Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G.A. Müller)
im Zentrum für Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss der Kollagenrezeptoren ITGA2 und DDR1 in der Pathogenese von glomerulären Nierenerkrankungen am Doppelknockout-Tiermodell

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Alexander Leibnitz

aus Dresden

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. O. Gross

2. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. W. Krick

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung 1

1.1 Nierenfibrose 1
1.2 Proteinurie 3
1.3 Transforming Growth Factor 4
1.4 Connective Tissue Growth Factor 6
1.5 Glomeruläre Basalmembran (GBM) und interstitielles Bindegewebe als Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) 7
1.6 Integrine 11
1.6.1 α2ß1-Integrin 13
1.7 Tyrosinkinaserezeptoren 14
1.7.1 Discoidin-Domain-Rezeptor, DDR1 15
1.8 Zielsetzung 16

2 Material und Methoden 17

2.1 Material 18
2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 18
2.1.2 Elektrophorese 18
2.1.3 Immunhistochemie Laminin/Fibronektin 19
2.1.4 Western-Blot 19
2.1.5 In-situ-Hybridisierung 21
2.1.6 Sonstiges Verbrauchsmaterial 23
2.1.7 Software 23
2.2 Methoden 23
2.2.1 Probengewinnung 23
2.2.2 Präparatanfertigung 23
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 24
2.2.4 Laminin-1-Färbung 24
2.2.5 Fibronektin-Färbung 25
2.2.6 Elektrophorese zur Bestimmung der Proteinurie 25
2.2.7 Western-Blot-Analyse 27
2.2.8 Lichtmikroskopische In-situ-Hybridisierung 29

3 Ergebnisse 31

3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 31
3.2 Bestimmung der Proteinurie für den Zeitraum 60 bis 140 Tage 34
3.3 Immunhistochemie Laminin 36

3.3.1 Glomeruläre Matrixakkumulation 39
3.3.2 Score für die interstitielle Matrixakkumulation 41
3.4 Immunhistochemie Fibronektin 43
3.5 Bestimmung der Proteinurie zum Zeitpunkt 160 bis 200 Tage 45
3.6 Elektronenmikroskopie 46
3.7 In-situ-Hybridisierung 48
3.8 Expression von TGF-ß und CTGF im Western-Blot 50

4 Diskussion 55

4.1 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und kritische Betrachtung 56
4.1.1 Allgemeines 56
4.1.2 Histologie 56
4.1.3 Proteinurie 56
4.1.4 Immunhistochemie 57
4.1.5 Elektronenmikroskopie 58
4.1.6 In-situ-Hybridisierung und Western-Blot 58
4.1.7 Fazit 59
4.2 Verspätete Ausreifung der glomerulären Basalmembran 59
4.3 Offene Fragen 60
4.4 Ausblick 61

5 Zusammenfassung 63

6 Literaturverzeichnis 65

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AGE	Advanced glycation endproduct
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DDR	Discoidin-Domain-Rezeptor
DDR1	Discoidin-Domain-Rezeptor 1
EMT	Epithelial-mesenchymalen Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal adhesion kinase
GAG	Glykosaminoglykan
GBM	Glomeruläre Basalmembran
H. E. Färbeverfahren	Hämatoxylin-Eosin-Färbeverfahren
ILK	Integrin-linked kinase
ISH	In-situ-Hybridisierung
ITGA2	Integrin alpha 2
JNK	Jun NH_2-terminal kinase
MAP- Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
MW	Mittelwert
Nck2	Non-catalytic (region of) tyrosine kinase adaptor protein 2
PINCH	Particularly interesting new cysteine-histidine rich protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RTK	Tyrosinkinaserezeptor
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS – PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TGF	Transforming Growth Factor

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation thematisiert die Bedeutung der Kollagenrezeptoren DDR1 (Discoidin-Domain-Rezeptor 1) und ITGA2 (Integrin Alpha 2) in der Pathogenese von glomerulären Nierenerkrankungen anhand des Mausmodells.
Einleitend werden theoretische Grundlagen erarbeitet, die den Forschungsgegenstand näher beschreiben.
Anschließend benennt Kapitel 2 die für die Forschung benötigten Materialien und beschreibt die Auswahl und Durchführung der zur Anwendung gekommenen Methoden. Nach einer Darstellung der Ergebnisse folgt neben einer kritischen Betrachtung des Forschungsdesigns und erhobenen Datenmaterials eine Zusammenfassung des Erkenntnisgewinns.

1.1 Nierenfibrose

Die chronische Niereninsuffizienz ist die Folge einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion beider Nieren mit einer Inzidenz von 10/100.000/ Jahr in Westeuropa. Die häufigsten Ursachen stellen hierbei die diabetische Nephropathie (35 %), die primären und sekundären Glomerulonephritiden (15 %), chronische tubulo-interstitielle Erkrankungen, die hypertensive Nephropathie (25 %) sowie polyzystische Nierenerkrankungen dar (Herold 2010). Auch hereditäre Nierenerkrankungen wie das Alport-Syndrom haben Einfluss auf die Entwicklung einer renalen Fibrose. Die vom deutschen Dialyseregister QuaSi-Niere für 2006/2007 erhobenen Daten zeigen alleine für Deutschland über 66.000 Dialysepatienten auf. Im Verlauf von 1997 - 2006 verzeichnete die Prävalenz einen Zuwachs von 4,4 %, die Inzidenz einen Anstieg um 5,1 % (Frei und Schober-Halstenberg 2008). Abgesehen vom volkswirtschaftlichen Schaden, der aktuell auf etwa 2,5 – 3 Milliarden Euro geschätzt wird und somit die chronische Niereninsuffizienz zu einer der teuersten Erkrankungen in Deutschland macht, darf die geminderte Lebensqualität nicht vergessen werden. Zum Beispiel korreliert die chronische Niereninsuffizienz in einem hohen Maße mit der Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen. So ist bekannt, dass das Risiko, an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben, bei Dialysepatienten 10 – 30 mal höher ist als in einer gesunden Vergleichspopulation (Sarnak et al. 2003).
Wie eingangs bereits erwähnt, ist der Diabetes mellitus für den Großteil dialysepflichtiger Patienten verantwortlich, welcher pathogenetisch die Glykosylierung von Matrixproteinen der Basalmembran zu Grunde liegt. Die entstehenden Protein-Zucker-Ablagerungen, auch

advanced glycation endproducts bzw. kurz AGE genannt, werden von spezifischen Rezeptoren (AGE-Rezeptoren, RAGE) gebunden und vermitteln die Ausschüttungen proinflammatorischer bzw. profibrotischer Signale wie zum Beispiel von Zytokinen (siehe auch 1.3 TGF-ß, 1.4 CTGF) (Brownlee 2001). Die konsekutive Sklerosierung, getriggert durch Zytokine, aber auch die Akkumulation der AGEs in den Gefäßwänden direkt, führt zu einem intraglomerulären Hochdruck mit Hyperfiltration und anschließender Permeabilitätssteigerung mit Proteinurie, insbesondere der Ausscheidung von Albumin. Zudem wird unter vermehrten AGEs die Produktion der Hyaluronsäure inhibiert, welche der GBM spezielle Ladungseigenschaften verleiht und ebenfalls eine Permeabilitätserhöhung zur Folge hat (Goldin et al. 2006).

Eine weitere glomeruläre Nierenerkrankung ist das Alport-Syndrom, eine hereditäre Kollagen-IV-Erkrankung, die im Folgenden ebenfalls näher beleuchtet werden soll, da die Auswahl der beiden Kollagenrezeptoren Discoidin-Domain-Rezeptor 1 (DDR1) und α2 β1 – Integrin (ITGA2) insbesondere auf bisherigen Studien fußt, die sich die Pathologie des Alport-Syndroms zu Nutze gemacht haben. Mutationen im Gen Col4A3, A4 oder A5, die für die α3-, α4- oder α5-Kette des Kollagen IV kodieren, führen zu Proteinurie, Hämaturie sowie Beeinträchtigungen beim Sehen und Hören (Hudson et al. 2003). Im Verlauf der Embryogenese besteht die Trippelhelix des Kollagen IV der glomerulären Basalmembran (GBM) noch aus den Ketten α1/α1/α2, während sich unter dem Einfluss der Podozyten dann die adulte Form aus α3/α4/α5-Ketten entwickelt (Abrahamson et al. 2009). Da dieser Prozess bereits früh beginnt, zeigen schon jüngste Patienten mit Alport-Syndrom erste Symptome. Das Vollbild des Alport-Syndroms und die damit u.a. verbundene terminale Niereninsuffizienz wird in der Mehrheit der Fälle um das 20. Lebensjahr erreicht.

Die Pathomechanismen, die eine chronische Nierenerkrankung zur Folge haben, münden allesamt in einer interstitiellen Fibrose, einem peritubulären Kapillarverlust sowie der Destruktion bzw. dem Funktionsverlust der Nephrone auf dem Boden tubulärer Atrophie (Eddy 2005). Bisherige Studien zeigten auf, dass Kollagenrezeptoren wie Integrine (Cosgrove et al. 2000; Girgert et al. 2010) und Discoidin-Domain-Rezeptor 1 (Gross et al. 2010) einen wichtigen Einfluss auf den Verlauf der Prognose haben.

Bekannt ist, dass es im Rahmen der Aufrechterhaltung der Nierenrestfunktion zu einer intraglomerulären Drucksteigerung mit Hyperfiltration kommt. Diese Drucksteigerung wiederum führt zur Induktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die eine glomeruläre Hypertrophie und –plasie bewirken, wodurch die glomeruläre Permeabilität verloren geht (Remuzzi und Bertani, 1998). Als Folge dessen ist eine Proteinurie zu beobachten, die als

direktes Nephrotoxin zur progressiven Sklerose der Niere führt, welche schließlich im terminalen Nierenversagen endet. Man beobachtet hierbei ein Versagen der exkretorischen Nierenfunktion, eine Störung im Elektrolyt- sowie Säure-Basen-Haushalt, einen Verlust der inkretorischen Nierenfunktion (EPO, Renin und Vitamin D) sowie toxische Organschäden durch retinierte harnpflichtige Substanzen (Herold 2010).

Seit Längerem wird vermutet, dass insbesondere die Ausprägung der tubulointerstitiellen Fibrose in Hinblick auf die Prognose der renalen Fibrose ausschlaggebend ist (Bohle et al. 1994).

Eine mögliche Stadieneinteilung zur Nierenfibrose erfolgte durch Eddy im Jahre 2000, die wie folgt zu beschreiben ist: Die Initialphase ist durch eine zelluläre Aktivierungs- und Schädigungsphase gekennzeichnet, wobei Monozyten in das Interstitium migrieren und zu Makrophagen ausreifen, gleichzeitig vermehren sich interstitiell aktivierte Fibroblasten. In der 2. sogenannten fibrogenetischen Signalphase kommt es zur Ausschüttung fibroseinduzierender Mediatoren wie z.B. TGF-ß und CTGF. Es folgt die fibrogenetische Phase, in der Matrixproteine interstitiell akkumulieren, an die sich wiederum die Organdestruktion unter exzessiver Matrixakkumulation insbesondere von Kollagen I, III, IV sowie Laminin und Fibronektin anschließt. Ein wichtiger Faktor, der die Progression entscheidet, ist der Mechanismus der so genannten Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Hierbei wird postuliert, dass ein großer Anteil intestinaler Fibroblasten ursprünglich Tubulusepithelzellen waren, die sich auf Grund von Schäden zu Mesenchymzellen transformierten bzw. ihre typischen epithelialen Charaktereigenschaften verloren haben und phänotypisch mesenchymalen Zellen ähneln. Experimente zeigten unter selektiver Blockade der EMT in Mäusen eine Verminderung der Fibroseläsionen (Liu 2004).

1.2 Proteinurie

Die Proteinurie im Rahmen glomerulärer Defekte ist eng mit der Ausbildung einer tubulointerstitiellen Fibrose assoziiert. Zum einen schädigt die glomeruläre Proteinurie die Tubulusepithelzellen direkt, zum anderen attackieren Zytokine das Epithel sekundär. Als zytotoxisch werden z.B. Transferrin, Lipoproteine und Komplementfaktoren identifiziert, die im Rahmen einer Proteinurie auftreten. (Bruzzi et al. 1997) Dies gilt auch für die von Albumin und Lipoproteinen gebundenen Lipide. Insbesondere die Rückresorption von Makroproteinen aktiviert Tubuluszellen zur Produktion von u.a. Zytokinen wie TGF-ß und

CTGF, also proinflammatorischen Substanzen, die zu einer verstärkten Matrixproduktion und Vernarbung führen (Praga und Morales 2002).

1.3 Transforming Growth Factor

Die allgemeine Unterteilung der Zytokine aus der Familie des Transforming Growth Factors (TGF-ß) erfolgt in die TGF-α- sowie die TGF-β-Superfamilie und die BMP-Familie. Letztere stellt hierbei eine Untergruppe des TGF-ß dar. Auf der einen Seite wirkt TGF-ß fördernd im Rahmen der Embryogenese oder der Wundheilung, auf der anderen Seite ist es aber auch verantwortlich für die Ausbildung einer Nierenfibrose (Border und Noble 1994). Hierzu stellten Zeisberg et al. 2002 fest, dass TGF-ß Podozyten zur Produktion der EZM stimuliert.
Es existieren 5 Isoformen des TGF-ß, wobei in Säugern bisher nur drei Formen (TGF-ß1, TGF-ß2 und TGF-ß3) nachgewiesen wurden.

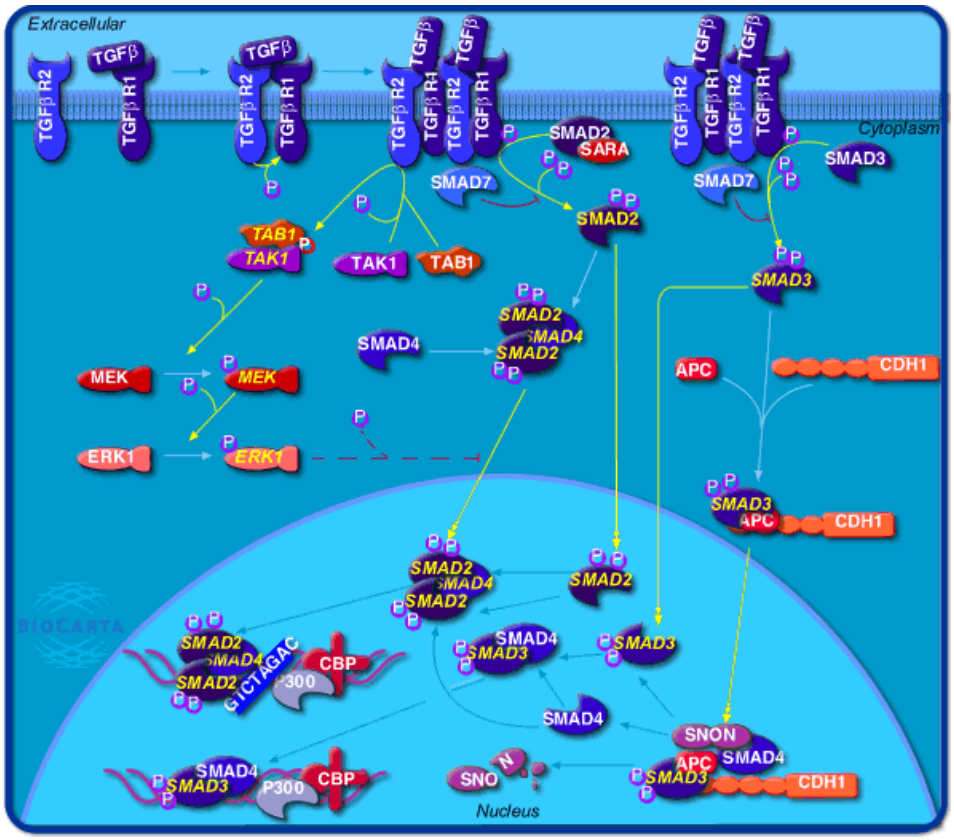


Abbildung 1: TGF-ß-Pathway nach Biocarta (http://www.biocarta.com/pathfiles/h_tgfbPathway.asp): Nach TGF-ß-Bindung an TGF-ß-Rezeptor 2 bildet dieser mit dem phosphorylierten TGF-ß-Rezeptor 1 ein Tetramer. Intrazelluläre Kaskade erfolgt dann weiter über Smad-Proteine (Abb. 2 und 3)

Signalweg: Nach Bindung des TGF-ß an den transmembranen Seronin-Threonin-Kinase-TGF-ß-Rezeptor 2 kommt es mit dem TGF-ß-Rezeptor 1 zur Bildung eines Tetramers und zur

Phosphorylierung des Rezeptors 1. Die intrazelluläre Signalübertragung erfolgt daraufhin über phosphorylierte Smad-Proteine, wobei folgende Smad-Unterteilung existiert:

R-Smad-Vertreter (rezeptor-reguliert), wie Smad 2 und Smad 3, werden im Beisein von SARA (Smad anchore for receptor activation) rezeptorvermittelt phosphoryliert und somit aktivert. So genannte Co-Smads wie Smad 4 bilden mit R-Smads Komplexe, welche die Transkription ihrer Zielgene über direkte Bindung an die DNA regulieren. Insbesondere Smad 2 und 3 sind in Studien für die Ausbildung einer renalen Fibrose verantwortlich gemacht worden (Li et al. 2004, Flanders 2004).

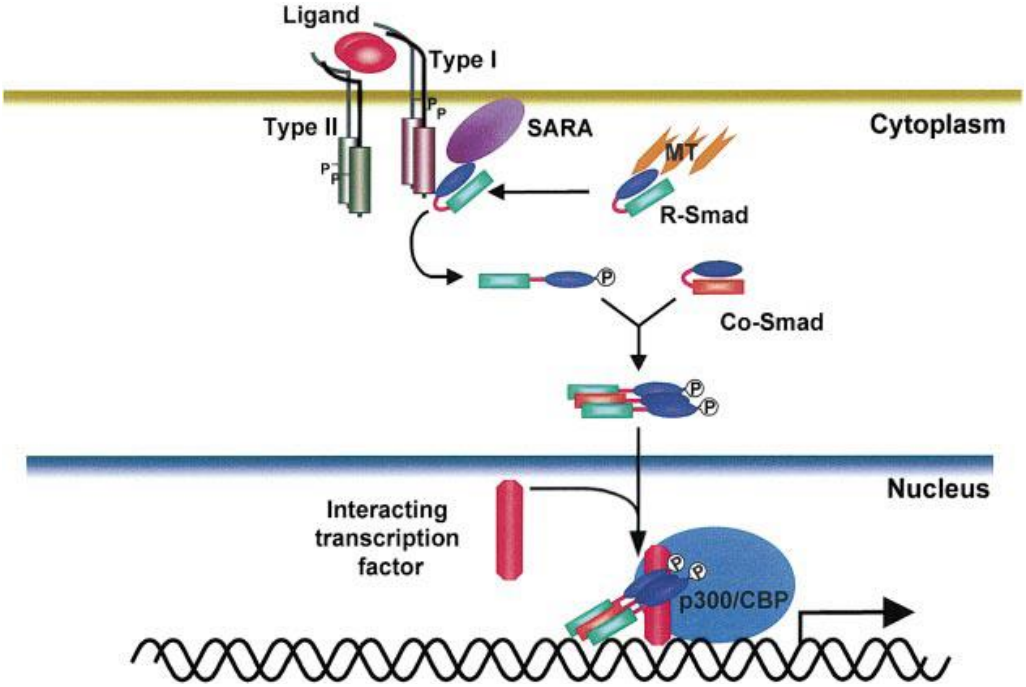


Abbildung 2: aus Itoh et al. 2000, S. 6956: Aktivierung von R- und Co-Smads. R-Smad-Vertreter wie Smad 2 und 3 werden im Beisein von SARA unter Phosphorylierung aktiviert. In Verbindung von Co-Smads wie Smad 4 kommt es zur Bildung von Komplexen, welche zur DNA-Bindung die Zielgentranskription regulieren.

Smad 6 und Smad 7 gehören zu den inhibitorischen I-Smads, die das Signal der Serin-Threonin-Kinase hemmen und somit autoinhibitorisch wirken, da ihre Expression direkt durch TGF-ß gefördert wird (Itoh et al. 2000, Miyazono et al. 2000).

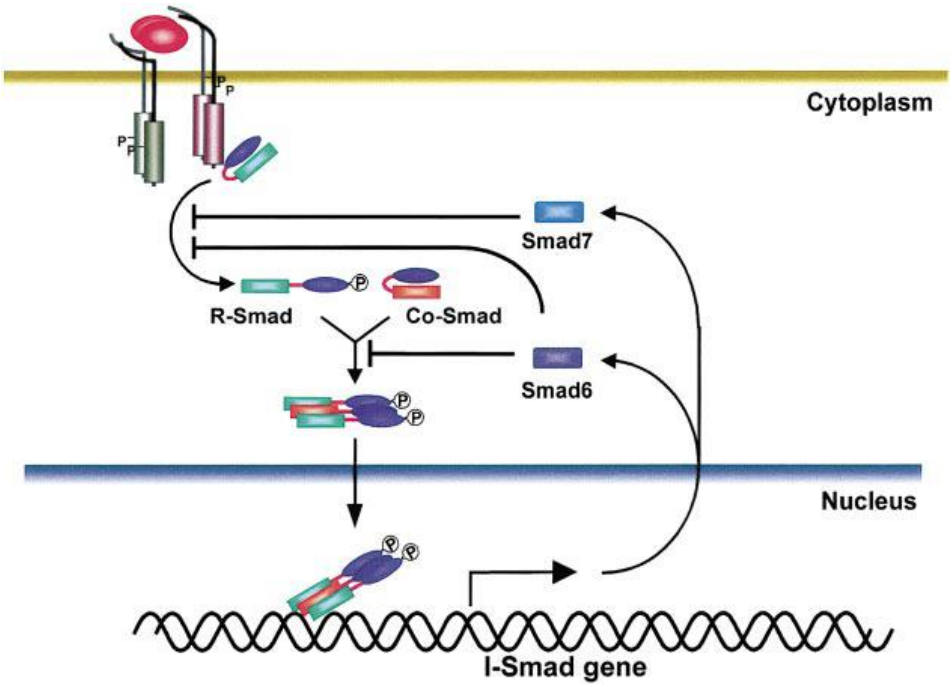


Abbildung 3: aus Itoh et al. 2000, S. 6957: Mechanismus der I-Smads: Als autoinhibitorische Smads wirken sie entweder als Smad 7 direkt hemmend auf die Serin-Threonin-Kinase des TGF-ß-Rezeptor-1-und-2-Tetramers oder sie verhindern eine Stufe tiefer in der Kaskade die Komplexbildung aus R- und Co-Smads (Bsp. Smad 6)

Zusätzlich werden Smads noch durch andere Mechanismen, wie z.B. MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases), reguliert.

