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

Die Bedeutung der glomerulären Basalmembrankomponente Nidogen-1 bei podozytären Erkrankungen der Niere

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christine Spieker
aus Göttingen

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in:	Prof. Dr. Oliver Gross
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Jörg Wilting
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Rainer Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 12.06.2017

Abkürzungsverzeichnis **5**

1. Einleitung **7**

1.1 Zielsetzung der Arbeit **21**

2. Material und Methoden **22**

2.1 Verwendete Mäuse für Elektronenmikroskopie, Western Blot und PCR **22**

2.2 Genotypisierung **22**

2.3.1 Präparation für die Histologie **26**

2.3.2 Elektronenmikroskopische Methodik **27**

2.3.2.1 LR-Gold®-Einbettung 27

2.3.2.2 Herstellung von Semi-Dünnschnitten und Ultra-Dünnschnitten 28

2.3.2.3 Kolloidales Gold herstellen 29

2.3.2.4 Antiköper koppeln (Immunogoldhistochemie) 30

2.4 Perfusion zur Glomeruli-Isolation **31**

2.5 PCR **33**

2.5.1 RNA-Isolation 33

2.5.2 Umschreibung von mRNA in cDNA 35

2.5.3 Primer 35

2.5.4 Real-time PCR 37

2.6 Western Blot **38**

2.7 Immunfluoreszenz für Kryo-LM-Schnitte **45**

3. Ergebnisse **47**

3.1 Immunfluoreszenz für Kryo-LM-Schnitte **47**

3.2 Western Blot-Ergebnisse Nidogen-1 **51**

3.3 Auswertung der Aufnahmen der Elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie von Nidogen-1 **54**

3.4 PCR-Ergebnisse **60**

4. Diskussion 65

4.1 Verwendetes Mausmodell für Fragestellung 65

4.2 Grenzen, Schwächen und Stärken der Methodik 65

4.3 Bewertung der Immunfluoreszenz-Ergebnisse 67

4.4 Analyse des Western Blots 67

4.5 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Nid-1 68

4.6 Beurteilung der PCR-Ergebnisse 69

5. Zusammenfassung 70

6. Abbildungs– und Tabellenverzeichnis 72

7. Glossar 75

8. Literaturverzeichnis 77

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ARAS	*autosomal recessive Alport Syndrome*
BE-Puffer	*Elution buffer* (von Macherey-Nagel)
BM	Basalmembran
BSA	*bovine serum albumin* (Rinderserumalbumin)
Col4	Kollagen 4
DDR1	Discoidin Domain Rezeptor 1
DNA	*deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreit (von Roth)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
En	Endothel
FBH	familiäre benigne Hämaturie
GBM	glomeruläre Basalmembran
kDa	Kilodalton
K/L	Kugeln pro Länge
LM	Lichtmikroskopie
Lsg	Lösung
mRNA	*messenger RNA*
n	Anzahl der untersuchten Tiere
NFW	Nuklease-freies-Wasser
Nid-1	Nidogen-1
Nphs2	Podocin-Gen
P	Podozyt
PBS	*phosphate buffered saline* (Phosphatpuffersaline)

PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
RLT-Puffer	*RLT Lysis buffer* (von Qiagen)
RNA	*ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	*slitdiaphragm* (Schlitzmembran)
Std-Abw.	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBMN	*Thin Basement Membrane Nephropathy*
TBS	*Tris-buffered saline*
u.a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
WT	Wildtyp
XLAS	*X-linked Alport Syndrome*
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Niere

Unterhalb des Zwerchfells liegen die bohnenförmigen Nieren beidseitig der Wirbelsäule im retroperitonealen Fettgewebe. Mit einem Längsdurchmesser von 10 bis 12 cm sind sie von einer bindegewebigen Kapsel überzogen (Horn und Wagner 1997). Die Niere setzt sich u.a. aus sog. Nephronen zusammen. Diese sind tubuläre Strukturen, welche etwa 1-3 Millionen Mal in der Niere vorkommen. Des Weiteren besteht die Niere auch aus einem Sammelrohrsystem. Die Beziehung des einzelnen Nephrons zum Gefäßnetz der Niere ist charakteristisch für die Nierenfunktion, die insbesondere darin besteht, die Zusammenstellung der Körperflüssigkeiten zu regeln (Netter 2001).

Die Ausscheidung von toxischen oder überflüssigen Substanzen, die den Körper nur über die Niere verlassen können, zählt zu den Hauptaufgaben der Niere. Zu diesen Substanzen zählen einige Pharmaka und Giftstoffe, aber vor allem körpereigene Stoffwechselprodukte wie z.B. Harnstoff, Harnsäure oder Ammoniak. Substanzen, die für den Körper sehr wichtig sind wie Glukose und Aminosäuren werden bei der Filtration des Blutes zurückgehalten bzw. wieder resorbiert.

Eine weitere wichtige Funktion der Niere ist die Steuerung des Wasser-, Elektrolyt-, Mineral und Säure-Basen-Haushaltes: Über die NaCl- und Wasser-Ausscheidung regelt die Niere die Elektrolyt-Zusammensetzung und das Volumen des Extrazellulärraums. Des Weiteren wird über das Plasmavolumen und das Hormon Renin der Blutdruck geregelt. Ferner wirkt die Niere durch ihren Einfluss auf die Plasmakonzentration von Calcium und Phosphat an der Knochenmineralisierung mit und durch die Exkretion von HCO_3^- und H^+ beeinflusst sie den Säure-Basen-Haushalt. Das Hormon Erythropoetin, welches die Neubildung von Erythrozyten im Knochenmark stimuliert, wird ebenfalls wie Renin in der Niere gebildet. Die Niere betreibt des Weiteren Glukoneogenese, wobei sie das nach der Desaminierung von Glutamat übrige Kohlenstoffskelett für die Synthese von Glukose nutzt (Lang und Kurtz 2005).

Das Glomerulum & die Blut-Harn-Schranke

Die Blut-Harn-Schranke ist für die Funktion des Nierenkörperchens (Glomerulum) eine ganz entscheidende Struktur. Wie in Abbildung 1 dargestellt, wird sie vom Kapillarendothel, den Podozyten mit ihrer Schlitzmembran und einer dazwischenliegenden, gemeinsamen Basalmembran gebildet (Wendler und Linß 1998). Die Glomeruli wirken durch ihren

speziellen Aufbau als Filter: der Übertritt von Makromolekülen (z.B. Plasmaproteine wie Albumin) und Hämozyten wird verhindert, während die Durchlässigkeit für Wasser und kleine Moleküle extrem hoch ist. Der Primärharn (Ultrafiltrat des Blutes) entsteht auf diese Weise (ca. 180 l/Tag), welcher in der Bowman-Kapsel aufgefangen wird. Der Primärharn wird durch Resorptions-, Sekretions- und Konzentrationsvorgänge zum Endharn im Röhrensystem der Tubuli aufbereitet (ca. 1,5 l/Tag) (Horn und Wagner 1997).

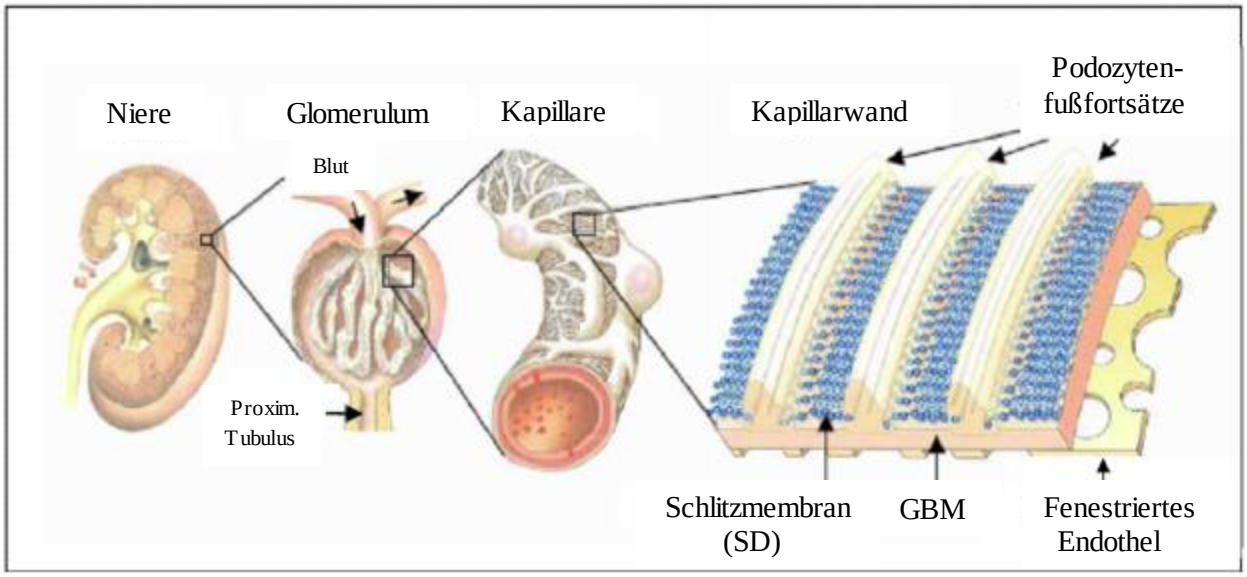


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Säugerniere

Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die Niere (links), ein daraus vergrößertes Glomerulum inklusive zu- und abführendem Gefäß und den sich anschließenden proximalen Tubulus (Mitte links). Weiter vergrößert stellt sich der Teil einer Kapillare mit aufliegenden Podozyten dar (Mitte rechts) sowie die Dreischichtung der glomerulären Filtrationsbarriere aus fenestriertem Endothel, glomerulärer Basalmembran (GBM) und Podozyten, zwischen deren Fußfortsätzen die Schlitzmembran (SD) ausgebildet wird (rechts).

(Abbildung modifiziert nach Tryggvason et al. 2006)

Die Glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist mit 300 Nanometern besonders dick und enthält zahlreiche negativ geladene Proteoglykane. Es handelt sich um die Basallaminae der Podozyten und des Kapillarendothels, die während der Entwicklung miteinander verschmolzen, so dass sich eine Lamina rara externa, Lamina densa und eine Lamina rara interna ausbildet (s. Abb. 2). Der Lamina densa wird eine mechanische Barrierefunktion zugeschrieben (Wendler und Linß 1998).

Wichtige Bestandteile der GBM sind Nidogen-1 und -2, Agrin, Laminine sowie Kollagen IV. Die Rolle der GBM bei der Filtration von Makromolekülen ist noch umstritten. So scheint Kollagen IV zwar für die Stützfunktion der Membran unverzichtbar zu sein, aber trägt nicht zur Größen- oder Ladungsselektivität des Filters bei (Barker et al. 1990; Hudson et al. 2003). Auch die Proteoglykane scheinen dabei keine wichtige Rolle zu spielen. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Laminin α5β2γ1 wichtig für die Filtrationsfunktion ist (Zenker et al. 2004).

Podozyten besitzen primäre und sekundäre Verzweigungen. Zwischen diesen Fortsätzen ist eine Schlitzmembran (SD) ausgebildet, welche auch zur Blut-Harn-Schranke zählt und nur unter benachbarten Podozyten ausgebildet werden kann. Die sehr feinen, außerordentlich zahlreichen miteinander verzahnten Sekundärfortsätze bedecken von der Harnseite vollständig die GBM. Die Podozyten besitzen eine negativ-geladene Glykokalix. Hauptbestandteile der SD sind Nephrin und intrazelluläres Podocin.

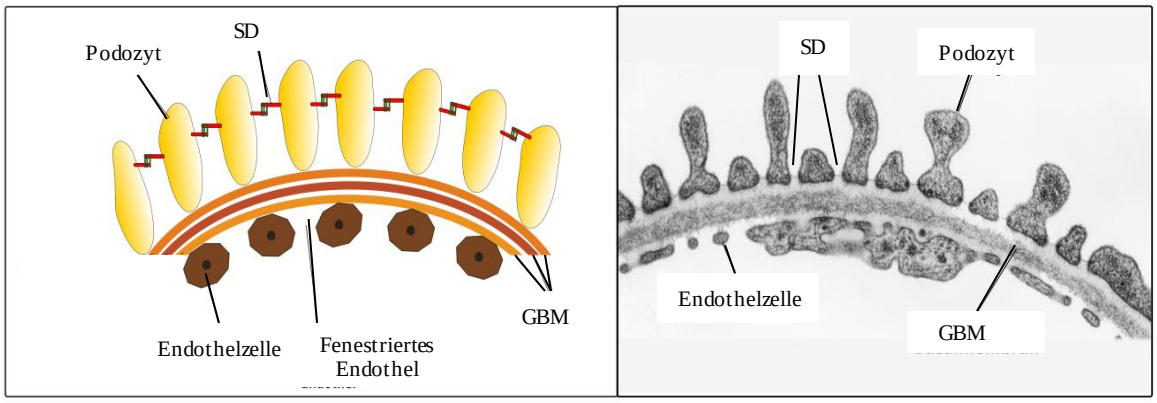


Abbildung 2: Glomerulärer Filter
A: Schema des glomerulären Filters **B:** EM-Aufnahme des glomerulären Filters

(Abbildung modifiziert nach Pavenstädt et al. 2003, S. 265)

Nidogen-1

Nidogen-1, alias Entactin, ist ein sulfatiertes Glykoprotein mit einem Zuckeranteil von 5% und es ist 148 kDa schwer (Carlin et al. 1981; Fox et al. 1991). Die Isolierung des Proteins erfolgte aus einer BM-produzierenden Zelllinie (Carlin et al. 1981) bzw. aus dem Maus-Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor (Timpl et al. 1983). Durch elektronenmikroskopische Experimente konnte gezeigt werden, dass Nidogen-1 aus einer einzelnen Polypeptidkette besteht, die sich zu einer länglichen Struktur faltet (Mayer und Timpl 1994). Wie in

Abbildung 3 dargestellt ist, ist das stabförmige Molekül 30 nm lang und besitzt drei globuläre Domänen (G1, G2, G3), welche über zwei lineare Molekülabschnitte verbunden sind (Fox et al. 1991; Mayer und Timpl 1994).

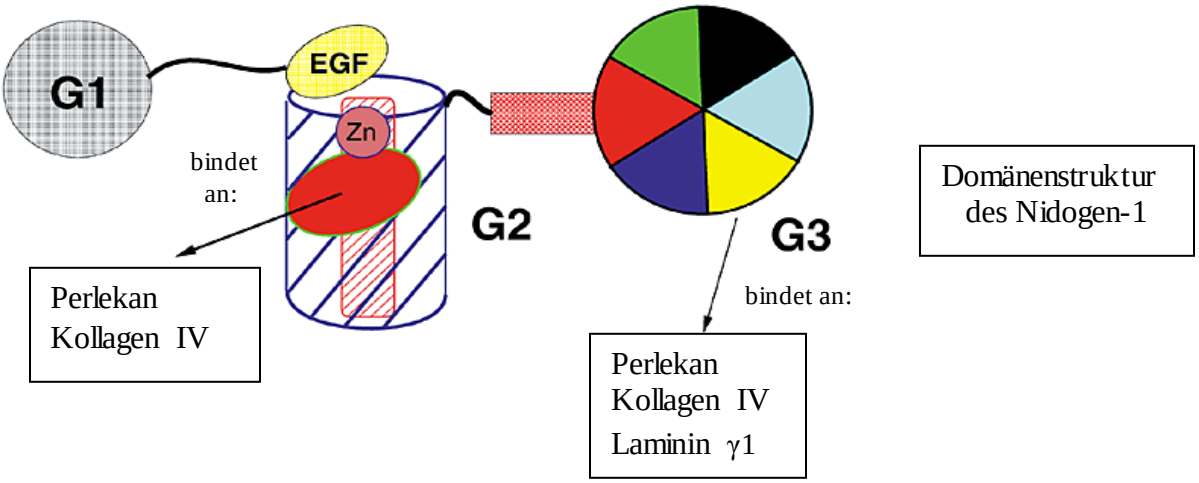


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Nidogen-1
Die säulenförmige G2-Domäne wird durch 11 β-Faltblätter gebildet, durch deren Hohlraum sich eine α-Helix zieht. Sie ist verantwortlich für die Bindung an Perlekan und Kollagen IV. Die G3-Domäne bildet einen sechsblättrigen β-Propeller. Sie bindet Perlekan, Kollagen IV und die Laminin γ1 Kette. Über die Struktur und Funktion der G1 Region ist sehr wenig bekannt

(Abbildung modifiziert nach Liddington 2001, S. 573).

