb. 3.9 Gemessene mittlere Intensitäten (MeanInt) in den verschiedenen Gruppen im zeitlichen Verlauf: **A** hochmolekulare Proteine **B** Bereich um Albumin **C** Bereich um Prealbumin

Durchschnittliche Intensität (MeanInt) im Gesamtbereich

Um auch gegebenenfalls außerhalb der drei markierten Bereiche liegende Proteinablagerungen zu erfassen, wurde außerdem die im Durchschnitt gemessene Intensität (MeanInt) in einem zusammenhängenden Bereich bis etwa 50 kDa bestimmt und der Mittelwert in nach passendem Alter und Genotyp zusammengesetzten Gruppen berechnet (Abb. 3.10). Zum Vergleich wurde aus den Werten, die an den drei festgelegten Messpunkten bestimmt wurden, ein Gesamtmittelwert errechnet (Abb. 3.11). Zum Zeitpunkt 100 Tage liegt der Wert der Kontrollgruppe mit 65,1 (n=8, SD 17,5) nur leicht oberhalb dieses Vergleichsmittelwertes (64,6, n=8, SD 7,6, p 0,91). Der Wert der Doppelknockoutgruppe erreicht 96,9 (n=7, SD 21,6) und unterscheidet sich damit ebenfalls nur gering vom Bezugswert (91,3, n=8, SD 18,9, p 0,51). Dagegen liegt die heterozygot rezeptorpositive Alportgruppe mit 131,2 (n=2, SD 11,5) am stärksten vom Vergleichswert entfernt (123,3, n=2, SD 16,9, p 0,57).

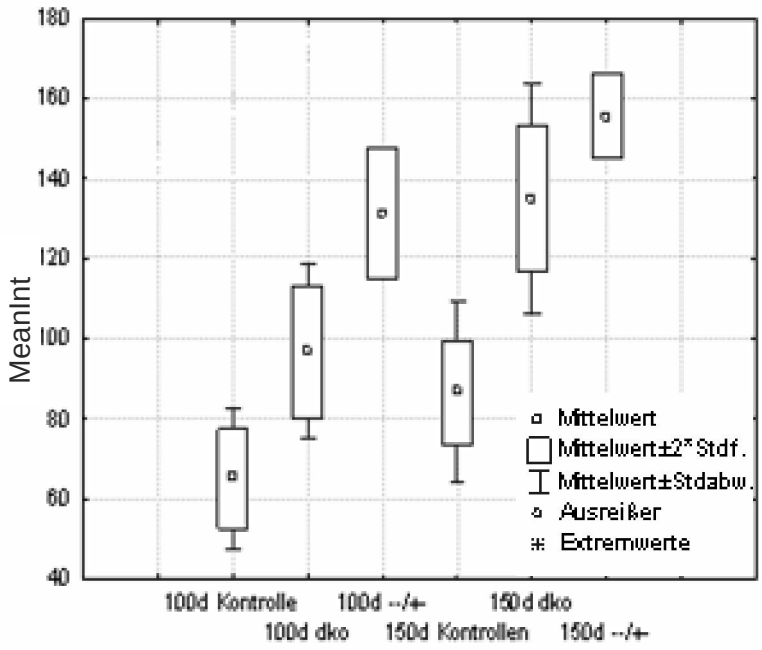


Abb. 3.10 Box Plot für die mittlere gemessene Intensität (MeanInt) im Gesamtbereich bis 50kDa

Zum Zeitpunkt 150 Tage ist der Unterschied in der Kontrollgruppe weiterhin gering (86,6, n=12, SD 22,6 gegenüber 83,8, n=12, SD 18, p 0,66). Die Doppelknockoutgruppe erreicht 135,1 (n=10, SD 28,8) gegenüber 123,6 (n=9, SD 32,2, p 0,33). In der heterozygot rezeptorpositiven Alportgruppe findet sich auch hier der größte Abstand von 155,6 (n=4, SD 10,5) in der Gesamtmessung gegenüber 143 (n=4, SD 13,4, p 0,11) als Mittelwert der Einzelbereiche. Sowohl in

der Doppelknockoutgruppe als auch insbesondere bei den COL4A3 -- / ITGA2 +- Tieren kommt es also tatsächlich zu einer verstärkten Ablagerung von Proteinen in einem weiteren Molekulargewichtsbereich als die Einzelmessungen vermuten lassen. In beiden Gruppen liegen die in der Messung der mittleren Intensität des Gesamtbereichs bis ca. 50 kDa gefundenen Werte signifikant oberhalb der der Kontrollen.

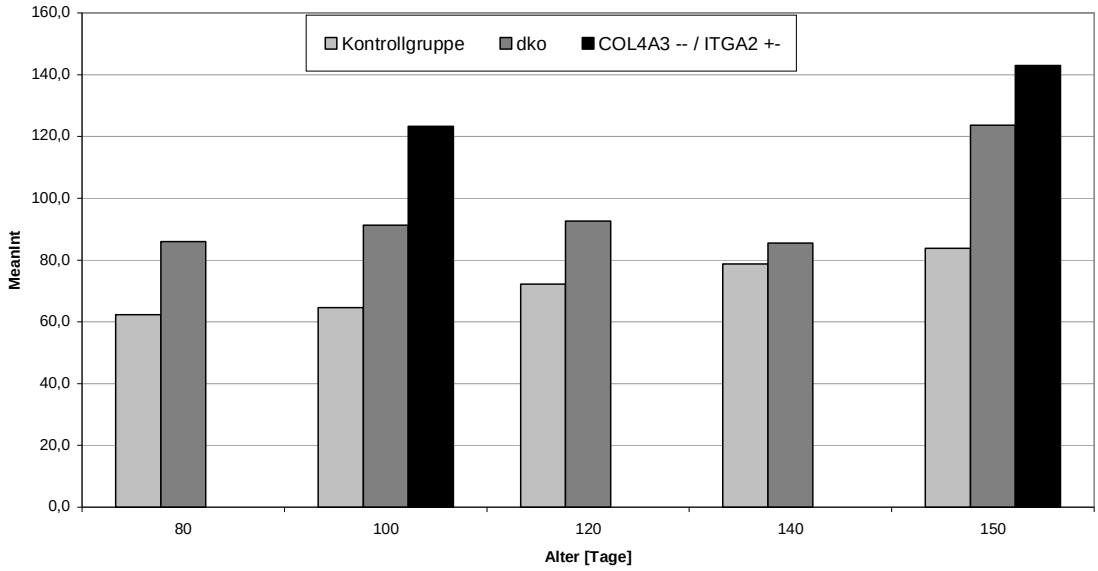


Abb. 3.11 Aus den an den festgelegten Messpunkten ermittelten Werten für hochmolekulare Proteine, Albumin und Prealbumin wurde ein Gesamtmittelwert der durchschnittlich gemessenen Intensität (MeanInt) errechnet.

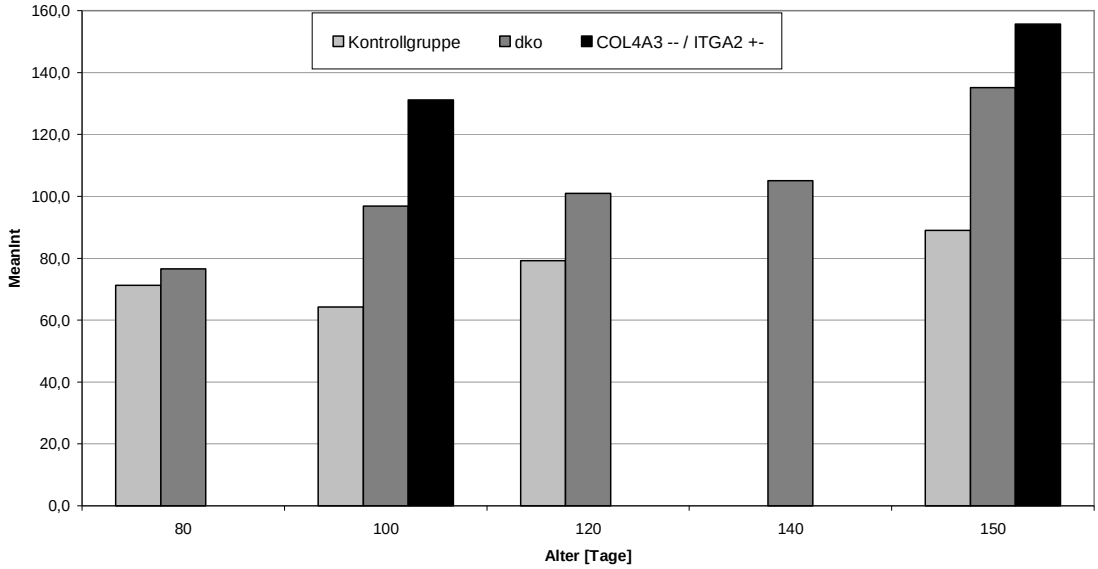
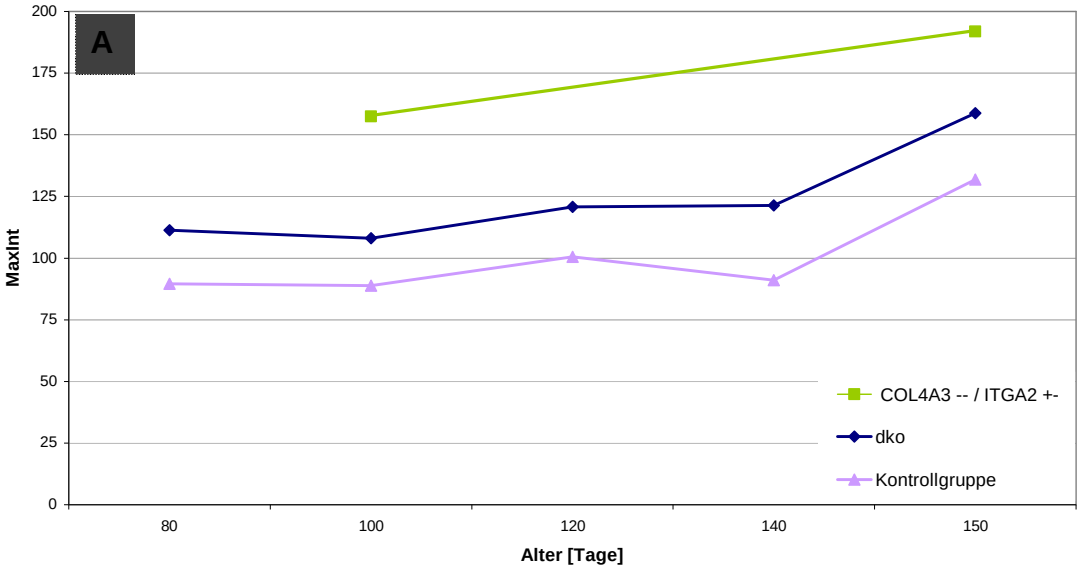
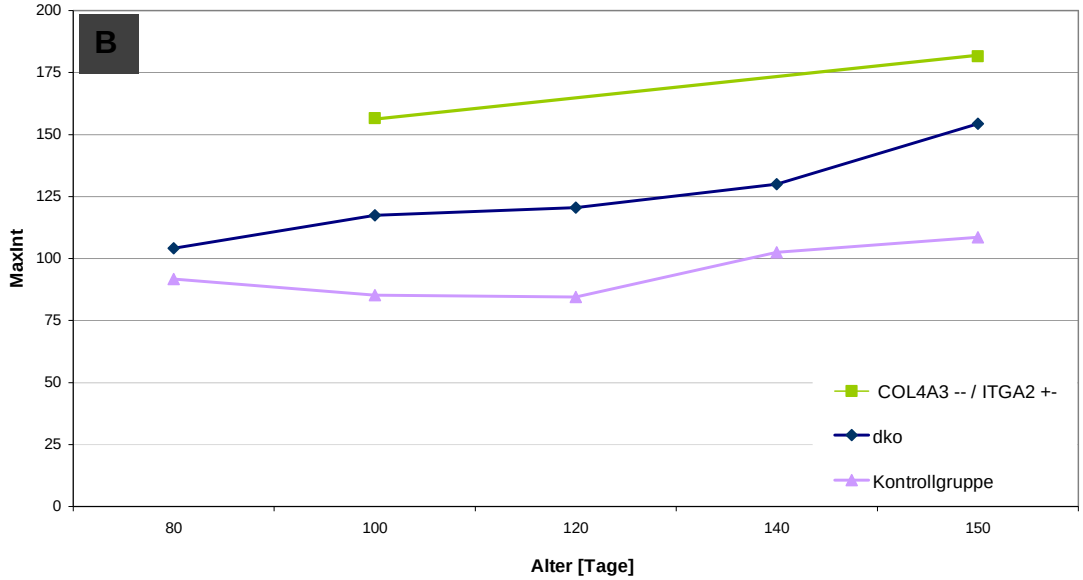


Abb. 3.12 Durchschnittlich gemessene Intensität (MeanInt) über den gesamten Bereich bis ca. 50 kDa. Aus der Differenz der Werte zu denen aus Abb. 3.11 lässt sich die zusätzlich außerhalb der drei Messbereiche hochmolekular, Albumin und Prealbumin abgelagerte Proteinmenge ablesen.

Maximal gemessene Intensität (MaxInt)

In den drei Messbereichen (ca. 90 kDa entsprechend hochmolekularen Proteinen, ca. 70 kDa entsprechend Albumin und ca. 50 kDa entsprechend Prealbumin, Abb. 3.6) wurde neben der durchschnittlich gemessenen Intensität auch jeweils der maximal gemessene Intensitätswert (MaxInt) bestimmt. Die Werte alters- und genotypgleicher Individuen wurden zu einem Gruppenmittelwert für jeden Bereich zusammengefasst. Insgesamt ist bei den Gruppen dabei die gleiche Verteilung wie bei den Durchschnittswerten zu finden. In allen Bereichen und Altersstufen erreicht die Kontrollgruppe die niedrigsten Maximalwerte, gefolgt von der Doppelknockoutgruppe. Die Höchstwerte liegen wiederum in der Gruppe der heterozygot rezeptorpositiven Alportmäuse (Abb. 3.13). In der Kontrollgruppe bleiben die Werte bis zum Zeitpunkt 140 Tage auf einem relativ konstanten Niveau mit einem Mittelwert aus den drei Messbereichen von 92,1 (80 Tage, n=8, SD 27,7), 89,6 (100 Tage, n=9, SD 22,5), 89,6 (120 Tage, n=4, SD 37,4) und 95 (140 Tage, n=2, SD 34,3). Erst bei 150 Tagen ist ein deutlicherer Unterschied mit im Mittel 118,4 (n=14, SD 30,3) messbar. Die Doppelknockouttiere zeigen dagegen von Beginn an einen leichten aber kontinuierlichen Anstieg. Die Mittelwerte liegen hier bei 110,4 (80 Tage, n=7, SD 27,7), 114,9 (100 Tage, n=8, SD 22,2), 118,1 (120 Tage, n=5, SD 23,8), 125,9 (140 Tage, n=8, SD 34) und 152 (150 Tage, n=11, SD 31,8). Bei 100 Tagen beträgt der Wert somit das 1,3- fache im Vergleich zu den Kontrollen. Am niedrigsten ist die maximale Ausscheidung zu diesem Zeitpunkt dabei für hochmolekulare Proteine (108,1, n=8, SD 15,1), signifikant höher für Albumin (117,4, n=8, SD 31,5) und Prealbumin (119,3, n=8, SD 17,9). In der Summe ergibt sich somit ein Wert von 344,8. Dieser steht 268,9 bei den Kontrollen gegenüber. In der Kontrollgruppe wird der niedrigste Spitzenwert in der Albuminfraktion erreicht (85,3, n=9, SD 16,4), gefolgt von hochmolekularen Proteinen (88,8, n=9, SD 27,7) und Prealbumin (94,8, n=9, SD 23,8). Während damit sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Doppelknockouts die Maximalwerte im niedermolekularen Bereich liegen, ist bei den heterozygot rezeptorpositiven Alportmäusen, wie bei den Durchschnittswerten, vor allem eine hochmolekulare Proteinurie feststellbar. Mit einem Spitzenwert von 157,5 (n=2, SD 12) in diesem Bereich liegt die Proteinausscheidung hier signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen.





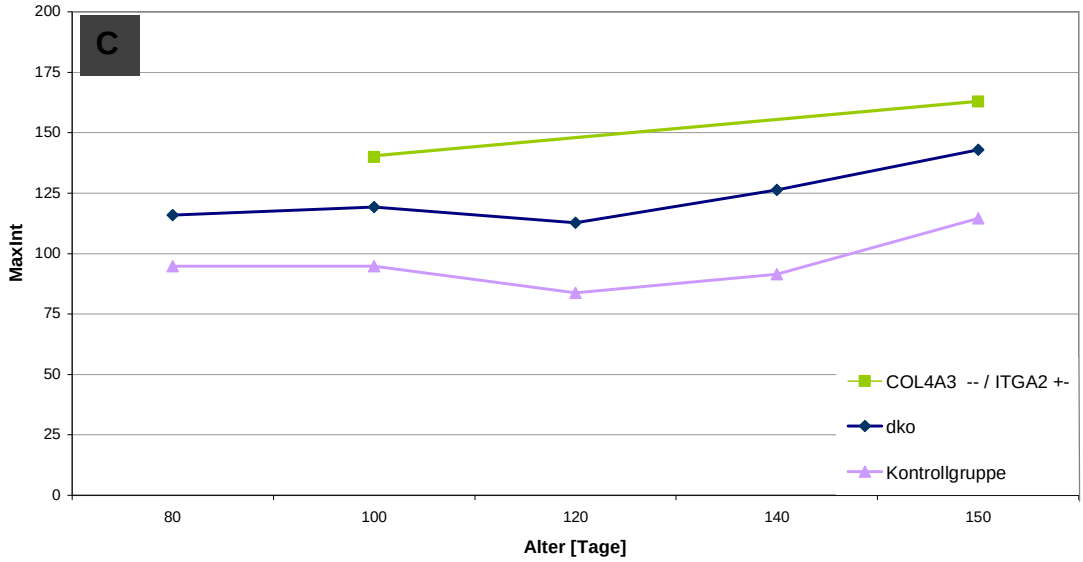


Abb. 3.13 Gemessene maximale Intensitäten (MaxInt) in den verschiedenen Gruppen im zeitlichen Verlauf: **A** hochmolekulare Proteine **B** Bereich um Albumin **C** Bereich um Prealbumin

Mit 156,5 (n=2, SD 36,1) nur wenig tiefer liegt der Maximalwert für Albumin. Im Prealbuminsegment wird eine maximale Intensität von 140 erreicht (n=2, SD 4,2). Es ergibt sich ein Summenwert von 454. Auch der Mittelwert aus den drei Werten ist mit 151,3 (n=2, SD 19,2) und damit einer Differenz von 61,7 zu den Kontrollen und 36,4 zur Doppelknockoutgruppe deutlich erhöht. Die Steigerung beträgt das 1,7- fache gegenüber den Kontrollen und das 1,3- fache gegenüber Doppelknockouttieren gleichen Alters.

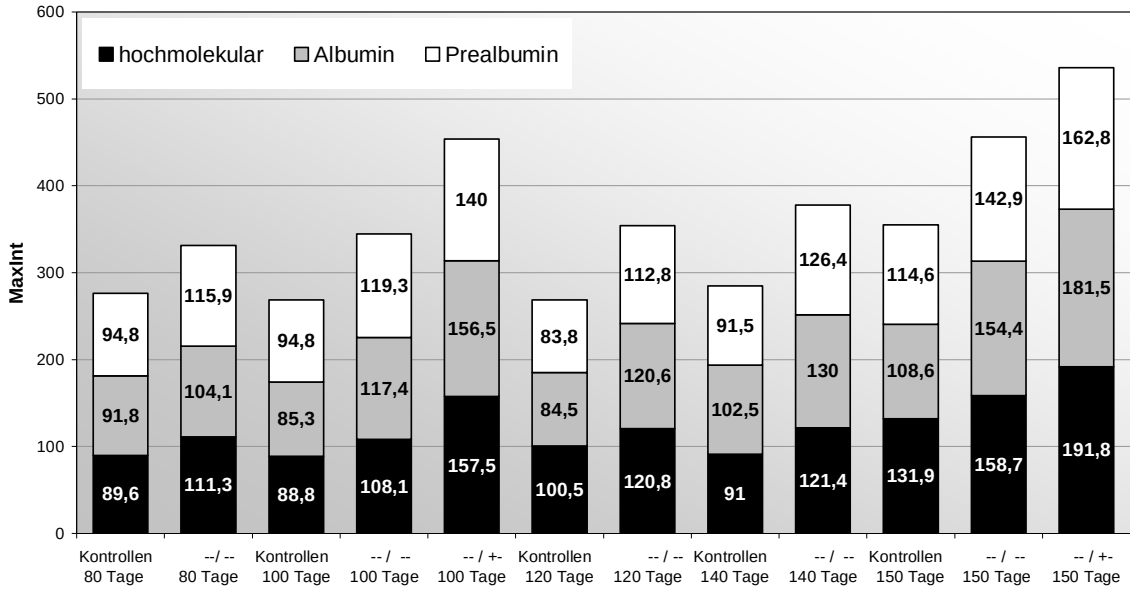


Abb. 3.14 Darstellung der maximal gemessenen Intensitäten (MaxInt) in den drei Messbereichen hochmolekulare Proteine, Albumin und Prealbumin als gestapelte Säulen. Die Werte sind Gruppenmittelwerte aus den für jede Probe gemessenen Maximalwerten. Die Höhe der Säulen entspricht der Gesamtsumme. Die x- Achse enthält jeweils den Genotyp in der Form COL4A3 / ITGA2 und die Altersangabe.

Zum Zeitpunkt 150 Tage ist in allen Gruppen ein Anstieg der Maximalwerte zu verzeichnen, am stärksten im hochmolekularen Bereich. Die Kontrollgruppe erreicht hier 131,9 (n=14, SD 39,5). Im Albuminbereich beträgt der Wert 108,6 (n=14, SD 23,2) und um Prealbumin 114,6 (n=14, SD 21,8). In der Doppelknockoutgruppe finden sich 158,7 (hochmolekular, n=11, SD 36,9), 154,4 (Albumin, n=11, SD 32,9) und 142,9 (Prealbumin, n=11, SD 25,3). Die höchsten Maximalwerte erreicht erneut die rezeptorpositive Alportgruppe mit 191,8 (hochmolekular, n=4, SD 6,8), 181,5 (Albumin, n=4, SD 14,2) und 162,8 (Prealbumin, n=4, SD 6). In allen Gruppen ist somit bis zu diesem Zeitpunkt eine vorwiegend hochmolekulare Proteinurie vorhanden. Der Mittelwert der drei Werte in der

Doppelknockoutgruppe entspricht mit 152 (n=11, SD 31,8) dem 1,3- fachen der Kontrollgruppe (118,4, n=14, SD 30,3), dementsprechend auch der Summenwert (456 zu 355,1). In der heterozygot rezeptorpositiven Alportgruppe wird ein Mittelwert von 178,7 (n=4, SD 15,3) und damit das 1,5- fache der Kontroll- und das 1,2- fache der COL4A3 -- / ITGA2 -- Gruppe erreicht (entsprechend mit dem Summenwert von 536,1). Die Werte dieser Gruppe sind in allen Proteinbereichen sowohl bei 100 Tagen als auch bei 150 Tagen signifikant über das Niveau der Kontrollen hinaus gesteigert. Die Maximalwerte stechen in allen Gruppen und Altersstufen aus dem Mittelwertniveau heraus und zeigen, ebenso wie der Verlauf der Mittelwerte, einen kontinuierlichen Anstieg über die Zeit hinweg, mit den Höchstwerten bei 150 Tagen (Abb. 3.15).