1.4 Connective Tissue Growth Factor

Connective Tissue Growth Factor (CTGF) ist ein 36- zu 38-kDa großes cysteinreiches Peptid, welches als Promotor für Proliferation, Kollagensynthese und Chemotaxie durch mesenchymale Zellen dient (Grotendorst 1997) und durch TGF-ß induziert wird (Wahab et al. 2001, Riser et al. 2000). Sowohl CTGF als auch TGF-ß sind im Nierengewebe gesunder Tiere nicht nachweisbar (Girgert et al. 2010).

Seit Längerem ist bekannt, dass das Auftreten von CTGF in enger Verbindung zu TGF-ß insbesondere in fibrotischen Geweben steht, wobei TGF-ß die CTGF-Expression über die Bindung des oben erwähnten Smad3 an den CTGF-Promotor induziert (Girgert et al. 2010). Allerdings wird gemutmaßt, dass CTGF auch allein profibrotisch wirkt. In einem negativen Rückkopplungsmechanismus kann CTGF TGF-ß sogar unterdrücken (Zhang et al. 2004).

CTGF eignet sich in absehbarer Zukunft nicht als therapeutischer Angriffspunkt, da am Knockout-Mäusemodell gezeigt werden konnte, dass es zu einer verminderten

Chondrozytenproliferation und überschießenden Bildung extrazellulärer Matrix, auf die nachfolgend noch eingegangen werden soll, kam, was sich letztendlich in einem abnormen Skelett widerspiegelte (Ivkovic et al. 2003).

1.5 Glomeruläre Basalmembran (GBM) und interstitielles Bindegewebe als Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM)

Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Gebilde, welches sowohl aus strukturgebenden als auch funktionellen Molekülen besteht (Bosman und Stamenkovic 2003). Zusammen mit dem interstitiellen Bindegewebe bildet die Basalmembran bzw. hier die glomeruläre Basalmembran (GBM) die EZM. Im Wesentlichen besteht die EZM aus Kollagenen, Glykoproteinen und an Proteine gebundenen Glykosaminoglykanen (GAG), den so genannten Proteoglykanen. Die wichtigsten Vertreter der Proteoglykane stellen Chondroitinsulfat, Keratan- und Heparansulfat dar, während unter den Glykoproteinen Fibronektin und Laminin zu nennen sind. Die Hyaluronsäure hingegen nimmt einen Sonderstatus ein, indem sie zwar zu den Glykosaminoglykanen gehört, jedoch nicht an Proteine gekoppelt und deshalb Non-Proteoglykan genannt wird.

Interstitielle Matrix

Die interstitielle Matrix besteht im Wesentlichen aus den Kollagentypen I und III, aus Fibronektin sowie Glykoproteinen und Proteoglykanen, welche die Nierentubuli umgeben. Typ-I-Kollagen stellt die bedeutendste interstitielle Matrixkomponente dar (Merker 1994). Zusätzlich lagern sich in ihr Fibroblasten und Immunzellen, wie Mastzellen und Makrophagen, ein.

Glomeruläre Basalmembran (GBM)

Die Basalmembran ist eine spezialisierte Form der Extrazellulären Matrix, da sie Epithelien gegenüber dem Interstitium abgrenzt. Die glomeruläre Basalmembran (Abb. 4) unterscheidet sich von Basalmembranen in anderen Standorten dadurch, dass sie auf beiden Seiten begrenzt ist, nämlich durch Endothelzellen und Podozyten. Nach Abrahamson et al. (2009) stellt die glomeruläre Basalmembran ein Fusionsprodukt aus Endothel- und Epithelzellen (Podozyten) dar. „Die GBM besteht aus drei Schichten: einer zentralen elektronendichten Lamina densa, an die sich beidseits eine Schicht geringerer Elektronendichte anschließt (Lamina rara externa und interna). Die den Endothelzellen zugewandte Schicht wird als Lamina rara interna und die den Podozyten zugewandte als Lamina rara externa bezeichnet. Beide Laminae rarae sind

von filamentösem Material durchsetzt, das auf der einen Seite an die Podozyten und auf der anderen an die Endothelien reicht. Das die GBM aufbauende Material ist über Disulfidbrücken und kollagenartige Bindungen stark quervernetzt. Es besteht, wie auch in anderen Basalmembranen, aus Typ-IV-Kollagen, Laminin, Proteoglykanen, Nidogen (Entacin) und weiteren Bausteinen. Das nicht Fibrillen bildende Kollagen Typ IV (siehe dazu nächster Abschnitt) ist das Grundgerüst der Lamina densa. Proteoglykane sind für die gitterartigen Anordnungen in beiden Laminae rarae verantwortlich. Sowohl Laminin als auch Nidogen sind in allen drei Basalmembranschichten vorhanden.“ (Pavelka und Roth 2005, S . 166)

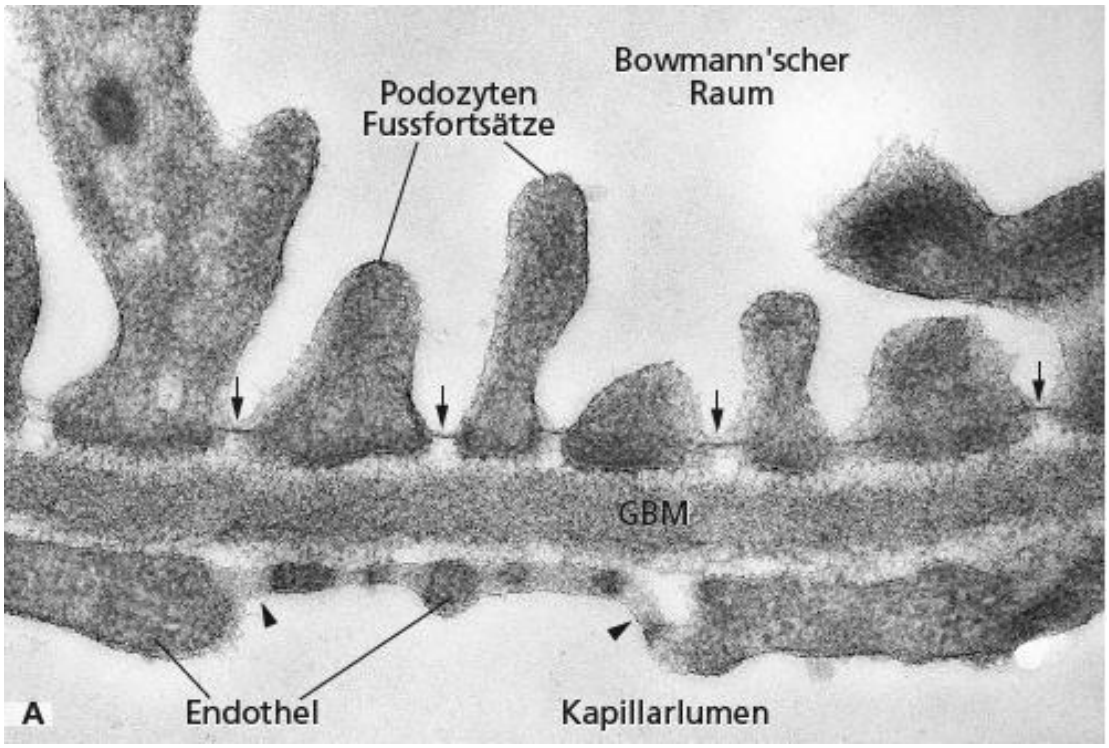


Abbildung 4: Aus Roth und Pavelka 2005, S. 167. Elektronenmikrospkopische Darstellung der glomerulären Basalmembran, Pfeile: Schlitzdiaphragmen zwischen den Podozyten, Pfeilköpfe: Angeschnittene Poren der Endothelien

Von Bedeutung im Rahmen dieser Arbeit sind vorrangig Kollagen, Laminin und Fibronektin, während auf die restlich genannten Bestandteile nicht eingegangen werden soll.

Podozyten

Der glomeruläre Filter besteht aus einem durchlässigen Endothel, der GBM sowie einer Schlitzmembran. Letztere wird durch die Fußfortsätze hochspezialisierter Epithelien, die Podozyten gebildet. Diese Epithelzellen stellen das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel dar.

Mit eben jener Membran wird der Filtrationsschlitz überbrückt und die selektive Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere bestimmt.

Podozyten produzieren Komponenten der GBM und sind für deren Ausreifung zuständig. Um die Dynamik der reifen GBM zu gewährleisten, produzieren Podozyten nicht nur ihre Bestandteile, sondern aktivieren zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes aus Auf- und Abbau auch matrixmodifizierende Proteine, wie Matrix Metalloproteinasen (MMP).

Podozyten organisieren den Austausch des präadulten Laminin-1 gegen Laminin-11 und wirken auch beim Wechsel der präadulten α-1- und α-2-Ketten des Kollagen IV gegen die adulten α-3-, α-4- und α-5-Ketten.

Kommt dieser Austausch nicht zu Stande, hat dies strukturelle und funktionelle Defekte (Proteinurie) zur Folge. So zeigten verschiedene Studien eine Aktivierung der TGF-ß-Signalkaskade in geschädigten Podozyten in vivo auf. In Zellkulturen induzierten TGF-ß und Smad7 die Apoptose von Podozyten, was insofern schwerwiegend ist, als dass Podozyten post-mitotische Zellen sind und ihr Verlust irreversibel ist (Pavenstädt et al. 2003).

Kollagene und Kollagen IV

Kollagen ist das mit Abstand am meisten vorzufindende Protein im Bindegewebe und mit 25-35 % das häufigste im menschlichen Organismus überhaupt. Aktuell sind 29 verschiedene Kollagene bekannt (Söderhäll et al. 2007). Auffällig an der Primärstruktur ist, dass jede dritte Aminosäure Glycin ist. Durch das zahlreiche Auftreten dieser kleinsten Aminosäure wird die helikale Ausbildung auf engem Raum erst möglich. Allen Kollagenen ist gemeinsam, dass jeweils drei α-Ketten eine Tripelhelix bilden, wobei die Tertiärstruktur zudem nicht wie üblich rechts-, sondern linksdrehend auftritt.

Die Tripelhelix des Kollagen IV wird als ein so genanntes Heterotrimer bezeichnet. Nachgewiesen wurden die Kettenkombinationen α1/α1/α2, α3/α4/α5 sowie α5/α5/α6, wobei Erstgenannte mit Ende der Embryonalentwicklung an Bedeutung verliert. Viel signifikanter erscheint allerdings, dass Kollagen IV sich netzartig ausbreitet, was sonst nur beim Kollagen VIII (in Endothelien) und X (im Knorpel) beobachtet wird. Häufiger findet man fibrilläre Kollagene, was aber auch dem Umstand geschuldet ist, dass Kollagen I den häufigsten Vertreter der Kollagene darstellt. Wie im Kapitel 1.6 noch ausgeführt wird, besitzt Kollagen IV eine Bindungsstelle für Integrine. Genauer betrachtet heißt dies, dass das tripelhelikale Cyanogen-Bromid-Fragment CB3[IV] im Kollagen IV, welches 100 nm vom N-terminalen Molekülende entfernt ist, eine Bindungsstelle für ITGA1 und ITGA2 besitzt (Eble et al. 1993).

Neben dem erwähnten Alport-Syndrom tritt als eine weitere Kollagen-IV-assoziierte Erkrankung das Goodpasture-Syndrom auf, das neben den Nieren auch die Lunge befällt und im Gegensatz zum Alport-Syndrom keinen Einfluss auf Seh- und Hörleistung nimmt. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um eine hereditäre Erkrankung, sondern um eine Autoimmunerkrankung, die für die Bildung von Autoantikörper gegen die nicht-kollagene Domäne (NC1) der alpha3-Kette des Kollagen IV verantwortlich ist (Kalluri et al. 1995).

Laminin

Laminine als Glykoproteine sind ein wichtiger funktioneller Bestandteil aller Basalmembranen, da sie Zelladhäsion, Migration und Proliferation unterstützen (Timpl et al. 1979). Sie bestehen alle aus jeweils drei Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Insgesamt sind 5α-, 4β- und 3γ-Ketten bekannt, aus denen sich in vivo 15 verschiedene Laminine nachweisen lassen. Gleichzeitig erfolgt die Namensgebung für das jeweilige Laminin in Abhängigkeit seiner Kettenkombination (Aumailley et al. 2005). Nach dieser neuen Nomenklatur wird z.B. Laminin-1, das früher unter dem Namen EHS-Laminin bekannt war, aufgrund der Kettenbausteine α1/β1/γ1 nunmehr als Laminin-111 bezeichnet. Wichtig ist auch die Fähigkeit der Laminine, Kollagen IV direkt oder über Perlecan und Nidogen zu binden (Beck et al. 1990) und damit das stabile Netzwerk der Basalmembran auszubilden. Des Weiteren werden sie auch von Integrinen wie dem ITGA2 gebunden (Belkin und Stepp 2000).

Fibronektin

Wie Laminin gehört Fibronektin zu den Glykoproteinen und existiert in 2 Formen: das so genannte Plasmafibronektin sowie das unlösliche Fibronektin, das v.a. durch Fibroblasten produziert wird (Muro et al. 2003). Wie beim Laminin liegt seine Hauptfunktion im Bereich der Adhesion der interstitiellen Matrix an die Basalmembran. So besitzt es eine RGD-Sequenz und kann von einer Vielzahl von Integrinen gebunden werden. Allerdings besteht es nur aus 2 Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

1.6 Integrine

Auf Zellen sind drei Typen oberflächlicher Rezeptoren für Kollagen bekannt: Integrine, Discoidin-Domäne-Rezeptoren und das Glykoprotein VI. Alle drei lösen unabhängig voneinander eine Vielzahl von Signalwegen der Kollagenbindung aus. Außer der Regulation verschiedener zellulärer Antworten sind sowohl die Integrine als auch die Discoidin-Domäne-Rezeptoren für die Integrität der kollagenen Komponente der extrazellulären Matrix durch die Steuerung von Auf- und Abbau der Matrix verantwortlich (Vogel WF 2001).

Integrine, die seit ihrer Entdeckung im Jahre 1987 zu den am besten verstandenen Zelladhäsionsrezeptoren (Hynes 1987) gehören, sind Transmembranmoleküle, die als heterodimere Rezeptoren aus je einer α- und β-Untereinheit bestehen. Beide Untereinheiten gehen eine nichtkovalente Bindung ein und durchdringen jeweils die Zellmembran, wobei im Vergleich zum extrazellulären Anteil der zytoplasmatische Anteil sehr kurz ist. Diese Rezeptoren stellen eine dynamische Verbindung zwischen den extrazellulären Molekülen bzw. Matrix und dem intrazellulären Aktinzytoskelett dar (Humphries 2000). Ihre intrazellulären Funktionen beinhalten neben Wachstum und Proliferation auch Apoptose (Giancotti und Ruoslahti 1999).

In Abhängigkeit davon, ob Integrine Signale in Richtung extra- („inside-out signaling“) oder intrazellulär („outside-in signaling“) durch die Zellmembran vermitteln, ändern sie ihre Konformation (Giancotti und Ruoslathi 1999; Giancotti und Tarone 2003).

Beim Menschen bekannt sind 18 α- und 8 β- Untereinheiten, aus denen sich 24 verschiedene Rezeptoren generieren lassen (Abb. 5).

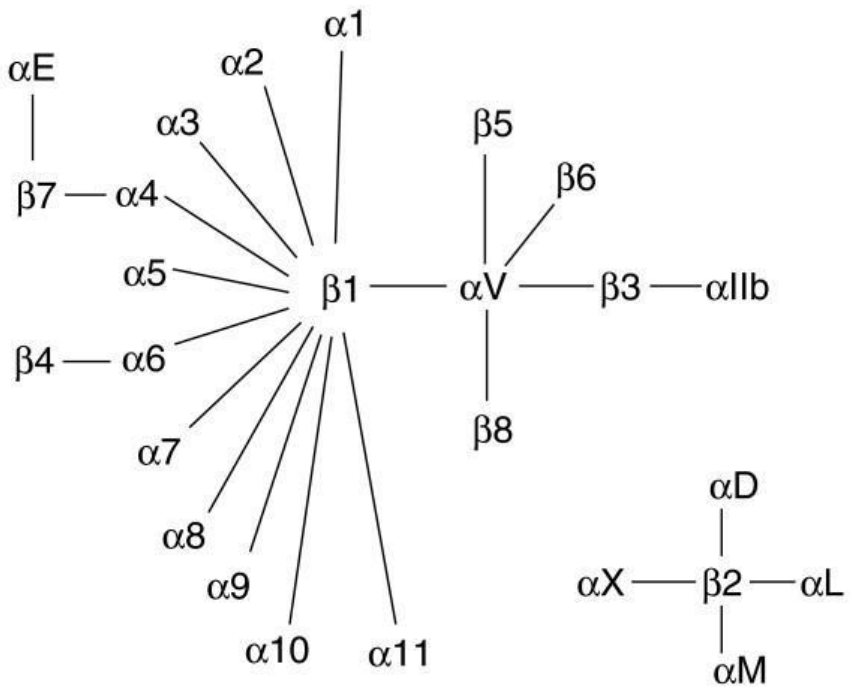


Abbildung 5: Die Mitglieder der menschlichen Integrin-Superfamilie und die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten zur Bildung eines heterodimeren Integrins (Takada et al. 2007, S. 2).

Neben ihrer oben genannten Fähigkeit, Moleküle der extrazellulären Matrix zu binden (Hynes 1999), sind sie auch im Stadium der embryonalen Entwicklung und bei immunologischen Prozessen wichtig (Takada et al. 2007). Wie DDRs (siehe Kapitel 1.8) werden auch Integrine durch die tripel-helikale Struktur von Kollagen I und IV aktiviert (Vogel W et al. 2000). Erkennen Integrine, wie z.B. α1β1, das Kollagen, so kommt es zur Herunterregulation der Kollagensynthese (Gardner et al. 1999).

Integrine vermitteln Signalkaskaden von der EZM in die Zelle durch Adaptermoleküle, wie z.B. FAK (*focal adhesion kinase*), ILK (*integrin-linked kinase*), PINCH (*particularly interesting new cysteine-histidine rich protein*) und Nck2 (*non-catalytic (region of) tyrosine kinase adaptor protein 2*). Diese Adaptermoleküle mit Kinaseaktivität sind notwendig, da Integrine im Gegensatz zu DDRs über keine intrinsisch enzymatische (katalytische) Aktivität verfügen (Hehlgans et al. 2007). Letztendlich wird der Signalweg für die JNK (*Jun NH_2-terminal kinase*) freigeschaltet (Oktay et al. 1999).

1.6.1 α2β1 –Integrin

In Abhängigkeit ihrer Ligandenspezifität, die durch die jeweiligen Unterheiten festgelegt wird, kann man Integrine in Laminin-bindende Integrine, Kollagen-bindende Integrine oder auch leukozytäre Integrine unterteilen. Dass α2β1-Integrin als Kollagenrezeptor fungiert, ist bereits länger bekannt (Kramer und Marks 1989, Vandenberg et al. 1991). Als Kollagen- und Lamininrezeptor wird α2β1 –Integrin auf Thrombozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen exprimiert (Chen et al. 2002).

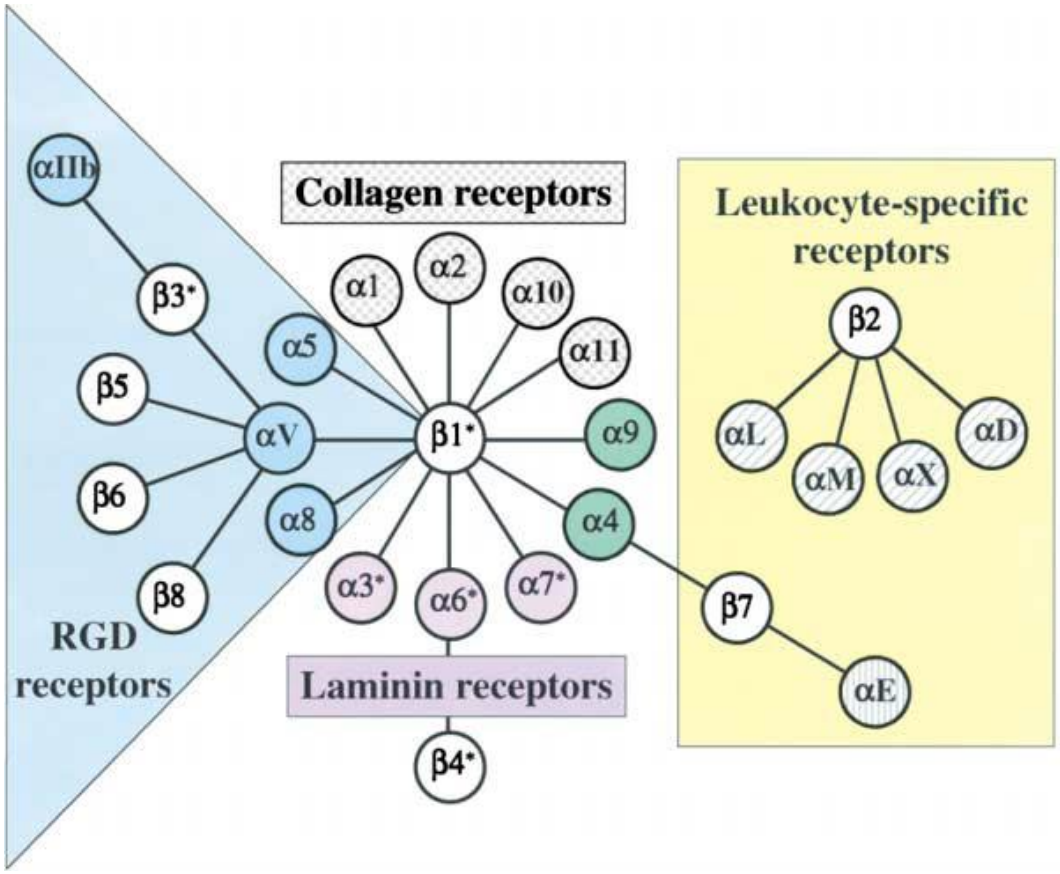


Abbildung 6: Integrine sind Heterodimere, zur Auswahl stehen 8 ß-Untereinheiten, die mit 18 α-Untereinheiten insgesamt 24 verscheidene Integrinrezeptoren bilden können. (Hynes 2002, S. 674)

Das ITGA2-Knockout-Mausmodell basiert auf der Ablation der Alpha2-Untereinheit unter Erhaltung der ß1-Untereinheit, da der Verlust letzterer bereits im Stadium der Implantation nicht überlebt wird (Hynes 2002). Als Grundlage diente der 1921 von Little gezüchtete Mausstamm C57Bl6.

Verweisend auf die Arbeiten von Girgert 2010 sowie Chen et al. und Holtkötter et al. aus dem Jahre 2002 wurden die Methoden zur Generierung einer ITGA2-Knochout-Maus bereits beschrieben. Die Untersuchung von ITGA2-ausgeknockten Tieren zeigte einen sehr vielschichtigen Phänotyp. So fand sich unter anderem eine herabgesetzte Affinität der Thrombozyten zum Kollagen I, allerdings ohne Komplikationen, wie z.B. Blutungen (Chen et al. 2002; Holtkötter et al. 2002). Unabhängig davon war dieser Phänotyp nicht letal, wie zum Beispiel die α5-Knockout-Maus, welche bereits während der Embryogenese verstarb (Yang et al. 1993).