Nidogen-1 spielt in der Embryogenese eine wichtige Rolle. Es kann während der Embryogenese aus unterschiedlichen Geweben als BM-Proteine (Laminin und Kollagen IV) sekretiert werden, was ein Zusammenspiel verschiedener Zelltypen bei der Bildung der BM notwendig macht (Mayer und Timpl 1994). Die Funktion und Verteilung von Nidogen-1 und Nidogen-2 im Gewebe während der menschlichen Embryogenese ist jedoch noch unklar (Miosge et al. 2002). Untersuchungen von Nidogen-1-Knockout-Mäusen und auch Nidogen-2-Knockout-Mäusen haben zeigen können, dass Nidogen-1 nicht essentiell ist für die Bildung und Bewahrung der BM. Nidogen-2 kann somit den Verlust von Nidogen-1 teilweise kompensieren (Murshed et al. 2000).

Es konnte neben Nidogen-1 also noch eine weitere Isoform, Nidogen-2, entdeckt werden. Nidogen-2 ist 200 kDa schwer und 50 nm lang (Kohfeldt et al. 1998). Es wurde bei wirbellosen Lebewesen nur eine Nidogenart festgestellt (Ackley et al. 2003). Nidogen-2 wird im Laufe der Embryonalentwicklung gemeinsam mit Nidogen-1 ubiquitär in allen Basalmembranen exprimiert (Miosge et al. 2002; Gersdorff et al. 2005). Mit der Spezifizierung im adulten Organismus wird Nidogen-2 vor allem in endothelialen Basalmembranen angereichert. Nidogen-1 ist aber weiterhin in deutlich molarem Überschuss ubiquitärer Bestandteil aller Basalmembranen, vor allem in den GBM der Nieren (Kohfeldt et al. 1998; Murshed et al. 2000). Die Nidogen-1-Fragmente (spezifische Banden beim Western Blot) sind unter Punkt 3.2 zu sehen.

Die Fähigkeit des Nidogen-1 sowohl dreifach Komplexe mit Laminin und Kollagen IV zu bilden (s. Abb. 4) als auch andere Komponenten der Basalmembran miteinander zu verknüpfen, lässt vermuten, dass Nidogen-1 als Linkprotein fungiert (Kramer 2005) und die Basalmembranarchitektur auf supramolekularer Ebene stabilisiert (Aumailley et al. 1993). Da sowohl Kollagen IV als auch Laminin α1β1γ1 selbständig zu Netzwerken polymerisieren und Nidogen-1 beide Strukturproteine binden kann, wurde dem Nidogen eine bedeutende Rolle in der Verknüpfung der beiden Netzwerke zugesprochen. Nidogen-1 ist sehr sensibel für Proteasen. Biochemische Studien zeigen, dass Nidogen-1 mit Laminin einen stabilen, nicht-kovalenten Komplex bildet (Dziadek und Timpl 1985). Durch die Bindung an Laminin wird Nidogen-1 stabilisiert. Beweise hierfür lieferten In-vitro-Versuche, in denen gezeigt werden konnte, dass nach der Bindung von rekombinantem Nidogen-1 mit Laminin α1β1γ1 die Spaltung des Nidogen-1 durch Thrombin verhindert und die Aktivität anderer Proteasen in der G3-Domäne verringert wurden (Mayer und Timpl 1994).
Nidogen-1 kann des Weiteren mit Perlekan interagieren. Auf der G2-Domäne befindet sich die Hauptbindungsstelle für Perlekan (Battaglia et al. 1992).

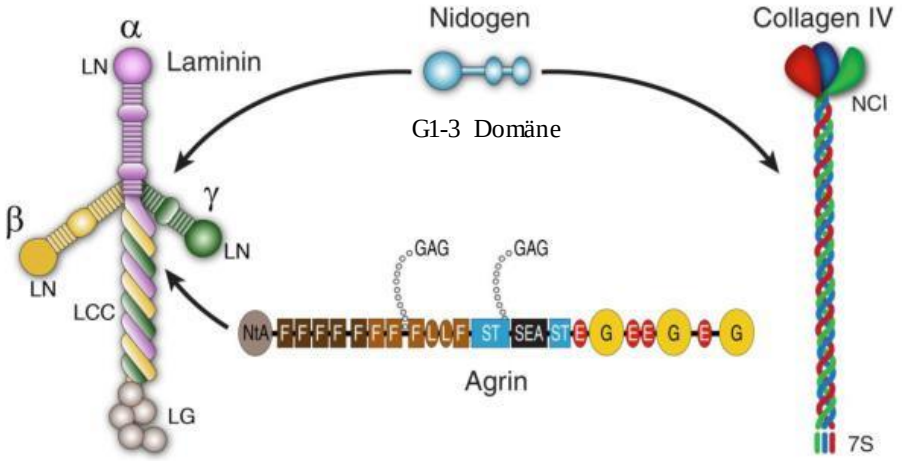


Abbildung 4: Basalmembrankomponenten der adulten GBM
Nidogen-1 bindet an den kurzen Arm von Laminin γ sowie an Kollagen IV
(Abbildung modifiziert nach Miner 2012, S. 10 NIH-PA Author Manuscript)

Es konnte in Studien gezeigt werden, dass eine Abwesenheit der Basalmembrankomponente Nidogen-2, nicht jedoch von Nidogen-1, zu einer erhöhten Bildung von Lungenmetastasen bei Mäusen führt, da die Basalmembran durchlässiger für Tumorzellen wird (Mokkapati et al. 2012). Ein Doppel-Knockout führt zu starken Veränderungen der BM und zu einem frühen Tod der Mäuse.

In den späten Stadien der Osteoarthritis (OA) wird vermutet, dass Nidogen-1 und -2 den Chondrozyten helfen, die Knorpelintegrität wiederherzustellen und somit diese Proteine eine wichtige Schlüsselrolle in der Pathogenese der OA spielen (Kruegel et al. 2008).

Perlekan

Perlekan ist ein Proteoglykan und wurde zuerst im Stroma des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor entdeckt (Paulsson et al. 1987).

Dadurch, dass das Erscheinungsbild des Proteins im Elektronenmikroskop (EM) eher perlenschnurartig ist, entstand der Name Perlekan. Das heparansulfathaltige Protein stellt die größte Basalmembrankomponente dar. Es besteht aus einem 500 kDa schweren Kern-Protein, welches aus fünf globulären Domänen (I bis V) aufgebaut ist und drei Heparansulfat-haltigen Ketten, die an einem der beiden Enden aufgehängt sind (Noonan et al. 1991).

Mutationen am HSPG2-Gen sind die Ursache für das Schwartz-Jampel-Syndrom (SJS) und die Dysplasie vom Silverman-Handmaker-Typ (DDSH) (Arikawa-Hirasawa et al. 2002). Das SJS ist eine seltene autosomal-rezessive Erkrankung, gekennzeichnet durch Myotonie und

Knochen- sowie Gelenkanomalien. Die klinischen Symptome treten bald nach der Geburt auf (Viljoen und Beighton 1992). Der Defekt des letalen Typs Silverman-Handmaker betrifft Perlekan der Basalmembran und der extrazellulären Matrix, vor allem des Knorpels (Prabhu et al. 1998).

Perlekan stabilisiert Basalmembranen, indem es mit anderen Basalmembrankomponenten Wechselwirkungen eingeht. Es konnte gezeigt werden, dass Perlekan sowohl mit Laminin als auch mit Nidogen-1 interagiert (Battaglia et al. 1992). Es ist während der Entwicklung in der GBM vorhanden und ändert aber im Adulten seine Lokalisation in das Mesangium und in die Bowmann`sche Kapsel und wird durch das Proteoglykan Agrin ersetzt (Groffen et al. 1998a).

Agrin

Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) (s. Abb. 4), welches hochkonzentriert an den Basallaminae von neuromuskulären Synapsen vorkommt und eine Hauptkomponente der menschlichen glomerulären Basalmembran darstellt (Groffen et al. 1998a). Das Proteoglykan kommt in verschiedenen Spezies vor. Agrin konnte unter anderem aus dem Huhn (Tsim et al. 1992), der Ratte (Rupp et al. 1991), dem Zitterrochen Discopyge ommata (Smith et al. 1992) und dem Menschen (Groffen et al. 1998b) isoliert werden.

Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine 95 nm lange Struktur, die fadenartig erscheint und drei kugelförmige Verdickungen am C-Terminus enthält (Denzer et al. 1998). Bei den kugelförmigen Verdickungen handelt es sich um drei globuläre Domänen, wobei G3 notwendig für die synapseninduzierte Aktivtät des Agrins an der neuromuskulären Endplatte ist (Gesemann et al. 1995; Jones et al. 1997; Cornish et al. 1999). Der Bereich um die G1- und G2-Domäne fungieren als Bindungsstelle für die Zuckerseitenketten des extrazellulären Matrixproteins α-Dystroglycan (Hopf und Hoch 1996; Gesemann et al. 1996).

Die Expression von Agrin im ZNS beginnt sehr früh und hält während der Entwicklung des Zentralnervensystems an (Li et al. 1997; Cohen et al. 1997). Es wurde nachgewiesen, dass nach Verletzungen, beispielsweise verursacht durch einen Schlaganfall oder Epilepsie, es zu einer Hochregulation von Agrin mRNA kommt (O`Connor et al. 1995; Thomas et al. 1995; Falo et al. 2008).

Im Hinblick auf Agrin am Glomerulum wird vermutet, dass die stark negativ geladenen Heparansulfat-Seitenketten mit verantwortlich sind beim Erhalt der ladungsabhängigen Permeabilität der GBM im Zuge des Filtrationsprozesses (Farquhar et al. 1985; Kanwar et al. 1991; van den Born et al. 1992). Des Weiteren scheint es eine bedeutende Rolle bei der

Verankerung von Fußfortsätzen (Podozyten) in der GBM zu spielen. Wie auch an der neuromuskulären Synapse konnten auf der Podozytenoberfläche alle Bestandteile des Dystrophin-Glycoprotein-Komplexes (α-Dystroglycan, β-Dystroglycan und Utrophin) bewiesen werden (Raats et al. 2000).

Nidogen-1 kann also nicht nur mit Perlekan interagieren (Battaglia et al. 1992), sondern auch mit Agrin, da es Perlekan in der adulten GBM ersetzt.

Laminin

Laminine wurden zuerst im Stroma des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumors entdeckt (Timpl et al. 1979). Sie sind Glykoproteine mit einer molekularen Masse von 400 bis 800 kDa. Sie bestehen aus drei genetisch unterschiedlichen Proteinketten, die als α, β und γ-Kette bezeichnet werden und sie haben eine charakteristische kreuzförmige Struktur (s. Abb. 4) (Burgeson et al. 1994; Beck et al. 1990). Die Untereinheiten können in fünf alpha-Ketten, drei beta-Ketten und drei gamma-Ketten differenziert werden und die Isoformen werden als Laminin-111 bis Laminin-523 bezeichnet (s. Abb. 4) (Aumailley et al. 2005).

Laminine sind bedeutend während der Embryonalentwicklung und bei Organfunktionen in adulten Geweben. Laminine binden an Kollagen IV, Nidogen, Agrin und an sich selbst, um die Struktur der BM zu bilden. Des Weiteren werden zahlreiche zellspezifische Antworten ausgelöst, wenn Laminin gebunden wird. Laminine sind strukturell und regulatorisch wichtige Moleküle (Martin und Timpl 1987) Sie können über die Rezeptoren beta1-Integrin, alpha-Dystroglycan und alpha6beta4 interagieren und die Zellen beeinflussen (Hohenester und Yurchenco 2013). Im Glomerulum findet bei den Lamininen ein Entwicklungsswitch von Laminin-111 über Laminin-511 zu Laminin-521 statt. Dies ist wichtig für die Differenzierung und Homöostase der Podozyten (Miner 2012).

Ein früher embryonaler Tod wird hervorgerufen, wenn die Laminin gamma1-Kette fehlt (Smyth et al. 1999). Der Verlust von Laminin beta2 verursacht das Pierson-Syndrom. Dies ist ein angeborenes nephrotisches Syndrom mit Augen- und neurologischen Defekten. Die Lebenserwartung dieser Patienten ist sehr gering (Suh et al. 2011).

Kollagen IV

Kollagene werden in mehrere Untergruppen unterteilt. Kollagen IV spielt eine wichtige Rolle in der Familie der Kollagene.

Kollagen IV tritt im Gegensatz zu den meisten Kollagenen nur in Basalmembranen auf. Bisher wurden sechs verschiedene alpha-Ketten (α1 bis α6) identifiziert, von denen sich jeweils drei dieser Ketten (α1α1α2(IV), α3α4α5(IV), α5α5α6(IV)) zu einer Tripelhelix zusammenfügen (Hudson 2004; Khoshnoodi et al. 2008). Sie bilden ein ca. 400 nm langes gestrecktes Molekül, welches aus drei Domänen und einer vorangestellten Signalsequenz besteht.

Die Kollagen IV-Monomere können sich durch ihre hohe Flexibilität mittels lateraler und End-zu-End-Assoziation zu Polymeren zusammenfügen und tragen somit entscheidend zur mechanischen Stabilität der Basalmembran bei (Timpl et al. 1981; Yurchenco und Ruben 1987).

Die α1(IV)- und α2(IV)-Ketten kommen ubiquitär vor. Die restlichen Ketten sind nur in Innenohr, Lunge, Augenlinse und der reifen glomerulären Basalmembran der Niere vorhanden (Heidet und Grubler 2009).

Die embryonale Form besteht aus zwei α1(IV)- und einer α2(IV)-Kette und wird dann kurze Zeit später in die reife Form überführt durch Austausch mit den α3α4α5(IV)-Ketten. Die reife Form wird nur von den Podozyten exprimiert (Abrahamson et al. 2009; Miner und Sanes 1994).

Mutationen in den COL4A3-5-Genen verursachen das Alport-Syndrom, welches zu Nierenfibrose führt. Mutationen im COL4A5-Gen werden X-chromosomal vererbt, wobei Mutationen in den COL4A3- oder COL4A4-Genen autosomal vererbt werden (Antignac 1995). Fast 1% der Bevölkerung sind heterozygote Genträger für Mutationen in den COL4A3/4-Genen und haben eine familiäre benigne Hämaturie (FBH) oder eine *Thin Basement Membrane Nephropathy* (TBMN) (s. Kapitel Alport-Syndrom, Seite 18). Durch Mutationen wird die Kollagenstruktur verändert und die Zell-Matrix-Interaktion verändert. Der Discoidin Domain Rezeptor 1 (DDR1) und Integrin α2β1 sind wichtige Rezeptoren, über die die Zellen die extrazelluläre Umgebung wahrnehmen (Rubel et al. 2014).