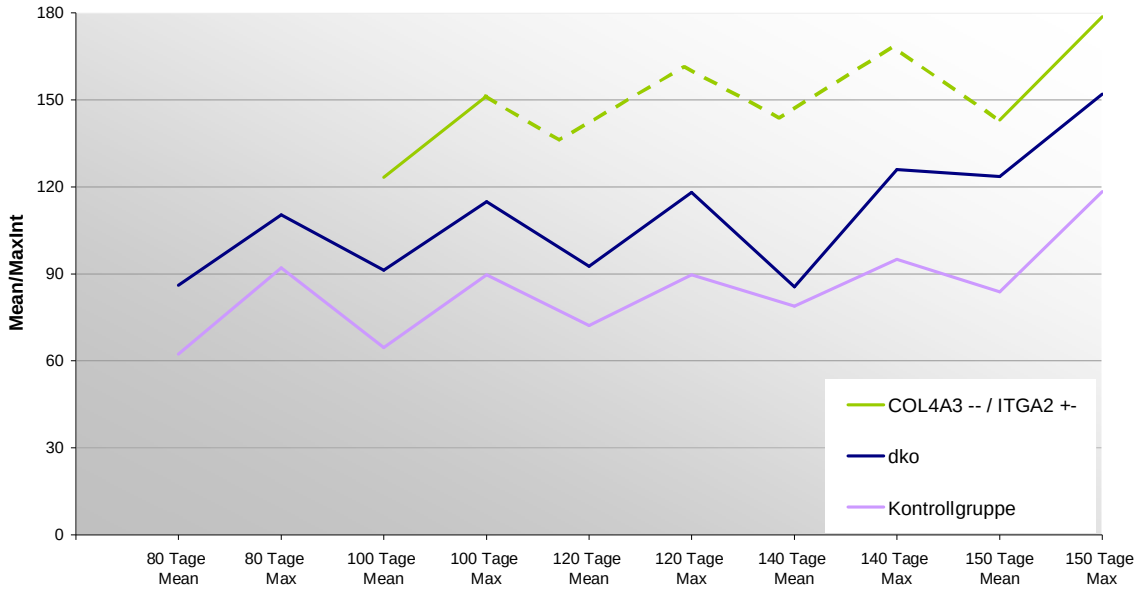


Abb. 3.15 Gesamtdarstellung der durchschnittlich gemessenen Intensitäten (MeanInt) und der dazugehörigen maximal gemessenen Intensitäten (MaxInt) in den drei Gruppen im zeitlichen Verlauf. Alle Werte sind Mittelwerte aus den in den drei Molekulargewichtsbereichen gemessenen Einzelwerten.

3.4 Harnstoffbestimmung

Als Parameter zur Einschätzung der Nierenfunktion wurde zu verschiedenen Zeiten die Harnstoffkonzentration im Serum bestimmt. Bei der ersten Messung im Alter von 100 Tagen stammt der niedrigste Wert von einem für COL4A3 homozygot positiven und für ITGA2 negativen Tier (27,8 mg/dl). Die für COL4A3 heterozygot positiven und für ITGA2 negativen Mäuse haben mit 39,1 mg/dl (n=2, SD 8,3) einen höheren Durchschnittswert (Abb. 3.16). Aufgrund der geringen Abweichungen der Mittelwerte auch zum Zeitpunkt 150 Tage wurde, zugunsten einer verbesserten Übersicht, aus den für COL4A3 hetero- bzw. homozygoten Tieren mit ITGA2 homozygot negativem Rezeptorstatus eine Referenzgruppe gebildet (Abb. 3.17). In dieser erreicht der Mittelwert zum Zeitpunkt 100 Tage 35,3 mg/dl (n=3, SD 8,8). Einen im Vergleich dazu höheren Mittelwert hat die Gruppe der Alporttiere mit heterozygot positivem Rezeptorstatus (COL4A3 -- / ITGA2 +-) mit 40,7 mg/dl (n=2, SD 18,1). Die Doppelknockoutgruppe liegt mit 44,2 mg/dl (n=3, SD 13,6) nicht wesentlich von diesem Wert entfernt. Insgesamt sind zu diesem Zeitpunkt in den Alportgruppen noch keine signifikanten Erhöhungen der Harnstoffwerte gegenüber der Kontrollgruppe zu finden (Abb. 3.16).

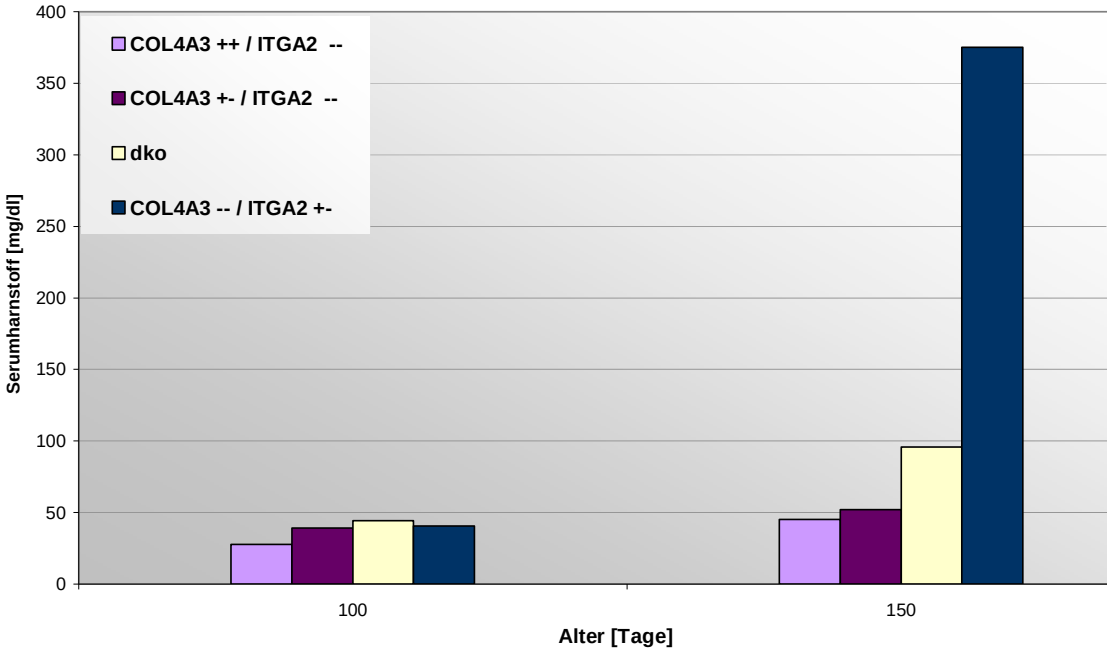


Abb. 3.16 Gruppenmittelwerte der Serumharnstoffkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten

In allen Gruppen kann eine mit zunehmendem Alter steigende Harnstoffserumkonzentration gemessen werden. Der Mittelwert der gesunden Tiere zeigt im

Vergleich zu den Vorwerten den geringsten Anstieg um 35,7 % auf 47,9 mg/dl (n=5, SD 11,8). Die für COL4A3 homozygot positiven und ITGA2- negativen Tiere allein erreichen 45,3 mg/dl (n=3, SD 3,8), die für die α3- Kette des Typ-IV- Kollagen heterozygot positiven und für ITGA2 negativen Mäuse tragen 51,9 mg/dl (n=2, SD 21,9) bei. Im Gegensatz zu den geringen Abweichungen der Alportgruppen vom Referenzwert gesunder Kontrollen im Alter von 100 Tagen, haben sich bis zum Zeitpunkt 150 Tage deutliche Unterschiede entwickelt. Im Vergleich zum Referenzmittelwert weist die Doppelknockoutgruppe mit 95,9 mg/dl eine im Mittel doppelt so hohe Serumharnstoffkonzentration auf (Steigerungsfaktor 2,0, n=3, SD 35,8). Zum eigenen 100 Tagewert ergibt sich eine Steigerung um 116 % (p 0,08). Sie weichen damit zwar bereits signifikant vom Harnstoffwert gesunder Kontrollen ab (p 0,03), liegen aber dennoch weit unterhalb der Werte der heterozygot rezeptorpositiven Alportgruppe, die im Alter von 150 Tagen den mit Abstand stärksten Anstieg und den höchsten Mittelwert aufweist. Mit 375,05 mg/dl (n=2, SD 102,2) ist die mittlere Serumharnstoffkonzentration gegenüber dem Ausgangswert bei 100 Tagen signifikant gesteigert (p 0,04). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen gleichen Alters stellt diese annähernde Verachtfachung ebenfalls eine signifikante Erhöhung dar (p< 0,001). Der Abstand zur Doppelknockoutgruppe beträgt 279,15 mg/dl, was einer rund vierfachen, signifikanten Steigerung entspricht (p 0,02, Abb. 3.16 und 3.17).

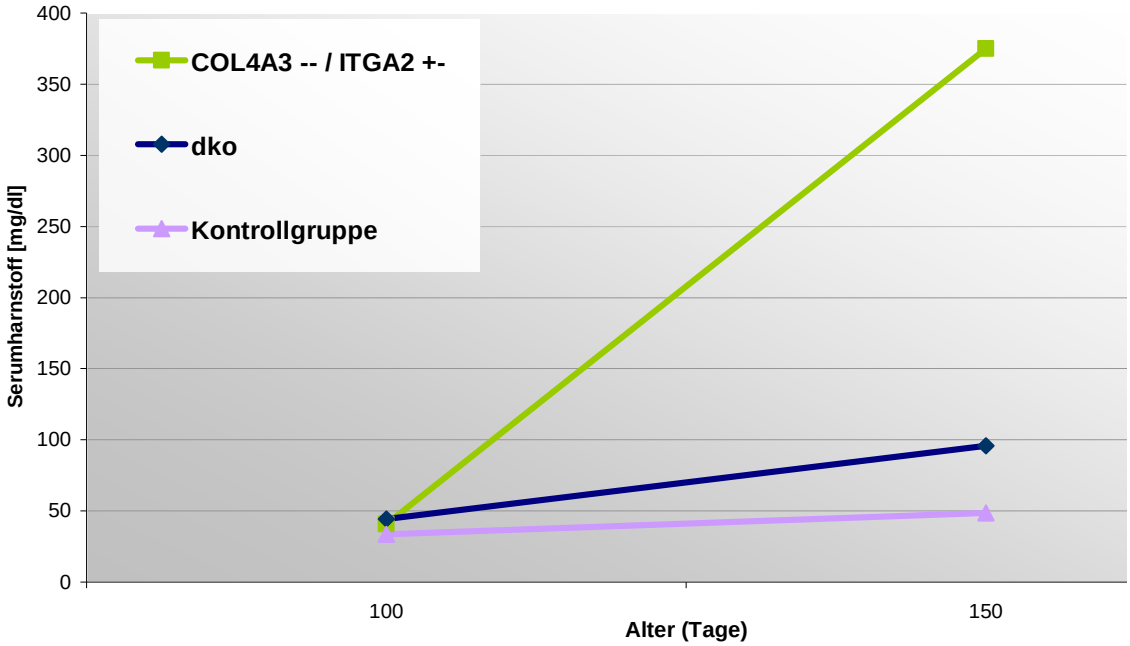


Abb. 3.17 Gruppenmittelwerte der Serumharnstoffkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten, ITGA2- negative und für COL4A3- homozygote sowie heterozygote Tiere sind zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst

3.5 Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Um eine Übersicht der Struktur des Nierengewebes zu erhalten, wurden Längsschnitte der Organe 100 und 150 Tage alter Mäuse angefertigt und mit Hilfe von Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Da das Eosin an positiv geladene Partner bindet, werden das Zytoplasma und insbesondere auch Ansammlungen von Proteinen wie Kollagen (z.B. als Bestandteil von Fibroseherden und Basalmembranen) rot dargestellt. Die Zellkerne hingegen färben sich durch das Hämatoxylin blau.

Zum Zeitpunkt 100 Tage zeigen die Schnitte der Referenzgruppe (COL4A3 ++ / ITGA2 --, Abb. 3.18 **A, D, G**) eine normale Nierenmorphologie. Die Kapillarschlingen der Glomeruli sind regelhaft verteilt und angefärbt. Die Struktur der Tubuli imponiert typisch netzartig und gleichmäßig. Erkennbar sind Zellen, die mit ihrem hellen Zytoplasma auf der etwas kräftiger angefärbten kollagenen Basalmembran liegen. Verbreiterungen des Interstitiums, narbige Veränderungen oder Ablagerungen sind nicht zu sehen. Dagegen zeigen die Färbungen der 150 Tage- Schnitte sowohl innerhalb der Glomeruli als auch interstitiell kleinere Proteinansammlungen (Abb. 3.19 **A, D, G**). Das glomeruläre Gefäßnetz stellt sich auch hier zart und klar strukturiert dar. Die Tubuluszellen sind kräftiger in ihrer Anfärbung, jedoch weiterhin nicht wesentlich verbreitert und umschließen ein deutlich erkennbares Lumen. Insgesamt erscheint die Gewebearchitektur auch zu diesem Zeitpunkt nur wenig verändert.

Die Doppelknockouttiere (COL4A3 --/ ITGA2 --, Abb. 3.18 **B, E, H**) unterscheiden sich im Alter von 100 Tagen durch eine etwas stärker ausgeprägte Anfärbung insbesondere im Bereich der tubulären Basalmembranen von den Referenzbildern. Eine Verbreiterung des Interstitiums, Narben und Proteinablagerungen sind auch hier nicht zu sehen. Ansonsten finden sich vergleichbar konfigurierte Glomeruli, die in den Aufnahmen höherer Vergrößerung etwas gedrängter wirken. Dieser Eindruck bestätigt sich auch auf den 150 Tage- Bildern (Abb. 3.19 **B, E, H**). Die Glomerulusschlingen erscheinen nicht vollständig frei entfaltet, die Zellkerne liegen etwas dichter beieinander. Außerdem sind die parietalen Epithelzellen zum Teil leicht verdickt und umschließen das Gefäßknäuel kapselartig. Ebenso wirken die Tubuluszellen auf der verbreiterten Basalmembran vergrößert und engen das Lumen stellenweise ein. Es finden sich, den gesunden Kontrollen entsprechend, auch Proteinansammlungen, die in ihrer Grö-

ße und Anzahl etwas stärker ausgeprägt sind. An einigen Stellen, besonders am äußeren Rand des renalen Kortex, sind auch interstitielle Narben zu finden. Es herrscht jedoch insgesamt ein Bild vor das weiterhin einer normalen, aber verdichtet wirkenden Nierenstruktur entspricht.

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Gruppen sind auf den Färbungen der heterozygot rezeptorpositiven Alporttiere (COL4A3 -- / ITGA2 +-, Abb. 3.18 **C, F, I**) bereits bei 100 Tagen deutliche Unterschiede sichtbar. Die Glomeruli sind stark verdichtet, erkennbar an den sich vielfach überlagernden Zellkernen und der Verbreiterung des Abstandes der Gefäßschlingen zum parietalen Epithel. Frei entfaltete Schlingen und Lücken zwischen den Zellen sind kaum mehr vorhanden. Auch ein Tubuluslumen ist an vielen Stellen nicht mehr abgrenzbar. Es ergeben sich flächenhaft ausgebreitete stark eosinophil gefärbte Bereiche, in denen keine normale Parenchymstruktur erkennbar ist. Die dazwischen liegenden Tubuli besitzen vielfach unregelmäßige Konturen und erscheinen ebenfalls gedrängt. Interstitielle Narben sind nicht zu finden. Es fallen aber bereits interstitielle Proteinablagerungen auf. Zum Zeitpunkt 150 Tage ist nahezu keine normale Nierenstruktur mehr erhalten (Abb. 3.19 **C, F, I**). Es finden sich zerstörte Glomeruli, zum Beispiel in stark komprimierter fibrotischer Form ohne ersichtliche Zwischenräume. Sie sind zum Teil nur noch schwer vom umgebenden narbig veränderten Interstitium zu unterscheiden. Gleichermaßen sind auch stark regressiv und höhlenartig veränderte Glomeruli zu finden. Kennzeichnend sind breite fibrotische Kapseln um die Glomeruli und plaqueartige Proteinablagerungen, die einen Großteil der glomerulären Struktur ausfüllen. Interstitiell sind ebenfalls Ablagerungen sichtbar, insgesamt überwiegen hier jedoch großflächige helle Narbenbereiche. Eine normale Tubulusanordnung und -struktur ist nicht mehr erkennbar. Die nur noch in geringer Anzahl vorhandenen Tubuli haben verdicktes und stark gefärbtes Epithel mit zentral oft aufgehellt erscheinenden Zellkernen. Im Vergleich zur Referenz- und Doppelknockoutgruppe lassen sich somit deutliche Unterschiede erkennen, wobei die Abweichungen von einer physiologischen Nierenmorphologie in dieser Gruppe der heterozygot rezeptorpositiven Alporttiere am größten sind.

100 Tage:

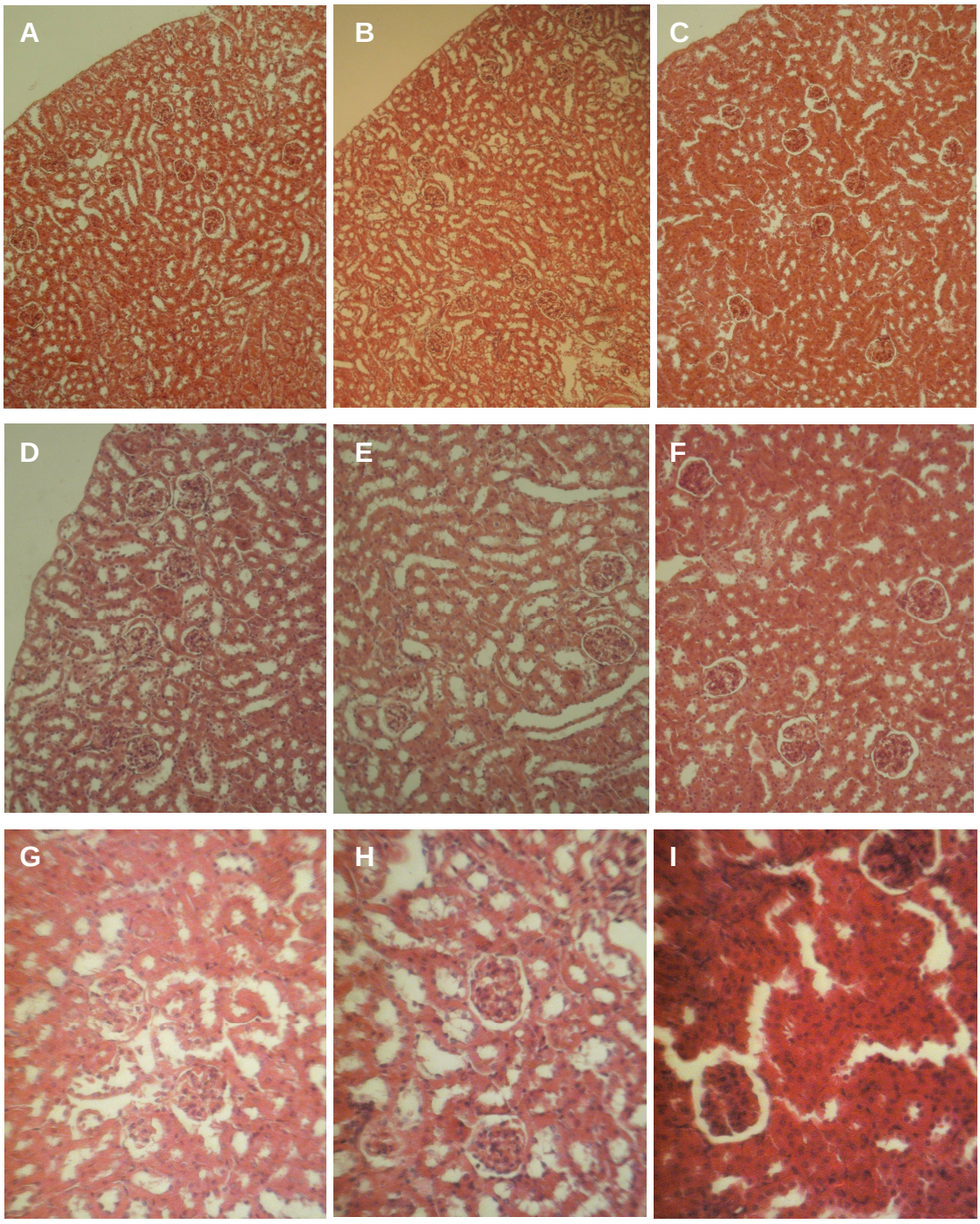


Abb. 3.18 Hämatoxylin- Eosin- Färbungen von im Alter von 100 Tagen angefertigten Längsschnitten der Nieren von Mäusen **A, D, G:** COL4A3 ++ / ITGA2 -- **B, E, H:** COL4A3 -- / ITGA2 -- **C, F, I:** COL4A3 -- / ITGA2 +- Dargestellt sind in der oberen Reihe Aufnahmen in 10- facher Vergrößerung, in der mittleren Reihe Aufnahmen in 20- facher Vergrößerung und in der unteren Reihe in 40- facher Vergrößerung (Erläuterungen im Text)

150 Tage:

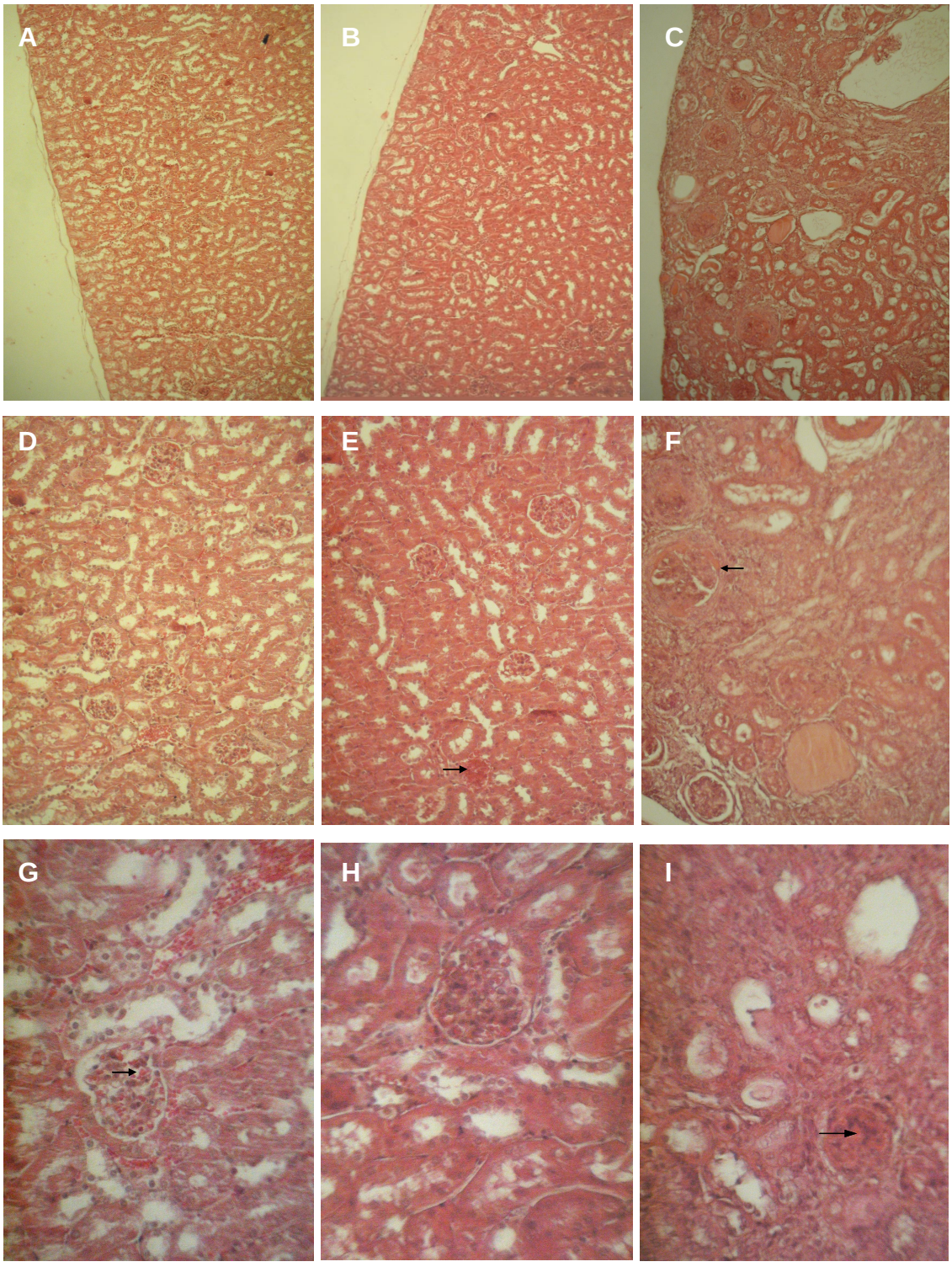


Abb. 3.19 Hämatoxylin- Eosin- Färbungen von im Alter von 150 Tagen angefertigten Längsschnitten der Nieren von Mäusen **A, D, G:** COL4A3 ++ / ITGA2 -- **B, E, H:** COL4A3 -- / ITGA2 -- **C, F, I:** COL4A3 -- / ITGA2 +- Dargestellt sind in der oberen Reihe Aufnahmen in 10- facher Vergrößerung, in der mittleren Reihe Aufnahmen in 20- facher Vergrößerung und in der unteren Reihe in 40- facher Vergrößerung. → Proteinansammlungen (Erläuterungen im Text)

3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen die α1-, β1- und γ1- Ketten des Laminins sowie eines farbstoffmarkierten Sekundärantikörpers die Verteilung des Proteins genauer untersucht. Laminin ist neben Kollagen IV der Hauptbestandteil von Basalmembranen, kennzeichnet aber auch interstitielle Narben (Eddy 1996), die im Rahmen von fibrotischen Umbauprozessen mit entsprechender Überproduktion und Akkumulation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix aufgrund von Nierenschädigungen verschiedenster Ursache entstehen.