Bisherige ITGA2-KO-Studien in Hinblick auf den renalen Phänotyp ahmten den renalen Phäntyp von DDR1 ausgeknockten Mäusen nach. So zeigten sich elektronenmikroskopisch lokalisierte Verdickungen der GBM, sowie Protrusionen der Podozyten zur Primärharnseite bei unauffälliger Darstellung der Podoyztenfortsätze. Des Weiteren fielen Mäuse ohne ITGA2 mit einer moderaten Proteinurie und einer erhöhten glomerulären und tubulointerstitiellen Matrixakkumulation und Fibrose bei gleichzeitigem Anstieg von TGF-ß und CTGF auf (Girgert et al. 2010). Kreuzungen mit COL4A3-KO-Mäusen führten hingegen zu einem verlängerten Überleben, einer besseren Nierenfunktion und weniger glomerulären Matrixablagerungen im Vergleich zu COL4A3-KO-Mäusen (Gross et al. 2013, unveröffentlichte Daten). ITGA2 scheint somit ein positiver Regulator der Kollagensynthese zu sein, welcher im Falle einer Nierenschädigung überexprimiert wird (Borza et al. 2012).

1.7 Tyrosinkinaserezeptoren

Eine Vielzahl von Rezeptoren, die Signalweitergaben durch Zellmemebranen ermöglicht, gehört zur Familie der Tyrosinkinaserezeptoren (RTK). Von den 90 bekannten Tyrosinkinasegenen kodieren 58 für Tyrosinkinaserezeptoren (Robinson et al. 2000). Es sind 17 Untergruppen (www.genome.ad.jp) bekannt, deren Ligandenspezifität durch die extrazelluläre Domäne bestimmt wird (Manning et al. 2002). Wie Integrine so sind auch RTK ein essentieller Bestandteil bei Zellteilungen oder Differenzierungen. Im Gegensatz zu Integrinen kommt es zur Autophosphorylierung bei Bindung eines spezifischen Liganden und damit zur Aktivierung zytoplasmatischer Signalkaskaden mit folgender Transkription von Zielgenen.

1.7.1 Discoidin-Domain-Rezeptor, DDR1

Discoidin-Domain-Rezeptoren (DDR) stellen eine Subfamilie von Tyrosinrezeptorkinasen dar, die selektiv in einer Reihe von verschiedenen Zelltypen und Organen exprimiert werden und deren Spezifität durch einen 160 Aminosäure langen extrazellulären Discoidin-Anteil bestimmt wird. Klonierungen der cDNA haben gezeigt, dass DDR1 und DDR2 fetal ubiquitär vorkommen. DDR1 findet sich überwiegend in der Entwicklung des Neuroektoderms (Zerlin et al. 1993). Später beschränkt sich die Expression insbesondere auf Epithelzellen, auf Teile des ZNS, der Lunge, der Nieren und des Gastrointestinaltraktes (Vogel W et al. 1997). Nach Aktivierung über Kollagen regulieren DDRs Zelladhäsion, Proliferation und Remodeling der EZM (Vogel WF et al. 2006). Im Vergleich zu den meisten RTKs werden sie nicht durch lösliche Wachstumsfaktoren aktiviert. DDR1 wird hierbei insbesondere über die native tripel-helikale Struktur des Typ I und IV- Kollagens aktiviert und zwar unabhängig vom Einfluss anderer Faktoren, wie z.B. der Integrine (Vogel W et al. 2000), weshalb DDRs auch als so genannte Nicht-Integrin-Rezeptoren für Kollagen bezeichnet werden. DDR2-Rezeptoren lassen sich hingegen nur durch fibrilläre Kollagene, wie Typ I, II, III, V und XI, aktivieren, während Typ IV zu den so genannten netzbildenden Kollagenen gehört (Prockop und Kivirikko 1995). Da Kollagen Typ IV der häufigste Bestandteil der GBM ist und der DDR1-Rezeptor von Podozyten exprimiert wird, haben verschiedene Studien den Einfluss von DDR1 in der Regulation mesangialer Proliferation, der GBM-Verdickung, der renalen Fibrose und der Entwicklung inflammatorischer Vorgänge im Nierengewebe diskutiert. So unterstellten Hahn et al. 2010, dass DDR1 eng mit der Ausbildung einer Proteinurie im Rahmen der kindlichen IgA-Nephritis assoziiert ist (Hahn et al. 2010). Bekannt ist seit Längerem, dass der Verlust von DDR1 am Knockout-Tiermodell zu lokalisierten Verdickungen der epithelialen (podozytären) GBM und zum Verlust der Schlitzmembran sowie einer moderaten Proteinurie führt, was darauf hindeutet, dass die fehlende Interaktion der GMB mit DDR1 in einer Matrixüberproduktion mündet (Gross et al. 2004). Auch der Phänotyp DDR1 -/- war überlebensfähig. Allerdings muss erwähnt werden, dass ein hoher Prozentsatz der Weibchen die Schwangerschaft bei fehlender Implantation der Blastozyste nicht austrug. Hinzu kam, dass die Knockout-Muttertiere nicht in der Lage waren, ihre Jungen zu stillen, da das Brustdrüsenepithel nicht zur Laktation befähigt ist (Vogel WF et al. 2006). Diese Erschwernis wurde durch Wildtyp-Ammen-Weibchen bzw. Verwendung von heterozygoten Weibchen gelöst.

1.8 Zielsetzung

Zielstellung der Arbeit war es, die beiden Kollagenrezeptoren ITGA2 und DDR1 am Doppelknockout-Tiermodell zu betrachten. Dies geschah unter dem Aspekt, dass bislang beide Rezeptoren nur getrennt voneinander im Hinblick auf die Entwicklung einer Nierenfibrose geprüft wurden.
Im Rahmen der Histologie, Bestimmung der Proteinurie, Immunhistochemie und der Detektion von Zytokinen mittels Western-Blot ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie entwickelt sich der renale Phänotyp bei Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zur bisher getrennten Beobachtung von Knockout-Mäusen vom Typ DDR1 bzw. ITGA2?

2. Ist die glomeruläre Basalmembran normal beschaffen?

3. Sind nierenschädigende Faktoren, wie Proteinurie oder profibrotische Zytokine, nachweisbar? Und wenn ja: Wie ändern sich diese im Verlauf?

4. Sind diese Tiere unter der Hypothese, dass beide Kollagenrezeptoren für die normale GBM-Struktur von Bedeutung sind, im mittleren Überleben beeinträchtigt?

2 Material und Methoden

Die Tierzucht wurde angezeigt. Nach dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) definiert der Gesetzgeber Tierversuche nach §7 Abs.1 TierSchG „als Eingriffe oder Behandlungen zu Versuchszwecken Nr.1 an Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für dieses Tier oder Nr.2 am Erbgut von Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die erbgutveränderten Tiere oder deren Trägertiere verbunden sein können“. Unter diesen Maßgaben fanden keine Tierversuche in den folgenden Versuchsanordnungen statt.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in Polykarbonat-Makrolon®-Käfigen vom Typ II lang, die über eine Bodenfläche von mindestens 360 cm^2 sowie ausreichend Einstreu (> 2 cm) und Holzwolle zum Nestbau verfügen. Über einen direkten Anschluss der Lüftungsanlage an die Käfige konnten die empfohlene Temperatur und Luftfeuchte gewährleistet werden, während der Tag-Nacht-Rhythmus (je 12 Stunden) über eine entsprechende Lichtregulation nachempfunden wurde. Trockenfutter in Pelletform in einer Raufe des Käfigdeckels sowie eine Wasserquelle standen den Tieren ad libitum zur Verfügung (Weiss et al. 2008).

Unter Berücksichtigung tierschutzgerechten Tötens kleiner Labortiere erfolgte die Tötung der Mäuse durch abrupte zervikale Dislokation. ITGA2- Knockoutmäuse in einem reinen C57BL/6- Hintergrund wurden von Frau Dr. B. Eckes (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Klinikum der Universität Köln) zur Verfügung gestellt. Die Generierung der DDR1-Knockoutmäuse erfolgte mittels Mäusen vom Stamm 129/Sv und wurden freundlicher Weise durch Prof. W. Vogel (University of Toronto) bereitgestellt.

2.1 Material

2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
H.E.-Färbeautomat	53STX	StainixDiapath
Mikroskop	S100TV Axiovert	Zeiss
Paraffinstreckbad	runde Ausführung	Medax
Schneidevorrichtung	Autocut 2040 Microtome	Reichert-Jung

2.1.2 Elektrophorese:

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	Protean Cell	BioRad
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph
Spannungsgerät	E835	Consort
Speed Vakuumzentrifuge	Vacuum centrifugator	Bachofer
Vortexer	Vortex-2-Genie	Scientific Industries
Waage	LA 620S	Sartorius
Zentrifuge	Z 233M	Hermle

Chemikalien	Hersteller
Chloroform	Merck
Coomassie Brillant Blue G-250	BioRad
Methanol	Merck
Polyacrylamidgel (4-12 % Bis-Tris Gel)	NuPage , Invitrogen
Probenpuffer/ LDS Sample Buffer (4x) pH 8,5: Tris HCl 106mM, Tris 141 mM, Lithiumdodecylsulfat (LDS) 2%, Glycerol 10%, EDTA 0,51 mM, Coomassie Blue G250 0,22 mM, Phenolrot 0,175mM	NuPage, Invitrogen
MOPS SDS-Running-Buffer 20x pH 7,7: Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) 50 mM, Tris 50mM, SDS 0,1%, EDTA 1mM	
Sea Blue Plus 2 Marker	NuPage , Invitrogen

2.1.3 Immunhistochemie Laminin/Fibronektin:

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert S 100 TV	Zeiss
Heizplatte	Thermoplatte	Schütt-Biotec
Ofen	Convection Oven MOV-112F	Sanyo
Paraffinstreckbad	runde Ausführung	Medax
Schneidevorrichtung	Autocut 2040 Microtome	Reichert-Jung

Chemikalien	Hersteller
Ethanol 70% ,80%, 90% und absolut	Merck
Xylol	Merck
Poteinase K	AppliChem
Tris-Puffer pH 7,5	AppliChem
Citrat-Puffer	AppliChem
TBS (10x) pH 7,4: Tris, pH 7.4, NaCl	Sigma Aldrich
BSA	Bio-Rad
Fluorescenc Mounting Medium	DAKO

Antikörperspezies	Hersteller und Bestellnummer
Primärantikörper	
Anti-Laminin: Kaninchen-Anti-Maus	Abcam ab 11575
Anti-Fibronektin: Maus Anti-Fibronektin	Acris BM422
Sekundärantikörper	
Laminin: Ziege-Anti-Kaninchen+ Cy3	Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc.
Fibronektin: Ziege-Anti-Maus+ Cy3	Dianova

2.1.4 Western-Blot:

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Homogenisator	Ultraturrax	Fisher
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph
Photometer	UV-120-01	Shimadzu
Röntgenfilm Kodak		Hohenbrunn
Spannungsgerät	E835	Consort
Vortex	Vortex-2-Genie	Scientific Industries

Waage	LA 620S	Sartorius
Western-Blot-Kammer	Mini-Protean 3 Cell	Hercules
Western-Blot-Kammer	Tankblot-Apparatur	Biorad
Whatman-Papier		Biorad
PVDF-Membran	Immun-Blot Membrane	Biorad
Zentrifuge	Z 233M	Hermle

Chemikalien	Hersteller
Proteinlysepuffer:	
10 mM Kaliumphophatpuffer (pH=7,0): 0,07M K_2HPO_4 und 0,03m KH_2PO_4 ad 100ml (Merck)	
0,1 % Brij-35	Roth
0,5% NP-40	MP Biomedicals
5 mM EGTA	SIGMA
10 mM EDTA	SIGMA
10 µM Leupeptin	SIGMA
10 mM $MgCl_2$	Merck
10 µM Pepstatin	SIGMA
1 mM PMSF	AppliChem
50 mM ß-Glycerophosphat	SIGMA
Proteinbestimmung:	
Bovine-Serum-Albumin/Quick Start Reagenz	Biorad
Elektrophorese:	
Antioxidanz	NuPage, Invitrogen
Polyacrylamidgel (4-12 % Bis-Tris Gel)	NuPage, Invitrogen
Probenpuffer/ LDS Sample Buffer (4x)	NuPage, Invitorgen
Reduktionspuffer/ Sample Reducing Agent (10x)	NuPage, Invitrogen
SDS-Running-Buffer	NuPage, Invitrogen
Detektion, Blotten und Strippen	
Chemolumineszenz-Reagenz ECL-Plus	GE-Healthcare
Magermilch	Merck
Restore Western-Blot Stripping Buffer	Biorad

10x TBST (pH 7,6): 121g Tris, 175 NaCl, 10 ml Tween 20 ad 2l dH_2O

Antikörperspezies	Hersteller und Bestellnummer
Primärantikörper	
Anti-Actin: Kaninchen-Anti-Maus	Sigma A2103
Anti-CTGF: Kaninchen-Anti-Maus	Biovision 5553R
Anti-TGF: Antikörper aus Maus	R&D Systems MAB240
Sekundäreantikörper	
Kaninchen-Anti-Maus IgG / HRP	DAKO P0161
Ziege-Anti-Kaninchen IgG / HRP	DAKO P0448

2.1.5 In-situ-Hybridisierung:

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Nylonmembran		MolGyn
Säulen	Micrp-Spin S300 HR 50	GE Amersham
Superfrost-Plus-Objektträger		Thermo Fisher

Chemikalien/Antikörper	Hersteller
2-Propanol	Merck
AEC	Substrate Systems
Agarose (1,5 %)	AGS GmbH
AK-Diluent	Biocare
Anti-DIG-AP	Roche
Aqua-Mount™ Aqueous Mounting Medium	DAKO
DDT	Sigma
Deionisiertes Formamid	Roth
Denhardt`s (50 x): 5 g Ficoll (Typ 400), 5 g Polyvinylpyrrolidon	
DEPC	AppliChem
DIG-Kontroll-RNA	Roche
DIG-Labeling-Kit	Roche
EDTA	Merck
Ethanol (60%, 80% und 90%)	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Goat-anti rabbit HRP	DAKO
Hämalaun	AppliChem
Lachs-Spermien-DNA	Sigma

LiCl	Merck
Loading-Buffer	Merck
Magermilchpulver	Merck
NBT/BCIP	Roche
NTP-Mix	Amershan
PBS pH 7,4: KH_2PO_4 (1,06 mM) 144 mg/l, NaCl (155,2mM) 9000mg/l, Na_2HPO_4-$7H_2O$ (2,97 mM) 795 mg/l	Gibco
PCR-Puffer	PeqLab
Rabbit-anti-DIG HRP	Roche
RNAse-Inhibitor Riboblock 2500U	MBI Fermentas
RNeasy Mini-Kit	Qiagen
Sek. AK-Envision	Roche
SP6-Polymerase 2000U	MBI Fermentas
SP6-Primersequenz	MWG
SSC (20x): 3 M NaCl, 0,3 M Na3-Citrat $2H_20$, pH 7,0	
T7-Polymerase 5000U	MBI Fermentas
T7-Primersequenz	MWG
TAE-Puffer: Tris 121g, EDTA (250mM) pH8 100ml, Essigsäure 29 ml, Aqua dest 500 ml	
Taq-Polymerase	PegLab
Transkriptionspuffer (5x)	MBI Fermentas
Tris	AppliChem
t-RNA (Bäckerhefe)	Roche
Xylol	Merck

Sonden

Hervorgehoben sind die Bindungsstellen für die RNA-Polymerase

T7 CTGF antisense:

5`- **TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT** TGA ACT CCA CTG GCA GAG T- 3`

SP6 CTGF sense:

5`- **ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG** GCT GAC CTG GAG GAA AAC ATT- 3`

T7 TGF antisense:

5`- **TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT** CCC AAG GAA AGG TAG GTG A- 3`

SP6 TGF sense:

5`- **ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG** CAC CCA CTT TTG GAT CTC AG- 3`

2.1.6 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger- silanisiert	Knittel Glass, Braunschweig
Pipettenspitze (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (500, 1500, 2000 µl)	Eppendorf, Hamburg

2.1.7 Software

Densitometrie: Kd1 Software, Kodak, Rochester

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Zum Nachweis einer möglichen Proteinurie wurde den Tieren ab dem 60. Lebenstag im Abstand von jeweils 20 Tagen Morgenurin bis zum Alter von 200 Tagen und abschließend am 250. Tag abgenommen. Sofern es möglich war, wurde direkt in Eppendorfgefäße abgegebener Spontanurin bevorzugt, wobei in den meisten Fällen allerdings auf das Aufpipettieren des Urins von der Arbeitsunterlage in einer Sterilbank zurückgegriffen werden musste.

Am 100., 150. und 250. Tag der Versuchsreihe wurden jeweils drei Tiere getötet. Neben der Entnahme der Nieren konnte außerdem die Gelegenheit genutzt werden, die Blase der Tiere zu punktieren.

2.2.2 Präparatanfertigung

Nach Entnahme der Nieren wurden diese für 24 Stunden in Formaldehyd (5 %) bzw. RNA-later eingelegt. Die im Anschluss in Paraffin eingebetteten Nieren mussten nunmehr zu 3 µm bzw. in einem zweiten Durchgang zu 5 µm dünnen Schichten verarbeitet und nach Gabe in ein warmes Wasserbad auf einen silanisierten Objektträger übertragen werden. Die Trocknung erfolgte auf einer Heizplatte über eine Zeitdauer von 24 Stunden.

2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um mögliche strukturelle Auffälligkeiten zu detektieren, wurden initial Schnitte mit einer Schichtdicke von 3 µm mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbeverfahren (H.E.) in einem H.E.-Färbeautomaten (Stainix Diapath) angefertigt.

Die präparatbeschickten Objektträger mussten hierbei 5 min in Xylol (Dimethylbenzen) entparaffiniert und danach für jeweils 2 min in absteigendem Ethanol (absoluter Alkohol sowie 80 %iger) rehydriert werden. Anschließend erfolgte die Hämalaunfärbung nach Meyer für 4 min, eine Spülung unter destilliertem Wasser für 1 min sowie unter fließendem Wasser für 15 min. Hierauf folgte die Eosinfärbung für 7 min mit anschließender Dehydrierung zum einem mit destilliertem Wasser (1 min) und zum anderen mittels aufsteigendem Alkohol (80 % für 1 min und absolutem Alkohol für 2 min) und Xylol (3 min). Den Abschluss bildete das Eindecken der Präparate in Entellan (Merck, Darmstadt).

2.2.4 Laminin-1-Färbung

Für die Immunhistochemie mussten die Schnitte durch Erwärmung bei 80 °C für 30 min vorbereitet werden. Nach Entfernung des abfließenden Paraffins wurden die Schnitte 2-mal für jeweils 15 min in ein Xylolbad mit aufsteigendem Reinheitsgrad getaucht. Die folgende Rehydrierung ging so vonstatten, dass erst eine absteigende Alkoholreihe (absolut, 90 %, 80 % sowie 70 % für jeweils 5 min) und dann Leitungs- und destilliertes Wasser für je 3 min genutzt wurden.

Die Andauung erfolgte mittels 10 µl Proteinase K + 990 µl 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 für 23 min bei 37 °C. In einem nächsten Schritt folgte eine 3-malige Waschung in TBS für je 10 min, im Anschluss daran wurde 100 µl einer Blocklösung aus 5 % BSA/TBS für 60 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Nunmehr konnten pro Objektträger 100 µl des Primärantikörpers, bestehend aus TBS und anti-Laminin (Firma Abcam ab 11575 Rabbit IgG) im Verhältnis 1:25 aufgetragen werden, wobei die Inkubation über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer stattfand. Am Folgetag schlossen sich abermals eine Waschung in TBS mit aufsteigendem Reinheitsgrad von 3-mal 10 min und ein wiederholtes Blocken in 5 % Normalserum (Ziege) in 0,8 % BSA/TBS bei Raumtemperatur für 30 min an. Der Sekundärantikörper (100 µl pro Schnitt), an Cy3 gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, konnte nun im Verhältnis 1:200 in TBS aufgetragen werden. Die anschließende Inkubation für 60 min fand im Dunkeln wiederum in einer Feuchtkammer statt. Den Abschluss des Vorgangs bildete eine nochmalige 3-malige Waschung der Objektträger für

jeweils 15 min in TBS mit anschließender Einbettung mittels DAKO flourescent Mounting Medium und Deckgläsern.

2.2.5 Fibronektin-Färbung

Ähnlich dem Verfahren zur Lamininfärbung wurden auch hier die Schnitte zu Beginn in einem Ofen für 30 min auf 80 °C erwärmt, von abfließendem Paraffin befreit und anschließend rehydriert. Dies geschah durch Überführung für 2-mal 15 min in xylolgefüllte Küvetten. Dem folgte die Gabe in eine absteigende Alkoholreihe, je 5 min in absoluten Alkohol sowie 90-, 80- und 70-prozentigen Alkohol mit anschließender Spülung unter Leitungs- und destilliertem Wasser für jeweils 3 min. Für die Fibronektinfärbung erfolgte die Demaskierung des Antigens Citratpuffer für 6-mal 5 min in einer Mikrowelle. Nach 3-maliger Waschung in TBS wurde pro Objektträger 100 µl einer Blocklösung aus 5 % BSA/TBS für 60 min unter Raumtemperatur aufgetragen. Als Primärantikörper diente anti-Fibronektin im Verhältnis von 1:100 in TBS (100 µl pro Präparat) mit anschließender Inkubation in einer Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht. Daran schlossen sich 3 jeweils 10-minütige Waschungen in TBS mit darauf folgender Blockung in 5 % Normalserum (Ziege) in 0,8 % BSA/TBS für 30 min bei Raumtemperatur an. Als Sekundärantikörper fand wie beim Lamininfärbeverfahren der Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper an Cy3 gekoppelt in TBS im Verhältnis 1:200 Verwendung. Nach 60-minütiger Inkubation in einer Feuchtkammer folgte nochmals eine 3-malige 15 Minuten dauernde TBS-Waschung mit anschließender Eindeckung in DAKO Flourescent Mounting Medium.

2.2.6 Elektrophorese zur Bestimmung der Proteinurie

Chloroform-Methanol-Fällung

Um die vorhandenen Proteine aufzukonzentrieren, bediente man sich der Chloroform-Methanol-Fällung nach Wessel und Flügge von 1985.