Nephrin

Nephrin ist etwa 180 kDa schwer und gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der Zell-Adhäsionsmoleküle (IgCAM) der Schlitzmembran (Kestila et al. 1998). Nephrin besitzt sechs

linear angeordnete Immunglobulin-ähnliche Strukturen am N-Terminus der extrazellulären Domäne. Interaktionen mit anderen Nephrinmolekülen können durch diese Domäne eingegangen werden. Nephrin übt eine wichtige Funktion in der Signalübertragung mittels Phosphorylierung der Tyrosinreste aus und beeinflusst das Überleben der Podozyten und deren Zellwachstum (Benzig 2004; Tryggvason 1999).

Mit Hilfe der Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Nephrin schon während der Embryonalentwicklung in der Niere spezifisch in den Podozyten exprimiert wird und nahe der Schlitzmembran lokalisiert ist (Holthofer et al. 1999; Holzman et al. 1999; Ruotsalainen et al. 1999; Ruotsalainen et al. 2000).

Durch das Krankheitsbild des Kongenitalen Nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ (CNF) konnte über Positionsklonierung das Gen NPHS1 identifiziert werden. Das CNF ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit. In Finnland hat diese Erkrankung eine besonders hohe Inzidenz. Etwa 1 von 1000 Neugeborenen ist dort betroffen, welche bereits in utero zu einer erheblichen Proteinurie führt. Unbehandelt führt diese Erkrankung kurz nach der Geburt zu einer terminalen Niereninsuffizienz (Huttunen 1976; Kestila et al. 1998).

In Mäusen führt die Inaktivierung von NPHS1 wie auch beim Menschen zu einer massiven Proteinurie und innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt zum Tod. Der Bowman`sche Kapselraum der Glomeruli ist vergrößert, die Fußfortsätze der Podozyten sind verschmolzen, die Tubuli sind dilatiert und eine Schlitzmembran kann nicht mehr nachgewiesen werden (Putaala et al. 2001)

Podocin

Das Gen NPHS2 wurde ebenfalls per Positionsklonierung identifiziert, das für das Protein Podocin codiert. Podocin ist ein Mitglied der Prohibitin-Domänen-Homologie-Proteine (PHBd-Proteine), welches ausschließlich von Podozyten exprimiert wird. Das Protein besteht aus einer kurzen intrazellulären aminoterminalen Domäne, einer intramembranären Region und einer zytosolischen carboxyterminalen Domäne. Analysen der Struktur dieses Proteins lassen auf eine haarnadelartige Faltung schließen (Boute et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Podocin an der glomerulären Schlitzmembran lokalisiert ist (Roselli et al. 2002) (s. Abb. 5), direkt mit Nephrin interagiert und Nephrin-assoziierte Signaltransduktion verstärkt (Huber et al. 2001) und somit einen wichtigen Anteil an Funktion und Aufbau des Nierenfilters hat.

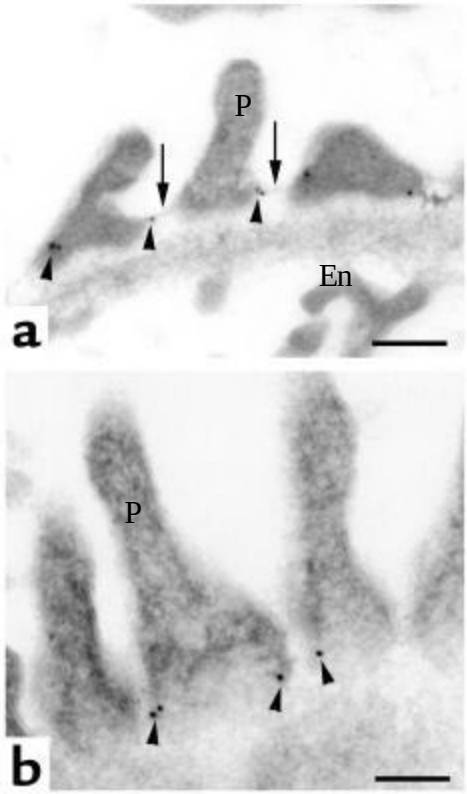


Abbildung 5: Podocin-Nachweis mittels Immunogoldhistochemie
Lokalisation von Podocin an der Schlitzmembran (►) bei einer adulten Rattenniere.

P=Podozyt; En= Endothelzelle

(Abbildung modifiziert nach Schwarz et al. 2001, S. 1625)

Patienten, welche eine heterozygote Podocin-Mutation und R229Q-Mutation aufweisen, können ein Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom entwickeln (Machuca et al. 2009). Mehrere Mutationen von NPHS2 bilden so die pathophysiologische Grundlage eines Steroid-resistenten, nephrotischen Syndroms (Boute et al. 2000; Pollak 2002; Ruf et al. 2004). Mäuse sterben in Tierexperimenten innerhalb weniger Tage nach der Geburt an Nierenversagen, wenn sie Podocin-defizient sind (Roselli et al. 2002). Heterozygote $Nphs2^{+/R140Q}$ Mäuse haben hingegen eine normale Lebenserwartung. Ein nephrotisches Sydrom ensteht ebenfalls, wenn Podocin in adulten Mausnieren inaktiviert wird (Mollet et al. 2009).

Das Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom ist eine seltene vererbte Erkrankung mit Affektion von Niere, Innenohr und Auge. Dieses Syndrom wurde nach dem südafrikanischen Arzt Arthur Cecil Alport benannt (1880-1959).

In über 80% der Fälle wird das Alport-Syndrom X-chromosomal (XLAS) (mutiertes COL4A5-Gen) vererbt, autosomal (ARAS) (Mutationen in den COL4A3- oder COL4A4-Genen) in 10-15% (Antignac 1995). Die Prävalenz des X-chromosomalen Alport-Syndroms liegt bei ca. 1:5.000 bis 1:10.000 und beim autosomal-rezessiven Syndrom bei 1:50.000.

Die (Mikro-)Hämaturie ist oft das einzige Symptom des heterozygoten XLAS– und ARAS-Überträgers, die Proteinurie dagegen seltener (Gross 2012).

Das Alport-Syndrom ist eine progressive Nierenerkrankung mit bereits erwähnter Hämaturie, Proteinurie, Innenohrschwerhörigkeit und typischen Augenveränderungen (Alport 1927; Hudson et al. 2003). Charakteristisch ist die Aufsplitterung und Lamellierung der GBM (s. Abb. 6). Männer mit dieser Erkrankung entwickeln in der Regel eine terminale Niereninsuffizienz (Morath et al. 2010). Etwa 90% der männlichen Patienten leiden schon vor dem 40. Lebensjahr an einem Nierenversagen (Jais et al. 2000). Des Weiteren kommt es meistens auch zu Folgeschäden wie renale Hypertonie, sekundäre Hyperparathyreoidismus und kardiovaskuläre Erkrankungen (Morath et al. 2010). Heterozygote Trägerinnen erkranken zu 95% an einer Hämaturie mit charakteristischer verdünnter GBM (s. Abb. 7) und es entwickeln etwa 10 bis 12% der Frauen ein terminales Nierenversagen typischerweise nach dem 40. Lebensjahr (Jais et al. 2003).

Aufgrund des Gendefektes können die Nieren in ihrer GBM keine intakten Kollagen IV-Ketten bilden. Die fibrotische Veränderung der Nieren ist die Konsequenz einer gestörten Zell-Matrix-Interaktion aufgrund des defekten Aufbaus von Kollagen IV (Gross und Weber 2005).

Lichtmikroskopisch sind die Veränderungen an der Niere beim Alport-Syndrom nicht spezifisch und daher zur Diagnostik allein nicht geeignet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der GBM sind Wegweiser bei der Diagnostik des Syndroms. Die verbreiterte, aufgesplitterte und ausgedünnte GBM sind typische Veränderungen (s. Abb. 6 und 7) (Kashtan et al. 1994). Des Weiteren können die Podozyten vergrößert und die Matrix des Mesangiums vermehrt sein (Gubler et al. 1981). Die Anamnese und Befunderhebung ist entscheidend für die Stellung der Diagnose (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Diagnosekriterien Alport-Syndrom			
Diagnosekriterien		Häufigkeit der Symptome	
1	Pos. Familienanamnese (Hämaturie) mit/ohne Progression zu terminalem Nierenversagen	Familienanamnese	85%
		Hämaturie	100%
2	Progrediente Innenohrschwerhörigkeit		75%
3	Augenveränderungen (Lentikonus, Fundus albipunctatus)		20-45%
4	Charakt. Ultrastrukturelle Veränderungen der glom. Basalmembran. Aufsplitterung/Lamellierung, Verdickung, Verdünnung.		100%
Neue Kriterien	Diffuse Leiomyomatose des Ösophagus		1-2%
	COL4A5-, COL4A3/A4-Mutationen	Nachweisbar in	40-70%

Tabelle 1: Diagnosekriterien für das Alport-Syndrom (Tabelle nach Gross 2008*)
*Die Verwendung der Tabelle erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. O. Gross

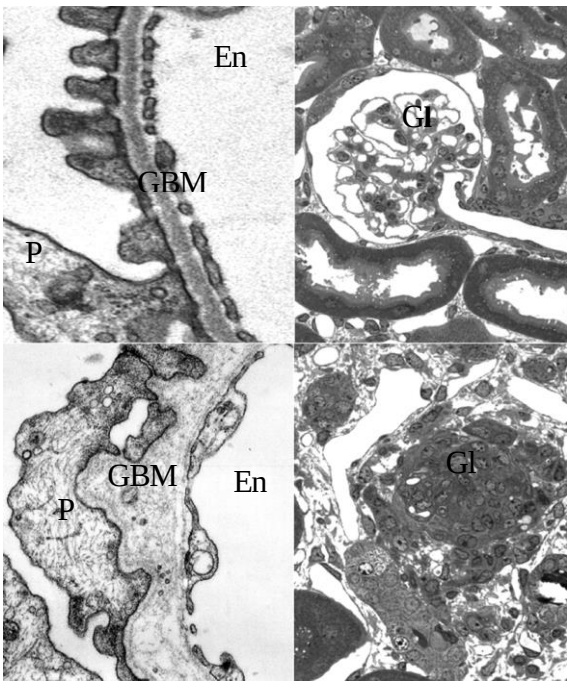


Abbildung 6: GBM & Glomerulus
EM (links); LM (rechts)

rechts oben: gesunde Niere mit gesundem Glomerulus und normaler glomerulärer Basalmembran (links oben).

links unten: Alport-Syndrom mit verbreiterter, aufgesplitterter Basalmembran und vernarbtem Glomerulus bzw. Glomerulosklerose (rechts unten).

P= Podozyt

GBM= glomeruläre Basalmembran

En= Endothel

Gl= Glomerulus

(Abbildung modifiziert nach Floege et al. 2006, S. 2722)

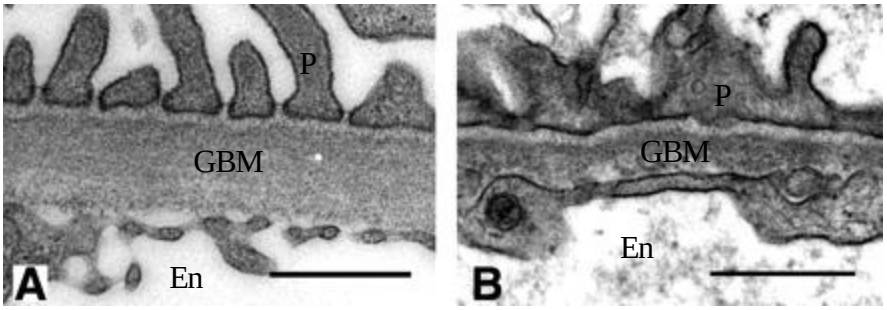


Abbildung 7: Normale GBM (A) und verdünnte GBM (B)

A: EM-Aufnahme einer gesunden Niere mit gleichmäßig breiter GBM mit fenestriertem Endothel und differenzierten Fußfortsätzen der Podozyten.

B: EM-Aufnahme einer Niere mit verdünnter GBM im frühen Stadium des Alport-Syndroms oder TBMN (= Thin Basement Membrane Nephropathy).

(Abbildung modifiziert nach Tryggvason und Patrakka 2006, S. 814)

COL4/Podocin als modifier Gen

Die Mutter einer österreichischen Familie, die sich als heterozygote Alportträgerin mit Mutation im COL4A5-Gen erwies, hatte bereits im Kindheitsalter eine Hämaturie sowie eine Proteinurie. Dies kann normalerweise in dieser Form und in dem Alter nicht bzw. kaum nachgewiesen werden. Sie entwickelte des Weiteren schon im jugendlichen Alter ein terminales Nierenversagen. Auch ihr Sohn leidet am Alport-Syndrom. Die Tochter – ebenfalls „nur“ heterozygote Trägerin der Mutation - leidet ebenfalls an einer früh einsetzenden Proteinurie und Niereninsuffizienz. Beide, Mutter und Tochter, besitzen neben einer heterozygoten COL4A5-Mutation einen Nphs2-Polymorphismus (R229Q (CGA>CAA)). Dieser Polymorphismus im Nphs2-Gen könnte den Krankheitsverlauf bei Mutter und Tochter aggravieren.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf dem Fall der österreichischen Familie besteht die Vermutung, dass es eine Verbindung zwischen der glomerulären Basalmembran und der Schlitzmembran gibt. Diese Verbindung könnte die Podozyten-Struktur beeinflussen und bei einem gleichzeitigen Auftreten von GBM/SD–Mutationen früher zum Nierenversagen führen.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob diese Mutationen früher zum Nierenversagen führen. Dies wird durch Untersuchungen von doppelt-heterozygoten COL4A3$^{+/-}$(GBM) / Nphs2$^{+/R140Q}$ (SD)-Mäusen am Tiermodell überprüft. Hierbei soll die Zusammensetzung der GBM untersucht werden, da diese essentiell für die Funktion von Zellen und Stabilität der GBM ist.

Nach unserer Hypothese nimmt Nidogen-1 (Nid-1) eine Schlüsselrolle ein, da es eine wichtige stabilisierende Funktion in der GBM übernimmt. Besonders für Kollagen IV und Laminin dient Nid-1 zur Vernetzung und Stabilisierung. Es scheint als Linkprotein zu fungieren (Kramer 2005). Daher werden in der vorliegenden Arbeit 60 und 180 Tage alte Wildtyp-, Einzel- und Doppel-heterozygote Kollagen IV/Podocin-Mäuse, mittels real-time qPCR (auf mRNA-Ebene) und Western Blot (auf Proteinebene) auf die Quantität/Verteilung von Nid-1 untersucht. Mittels ultrastruktureller Immunogoldhistochemie und Immunfluoreszenz wird die genaue Lokalisation und Quantifizierung von Nid-1 in der GBM durchgeführt. Insbesondere bei der elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie kann Nid-1 sehr genau untersucht werden in Bezug auf die Lokalisation. Proteinmenge und/oder Lokalisation des Proteins wie zum Beispiel in der Zelle, Mesangium oder GBM sollen dank Elektronenmikroskopie genauer untersucht werden und einen möglichen Aufschluss geben.

Änderungen von Nid-1 können Hinweise auf eine veränderte Stabilität und erhöhte Durchlässigkeit der GBM sein, was zu Proteinurie und damit korrelierend Nierenfibrose führen könnte. Diese Untersuchungen zur Rolle von Nid-1 bei der Interaktion von GBM und Podozyten könnten neue Therapieansätze bei glomerulären Erkrankungen ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Mäuse für Elektronenmikroskopie, Western Blot und PCR

Es wurden heterozygote Nphs2$^{+/R140Q}$-Mäuse aus 129 Sv/Pas-Hintergrund mit heterozygoten COL4A3$^{+/-}$-Mäusen aus 129 Sv/J-Hintergrund gekreuzt. Von der Arbeitsgruppe um Prof. Corinne Antignac (INSERM, Paris) wurden die Nphs2$^{+/R140Q}$-Mäuse freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Von den Jackson Immunoresearch Laboratories (WestGrove, PA, USA) wurden die COL4A3$^{+/-}$-Mäuse bezogen. Die Tierzucht wurde vom Tierpflegepersonal der Uniklinik Göttingen durchgeführt und bei den zuständigen Behörden unter dem Projekttitel

T 12/7 „Basalmembran-Interaktion mit der Schlitzmembran der Podozyten“ angezeigt.