Die Schnitte COL4A3- und ITGA2- homozygot positiver Kontrollen (Abb. 3.20 A) haben im Alter von 9,5 Wochen schmal angefärbte tubuläre Basalmembranen (α1, β1, γ1). Auch die Bowman`sche Kapsel kommt zart und gleichmäßig zur Darstellung (β1, γ1). Im Bereich der Glomeruli sind die mesangialen Zellen, die α1-, β1- und γ1- Lamininketten besitzen, deutlicher gefärbt. Ebenso wie die glomerulären Kapillarschlingen enthält die glomeruläre Basalmembran als Antigen nur die γ1- Kette und erscheint entsprechend weniger intensiv. Insgesamt findet sich eine normale Nierenmorphologie mit regelhaft erscheinenden Glomeruli und Tubulusstrukturen. Ansammlungen von Laminin in Form von Verbreiterungen der Basalmembranen oder der intertubulären Bereiche bzw. interstitielle Narben sind nicht erkennbar.

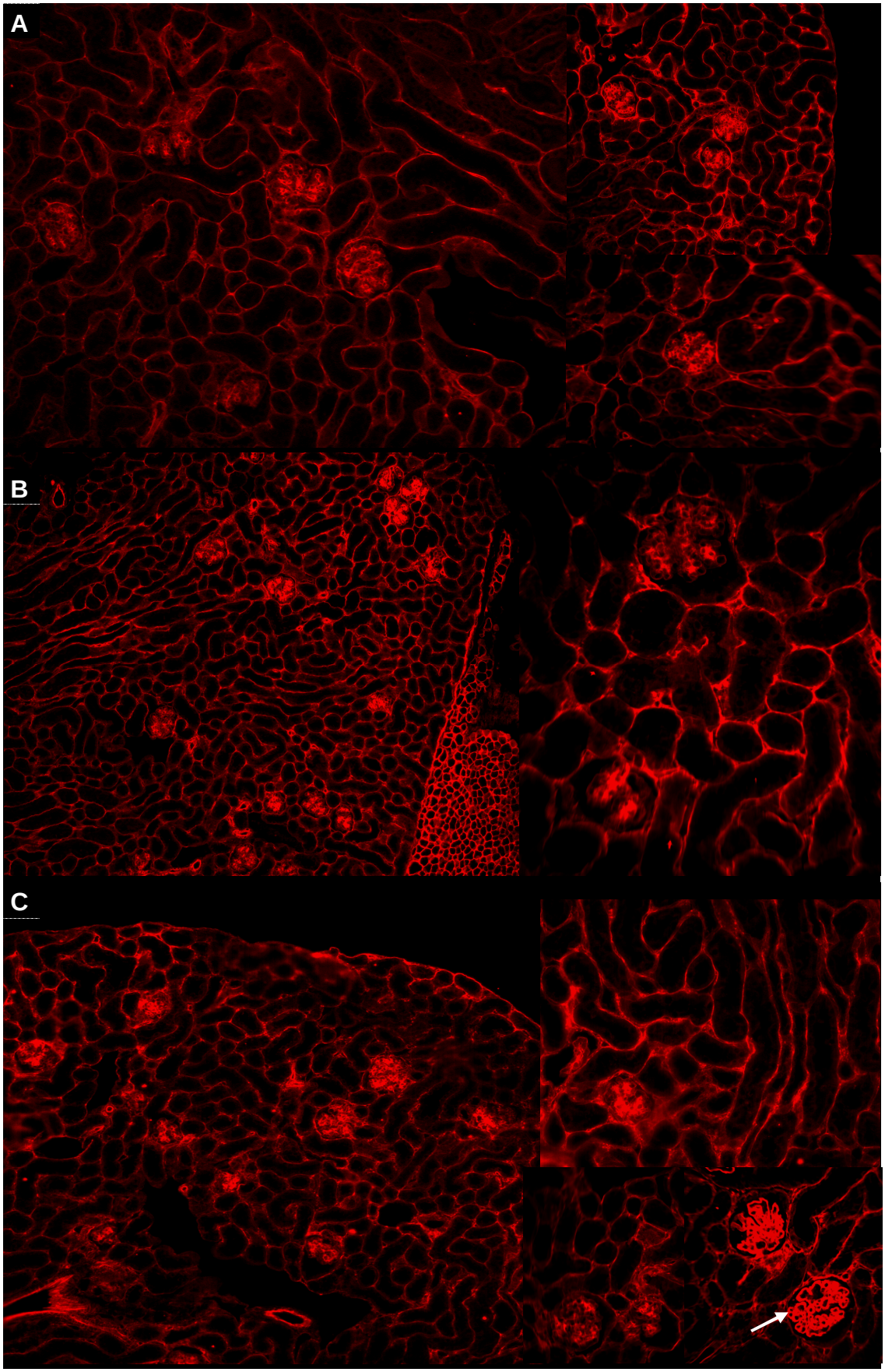
Die Immunfluoreszenzmikroskopie der für COL4A3 homozygot positiven und für ITGA2 homozygot rezeptornegativen Tiere zum Zeitpunkt 100 Tage zeigt ein vergleichbares Bild (Abb. 3.20 B). Die tubulären Basalmembranen wirken in höherer Vergrößerung stellenweise geringfügig breiter. Größere Abweichungen oder eine interstitielle Fibrose sind nicht feststellbar.

Im gleichen Alter erscheinen die tubulären Basalmembranen der Doppelknockouttiere, ebenso wie die Bowman`schen Kapseln im Vergleich zu den gesunden Kontrollen dezent verdickt (Abb. 3.20 C). Unter den Glomeruli finden sich sowohl weitestgehend den Kontrollglomeruli entsprechende, mit ebenfalls maximal leicht verdickter Basalmembran, als auch Glomeruli, deren Basalmembran bereits eindeutig intensiver durch die Lamininantikörper gefärbt ist. Dies ist zum einen auf die alporttypische Verdickung mit der Akkumulation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix der GBM zurückzuführen, zum anderen auf die damit einhergehende gesteigerte Deposition von Lamininketten die in der normalen

GBM nicht zu finden sind (α2, α1, β1) und deren Erfassung durch den Antikörper. Die Kapillarschlingen des glomerulären Gefäßnetzes sind mit ihren Lumina jedoch deutlich erkennbar und der gesamte Kapselraum mit locker liegenden Schlingen ausgefüllt, so dass die Grundstruktur der Glomeruli weiterhin erhalten ist. Fibrotische Bezirke oder interstitielle Proteinakkumulationen fehlen. Die normale Nierenmorphologie ist insgesamt erhalten.

Vergleichend dazu findet man bei Alporttieren, die heterozygot rezeptorpositiv für Integrin α2β1 sind, zum Zeitpunkt 100 Tage eine stärkere Ausprägung der Verdickungen tubulärer Basalmembranen mit peritubulärer Gewebsvermehrung (Abb. 3.20 D). Die einzelnen Tubuli wirken in der Übersicht dichter gedrängt. In höherer Vergrößerung sind vielfach interstitielle Brücken zwischen ihnen sichtbar. Neben den erkennbaren aber in ihrem Ausmaß noch geringgradigen Veränderungen im Bereich der Tubuli, sind auch glomerulär Umgestaltungen darstellbar. Hier sind in der Übersichtsvergrößerung stellenweise homogen wirkende Glomeruli zu erkennen, die bei genauerer Betrachtung entsprechende strukturelle Abweichungen aufweisen. Das Kapillarnetz liegt gedrängter, die Lumina sind weniger gut abgrenzbar. Die allgemeine Nierenmorphologie entspricht insgesamt noch dem normalen Bild. Narbenbezirke sind nicht zu finden.

Starke Strukturveränderungen kommen dagegen bei Alporttieren mit homozygot positivem ITGA2- Status vor. Bereits im Alter von 9,5 Wochen ist der normale Gewebeaufbau weitestgehend zerstört. Es sind Tubuli mit stark betonter Basalmembran erkennbar, die zumeist in breite interstitielle Narben eingebettet sind. Die fibrotischen Areale erstrecken sich zum Teil auch über größere Flächen, ohne abgrenzbare Normalstruktur. Ebenso befinden sich dort in hohem Anteil Glomeruli, die fibrosiert sind und eine zwiebelschalenähnliche Konformation aufweisen. Eine Abgrenzung von Substrukturen ist dort nicht mehr möglich. Ebenfalls kommen stark regressiv veränderte Glomeruli vor. Die fibrosierten Bereiche kennzeichnet eine starke Anfärbung durch den fluoreszierenden Sekundärantikörper, da hier im Rahmen einer gesteigerten Matrixsynthese unter anderem Laminin in hohen Mengen eingelagert wird. Die Alporttiere mit homozygot positivem ITGA2- Status zeigen somit in der Immunfluoreszenzmikroskopie histologisch den schlechtesten Zustand (Abb. 3.20 E).


A
B
C

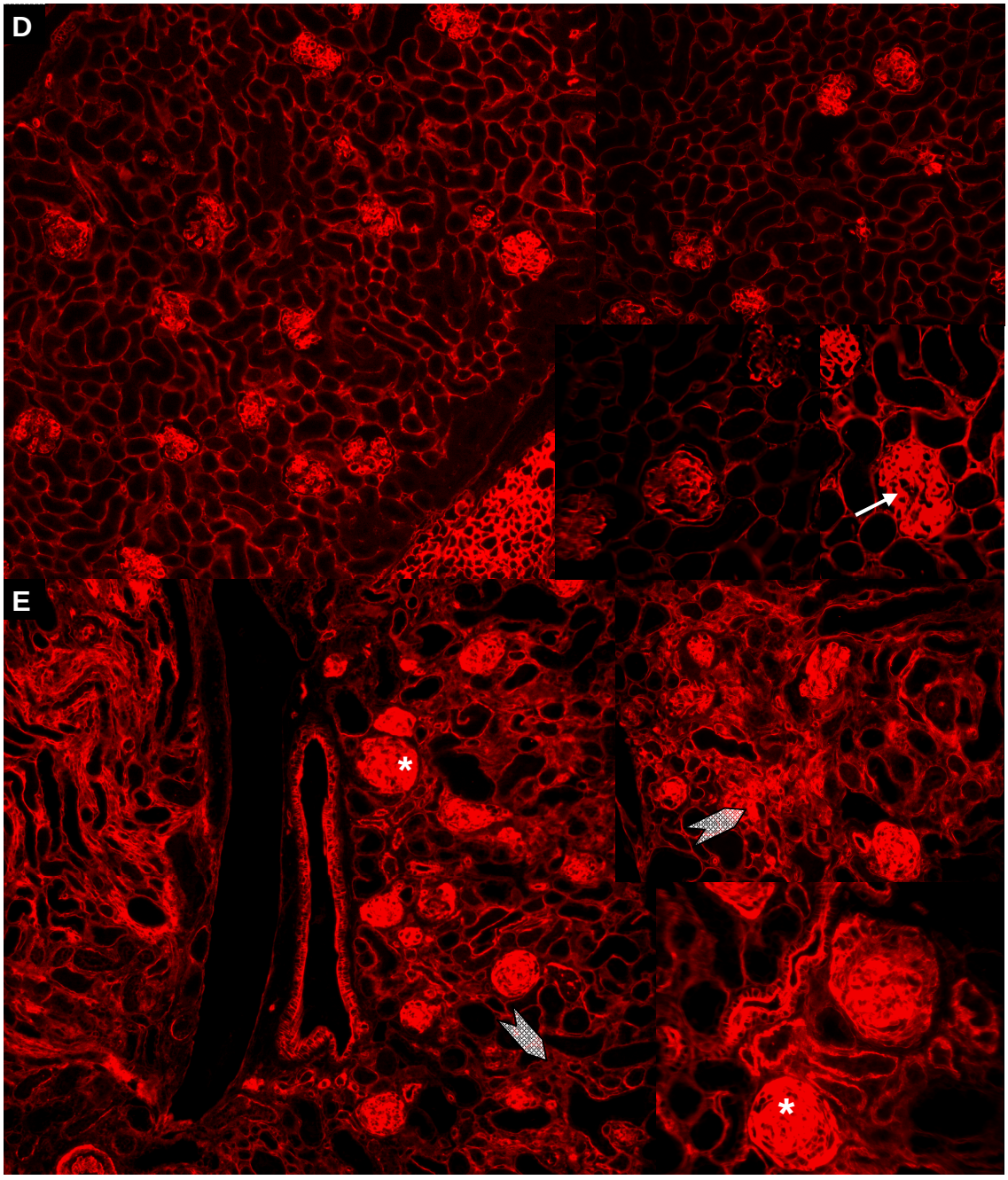
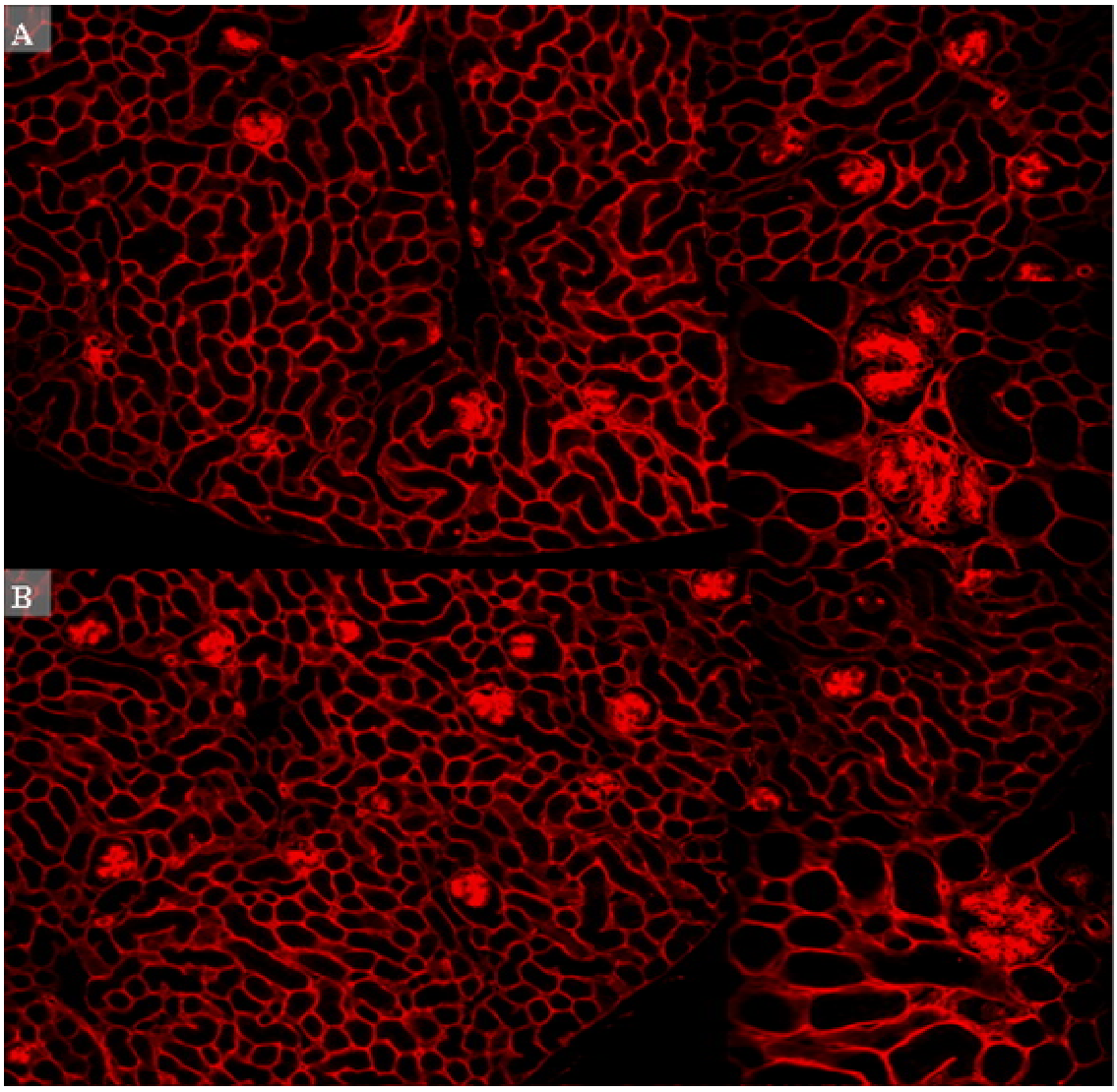


Abb. 3.20 Anti- Laminin- gefärbte Transversalschnitte von Mausnieren in der Immunfluoreszenzmikroskopie, Darstellung jeweils in 10- facher (großes Bild links), 20- facher (rechts oben) und 40- facher Vergrößerung (rechts unten) **A** COL4A3 ++/ ITGA2 ++, Alter 9,5 Wochen, Beispiel einer normalen Nierenmorphologie mit zarten Basalmembranen tubulär und glomerulär; eine verstärkte Anfärbung findet sich physiologisch im Bereich des Mesangiums. **B** COL4A3 ++/ ITGA2 --, Alter 101 Tage (hier nur 10- fache und 40- fache Vergrößerung), gegebenenfalls leichte Zunahme der Anfärbbarkeit der Basalmembranen, aber insgesamt ohne auffällige Abweichungen **C** COL4A3 --/ ITGA2 --, Alter 100 Tage mit ebenfalls normaler Gewebsarchitektur, stellenweise finden sich Glomeruli mit verdickter GBM (→) **D** COL4A3 --/ ITGA2 +-, Alter 101 Tage, Überwiegen von Glomeruli mit alporttypisch verdickter GBM (→), ferner Zunahme des intertubulären Gewebes **E** COL4A3 --/ ITGA2 ++, Alter 9,5 Woche, deutliche tubulointerstitielle (⋗) und intraglomeruläre Fibrose mit Glomeruli in Zwiebelschalenkonformation (*)

Um die Histologie im Verlauf beurteilen zu können, wurden Nierenschnitte von 150 Tage alten Tieren angefertigt. In der Kontrollgruppe (COL4A3 ++ / ITGA2--, Abb. 3.21 A) stellen sich leicht verbreiterte tubuläre Basalmembranen dar. Peritubulär gibt es Gewebsvermehrungen, die stellenweise flächig zwischen den Tubuli liegen. Insgesamt ist der tubulointerstitielle Fibrosegrad aber noch als eher gering einzustufen. Eine normale Tubulusarchitektur ist erhalten. Die Bowman`schen Kapseln sind zum Teil leicht verdickt. Innerhalb der Glomeruli lassen sich die Basalmembranen allenfalls leicht verdickt abgrenzen. Die intraglomeruläre Signalintensität ist jedoch gesteigert, was auf eine vermehrte Lamininakkumulation hinweist. Vor allem zentral gelegen stellen sich weniger Kapillarlumina dar. Das Gefäßnetz wirkt entsprechend rarefiziert und gedrängt. Ausgedehnte interstitielle Fibrosebezirke kommen nicht vor. Abgesehen von den beschriebenen Fibrosen interstitiell, sowie peri- und intraglomerulär zeigt sich noch ein normaler Gewebeaufbau ohne grundlegende Umgestaltungen.
Unter den Doppelknockouttieren finden sich zwei wesentliche histologische Bilder. Zunächst stellen sich Bereiche dar, die im Vergleich zur Kontrollgruppe eine leicht vermehrte interstitielle Fibrose aufweisen (Abb. 3.21 B). Die tubulären Basalmembranen sind verdickt, ebenso die Bowman`schen Kapseln. Das Tubulointerstitium erscheint vermehrt mit Flächenbildungen. Bezüglich der Glomeruli entsprechen sie weitestgehend der Kontrollgruppe. Neben einer Zunahme der GBM- Dicke finden sich auch hier intraglomerulär vermehrt fibrotische Areale. Das Gesamtbild hat sich gegenüber der Kontrollgruppe mittelgradig verschlechtert. Das zweite histologische Bild zeigt Areale in denen die Basalmembranen deutlicher verdickt sind (Abb. 3.21 C). Insbesondere in höherer Vergrößerung sind sowohl tubulär als auch glomerulär krankheitstypisch verbreiterte und entsprechend signalintensive Membranen zu erkennen. Die Glomeruli stellen sich homogen stark angefärbt dar, wobei das glomeruläre Kapillarnetz noch gut erkennbar ist und überwiegend nicht stark regressiv oder vollständig fibrosiert und adhärent erscheint. In diesen Teilen ist das interstitielle Gewebe stärker vermehrt. Die zum Teil regressiven Tubuli sind durch Fibrosen voneinander getrennt. Das Verhältnis von Narbenanteilen und funktionalem Gewebe ist insgesamt noch ausdrücklich zu Gunsten von Tubuli und Glomeruli verschoben, die mit verdickten Membranen aber in ihrer Grundstruktur erhalten erscheinen. Die zwei Gewebskonformationen die innerhalb der Doppelknockoutgruppe bestehen, kommen interindividuell in unterschiedlichem Ausmaß vor. Die Bandbreite

reicht dabei von Nieren, die komplett dem ersten Typ entsprechen und damit lediglich geringe morphologische Veränderungen aufweisen, bis hin zu Organen die fast ausschließlich vom zweiten Bild geprägt sind und damit mittelgradig verändert sind. Dazwischen liegen Individuen bei denen sich die Varianten mit unterschiedlich starken Anteilen abwechseln.