Nach dem Auftauen der Urinproben in ihren Eppendorfgefäßen erfolgte ein sanftes Vortexen, um die Proben zu durchmischen. Zu 20 µl Probe wurden 400 µl Methanol und nach Durchmischung weitere 100 µl Chloroform gegeben. Nach wiederholtem Vortexen konnten nun weitere 300 µl destilliertes Wasser hinzugefügt werden. Die Lösung wurde bei 14.000 Umdrehungen pro Minute 60 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase (etwa 600 µl) verworfen und wiederholt 400 µl Methanol zur verbliebenen unteren Phase sowie der mittleren Phasen mit ihren präzipitierten Proteinen hinzugegeben. Nach 2-minütiger

Zentrifugation wurde die obere Phase entnommen, wobei dies mit besonderer Sorgfalt vorzunehmen war, um keines der instabilen Pellets anzupipettieren. Die abschließende Waschung erfolgte mit 400 µl Methanol, an die sich eine 2-minütige Zentrifugation und Entnahme der oberen Phase anschloss. Durch Trocknung in einer Sterilbank wurden die Proteine von ggf. noch bestehenden Lösungsresten befreit.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) bietet die Möglichkeit, Proteine in Relation zu ihrer Größe aufzutrennen. Aufgrund ihrer Unterteilung in Sammel- und Trenngel bietet diese Methode zum einen eine hohe Trennschärfe, zum anderen verhindert es die Ausfällung oder Aggregation der Proteine im Gel. Die dafür notwendige durchgehende negative Ladung der Proteine wird durch den SDS-Laufpuffer gewährleistet, der mit den Proteinen Komplexe bildet, so dass die Eigenladung der Proteine maskiert wird. Die Komplexbildung erfolgt hierbei in einem konstanten Verhältnis von Größe und Ladung.

Durchführung: Vorab wurden 280 µl Probenpuffer aus 140 µl destilliertem Wasser und 140 µl LDS(Lithium)-Puffer hergestellt. Die Proteinpellets wurden mit jeweils 20 µl Probenpuffer aufgelöst. Nach einem Erhitzen bei 95 °C für 5 Minuten, um die Proteine in ihrer Primärstruktur vorliegen zu haben, erfolgte im Anschluss eine Lagerung auf Eis. Als Kontrolle bei bekanntem Bandenmuster wurden in die erste Tasche des Gels 10 µl Sea Blue Plus 2 Standard-Puffer, in die restlichen Taschen die mit LDS-Puffer versetzten Proben gegeben. Als anionische Lösung diente ein vorgefertigter Laufpuffer (SDS-Running-Buffer 20 x). Die Auftrennung erfolgte in 2 Stufen, zunächst 30 min bei 80 V, gefolgt von 70 min bei 120 V.

Coomassie-Färbung

Die Sichtbarmachung (nach Weber und Osborn 1969) der im Gel gewanderten Proteine erfolgte mittels 5x Coomassie-Färbung im Plattformschüttler über Nacht mit anschließender Waschung in Leitungswasser, während die absolute Messung in Form von Pixeln mittels Densitometrie durch die Kodaksoftware Kd1 realisiert werden konnte.

2.2.7 Western-Blot-Analyse

Lysatherstellung

Mittels Messerhomogenisator wurde jeweils 1 Niere in 500 µl Lysepuffer auf Eis gekühlt im 5 ml Röhrchen für 30 sec. homogenisiert und im Anschluss bei 16.500 U/min für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes konnte das Lysat bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C eingefroren werden.

Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes fand die Methode nach Bradford Anwendung, bei welcher Proteine mittels Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt werden. Durch die Bindung von G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs (Bradford 1976). Unter Verwendung von BSA (Bovine Serum Albumin) erfolgte die Herstellung einer Standardreihe mit 0,25; 0,5; 0,75; 1 und 1,5 mg/ml hergestellt. Die Lysate wurden mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Anschließend wurden je 20 µl sowohl der Proteinlösung als auch der BSA-Reihe mit je 980 µl Biorad Quick Start Reagenz (Quick Start™ Bradford Protein Assay) gemischt. Mittels eines Leerwertes (20 µl destilliertem Wasser und 980 µl Reagenz) bei 595 nm erfolgte die Eichung des Photometers auf null (Reisner et al. 1975). Die aus den Messwerten der Standardproben ermittelte Eichkurve diente der Bestimmung der Proteinkonzentrate der einzelnen Homogenate.

Elektrophorese und Blotten

Von jeder Probe wurden 20 µg Protein in 20 µl mit 2 µl Reduktionspuffer (Sample Reducing Agent 10x, NuPage, Invitrogen) und 5 µl Probenpuffer (NuPage LDS Sample Buffer 4x) gemischt. Wie im Rahmen der Elektrophorese für die Proteinuriebestimmung bereits beschrieben, erfolgten nunmehr eine 5-minütige Denaturierung bei 95 °C und das Auftragen der Proben auf die 4-12 % Polyacrylamid-Fertiggele. Zur Kontrolle kamen abermals 10 µl Sea Blue Plus 2 Standard-Puffer zum Einsatz. Der eigentliche Western-Blot erfolgte nach elektrophoretischer Trennung. Dabei wurden die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran, die kurz zuvor in einem 10-sekündigen Methanolbad aktiviert wurde, geblottet. Dazu wurden dem Gel eine zur Anode zeigende PVDF-Membran sowie beidseitig Whatman-Papier-Streifen und Schaumstoffschwämme angelegt. Das Blotten erfolgte nunmehr in einer Biorad-Tankblot-Apparatur mit Eiskühlung für 60 min bei 100 V. Eine Waschung der Membran in TBST und ein 60 minütiges Blocken

in TBST mit 5 % Magermilch (Merck) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen beendeten den Vorgang.

Detektion

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (antigenspezifisch, aber unmarkiert) erfolgte über Nacht bei 4 °C und verdünnt in TBST.

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung in TBST	Firma
Actin	Polyklonal, rabbit-anti mouse	1:2000	Sigma, A2103
TGF-ß	Monoklonaler Antikörper aus Maus	1:2000	R&D Systems, MAB240
CTGF	Polyklonal, rabbit-anti mouse	1:2000	Biovision, 5553R

Tabelle 1: Primärantikörper

Nach 4-mal je 15-minütiger Waschung der Membran in TBST wurde der jeweilige Sekundärantikörper (speziesspezifisch und markiert) für 1 Stunde aufgetragen und nochmals 4- mal 15-minütig in TBST gewaschen.

HRP- (Meerrettich-peroxidase-) konjugierte Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung in TBST	Firma
Actin	HRP-goat-anti rabbit	1:20000	DAKO P0448
TGF-ß	HRP-rabbit-anti mouse	1:20000	DAKO P0161
CTGF	HRP-goat-anti rabbit	1:20000	DAKO P0448

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Zur eigentlichen Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde eine Chemolumineszenz-Reaktion mittels ECL-plus Detektionsset (GE-Healthcare) durchgeführt. Die Exposition gegenüber einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak) erfolgte zwischen 60 Sekunden und 2 Stunden.

Strippen

Zur Reinigung der Membran wurde diese 15 min in Restore-Stripping-Buffer, danach für 5 min in destilliertem Wasser, 5 min in TBST und dann eine Stunde in TBST mit 5 % Magermilch geblockt. Danach konnte der nächste Primärantikörper hinzugegeben werden.

2.2.8 Lichtmikroskopische In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung ist ein aussagekräftiges Verfahren zum lokalisierten Nachweis von mRNA in Gewebs- und Zellproben, die wiederum Einblicke auf die zellulären Grundlagen in vivo ermöglicht (Ogilvie et al. 1990). Das Vorhandensein einer spezifischen mRNA weist darauf hin, dass bestimmte Gensequenzen zum Zeitpunkt der Analyse transkribiert wurden. Es lässt sich also ein zeitlicher und räumlicher Verlauf von Expressionsmustern bestimmter Gene aufzeigen (Jackson et al. 1993).

Sondenherstellung

Die RNA aus in RNA-later eingelegten Nieren wurde extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Dem folgte eine RT-PCR mit 35 Zyklen, in deren Ansatz sich neben der cDNA, einer Polymerase auch die jeweiligen spezifischen Promotorprimer (T7 antisense bzw. SP 6 sense für TGF-ß und CTGF) befanden, um die Bindungsstellen zu verlängern. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss gereinigt und zur Markierung der RNA-Sonde in einer 2. Transkription mit einer RNA-Polymerase (SP6 oder T7) sowie DIG-markierten NTP´s (DIG-labeling-Kit) für 150 min bei 37 °C unterzogen. Zuletzt folgte die Fällung der RNA mittels Ethanol. Die nach Abpipettieren des Überstandes und Trocknung gewonnenen Pellets wurden in Diethyl-pyrocarbonat-Aqua dest. aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

Hybridisierung

Das praktische Vorgehen kann auf folgende Weise beschrieben werden: Am ersten Tag erfolgte die Prähybridisierung der 5 µm Schnitte mit 25 µl Hybridisierungspuffer, welcher unter anderem Lachsspermien-DNA enthielt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden pro Schnitt 5 µl komplimentäre TGF bzw. CTGF-Sonde (antisense) in Hybridisierungspuffer, nach 3-minütiger Sondendenaturierung bei 65 °C aufgetragen. Es kamen digoxigeninmarkierte RNA-Sonden zum Einsatz (s.o. DIG-labeling-Kit), da Digoxigenin mit Hilfe eines Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, erkannt und lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann (Romeis 2010). Die Schnitte

wurde bei 42 °C über Nacht mit den Sonden in einer feuchten Kammer inkubiert. Die anschließende Waschung erfolgte in 2x SSC für 10 min sowie 2-mal 5 min in PBS.

Detektion

Die Schnitte wurden mit NBT/BCIP-Färbereagenz (1:50) in Puffer III in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Dauer betrug zwischen 10 und 120 min, bis es zu einer deutlichen Blaufärbung kam. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Aqua-Mount™ Aqueous Mounting Medium benetzt und eingedeckt.

Negativkontrolle

Um die Richtigkeit der durch die Hybridisierung erzeugten Signale zu bestätigen, mussten Negativkontrollen durchgeführt werden. Hierzu wurden kodierende Sequenzen genutzt (sense), bei deren lichtmikroskopischer Auswertung keinerlei Signal nachgewiesen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um zu Beginn eine grobe Übersicht zu gewinnen, wählten wir die weit verbreitete Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Hämatoxylin ist blau-violett und färbt basophile Bestandteile wie Zellkerne aufgrund ihrer Nukleinsäuren, wohingegen das pinkfarbene azidophile Eosin Zytoplasma und die extrazelluläre Matrix (Proteine) anfärbt.

Am 100., 150. und 250. Tagen erfolgte bei jeweils 3 Tieren die Entnahme der Nieren, wobei jedoch zu allen drei Zeitpunkten keinerlei Unterschiede erkennbar waren. Die eosinen und hämatoxylinen Anteile waren durchgehend konstant in Verhältnis und Intensität. Zudem zeigte sich keine auffällige Zunahme an eosinen Färbeanteilen, die u.a. für eine Zunahme des Zytoplasmas sprechen würde. Auch fand sich kein Nachweis einer für die Nierenfibrose typischen Tubulusatrophie oder periglomerulären Vernarbung bzw. Zunahme der mesangialen Matrix (Monographie Forbes und Jackson 2008). Ein Untergang von Glomeruli war nicht zu beobachten. Beispielhaft stehen hierfür die Abbildung 7-12 (durchgehender Genotyp ITGA2 -/- und DDR1 -/-, ausgenommen Abbildung 7 rechts). Aufgrund der lichtmikroskopisch unauffälligen Nierenstruktur wurden die Schnitte nicht statistisch ausgewertet.

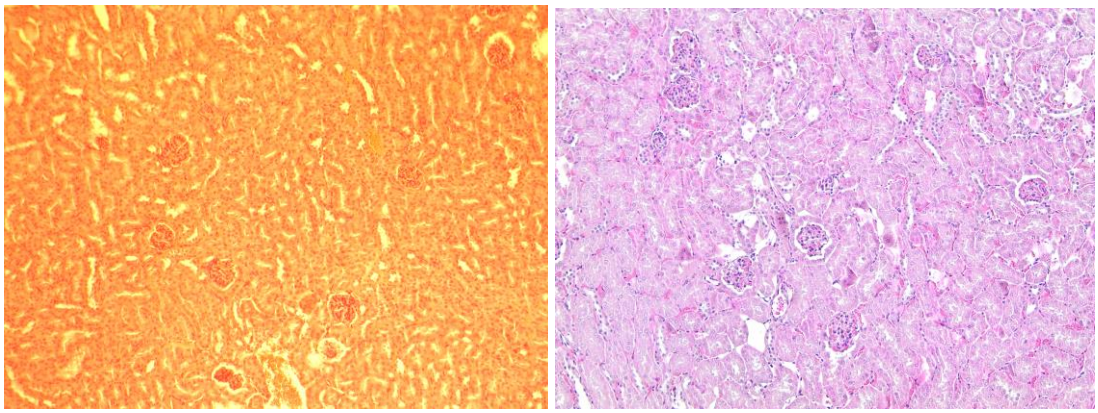


Abbildung 7: 100x Vergrößerung einer 100 Tage alten Niere (mit dem Genotyp ITGA -/- und DDR1 -/-). Rechts zum Vergleich eine 100fache Vergrößerung einer 70 Tage alten Wildtypmaus.

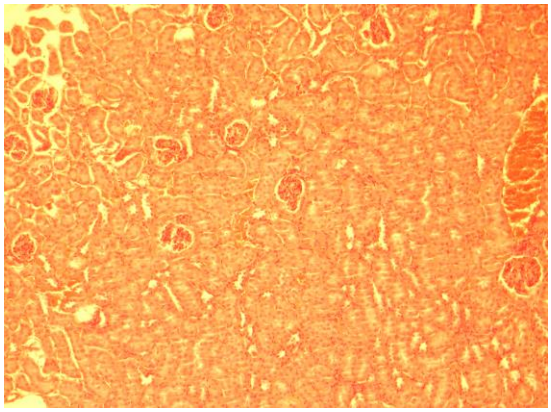


Abbildung 8: 100x Vergrößerung einer 150 Tage alten Niere (mit dem Genotyp ITGA -/- und DDR1 -/-)

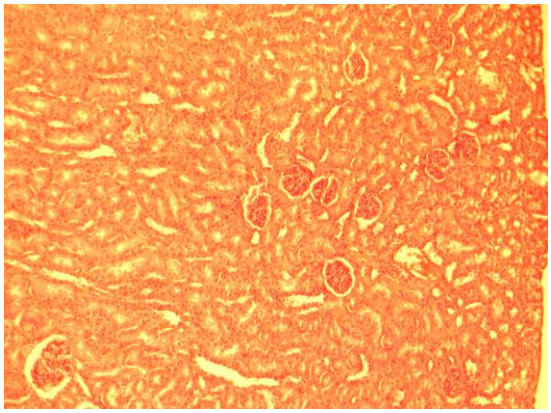


Abbildung 9: 100x Vergrößerung einer 250 Tage alten Niere

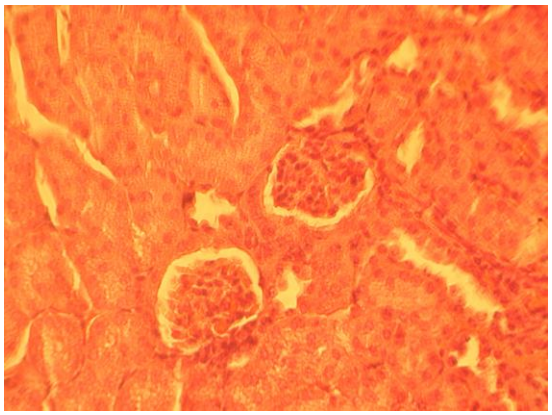


Abbildung 10: 400x Vergrößerung einer 100 Tage alten Niere

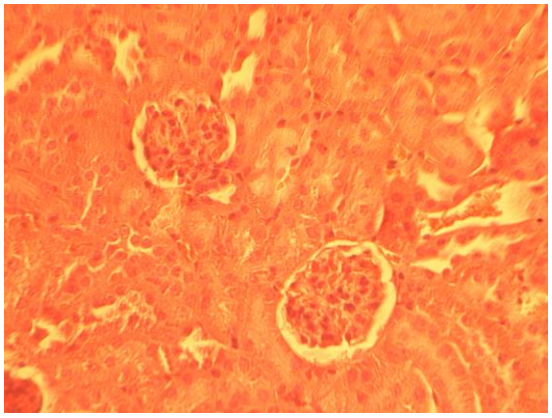


Abbildung 11: 400x Vergrößerung einer 150 Tage alten Niere

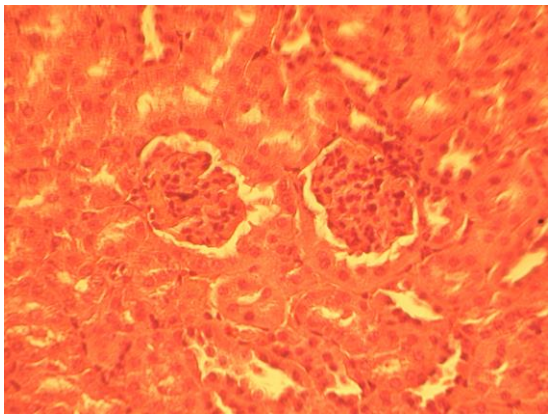
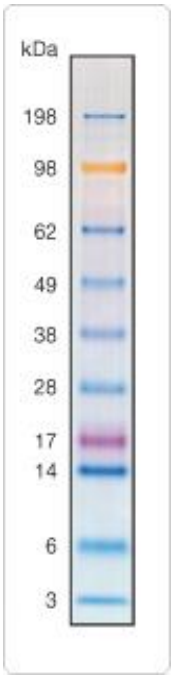


Abbildung 12: 400x Vergrößerung einer 250 Tage alten Niere

3.2 Bestimmung der Proteinurie für den Zeitraum 60 bis 140 Tage

In einem ersten Schritt wurden Proben im Alter von 60 bis 140 Tagen aufgetragen, wobei der zeitliche Abstand jeweils 20 Tage betrug. Die in Abb. 13 dargestellten Bandenmuster des genutzten Markers dienten hierbei als Orientierung. Tab. 3 soll beispielhaft die bekanntesten Vertreter der jeweiligen Molekulargewichtsklasse veranschaulichen.



Molekularmasse	Protein
180 000	Apolipoprotein A
150 000	Immunglobulin G
77 000	Transferrin
67 248	Albumin
54 000	α_1-Antitrypsin
44 000	Orosomucoid
40 000	ß2-Glykoprotein
30 000	α_1-Mikroglobulin
21 000	retinolbindendes Protein
15 000	Lysozym
11 800	ß2-Mikroglobulin

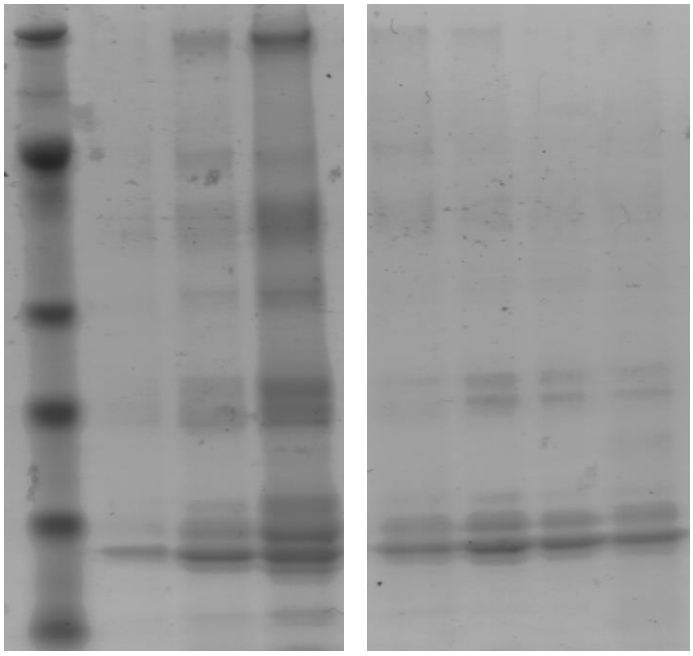
Abbildung 13
Marker (SeeBlue Plus2) Bande

Tabelle 3
www.biorama.ch/biblio/b10skript/s50chem/niere02.doc

Die Unterteilung der Proteinurie erfolgte in eine Makroproteinurie, Albuminurie und Mikroproteinurie. Als Makroproteinurie wurden jene Banden gewertet, deren Molekularmasse größer als der des Albumins waren. Die Mikroproteinurie lag dementsprechend unterhalb der Molekularmasse des Albumins. Für die Albuminurie erfolgte eine isolierte Betrachtung, während die Banden unterhalb einer Größe von 14kDa nicht berücksichtigt wurden, da sich hier eine kaum mehr voneinander trennbare Menge denaturierter Proteine abgelagert hatte.

Der Verlauf der Proteinurie wurde im Verhältnis zum Ausgangswert einer 60 Tage alten Doppelknockout-Maus betrachtet. Hierbei zeigte sich für alle drei betrachteten Arten von Proteinurie ein kontinuierlicher Anstieg mit einem jeweiligen Maximum zum Zeitpunkt von 100 Tagen Lebensalter (Abb. 14). Nach der Messung zum Zeitpunkt 100 Tage sank die Proteinurie, wobei insbesondere Makro- und Albuminurie abfielen, wohingegen die

Mikroproteinurie noch 55 % über dem Ausgangswert lag, aber dennoch 73 % unter ihrem Höchstwert. Tabelle 4 veranschaulicht hierbei die relativen Veränderungen.