In der im Anhang aufgeführten Tabelle (siehe Tabelle 2, Seite 74) sind die Mäuse dargestellt, die für die jeweiligen Methoden verwendet wurden.

2.2 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurden Schwanzbiopsien der Mäuse (siehe Tabelle 2, Seite 74) benutzt. Die DNA-Isolation wurde nach Standardprotokoll durchgeführt (Nucleo Spin®, Macherey-Nagel). Die Schwanzbiopsien wurden jeweils in ein 1,5-ml-Tube überführt und dieses mit 180 µl T1 Puffer und 25 µl Proteinase K gevortext. Danach folgte für 60 min bei 56°C die Inkubation. Der BE-Puffer wurde auf 70°C vorgewärmt. Das Lysat der Biopsien wurde dann für 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen (200 µl) und in ein neues E-Cup überführt. Der Überstand (200 µl BE) wurde gevortext, mit 210 µl 100% Ethanol aufgefüllt und erneut gevortext.

Die Proben wurden auf die Säule pipettetiert und für 1 min bei 13500 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und anschließend auf die Säule 500 µl Waschpuffer BW gegeben. Dieses wurde erneut zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Auf die Säule wurde danach 600 µl Waschpuffer B5 gegeben und nochmals zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule getrocknet und dann in ein E-Cup überführt. Zu der Säule wurden 200 µl BE-Puffer (70°C) gegeben und dieses 1 min bei RT stehen gelassen; abschließend nochmals zentrifugiert und die Säule verworfen. Die Proben mit der gewonnenen DNA wurden bei 4°C gelagert, bis diese für die Genotypisierung verwendet wurden.

COL4A3

Primer forward

CAA GGC TTA AAG GAA AAT CC

Primer reverse

CCT GCT AAT ATA GGG TTC GAG A

Primer mutant

AAT CGC CAA TGA CAA GAC G

Nphs2

Primer forward

TAA TTA TAG GGC GG TTG TC

Primer reverse

TC CTC TTC TCC CAA CTA AA

Der Mastermix für die Genotypisierung ist folgendermaßen mit COL4A3 anzusetzen:

10 µl DNA,

0,5 µl Primer foward (20 pM),

0,5 µl Primer reverse (20 pM),

0,5 µl Primer mutant (20 pM),

0,5 µl Nuclei,

0,2 µl Taq (F-100, Biozym),

2,5 µl 10xPuffer und

10,3 µl dH_2O werden in PCR-tubes gegeben.

Der Mastermix für die Genotypisierung ist folgendermaßen mit Nphs2 anzusetzen:

10 µl DNA,

0,5 µl Podocin 3 forward (20 pM),

0,5 µl Podocin 3 reverse (20 pM),

0,5 µl Nuclei (je 10 mM),

0,2 µl Taq (F-100, Biozym),

2,5 µl 10xPuffer und

10,8 µl dH2O werden

in PCR-tubes gegeben.

Für die PCRs wurden dann jeweils folgende Programme des Thermocyclers (Mastercycler personal von Eppendorf) verwendet:

COL4A3

°C	Minuten	
95	4	
64	1	
72	2	
95	1	30 sek 3x
62	1	
72	2	
95	1	30 sek 3x
60	1	
72	2	
95	1	30 sek 41x
58	1	
72	4	
72	1	

Nphs2

°C	Minuten	
94	5	
94	45 sek	
52	45 sek	35x
72	45 sek	
72	10	

Anschließend folgte der Agarose-Gellauf:

1,5% Agarose wurden mit 1x TAE gekocht. 10 µl 0,06%iges Ethidiumbromid wurden zu den 30ml Agarose zugegeben und dann ausgehärtet. Danach wurde das Gel beladen mit 12,5 µl Probe (DNA) und 2,5 µl 6x DNA Ladepuffer. Der Gellauf lief bei 70 V 1 Std und das Bild wurde danach unter UV-Licht erstellt.

Ansatz 6x Ladepuffer:

10 mM Tris pH 7,6

0,03% Bromphenolblau

0,03% Xylencyanol

60% Glycerol

60 mM EDTA

Rezept TAE:

50x TAE für 1 l / 1:50 Verdünnung:

2 M Tris

50 mM EDTA-Tetranatriumsalz

Tetrahydrat mit Essigsäure ergeben ca. 57,1 ml

pH-Wert 8,3 (mit Essigsäure eingestellt)

Zur Kontrolle der Größe wurde ein Marker zusätzlich aufgetragen.

(100 bp Plus DNA Leiter # 5M0321, Fermentas)

Ansatz Marker:

105 µl DNA-Leiter

105 µl 6x Ladepuffer

420 µl dH_2O

Genotypen zu Abb. 8a,b:

+/- heterozygot

+/+ homozygoter Wildtyp

-/- homozygoter Knockout

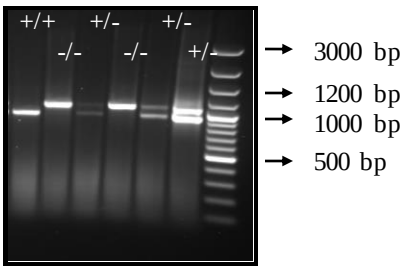


Abbildung 8a:
Beispielhaftes 1,5%iges Agarose-Gel zur Auftrennung einer COL4A3-PCR

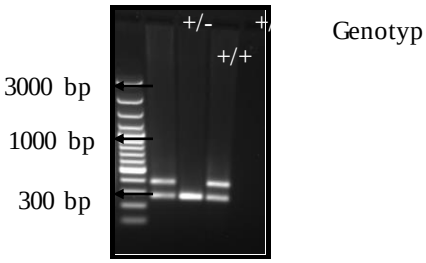


Abbildung 8b:
Die Nphs2-PCR wurde mittels 2%igem Agarose-Gel analysiert. Es gab keine homozygoten $Nphs2^{+/R140Q}$ da diese postnatal letal gewesen wären.

Für die Einbringung der Punktmutation im Nphs2-Gen wurde die Region zwischen Exon 3 bis Exon 4 ausgetauscht. Gleichzeitig wurde eine Hygromycin-Kassette in die Intronregion eingebaut. Der Einbau dieser Hygromycin-Kassette diente zur Selektion der Stammzellen, wurde aber in den Mäusen über die LoxP-sites wieder entfernt. Die Primer zur Genotypisierung liegen in der Intron-3-Region. Dementsprechend muss zusätzlich zu der im

Genom verbliebenen LoxP-site auch ein gewisser Teil des Konstruktes erhalten geblieben sein. Welcher Teil das allerdings ist, kann über die Original-Veröffentlichung nicht nachvollzogen werden (Philippe et al. 2008). Die Arbeitsgruppe von C. Antignac, die uns die Mäuse zur Verfügung gestellt hat, hat uns ebenso die Primer-Sequenzen zur Verfügung gestellt.

2.3.1 Präparation für die Histologie

Für diesen Versuch wurden präparierte Mausnieren (siehe Tabelle 2, Seite 74) benutzt.

Verwendete Antikörper:

1. AK: Nidogen-1 1052 (rabbit-anti-human/mouse)

(Geschenk von Prof. Dr. med. Miosge, Abteilung Prothetik, Uniklinik Göttingen)

2. AK: polyclonal goat anti-rabbit Immunoglobulins/HRP von Dako 1:5000

Die im Vorfeld hergestellten 3 µm dicken Paraffinschnitte wurden mit Hilfe von Xylol entparaffiniert (dreimal, für je 10 min, bei RT). Anschließend kamen die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe, um diese zu rehydrieren; zweimal für 5 min in 100% Ethanol, sowie je einmal für 5 min in 96%, 70% und 50% Ethanol. Danach wurde 5 min mit dH_2O gewaschen und für den Andau Proteinase K (Dako; 0,4 mg/ml) (verdünnt 1:50 in 0,05Tris-HCl pH 7,6) für 5 min bei 37°C verwendet. Darauf folgte das dreimalige Waschen mit 1x TBS für jeweils 10 min (10x TBS: 0,5M Tris = 60,57g/l; 1,5MNaCl = 87,6g/l pH 7,6). Das Blocken erfolgte mit 5% BSA/TBS 1h bei RT. Der AK gegen Nidogen-1 wurde anschließend mit 5% BSA/TBS 1:100 für 1 h bei 37°C angewendet. Das dreimalige Waschen folgte erneut mit 1x TBS für jeweils 10 min. Der zweite AK (Goat anti rabbit Alexa 488; Invitrogen) wurde mit 5% BSA/TBS 1:200 verdünnt und die Schnitte 1 h bei RT und Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte das Waschen für 10 min mit TBS und abschließend das Eindecken mit Fluoreszenz Mounting Medium ü. N. bei Dunkelheit und 4°C.

Mit Hilfe des Fluoreszenz Mikroskops konnten die Zellen analysiert werden (Fluoreszenz Mikroskop von ZEISS, Axiovert S100TV; UV-Lampe: XBO 75W HBO 100W).

2.3.2 Elektronenmikroskopische Methodik

Diese Methodik wird unterteilt in die LR-Gold® - Einbettung, die Herstellung von Semi-Dünnschnitten (0,9 µm) und Ultra-Dünnschnitten (80 nm), das Herstellen von kolloidalem Gold und das Koppeln von Antikörpern, sowie die elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Nidogen-1.

Die verwendeten Mäuse für die Elektronenmikroskopie sind aus der Tabelle 2, Seite 74 im Anhang zu entnehmen. Der Nidogen-1 AK ist unter 2.3.1 auf Seite 26 beschrieben.

2.3.2.1 LR-Gold®-Einbettung

Im folgenden Abschnitt wird die Methodik der Präparation und Fixierung für Immunogoldhistochemie (LR-Gold®) beschrieben.

1) Die Gewebestücke der Mausniere sollten nicht größer als 1,5 x 1,5 mm sein und schnellstmöglich in ein Fixans gebracht werden; für 20 min bei 4°C.

   Das Fixans bestand aus 4% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd (von Sigma-Aldrich, Art-Nr. 2038565) in 0,1 M PBS:

   Für das Fixans wurde 0,2 M PBS angesetzt. (0,1 M PBS setzt sich zusammen aus: 6,79 g NaCl + 1,48 g Na_2HPO_4 in 1000 ml aq. tridest. gelöst und mit 1 N NaOH auf pH 7,4 gebracht und filtriert.) 20 ml 0,2 M PBS und 20 ml 8% frisches Paraformaldehyd (8 g Paraformaldehyd auf 100 ml aq. tridest. für 1 h auf 60°C erhitzt, gekühlt auf RT, 1 Tropfen 1 N NaOH dazu, danach filtriert. Der pH sollte um 8 liegen) wurden mit 0,8 ml 25% Glutaraldehyd vermischt (aus luftdichter Ampulle; z.B. SERVA, Art-nr. 2311, Boe Ingelheim Gruppe). Der pH-Wert des fertig gemischten Fixans muss um 7,4 liegen.
2) Nach der Fixierung wurde mit 0,1 M PBS gewaschen.
3) Die Proben wurden für 45 min in 10 mM Ammoniumchlorid (0,0053 g NH_4Cl auf 10 ml 0,1 M PBS) in 0,1 M PBS bei 4°C gelagert.
4) Danach wurde 3mal für jeweils 5 min in 0,1 M PBS bei 4°C gespült und
5) anschließend die Gewebestücke für 15 min in 30% Ethanol bei 4°C gelagert.
6) Im Anschluss wurden die Gewebestücke für 15 min in 50% Ethanol und
7) für 15 min in 70% Ethanol dehydriert.
8) Danach wurden die Präparate 1 h mit LR-Gold® pur bei 4°C und

9) 16 h (über Nacht) bei -20°C LR-Gold® mit 0,8% Beschleuniger (25 ml LR-Gold® und 0,2 g Benzil) gelagert.
10) Zuletzt wurde frisches LR-Gold® mit Beschleuniger angesetzt und Proben in Beem®-Kapseln ausgerichtet, luftdicht verschlossen und 16 h (über Nacht) bei -20°C unter UV-Licht ausgehärtet.

2.3.2.2 Herstellung von Semi-Dünnschnitten und Ultra-Dünnschnitten

Die Netzträger oder auch Grids genannt, bestehen aus Nickel, Kupfer oder Gold und haben einen Durchmesser von 2-3 mm und eine definierte Anzahl von Gitterlinien. Diese Grids müssen befilmt werden, bevor sie als Objektträger dienen können. Hier wurden Nickel-Grids mit einem Durchmesser von 3,05 mm verwendet.

Grids befilmen:

1) Beschichtungslösung: 0,3 g Formvar (von Agar Scientific) wurden in 100 ml Chloroform (von MERCK) gelöst (Lagerung lichtgeschützt bei RT),
2) eine Glasküvette mit Aqua dest. randvoll befüllt und
3) 5 Objektträger (unbeschichtet) wurden mit Seife gewaschen und anschließend gut mit Aqua dest. und folgend 70% EtOH fusselfrei gereinigt und getrocknet.
4) Nun wurde der Objektträger 15 sek in die Flasche mit der Beschichtungslösung gestellt und
5) anschließend wurden mit einem anderen Objektträger die Kanten sehr gut angekratzt.
6) Nun wurde vorsichtig vom Rand aus der Objektträger ins Wasser geschoben, sodass sich der Film löste und auf das Wasser legte.
7) Nun wurden die Grids mit der glänzenden Seite auf den Beschichtungsfilm gelegt.
8) Parafilm wurde geschnitten (sollte grösser sein als der Beschichtungsfilm mit den Grids) und
9) auf den Beschichtungsfilm mit den Grids gelegt und schnell hochgezogen.
10) Wasserreste wurden vorsichtig am Rand mit Zellstoff entfernt und
11) die Grids anschließend in einer Plastik-Petrischale gelagert und ü. N. trocknen gelassen.

Mit Hilfe des Ultramikrotoms (von Reichert-Jung Ultracut E) und mittels Diamantenmesser konnten Semi-Dünnschnitte (0,9 µm) und danach Ultra-Dünnschnitte (80 nm) von den eingebetteten Proben hergestellt werden.

Die Semi-Dünnschnitte wurden hier angefertigt, um festzustellen, ob sich Glomeruli auf dem Schnitt befinden. Wenn Glomeruli auf dem Schnitt vorhanden sind, kann man das Präparat mit Hilfe einer Rasierklinge quadratisch trimmen, ohne dass die Glomeruli dabei verloren gehen. Anschließend können damit Ultra-Dünnschnitte angefertigt werden.

Die Ultra-Dünnschnitte wurden auf Wasser aufgefangen und anschließend mittels Träger (Grid von AHTENE GRIDS®) aufgenommen.

Die Semi-Dünnschnitte wurden auf Objektträger mit Hilfe von Glasstäbchen überführt. Mit der Richardson-Blau-Färbung wurden die Schnitte angefärbt.

Richardson-Blau

Lsg. A: 1% Azur II	Lsg. B: 2% Methylenblau	Lsg. C: 2% Borax
1 g Azur II	2 g Methylenblau	2 g $Na_2B_4O_7$
(Merck, # 1.09211)	(Merck, # 1.15943)	(Merck, # 1.06309)
100 ml Aqua dest.	100 ml Aqua dest.	100 ml Aqua dest.