Die Nieren der Alportgruppe mit heterozygot positivem Integrin- α2β1- Rezeptorstatus sind überwiegend von Fibrose geprägt (Abb. 3.21 D). Es finden sich breite Narbenregionen mit massiver Vermehrung des Interstitiums, in denen kaum normale Nierenstrukturen abgrenzbar sind. Bei den erhaltenen Tubuli ist die Basalmembran deutlich verdickt. Auch die Bowman`schen Kapseln weisen eine, zum Teil erhebliche, Verbreiterung auf. Es sind zahlreiche stark regressive bzw. zwiebelschalenähnlich konformierte und stark fibrosierte Glomeruli zu sehen, die durch eine sehr hohe Signalintensität auffallen. Insgesamt ist die Nierenstruktur zum größten Teil zerstört. Die Schädigungen sind somit hochgradig.



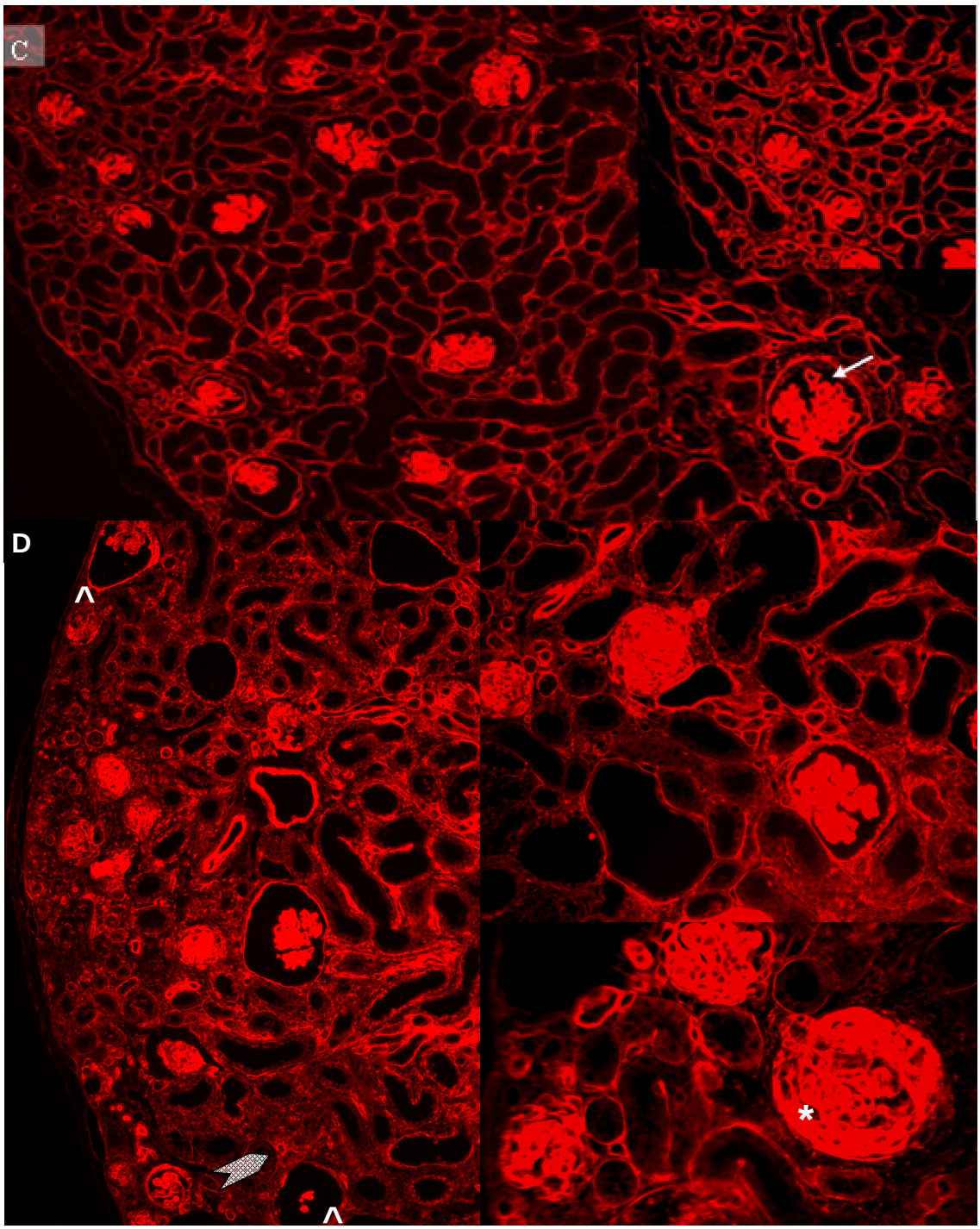


Abb. 3.21 Anti- Laminin- gefärbte Transversalschnitte von Mausnieren in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Darstellung in 10- facher (großes Bild links), 20- facher (rechts oben) und 40- facher Vergrößerung (rechts unten) **A** COL4A3 ++/ ITGA2 --, Alter 151 Tage: altersentsprechend mit leicht verdickten tubulären und glomerulären Basalmembranen und verstärkter Intensität **B** COL4A3 --/ ITGA2 --, Alter 151 Tage: leichte Steigerung in der Anfärbbarkeit der Basalmembranen mit stärkerer interstitieller Gewebsvermehrung **C** COL4A3 --/ ITGA2 --, Alter 152 Tage; Glomeruli mit zum Teil stark verdickter GBM (→) und Interstitium mit größeren tubulointerstitiellen Brücken **D** COL4A3 --/ ITGA2 +-, Alter 146 Tage; deutliche tubulointerstitielle Gewebsvermehrung mit großflächig ausgedehnten Fibrosebereichen (⋗⋖) sowie fibrotische Glomeruli in Zwiebelschalenkonformation (*) und stark regressive Glomeruli (^)

Um die sichtbaren Unterschiede besser quantifizieren zu können, wurden die Immunfluoreszenzbilder doppelblind bewertet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.1.

		Glomeruli				Tubulointerstitium				
Alter (Tage)	COL4A3/ ITGA2	Bewertungen (n)	Minimum	Maximum	Gesamt	Bewertungen (n)	Minimum	Maximum	Gesamt	**Gesamtnote**
80	+ + / + +	90	0	4,5	1,08	90	0	4,5	0,97	**1,03**
80	- - / + +	60	4,5	5	4,24	60	4	5	3,99	**4,11**
100	- - / + -	63	2	4	1,86	63	1	4	1,42	**1,64**
150	- - / + -	87	3,5	5	3,54	87	3	5	3,08	**3,31**
150	+ + / - -	90	1	3	1,25	90	1	2,5	1,03	**1,14**
150	+ - / - -	63	1,5	2	1,27	63	1	2,5	0,97	**1,12**
100	- - / - -	90	1,5	3	1,28	90	1	4	1,21	**1,24**
150	- - / - -	84	1,5	5	1,69	84	1,5	5	1,54	**1,62**

Tab. 3.1 Anzahl der Bewertungen (n), Minima, Maxima sowie Mittelwerte der Einzelbewertungen für die Glomeruli und das Tubulointerstitium mit der daraus ermittelten Gesamtnote für den Fibrosegrad der verschiedenen Versuchsgruppen

Die Referenzgruppe (80 Tage, COL4A3 ++ /ITGA2 ++) weist sowohl in den Einzelbewertungen für die Glomeruli (SD 0,68) als auch bei denen für das Tubulointerstitium (SD 0,62) die niedrigsten und somit besten Werte auf. Es ergibt sich eine Gesamtnote des Fibrosegrades von 1,03. Obwohl mit 150 Tagen bereits deutlich älter zeigt sich bei den Benotungen für homozygot COL4A3- rezeptorpositive und gleichzeitig ITGA2- rezeptornegative Tiere (Glomeruli SD 0,56, Tubulointerstitium SD 0,5) und auch bei den heterozygot- COL4A3- Rezeptorpositiven und ITGA2- Rezeptornegativen (Glomeruli SD 0,51, Tubulointerstitium SD 0,49) nur eine leichte Erhöhung. Auf einem etwa gleichen Niveau in der Einschätzung der Glomeruli finden sich die Doppelknockouttiere im Alter 100 Tage (SD 0,76). Für das Tubulointerstitium dieser Individuen wird der Fibrosegrad mit im Mittel 1,21 (SD 0,8) etwas höher eingeschätzt. Auch das Gesamtergebnis liegt etwas oberhalb dessen der zuvor genannten Gruppen. Bereits deutlicher unterscheiden sich davon die errechneten Werte für Tiere des gleichen Genotyps zum Zeitpunkt 150 Tage. Bei den Glomeruli werden im Mittel 1,69 Punkte

erreicht (SD 0,83), für das Tubulointerstitium 1,54 (SD 0,74). Die Gesamtnote beträgt mit 1,62 rund das 1,4- fache der homo- bzw. heterozygot COL4A3- positiven und ITGA2- rezeptornegativen Tiere gleichen Alters. Mit 1,64 kommen im Vergleich dazu die heterozygot- ITGA2- positiven und für COL4A3 homozygot negativen Tiere bereits im Alter von 100 Tagen auf etwa gleiche Werte. Die Benotung der Glomeruli fällt mit 1,86 (SD 0,98) deutlich schlechter aus, die für das Tubulointerstitium mit 1,42 (SD 0,9) etwas besser. Im Alter von 150 Tagen weisen die Individuen dieses Genotyps deutliche Verschlechterungen auf. Die Glomeruli werden im Mittel mit 3,54 (SD 0,99) eingeschätzt, das Tubulointerstitium mit 3,08 (SD 1,06). Gegenüber den eigenen Vergleichswerten findet nahezu eine Verdopplung statt. Nur die für COL4A3 homozygot negativen und für ITGA2 homozygot positiven Tiere sind schlechter bewertet. Bereits im Alter von 80 Tagen werden mit 4,24 für die Glomeruli (SD 0,72) und 3,99 für das Tubulointerstitium (SD 0,83) die mit Abstand höchsten Werte vergeben. Die Gesamtnote ist mit 4,11 nur noch wenig von der maximal schlechtesten zu erreichenden Bewertung entfernt und spricht für starke fibrotische Veränderungen. Entgegen der Schwankungen in Minima und Maxima bei anderen Gruppen werden in den 60 bewerteten Stichproben ausschließlich Noten im Bereich 4 - 5 bei den tubulointerstitiellen Strukturen bzw. 4,5 - 5 bei den Glomeruli vergeben (Abb. 3.22).

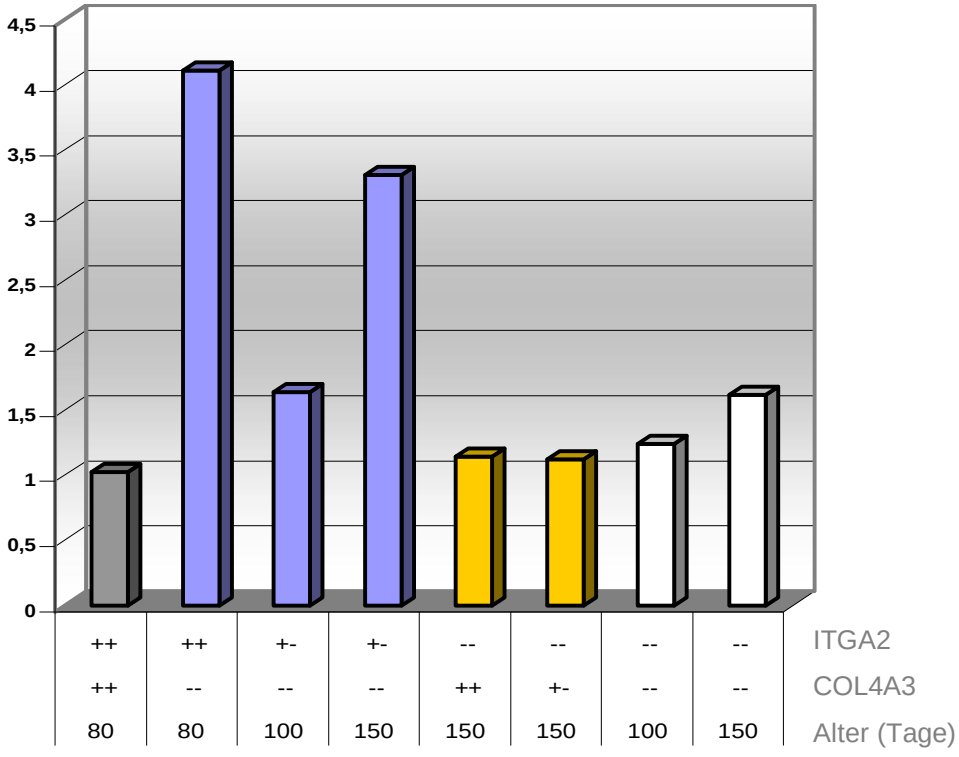


Abb. 3.22 Grafische Darstellung der Gesamtbenotung für die verschiedenen Gruppen

Alter COL4A3/ ITGA2 / Alter COL4A3/ ITGA2	80 + + / + +	80 - - / + +	100 - - / + -	150 - - / + -	150 + + / - -	150 + - / - -	100 - - / - -	150 - - / - -
80 + + / + +	----	0,25	0,58	0,31	0,86	0,85	0,84	0,64
80 - - / + +	3,93	----	2,28	1,2	3,39	3,34	3,31	2,51
100 - - / + -	1,72	0,44	----	0,53	1,49	1,46	1,45	1,1
150 - - / + -	3,28	0,83	1,9	----	2,83	2,79	2,77	2,09
150 + + / - -	1,16	0,29	0,67	0,35	----	0,98	0,98	0,74
150 + - / - -	1,18	0,3	0,68	0,36	1,02	----	0,99	0,75
100 - - / - -	1,19	0,3	0,69	0,36	1,02	1,01	----	0,76
150 - - / - -	1,56	0,4	0,91	0,48	1,35	1,33	1,32	----

Tab. 3.2 Steigerungsfaktoren in der Analyse der Glomerulusbewertungen. Die Zahl an der Kreuzungsstelle zweier Gruppen gibt den Faktor an um welchen die Genotypgruppe auf der linken Seite sich von der in der Kopfzeile unterscheidet. Der Wert für die Gruppe COL4A3 -- / ITGA2 ++ ist zum Zeitpunkt 80 Tage beispielsweise um das 3,93- fache höher als der der 80 Tage COL4A3 ++ / ITGA2 ++ Gruppe.

Alter COL4A3/ ITGA2 / Alter COL4A3/ ITGA2	80 + + / + +	80 - - / + +	100 - - / + -	150 - - / + -	150 + + / - -	150 + - / - -	100 - - / - -	150 - - / - -
80 + + / + +	----	0,24	0,68	0,31	0,94	1	0,8	0,63
80 - - / + +	4,11	----	2,81	1,3	3,87	4,11	3,3	2,59
100 - - / + -	1,46	0,36	----	0,46	1,38	1,46	1,17	0,92
150 - - / + -	3,18	0,77	2,17	----	2,99	3,18	2,55	2
150 + + / - -	1,06	0,26	0,75	0,33	----	1,06	0,85	0,67
150 + - / - -	1	0,24	0,68	0,31	0,94	----	0,8	0,63
100 - - / - -	1,25	0,3	0,85	0,39	1,17	1,25	----	0,79
150 - - / - -	1,59	0,39	1,08	0,5	1,5	1,59	1,27	----

Tab. 3.3 Steigerungsfaktoren in der Analyse der Bewertungen des Tubulointerstitiums. Die Zahl an der Kreuzungsstelle zweier Gruppen gibt den Faktor an um welchen die Genotypgruppe auf der linken Seite sich von der in der Kopfzeile unterscheidet. Der Wert für die Gruppe COL4A3 -- / ITGA2 ++ ist zum Zeitpunkt 80 Tage beispielsweise um das 4,11- fache höher als der der 80 Tage COL4A3 ++ / ITGA2 ++ Gruppe.

Alter COL4A3/ ITGA2 / Alter COL4A3/ ITGA2	80 + + / + +	80 - - / + +	100 - - / + -	150 - - / + -	150 + + / - -	150 + - / - -	100 - - / - -	150 - - / - -
80 + + / + +	----	0,25	0,63	0,31	0,9	0,92	0,83	0,64
80 - - / + +	3,99	----	2,51	1,24	3,61	3,67	3,31	2,54
100 - - / + -	1,59	0,4	----	0,5	1,44	1,46	1,32	1,01
150 - - / + -	3,21	0,81	2,02	----	2,9	2,96	2,67	2,04
150 + + / - -	1,12	0,28	0,7	0,34	----	1,02	0,92	0,7
150 + - / - -	1,09	0,27	0,68	0,34	0,98	----	0,9	0,69
100 - - / - -	1,2	0,3	0,76	0,37	1,09	1,11	----	0,77
150 - - / - -	1,57	0,39	0,99	0,49	1,42	1,45	1,31	----

Tab. 3.4 Steigerungsfaktoren in der Analyse der Gesamtbewertungen. Die Zahl an der Kreuzungsstelle zweier Gruppen gibt den Faktor an um welchen die Genotypgruppe auf der linken Seite sich von der in der Kopfzeile unterscheidet. Der Wert für die Gruppe COL4A3 -- / ITGA2 ++ ist zum Zeitpunkt 80 Tage beispielsweise um das 3,99- fache höher als der der 80 Tage COL4A3 ++ / ITGA2 ++ Gruppe.

3.7 Computertomografie

Auf den mittels der Computertomografie erfassten Bildern lassen sich, sowohl in der Übersicht, als auch in der dreidimensionalen Rekonstruktion, Veränderungen der Nieren der Doppelknockoutmaus in Bezug auf die Organgröße und -struktur erkennen. In vergleichbaren Projektionen kann die rechte Niere mit 5,6 mm Breite und 9,4 mm Länge gegenüber 6,2 mm Breite und 11,2 mm Länge bei der Kontrollmaus gemessen werden (Abb. 3. 23 **A, D**). Auf der linken Seite stehen 5,2 mm Breite und 10,6 mm Länge der 6,7 mm breiten und 12,4 mm langen Kontrollniere entgegen (Abb. 3.23 **B, E**). Des Weiteren lässt sich bei der Wildtypmaus das Gesamtvolumen der linken Niere mit 0,241 cm^3 bestimmen (Abb. 3.23 **C**). Beim COL4A3 - -/ ITGA2 - - Tier ergibt sich ein Wert von 0,215 cm^3 (Abb. 3.23 **F**). Die Größen- und Volumenwerte der Nieren weisen so auf beidseits leicht verkleinerte Nieren der Doppelknockoutmaus gegenüber der Kontrolle hin. Anatomisch kommen die Nieren an korrekter Position ohne auffallende Fehlbildungen zur Darstellung. Bei genauerer Betrachtung erscheinen sie

bei der Doppelknockoutmaus an den Polen leicht abgerundet und in ihrer Feinstruktur unregelmäßiger als bei der Wildtypkontrolle. Eine Mark- Rinden- Differenzierung ist mit Hilfe der Bilder orientierend möglich, mit annähernd normaler Aufteilung der Anteile. Eine weiterführende Beurteilung der Organe ist anhand der Aufnahme nicht möglich. Bezüglich des grundlegenden skelettalen Baus der Tiere lassen sich keine Unterschiede erkennen. Entsprechend zeigen sie in ihrer Körpergröße und -form keine wesentlichen Abweichungen voneinander.