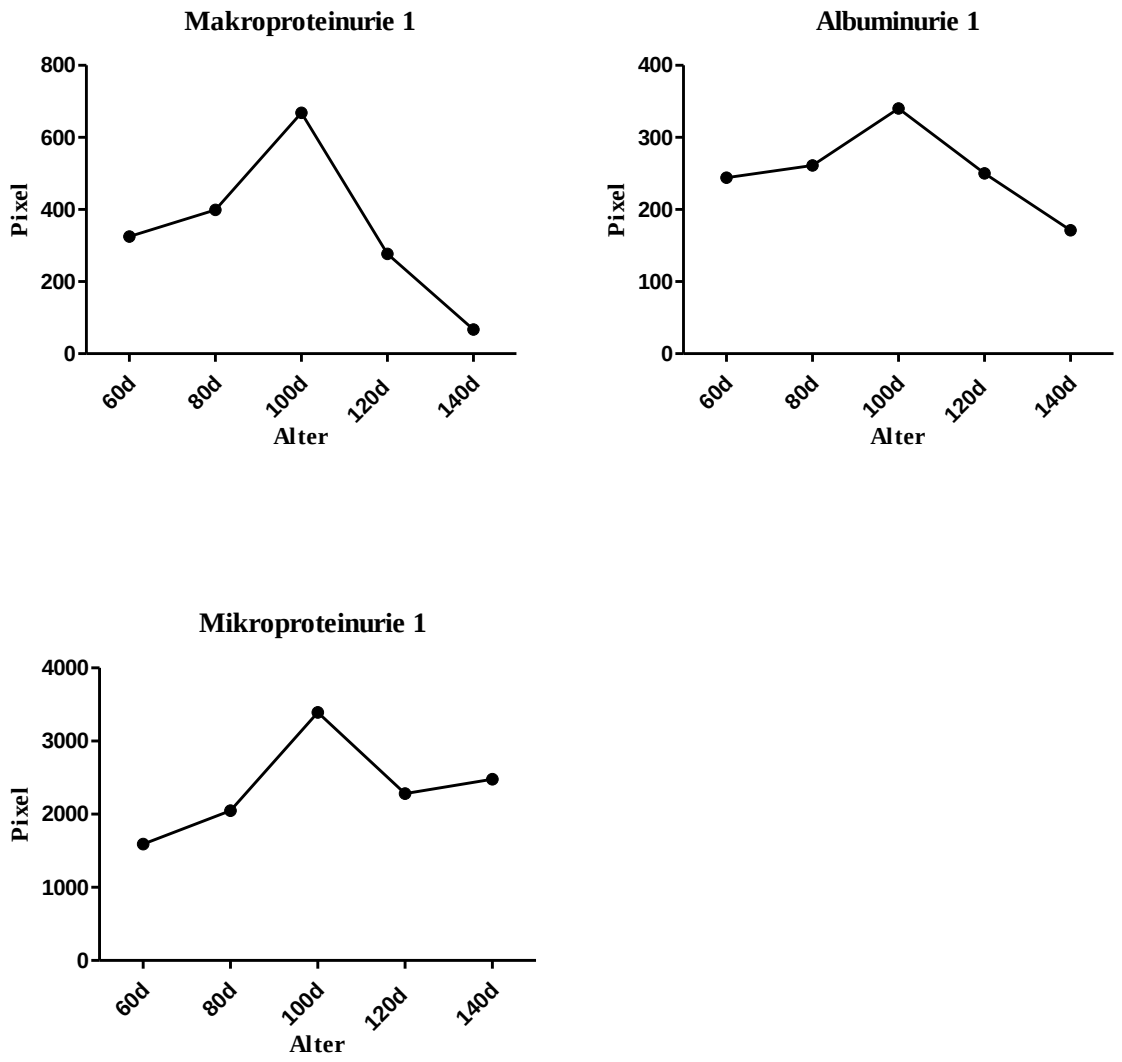


Maker 60d 80d 100d 120d 120d 140d 140d

Abbildung 14: Gelelektrophorese für den Zeitraum 60-140 Tage mit einem Maximum an Mikro-und Makro- sowie Albuminurie zum Zeitpunkt von 100 Tagen in Relation zur einer 60 Tage Doppelknockout-Maus. n=1 für 60 und 80; n=2 für 100d und 120d sowie n=3 für 140d.

Alter	60 Tage	80 Tage	**100 Tage**	120 Tage	140 Tage
Makroproteinurie	100 %	123 %	**206 %**	85 %	21 %
Albuminurie	100 %	107 %	**139 %**	102 %	70 %
Mikroproteinure	100 %	128 %	**213 %**	143 %	155 %

Tabelle 4: Darstellung der relativen Werte auf Grundlage der gemessenen Pixel



Grafik 1-3: Grafische Darstellung der Verläufe nach Messung der absoluten Anzahl an Pixeln (optische Dichtemessung) auf dem Elektrophoresegel

3.3 Immunhistochemie Laminin

Um den Effekt des Verlustes der beiden Kollagenrezeptoren ITGA2 und DDR1 hinsichtlich einer vermehrten Bildung extrazellulärer Matrix im Sinne einer Matrixakkumulation zu analysieren, wurden im Rahmen der Immunhistochemie Laminin 1-Färbungen (ehemals EHS-Laminin) zu 100, 150 und 250 Tagen angefertigt.

Diese wurden für einen Score glomerulärer bzw. tubulointerstitieller Matrixakkumulation verblindet und nach den jeweiligen Graduierungen in Tab.5 und 6 bewertet.

Grad 0	klar erkennbare Strukturen, keine Kapselbildung, keine Aufhellung der Kapillarschlingen
Grad 1	erkennbare Struktur, angedeutete Kapselbildung, angedeutete Aufhellung der Kapillarschlingen
Grad 2	gerade noch erkennbare Strukturen, komplette Aufhellung der Kapillarschlingen, starke Kapselbildung
Grad 3	Struktur aufgehoben bzw. Verschmelzung mit der Kapsel

Tabelle 5: Score für die glomeruläre Matrixakkumulation

Grad 0	schmales Interstitium, kein Hinweis auf Matrixakkumulation
Grad 1	leicht verbreitertes Interstitium, eventuelle kleine Matrixakkumulationsherde
Grad 2	verbreitertes Interstitium und Matrixherde
Grad 3	interstitielle Struktur unregelmäßig

Tabelle 6: Tubulointerstitieller Matrixakkumulationsscore

Auffällig war die inhomogene Färbung insbesondere des Interstitiums bei homogenerem Signal der Glomeruli (Abb.15-17, allesamt Genotyp ITGA -/- sowie DDR 1-/-).

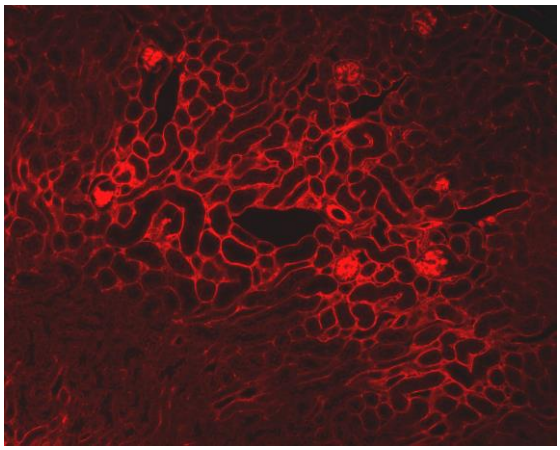
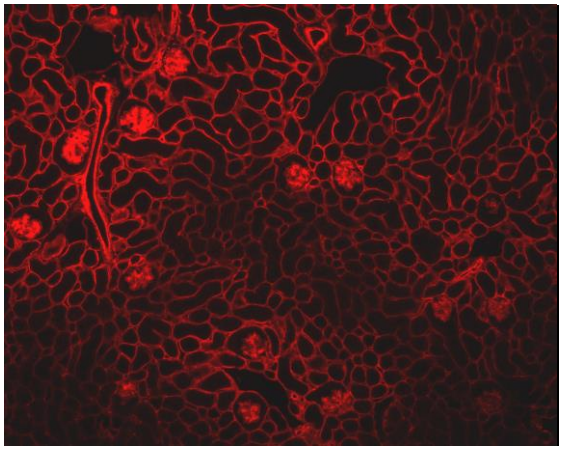


Abbildung 15: 100 Tage, 100x Vergrößerung, Genotyp ITGA2 -/- sowie DDR -/-



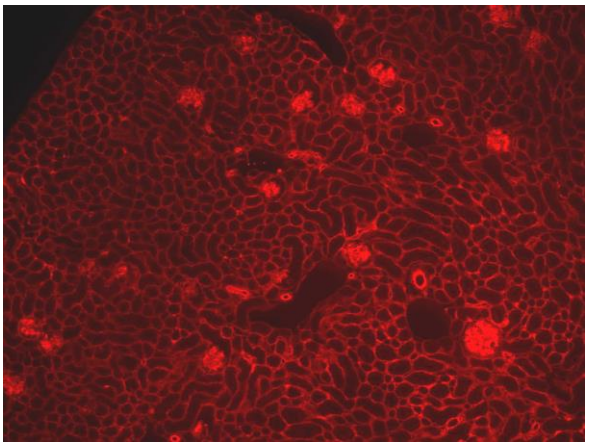


Abbildung 16: 150 Tage, links Doppelknockout, rechts Wildtyp, 100x Vergrößerung

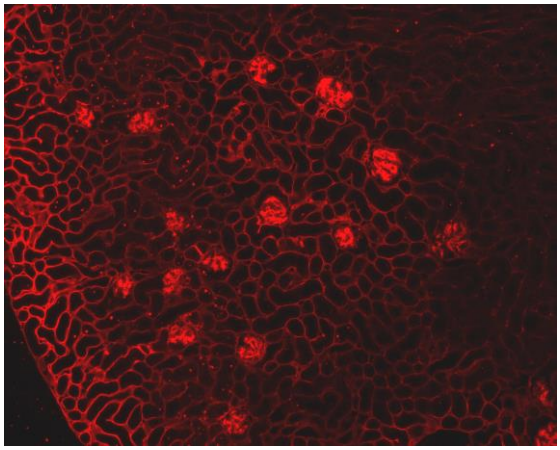


Abbildung 17: 250 Tage, 100x Vergrößerung, Genotyp ITGA2 -/- sowie DDR -/-

3.3.1 Glomeruläre Matrixakkumulation

Die statistische Auswertung anonymisierter Abbildungen wurde von 4 Teilnehmern vorgenommen.

In einem ersten Schritt war die Bewertung einer Analyse der Varianz, also einer globalen Testung, zu unterziehen. Als Hypothese galt die Behauptung, dass $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$, wobei $\mu 1$ für den Mittelwert 100 Tage, $\mu 2$ für 150 Tage und $\mu 3$ für 250 Tage stand. Bei einem Wert für $p=0{,}033915$ und somit $p<0{,}05$ fiel die Entscheidung, diese Hypothese zu verwerfen, da das ermittelte p signifikant war und somit von einem Unterschied der Mittelwerte ausgegangen werden musste (Abb. 18).

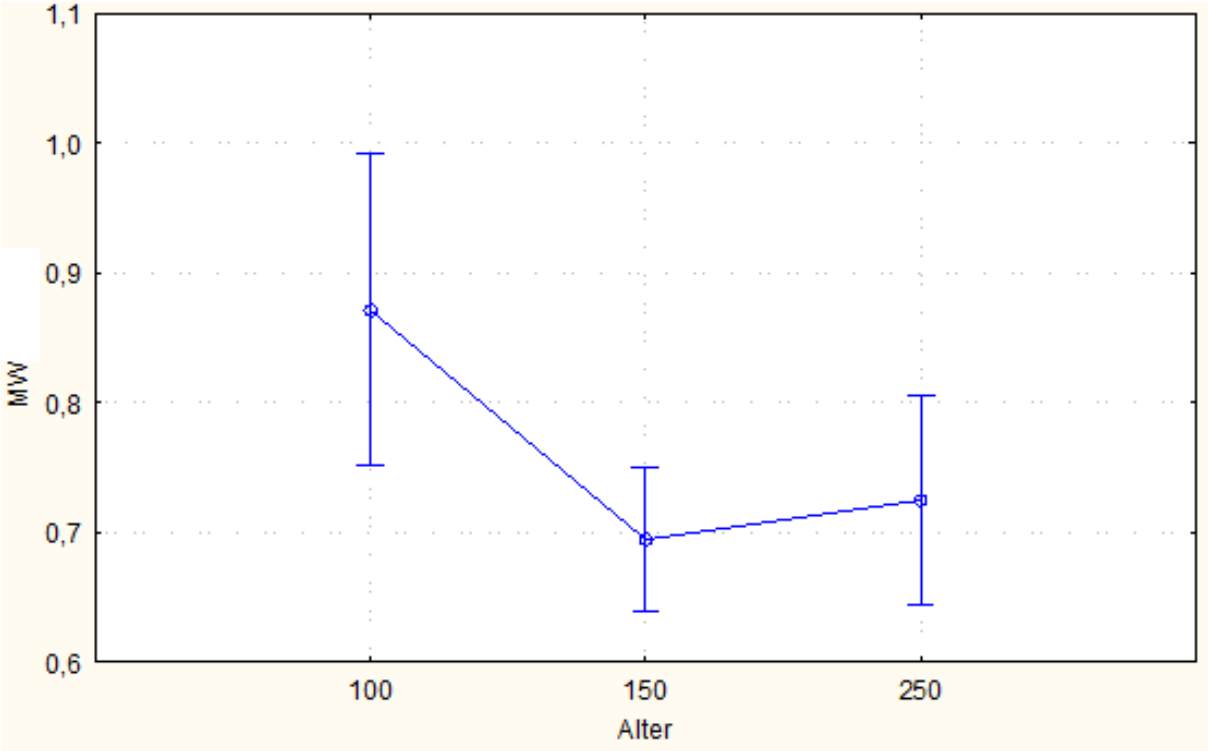


Abbildung 18: Globale Testung der Mittelwerte (MW) der jeweiligen Altersgruppe bei 95 %igem Konfidenzintervall für die Mittelwerte der jeweiligen Altersgruppe. Die Testung erfolgte unter der initialen Hypothese, dass die Mittelwerte zu den Zeitpunkten von 100, 150 und 250 Tagen zueinander gleich sind. Bei einem p=0,033 wurde diese Hypothese verworfen. Es erfolgte die t-Testung in Paaren.

Nachdem, wie oben bereits beschrieben, die Hypothese nicht zu halten war, fand nunmehr ein Vergleich der einzelnen Mittelwerte in Paaren unter Zuhilfenahme von t-Tests statt, die der Identifizierung des in der globalen Testung nachgewiesenen Unterschiedes dienen sollten.

Für folgende Konstellationen erfolgte ein Vergleich: 100 zu 150 Tage
150 zu 250 Tage und
100 zu 250 Tage.

Zur Niveauerhaltung musste der p-Wert α-adjustiert werden, was bedeutete, dass nunmehr der Unterschied p< 0,016 signifikant war (0,05/3 Konstellationen).

MW 100 Tage	MW 150 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	p (2-seitig)
0,871032	0,694444	21	96	0,014319

Tabelle 7: Der t-Test 100 Tage zu 150 Tage war mit 0,014 im Sinne einer Befundverbesserung signifikant.

MW 150 Tage	MW 250 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	Anzahl (n) für 250 Tage	p (2-seitig)
0,694444	0,724638	96	46	0,512281

Tabelle 8: t-Test 150 Tage zu 250 Tage

MW 100 Tage	MW 250 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 250 Tage	p (2-seitig)
0,871032	0,724638	21	46	0,043950

Tabelle 9: Der t-Test 100 Tage zu 250 Tage war wie die Testung des Paares 150 Tage zu 250 Tage (Tabelle 8) nicht signifikant. Grafisch lässt sich aber eine Tendenz im Sinne einer Besserung erkennnen.

Aus den Tabellen 7, 8 und 9 konnte man ersehen, dass ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte für das Intervall von 100 zu 150 Tagen vorlag. Statistisch betrachtet ist der Unterschied zwischen 100 und 250 Tagen nicht signifikant, graphisch lässt sich aber eine gewisse Tendenz im Sinne einer Besserung erkennen. Die Konstellation von 150 zu 250 Tagen war nicht signifikant.

Unabhängig von den einzelnen t-Tests ist rein vom graphischen Verlauf aus Abbildung 18 ersichtlich, dass die Matrixakkumulation in den Glomeruli von 100 zu 250 Tagen rückläufig war.

3.3.2 Score für die tubulointerstitielle Matrixakkumulation

Die Vorgehensweise der Auswertung ist identisch zu jener unter Punkt 3.3.1, da auch hier initial alle drei Mittelwerte einer globalen Testung unterzogen wurden. Als Hypothese galt wiederum die Behauptung, dass $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$. Bei einem p-Wert von 0,000003 musste auch diese Hypothese verworfen werden, so dass im Folgenden t-Tests für die möglichen Paarungen vorgenommen wurden.

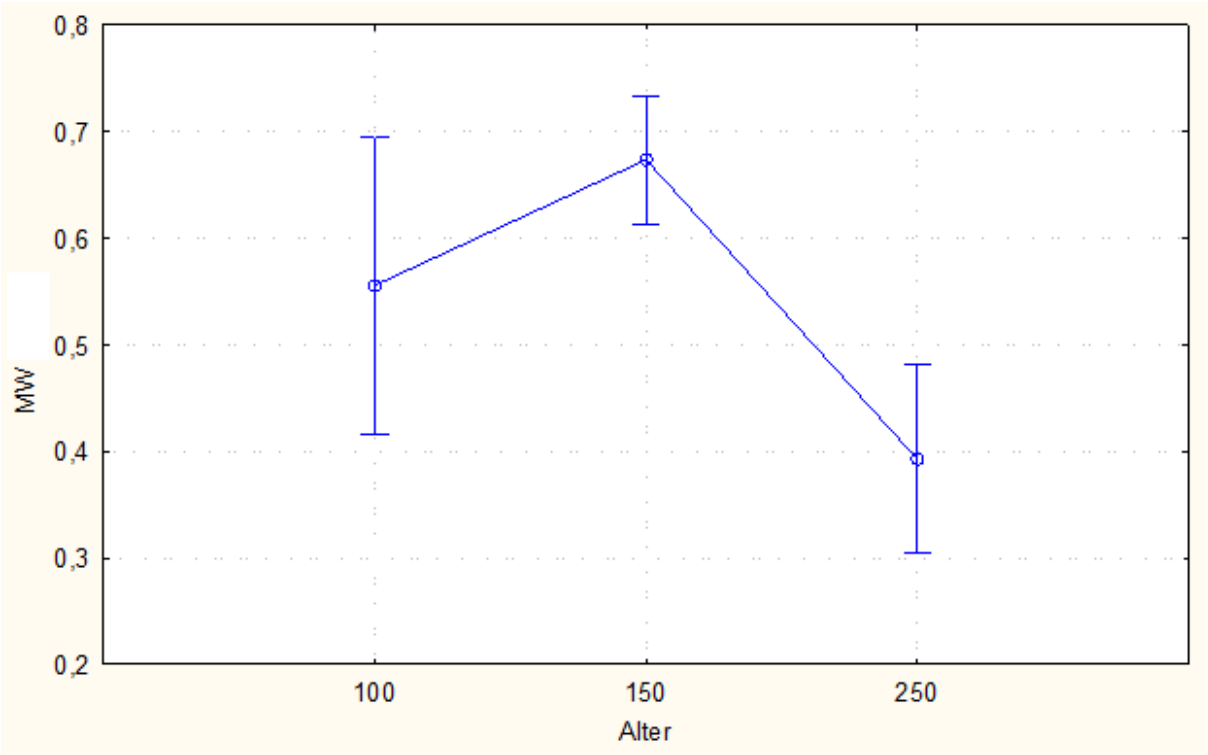


Abbildung 19: Globale Testung der Mittelwerte (MW) der jeweiligen Altersgruppe bei 95 %igem Konfidenzintervall für die Mittelwerte der jeweiligen Altersgruppe. Wie im Rahmen der globalen Testung der Mittelwerte des Glomerulosklerosescores auch hier eingangs unter der Hypothese, dass es keine Unterschied zwischen den Mittelwerten der drei Zeitpunkte gibt ($\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$). Abermals wurde diese Hypothese bei einem p-Wert gegen Null verworfen und im Weiteren die einzelnen Paare t-Tests unterworfen.

MW 100 Tage	MW 150 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	p (2-seitig)
0,555556	0,673304	21	113	0,122318

Tabelle 7: t-Test 100 Tage zu 150 Tage

MW 150 Tage	MW 250 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	Anzahl (n) für 250 Tage	p (2-seitig)
0,673304	0,392628	113	52	0,000000

Tabelle 8: Der t-Test 150 Tage zu 250 Tage war als einziger signifikant im Sinne einer Befundverbesserung.

MW 100 Tage	MW 250 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 250 Tage	p (2-seitig)
0,555556	0,392628	21	52	0,041340

Tabelle 9: t-Test 100 Tage zu 250 Tage: Wenn auch mit einem p-Wert von 0,04 nach α-Adjustierung nicht signifikant (p ist signifikant, wenn kleiner 0,05/3), so ist doch grafisch eine Tendenz im Sinne Besserung zu sehen

Wie im Falle der glomerulären Matrixakkumulationsabnahme, so beobachtet man auch für das tubulointerstielle Gegenstück schon rein optisch nach Abb. 19 eine Abnahme der Bindegewebsanhäufung.

Signifikant war der Vergleich zwischen 150 und 250 Tagen mit einem p-Wert gleich Null. Wie aus Abb. 19 zu vermuten, war der p-Wert von 100 zu 150 Tagen nicht kleiner 0,016. Wenn auch analog zur Bewertung der Glomeruli keine Signifikanz für den Gesamtverlauf festgestellt werden konnte, so zeigte sich auch hier tendenzielle Besserung, im Sinne eines Rückganges des Bindegewebsüberschusses, was der p-Wert von 0,04 andeutete.

3.4 Immunhistochemie Fibronektin

Als ein Protein der extrazellulären Matrix wird Fibronektin von Fibroblasten synthetisiert und sammelt sich glomerulär im Mesangium sowie tubulär im Interstitium an. Während eine ausgeprägten Expression von Laminin eher einen Rückschluss erlaubt, dass das Signal auf dem Boden einer Bindesgewebesakkumulation entstanden ist, so deutet ein Fibronektinsignal auf eine Vernarbung, also ein irreversibles Geschehen, hin.

Auf die Durchführung eines Fibrosebewertung wurde verzichtet, da auch nach Wiederholung des Versuches und folgender Fluoreszenzmikroskopie keine Signale, unabhängig vom Alter der Tiere nachweisbar waren, wie die Abb. 20-22 exemplarisch darzustellen versuchen, was bedeutet, das keine Vernarbung nachweisbar war.