→ 20 ml Lsg. A + 10 ml Lsg. B + 10 ml Lsg. C mischen

→ filtrieren

2.3.2.3 Kolloidales Gold herstellen

Kolloidales Gold wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

1) Gold kochen: 49,5 ml Aqua dest. (Tridest) mit 0,5 ml 1% $AuHCl_4$ x $3H_2O$ (TetrachlorogoldIII-säure-trihydrat von Roth, Art.-Nr. 3867.1) gekocht mit Rückflusskühlung in einem sauberen Zwei-Hals-Kolben. Als es kochte, wurde 1 ml 1% Tri-Na-citrat $2H_2O$ zugegeben und anschließend weiter gekocht (1% Tri-Na-citrat $2H_2O$: 1,38 g in 50 ml Aqua dest.)

Farbumschlag: Der Farbumschlag verlief folgendermaßen:

gelb → taubenblau → blau → violett → rot → kirschrot

Beim Farbumschlag kirschrot wurde es weitere 5 min gekocht

2) Verdünnungsreihe: Die Stammlösung goat-anti-rabbit IgG (Invitrogen A 10533 1 mg/ml; 4°C) wurde zunächst 1:10 mit Aqua dest. pH 9,0 verdünnt und anschließend auf 1:100 verdünnt (für die Verdünnungsreihe auf Mikrotiterplatte). Das Volumen betrug ca. 500 µl

   Verdünnungsreihe auf Mikrotiterplatte:

   In zehner Schritten von 10 µl bis 120 µl wurde die 1:100 Verdünnung des sek. AK in die Mikrotiterplatte pipettiert; anschließend wurden 100 µl kolloidales Gold zugegeben, kurz geschüttelt und 2 min gewartet, dann 100 µl 10% NaCl zugegeben und der Farbumschlag abgelesen.

   Bei einem rosa Farbumschlag liegt eine optimale Verdünnung vor. Bei dem Farbumschlag blau ist der AK-Anteil zu gering.

2.3.2.4 Antiköper koppeln (Immunogoldhistochemie)

Bei 40 µl idealem Farbumschlag wurde mit folgendem Pipettierschema fortgefahren:

1) 40 µl (1:10) AK + 1000 µl Gold

   = 1040 µl

   + 104 µl 10% BSA/PBS pH 9,0

   + 556 µl 1% BSA/PBS pH 9

   = 1700 µl

   Das E-Cup wurde zwei Minuten stehen gelassen, damit sich der AK an das Gold koppeln kann.

2) Das gekoppelte Gold wurde zentrifugiert (10.000 rpm, 25 min bei 21°C).

3) Anschließend 10 min im Ständer stehen gelassen (Sediment ist gekoppelt / Fahne ist ungekoppelt) und

4) das Sediment (ca. 15 µl) mit Eppendorfspitze herauspipettiert und in ein E-Cup überführt.

5) 15 µl Sediment wurden nochmals 1:10 verdünnt mit jeweils der Hälfte:

   + 67,5 µl 1% BSA/PBS pH 9,0

+ 67,5 µl 1% BSA/PBS pH 7,4

= 150 µl

Der gekoppelte AK konnte dann bei 4°C gelagert werden (ca. 2 Wochen im Kühlschrank haltbar).

Eine Petrischale wurde mit Parafilm beschickt und anschließend pro Grid 20 µl 1% PBS/BSA pH 7,4 auf den Parafilm pipettiert. Das Präparat wurde auf den PBS/BSA-Tropfen für 10 min bei RT gelegt und geblockt. Danach wurde das Präparat mit dem primären AK (Nid-1 1052) 1:200 in 1% PBS/BSA pH 7,4 für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend mit 1x PBS gewaschen (100 ml pro Grid) und danach mit dem sekundären AK (gekoppelt an 20 nm Gold) 1:30 in PBS/BSA pH 7,4 für 20 min bei RT ebenfalls inkubiert. Der Grid wurde erneut mit 1x PBS gewaschen und danach kontrastiert mit 1% Uranylacetat (giftig) und 2,66% Bleicitrat für je 10 min bei RT und mit dest. H_2O sorgfältig gewaschen (200 ml pro Grid). Abschließend wurde der Grid bis zur Verwendung für das EM in einer Gridbox gelagert.

Für die Negativkontrolle (Seite 73) wurde der primäre AK (Nid-1 1052) gegen 1% PBS/BSA (pH 7,4) ersetzt.

<u>Uranylacetat (1%)</u> muss alle zwei Wochen neu angesetzt werden:

0,1 g auf 10 ml Aqua dest.

<u>Bleicitrat (2,66%)</u> muss alle sechs Monate neu angesetzt werden:

1,33 g $Pb(NO_3)_2$ (Blei-II-nitrat) wurden in 30 ml Aqua dest. gelöst und 1,76 g Tri-Natrium-Citrat-dihydrat dazugegeben, 1 min kräftig geschüttelt und 30 min zur Umwandlung in Bleicitrat bei RT stehen gelassen, gelegentlich geschüttelt. Danach wurden 8 ml 1 N NaOH zugegeben und mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt und geschüttelt. Bleicitrat löste sich und wurde abschließend filtriert.

2.4 Perfusion zur Glomeruli-Isolation

Für die Glomeruli-Isolation wurden die Mäuse mittels Metallkügelchen (Dynabeads®, von Invitrogen) intrakardial perfundiert. Aufgrund der Beads-Größe setzen sich die Kügelchen in den Glomeruli fest, was eine Isolation der Glomeruli mit Hilfe von Magneten ermöglicht.

Ansätze der benötigten Lösungen:

-Puffer 1: 0,1 M NaH_2PO_4 (steril), Lagerung bei RT

-Puffer 2: 0,1 M NaH_2PO_4 + 0,1% BSA (steril), Lagerung bei 4°C

-Dynabeads® M450 Epoxy Invitrogen 14011

Dynabeads® (M450 Epoxy) wurden resuspendiert und pro Ansatz 1 ml in ein 1,5-ml-E-Cup überführt und in einen Magnetständer für 1 min gestellt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das E-Cup mit den Magnetkugeln wurde in einen Halter gestellt und 1 ml Puffer1 hinzupipettiert, 2 min resuspendiert und wieder 1 min in den Magnetständer gestellt. Danach wurde der Überstand erneut abgenommen und das Bead-Pellet erneut in Puffer1 verdünnt. Dieser Vorgang wurde nochmals zweimal wiederholt, anschließend die Magnetkugeln mit 1 ml Puffer 2 für 2 min resuspendiert und über Nacht bei RT und 800 rpm in den Thermomixer gestellt.

Am nächsten Tag wurde das E-Cup für 1 min in den Magnetständer gestellt, dann der Überstand abgenommen. Danach wurde 1 ml Puffer2 hinzupipettiert und 2 min resuspendiert und wieder 1 min an den Magneten gestellt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Am Ende wurden die Beads in 1 ml Puffer2 bei 4°C gelagert.

Die Narkose der Mäuse wurde mit Isofluran (Forene®, Abbott) auf Zellstofftuch (~2 ml) in einer Betäubungsflasche durchgeführt. Die Maus wurde in die Flasche gesetzt und gewartet, bis die Schnappatmung aufhörte.

Die Maus wurde fixiert und am Bauch mit Desinfektionsmittel angefeuchtet. Die Bauchdecke wurde mit Hilfe einer Schere eröffnet und an beiden Seiten aufgeschnitten, die Leber nach unten geklappt und das Zwerchfell durchtrennt. Anschließend folgte die Durchtrennung der Rippenbögen, links und rechts des Sternums. Danach wurde das Herz freigelegt und mit einer Gewebepinzette fixiert, der rechte Vorhof mit einer spitzen Schere eröffnet und der Butterfly in den linken Ventrikel eingeführt. Die Klemme wurde geöffnet für die Perfusionsflüssigkeit. Bei einer erfolgreichen Perfusion färben sich Leber und Niere hell. Abschließend konnten die Nieren mit einer spitzen Schere isoliert werden.

Die darauffolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt:

Für die Glomeruliisolation wurden die Nieren zuerst auf einer autoklavierten Glasplatte auf Eis in ca. 1 mm große Stücke mit einem Skalpell geschnitten (Skalpell „Feather Disposable Scalpel“ No. 11, REF 02.001.30). Das Gewebe wurde in 15-ml-Falkon-Röhrchen überführt und mit 1xPBS (von PAA, Cat. No. H15-002, 500ml) auf 1 ml aufgefüllt. Collagenase A

0,1 ml 20 mg/ml (von Roche, 70365126, 100mg) in HBSS/Hanks (von Biochrom L2045) gelöst und im 37°C Wasserbad für 45 min alle 5 min geschwenkt. Das Gewebe mit der Lösung wurde durch ein 100-µm-Zellsieb (Cell stainer von BD Falcon, REF 352360) in ein 50-ml-Falkon gegeben; anschließend mit 1xPBS nachgespült (insgesamt 14 ml) und 15 min in einen Magnethalter (von New England BioLabs, Cat.No. S1507S) auf Eis gestellt. Der Überstand wurde in ein 50-ml-Falkon überführt (Ü1) und das am Magnet entstandene Pellet mit 14 ml 1xPBS erneut gewaschen. Danach wurde das Falkon erneut für 15 min auf Eis in den Magnethalter gestellt, anschließend der Überstand abgenommen und mit Überstand 1 vermischt (Ü1 + Ü2). Das Pelett (am Magneten), welches die Glomeruli enthält, wurde in 500 µl 1xPBS aufgenommen und in ein 1,5-ml-E-Cup überführt und anschließend auf Eis gestellt. Das Falkon mit Ü1 + Ü2 wurde kurz geschwenkt und der Inhalt durch ein 100-µm-Sieb gegeben und erneut für 10 min in den Magnetständer gestellt. Dieser Überstand wurde in ein weiteres 50-ml-Falkon überführt und dann das zweite Pellet (am Magneten) mit 500 µl 1xPBS gewaschen und zum ersten Pellet dazugegeben. Aus dem restlichen Überstand, welcher Tubuli-Reste enthält, wurde je 1 ml entnommen und in ein neues 1,5-ml-E-Cup überführt. Beide E-Cups wurden dann bei 3250 rpm bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand bis zum Pellet wurde vorsichtig abgesaugt und das E-Cup für Western Blot bei -20°C weggefroren. Für die real-time PCR wurde es mit 350 µl RLT-Puffer + 3,5 µl ß-ME (ß-Mercapto-Ethanol) verdünnt und bei -20°C weggefroren.

2.5 PCR

2.5.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus Glomerulikultur sind folgende Schritte durchgeführt worden:

1) 350 µl Lysat aus den Glomerulipellets wurde auf eine Shredder-Säule (QIA Shredder, Qiagen Cat.No. 79656) gegeben und bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert, dann die Säule verworfen

   350 µl 70% EtOH dazugegeben und gründlich resuspendiert,

2) + 700 µl auf MinElute Spin Column (4°C) und bei 10000 rpm 30 sek zentrifugiert, Durchlauf verworfen

   + 350 µl RW1 (Puffer Kit) und erneut bei 10000 rpm 30 sek zentrifugiert, Durchlauf verworfen

3) DNase Verdau (DNase, Qiagen, Cat.No. 79254):

10 µl DNase

+ 70 µl RDD → 80 µl direkt auf den Filter gegeben; 15 min bei RT inkubiert

4) + 350 µl RW1 zugegeben und bei 10000 rpm 30 sek zentrifugiert (neues Collection Tube)

5) + 500 µl RPE (RNeasy Mikrokit, Qiagen 50 Cat.No. 74004) zugegeben und ebenfalls bei 10000 rpm 30 sek zentrifugiert, Durchlauf verworfen

6) + 500 µl 80% EtOH, bei 10000 rpm 2 min zentrifugiert (neues Collection Tube), anschließend bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert,

7) Säule auf neuen E-Cups,

   + 14 µl NFW (nukleasefreies Wasser) zugegeben und bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung:

Mittels eines Photometers (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

-63 µl NFW + 7 µl Probe

-70 µl NFW in eine Küvette (UVette 220-1600 nm, Eppendorf, Cat.No. 952010051)

- Photometrische Messung der RNA wurde bei 260 nm durchgeführt.

2.5.2 Umschreibung von mRNA in cDNA

Durchführung der Transkription (im E-Cup) (pro Probe 200ng in PCR-Thermocycler umgeschrieben)

1) 200 ng RNA in 14 µl NFW, für 5 min bei 65°C und anschließend für 5 min bei 4°C (Pause)
2) + 23 µl Mastermix

   8 µl 5x Puffer

   1 µl RNase OUT (40 U/µl, 125 µl) (von Invitrogen/life tech, Cat.No. 10777-019)

   4 µl dNTP (10 mM) (von Invitrogen/life tech, Cat.No. 18427-013 100 µl)

   4 µl Oligo dT_{15} (Primer $p(dT)_{15}$ von Roche, Cat.No. 10814270001)

   4 µl DTT (0,1 M)

   2 µl Superscript II (200 U/µl) (von Invitrogen/life tech, Cat.No. 18064-071)
3) bei 37°C für 60 min, bei 70°C für 15 min, bei 4°C Pause
4) + 2 µl RNase H bei 37°C für 20 min (von Invitrogen/life tech, Cat.No. 18021-071)
5) + 161 µl NFW
6) Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.5.3 Primer

Die Primersequenzen für die real-time PCR von Nidogen-1 und GAPDH (Housekeeping-Gen) sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Sie wurden mit Hilfe der NCBI Primer-Blast hergestellt und mit der Datenbank von NCBI Blast (Standard Nucleotide BLAST, http://www.ncbi.nlm.nih.gov (2007)) überprüft. Die Größe der Produkte wurde überprüft mittels normaler PCR und anschließendem Agarose-Gellauf. Des Weiteren wurde die Annealing-Temperatur durch eine Gradienten-PCR ermittelt.

Zielgen	Reverse (5´ → 3´)	Forward (5´ → 3´)	Annealing Temperatur (°C)	Längen der Primer
Nidogen-1	AGG TCA GAC CAT TGG GCA AG	CAG ACC CCG TAA GAG GGA AC	60	135
GAPDH	CTG TAG CCG TAT TCA TTG TC	CAT CTT GGG CTA CAC TGA	60	123

Gradienten-PCR

Die Annealing-Temperatur wurde mit Hilfe der Gradienten-PCR ermittelt. Die Annealing-Temperatur beschreibt hierbei die maximale Temperatur, bei welcher sich der Primer am Besten an die cDNA anlagert und nur ein Produkt gebildet wird.

Ansatz Gradienten-PCR:

cDNA	0,5 µl
Primer (for + rev)	2 µl
SYBR-Green Mix	5 µl
Nuklease-freies Wasser	2,5 µl

PCR-Protokoll:

Initiale Denaturierung	3 min	95°C	
Denaturierung	20 sek	94°C	
Anlagerung (Annealing)	20 sek	variabel	45 Zyklen
Verlängerung	20 sek	68°C	
Letzte Verlängerung	10 min	68°C	
	∞	4°C	

2.5.4 Real-time PCR

Mastermix (iQ SYBR Green Supermix) für qPCR

1x 12,5 µl (2x) SYBR + ROX (3,3 µl zu 1,25 ml auf 2xiQ)

0,5 µl Primer rev.

0,5 µl Primer fwd.

11,5 µl NFW

25 µl

Die Real-time PCR wurde mithilfe eines Mastercycler Realplex^2 S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10 min	1
95°C	30 sek	
60°C	1 min	40
72°C	1 min	
95°C	1 min	
60°C	30 sek	1
95°C	30 sek	

Die statistische, erforderliche Normalisierung der PCR-Daten erfolgte mit Hilfe des House-keeping-Gens GAPDH. Es wurde als Kontroll-Gen gewählt, da es sich stabil exprimierte in unseren Versuchen.