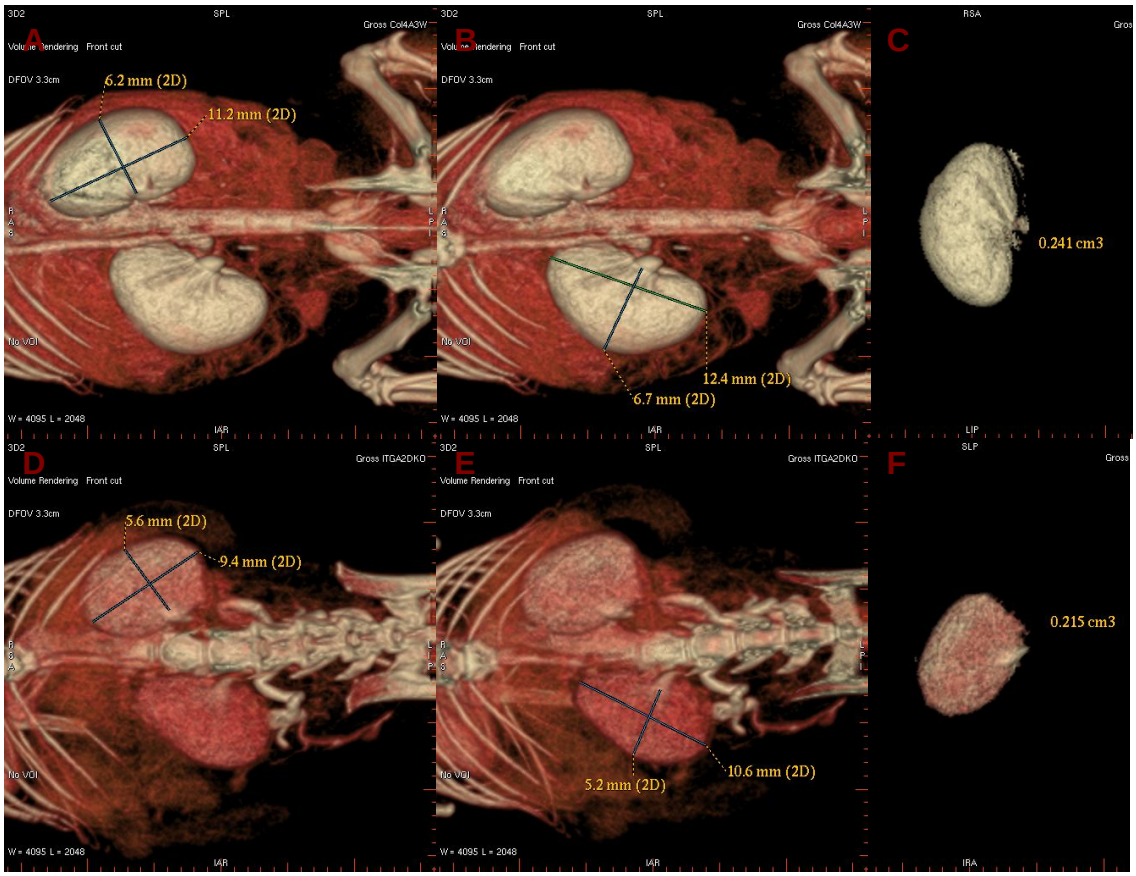


Abb. 3.23 Flächendetektorbasierte Volumen- Computertomografie bei einer Wildtypkontrolle (obere Reihe, **A – C**) und einer Doppelknockoutmaus (untere Reihe, **D – F**): Bestimmung der maximalen Länge und Breite der rechten (**A, D**) bzw. linken (**B, E**) Niere, sowie des Gesamtvolumens (**C, F**) **A, B, D, E:** Transversalschnitte, Ansicht von dorsal. Wirbelsäule zur besseren Übersicht grafisch entfernt **C und F:** isolierte Darstellung der linken Niere

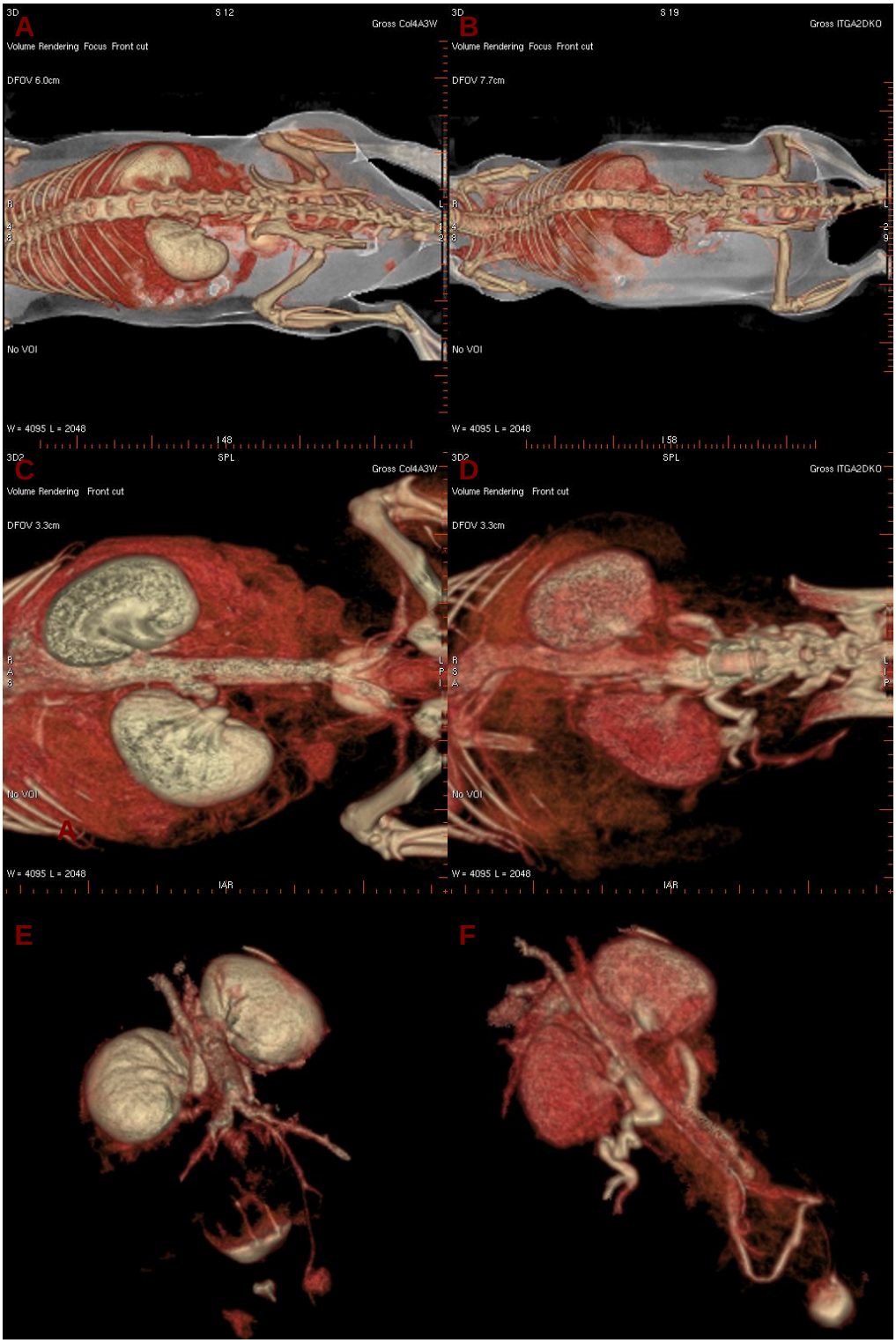


Abb. 3.24 Flächendetektorbasierte Volumen- Computertomografie bei einer Wildtypkontrolle (linke Spalte, **A, C, E**) und einer Doppelknockoutmaus (rechte Spalte, **B, D, F**). **A und B:** Übersicht über die Position und Struktur der Nieren, sowie vergleichende Darstellung des Körperbaus (Transversalschnitt, Ansicht von dorsal) **C und D:** Transversalschnitt auf Höhe des Ureterabgangs mit Nierenbecken und erkennbarer Mark- Rinden- Struktur (Ansicht von dorsal, Wirbelsäule zur besseren Übersicht grafisch entfernt) **E und F:** Isolierte Darstellung von Nieren und Harnblase, sowie der thorakalen Aorta und den sie begleitenden anatomischen Strukturen in diesem Bereich (Ansicht von kaudal und dorsal)

4 Diskussion

Chronische Nierenerkrankungen, die mit Proteinurie einhergehen, führen aus den verschiedensten Ursachen in einem Circulus vitiosus aus veränderter Wahrnehmung der extrazellulären Strukturen und der folgenden kompensatorisch gesteigerten Synthese und Sekretion der Matrixbestandteile, mit wiederum veränderter Wahrnehmung, zu einer progredienten renalen Fibrose (Remuzzi und Bertani 1998). Insbesondere hereditäre Erkrankungen, die mit einer veränderten Struktur des maßgeblich in den Basalmembranen der Niere vorhandenen Kollagen IV (Hudson et al. 1993, Timpl et al. 1981) einhergehen, wie das Goodpasture- Syndrom (Kluth und Rees 1999), das Alport- Syndrom (Hudson et al. 2003) oder auch die, vermutlich stark genetisch verankerte diabetische Nephropathie (Dronavalli et al. 2008) initiieren den Fibrosekreislauf. Dazu tragen die gesteigerte Durchlässigkeit des glomerulären Filters für Proteine und die von den Podozyten registrierte veränderte extrazelluläre Matrixstruktur bei (Shankland 2006). Klinisch entwickelt sich eine zunehmende Funktionseinschränkung, die bis zur terminalen Niereninsuffizienz fortschreitet. Ein Hauptziel bei der Erforschung von Nierenerkrankungen, die durch Kollagen- IV- Veränderungen bedingt sind, ist die Charakterisierung von Rezeptoren, die an der Vermittlung von Signalen zwischen der extrazellulären Matrix und den Zellen relevant beteiligt sind, sowie die detaillierte Entschlüsselung ihrer Signalwege.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Integrin α2β1 hat einen profibrotischen Einfluss bei der Vermittlung veränderter extrazellulärer Matrixsignale.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Integrin α2β1 als einer möglichen Schnittstelle über die Signalprozesse, die zur renalen Fibrose führen, vermittelt werden. Anhand des Alport- Mausmodells wird gezeigt, dass die fehlende Expression des Rezeptors den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst. Theoretische Grundlage ist die Tatsache, dass in Basalmembranen, denen die α3- Kette des Kollagen Typ IV fehlt, das embryonale α1α2- Netzwerk persistiert. Dieses ist

gegenüber dem adulten α3α4- Netzwerk anfälliger bezüglich proteolytischer Degradierungen (Gunwar et al. 1998). Veränderungen in der Zusammensetzung der GBM können von Podozyten registriert und mit verstärkter Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile beantwortet werden (Shankland 2006). Aus der Summe der induzierten Veränderungen entwickeln die Betroffenen im Verlauf das Vollbild des Alport- Syndroms. Bereits 1996 konnte von Cosgrove et al. ein Mausmodell für die autosomal- rezessive Form der Erkrankung etabliert werden. Ebenfalls untersucht sind die Eigenschaften von Mäusen, die aufgrund eines Knockouts im Gen für ITGA2 keinen Integrin- α2β1- Rezeptor exprimieren (Chen et al. 2002, Holtkötter et al. 2002). Die Kombination der Modelle unter Generierung von COL4A3 / ITGA2- Doppelknockoutmäusen erzeugt Individuen mit verzögerter Progression der Erkrankung bei Verbesserung aller untersuchten Parameter im Vergleich zu rezeptorpositiven Tieren. Unter der Voraussetzung einer ansonsten identischen genetischen Ausstattung mit Etablierung des Modells über Generationen in einem reinen C57BL/6- Hintergrund, bei Ausschluss der Einwirkung mutagener Umweltfaktoren über den gesamten Untersuchungszeitraum und identischen Lebensbedingungen sind die Unterschiede demzufolge auf die fehlende Integrinexpression zurückzuführen. Das Vorhandensein von Integrin α2β1 verschlechtert im Umkehrschluss den Krankheitsverlauf und wirkt profibrotisch bei Mäusen mit COL4A3- Defizienz.

Integrin- α2β1- defiziente Alportmäuse zeigen ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben gegenüber rezeptorpositiven Tieren

Histologische und laborchemische Parameter können anhand ihrer Entwicklung Anhaltspunkte für einen Krankheitsverlauf geben. Die Korrektur der von der Norm abweichenden Werte hat nur eine Bedeutung, wenn der Krankheitsprogress dadurch insgesamt auch positiv beeinflusst werden kann und den Erkrankten ein Zuwachs an Lebensqualität und/oder -zeit resultiert. Das Gesamtüberleben der Individuen in den Gruppen ist somit ein bestimmender Faktor um eine Aussage über den Erfolg einer bestimmten therapeutischen Beeinflussung zu treffen. Im Vergleich zu heterozygot rezeptornegativen Alporttieren (COL4A3 -- / ITGA2 +-) weisen die Doppelknockouttiere im Mittel eine um mehr als 8 % gesteigerte Überlebensrate auf. Gegenüber der homozygoten Alportgruppe

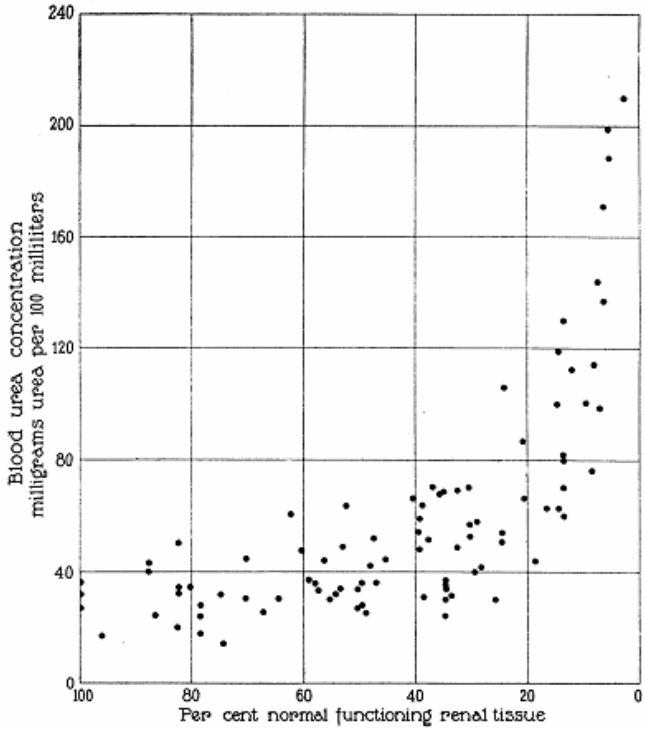
(COL4A3 -- / ITGA2 ++) wächst der Unterschied bis auf rund 24 %, was einem Zeitraum von 40 Tagen entspricht. Die ablaufenden Veränderungen in der Wahrnehmung der GBM bzw. in den dadurch induzierten Signalkaskaden bei Fehlen des Integrin- α2β1- Rezeptors sind also in der Lage die zellulären Prozesse soweit zu beeinflussen, dass ohne zusätzliche Therapien bereits ein deutlicher Gewinn an Lebenszeit resultiert. Der Rezeptor kann damit als für die Signalvermittlung relevant eingestuft werden.

Die Serumharnstoffkonzentration der rezeptorpositiven Alporttiere ist, im fortgeschrittenen Alter, signifikant gegenüber der der Doppelknockoutmäuse gesteigert

Durch die Analyse der Serumharnstoffkonzentrationen in den Versuchsgruppen kann ausgehend von noch geringen Unterschieden zum Zeitpunkt 100 Tage die Entwicklung deutlicher Differenzen bis zum Endmesspunkt im Alter von 150 Tagen gezeigt werden. Ein geringer Anstieg der Werte ist auch bei den untersuchten Individuen der Kontrollgruppe nachweisbar und kann daher einem in gewissem Maß altersabhängigen Prozess zugeordnet werden. Die Steigerung der rezeptorpositiven Alporttiere auf durchschnittlich rund 375 mg/dl lässt jedoch auf eine drastische Veränderung weit außerhalb physiologischer Toleranzen schließen. Ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Serumharnstoffkonzentration und der Nierenfunktion konnte bereits 1927 durch MacKay und MacKay beschrieben werden. Die Harnstoffwerte im Blut steigen ihren Beobachtungen zufolge langsam mit dem Verlust an funktionalem Nierengewebe an (Abb. 4.1). Erst ab einem Anteil funktionierenden Nierengewebes von unter 50 % kann ein überproportional steiler Anstieg der Serumharnstoffkonzentration beobachtet werden, wobei das Ausmaß der Schädigung auch in den oberen Bereichen weiterhin mit der Höhe des Wertes korreliert. Die Referenzwerte der Serumharnstoffkonzentrationen für C57BL6- Mäuse variieren in der Literatur. Neuere Daten ergeben Mittelwerte von 47,53 (n=15, SD 10,03, Referenzintervall 47,97-53,09 mg/dl, Almeida et al. 2008) bzw. 47,4 mg/dl (n=28, SD 20,4 mg/dl, Zur 2005) für männliche Tiere und 52,4 mg/dl (n=30, SD 10,4 mg/dl, Zur 2005) für weibliche Individuen. Es kann entsprechend ab Serumharnstoffwerten von rund 53 mg/dl ein pathologischer Bereich definiert werden, in dem von einer Ein-

schränkung der exkretorischen Nierenfunktion aufgrund des Verlustes von mehr als der Hälfte des funktionalen Nierengewebes ausgegangen werden muss.

A



B

Number of observations	Functioning renal tissue		Blood urea concentration—mean for class
	Limits of class	Mean for class	
	per cent normal	*per cent normal*	*mgm. per 100 cc. blood*
4	90–100	99	27
9	80–90	83	35
7	70–80	74	29
4	60–70	63	38
14	50–60	54	36
8	40–50	46	51
18	30–40	35	50
13	20–30	24	55
12	10–20	14	95
11	0–10	6	179

Abb. 4.1 Abhängigkeit der Höhe der gemessenen Blutharnstoffkonzentration vom Prozentsatz an normal funktionierendem Nierengewebe. Darstellung als Grafik **A** und Wertetabelle **B** (MacKay und MacKay 1927 S. 130, 132)

Die Kontrollgruppe liegt in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen erwartungsgemäß auch zum Zeitpunkt 150 Tage im Normbereich. Die Doppelknockouttiere überschreiten diesen in fortgeschrittenem Alter. Die Progression des renalen Funktionsverlustes kann über die Ausschaltung des Integrin-α2β1- Rezeptors nicht soweit beeinflusst werden, dass die Werte im physiologischen Segment gehalten werden können. Auch die heterozygot rezeptornegativen Alporttiere erreichen Werte weit außerhalb des definierten Referenzni-

veaus. Gegenüber homozygot rezeptornegativen Alporttieren ergibt sich im Alter von 150 Tagen eine Steigerung des Serumharnstoffwerts auf 391 %, gegenüber der Kontrollgruppe sogar auf 783 %. Unter der Voraussetzung der Korrelation zwischen der Harnstoffkonzentration und dem Grad der Nierenschädigung kann somit bereits laborchemisch eine deutlich stärkere Einbuße an funktionalem Nierengewebe nachgewiesen werden, die bei ansonsten gleicher genetischer Ausstattung und nach Ausschluss anderer, den Serumharnstoffwert relevant beeinflussender, Faktoren Integrin- α2β1- vermittelt ist.

Die immunhistochemische Aufarbeitung zeigt deutlich weniger Fibrose sowohl der Glomeruli als auch des Interstitiums bei den Doppelknockouttieren im Vergleich zu rezeptorpositiven Alporttieren

Neben Kollagen Typ IV als Hauptbestandteil von Basalmembranen kommt als häufigstes nichtkollagenes Protein Laminin vor. Es handelt sich ebenfalls um ein Heterotrimer, gebildet aus je einer α-, einer β- und einer γ- Kette. Die verschiedenen Lamininisoformen sind gewebespezifisch verteilt (LeBleu et al. 2007). Die reife GBM gesunder Individuen enthält ausschließlich Laminin 11, das sich aus α5, β2 und γ1 zusammensetzt (Miner 1998). Sowohl in Tiermodellen von Mäusen und Hunden als auch bei ultrastrukturellen Untersuchungen am Menschen konnten beim Alport- Syndrom ektope Depositionen von Lamininketten nachgewiesen werden. Immunhistochemisch lassen sich α1-, α2- und β1-Ketten in der GBM darstellen (Kashtan et al. 2001), die sonst dort normalerweise nur in frühen Entwicklungsstadien der Niere zu finden sind (Miner 1998). Reife Glomeruli gesunder Individuen enthalten die aus diesen Bestandteilen zusammengesetzten Heterotrimere Laminin 1 (α1 β1 γ1) beziehungsweise Laminin 2 (α2 β1 γ1) nur im Mesangium (Kashtan et al. 2001). Quelle der Ketten sind sowohl für die Laminin 11 Isoform als auch für das beim Alport- Syndrom pathologisch reexprimierte Laminin 1 endotheliale Zellen und Podozyten (St. John und Abrahamson 2001). Quantitative Analysen bezüglich deren Verteilung zeigen eine signifikant erhöhte Ansammlung von α1- Ketten insbesondere in den typischen GBM- Verdickungen. Ebenso findet sich für die Laminin- α5- Kette, neben einer stark vermehrten Gesamtkonzentration als Resultat der gesteigerten Transkription des LAMA5- Gens, eine spezifische Akkumulation in die-

sen GBM- Abschnitten. Als Konsequenz der atypischen Expression von Laminin α1 und α5 kann in den Bereichen verstärkter Ablagerungen dieser Proteine eine Permeabilitätszunahme der GBM für hochmolekulare Stoffe nachgewiesen werden (Abrahamson et al. 2007). Der für die Progredienz vieler chronischer Nierenerkrankungen essentielle Mechanismus der gesteigerten Membrandurchlässigkeit ist beim Alport- Syndrom demzufolge auch Laminin- vermittelt.
Auch in der vorliegenden Arbeit kann durch die immunhistochemische Anfärbung mit einem Antikörper gegen Laminin 1 (α1 β1 γ1) bei den Alportindividuen die typische Vermehrung der irregulären Ketten nachgewiesen werden. Auffallend ist dabei die stark gesteigerte Expression bei allen Gruppen die gleichzeitig den ITGA2- Rezeptor homo- oder heterozygot exprimieren. Während Individuen ohne COL4A3- Mangel erwartungsgemäß die besten Bewertungen in der Doppelblindbeurteilung bekommen, ist in den Alportgruppen eine deutliche Verschlechterung mit zunehmender ITGA2- Expression erkennbar. Tiere mit homozygotem Rezeptorstatus (COL4A3 -- /ITGA2 ++) erreichen bereits mit 80 Tagen das schlechteste Ergebnis aller bewerteten Gruppen sowohl für die Glomeruli als auch für das Tubulointerstitium. Obwohl etwas besser eingeschätzt liegen die Individuen mit heterozygoter ITGA2- Expression (COL4A3 -- /ITGA2 +-) deutlich oberhalb der von der Doppelknockoutgruppe erreichten Werte. Es kann anhand der Immunfluoreszenzbilder gezeigt werden, dass der Integrinrezeptor α2β1 einen deutlichen Einfluss auf die Expression der atypischen Lamininketten ausübt und somit auch auf der Ebene des Laminins positive Effekte zur Verlangsamung der Krankheitsprogression angenommen werden müssen.

Eine gesteigerte Proteinablagerung ist bei Alporttieren in fortgeschrittenem Alter schon mit Hilfe der HE- Übersichtsfärbung nachweisbar. ITGA2-defiziente Individuen zeigen hier gegenüber heterozygot rezeptorpositiven Tieren einen besseren Erhalt der renalen Gesamtstruktur und deutlich weniger extrazelluläre Matrixakkumulation.

Die Hämatoxylin- Eosin- Färbung ermöglicht aufgrund der überwiegend negativen Ladungen des Eosins, die typischerweise an positive geladene Proteingruppen binden, neben einer guten Darstellung der renalen Gesamtstruktur auch die Anfärbung von Proteinakkumulationen. Auf diese Weise kann bei Al-

porttieren in fortgeschrittenem Alter eine zu erwartende Zunahme der Proteinablagerungen im Vergleich zu gesunden Individuen nachgewiesen werden. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich jedoch hinsichtlich des Einflusses des Integrin-α2β1- Rezeptors. Während homozygot rezeptornegative Mäuse im Alter von 100 Tagen eine leichte Zunahme der Eosinophilie feststellen lassen, sind die Veränderungen bei den heterozygot Rezeptornegativen am stärksten. Es kommen flächenhaft stark eosinophil gefärbte Bereiche zur Darstellung, in denen keine normale Parenchymstruktur erkennbar ist. Weiterhin fallen bereits an vielen Stellen Proteinakkumulationen auf, die in den anderen Gruppen nicht in dieser Form zu finden sind. Zum Zeitpunkt 150 Tage ist nahezu keine normale Nierenstruktur mehr erhalten. Es finden sich zerstörte Glomeruli in stark komprimierter fibrotischer Form oder regressiv und höhlenartig verändert. Auch eine normale Tubulusanordnung und -struktur ist nicht mehr erkennbar. Im Interstitium imponieren große Narben, die mit anderen renalen Strukturen dicht verbacken sind. Aufgrund der Ergebnisse der HE- Übersichtsfärbung, mit deutlichen Unterschieden in den Gruppen bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt, muss ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des α2β1- Integrins und einer verstärkten Störung der Funktion des glomerulären Filters mit der Ablagerung von Proteinen vermutet werden. Das Auftreten glomerulärer und tubulointerstitieller Fibrose ist bei Abwesenheit des Rezeptors beim Alport- Syndrom deutlich verringert. Der gesteigerte Fibrosegrad ergibt sich als direkte Folge der insuffizienten Filterfunktion über eine gesteigerte glomeruläre Proteinpassage mit folgender Initiierung der renalen Fibrosekaskade (siehe Kapitel 1.2.5).