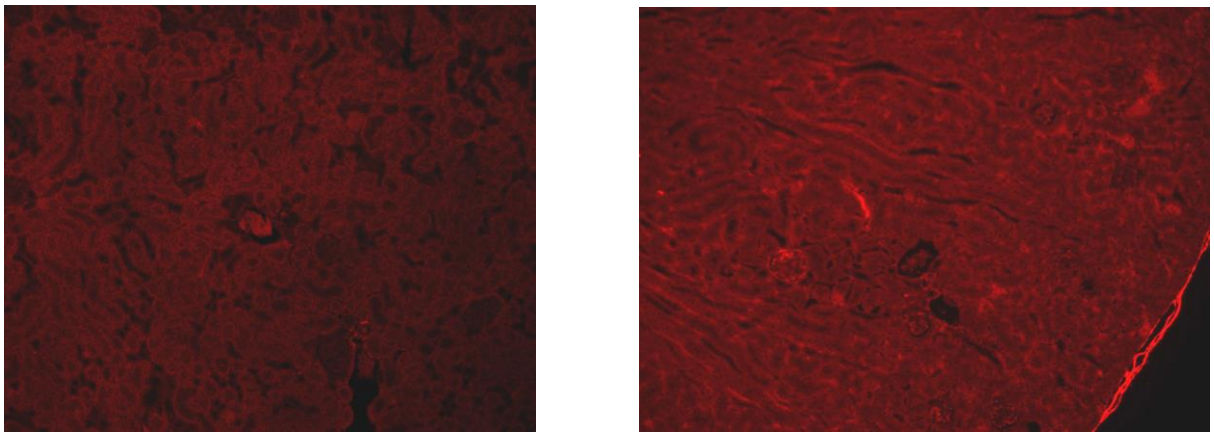


Abbildung 20: 100Tage, 100x, Abb. 20-22 von Genotyp ITGA -/-, DDR -/-. Zum Vergleich eine 120 Tage alte Wildtypmaus (100x)

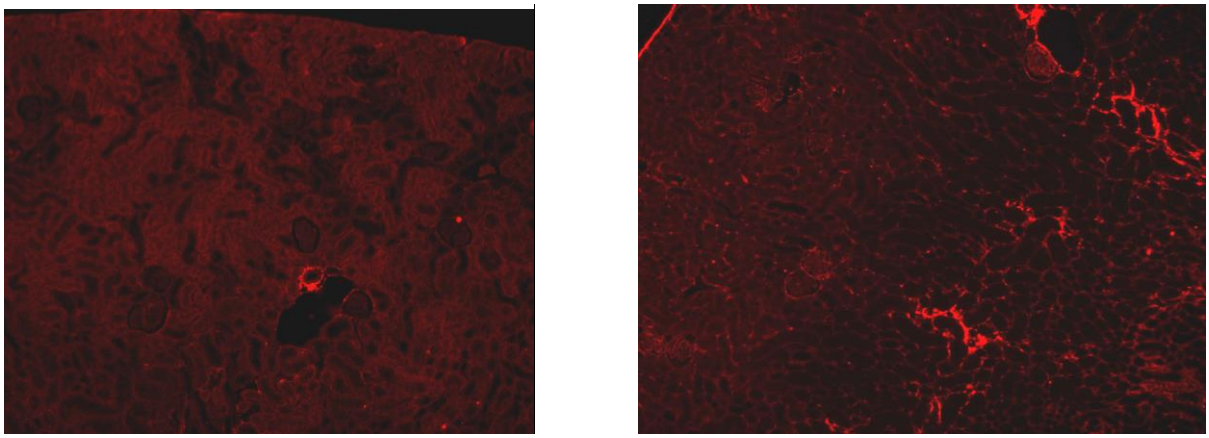


Abbildung 21: Links 150Tage Doppel-Knockout-Maus, rechts 150 Tage alte Wildtypmaus, 100x

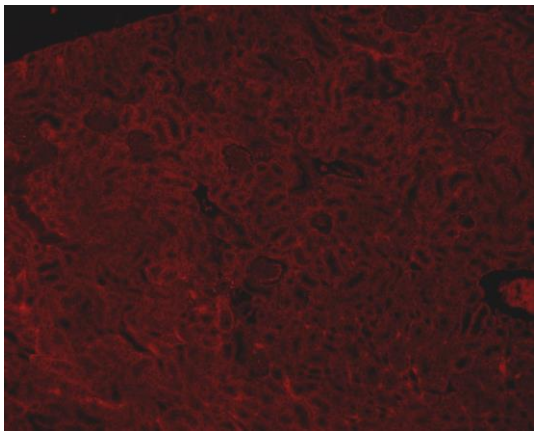
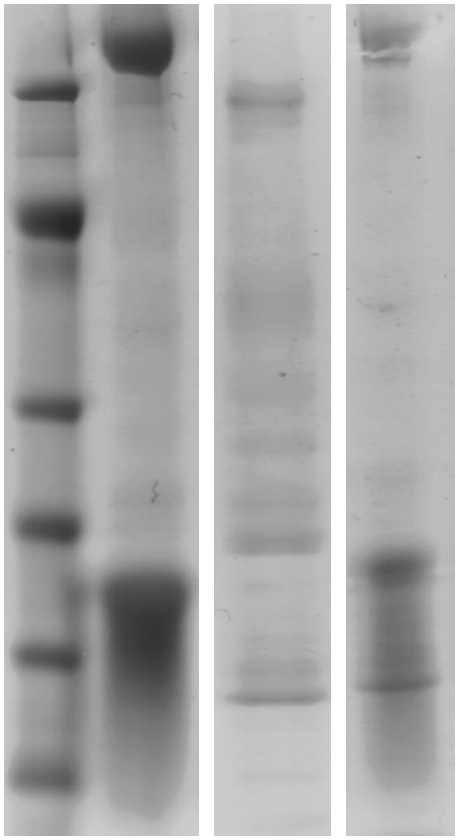


Abbildung 22: 250Tage Doppel-Knockout-Maus, 100x

3.5 Bestimmung der Proteinurie zum Zeitpunkt 160 bis 200 Tage

Im Anschluss an die Auswertung der Proteinurie 1 bis zum Zeitpunkt 140 Tage erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie der Lamininschnitte. Die im Abschnitt 3.3 Laminin erlangten Erkenntnisse hatten zur Folge, dass in einem zweiten Schritt von den gleichen schon im 1. Proteinuriegel verwendeten Tieren Urin gesammelt wurde, diesmal im Zeitraum von 160 bis 200 Tagen.



Marker 160d 180d 200d

Abbildung 23: Gelelektrophorese für den zeitlichen Abschnitt 160-200 Tage. Im Verlauf lässt sich einer weiterer Rückgang der Proteinurie aller drei Klassen beobachten. n =2 für 160, 180 und 200d. In die Abbildung wurde exemplarisch jeweils nur ein Vertreter jeder Altersklasse aufgenommen.

Alter	160 Tage	190 Tage
Makroproteinurie	100 %	40 %
Albuminurie	100 %	76 %
Mikroproteinure	100 %	33 %

Tabelle 10: Darstellung der relativen Werte auf Grundlage der gemessenen Pixel

3.6 Elektronenmikroskopie

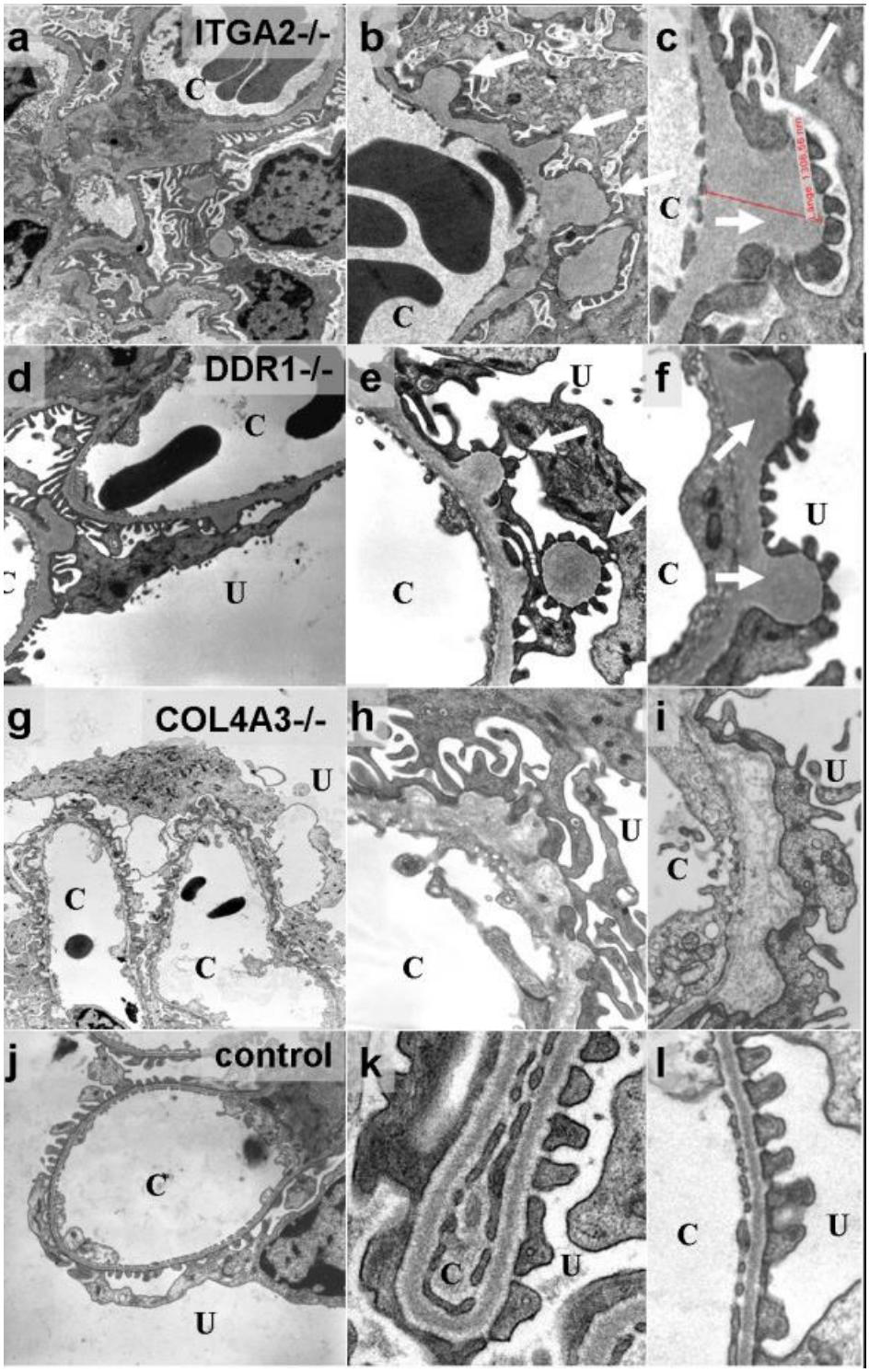


Abbildung 24: Aus Girgert 2010, S4. (a-c) ITGA2-Knockout-Maus, (d-f) DDR1-Knockout-Maus, COL4A3-Knockout-Maus (g-i) und Wildtypkontrollmaus (j-l). Jeweils 150 Tage alte Mäuse.

In der Arbeit von Girgert 2010 zeigen sich elektronenmikroskopisch vereinzelte, lokalisiertes, pilzartige isodense Verdickungen der GBM (1-3 % der GBM betroffen) der ITGA2-Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. Diese subepithelialen homogenen Ausbuchungen (weiße Pfeile) der ITGA2-Knockout-Mäuse sind den Läsionen in DDR1-

Knockout-Mäusen ähnlich. Die GBM der COL4A3-Knockout-Maus weist hingegen ubiquitäre, inhomogene Aufspaltungen und Verdickungen auf.

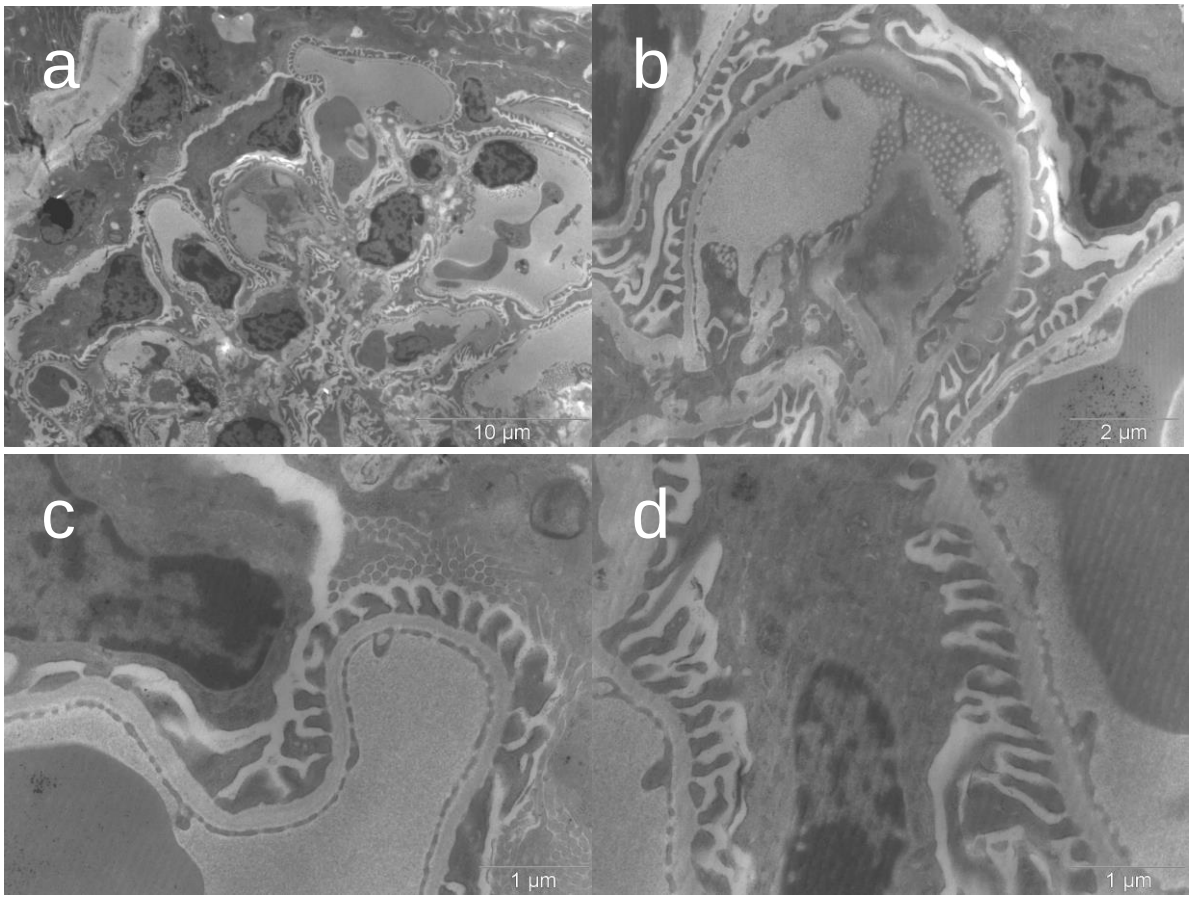


Abbildung 25: (a-d) 120 Tage alte ITGA2-DDR1-Knockout-Maus

Die Abbildungen 25 a-d zeigen glomeruläre Ausschnitte einer 120 Tage alte ITGA2-DDR1-Doppelknockout-Maus. Im Vergleich zum ITGA2 -/- und DDR1 -/- lassen sich vorbeschriebene vereinzelte Protrusionen der GBM nicht abgrenzen. Im Alter von 120 Tage stellen sich die Podozyten samt Schlitzmembran unauffällig dar, Leckagen kommen nicht zur Darstellung. Die regelrechte Anheftung der Podozyten an die GBM wurde bereits beim Genotyp ITGA2 -/- beschrieben und bezog sich auch auf Abschnitte mit lokaler Protrusion (Abb. 24 b und c aus Girgert 2010).

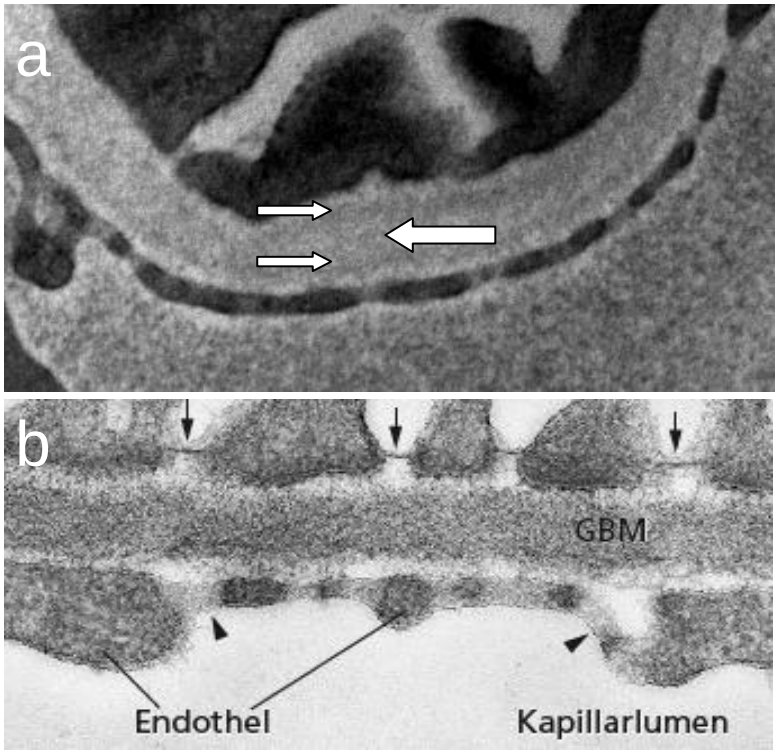


Abbildung 26: (a) Es handelt sich hierbei um einen Ausschnitt der GBM aus Abbildung 25d.
(b) Ausschnitt einer unauffälligen GBM aus Abbildung 4. Im Falle des Doppel-Knockouts weist die sonst homogen hypodense Lamina densa eine Dreischichtungen auf. Die beiden schmalen weisen Pfeile zeigen hierbei die äußeren hypodensen Schichten auf, der dicke weiße Pfeil verweist auf die eigentliche Dichte.

Wie eingangs beschrieben, besteht die GBM aus drei Schichten: einer zentralen elektronendichten Lamina densa, an die sich beidseits eine Schicht geringerer Elektronendichte anschließt (Lamina rara externa und interna). Die Lamina rara interna ist dabei den Endothelzellen zugewandt, der externe Anteil den Podozyten.
Im Falle eines Doppelknockouts weist die eigentlich sonst homogen hypodense Lamina densa sowohl in Richtung der Podozyten als auch in Richtung des Endothels eine Dreischichtung mit einem beidseits peripheren dunklen Saum auf.

3.7 In-situ-Hybridisierung

Die Durchführung der In-situ-Hybridisierung (ISH) erfolgte zum Nachweis, in welchen Abschnitten der Niere, welche für uns relevante Zytokine gebildet werden. Für den Versuch wurden Proben einer 150 Tage alten Doppelknockout-Maus gewählt.

Hierbei zeigte sich eine Expression von CTGF m-RNA ausschließlich tubulär (Abb. 27), wohingegen TGF-ß m-RNA nur podozytär (Abb. 28) nachgewiesen wurde. Im Rahmen der Negativkontrollen waren keine Signale erkennbar (Abb. 29).

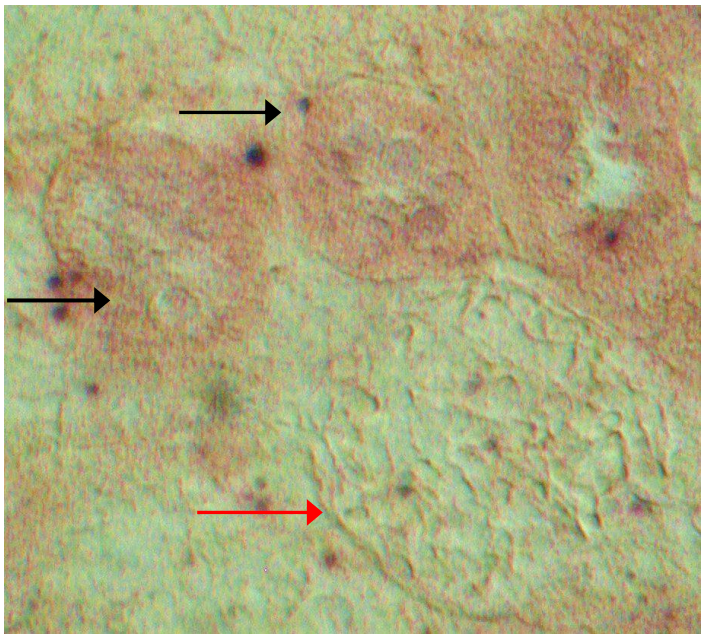


Abbildung 267: CTGF m-RNA-Expression tubulär (schwarzer Pfeile), mit rotem Pfeil markiertes signalfreies Glomerulum

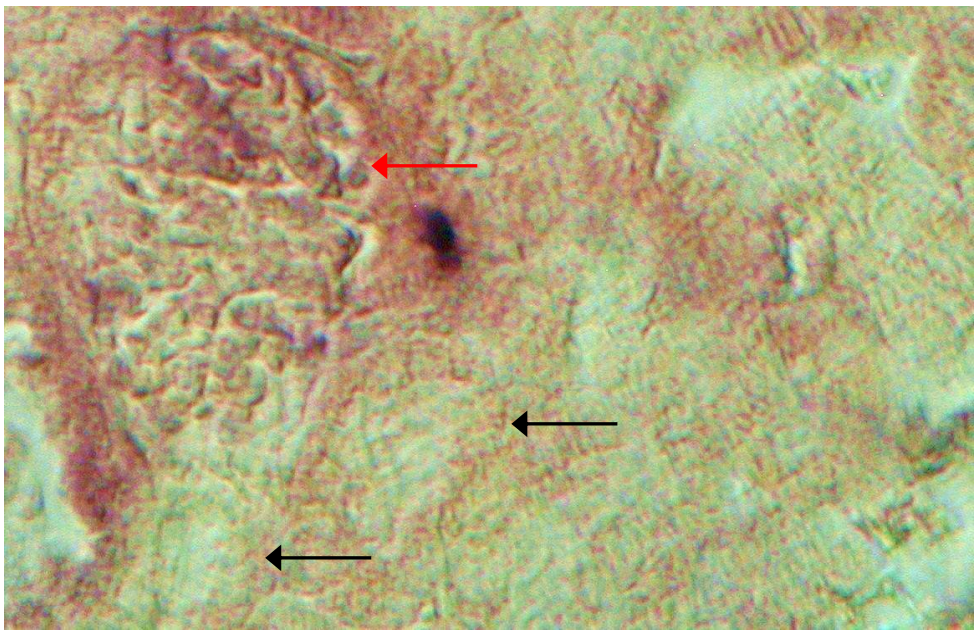


Abbildung 278: TGF-ß-mRNA-Expression zum Zeitpunkt der ISH podozytär: Der rote Pfeil zeigt hierbei auf die Kapillarschlingen des Glomerulum, wohingegen die schwarzen Pfeile auf signalnegative Tubuli verweisen.

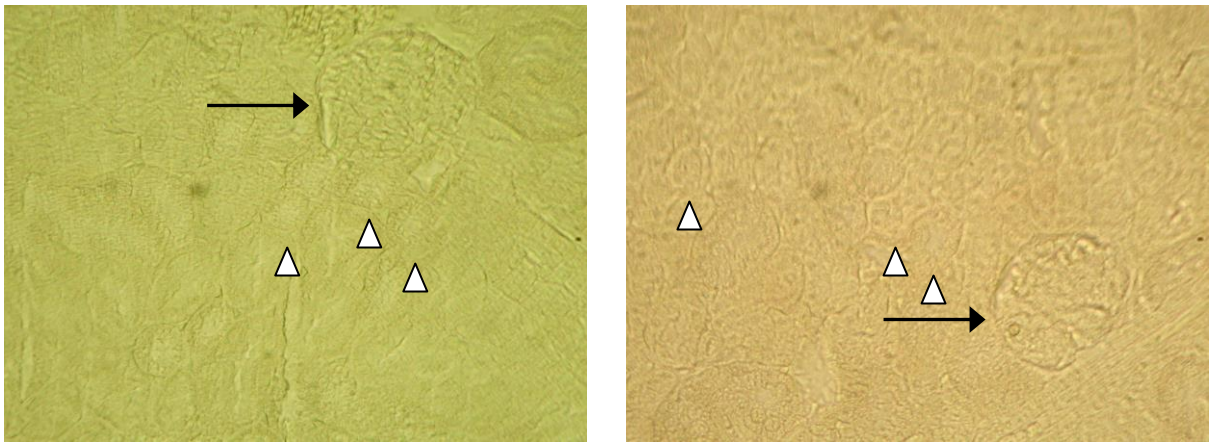


Abbildung 289: Negativkontrollen ohne Signalnachweis- schwarze Pfeile deuten auf Glomeruli, die sie umgebenden Tubuli werden exemplarisch durch weiße Dreiecke markiert.