Die Berechnung der Ratio ist eine Möglichkeit des Vergleichs der Proben. Der relative Expressionsunterschied zwischen dem House-keeping-Gen zur Referenzprobe, normalisiert durch das Referenzgen GAPDH, wird hierbei aus der arithmetischen Formel $E^{-\Delta\Delta Ct}$ (E=Effizienz der PCR) berechnet.

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = C_t \text{ Behandlung} - C_t \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Der C_t-Wert *(Cycle of threshold)* entspricht dem Zyklus (Schwellenwert-Zyklus) der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je kleiner der C_t-Wert, desto mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn in der Probe enthalten. Bei der relativen Expression von Nid-1 wurde WT 60T (+/+//+/+) normalisiert (= 1,0) und es ergaben sich entsprechende Signifikanzen zwischen den Genotypen (Seiten 61-64).

2.6 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht den Nachweis von Proteinen durch die Übertragung (Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran. Diese Proteine sind dann zugänglich für einen spezifischen Antikörpernachweis. Durch einen daran bindenden sekundären Antikörper, an dem das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist, ist eine Visualisierung der Proteine möglich. Die Peroxidase setzt das Luminol in einer Chemilumineszenzreaktion um.

Zur Herstellung der Lysate wurden die Glomeruli und die Pellets der Überstände in je 100 µl Urea Puffer (9,5 M Urea, 2% CHAPS, 1% DTT) in ein 1,5-ml-E-Cup auf Eis lysiert. Anschließend wurde ein Ultraschallstab in das Röhrchen gestellt und das Programm 1 lief insgesamt 5 min (Gerät: Misconix), um die DNA zu zerkleinern. Danach wurde das Lysat für 10 min bei 15000 rpm und 8°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues E-Cup überführt und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Mit Hilfe der Methode nach Bradford wurden die Proteinkonzentrationen der Proben im Vergleich zur Standardkurve mit BSA ermittelt. Es wurden Doppelbestimmungen der Standartkurven und der Proben durchgeführt.

Die Proben bzw. die Glomeruli wurden 1:5 verdünnt (2,5 µl Probe wurden mit 22,5 µl dH_2O vermischt).

<u>Standard verdünnen</u>

- Stock 1 mg/ml BSA (-20°C)

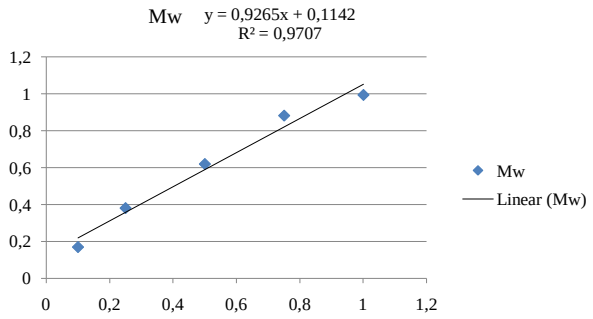
- 0 mg/ml		Leerwert		**Std A**
- 0,1 mg/ml	50 µl	5 µl	+ 45 µl dH_2O	**Std B**
- 0,25 mg/ml		12,5 µl	+ 37,5 µl dH_2O	**Std C**
- 0,5 mg/ml		25,0 µl	+25,0 µl dH_2O	**Std D**
- 0,75 mg/ml		37,5 µl	+12,5 µl dH_2O	**Std E**
- 1,00 mg/ml		50,0 µl	+0,0 µl dH_2O	**Std F**

Eine 96-Well-Platte wurde mit je 10 µl Standartreagenz und mit den verdünnten Proben in der Doppelbestimmung bestückt. Auf die 10 µl Standartreagenz wurden je 200 µl von der verdünnten Bradfordlösung pipettiert. Das Bradford Reagenz wurde zuvor 1:5 in dH_2O verdünnt. Um eine vorzeitige Ausfällung zu verhindern, wurde die Bradfordlösung nach den Proben pipettiert. Nun werden die Extensionen im ELISA Reader gemessen.

	1	2
A	StdA	StdE
B	StdA	StdE
C	StdB	StdF
D	StdB	StdF
E	StdC	1:5 P1
F	StdC	1:5 P1
G	StdD	1:5 P2
H	StdD	1:5 P2

Extension und Konzentration der Überstände

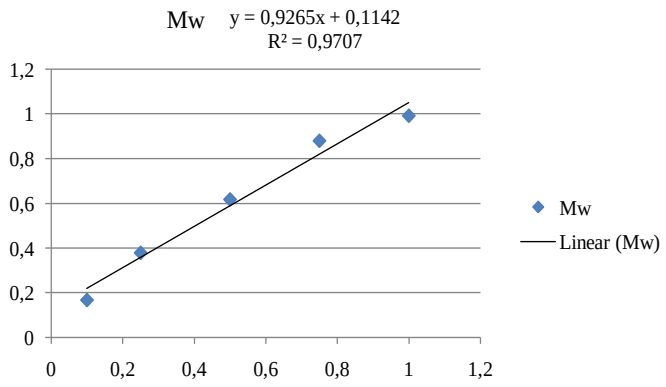
Standardkurve 0,1	Ext 1	Ext 2	Mw
0,1	0,161	0,176	0,1685
0,25	0,378	0,381	0,3795
0,5	0,601	0,635	0,618
0,75	0,863	0,897	0,88
1	0,99	0,994	0,992



	Überstand						µg	µL dH2O
Pod/Col4	1:5	Ext 1	Ext 2	Mw	Konz mg/ml 1:5 Verd	Konz mg/ml	**40,00**	**22,75**
+/+ +/+	365	1,1169	1,157	1,13695	1,10	5,52	**7,25**	**15,50**
	366	1,174	1,163	1,1685	1,13	5,63	**7,10**	**15,65**
	438	1,265	1,184	1,265	1,23	6,15	**6,50**	**16,25**
+/- +/+	363	0,915	0,885	0,9	0,84	4,18	**9,57**	**13,18**
	450	1,033	1,006	1,0195	0,97	4,83	**8,29**	**14,46**
	440	0,824	0,831	0,8275	0,76	3,79	**10,56**	**12,19**
+/+ +/-	405	0,76	0,742	0,751	0,67	3,37	**11,85**	**10,90**
	417	1,165	1,143	1,154	1,11	5,55	**7,20**	**15,55**
	452	1,174	1,142	1,158	1,12	5,58	**7,17**	**15,58**
+/- +/-	439	0,899	0,863	0,881	0,82	4,08	**9,81**	**12,94**
	434	0,931	0,871	0,901	0,84	4,19	**9,56**	**13,19**
	441	0,94	1,0	0,97	0,91	4,56	**8,77**	**13,98**

Extension und Konzentration der Glomeruli

Standardkurve 0,1	Ext 1	Ext 2	Mw
0,1	0,161	0,176	0,1685
0,25	0,378	0,381	0,3795
0,5	0,601	0,635	0,618
0,75	0,863	0,897	0,88
1	0,99	0,994	0,992



	Glomeruli						µg	µL dH2O
Pod/Col4	1:5	Ext 1	Ext 2	Mw	Konz mg/ml 1:5 Verd	Konz mg/ml	**40,00**	**22,75**
+/+ +/+	365	1,1169	1,157	1,13695	1,10	5,52	**7,25**	**15,50**
	366	1,174	1,163	1,1685	1,13	5,63	**7,10**	**15,65**
	438	1,265	1,184	1,265	1,23	6,15	**6,50**	**16,25**
+/- +/+	363	0,915	0,885	0,9	0,84	4,18	**9,57**	**13,18**
	450	1,033	1,006	1,0195	0,97	4,83	**8,29**	**14,46**
	440	0,824	0,831	0,8275	0,76	3,79	**10,56**	**12,19**
+/+ +/-	405	0,76	0,742	0,751	0,67	3,37	**11,85**	**10,90**
	417	1,165	1,143	1,154	1,11	5,55	**7,20**	**15,55**
	452	1,174	1,142	1,158	1,12	5,58	**7,17**	**15,58**
+/- +/-	439	0,899	0,863	0,881	0,82	4,08	**9,81**	**12,94**
	434	0,931	0,871	0,901	0,84	4,19	**9,56**	**13,19**
	441	0,94	1,0	0,97	0,91	4,56	**8,77**	**13,98**

Im Anschluss wurde der Gellauf mit Fertiggelen (4-8%ig, Expedeon Run Blue) durchgeführt. (Bei Fertiggelen muss der dazugehörige Laufpuffer und für die Proben der dazugehörige Probenpuffer benutzt werden.)

Die Probe (40 µg, im ELISA Reader gemessen) wurde zu 6,5 µl dH_2O gegeben;

+ Probenpuffer: 4 µl = 400 µg

4 µl Lysat +

2,5 µl H_2O +

2,5 µl Expedeon 4x LDS Sample Buffer +

<u>1 µl DTT (10fach)</u>

= 10 µl

Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 70°C inkubiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt.

Dann wurde es kurz zentrifugiert. Die Fertiggele wurden in die Halterung eingespannt und die Kammer innen mit dem Puffer befüllt (die Dichtigkeit wurde geprüft), außen sollte es ¼ voll befüllt sein. Danach wurden 10 µl Marker (ProSieve QuadColor Protein Marker, Lonza) direkt links in die Tasche gegeben und anschließend die Proben pipettiert.

Das Gel lief zunächst bei 80 V 30 min lang und danach bei 120 V ca. 1-1,5 Std.

Für die Materialvorbereitung wurde folgendes benötigt:

Je Gel: 1x Membran (links oben beschriftet, so wenig wie möglich berührt)

2x Filterpapiere (Bio-Rad, 170.3932) (größer als Membran geschnitten)

2x Vlies

Die Nitrocellulosemembran (Protran® #4685.1 von Roth) zwischen den Filterpapieren und Vlies wurde 15 min in Transferpuffer eingeweicht.

Nun wurde der Blot aufgebaut. Die Plastikplatte wurde mit einem Spatel gelöst und das Gel 7 min im Transferpuffer äquilibriert. Je nach Größe des gesuchten Proteins und Laufverhalten des Gels musste das Gel zugeschnitten werden.

Die Blotkassette in Transferpuffer wurde nach dieser Reihenfolge zusammengebaut:

1. Blotkassette (schwarze Seite nach unten)
2. Vlies
3. Filterpapier
4. Gel (Marker rechts)
5. Membran (Beschriftung rechts oben auf dem Bauch)
6. Filter
7. Luftblasen „herausgerollt“
8. Vlies
9. Blotkassette geschlossen

Die Kassette wurde in die Apparatur eingesetzt (schwarze Seite an schwarzer Seite der Kammer) und dann die Kammer mit Transferpuffer befüllt. Der Eisblock wurde auf die schwarze Seite der Kammer gestellt. Das Blotten erfolgte ü. N. bei 4°C und 40 V. 1 h 100 V.

Danach wurde der Blott abgebaut (Marker musste komplett übertragen sein).

Das Blocken erfolgte 1 h bei RT mit 5%iger Magermilch in TBS-T.

AK

1. AK (Nid-1 1052) (1 µl in 6 ml) ü. N. bei 4°C

Dann folgte das 3malige Waschen für je 15 min mit 1xTBS-T

2. AK (Polyclonal goat anti-rabbit Immunglobulins / HRP 1:5000)

in 5%iger Magermilch in TBS-T (Gesamtvolumen 6ml) für 1 h bei RT

Dann folgte das 4malige Waschen für je 15 min mit 1xTBS-T (Entwickler angeschaltet)

Blot entwickelt

Je Küvette 3 ml Lsg A (Perkin Elmer)

3 ml Lsg B, Lsg mischen

Die Membran in der Lsg wurde 1 min geschwenkt und dann die Membran in die Entwicklerkassette gelegt. Der Film wurde rechts oben umgeknickt und der Film dann nach entsprechender Zeit entwickelt und anschließend in der Dunkelkammer sofort beschriftet.

Die Marker wurden eingezeichnet und erst dann sollte die Membran aus der Entwicklerkassette genommen werden.

Quantifizierung von Nidogen-1

Die Western Blots wurden zum Nidogen-1 quantifiziert (Seite 52). Die Filme wurden auf einem Standardkopierer als TIFF-Datei mit 1200 dpi eingescannt. Die Pixel der Banden wurden mit der Kd-1 Software (Kodak, Rochester, USA) ermittelt. Für die relative Expression der Banden wurden die Pixelwerte jeder einzelnen Probe durch den Pixelwert der Wildtyp-Bande dividiert.

2.7 Immunfluoreszenz für Kryo-LM-Schnitte

Der Gefrierschnitt wird in der Pathologie hauptsächlich als Schnellschnitt zur intraoperativen Beurteilung von Geweben herangezogen. Er hat vor allem in der Immunhistochemie Bedeutung erlangt, besonders dann, wenn Forschungsantikörper verwendet werden sollen, die nur auf nativen Geweben binden können.

Die Nieren-Proben wurden direkt nach der Entnahme in die Einbettschalen Tissue-Tek® (Cryomold® Intermediate USA) mit Hilfe vom Einbettmedium Tissue-Tek® (O.C.T.™ compound containing Sakura Finetek Europe B.V.) eingebettet und bei -20°C über Nacht gelagert. Anschließend erfolgte die langfristige Lagerung bei -80°C.

Es wurden 7 µm dicke Schnitte mit dem Kryotom (Jung CM3000) angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden mit Hilfe eines Objektträgers (Menzel-Gläser Superfrost® Plus) aufgenommen und bei RT für 10 min luftgetrocknet.

Für die Immunfluoreszenzdoppelfärbung (Nidogen-1 + Nephrin) wurde das Einbettmedium vorsichtig von dem Objektträger entfernt und die Schnitte in Aceton für 10 min bei -20°C auf dem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 min mit 1xPBS gewaschen.

Der primäre AK (Nephrin Guinea pig polyclonal Cat.Nr GP-N2 1:100) in 1% PBS/BSA (pH 7,4) wurde für 1 h bei RT auf die Gefrierschnitte aufgetragen. Danach folgte das 3malige Waschen für jeweils 5 min mit 1xPBS. Der sekundäre AK (Alexa Fluor 546 goat anti guinea pig Invitrogen A11074 1:200) in 1% PBS/BSA (pH 7,4) wurde für 1 h bei RT im Dunkeln aufgetragen. Anschließend erfolgte wieder das 3malige Waschen allerdings im Dunkeln.

Nun wurde der zweite primäre AK (Polyclonal Antibody to Nidogen-1 Serum rabbit Acris# APO2274Su-S 1:500) in 1% PBS/BSA (pH 7,4) auf die Nephrinreaktion aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT im Dunkeln. Danach folgte wiederholt das 3malige Waschen für jeweils 5 min mit 1xPBS im Dunkeln. Der zweite sekundäre AK (Alexa Fluor 488 goat anti rabbit Invitrogen A11008 1:200) in 1% PBS/BSA (pH 7,4) wurde für 1 h bei RT im Dunkeln aufgetragen. Abschließend erfolgte wieder das 3malige Waschen im Dunkeln.

Zur Absicherung einer spezifischen Bindung des Antikörpers wurde eine Negativkontrolle mitgeführt (Seite 68), wobei jeweils die primären AK nicht mit aufgetragen wurden, sondern nur das 1% PBS/BSA (pH 7,4).

Mit Hilfe von Deckgläschen (von Menzel-Gläser®) und Fluoreszenz Mounting Medium (Dako 10085472, USA) konnten die gefärbten Schnitte eingedeckt werden. Sie sollten ü. N. bei 4°C im Dunkeln trocknen bzw. aushärten.

Unter dem Mikroskop (Axiovert S 100TV) mit UV-Licht (XBO75W HBO 100W) wurden die Schnitte mit einer Vergrößerung von 40x (400fach) beurteilt.