Die gemessene Proteinurie ist in ihren Durchschnitts- und Maximalwerten bei den rezeptornegativen Alporttieren geringer als bei den rezeptorpositiven Individuen. Die Verschiebung der Proteinausscheidung in hochmolekulare Bereiche findet bei fehlendem Integrin α2β1 später statt.

Eine Proteinurie ist bei Nierenerkrankungen ein Schlüsselereignis für die Initiierung und Aufrechterhaltung fibrotischer Prozesse. Insbesondere die Hochregulierung von TGF- β1 durch Podozyten als Reaktion auf eine exzessive intraglomeruläre Proteinpassage ist als wichtiger Pathomechanismus etabliert (Abbate et al. 2002). TGF- β1 verfügt über das Potenzial zur Beeinflussung verschiede-

ner Gene, in deren Folge renale Strukturen umgewandelt und bis zur Fibrose geschädigt werden können. Im sensiblen Gefüge der renalen Filtrationsbarriere entstehen so Veränderungen in der GBM und den Zellen, was wiederum den Durchtritt von hochmolekularen Stoffen begünstigt, so dass sich der Kreislauf letztendlich selbst unterhält und verstärkt (Shankland 2006). Der Nachweis von Proteinen im Urin kann somit als wichtiger Gradmesser für den Krankheitsverlauf dienen und indirekt Aufschlüsse über den Zustand des glomerulären Filters liefern. Eine Zunahme der Proteinausscheidung kann in allen Gruppen mit steigendem Alter festgestellt werden. Die Veränderungen sind also in gewissen Grenzen einem physiologischen Alterungsprozess geschuldet. Abgesehen davon kann jedoch zu allen Zeitpunkten eine zusätzlich gesteigerte Proteinausscheidung der Alporttiere gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden (Tab. 4.1). Die genetisch bedingten strukturellen GBM- Veränderungen, die beim Alport- Syndrom eine Proteinurie begünstigen, können somit allein durch das Fehlen des Integrins α2β1 nicht vollständig ausgeglichen werden. Jedoch lassen sich innerhalb der integrinrezeptorpositiven und -negativen Alportgruppe deutliche Unterschiede feststellen. Während die Doppelknockoutgruppe mäßig erhöhte Proteinspiegel im Urin aufweist und erst in fortgeschrittenem Alter stärkere Anstiege zeigt, erreichen die heterozygot integrinpositiven Alporttiere schon zu einem frühen Zeitpunkt nahezu eine Verdopplung der in der Kontrollgruppe gemessenen Werte. Die Schwankungsbreite ist im Vergleich zu den anderen Gruppen wesentlich reduziert. Auffallend in dieser Gruppe ist weiterhin die vorherrschend hochmolekulare Proteinurie bereits im Alter von 100 Tagen, die abgesehen von der Menge der ausgeschiedenen Eiweiße unterstützend auf die Schwere der glomerulären Schrankenstörung hinweist. Eine klare Verschiebung in der hochmolekularen Bereich findet bei COL4A3 -- / ITGA2 -- Individuen erst später statt. In fortgeschrittenem Alter findet sich die stärkste Annäherung der Werte, wobei die Doppelknockoutgruppe auch zum Zeitpunkt 150 Tage noch deutlich geringere Proteinkonzentrationen ausscheidet. Die Unterschiede der Auswirkungen des Vorhandenseins des Integrin- α2β1- Rezeptors beim Alport- Syndrom können sowohl bei der Analyse der Durchschnittswerte als auch beim Vergleich der Maximalwerte übereinstimmend belegt werden (Tab. 4.1). COL4A3 --/ ITGA2-- Tiere profitieren also, gemessen an der Proteinurie als Indikator des Krankheitsverlaufs, von der Abwesenheit des Rezeptors. Die Progression der einhergehenden Proteinausscheidung ist deutlich verzögert.

	100 Tage COL4A3 -- ITGA2 --	100 Tage COL4A3-- ITGA2 +-	150 Tage COL4A3-- ITGA2 --	150 Tage COL4A3-- ITGA2 +-
Mean hochmolekular	+ 35 %	+ 116 %	+ 56 %	+ 67 %
Mean Albumin	+ 47 %	+ 85 %	+ 54 %	+ 79 %
Mean Prealbumin	+ 42 %	+ 73 %	+ 33 %	+ 66 %
Mean Gesamt	**+ 41 %**	**+ 91 %**	**+ 48 %**	**+ 71 %**
Max Hochmolekular	+ 22 %	+ 77 %	+ 20 %	+ 45 %
Max Albumin	+ 38 %	+ 83 %	+ 42 %	+ 67 %
Max Prealbumin	+ 26 %	+ 48 %	+ 25 %	+ 42 %
Max Gesamt	**+ 28 %**	**+ 69 %**	**+ 28 %**	**+ 51 %**

Tab. 4.1 Zuwachs der Proteinurie gegenüber der Kontrollgruppe in %. Mean entspricht der Auswertung der durchschnittlich in den einzelnen Bereichen gemessenen Proteinmenge, Max der Maximalwerte

Die computertomografische Darstellung zeigt bei den Doppelknockouttieren im Alter von 150 Tagen lediglich geringgradige Abweichungen der Nierenmorphologie im Vergleich zum Wildtyp.

Für die Einschätzung der Folgen einer Genausschaltung stehen neben der Analyse der feingeweblichen und funktionellen Auswirkungen, die Aufschluss auf eine nähere Funktion des betreffenden Gens bzw. seiner Produkte liefern können, auch Fragen über eventuelle morphologische Abweichungen im Vordergrund. Auf den computertomografischen Schnittbildern der Doppelknockouttiere lassen sich keine grundlegenden Unterschiede bezüglich des skelettalen Baus gegenüber den Wildtypkontrollen erkennen. In der Folge finden sich in Körpergröße und -form keine wesentlichen Abweichungen. Die Ergebnisse stimmen dementsprechend mit denen anderer Studien überein, die ebenfalls keine relevante Phänotypveränderung in ITGA2- Knockoutmäusen feststellen konnten (Chen et al. 2002, Holtkötter et al. 2002). Im Hinblick auf die Nieren lässt sich eine anatomisch korrekte Position ohne auffallende Fehlbildungen

feststellen. Die Größen- und Volumenwerte weisen auf beidseits leicht verkleinerte Nieren der Doppelknockoutmaus hin, die an den Polen etwas abgerundet und in ihrer Feinstruktur etwas unregelmäßiger wirken. Insgesamt erscheinen die gefundenen Veränderungen aber eher dezent, ohne Hinweis auf eine massive Organzerstörung, was den positiven Einfluss der Abwesenheit des α2β1-Integrins auf den Krankheitsverlauf des Alport- Syndroms im Mausmodell weiter unterstreicht. Da aus Veränderungen der Integrinausstattung eines Individuums weit reichende Effekte in Wachstums-, Migrations- und Differenzierungsprozessen der Zellen resultieren können, ist eine Beteiligung in der Karzinogenese und Ausbreitung von Tumoren vorstellbar. Für α2β1 konnte bereits eine Rolle in der Ausbreitung des hepatozellulären Karzinoms belegt werden (Yang et al. 2003). Ebenso sind Zusammenhänge für die Interaktion verschiedener maligner Pankraszelllinien (Grzesiak und Bouvet 2007) mit ihrer Umgebung und für das Kolonkarzinom (Sawhney et al. 2006, Orian- Rousseau et al. 1998) bekannt. Das Vorhandensein von Integrin α2β1 hat in diesen Studien eher prokanzerogene Effekte gezeigt. Im Umkehrschluss sollte das Fehlen des Rezeptors günstig wirken. Auf den in der Arbeit angefertigten Computertomografiebildern lassen sich keine tumorverdächtigen Strukturen erkennen. Allerdings ist aufgrund der Aufnahmetechnik mit Fokussierung auf das Urogenitalsystem die detaillierte Beurteilung anderer Organe stark eingeschränkt, so dass nur das Vorhandensein großer solider Tumore weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

4.2 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext vorhandener Erkenntnisse

Die zentrale Rolle in der Registrierung und Vermittlung pathologischer Prozesse nehmen die Podozyten ein. Als Reaktion auf die abnorm gesteigerte intraglomeruläre Proteinpassage, z.B. infolge der alporttypischen GBM- Veränderungen, schütten sie vermehrt TGF- β1 aus (Abbate et al. 2002). Dessen entscheidende Rolle bei der Progression der Alportnephropathie ist bereits lange bekannt. TGF- β1 induziert in Podozyten Gene, die für die Produktion der extrazellulären Matrixkomponenten verantwortlich sind und trägt so zur veränderten GBM- Zusammensetzung bei. Möglich ist dabei sowohl eine direkte Wirkung auf die Zellen, als auch eine Indirekte. Hier ist zum Beispiel die Induktion der

Expression verschiedener Rezeptoren von Bedeutung, die dann mit der pathologischen GBM interagieren und ihrerseits Matrixgene aktivieren (Sayers et al. 1999). Ein solcher Effekt konnte bereits nachgewiesen werden. Zum einen ist TGF- β1 in der Lage die Rezeptorsynthese zu steigern. Hierbei spielen sowohl erhöhte Spiegel der Rezeptor mRNS als auch ein schnellerer Rezeptorzusammenbau eine Rolle. Zum anderen findet sich eine gesteigerte Zahl der Rezeptoren auf den Zellen (Ignotz und Massagué 1987). Auch die Produktion der α2- und β1- Integrinuntereinheiten, sowie deren Zusammenlagerung und die Anzahl fertiger Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann unter TGF- β1- Einfluss gesteigert werden (Heino et al. 1989). In allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erwies sich das hetero- oder homozygote Vorhandensein des Integrins α2β1 als nachteilig für die Alporttiere. Individuen, denen unter der Erkrankung der Rezeptor fehlt, weisen deutlich bessere histologische und laborchemische Parameter, sowie ein gesteigertes Gesamtüberleben auf. Eine denkbare Ursache könnte in eben dieser fehlenden Möglichkeit der Steigerung der Rezeptorexpression unter TGF- β1- Stimulation im Rahmen des proteinurischen Status begründet sein. Voraussetzung wäre dafür eine ausreichende Rolle des Integrins α2β1 zum Beispiel in der direkten Erkennung einer intakten bzw. gerade einer atypischen GBM und/oder als Vermittler von Signalkaskaden, die zur Fibroseentstehung beitragen können. Da ein Fehlen des Rezeptors offensichtlich eine Verlangsamung der Krankheitsprogression bewirken kann, muss von einem solchen Einfluss auf pathogenetisch entscheidende Prozesse ausgegangen werden. Eine Betrachtung der Vielzahl an Verknüpfungen des Integrins zu Systemen der Zelle die unter anderem Wachstums- und Differenzierungsprozesse steuern, stützt die Wahrscheinlichkeit umfassender Einflussmöglichkeiten bei Expression des Rezeptors weiter.

Ein neuerer Ansatz die Veränderungen über die proteinurische Nierenkrankheiten zur renalen Fibrose weiterführend zu erklären, ist die Tatsache dass TGF-β1 auch in der Lage zu sein scheint einen epithelial mesenchymalen Übergang (EMT) in Podozyten auszulösen (Li et al. 2008). Diese Form der Umwandlung des Phänotyps der Zellen und damit auch ihrer Morphologie und Funktion ist für die Tubulusepithelzellen der Niere schon länger nachgewiesen (Zeisberg et al. 2001). Es entstehen Zellarten mit hoher Potenz für die Produktion von extrazellulären Matrixbestandteilen und fibrotischen Komponenten, die ihre eigentliche Funktion verlieren und damit noch weiter zur Dysfunktion eines Gewebes bei-

tragen (Li et al. 2008). Mit dieser Verschiebung des histologischen Typs der Podozyten zu ihrem embryonalen Ursprungsgewebe hin wäre eine Veränderung in der Expression bestimmter Enzyme denkbar. Mit MMP 12 (Metalloelastase) konnte in Alportpodozyten eine atypische Protease gefunden werden. Eine Expression des Enzyms war bis dahin ausschließlich in Makrophagen, hypertrophen Osteoklasten, glatten Muskelzellen der Gefäße und einigen Tumorzellen bekannt. Die atypisch erhöhte Expression in Podozyten kann potentiell zur proteolytischen Degradierung der GBM beitragen und so die Entstehung der alporttypischen GBM- Verdickungen und Aufsplitterungen mindestens teilweise bedingen (Rao et al. 2006). Auffallend ist, dass alle Zellarten die MMP 12 regulär exprimieren mesenchymale Zellen sind. Pathophysiologisch könnte eine ***m****onocyte* ***c****hemoattractive* ***p****rotein 1* (MCP 1)- vermittelte Aktivierung des CCR2- Rezeptors der Podozyten der MMP 12- Induktion zu Grunde liegen. Diese Form der Aktivierung ist so zuvor nur in Makrophagen beschrieben (Rao et al. 2006). Der Erwerb atypischer Zelleigenschaften mit der Produktion von eigentlich mesenchymalen Zellen vorbehaltenen Enzymen stützt die Theorie einer EMT der Podozyten weiter. Die potentielle Bedeutung des Integrins α2β1 im Kontext einer möglichen Podozyten- EMT ist bisher noch unzureichend geklärt. Bei humanen Pankreaszellen ist ein Zusammenhang dagegen bereits nachgewiesen (Shintani et al. 2008). Im Verlauf einer EMT kommt es oft zur gesteigerten Expression von N- Cadherin (Lee et al. 2006). Für die Initiierung der dafür notwendigen Signalkaskade sind die Kollagenrezeptoren Integrin α2β1 und DDR 1 essentiell (Shintani et al. 2008) und spielen damit eine entscheidende Schlüsselrolle für den Wechsel der Phänotyppriorität in diesen Zellen. Die in dieser Arbeit insbesondere in den histologischen Verfahren gefundene starke glomeruläre Fibrose bei Alporttieren die Integrin α2β1 exprimieren steht einem pathophysiologischen Erklärungsmodell unter Einbeziehung der Möglichkeit einer gegebenenfalls sogar Integrinrezeptor- vermittelten EMT der Podozyten nicht entgegen. Inwieweit eine mögliche TGF- β1- getriggerte Steigerung der Expression des Integrin- α2β1- Rezeptors eine solche Podozyten- EMT beeinflusst oder vermittelt und welchen Stellenwert eine derartige Transformation in der Pathogenese des Alport- Syndroms hat, muss zunächst Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben.

Ob im Rahmen einer EMT oder als eigenständiger Prozess im Rahmen der Pathogenese, belegt ist, dass beim Alport- Syndrom Veränderungen im MMP- Mu-

ster der Zellen auftreten und dass diese durch die Expression von Integrinrezeptoren beeinflusst werden können. Neben einer gesteigerten Expression von MMP 12 (Rao et al. 2006) lassen sich auch erhöhte Konzentrationen von MMP 9 (Cosgrove et al. 2008), sowie bei Mäusen im C57BL/6- Hintergrund auch von MMP 2 (Zeisberg et al. 2006) in Alportglomeruli feststellen. Am Alport- Integrin-α1β1- knockout- Mausmodell wurde des Weiteren eine MMP 14- Erhöhung gemessen. Mithilfe einer Western- Blot- Analyse konnte bei Integrin- α1- defizienten Tieren im Gegensatz zu Tieren, die das entsprechende Gen exprimieren eine Aktivierung sowohl im p38- als auch im ERK 1/2- Zweig des MAPK- Signalweges detektiert werden (Cosgrove et al. 2008), dem ein wichtiger Einfluss unter anderem bei der Induktion von Genen die für die Proliferation von Zellen verantwortlich sind zugeschrieben wird (Berman et al. 2003, Juliano 2002). Das Vorhandensein von Integrinen kann also mit einer veränderten MMP- Ausstattung der Zellen einhergehen. Auch die alporttypische, ansonsten aber in glomerulären Zellen atypische MMP 12- Expression, die mit der GBM- Schädigung in Verbindung steht (Rao et al. 2006), wird durch das Integrin α1β1 beeinflusst (Cosgrove et al. 2008). Der homozygote Verlust des Rezeptors führt bei Alportmäusen zu MMP 12- Spiegeln, die denen von Wildtypkontrollen vergleichbar sind (Cosgrove et al. 2008). Für die bei diesen Tieren verzögerte Krankheitsprogression mit histologisch weniger glomerulärer sowie tubulointerstitieller Matrixakkumulation und einer resultierend nahezu verdoppelten Gesamtüberlebensspanne (Cosgrove et al. 2000) könnte diese MMP 12- Veränderung ganz oder teilweise als Erklärung dienen. Es besteht über die MMP- Regulation somit ein möglicher Einfluss von Integrinen sowohl auf Mechanismen die die GBM-Destruktion fördern als auch auf solche, die die Progression hemmen können.
Es ist bekannt, dass Integrin α2β1 nicht nur ein Rezeptor für Kollagene, wie z.B. das Kollagen Typ IV der GBM, sondern auch für Laminin ist (Elices und Hemler 1989). In verschiedenen Tiermodellen und bei Untersuchungen am Menschen konnten beim Alport- Syndrom übereinstimmend Ablagerungen von atypischen Lamininketten gezeigt werden (Kashtan et al. 2001). Es handelt sich um Formen, die eigentlich nur in frühen Entwicklungsstadien der Niere (Miner 2005) bzw. in reifen Glomeruli ausschließlich im Mesangium zu finden sind (Kashtan et al. 2001). Resultat ist eine Permeabilitätszunahme der GBM für hochmolekulare Stoffe (Abrahamson et al. 2007). Die Lamininveränderungen der GBM spielen für die Pathogenese des Alport- Syndroms somit eine wichtige Rolle.

Durch Ausschaltung des Gens für das Integrin α1β1 kann eine verzögerte Progression des Alport- Syndroms bei Mäusen gezeigt werden. Neben einer Verlangsamung des Verlustes der physiologischen Ultrastruktur in der Niere fällt eine Verminderung der abnormalen Deposition von Laminin- α2- und β1- Ketten in der GBM auf. Dass Integrin α1β1 vorrangig auf mesangialen Zellen exprimiert ist, die ursprünglich nicht in unmittelbarem Kontakt mit der GBM stehen (Cosgrove et al. 2000), lässt Mediatoren vermuten, die Podozyten und Endothelzellen zur Reexpression von Laminin α2 und β1 stimulieren (St. John und Abrahamson 2001). Ähnlich wie für das Integrin α1β1 von Cosgrove et al. 2000 belegt, kann in dieser Arbeit eine Reduktion der atypischen Laminindeposition und eine positive Beeinflussung des gesamten Krankheitsverlaufes durch die Ausschaltung des Integrins α2β1 gezeigt werden. Die Möglichkeit des Rezeptors Kollagen und Laminin zu binden kann unter Umständen über mehrere Ansatzpunkte dazu beitragen die Progression der Alportnephropathie zu verlangsamen. Ein Modell wie atypische Lamininketten eine reguläre Wahrnehmung sowie Signaltransduktion von Integrinen beeinflussen können, ist für den α3β1-Rezeptor entworfen worden (Cosgrove et al. 2000). Das in der basalen Zytoplasmamembran von Podozyten lokalisierte Protein gilt als essentielles Bindeglied zwischen diesen Zellen und der GBM (Kreidberg et al. 1996). Da der Rezeptor spezifisch Laminin- α5- Ketten- enthaltende Heterotrimere bindet (Eble et al. 1998), könnten die fälschlicherweise abgelagerten α2- Lamininketten die essentielle Bindung dieser an die Podozyten maskieren und so den physiologischen Ablauf behindern (Cosgrove et al. 2000). Der α3β1- Rezeptor gilt als entscheidend für die Initialisierung einer geordneten GBM- Struktur bei der Entstehung der Niere, sowie deren Aufrechterhaltung. Das Fehlen von Integrin α3 führt zu weit reichenden Entwicklungsstörungen mit Desorganisation und Fragmentation der GBM und einer gestörten Ausbildung der Podozytenfußfortsätze. Infolge der insuffizienten Filtrationsbarriere resultiert eine schwere Proteinurie. Aufgrund dieser renalen und der ebenfalls schweren pulmonalen Veränderungen sind α3- defiziente Mäuse nicht über die Neonatalperiode hinaus überlebensfähig (Kreidberg et al. 1996). Am α3β1- Rezeptor ist bereits belegt, wie Integrin- vermittelte Signalkaskaden zur Beeinflussung komplexer Prozesse der Zellmorphologie und des Verhaltens von Zellen beitragen. Über die Regulation der Expression der Tyrosin- Phosphatase PTPμ in Podozyten werden wichtige interzelluläre Adhäsionsmechanismen initiiert, die das Vorhandensein eines ge-

ordneten Zellverbandes erst ermöglichen (Chattopadhyay et al. 2003). Auch auf dieser Ebene könnten fehlerhaft abgelagerte Lamininketten über Integrinrezeptoren wie α2β1 zur Störung eines sensiblen Mechanismus der Regulation von Genen zur interzellulären Kommunikation und letztendlich zum Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beitragen. Wie das Integrin die Signaltransduktionswege, die zur abnormalen Laminindeposition führen, beeinflusst bleibt zunächst unklar.

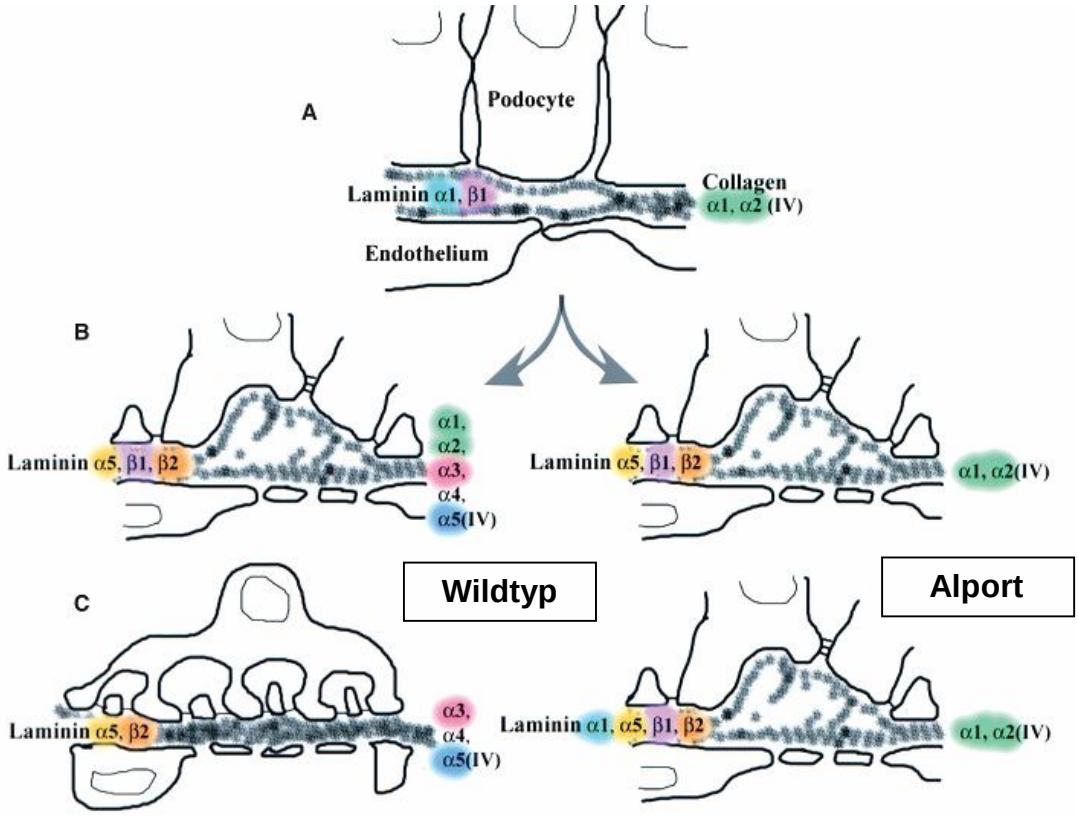


Abb. 4.2 Laminin- und Kollagenexpression in der GBM zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten in Wildtyp- und Alportmäusen **A** frühe Entwicklungsstufe **B** Stadium der Kapillarschlingenbildung **C** reifes Gewebe (Abrahamson et al. 2003 S. 832)

Auffallend ist, dass sowohl für Kollagen- als auch für Lamininnetzwerke die Umstellung von Formen der Heterotrimere, die ihren Platz in frühen Entwicklungsabschnitten haben, hin zu reifen Varianten gestört ist (Abb. 4.2). Sie tritt in beiden Fällen im Stadium der Bildung von glomerulären Kapillarschlingen auf (Miner 2005, Kashtan et al. 2001). Nicht zuletzt daher liegt die Vermutung nah, dass ein ähnlicher, wenn nicht sogar gemeinsamer, Interaktionsweg den Wechsel auf adulte GBM- Netzwerkproteine beeinflusst. Eine seit längerer Zeit diskutierte Theorie ist die der Induktion bestimmter Gene als zelluläre Antwort auf die

Wahrnehmung der durch das fehlende Kollagen- (IV)- α3α4α5- Netzwerk veränderten GBM. Als für diesen Mechanismus bedeutende oder sogar essentielle Zell- Matrix- Vermittler werden wiederum die Integrine angesehen (Cosgrove et al. 1996, Abrahamson et al. 2007).