3.8 Expression von TGF-ß und CTGF im Western-Blot

Letztendlich folgte die Western-Blot-Analyse in Hinblick auf eine mögliche Expression von TGF bzw. CTGF, sowie im Falle eines Nachweises bezüglich des zeitlichen Verlaufes. Die Angleichung der in die Geltaschen hineingegebenen Probenmengen erfolgte über Aktin. Der Vorteil der Angleichung über Aktin bestand darin, dass Aktin zu den häufigsten Proteinen in Eukaryonten gehört, dessen Expression unter den meisten Bedingungen stabil bleibt.

Die Interpretation des zeitlichen Verlaufes der TGF-ß- und CTGF-Expression erfolgte als Vervielfachung in Relation zum Wildtyp. Hierbei zeigte sich ein Abfall der Werte für CTGF nach 150 Tagen (Abb. 31), wohingegen TGF-ß nach 150 Tagen weiterhin anstieg (Abb. 30).

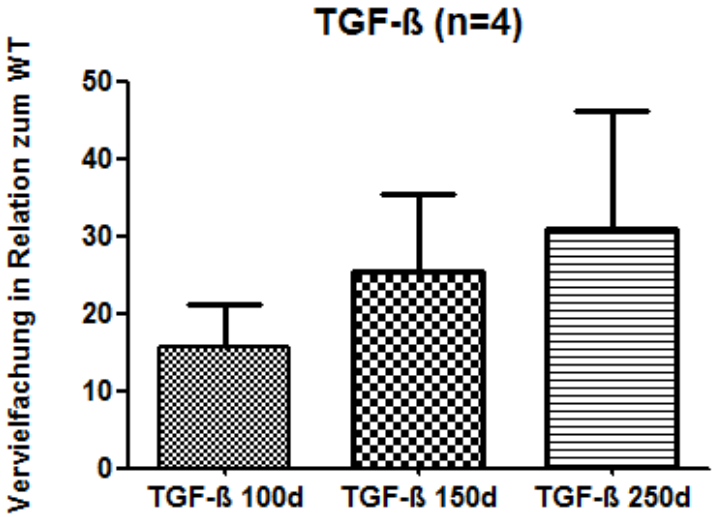


Abbildung 30: Anstieg (Vervielfachung) TGF-ß in Relation zum Wildtyp (WT)

Für folgende Konstellationen erfolgte ein Vergleich der Mittelwerte unter Zuhilfenahme von t-Test: 100 zu 150 Tage, 150 zu 250 Tage und 100 zu 250 Tage. Zur Niveauerhaltung musste der p-Wert α-adjustiert werden, was bedeutete, dass nunmehr der Unterschied $p<0{,}016$ signifikant war (0,05/3 Konstellationen).

MW TGF-ß 100 Tage	MW TGF-ß 150 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	p (2-seitig)
15,5	25,5	4	4	0,51

Tabelle 11: t-Test 100 Tage zu 150 Tage

MW TGF-ß 100 Tage	MW TGF-ß 250 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 250 Tage	p (2-seitig)
15,5	30,75	4	4	0,51

Tabelle 12: t-Test 100 Tage zu 250 Tage

MW TGF-ß 150 Tage	MW TGF-ß 250 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	Anzahl (n) für 250 Tage	p (2-seitig)
25,5	30,75	4	4	0,8

Tabelle 13: t-Test 150 Tage zu 250 Tage

Aus den Tabellen 11, 12 und 13 war ersichtlich, dass kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte für das Intervall von 100 zu 150 Tagen vorlag.

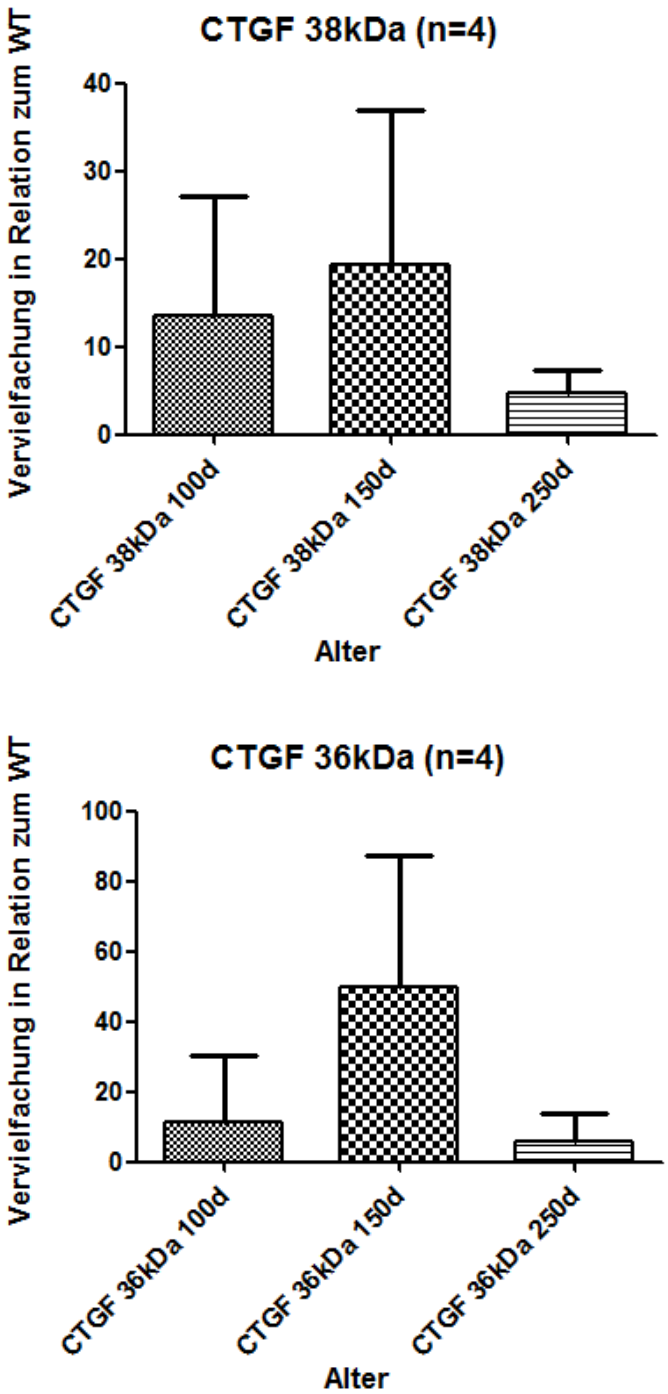


Abbildung 31: Anstieg (Vervielfachung) der beiden CTGF-Banden in Relation zum Wildtyp (WT)

Vor t-Testung der jeweiligen Paarungen für CTGF wurden die Werte für 36 kDa und 38 kDa addiert, so dass n nunmehr 8 ergab.

MW CTGF 100 Tage	MW CTGF 150 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	p (2-seitig)
12,625	53,375	8	8	0,02

Tabelle 14: t-Test 100 Tage zu 150 Tage

MW CTGF 100 Tage	MW CTGF 250 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	p (2-seitig)
12,625	5,25	8	8	0,28

Tabelle 15: t-Test 100 Tage zu 250 Tage

MW CTGF 150 Tage	MW CTGF 250 Tage	Anzahl (n) für 100 Tage	Anzahl (n) für 150 Tage	p (2-seitig)
53,375	30,75	8	8	0,02

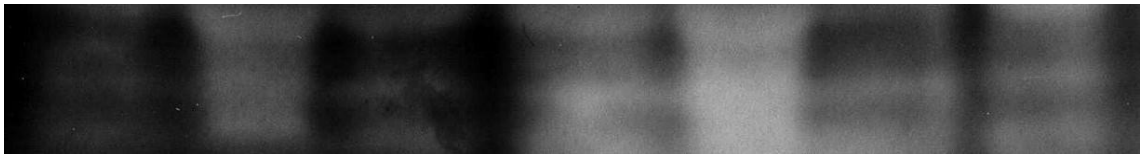
Tabelle 16: t-Test 150 Tage zu 250 Tage

Statistisch betrachtet war der Unterschied zwischen 100 und 150 Tagen wie auch der zwischen 150 und 250 Tagen nicht signifikant, graphisch lässt sich aber eine Tendenz im Sinne einer initialen Zunahme und einem folgenden Abfall erkennen.

Abbildung Western Blot A

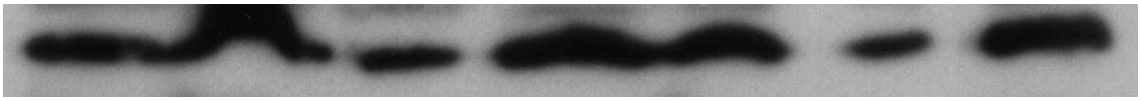
Actin	WT	100d	150d	250d	100d	150d	250d

TGF	WT	100d	150d	250d	100d	150d	250d
	1	19	45	7	7	13	72

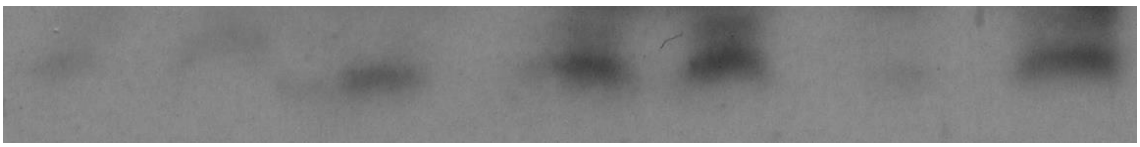


CTGF	WT	100d	150d	250d	100d	150d	250d
	1	4	5	1	13	29	7
	1	1	1	1	1	42	17

Abbildung Western Blot B



Actin	WT	100d	150d	250d	100d	150d	250d



TGF	WT	100d	150d	250d	100d	150d	250d
	1	6	40	37	30	4	7

CTGF	WT	100d	150d	250d	100d	150d	250d
	1	5	42	7	33	150	4
	1	4	74	4	40	84	1

Abb. 32: Fotografien der in den Western-Blot-Analysen detektierten Banden für die Zytokine TGF-ß und CTGF. Nach Angleichung an Actin erfolgte die Bestimmung der Vervielfachung der Banden von TGF-ß und CTGF in Relation zum Wildtyp.

4 Diskussion

Nach einer Studie von Coresh et al. waren 2007 13 % der US-Amerikaner an einer chronischen Niereninsuffizienz erkrankt, was einem Anstieg von 3 % innerhalb des letzten Jahrzehntes entspricht. Die Zahl dialysepflichtiger Patienten stieg von 209.000 im Jahre 1991 auf 472.000 in 2004. Die jährlichen Therapiekosten im Endstadium der Niereninsuffizienz in den USA wurden bereits 2002 mit etwa 66.000 USD pro Patient beziffert, die Kosten aller Patienten weltweit mit etwa 70 -75 Mrd. USD. Dem Anstieg von Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) und Prävalenz (Krankheitshäufigkeit) folgend, wurden die notwendigen weltweiten volkswirtschaftlichen Aufwendungen für das Jahr 2012 bereits auf etwa 1 Billion Dollar geschätzt (Lysaght 2002). Aktuell sind in Deutschland etwa 80.000 Menschen dialysepflichtig.

Das Krankheitsbild der chronischen Niereninsuffizienz ist in vielen Fällen mit der Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen verbunden. So ist bekannt, dass das Risiko für Dialysepatienten an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben 10 – 30 mal höher ist als in einer gesunden Vergleichspopulation (Sarnak et al. 2003).

Den für die chronische Niereninsuffizienz verantwortlichen Tubulo-Interstitiellen Nephropathien (Tubulopathien und interstitielle Nephritis) steht die große Gruppe der Glomerulopathien gegenüber. Letztere werden vorrangig durch Diabetes mellitus und arteriellen Hypertonus bedingt. Auch wenn diese beiden Volkskrankheiten unterschiedliche Pathomechanismen aufweisen, so ist ihnen doch gemeinsam, dass ihre Inzidenz steigt und die gemeinsame Endstrecke in eine Nierensklerose mündet. Hereditäre glomeruläre Nierenerkrankungen sind nur zu etwa 1 % für die diagnostizierten Niereninsuffizienzen verantwortlich. Aufgrund dessen sind sie für die Pharmaindustrie eher von geringem wirtschaftlichen Interesse.

Zusammenfassend sind fibroseinduzierende Rezeptoren und deren Blockade von großem klinischen Interesse für die Wissenschaft. Mit Hilfe dieser Arbeit wird eine Erweiterung des derzeitigen Wissensstandes angestrebt.

4.1 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und kritische Betrachtung

4.1.1 Allgemeines

Zum Zeitpunkt der Nierenentnahme fanden sich makroskopisch keine fibrotischen Schrumpfnieren. Ein derartiger Phänotyp hätte eine erhöhte Mortalität und Morbidität zur Folge haben müssen. Tatsächlich wiesen die Mäuse jedoch, sofern sie nicht zur Explantation vorgesehen waren, ein Alter von 200 Tagen und darüber hinaus auf. Die letztmalige Kontrolle auf Überleben erfolgte zum Zeitpunkt 250 Tage, wobei auch hier weiterhin keine Verluste festzustellen waren. Nach den Untersuchungen von Gross et al. wird Mäusen mit dem Genotyp DDR1 -/- und COL4A3 +/+ eine normale Lebenserwartung vorausgesagt (Gross et al. 2004). In diesem Kontext ist festzuhalten, dass keines der Tiere unter dem Rezeptorenverlust frühzeitig verstarb.

4.1.2 Histologie

Die Durchführung der H.E.-Färbung ist ein bewährtes Verfahren zur orientierenden Detektion von strukturellen Gewebsveränderungen in feingeweblichen Schnitten.

Im Rahmen der lichtmikroskopischen Untersuchung fanden sich keinerlei Auffälligkeiten. Im Interstitium war weder eine Matrixakkumulation oder Hyperzellularität im Sinne einer Entzündung nachweisbar, noch zeigte sich eine Atrophie der Glomeruli. Girgert beschrieb in seinen wissenschaftlichen Ausführungen von 2010, dass der Verlust von ITGA2 im Vergleich zum Wildtyp nach 150 Tagen nur einen geringen Zuwachs glomerulärer, periglomerulärer und tubulointerstitieller Matrixakkumulation zur Folge hatte. Ähnlich verhielt es sich bei DDR1-/- Mäusen: Hier fand sich kein Anhalt für eine glomeruläre bzw. tubulointerstitielle Fibrose oder ein Verlust von Nephronen (Gross et al. 2004).

4.1.3 Proteinurie

Um sowohl Qualität als auch Quantität eines möglichen Nierenschadens zu detektieren, wurde Urin für eine diskontinuierliche Gelelektrophorese verwertet, um qualitative (Größe der Proteine in kDa) und quantitative Proteinurie darzustellen, wie es auch 2003 von Gross et al. beschrieben wurde.

Wie im Ergebnisteil bereits angesprochen, erfolgte die Auswertung der Proteinurie zweigeteilt, da sich erst aus der Immunhistochemie die Notwendigkeit einer zusätzlichen späteren Verlaufsbestimmung ergab.

Hierbei war sowohl im Zeitraum von 60-140 Tagen als auch im Alter von 160-200 Tagen ein Rückgang der Makro- und Mikro- sowie der Albuminurie festzustellen.
Festzuhalten ist, dass bei Mengen von n=1 für 60d und 80d, n=2 für 100d und 120d und n=3 für 140d sowie n=2 für 160, 180 und 200d keine Ermittlung einer Standardabweichung bzw. t-Testung möglich ist und somit keine Aussage zum Signifikanzintervall getroffen werden kann. Ursächlich hierfür waren zum einen nicht ausreichende Probenmenge bzw. auch denaturierte Proben oder nicht verwertbare Proben wie z.B. trüber Urin bei weiblichen Mäusen, was für einen Harnwegsinfekt sprach.

4.1.4 Immunhistochemie

Die Gewinnung von Nierengewebsproben und deren histologische Aufarbeitung stellt den Goldstandard zur Diagnosefindung renaler Defekte, da der klinischen Chemie sowie der bildgebenden Verfahren hier Grenzen gesetzt sind.
Um zwischen reversiblen und irreversiblen Strukturveränderungen unterscheiden zu können, wählten wir für die Immunohistochemie einerseits die Laminin-1-Färbung Marker für eine mögliche reversible Matrixakkumulationen und andererseits die Fibronektin-Färbung zur Detektion von Narbengewebe. Mit der zentralen Fragestellung nach einer Fibroseentwicklung war es sinnvoll, eine Graduierung zu treffen.
Im Rahmen der Fibronektinfärbung war kein Hinweis auf Vernarbung ersichtlich. Die in der Lamininfärbung aufgezeigten Signale sprachen ebenfalls für eine reversible Akkumulation von Bindegewebe sowohl in den Glomeruli als auch im Interstitium. Wenn auch durch die Bewertung der Sklerosescores in beiden Fällen (glomerulär bzw. interstitiell) keine Signifikanz für den Gesamtverlauf festgestellt werden konnte, so ließ sich zum einen graphisch Tendenz im Sinne einer Besserung erkennen, zum anderen wurde eine Gesundung in beiden Fällen mit einem p-Wert von 0,04 angedeutet.
Die graphische Verhalten wie auch die fast signifikanten p-Werte ermöglichen einen indirekten Beweis dafür, dass der ermittelte Proteinurierückgang tatsächlich erfolgte und es sich nicht um ein zufälliges Ergebnis handeln kann.
Während der Sklerosescore glomerulär im zeitlichen Intervall von 100 zu 150 Tagen sank, stieg er im gleichen Zeitraum interstitiell an. Letztlich sank aber auch der interstitielle Sklerosescore bis zum Zeitpunkt 250 Tagen.
Der primäre Anstieg einer unselektiven Proteinurie von Mikro- bis Makroproteinen spricht für einen Defekt der glomerulären Filtrationsbarriere. Sekundär wirkt sich diese, unabhängig der Rückresorptionskapazität der Tubuli, toxisch auf Tubulussystem und Interstitium aus. So

wird z.B. das Albumin von proximalen Tubuluszellen reabsorbiert, welche im Falle einer Überladung mit einer Ausschüttung von Zytokinen reagieren (Bruzzi I, Benigni A und Remuzzi G 1997). Der initial glomeruläre Schaden hat einen sekundären interstitiellen Schaden zur Folge. Dafür spricht, dass zum Zeitpunkt von 150 Tagen der interstitielle Sklerosescore noch ansteigt, obwohl kaum mehr Proteinurie festzustellen ist.

4.1.5 Elektronenmikroskopie

Im Falle des Doppelknockouts wurden die im Vergleich zum Einzelknockout beschriebenen vereinzelten Protrusion der GBM in Richtung der Podozyten nicht beobachtet. Allerdings wies die sonst homogen hypodense Lamina densa vereinzelt sowohl in Richtung der Podozyten als auch in Richtung des Endothels eine Dreischichtung mit einem beidseits peripheren dunklen Saum auf. Dieses vereinzelt auftretende Phänomen interpretieren wir als Aufsplitterung der GBM. Mehrheitlich stellte sich die GBM aber passend zur deutlichen regredienten Proteinurie unauffällig dar.

4.1.6 In-situ-Hybridisierung und Western-Blot

Die In-situ-Hybridisierung diente der Bestätigung der von Girgert et al. 2010 erlangten Erkenntnisse bezüglich der Expressionsorte von TGF-ß und CTGF. Des Weiteren bestand ihr Vorteil darin, dass das Vorhandensein einer spezifischen mRNA darauf hinweist, dass zum Zeitpunkt der Analyse diese Zielgene transkribiert wurden, womit im Endeffekt ein zeitlicher und räumlicher Verlauf der Expression von TGF-ß und CTGF darstellbar war.

Die durchgeführte Western-Blot-Analyse ist ein zur Detektion spezifischer Proteine, in unserem Fall Zytokine, anerkanntes und bewährtes Verfahren, weshalb an dieser Stelle nicht weiter auf die Methode eingegangen werden soll.

Die durchgeführte In-situ-Hybridisierung diente der Bestätigung, dass CTGF rein tubulär und TGF-ß nur in glomerulären Zellen exprimiert wird. Statistisch waren weder die Ergebnisse der Verläufe von TGF-ß und CTGF signifikant, graphisch ließ sich aber für CTGF eine Tendenz im Sinne einer initialen Zunahme und einem folgenden Abfall erkennen. Der mit dem Alter der Mäuse beobachtete Abfall der CTGF-Expression korrelierte mit dem Verlauf von Histologie, Proteinurie und Immunhistochemie. Erst kürzlich wurde das parallele Verhalten von TGF-ß und CTGF wieder sehr anschaulich am Modell der intraperitonealen Fibrose durch Zytokininjektion, der Nierenfibrose durch einseitige Uretherobstruktion und Lungenfibrose durch intratracheale Bleomycingabe verdeutlicht (Wang Q. et al. 2011).

In unseren Versuchen stiegen die Werte für TGF-ß zwar weiterhin an, führten aber nicht zu glomerulären Schäden. Des Weiteren werden die untersuchten Zytokine tubulär rückresorbiert. Gerade aber das Interstitium zeigte einen kontinuierlichen Rückgang der Matrixakkumulation bei völligem Fehlen von Vernarbungszeichen auf. Des Weiteren war im Hinblick auf eine mögliche Fehlerbetrachtung die überdurchschnittlich große Standardabweichung für den TGF-ß-Wert zum Zeitpunkt von 250 Tagen zu beachten.

4.1.7 Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass selbst der Verlust der beiden Kollagenrezeptoren ITGA2 und DDR1 nicht so schwer wiegt, als dass es zur Ausprägung einer Nierenfibrose kommt. Allerdings scheint der Ausfall beider Rezeptoren für eine mangelnde Interaktion zwischen Zellen und Matrix verantwortlich zu sein, was über eine verspätete GBM-Ausreifung zu einer Proteinurie, Auftreten profibrotischer Zytokine, Matrixakkumulation und eventuell einem verspätetem Laminin- und Kollagenswitch führt (siehe Punkt 4.2):

4.2 Verspätete Ausreifung der glomerulären Basalmembran

Säuglinge können bei Infektionen eine milde Proteinurie aufweisen. Grund hierfür ist die noch unreife GBM, da es erst im Laufe der Entwicklung zu einem Switch der Kollagenketten Typ α1 und α2 in die adulte Form aus den Ketten α3- α5 kommt (Miner 2003). Die von uns beobachtete Proteinurie am Mausmodell mit einem Maximum bei 100 Tagen fiel aber in einen Zeitraum, zu dem die Reifung der GBM, längst abgeschlossen sein müsste. Eine so genannte präadulte GBM kann somit ursächlich für den festgestellten Verlust von Proteinen verantwortlich gemacht werden.