3. Ergebnisse

Nach unserer Hypothese nimmt Nidogen-1 (Nid-1) bei podozytären Erkrankungen der Niere eine Schlüsselrolle ein, da es vermutlich eine wichtige stabilisierende Funktion in der GBM übernimmt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit 60 und 180 Tage alte Wildtyp-, Einzel- und Doppel-heterozygote Kollagen IV/Podocin-Mäuse, mittels real-time qPCR (auf mRNA-Ebene) und Western Blot (auf Proteinebene) auf die Quantität/Verteilung von Nid-1 untersucht. Mittels ultrastruktureller Immunogoldhistochemie und Immunfluoreszenz wurde die genaue Lokalisation und Quantifizierung von Nid-1 in der GBM durchgeführt. Insbesondere bei der elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie konnte Nid-1 sehr genau untersucht werden in Bezug auf die Lokalisation und Proteinmenge.

3.1 Immunfluoreszenz für Kryo-LM-Schnitte

Um die genaue Lokalisation des Nid-1 histologisch darstellen und untersuchen zu können, wurde die Immunfluoreszenz durchgeführt. Nicht nur die Quantität, sondern auch die Verteilung und Lokalisation von BM-Komponenten spielt eine essentielle Rolle für die Funktionalität der GBM und die sie umgebenden Strukturen.

In Abbildung 9 ist die Immunfluoreszenz für Kryo-LM-Schnitte mit Nid-1 und Nephrin dargestellt. Des Weiteren wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung der beiden Proteine durchgeführt.

Verglichen von WT 60Tagen mit WT 180Tagen (s. Abb. 9) ist auffällig, dass sich die Kolokalisation des Nidogen-1 und des Nephrins verändert. Während Nid-1 und Nephrin beim WT 60T eher in/auf der Basalmembran lokalisiert sind, verlagern sich diese beim WT 180T eher in die mesangiale Matrix. Tubulär können keine Unterschiede festgestellt werden.

Vergleicht man Pod/Col IV 60T mit Pod/Col IV 180T, ist erkennbar, dass sich die Kolokalisation des Nid-1 und des Nephrins ebenfalls verändert. Während sich Nid-1 und Nephrin bei Pod/Col IV 60T eher in/auf der Basalmembran lokalisieren, verlagern sich diese bei Pod/Col IV 180T eher in das Mesangium. Nid-1 ist bei Pod/Col IV 180T vermehrt im Mesangium und auch auf der Basalmembran vorhanden. Tubulär sind ebenfalls keine Unterschiede festzustellen.

Im Vergleich von allen Genotypen zu Alport 60T (Col IV -/-) sind größere Auffälligkeiten sichtbar. Nid-1 ist im Bereich der Basalmembran stark vermehrt, jedoch nicht mesangial oder tubulär. Nephrin hingegen ist mesangial, tubulär und kaum auf der BM lokalisiert. Eine Negativkontrolle ist im Anhang auf Seite 73 aufgeführt.

Um diese Auffälligkeiten genauer quantifizieren zu können, wurde der Western Blot (s. Seite 51) durchgeführt und anschließend mit der Immunogoldhistochemie (s. Seite 54) die Lokalisation und Menge des Nid-1 genauer unter dem Elektronenmikroskop untersucht.

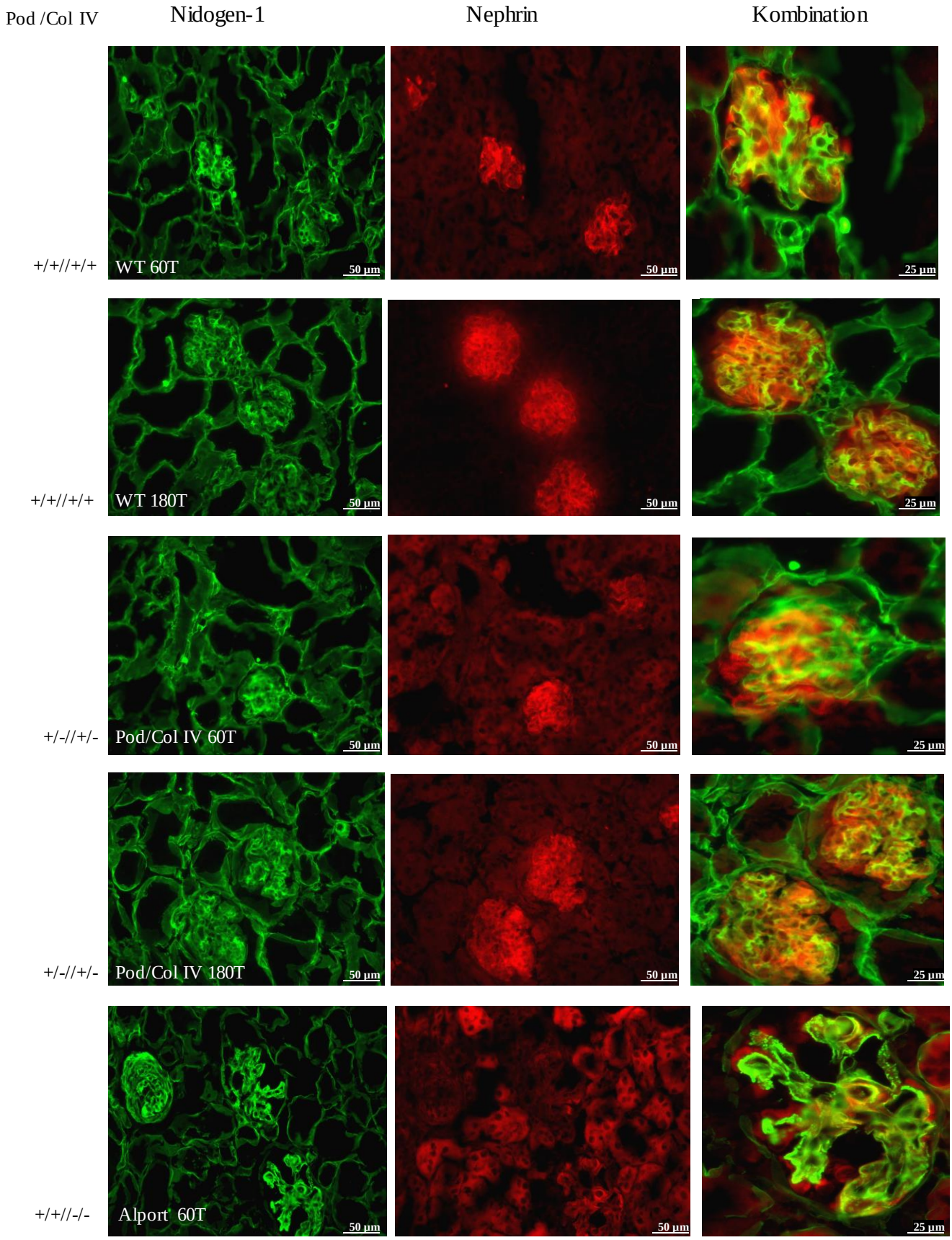

Pod /Col IV
Nidogen-1
Nephrin
Kombination
+/+//+/+
WT 60T
50 µm
50 µm
25 µm
+/+//+/+
WT 180T
50 µm
50 µm
25 µm
+/-//+/-
Pod/Col IV 60T
50 µm
50 µm
25 µm
+/-//+/-
Pod/Col IV 180T
50 µm
50 µm
25 µm
+/+//-/-
Alport 60T
50 µm
50 µm
25 µm

Abbildung 9: Immunfluoreszenz für Kryo-LM

Aufgezeigt sind die jeweiligen Genotypen mit Nidogen-1 und Nephrin und die Kombination der beiden Proteine (Immunfluoreszenzdoppelfärbung).

Wie in der Abb. der Kombinationen ersichtlich ist, sind Nid-1 und Nephrin bei den Genotypen +/+//+/+ (WT 60T) und +/-//+/- (Pod/Col IV 60T) eher in/auf der Basalmembran lokalisiert und verlagern sich bei den Genotypen +/+//+/+ (WT 180T) und +/-//+/- (Pod/Col IV 180T) eher in die mesangiale Matrix. Nid-1 ist beim Genotyp +/-//+/- (Pod/Col IV 180T) auch auf der Basalmembran vorhanden. Bei dem Genotyp +/+//-/- (Alport 60T) ist Nid-1 im Bereich der Basalmembran stark vermehrt. Nephrin hingegen ist mesangial, tubulär und kaum auf der BM lokalisiert. Negativkontrollen von Nid-1 und Nephrin sind auf Seite 73 dargestellt.

3.2 Western Blot-Ergebnisse Nidogen-1

Um zu beurteilen, ob es quantitative Unterschiede in der Proteinmenge von Nid-1 gibt, wurde der Western Blot mit 180T alten Mäusen durchgeführt (s. Abb. 10a+b). Die Gele von 60T alten Mäusen zeigten keine repräsentativen Ergebnisse.

Die Untersuchungen wurden an isolierten Glomeruli vorgenommen, weil Analysen aus den Tubuli nicht detailliert genug sind, da die BM-Komponenten auch im Tubulointerstitium vorkommen. Wie im Methodenteil erläutert (s. Punkt 2.4, Seite 31), wurden die Mäuse für die Glomeruli-Isolation mittels Metallkügelchen (Dynabeads®, von Invitrogen) intrakardial perfundiert. Aufgrund der Beads-Größe setzten sich die Kügelchen in den Glomeruli fest, was eine Isolation der Glomeruli mit Hilfe von Magneten ermöglichte. Um die Struktur der Glomeruli zu erhalten, ist es sinnvoll, diese direkt nach der Isolation zu verwenden.

Als Referenz wurde β-Aktin gewählt, da es stabil produziert wird.

Wie in Abbildung 10a+b ersichtlich ist, gibt es keine quantitativen Unterschiede in der Proteinmenge von Nid-1 beim Western Blot.

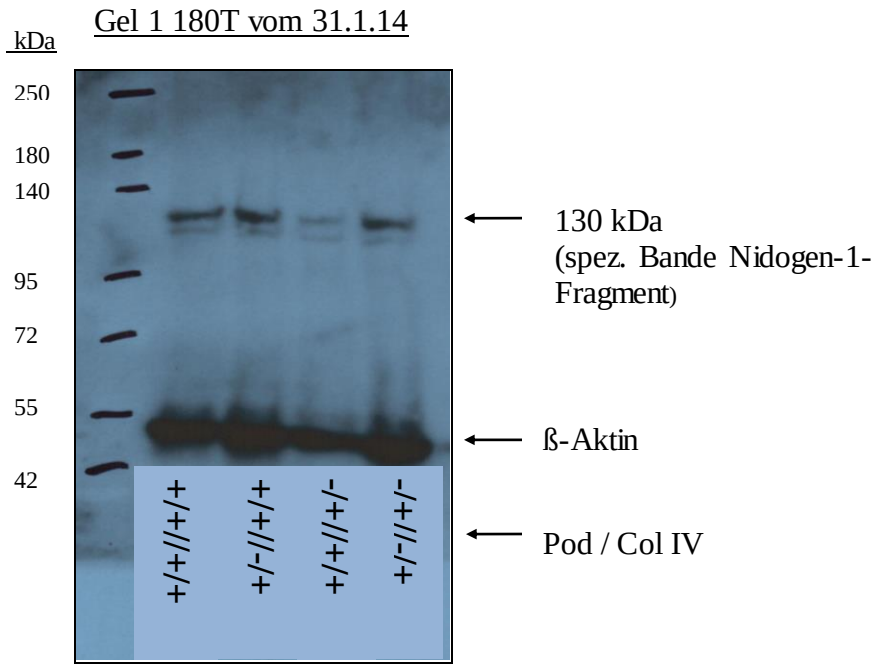


Abbildung 10a: Dieser Western Blot zeigt bei 130 kDa spezifische Banden (Nidogen-1-Fragmente). Nidogen-1 wird in der Literatur als 148 kDa schwer beschrieben (Carlin et al. 1981). Des Weiteren zeigt das Gel bei 50 kDa ß-Aktin-Banden. ß-Aktin wird in der Literatur mit einem Gewicht von ca. 42 kDa beschrieben und fungiert als Kontroll-Gen.

Gel 2 180T vom 31.1.14

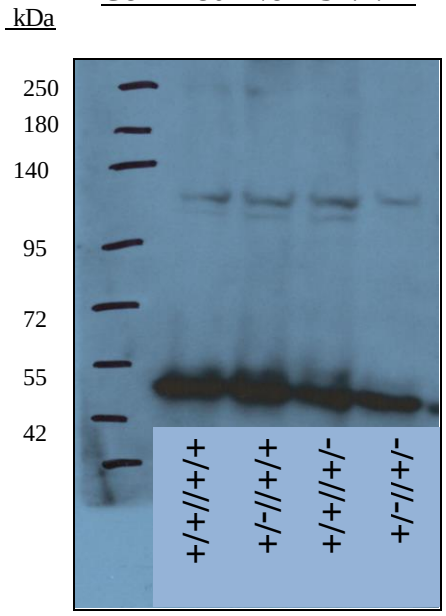


Abbildung 10b: Dieses Gel zeigt ebenfalls bei 130 kDa spezifische Banden (Nidogen-1-Fragmente). ß-Aktin-Banden sind auch bei diesem Gel bei 50 kDa.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Quantifizierung des Proteins aufgeführt.

Quantifizierung von Nidogen-1

Gel 1 30 sek	**381** +/+//+/+	**385** +/-//+/+	**372** +/+//+/-	**386** +/-//+/-
obere Bande	900470,31	1132514,72	421099,17	1009610,33
	1,00	1,26	0,47	1,12
untere Bande	452438,56	444483,93	192051,57	294085,96
	1,00	0,98	0,42	0,65

Gel 2 30 sek	**423** +/+//+/+	**421** +/-//+/+	**369** +/+//+/-	**394** +/-//+/-
obere Bande	736513,55	737514,00	948708,13	736846,00
	1,00	1,00	1,29	1,00
untere Bande	181521,59	210865,50	292415,50	90879,00
	1,00	1,16	1,61	0,50

Tabellen der Quantifizierung von Nidogen-1:

Die oberen dargestellten Werte stellen jeweils die Pixel der Banden dar. Darunter die relative Expression bezogen auf den Wildtyp (=1,0). Für die relative Expression der Banden wurden die Pixelwerte jeder einzelnen Probe durch den Pixelwert der Wildtyp-Bande dividiert.

Um das Ergebnis weiterhin quantifizieren zu können, wurde die Lokalisation und die Menge des Nid-1 mit der elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie genauer untersucht.

3.3 Auswertung der Aufnahmen der Elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie von Nidogen-1

Die genaue Lokalisation von Nid-1 und Unterschiede zwischen der mesangialen Matrix, BM und Bowmann`schen Kapsel können dank ultrastruktureller Immunogoldhistochemie qualitativ untersucht werden, was im Western Blot nicht möglich ist. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht auch kleine Veränderungen klar darzustellen und dementsprechend zu beurteilen. Veränderungen in der Menge von Nid-1 oder in der Lokalisation können Hinweise auf mögliche zusätzliche Funktionen des Proteins und/oder Interaktionen von Zellen geben.

In Abbildung 11 sind die elektronenmikroskopischen Bilder der Wildtyp, Einzel- und Doppelheterozygoten Pod/Col IV-Mäuse, 60 Tage und 180 Tage alt, aufgeführt. Auf Seite 73 ist eine Negativkontrolle von WT 60T aufgeführt.

Die Unterschiede zwischen gesunder GBM (WT) und aufgesplitterter GBM mit Glomerulosklerose und vergrößerten, verschmolzenen Podozyten beim Alport-Syndrom (-/-) sind deutlich auf den elektronenmikroskopischen Bildern erkennbar. Es herrscht ein dichtes Nebeneinander von dünnen und dicken glomerulären Basalmembran-Abschnitten. Auch der Verlust der Schlitzmembran ist eindeutig sichtbar. Nid-1 ist beim Alport-Syndrom vermehrt in den Verdickungen der GBM und vermehrt in der mesangialen Matrix lokalisiert.