Deutlich wird, dass die Veränderungen, die aus dem, dem Alport- Syndrom zugrunde liegenden, Gendefekt resultieren, viele Ebenen der Signalvermittlung umfassen. Um die Vielzahl der Abweichungen, die mit der Krankheit einhergehen, erklären und letztendlich positiv beeinflussen zu können, müssen komplexe Interaktionsmuster von Zellen und extrazellulären Matrixkomponenten, sowie verschiedenster Rezeptoren untereinander berücksichtigt werden. Für das Integrin α2β1 konnten beispielsweise bereits an mehreren Zellarten Beziehungen zum Kollagenrezeptor DDR 1 hergestellt werden (Shintani et al. 2008, Yeh et al. 2009). Dieser hat seinerseits ebenfalls nachgewiesenen Einfluss auf den Verlauf proteinurischer Nephropathien (Gross et al. 2004 b, Flamant et al. 2006). In der Niere sind als Folge von Veränderungen des Zusammenspiels der Rezeptoren Auswirkungen auf die Migration von Zellen und auf die Morphogenese von Tubuli bekannt (Wang et al. 2006, Yeh et al. 2009). Auch Integrin α1β1 ist wichtiger Kommunikationspartner für Integrin α2β1. Der Feststellung, dass beide Rezeptoren in epithelialen Zellen oft koexprimiert werden, führte zur detaillierten Analyse ihrer Wechselwirkungen. Als Resultat konnte gezeigt werden, dass die α2β1- vermittelte Zellfunktion und Signalübertragung durch α1β1 reguliert ist (Abair et al. 2008). Sofern in Abwesenheit von α1β1 keine normale Signalvermittlung der Zellen via Integrin α2β1 gewährleistet ist, stellt sich die Frage inwieweit die am Integrin- α1β1- Knockoutmodell gewonnenen Erkenntnisse bezüglich einer verlangsamten Krankheitsprogression des Alport- Syndroms (Cosgrove et al. 2000) tatsächlich Folge des α1β1- Ausfalls sind und ob nicht eher auch in diesem Modell die eingeschränkte α2β1- Funktion die Verbesserungen erklären kann. Zur Klärung sind weitere Analysen nötig, die insbesondere die Auswirkungen gestörter Kommunikationswege beider Integrine beim Alport- Syndrom in den Fokus der Untersuchungen stellen.

Die Tatsache, dass trotz der Identifikation einiger wichtiger Rezeptoren, Matrixbestandteile und Mediatoren beim Alport- Syndrom noch keine Therapieoption verfügbar ist um den Krankheitsverlauf zu stoppen oder sogar präventiv zu agieren zeigt, dass neben der Untersuchung einzelner Komponenten das Erkennen der Wechselwirkungen der verschiedenen Partner von essentieller Be-

deutung ist. Aus den für die jeweils einzeln untersuchten Bestandteile gewonnenen Ergebnissen muss so ein schlüssiges Gesamtkonzept entstehen um die Einflussmöglichkeiten auf den Krankheitsverlauf in Zukunft zu maximieren.

4.3 Bedeutung der Arbeit und Ausblick

Die Komplexität des Systems der Kommunikation der Zellen mit den Matrixkomponenten erfordert die Identifikation der Rezeptoren und im Folgenden die Entschlüsselung der Signalwege, sofern relevant. In den letzten Jahren konnten bereits einige solcher Rezeptoren gefunden und in ihrer Bedeutung klassifiziert werden. Insbesondere auch für die Gruppe der Integrine steigt der Zuwachs an Informationen über Art und Bedeutung ihrer vielschichtigen Interaktionen. Hinter den Bemühungen die Bedeutung verschiedener Kollagenrezeptoren der Niere und ihre Signalwege aufzudecken verbirgt sich die Hoffnung mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu eröffnen, um den betroffenen Patienten den genetisch programmierten Weg in die dialysepflichtige Niereninsuffizienz mit all ihren Einschränkungen der Lebensqualität und -dauer zu ersparen. Ferner könnte die Uniformität der Reaktion der Niere auf verschiedene Einflüsse mit der Endstrecke Kreislauf der Fibrose genutzt werden, um auch bei Patienten mit nichtgenetisch bedingten Erkrankungen im Krankheitsverlauf zu intervenieren bzw. idealerweise präventiv zu agieren. Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse kann Integrin α2β1 als ein wichtiger Bestandteil der Vermittlung von Signalen im Prozess der renalen Fibroseentstehung charakterisiert werden. Die Abwesenheit des Rezeptors verlangsamt histologisch und laborchemisch sichtbar die Progression des Funktionsverlustes der Nieren COL4A3- defizienter Individuen und führt in letzter und entscheidender Konsequenz zu einer Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit.

Besondere Bedeutung besitzen die am Alportmausmodell gewonnenen Erkenntnisse vor allem durch die Tatsache, dass eine gute Korrelation zum humanen Krankheitsbild besteht (Cosgrove et al. 1996). Die Übertragbarkeit therapeutischer Ansätze, die im Tiermodell einen positiven Einfluss gezeigt haben, ist potentiell hoch. Ein Beleg dafür sind beispielsweise die Untersuchungen zum Einfluss von Ramipril auf den Verlauf. Unter Therapie mit dem ACE- Hemmer finden sich erniedrigte TGF- β1- Spiegel im Vergleich zu Tieren mit gleichem

Genotyp, die das Medikament nicht erhalten haben. Die in der Folge verminderten Proteinmengen im Urin und die Reduktion der Deposition von Bestandteilen der extrazellulären Matrix führen insgesamt zu weniger interstitieller Fibrose und beeinflussen das Gesamtüberleben positiv (Gross et al. 2003). Aufgrund der am Mausmodell erkannten Vorteile konnte bereits kurze Zeit später die medikamentöse Behandlung mit Ramipril am Menschen etabliert werden (Gross et al. 2004 a). Für das humane Alport- Syndrom kann entsprechend ein positiver Einfluss der Abwesenheit des Integrins α2β1 auf den Verlauf vermutet werden. Allerdings wäre die Ausschaltung des ITGA2- Gens als Grundlage einer Intervention praktisch schwer durchführbar. Die Entdeckung von Proteinen wie Angiocidin (Sabherwal et al. 2006) oder niedermolekularen Inhibitoren mit spezifischen Ansatzpunkten am Integrin α2β1 (Miller et al. 2009) könnten hingegen bei Individuen mit vorhandenem ITGA2- Gen therapeutische Optionen darstellen, da sie die Signalübermittlung via α2β1 hemmen. Studien in diese Richtung beschäftigen sich derzeit vor allem mit der Auswirkung auf Tumorprogressionen (Sabherwal et al. 2006) und nutzbaren Effekten für eine antithrombotische Therapie (Miller et al. 2009). Das Ergebnis ob und wieweit Medikamente, die die α2β1- Funktion hemmen, auch als therapeutische Option für das Alport- Syndrom und gegebenenfalls auch für andere Nephropathien nutzbar sind bleibt zunächst noch offen. Abhängig sein wird die Nutzbarkeit unter anderem von der Frage ob Pharmaka Resultate erzielen können, wie sie durch die maximalen Funktionsblockade, also der fehlenden Expression des Rezeptors in Folge einer Knockoutmutation hervorgerufen werden. Des Weiteren bleibt abzuwarten, ob das Ausmaß der beim Menschen zu erreichenden Verbesserungen denen des Tiermodells entspricht und für den einzelnen Patienten tatsächlich ein Gewinn an Lebensqualität resultieren würde. Die deutliche Verbesserung aller untersuchten Parameter bei Integrin- α2β1- negativen Alporttieren gegenüber rezeptorpositiven begründet die Annahme einer Relevanz des Integrins in der Pathogenese der Erkrankung. Die Möglichkeit, dass im Vergleich zu Alporttieren mit vorhandenem Integrin α2β1 bessere Werte der Doppelknockouttiere zufällig bzw. aufgrund von Messfehlern entstanden sind, erscheint aufgrund der ausnahmslosen Übereinstimmung der Ergebnisse im zeitlichen Verlauf bei verschiedensten untersuchten Parametern mit stets deutlichen Unterschieden unwahrscheinlich.

Alle Erkenntnisse dieser Arbeit lassen einen positiven Nutzen des Integrin α2β1 vermuten und dienen damit als Grundlage weiterführender Analysen. Für eine noch umfassendere Aussage zur Rolle des Rezeptors sind Studien mit höheren Fallzahlen nötig, nicht zuletzt auch um eine bessere Differenzierung bezüglich der für COL4A3 homo- und heterozygoten Individuen in der Kontrollgruppe zu ermöglichen. So könnten auch eventuell bestehende dezente Unterschiede in der Auswirkung des Rezeptorverlustes aufgedeckt werden. Auch hinsichtlich der Entschlüsselung entscheidender Schritte in der Entstehung anderer fibrotischer Nierenerkrankungen ergibt sich eine wichtige Bedeutung weiterer Analysen. Im Kontext der sehr uniformen Reaktion der Niere auf verschiedene Ursachen, die letztendlich zur Proteinurie führen betrachtet, scheint es wahrscheinlich, dass die an einem bestimmten Krankheitsmodell gewonnenen Erkenntnisse durchaus auf Andere übertragbar sind. Dafür sprechen Gemeinsamkeiten bezüglich auftretender Veränderungen im Verlauf der unterschiedlichen Erkrankungen. Parallelen finden sich beispielsweise in den MMP 9- Erhöhungen bei der diabetischen Nephropathie und beim Alport- Syndrom (Cosgrove et al. 2008) oder in den gesteigerten TGF- β1- Spiegeln beider Erkrankungen (Dronavalli et al. 2008). Eine Analyse der Auswirkungen des ITGA2- Knockouts beispielsweise auf die Erhöhung von TGF- β1 und Veränderungen der MMP-Muster kann weiteren Aufschluss über den Einfluss auf wichtige Kaskaden liefern. So besteht die begründete Hoffnung, dass auch eine Ausweitung der Erkenntnis eines positiven Einflusses des Rezeptorverlustes beim Alport- Syndrom hin zu der Erkenntnis eines positiven Einflusses auf Nephropathien, die mit Proteinurie einhergehen, möglich ist. Daraus könnten Ergebnisse wachsen, die Möglichkeiten eröffnen die resultierende progrediente Fibrose und den Endpunkt der terminalen Niereninsuffizienz, die eine wesentliche Einschränkung der Lebensqualität der Patienten bedeutet hinauszuzögern oder sogar zu verhindern. Für die Entschlüsselung solcher zentralen Mechanismen ist die weitere kontinuierliche Erforschung von Rezeptoren und Signalwegen nötig. Die Ergebnisse der Arbeit rechtfertigen die Einbeziehung des Integrins α2β1 in folgende Analysen. Die Entwicklung potenter medikamentöser und gentechnologischer Strategien wird umso erfolgreicher für die betroffenen Patienten verlaufen, je mehr relevante Interaktionspartner entdeckt und in ihren profibrotischen Einflussmöglichkeiten gehemmt werden können.

5 Zusammenfassung

Kollagen ist mit einem Anteil von etwa 30 % das häufigste Protein des menschlichen Körpers. Neben wichtigen Aufgaben bei der Strukturgebung und Stabilisierung von Geweben spielen die Kollagenmoleküle vor allem auch als Liganden an Rezeptoren der Zellen eine entscheidende Rolle. Auf diese Weise tragen sie im Organismus vielfältig essentiell zur Vermittlung von Signalkaskaden, die Zellfunktionen, Wachstums- und Differenzierungsprozesse beeinflussen, bei. Kollagen Typ IV ist der Hauptbestandteil von Basalmembranen. Seit seiner Entdeckung konnten sechs verschiedene Ketten identifiziert werden, die sich zu typischen Netzwerken zusammenlagern. Diese weisen eine gewebespezifische Verteilung auf. In der glomerulären Basalmembran (GBM) der reifen Niere ist das aus je einer α3-, α4- und α5- Kollagen- IV- Kette zusammengesetzte Heterotrimer essentieller Bestandteil. Veränderungen einer Kette können die gesamte Netzwerkstruktur beeinträchtigen und somit schwere Störungen im Aufbau der GBM verursachen. Ganz oder teilweise hereditär bedingte Erkrankungen, die mit Veränderungen der α3- Kette des Kollagen Typ IV assoziiert sind, sind das Goodpasture- Syndrom, die diabetische Nephropathie und das Alport- Syndrom. Gemeinsam ist ihnen eine gesteigerte Durchlässigkeit der GBM für Proteine aufgrund der entstehenden Abweichungen von der normalen Struktur. Auf eine dauerhaft massiv gesteigerte intraglomeruläre Proteinpassage reagiert die Niere unabhängig von den auslösenden Ursachen weitestgehend uniform. Von zentraler Bedeutung ist beispielsweise die Erhöhung von TGF- β1. Es ist durch seine Fähigkeit zur Modulation der Aktivität bestimmter Gene mit resultierender vermehrter Sekretion von Mediatoren und Proteinen der extrazellulären Matrix, v. a. Kollagen Typ IV, maßgeblich an der Entwicklung einer renalen Fibrose beteiligt. Der Verlust von Nephronen führt über einen charakteristischen, sich selbst unterhaltenden, Kreislauf zur Progredienz der Schädigungen, aus denen meist eine terminale Niereninsuffizienz resultiert.

Um den Verlauf solcher Nephropathien positiv zu beeinflussen, ist die Frage bedeutend, wie die Zellen der Niere die defekte GBM wahrnehmen bzw. welche Signale zur Induktion von Fibrose führen. Als bidirektionale Signalmoleküle sind die Integrine in der Lage, beide Komponenten zu vermitteln. Sie dienen den

Zellen sowohl als Rezeptoren zur Erkennung extrazellulärer Matrixbestandteile, als auch zur Initiierung intrazellulärer Kaskaden, die z.B. Einfluss auf Wachstums-, Migrations- und Differenzierungsprozesse haben. Ein auf verschiedenen Zellen der Niere exprimiertes Integrin ist α2β1. Es dient in Podozyten zugleich als Kollagen- und Lamininrezeptor der Erkennung der GBM und verfügt über vielfältige Beziehungen zu wichtigen Signalkaskaden. Anhand des etablierten Alportmausmodells als Beispiel für eine Nierenerkrankung, die über eine gesteigerte Proteinurie zur renalen Fibrose führt, wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb die Bedeutung des Integrins α2β1 für den Krankheitsverlauf untersucht. Die Generierung von COL4A3 / ITGA2-Doppelknockoutmäusen, denen der α2β1- Rezeptor völlig fehlt, erzeugt Individuen mit verzögerter Progression der Erkrankung unter Besserung aller untersuchten Parameter (Überleben, Proteinurie, Serumharnstoffkonzentration, Histologie in der Übersicht und spezifischer Struktur) im Vergleich zu homo- und heterozygot rezeptorpositiven Tieren. Das Vorhandensein von Integrin α2β1 verschlechtert im Umkehrschluss den Krankheitsverlauf und wirkt profibrotisch bei Mäusen mit COL4A3- Defizienz.

Besondere Bedeutung besitzen die Ergebnisse aufgrund der nachgewiesenen guten Übereinstimmung zwischen Alportmausmodell und dem humanen Krankheitsverlauf. So kann ein positiver Einfluss des Integrin- α2β1- Rezeptorverlustes ebenso beim Menschen vermutet werden. Über die genaue Art der Beteiligung des Rezeptors an der Progression der Erkrankung kann derzeit nur spekuliert werden. Zukünftige Untersuchungen finden mögliche Ansatzpunkte bei der Entschlüsselung der Signalwege über die Integrin α2β1 möglicherweise den Krankheitsverlauf beeinflusst oder sogar mit initiiert. Dabei kommen auch den Analysen der Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren wie DDR 1 oder α1β1 wichtige Bedeutungen zu, um möglichst vielfältige und potente therapeutische Einflussmöglichkeiten zu erlangen. Eine Relevanz besteht dabei nicht nur für das Alport- Syndrom, sondern aufgrund der bekannten uniformen Fibrosereaktion der Niere im Verlauf von mit Proteinurie einhergehenden Erkrankungen auch für eine Vielzahl anderer Erkrankungen. Neben der Ausschaltung des ITGA2- Gens kann dabei auch eine medikamentöse Blockade des Rezeptors zum Funktionsverlust führen und so möglicherweise eine wichtige therapeutische Option bieten.

6 Literaturverzeichnis

Internetadressen, die in der Arbeit verwendet wurden, sind durch eine, anstelle des Autorennamens, in Klammern stehende Bezeichnung erkennbar. Sie finden sich im Literaturverzeichnis alphabetisch nach dieser Kennung eingeordnet, die entsprechend auch an den betreffenden Stellen im Text angeführt ist.

Abair TD, Sundaramoorthy M, Chen D, Heino J, Ivaska J, Hudson BG, Sanders CR, Pozzi A, Zent R (2008): Crosstalk between integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 in renal epithelial cells. *Exp Cell Res* 314, 3593- 3604

Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, Zanchi C, Longaretti L, Donadelli R, Remuzzi G (2002): Transforming growth factor- beta 1 is up- regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 161, 2179- 2193

Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St. JohnPL (2003): Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerulär basement membranes. *Kidney International* 63, 826- 834

Abrahamson DR, Isom K, Roach E, Stroganova L, Zelenchuk A, Miner JH, St John PL (2007): Laminin compensation in collagen 3 (IV) knockout (Alport) glomeruli contributes to permeability defects. *J Am Soc Nephrol* 18, 2465- 2472

Aggeli AS, Kitsiou PV, Tzinia AK, Boutaud A, Hudson BG, Tsilibary EC (2009): Selective binding of integrins from different renal cell types to the NC1 domain of alpha 3 and alpha 1 chains of type IV collagen. *J Nephrol* 22, 130- 136

Almeida AS, Faleiros ACG, Teixeira DNS, Cota, Antônio U, Chica JEL (2008): Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J Bras Patol Med Lab* 44, 429- 432

Alport AC (1927): Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Brit Med J* 1, 504- 506

Andrews KL, Mudd JL, Li C, Miner JH (2002): Quantitative Trait Loci Influence Renal Disease Progression in a Mouse Model of Alport Syndrome. *Am J Pathol* 160, 721- 730

Argraves WS, Suzuki S, Arai H, Thompson K, Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1987): Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol* 105, 1183- 1190

Berman AE, Kozlova NI, Morozevich GE (2003): Integrins: Structure and Signaling. *Biochemistry (Mosc)* 68, 1284- 1299

Borza DB, Bondar O, Todd P, Sundaramoorthy M, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG (2002): Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the alpha 3 (IV) collagen chain: Sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the alpha4 and alpha5 NC1 domains. *J Biol Chem* 277, 40075- 40083

Chattopadhyay N, Wang Z, Ashman LK, Brady- Kalnay SM, Kreidberg JA (2003): Alpha 3 beta 1 integrin- CD151, a component of the cadherin- catenin complex, regulates PTPμ expression and cell- cell adhesion. *J Cell Biol* 163, 1351- 1362

Chen J, Diacovo TG, Grenache DG, Santoro SA, Zutter MM (2002): The alpha2 integrin subunit- deficient mouse: A multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* 161, 337- 344

Choi JK, Yoon SH, Hong HY, Choi DK, Yoo GS (1996): A modified Coomassie blue staining of proteins in polyacrylamide gels with Bismark Brown R. *Anal Biochem* 236, 82- 84

Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E (1942): The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *J Immunol* 45, 159- 170

Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10, 2981- 2992

Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A, Kalluri R (2000): Integrin alpha 1 beta 1 and transforming growth factor- beta 1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 157, 1649- 1659

Cosgrove D, Kalluri R, Miner JH, Segal Y, Borza DB (2007): Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport Glomerulonephritis. *Kidney Int* 71, 615- 618

Cosgrove D, Meehan DT, Delimont D, Pozzi A, Chen X, Rodgers KD, Tempero RM, Zallocchi M, Rao VH (2008): Integrin alpha 1 beta 1 regulates matrix metalloproteinases via P38 mitogen- activated protein kinase in mesangial cells: implications for Alport syndrome. *Am J Pathol* 172, 761- 773

Davis BJ (1964): Disc electrophoresis- II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 121, 404- 427

Deutzmann R, Bruckner- Tuderman L, Bruckner P: Binde- und Stützgewebe; in: Biochemie und Pathobiochemie; Hrsg. Löffler G, Petrides PE; 7. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2003, 65- 76 und 754- 762

Dronavalli S, Duka I, Bakris GL (2008): The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4, 444- 452

Eble JA, Wucherpfennig KW, Gauthier L, Dersch P, Krukonis E, Isberg RR, Hemler ME (1998): Recombinant soluble human a3b1 integrin: purification, processing, regulation, and specific binding to laminin-5 and invasion in a mutually exclusive manner. *Biochemistry* 37, 10945- 10955

Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7, 2495- 2508

El- Aouni C, Herbach N, Blattner SM, Henger A, Rastaldi MP, Jarad G, Miner JH, Moeller MJ, St- Arnaud R, Dedhar S (2006): Podocyte- specific deletion of integrin- linked kinase results in severe glomerulär basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 17, 1334- 1344

Elices MJ, Hemler ME (1989): The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/ laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9906- 9910

Emsley J, King SL, Bergelson JM, Liddington RC (1997): Crystal structure of the I domain from integrin alpha2 beta1. *J Biol Chem* 272, 28512- 28517

Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC (2000): Structural basis of collagen recognition by integrin alpha 2 beta 1. *Cell* 101, 47- 56

Fazekas de St. Groth S, Webster RG, Datyner A (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 71, 377- 391