Miner konstatierte, dass die unreife GBM anfälliger für den mechanischen Druck im Rahmen der Ultrafiltration sei. Zudem sei eine präadulte GBM weniger resistent gegenüber endogenen proteolytischen Prozessen. Miner postuliert, dass das Fortbestehen der Ketten α1 und α2 im Kollagen Typ IV als Ersatz für die defekten Ketten α3- α5 parallel zu einer Überexpression von Laminin 1 in der EZM führe, welche die Ultrastruktur schädige und somit eine Proteinurie zur Folge habe (Miner 2003).

Miner äußert 1998 in seinen Darstellungen, dass Kollagen IV und Laminin im Rahmen der Ausreifung der Filtrationsbarriere einen Wechsel ihrer Ketten auf Isoformenebene aufzeigen. Ebenfalls zeigt Noakes, dass es am Modell der Laminin-2-Knockoutmaus zur Überexpression von Laminin 1 kommt, was für eine unreife GBM spräche (Noakes et al. 1995).

Besonders zu beachten ist dabei, dass Miner bereits 1999 darauf verweist, dass Laminin 11 das einzig bekannte Laminin der adulten GBM ist (Miner 1999). Dazu passt auch die Beobachtung, dass eine Laminin-11 defiziente Maus das Bild des sogenannten finnischen kongenitalen nephrotischen Syndroms mit ausgeprägter Proteinurie aufweist. Elektronenmikroskopisch zeigt sich dabei ein Defekt der Podozyten, da ihre Fußfortsätze verschmelzen (Holthöfer et al. 1999). Die von uns durchgeführte Laminin 1-Immunohistochemie zeigte zwar ein inhomogenes Verhältnis zwischen Glomeruli und Interstitium, allerdings gilt zu beachten, dass sich die Glomeruli von 100-250 Tagen recht intensiv und homogen anfärbten. So bemerkten z. B. auch Abrahamson et al. 2003, dass es bei der Ausreifung der GBM der Alportmaus zu einem Wiederauftreten von Laminin1 parallel zu Laminin 11 kommt. Im Umkehrschluss sieht er in der Ursache für das erneute Auftreten von Laminin 1 das Fehlen der α3, α4, α5(IV) Kollagenketten.

Gross et al. zeigten 2010 mittels Immunogoldfärbung auf, dass DDR1 in den glomerulären Epithelien exprimiert wird, genauer auf der basalen Seite der Podozyten an ihren Fußfortsätzen in unmittelbarer Nachbarschaft zur GBM und der Schlitzmembran. Gleichzeitig verweisen sie auf Arbeiten von Abrahamson und Mitarbeitern aus dem Jahre 2009, wonach Integrine ebenfalls mit dem Zytoskelett der Podozyten verwoben sind.

In diesem Zusammenhang ließe sich die Behauptung aufstellen, dass die GBM einer sonst kollagengesunden Maus ohne die Rezeptoren ITGA2 und DDR1erst verspätet ausreift.

Aus den Untersuchungen lässt sich folgende Arbeitshypothese aufstellen: Eine durch die verspätete Ausreifung der GBM hervorgerufene Proteinurie ist ursächlich für das Ansteigen der Zytokine TGF-ß und CTGF. Der Anstieg dieser profibrotischen Mediatoren reicht allerdings nicht aus, um eine Vernarbung des Nierengewebes zu erzeugen, was sich im fehlenden Nachweis von Fibronektin widerspiegelt. Des Weiteren ist die in der Lamininfärbung nachgewiesene Matrixakkumulation im Verlauf rückläufig.

4.3 Offene Fragen

Laut Hynes 2002 sind die Integrine α3β1 und α6β1 die hauptsächlich bindenden Rezeptoren für Laminin, dominierend für das Kollagen sind hingegen die Integrine α1β1 and α2β1. Dennoch bleibt unklar, welche Rezeptoren den Podozyten das Vorhandensein einer intakten präadulten GBM anstatt von DDR1 und ITGA2 signalisieren bzw. über welche Rezeptoren die Podozyten letztendlich zur Induktion des Laminin- und Kollagen-Switches angeregt werden.

Weitere Studien sollten klären, zu welchem Zeitpunkt, ein Auftreten des Laminin 11 (α5ß2γ1) in den DDR1/ITGA2 -/- zu beobachten ist. Sollte hierbei ein paralleles Auftreten beider Laminine feststellbar sein, so stellt sich die Frage, ob Laminin 1 pathogen genug ist, die Ultrastruktur der GBM zu schädigen bzw. ob es ein geeignetes Ziel für die Herstellung entsprechender Pharmazeutika darstellt.

Zu diesem Zweck wäre es sinnvoll, die GBM elektronenmikroskopisch vor und nach dem Zeitpunkt von 120 Tagen zu untersuchen. Gemäß unserer Hypothese müsste die jünger 120 Tage alte GBM auffälligere Defekte als die beschriebene Dreischichtung der Laminia densa aufweisen. Eine ältere GBM sollte hingegen defektfrei sein.

4.4 Ausblick

Aktuell sind nur wenige nephroprotektive Medikamente wie ACE (Angiotensin Converting Enzyme)-Hemmer vorhanden. Die blutdrucksenkende spezifische Wirkung ist in prospektiven Studien sowohl bei diabetischer als auch nicht-diabetischer Nephropathie nachgewiesen worden. Zum einem senken ACE-Hemmer über die Dilatation des Vas efferens den intraglomerulären Druck, zum anderen ist ihre nierenprotektive Wirkung in einer verminderten Bildung von Angiotensin II zu sehen. So trägt Angiotensin II zu einer Erhöhung der glomerulären Permebilität mit konsekutiver Proteinurie bei. Des Weiteren besitzt es eine proliferative und proinflammatorische Wirkung und fördert über TGF-ß eine verstärkte Matrixbildung (Schneider, Mann und Schmieder 2000).

Getrennt voneinander betrachtet, weisen ITGA2 bzw. DDR1 defiziente Alportmäuse ein verzögertes und milderes Auftreten des Vollbildes des Alport-Syndroms auf. Vor dem Hintergrund, dass die Embryonalphase auch mit dem Verlust beider Rezeptoren überlebt wird, wäre es demnach therapeutisch sinnvoll, pharmakologisch beide Rezeptoren zu hemmen.

Anti-Integrine haben mittlerweile ihren Einzug in die Therapie verschiedener Erkrankungen gehalten. Bekanntester Vertreter dürfte Natalizumab sein. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper gegen die α4-Untereinheit des α4ß1-Integrins, welches die Migration von Th1-Lymphozyten begünstigt, die wiederum für die so genannten Schübe der Multiplen Sklerose mitverantwortlich sind (Rice et al. 2005).

Auch Tyrosinkinaseinhibitoren sind heute fester Bestandteil einer Chemotherapie, wie z.B. der Chronisch myeloischen Leukämie. Als bekannteste Vertreter gilt hier das Imatinib, das in therapeutischen Dosen neben seiner Zieltyrosinkinase Bcr/Abl auch andere

Tyrosinkinaserezeptoren selektiv, wie DDR1, hemmt (Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G 2008).

2005 zeigten Wang S. et al. im Tiermodell anhand von Ratten mit unilateraler Ureterobstruktion, dass Imantinib deutlich einen Anstieg interstitieller Fibroblasten verhindert und die Expression einer interstitiellen Akkumulation von Kollagen III, IV und Fibronektin reduziert.

Auch wenn Zytokine in dieser Arbeit keinen relevanten Einfluss auf das Nierengewebe hatten, bleibt abzuwarten, wie sich ihre Expression im Falle eines Trippelknockouts (COL4A3, ITGA2 und DDR1) bzw. im Falle einer diabetischen Doppelknockoutmaus (ITGA2 und DDR1) verhält. Zwar ist bekannt, dass eine TGF-ß-Knockout-Maus nicht überlebensfähig ist (Kulkarni et al. 1993), so gibt es doch Versuche direkt in die komplexe TGF-ß-Signalkaskade einzugreifen. So zeigte bereits Cruz et al. 2000, dass die Substitution von Taurin, eine Aminosulfonsäure, die Expression von TGF-ß reduziert.

Die Aufschlüsselung der komplexen Interaktion einer Vielzahl von Kollagenrezeptoren mit den Podozyten sowie der GBM bedarf weiterführender Forschungen, da diese gewichtige Ansatzpunkte zur Verlangsamung bzw. sogar zur Verhinderung renaler Fibrosen liefern können.

5 Zusammenfassung

Die Zahl dialysepflichtiger nierenkranker Patienten hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Betrug ihre Zahl in den USA 1991 noch 209.000, so waren 2004 bereits 472.000 auf eine Nierenersatztherapie angewiesen. In Deutschland liegt ihre Zahl bei aktuell etwa 80.000. Hauptursachen für eine terminale Niereninsuffizienz liegen im Diabetes mellitus sowie arteriellen Hypertonus. Die Zahl dialysepflichtiger Patienten wird also auch in den nächsten Jahren weiter ansteigen. Abgesehen vom beträchtlichen volkswirtschaftlichen Schaden, gehen mit einer terminalen Niereninsuffizienz eine erhöhte Morbidität und Mortalität einher. So steigt das Risiko kardialer Erkrankungen um ein Vielfaches. Die Mehrheit chronischer Nierenerkrankungen wird durch glomeruläre Defekte hervorgerufen. In dieser Arbeit wurde deshalb im Mausmodell die Bedeutung der Kollagenrezeptoren DDR1 (Discoidin Domain Rezeptor 1) und ITGA2 (Integrin Alpha 2) in der Pathogenese von glomerulären Nierenerkrankungen untersucht. Von zentralem Interesse waren neben der Betrachtung des renalen Phänotyps, die Analyse der glomerulären Basalmembran sowie die Prüfung auf Vorhandensein nierenschädigender Faktoren.

Zunächst wurden H.E.-Färbungen der Nieren zur orientierenden Übersicht hergestellt. Mögliche Anzeichen einer Bindegewebsakkumulation oder Vernarbung wurden mittels immunhistochemischer Laminin- bzw. Fibronektin-Färbung untersucht. Die Proteinurie wurde mittels Elektrophorese untersucht, der Beweis von profibrotischen Zytokinen erfolgte durch Western-Blot-Analysen. Die Beschaffenheit der GBM wurde mittels Elektronenmikrospie untersucht.

Die H.E.-Färbung war lichtmikroskopisch unauffällig, jedoch ließ sich mittels Gelelektrophorese eine Mikro-, Makro- und Albuminurie mit einem Maximum zum Zeitpunkt von 100 Lebenstagen nachweisen, die mit 200 Tagen wieder stark sank. Auf dem Boden der nierenschädigenden Proteinurie, zeigten die Western-Blot-Analysen das Vorhandensein der Zytokine TGF-ß und CTGF auf. CTGF war passend zur abfallenden Proteinurie im Verlauf rückläufig. Der weitere Anstieg von TGF-ß ist am ehesten einer großen Standardabweichung zum Zeitpunkt von 250 Tagen geschuldet. Für die beiden Zytokine konnte in früheren Studien ein kongruentes Expressionsverhalten belegt werden.

Laminin-1 wies immunhistochemisch ein schwaches und heterogenes Signal im Interstitium der Nierenproben auf. Die Glomeruli im Alter von 100, 150 und 200 Tagen ließen sich hingegen kräftig und homogen anfärben. Dies ist insofern interessant, als dass Laminin-1 in

adulten Glomeruli nicht nachweisbar sein sollte, sondern nur Laminin 11. Die zur Detektion von Narbengewebe durchgeführte Fibronektinfärbung , erbrachte keinerlei weiterführende Anhaltspunkte. In der Elektronenmikroskopie ließ sich vereinzelt eine Mehrschichtung der GBM nachweisen, was als Ausreifungsstörung interpretiert wurde.

Der Wegfall der beiden Kollagenrezeptoren ITGA2 und DDR1 scheint somit die Interaktion der Podozyten mit der GBM zu stören. Dies hat eine Proteinurie zur Folge. In Folge dessen werden profibrotische Zytokine sezerniert. Die juvenilen α-1- und α-2-Ketten des Kollagen IV werden durch die adulten Ketten α 3-5 ersetzt, ebenso erfolgt der Switch von Laminin 1 zu 11. Die Proteinurie wie auch die profibrotischen Zytokine sind rückläufig. Das Fehlen der beiden Kollagenrezeptoren DDR1 und ITGA2 führte jedoch nicht zur Ausbildung einer renalen Fibrose, wie in der Fibronektin-Färbung gezeigt werden konnte.

Gross und Girgert zeigten, dass nierenkranke Mäuse nach dem Verlust von DDR1 oder ITGA2 einen verzögerten Verlauf der Nierenfibrose entwickelten. Vielversprechend scheinen Untersuchungen z.B. am Mausmodell Col4A3/DDR1/ITGA2 -/- oder an einer diabetischen ITGA2/DDR1 -/- Maus. Gesetzt dem Fall, dass eine renale Fibrose im Vergleich zum Einzelknockout noch später eintritt, eignen sich diese beiden Kollagenrezeptoren als therapeutisches Ziel. Aktuell stehen nur wenige nephroprotektive Medikamente, wie ACE-Hemmer, zur Verfügung. Anti-Integrine und Inhibitoren gegen Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie DDR1, haben bereits Einzug in den klinischen Alltag gehalten und stellen eventuell einen wirksamen Ansatzpunkt zur Verhinderung einer renalen Fibrose dar.

6 Literaturverzeichnis

Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St John PL (2003): Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes. *Kidney Int* 63(3), 826-834

Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL (2009): Cellular origins of glomerular basement membrane type IV collagen networks. *J Am Soc Nephrol* 20(7), 1471–1479

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC (2005): A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24 (5), 326–332

Beck K, Hunter I, Engel J. (1990): Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 4(2), 148-160

Belkin AM, Stepp MA (2000): Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* 51(3), 280-301

Bohle A, Strutz F, Muller GA (1994): On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium. *Exp Nephrol 2*, 205-210

Border WA, Noble NA (1994): Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New Eng J Med* 331, 1286-1292

Borza CM, Su Y, Chen X, Yu L, Mont S, Chetyrkin S, Voziyan P, Hudson BG, Billings PC, Jo H, Bennett JS, Degrado WF, Eckes B, Zent R, Pozzi A (2012): Inhibition of integrin α2β1 ameliorates glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 23(6), 1027-38

Bosman FT, Stamenkovic I (2003): Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200(4), 423-428

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254

Brownlee (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820

Bruzzi I, Benigni A, Remuzzi G (1997): Role of increased glomerular protein traffic in the progression of renal failure. *Kidney Int* 62, 29-31

Chen J, Diacovo TG, Grenache DG, Santoro SA, Zutter MM (2002): The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* 161(1), 337-344

Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS (2007): Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *JAMA* 298(17), 2038-2047

Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A, Kalluri R (2000): Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 157, 1649–1659

Cruz CI, Ruiz-Torres P, del Moral RG, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D (2000): Age-related progressive renal fibrosis in rats and its prevention with ACE inhibitors and taurine. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, 122-129

Eble JA, Golbik R, Mann K, Kühn K (1993): The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]2 alpha 2(IV). *EMBO J* 12(12), 4795-4802

Eddy AA (2000): Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15, 290-301

Eddy AA (2005): Progression in Chronic Kidney Disease. *Pediatric Chronic Kidney Disease* 12, 353–365

Flanders KC (2004): Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85(2), 47-64

Forbes CD, Jackson WF: Farbatlas der Inneren Medizin. 1. Auflage; Elsevier, München 2008

Frei U, Schober-Halstenberg HJ (2008): Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebahndlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. *QuasiNiere* 1-64

Gardner H, Broberg A, Pozzi A, Laato M, Heino J (1999): Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *J Cell Sci* 112, 263-272

Giancotti FG, Ruoslahti E (1999): Integrin signaling. *Science* 285(5430), 1028-1032

Giancotti FG, Tarone G (2003): Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 173-206

Girgert R, Martin M, Kruegel J, Miosge N, Temme J, Eckes B, Müller GA, Gross O (2010): Integrin α2-deficient mice provide insights into specific functions of collagen receptors in the kidney. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3(19), 1-10

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA (2006): Advanced Glycation End Products. Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* 114, 597-605

Gombos A, Izzedine H, Besse B, Massard C, Brocheriou I, Bahleda R, Soria JC (2010): Proteinuria and proximal tubule lesions induced by an anti-integrin monoclonal antibody treatment: case report. *Invest New Drugs* 28(1), 102-105

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

Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse AC, Segerer S, Vogel WF, Müller GA, Weber M. (2010): Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. *Matrix Biol* 29(5), 346-356

Gross O Göttingen 2013, persönliche Mitteilung

Grotendorst GR (1997): Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3):171-179

Hahn WH, Suh JS, Cho BS, Kim SD (2010): Linkage and association study of discoidin domain receptor 1 as a novel susceptibility gene for childhood IgA nephropathy. *Int J Mol Med* 25(5), 785-791

Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G 2008: Target Spectrum of BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma* 49(4), 615-619

Hehlgans S, Haase M, Cordes N (2007): Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 1775, 163-180

Herold G: Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, Gerd Herold, Köln 2010

Holthöfer H, Ahola H, Solin M-L, Wang S, Palmen T, Luimula P, Miettinen A, Kerjaschki D (1999): Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol* 155(5), 1681-1687

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, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *New Eng J Med* 348, 2543–2556

Humphries MJ (2000): Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28(4), 311–339

Hynes RO (1987): Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-554

Hynes RO (1999): Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 9, M33-37

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

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P (2000): Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267(24), 6954-6967

Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM (2003): Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130 (12), 2779-2791

Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR (1993): Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* 12(3), 1059–1065

Jacobsen JN, Steffensen B, Häkkinen L, Krogfelt KA, Larjava HS (2010): Skin wound healing in diabetic β6 integrin-deficient mice. *APMIS* 118(10), 753-764

Kalluri R, Wilson CB, Weber M, Gunwar S. Chonko AM, Neilson EG, Hudson BG (1995): Identification of the a3(IV) chain of type IV collagen as the common autoantigen in anti-basement membrane disease and Goodpasture syndrome. *J Aın Soc Nephrol* 6, 1178-1185

Kramer RH, Marks N (1989): Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem* 264, 4684-4688

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S (1993): Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci* 90(2), 770-774

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

Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, Johnson RJ, Lan HY (2004): Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J* 18(1), 176-188

Liu Y. (2004): Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol* 15, 1-12

Lysaght MJ (2002): Maintenance Dialysis Population Dynamics: Current Trends and Long-Term Implications. *J Am Soc Nephrol* 13, 37-40

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002): The Protein Kinase Complement of the Human Genome, *Science* 298 (5600) 1912-1934

Merker HJ (1994). Morphology of the basement membrane. *Microscopy Research and Technique*, 28, 95-124

Miner JH (1998): Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7(1), 13-19

Miner JH (1999): Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56, 2916-2024

Miner JH (2003): Of laminins and delamination in Alport syndrome. *Kidney Int* 63, 1158-1159

Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH (2000): TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75, 115-157

Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, Baralle FE (2003): Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* 162(1), 149-160

Noakes PG, Miner JH, Gautam M, Cunningham JM, Sanes JR, Merlie JP (1995): The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat Genet* 10(4), 400-406

Ogilvie AD, Wood NC, Dickens E, Wojtacha D, Duff GW (1990): In situ hybridisation. *Ann Rheum Dis* 49, 434-439

Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, Giancotti FG (1999): Integrin-mediated Activation of Focal Adhesion Kinase Is Required for Signaling to Jun NH_2-terminal Kinase and Progression through the G1 Phase of the Cell Cycle. *J Cell Biol* 145(7), 1461–1470

Pavelka M, Roth J: Funktionelle Ultrastruktur. Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben. 1. Auflage , Springer, Wien 2005, 166-167

Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2003): Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol Rev* 83(1), 253-307

Praga M, Morales E (2002): Renal damage associated with proteinuria. *Kidney Int* 62, 42-46

Prockop DJ, Kivirikko KI (1995): Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64, 403-434

Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C (1975): The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 64(2), 509-516

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

Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA (2005): Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 64(8), 1336-1342

Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG (2000): Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11, 25–38

Robinson DR, Wu YM, Lin SF (2000): The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19 (49) 5548–5557

Romeis – Mikroskopische Technik. Hrsg. von Mulisch M, Welsch U. 18. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 2010, 419-447

Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW (2003): Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108, 2154-2169

Schneider M, Mann J, Schmieder R (2000): Medikamentöse Nephroprotektion. *Internist* 41, 679-687

Söderhäll C, Marenholz I, Kerscher T, Gruber C, Worm M, Esparza-Gordillo J, Rüschendorf F, Rohde K, Schulz H, Wahn U, Hubner N, Lee YA (2007): Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biology* 5(9), e242

Takada Y**,** Ye X, Simon S (2007): The integrins. *Genome Biology* 8(5) 215

Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979): Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254 (19), 9933–9937

Vandenberg P, Kern A, Ries A, Luckenbill-Edds L, Mann K, Kuhn 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

Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997): The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell*1(1), 13-23

Vogel W, Brakebusch C, Fässler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T (2000): Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta1 integrin. *J Biol Chem* 275(8), 5779–5784

Vogel WF (2001): Collagen-receptor signaling in health and disease. *Eur J Dermatol* 11(6), 506-514

Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE (2006): Sensing extracellular matrix: An update on discoidin domain receptor function. *Cell Signalling* 18, 1108–1116

Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, Roberts T, Li XJ, Brinkman H, Mason RM (2001): Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biochem J* 359, 77–87

Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, Lin A, Yeowell D (2011): Cooperative interaction of CTGF and TGF-β in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4(4), 1-11

Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R (2005): Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J* 19(1), 1-11

Weiss J, Becker K, Bernsmann E, Dietrich H, Nebendahl K: Tierpflege in Forschung und Klinik, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage, Enke-Verlag, Stuttgart 2008

Wenzel U, Dominiak P, Neumayer HH, Wolf G (2003): Hemmung der Progression von chronischen Nierenerkrankungen: Therapie durch Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems. *Dtsch Arztebl* 100(31-32), 2072- 2079

Wessel D, Flügge UI (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138(1), 141-143.

Yang JT, Rayburn H, Hynes RO (1993): Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* 119(4), 1093-1105

Zeisberg M, Ericksen MB, Hamano Y, Neilson EG, Ziyadeh F, Kalluri R (2002): Differential expression of type IV collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 401-407

Zerlin M, Julius MA, Goldfarb M (1993): NEP: a novel receptor-like tyrosine kinase expressed in proliferative neuroepithelia. *Oncogene* 8, 2731–2739

Zhang C, Meng X, Zhu Z, Liu J, Deng A (2004): Connective tissue growth factor regulates the key events in tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. *Cell Biol Int* 28(12), 863-873

Danksagung:

Mein primärer Dank gilt meinen Doktorvater Prof. Dr. med. O. Gross für das Anvertrauen des Doktorthemas, Herrn PD Dr. rer. nat. R. Girgert für die schnelle Einarbeitung in die einzelnen laborchemischen Verfahren sowie Frau A. Bernhard für die Unterstützung während der Durchführung der Experimente.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. J. Krügel für die Bereitstellung der elektronenmikroskopischen Bilder.