Flamant M, Placier S, Rodenas A, Curat CA, Vogel WF, Chatziantoniou C, Dussaule JC (2006): Discoidin Domain Receptor 1 Null mice are protected against Hypertension- induced renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 3374- 3381

Goodpasture EW (1919 a): The pathology of pneumonia accompanying influenza. *US Naval Med Bull* 13, 177- 197

Goodpasture EW (1919 b): The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza. *Am J Med Sci* 158, 863- 870

Gould DB, Phalan FC, Breedveld GJ, van Mil SE, Smith RS, Schimenti JC, Aguglia U, van der Knaap MS, Heutink P, John SW (2005): Mutations in COL4A1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science* 308, 1167- 1170

Gould DB, Phalan FC, van Mil SE, Sundberg JP, Vahedi K, Massin P, Bousser MG, Heutink P, Miner JH, Tournier-Lasserve E (2006): Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N Engl J Med* 354, 1489- 1496

Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze- Lohoff E, Weber M (2003): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int* 63, 438- 446

Gross O, Koepke ML, Weber M (2004 a): Alport- Syndrom und familiäre benigne Hämaturie: Eine Übersicht über hereditäre Erkrankungen des Typ- IV- Kollagens und der Gefäßbasalmembranen. *Nieren- Hochdruckkr* 33, 348- 356

Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorner PS, Smyth N, Addicks K, Bloch W (2004 b): DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int* 66, 102- 111

Grzesiak JJ, Bouvet M (2007): Determination of the ligand- binding specificities of the alpha 2 beta1 and alpha 1 beta1 integrins in a novel 3- dimensional in vitro model of pancreatic cancer. *Pancreas* 34, 220- 228

Gunwar S, Ballester F, Noelken ME, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG (1998): Glomerular basement membrane: Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J Biol Chem* 273, 8767- 8775

Heino J, Ignotz RA, Hemler ME, Crouse C, Massagué J (1989): Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta: Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* 264, 380- 388

Holtkötter O, Nieswandt B, Smyth N, Müller W, Hafner M, Schulte V, Krieg T, Eckes B (2002): Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem* 277, 10789- 10794

Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K (1993): Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases: Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268, 26033- 26036

Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen. *N Engl J Med* 348, 2543- 2556

Hynes RO (2002): Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673- 687

Ignotz RA, Massagué J (1987): Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- beta action. *Cell* 51, 189- 197

Ivaska J, Reunanen H, Westermarck J, Koivisto L, Kähäri VM, Heino J (1999): Integrin alpha 2 beta 1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha 2 cytoplasmic tail. *J Cell Biol* 147, 401- 415

Jaspers M, Marynen P, Sayed Aly M, Cuppens H, Hiiliker C, Cassiman JJ (1991): Localization of the gene encoding the alpha 2 subunit of the human VLA- 2 receptor to chromosome 5q23-31. *Somatic Cell Mol Genet* 17, 505- 511

Juliano RL (2002): Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 283- 323

Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG (1997): Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest* 99, 2470- 2478

Kashtan CE, Kim Y, Lees GE, Thorner PS, Virtanen I, Miner JH (2001): Abnormal glomerular basement membrane laminins in murine, canine, and human Alport syndrome: aberrant laminin alpha 2 deposition is species independent. *J Am Soc Nephrol* 12, 252- 260

Kefalides NA (1966): A collagen of unusual composition and a glycoprotein isolated from canine glomerular basement membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 22, 26- 32

Kern A, Eble J, Golbik R, Kühn K (1993): Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. *Eur J Biochem* 215, 151- 159

Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG (2008): Mammalian Collagen IV. *Microsc Res Tech* 71, 357- 370

Kluth DC, Rees AJ (1999): Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *J Am Soc Nephrol* 10, 2446- 2453

Kreidberg JA, Symons JM (2000): Integrins in kidney development, function, and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F233- F242

Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, Jaenisch R (1996): Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122, 3537- 3547

Kretzler M, Teixeira VP, Unschuld PG, Cohen CD, Wanke R, Edenhofer I, Mundel P, Schlöndorff D, Holthöfer H (2001): Integrin- linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *FASEB J* 15, 1843- 1845

Kühn K, Wiedemann H, Timpl R, Risteli J, Dieringer H, Voss T, Glanville RW (1981): Macromolecular structure of basement membrane collagens: Identification of 7 S collagen as a crosslinking domain of type IV collagen. *FEBS Lett* 125, 123- 128

(labor)
http://laborwissen.de/wiki/tiki-index.php?page=HE-F%C3%A4rbung&highlight=etoh
16.1.2009

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680- 685

LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R (2007): Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med* 232, 1121- 1129

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006): The epithelial- mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973- 981

Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y (2008): Epithelial- to- mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* 172, 299- 308

Mackay EM, Mackay LL (1927): The relation between the blood urea concentration and the amount of functioning renal tissue. *J Clin Invest* 4, 127- 133

(merck)
http://www.merck-chemicals.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/de_DE/-/-/ViewProductDetail-Start?ProductUUID=Ru2b.s1OAg4AAAEWcWoW4z7 2&PortalCatalogUUID=Uc6b.s1LfzAAAAEW6tYfVhTl
20.1.2009

Michov BM: Elektrophorese: Theorie und Praxis. de Gruyter Verlag, Berlin 1995

Miller MW, Basra S, Kulp DW, Billings PC, Choi S, Beavers MP, McCarty OJ, Zou Z, Kahn ML, Bennett JS, DeGrado WF (2009): Small- molecule inhibitors of integrin alpha 2 beta 1 that prevent pathological thrombus formation via an allosteric mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 719- 724

Miner JH (1998): Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7, 13- 19

Miner JH (2005): Building the glomerulus: A matricentric view. *J Am Soc Nephrol* 16, 857- 861

(ncbi)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3688
20.3.2009

Nykvist P, Tu H, Ivaska J, Käpylä J, Pihlajaniemi T, Heino J (2000): Distinct recognition of collagen subtypes by alpha 1beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins: Alpha 1 beta 1 mediates cell adhesion to type XIII collagen. *J Biol Chem* 275, 8255- 8261

Orian- Rousseau V, Aberdam D, Rousselle P, Messent A, Gavrilovic J, Meneguzzi G, Kedinger M, Simon- Assmann P (1998): Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin- 5. Their adhesion to laminin- 5 involves multiple receptors among which is integrin alpha 2 beta 1. *J Cell Sci* 111, 1993- 2004

Ornstein L (1964): Disc electrophoresis- I. Background and theory. *Ann NY Acad Sci* 121, 321- 349

Pfaff M, Göhring W, Brown JC, Timpl R (1994): Binding of purified collagen receptors (alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1) and RGD-dependent integrins to laminins and laminin fragments. *Eur J Biochem* 225, 975- 984

Plaisier E, Gribouval O, Alamowitch S, Mougenot B, Prost C, Verpont MC, Marro B, Desmettre T, Cohen SY, Roullet E (2007): COL4A1 mutations and hereditary angiopathy, nephropathy, aneurysms, and muscle cramps. *N Engl J Med* 357, 2687- 2695

Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, Eremina V, Hudson BG, Borza DB, Harris RC, Holzman LB, Phillips CL, Fassler R, Quaggin SE, Miner JH, Zent R (2008): Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev Biol* 316, 288- 301

Rao VH, Meehan DT, Delimont D, Nakajima M, Wada T, Gratton MA, Cosgrove D (2006): Role for macrophage metalloelastase in glomerular basement membrane damage associated with alport syndrome. *Am J Pathol* 169, 32- 46

Remuzzi G, Bertani T (1998): Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339, 1448- 1456

Sabherwal Y, Rothman VL, Dimitrov S, L'Heureux DZ, Marcinkiewicz C, Sharma M, Tuszynski GP (2006): Integrin alpha 2 beta 1 mediates the anti-angiogenic and anti- tumor activities of angiocidin, a novel tumor- associated protein. *Exp Cell Res* 312, 2443- 2453

Sanders MA, Basson MD (2004): Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via alpha 1 beta 1- and alpha 2 beta 1- integrin- dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G547- G557

Santoro SA, Zutter MM (1995): The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost* 74, 813- 821

Sawhney RS, Cookson MM, Omar Y, Hauser J, Brattain MG (2006): Integrin alpha 2- mediated ERK and calpain activation play a critical role in cell adhesion and motility via focal adhesion kinase signaling: identification of a novel signaling pathway. *J Biol Chem* 281, 8497- 8510

Sayers R, Kalluri R, Rodgers KD, Shield CF, Meehan DT, Cosgrove D (1999): Role for transforming growth factor-beta1 in alport renal disease progression. *Kidney Int* 56, 1662- 1673

Schiebler TH: Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie. 4. Auflage; Springer Verlag, Berlin 1996

Setty S, Kim Y, Fields GB, Clegg DO, Wayner EA, Tsilibary EC (1998): Interactions of type IV collagen and its domains with human mesangial cells. *J Biol Chem* 273, 12244- 12249

Shankland SJ (2006): The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 69, 2131- 2147

Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Svoboda R, Wheelock MJ, Johnson KR (2008): Collagen I- mediated up- regulation of N- cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J Cell Biol* 180, 1277- 1289

Siljander PR, Hamaia S, Peachey AR, Slatter DA, Smethurst PA, Ouwehand WH, Knight CG, Farndale RW (2004): Integrin activation state determines selectivity for novel recognition sites in fibrillar collagens. *J Biol Chem* 279, 47763- 47772

Söderhäll C, Marenholz I, Kerscher T, Rüschendorf F, Esparza- Gordillo J, Worm M, Gruber C, Mayr G, Albrecht M, Rohde K (2007): Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol* 5, 1952- 1961

Stelzer K, Köhler H: Grundlagen der Nierenfunktion; in: Thiemes Innere Medizin; Hrsg. Köhler H (Kapitel Nephrologie), u.a.; Thieme Verlag, Stuttgart 1999, 1289- 1296

St. John PL, Abrahamson DR (2001): Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int* 60, 1037- 1046

Takada Y, Hemler ME (1989): The primary structure of the VLA-2/ collagen receptor alpha 2 subunit (platelet GPIa): Homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain. *J Cell Biol* 109, 397- 407

Than ME, Henrich S, Huber R, Ries A, Mann K, Kühn K, Timpl R, Bourenkov GP, Bartunik HD, Bode W (2002): The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met- Lys cross-link. *Proc Nat Acad Sci USA* 99, 6607- 6612

Timpl R, Risteli J, Bächinger HP (1979): Identification of a new basement membrane collagen by the aid of a large fragment resistant to bacterial collagenase. *FEBS Lett* 101, 265- 268

Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K (1981): A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* 120, 203- 211

(uniprot P05556)
http://www.uniprot.org/uniprot/P05556
20.3.2009

(uniprot P17301)
http://www.uniprot.org/uniprot/P17301
20.3.2009

(uniprot Align PP)
http://www.uniprot.org Alignment P05556 und P09055
20.3.2009

(uniprot Align PQ)
http://www.uniprot.org Alignment P17301 und Q62469
20.3.2009

Vandenberg P, Kern A, Ries A, Luckenbill- Edds L, Mann K, Kühn K (1991): Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* 113, 1475- 1483

Wang CZ, Su HW, Hsu YC, Shen MR, Tang MJ (2006): A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration. *Mol Biol Cell* 17, 2839- 2852

Yang C, Zeisberg M, Lively JC, Nyberg P, Afdhal N, Kalluri R (2003): Integrin alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta1 are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment. *Cancer Res* 63, 8312- 8317

Yeh YC, Wang CZ, Tang MJ (2009): Discoidin domain receptor 1 activation suppresses alpha 2 beta 1 integrin- dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity. *J Cell Physiol* 218, 146- 156

Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2001): Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 315- 320

Zeisberg M, Khurana M, Sugimoto H, Cosgrove D, Rao VH, Rougier JP, Werner MC, Shield III CF, Werb Z , Kalluri R (2006): Stage specific action of matrix metalloproteinases influence hereditary kidney disease. *PLoS Med* 3, 535- 546

Zhou J, Ding M, Zhao Z, Reeders ST (1994): Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6 (IV): Isolation of the cDNAs for alpha 6 (IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *J Biol Chem* 269, 13193- 13199

Zur B (2005): Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Medizinische Dissertation, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Struktur der Kollagentripelhelix 2
Abb. 1.2 α1(IV)- NC1- Domäne 4
Abb. 1.3 Kollagensuprastruktur 5
Abb. 1.4 Mutationen der α1(IV)- Kette 12
Abb. 1.5 Schematische Darstellung der an der Nierenfibrose beteiligten Prozesse 14
Abb. 1.6 Mögliche Wirkungen von Angiotensin II auf Podozyten und an der Nierenfibrose beteiligte Zellen und Mediatoren 17
Abb. 1.7 Grundstrukturen der α2- und der β1- Untereinheiten der Integrine 19
Abb. 1.8 I- Domäne 21
Abb. 1.9 MAP- Kinase- Kaskade 22
Abb. 1.10 ILK- abhängige Veränderung der Podozyten- GBM- Interaktion 23
Abb. 1.11 Expression der α- Ketten in den Glomeruli 27
Abb. 1.12 Genotypabhängige Netzwerkexpression in der GBM 28
Abb. 2.1 SDS- Proteinkomplex 41
Abb. 2.2 Strukturformeln von LDS und SDS 42
Abb. 2.3 Strukturformel Coomassie R 250 45
Abb. 2.4 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung 48
Abb. 3.1 COL4A3- bzw. ITGA2 PCR- Ergebnis für verschiedene Genotypen 51
Abb. 3.2 Mittlere Überlebensdauer in Abhängigkeit vom Genotyp. 52
Abb. 3.3 Box Plot der mittleren Gesamtüberlebensdauer 53
Abb. 3.4 Kaplan- Meier- Kurve der kumulierten Überlebensanteile 53
Abb. 3.5 Gel nach SDS- PAGE zur Auftrennung der Proteine im Urin 54
Abb. 3.6 SDS- PAGE zur Auftrennung der Proteine im Urin 55
Abb. 3.7 Darstellung der im Durchschnitt gemessenen Intensitäten 57
Abb. 3.8 Box Plot für die Summenwerte aus den mittleren Intensitäten. 58
Abb. 3.9 Gemessene mittlere Intensitäten (MeanInt) im zeitlichen Verlauf 59
Abb. 3.10 Box Plot für die mittlere gemessene Intensität im Gesamtbereich 60
Abb. 3.11 Gesamtmittelwert der durchschnittlich gemessenen Intensität 61
Abb. 3.12 Zusätzlich außerhalb der drei Messbereiche abgelagerte Proteine 61
Abb. 3.13 Gemessene maximale Intensitäten (MaxInt) im zeitlichen Verlauf 63

Abb. 3.14 Maximal gemessene Intensitäten (MaxInt). 64
Abb. 3.15 Gesamtdarstellung der durchschnittlich gemessenen Intensitäten und der dazugehörigen maximal gemessenen Intensitäten (MaxInt) 65
Abb. 3.16 Serumharnstoffkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten 1 66
Abb. 3.17 Serumharnstoffkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten 2 67
Abb. 3.18 Hämatoxylin- Eosin- Färbungen im Alter von 100 Tagen..... 70
Abb. 3.19 Hämatoxylin- Eosin- Färbungen im Alter von 150 Tagen..... 71
Abb. 3.20 Anti- Laminin- gefärbte Transversalschnitte von Mausnieren in der Immunfluoreszenzmikroskopie, Alter etwa 100 Tage..... 75
Abb. 3.21 Anti- Laminin- gefärbte Transversalschnitte von Mausnieren in der Immunfluoreszenzmikroskopie, Alter etwa 150 Tage..... 78
Abb. 3.22 Grafische Darstellung der Gesamtbenotung..... 80
Abb. 3.23 Flächendetektorbasierte Volumen- Computertomografie 1..... 83
Abb. 3.24 Flächendetektorbasierte Volumen- Computertomografie 2..... 84
Abb. 4.1 Abhängigkeit der Höhe der gemessenen Blutharnstoffkonzentration vom Prozentsatz an normal funktionierendem Nierengewebe 88
Abb. 4.2 Laminin- und Kollagenexpression in der GBM zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten in Wildtyp- und Alportmäusen 99

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Eigenschaften der Kollagen- Typ- IV- α- Ketten 3
Tab. 2.1 Übersicht der verwendeten Puffer und ihre Zusammensetzung 33
Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidprimer 34
Tab. 2.3 Zuordnung der Banden des Molekulargewichtsmarkers 35
Tab. 2.4 Programmschritte des Thermocyclers für die PCR ITGA2 39
Tab. 2.5 Programmschritte des Thermocyclers für die PCR COL4A3 40
Tab. 3.1 Bewertungen für den Fibrosegrad 79
Tab. 3.2 Steigerungsfaktoren in der Analyse der Glomerulusbewertungen 81
Tab. 3.3 Steigerungsfaktoren in der Analyse der Bewertungen des Tubulointerstitiums 81
Tab. 3.4 Steigerungsfaktoren in der Analyse der Gesamtbewertungen 82
Tab. 4.1 Zuwachs an Proteinurie gegenüber der Kontrollgruppe 93

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin- Converting- Enzym
AGE	Advanced glycosylation end products
ANG II	Angiotensin zwei
ARAS	Autosomal- rezessives Alport- Syndrom
AT	Angiotensin
BM	Basalmembran
BSA	Bovines Serumalbumin
CB3	Cyanogen bromide derived fragment 3
COL	Kollagengen
CT	Computertomografie
CTGF	Connective tissue growth factor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDR1	Discoidin domain receptor 1
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dko	Doppelknockout (COL4A3 -- / ITGA2 --)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGE	Early glycosylation end products
EM	Elektronenmikroskopie
EMT	Epitheliale mesenchymale Transformation
et al.	Et alii
etc.	Et cetera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal adhesion kinase
FBH	Familiäre benigne Hämaturie
FGF- 2	Fibroblast growth factor 2

fp VCT	Flat panel volume computertomography
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Gly	Glyzin
HE	Hämatoxylin- Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IL- 1	Interleukin 1
ILK	Integrin- linked Kinase
ITGA2	Gen für eine Integrin- α2- Untereinheit
LAMA	Gen für eine Laminin- α- Kette
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MAPK	Mitogen- activated Protein- Kinase
MaxInt	Maximal gemessene Intensität
MCP 1	Monocyte chemoattractive protein 1
MeanInt	Durchschnittlich gemessene Intensität
MIDAS	Metal ion dependent adhesion site
MMP	Matrix- Metalloproteinase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
n	Fallzahl
NC1	Non collagenous 1
NF - kB	Nuklear factor kappa B
NGS	Normal goat serum
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
RAAS	Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems
RAGE	Receptor for advanced glycosylation end products
RANTES	Regulated upon activation normal T- cell expressed and secreted
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris- Acetat- EDTA- Puffer

TBS	Tris buffered saline
TGF- β1	Transforming growth factor beta 1
Tris	Tris- (hydroxymethyl) - aminomethan
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	Von- Willebrand- Faktor
z.B.	Zum Beispiel

Verwendete Einheiten und Symbole

n	*Nano*	c	*Centi*
µ	*Mikro*	d	*Dezi*
m	*Milli*	k	*Kilo*

A	*Ampere*	min	*Minute*
bp	*Basenpaare*	p	*Pond*
°C	*Grad Celsius*	rpm	*rounds per minute*
d	*Tag*	U	*Unit*
Da	*Dalton*	V	*Volt*
dpi	*dots per inch*	%	*Prozent*
g	*Gramm*	§	*Paragraf*
l	*Liter*	®	*eingetragenes*
m	*Meter*		*Warenzeichen*
M	*Mol*		

Veröffentlichungen zum Thema der Dissertation

Girgert R, Reinhardt J, Martin M, Koschnik S, Weber M, Müller GA, Gross O: Veränderte Expression fibrogener und inflammatorischer Cytokine nach Verlust des Kollagenrezeptors alpha 2 beta 1- Integrin auf Podozyten verlangsamt die Nierenfibrose im COL4A3- knockout Tiermodell. Abstract- Posterpräsentation (P 151) auf dem Kongress für Nephrologie, Tübingen 2008

Girgert R, Reinhardt J, Martin M, Koschnik S, Weber M, Müller GA, Gross O: Altered expression of fibrogenic and inflammtory cytokines after loss of the collagen- receptor alpha 2 beta 1- integrin in podocytes delays renal fibrosis in COL4A3 knockout mice. Abstract- Posterpräsentation (TH- PO447) auf der Renal Week der American Society of Nephrology, Philadelphia 2008

Girgert R, Martin M, Kruegel J, Miosge N, Temme J, Eckes B, Müller GA, Gross O (22. September 2010): Integrin alpha 2- deficient mice provide insights into specific functions of collagen receptors in the kidney. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 3: 19

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich an Herrn PD Dr. med. Oliver Gross für die Vergabe und die hervorragende Betreuung der Arbeit richten. Sein Vertrauen und seine strukturierte Anleitung waren die Grundpfeiler der Dissertation.

Ich danke Joanna Reinhardt, die mit mir viele Stunden in den Aufbau und die konsequente Verbesserung der Versuchsabläufe investiert hat, um die Grundlagen für die Realisierung des Projektes zu schaffen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Andrea Bernhardt und den MTAs des Labors PD Dr. O. Gross/ Prof. Dr. S. Blaschke bedanken, die meinen Laboralltag begleitet und unterstützt und mit ihren Ideen und ihrer Erfahrung über viele Krisen hinweg geholfen haben.

Herrn PD Dr. rer. nat. Rainer Girgert danke ich für die Unterstützung der Arbeit und die Erweiterung der Sichtweise auf die Thematik über die einer Medizinerin hinaus.

Ein weiterer Dank gilt den Abteilungen und Mitarbeitern der Universitätsmedizin Göttingen, die Teile der Auswertungen übernommen haben oder dabei beratend tätig waren. Der Abteilung Radiologie, insbesondere Frau A. C. Busse, danke ich für die Hilfe bei den CT- Aufnahmen und deren Interpretation, Frau Dr. med. vet. Sarah Kimmina und dem Team der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtungen für die Betreuung der Tiere. Auch der Abteilung für Klinische Chemie vielen Dank für die technische Unterstützung bei der Auswertung der Blutproben. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. R. Hilgers danke ich für die Beratung und Überprüfung des statistischen Teils der Arbeit.

Für die Unterstützung des Projektes möchte ich mich herzlich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken.

Darüber hinaus gilt mein ausdrücklicher Dank allen, die auf dem langen Weg durch Ihren persönlichen und/oder fachlichen Beistand, die Gesten, Gedanken und das Verständnis, ohne das ein Gelingen einer solchen Arbeit undenkbar wäre, beigetragen haben.

Lebenslauf

Am 13. Juli 1983 wurde ich, Maria Martin, als Tochter von Johannes Martin, Schlosser, und Marina Martin, geborene Krauel, Textilfacharbeiterin, in Leinefelde geboren.

Dort besuchte ich von 1990 bis 1994 die Konrad- Hentrich- Grundschule und im Anschluss daran das Gottfried - Wilhelm - Leibniz - Gymnasium, an dem ich 2002 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im Oktober 2002 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August- Universität zu Göttingen, das ich dort 2008 erfolgreich beenden konnte. Am 5. Dezember 2008 wurde mir die Approbation als Ärztin erteilt.

Seit Juli 2009 bin ich im Institut für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin im Klinikum Bremerhaven Reinkenheide im Rahmen meiner Facharztweiterbildung tätig.