Während sich Nid-1 (gekoppelt an 20 nm Gold) bei den 60T-Genotypen und WT 180T vereinzelt auf der GBM angesiedelt hat, ist es beim Alport-Syndrom und Pod/Col IV 180T stark vertreten.

Die Ausdünnung der GBM ist bei dem elektronenmikroskopischen Bild von Pod/Col IV 60T und 180T an einigen Stellen erkennbar.

Die verdünnte GBM ist ein Symptom des frühen Alport-Syndroms oder der TBMN.

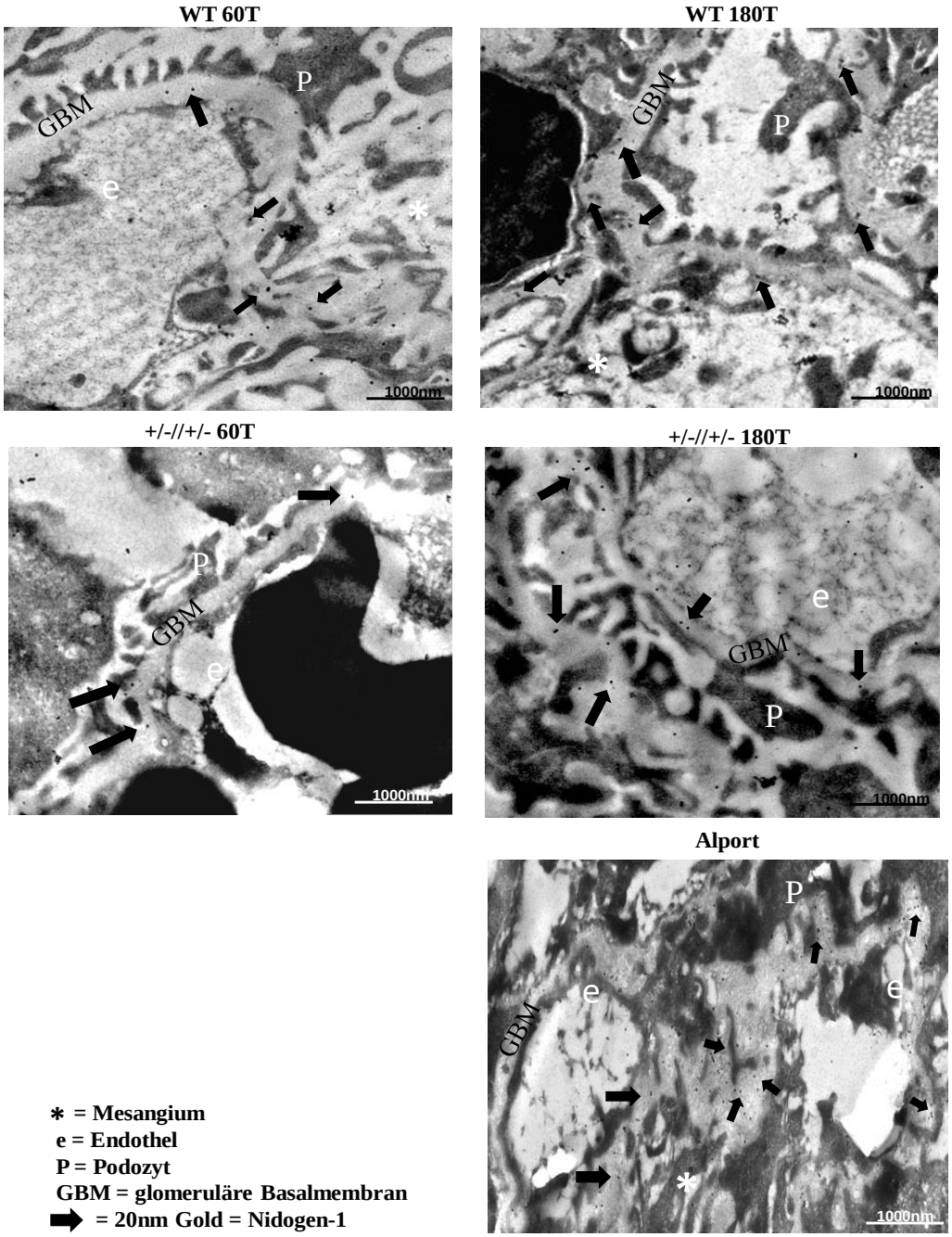


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Bilder der Immunogoldhistochemie

Statistische Auswertung der Immunogoldhistochemie

Erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms „SAS“ und Unterstützung von Herrn Albert Rosenberger aus der Abteilung Genetische Epidemiologie Göttingen.

Begriffserklärungen sind dem Glossar (s. Punkt 7, Seite 75) zu entnehmen.

Design:

Untersucht wurde die Anzahl der Kugeln (=Nidogen-1 an 20 nm Gold gekoppelt) je Glomerulus der Nierenkörperchen in n=14 Mäusen mit unterschiedlichen Genotypen (Alport Col IV -/- 60T, +/-//+/- 180T, +/-//+/- 60T, WT 180T und WT 60T). Je Maus wurden bis zu 4 Glomeruli in elektronenmikroskopischen Bildern abgebildet und vermessen. Die Zählung der Kugeln je Glomerulus erfolgte in verschieden, sich nicht überlappenden Abschnitten dieser Bilder entlang der Zellmembran. Die Länge der sichtbaren Zellmembran kann zwischen den Abschnitten variieren. Als Zielgröße wurde daher die auf eine Referenzlänge L von je 1000 Pixel standardisierte Anzahl Kugeln (K/L) gewählt. Die Gesamtzahl der ausgemessen elektronenmikroskopischen Bilder beläuft sich auf n=428. Die Messung der Basalmembranlänge und Auszählung der Kugeln erfolgten mit Hilfe vom Programm ImageJ.

Qualitätskontrolle (QC):

Die erhobenen Daten wurden auf Erfassungsfehler durch Plotten der Verteilung der K/L, bzw. des Logarithmus ln (K/L), je Abschnitt und Maus sowohl visuell als auch mit der statistischen Kennzahl COOKs D (Kriterium D>4/n) geprüft (Der und Everitt 2006). Die erfassten Werte von Ausreißern wurden mit dem Laborprotokoll verglichen und ggf. korrigiert.

Statistisches Modell:

Unterschiede in der zu erwartenden Anzahl Kugeln (K/L) wurden mit einem gemischten, linearen Modell statistisch getestet, wobei der Glomerulus als „random effect“ berücksichtigt wurde (Maxwell und Delaney 2004).

Die Varianz der Beobachtungen wurde je Maus im Modell geschätzt. Als Zielgröße wurde ln (K/L) gewählt, um der Annahme normalverteilter Residuen bestmöglich zu entsprechen. Unterschiede zwischen den Genotypen wurden im Sinne eines t-Tests geprüft, wobei die erzielten p-Werte für multiples Testen gemäß der studentisierten Rang-Prozedur nach Tukey-Kramer (HSD-Methode) korrigiert wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf α=5%

festgelegt. Das Signifikanzniveau α=5% spiegelt somit den kritischen Wert für die Schwellenhöhe wider (dies entspricht einer maximal zulässigen „Irrtumswahrscheinlichkeit“).

Bei der QC fielen einige Abschnitte mit hoher Variabilität (relative zu den meisten anderen Abschnitten) auf. Da diese die Schätzung der Messwert-Varianzen stark beeinflussen kann, wurde eine durch Bootstrapping robuste Modellbildung durchgeführt (Davison und Hinkley 1999).

Dabei wurden r=5.000 bzw. 10.000 Bootstrap-Stichproben aus den erhoben Daten, gemäß Ziehen mit Zurücklegen, generiert. Das oben beschriebene Modell wurde an jede dieser Bootstrap-Stichproben angepasst. Die robusten p-Werte je Gruppenvergleich wurden als mittlerer p-Wert aller 5.000 Modellanpassungen ermittelt. Die Punktschätzer und die 95%-Konfidenzintervalle der erwarteten K/L je Genotyp wurden aus der Verteilung der entsprechenden Punktschätzer ermittelt.

Geschätzte Erwartungswerte je Gruppe

Genotyp	Bootstrapping*			Original-Daten		
	Mittel	95%-CI	s.e.	Mittel	95%-CI	s.e.
Alport 60T (-/-)	**2,21**	(2,09-2,33)	0,061	2,05	(1,83- 2,28)	0,113
WT 180T	1,89	(1,79-1,99)	0,050	2,05	(1,86- 2,25)	0,100
Pod/Col IV 180T	1,29	(1,09-1,47)	0,098	0,64	(0,32- 0,96)	0,163
Pod/Col IV 60T	0,71	(0,55-0,92)	0,094	1,10	(0,73- 1,46)	0,184
WT 60T	0,42	(0,28-0,58)	0,073	0,07	(-0,11- 0,25)	0,092

* bei 10.000 Replikationen

Mittel = arithmetisches Mittel

95%-CI = 95% Erwartungsbereich/Vertrauensbereich (95% confidence interval)

s.e. = Standardfehler (standard error)

Für Alport dürfen 2,21 Kugeln je 1000 Pixel (95%-CI: 2,09-2,33) erwartet werden. Dies unterschiedet sich signifikant von den Genotypen Pod/Col IV 60T (+/-//+/-) und WT 60T mit weniger als 0,75 Kugeln je 1000 Pixel (alle p-Werte <0,001).

Signifikanz: globaler Test

p-Wert (Globaler Test)	
Bootstrapping*	Original-Daten
<,0001	<,0001

* bei 10.000 Replikationen

Mit dem globalen Test (F-Test) wurde ermittelt, ob sich die zu erwartende Anzahl Kugeln/Länge (K/L) im Generellen zwischen den Genotypen unterscheidet.

Signifikanz der Gruppenvergleiche (adj. für multiples Testen nach Dunnett)

Genotyp	verglichen mit	adjustierte p-Werte	
		Bootstrapping*	Original-Daten
WT 180T	Alport 60T (-/-)	0,4774	1,0000
Pod/Col IV 180T	Alport 60T (-/-)	0,1291	<,0001
Pod/Col IV 60T	Alport 60T (-/-)	0,0064	<,0001
WT 60T	Alport 60T (-/-)	<,0001	<,0001

* bei 10.000 Replikationen

Adjustiert für multiples Testen wurde gemäß Dunnett (Vergleich gegen Alport 60T)

Im obigen Gruppenvergleich wurde ermittelt, ob sich die zu erwartende Anzahl Kugeln (K/L) zwischen den einzelnen Genotypen und Alport 60T (Col IV -/-) unterscheiden. Für multiples Testen wurde gemäß Dunnett korrigiert.

Für Alport dürfen 2,21 Kugeln je 1000 Pixel (95%-CI: 2,09-2,33) erwartet werden. Dies unterschiedet sich signifikant von den Genotypen Pod/Col IV 60T (+/-//+/-) und WT 60T mit weniger als 0,75 Kugeln je 1000 Pixel (alle p-Werte <0,001). Daraus kann geschlossen werden, dass sich bei Alport 60T (Col IV -/-) 3 bis 5-mal mehr Kugeln auf der Basalmembran ansiedeln, im Vergleich zu beiden 60-Tage-Genotypen. Für den Genotyp Pod/Col IV 180T (+/-//+/-) dürfen 1,29 Kugeln je 1000 Pixel, für WT 180T dürfen 1,89 Kugeln je 1000 Pixel erwartet werden. Auf Basis der gegebenen Stichprobe kann dies jedoch nicht von Alport 60T (Col IV -/-) signifikant unterschieden werden.

Signifikanz der Gruppenvergleiche (adj. für multiples Testen nach Tukey-Kramer)

Genotyp	verglichen mit	adjustierte p-Werte	
		Bootstrapping*	Original-Daten
WT 180T	Alport 60T (-/-)	0,5926	1,0000
Pod/Col IV 180T	Alport 60T (-/-)	0,2069	<,0001
Pod/Col IV 60T	Alport 60T (-/-)	0,0131	0,0001
WT 60T	Alport 60T (-/-)	<,0001	<,0001
Pod/Col IV 180T	WT 180T	0,5900	<,0001
Pod/Col IV 60T	WT 180T	0,0694	<,0001
WT 60T	WT 180T	0,0002	<,0001
Pod/Col IV 60T	Pod/ColIV 180T	0,8101	0,3505
WT 60T	Pod/ColIV 180T	0,3344	0,0181
Pod/Col IV 60T	WT 60T	0,9412	<,0001

* bei 5.000 Replikationen

Adjustiert für multiples Testen wurde gemäß Tukey-Kramer (paarweise Vergleiche der Genotypen)

Im obigen Gruppenvergleich wurde ermittelt, ob sich die zu erwartende Anzahl Kugeln (K/L) zwischen den Genotypen untereinander unterscheiden. Für multiples Testen wurde gemäß Tukey-Kramer korrigiert.

Die signifikanten Unterschiede in der Anzahl Kugeln je 1000 Pixel zwischen Pod/Col IV 60T sowie WT 60T und Alport 60T (Col IV -/-) bleiben auch nach Korrektur für multiples Testen eines jeder-mit-jedem-Vergleichs bestehen. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen WT 60T und WT 180T nachgewiesen werden (p=0,0002).

3.4 PCR-Ergebnisse

Die Expression von Nid-1 wurde auf mRNA-Ebene mittels real-time PCR untersucht. Dafür wurden isolierte Glomeruli genommen, um die Ergebnisse genauer quantifizieren zu können.

Im folgenden sind die Dissoziations-Kurve (s. Abb. 12), das PCR-Diagramm (s. Abb. 13) und die dazugehörigen aufgelisteten Signifikanzen(***) (s. Seite 61) aufgeführt. Mit Hilfe des Progamms GraphPad konnten die Ergebnisse ausgewertet werden.

Amplifications Plots & Dissociation Curve

Dissociation Curve

Nidogen – 1 60°C

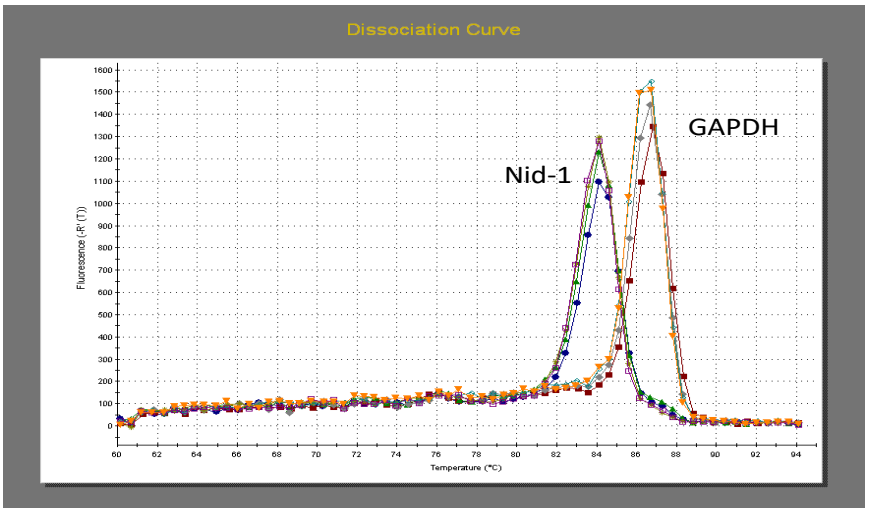


Abbildung 12: Die Dissoziations-Kurve zeigt die spezifische Expression von Nidogen-1. GAPDH wurde als House-keeping-Gen (Kontroll-Gen) verwendet, da es sich stabil exprimierte in unseren Versuchen.

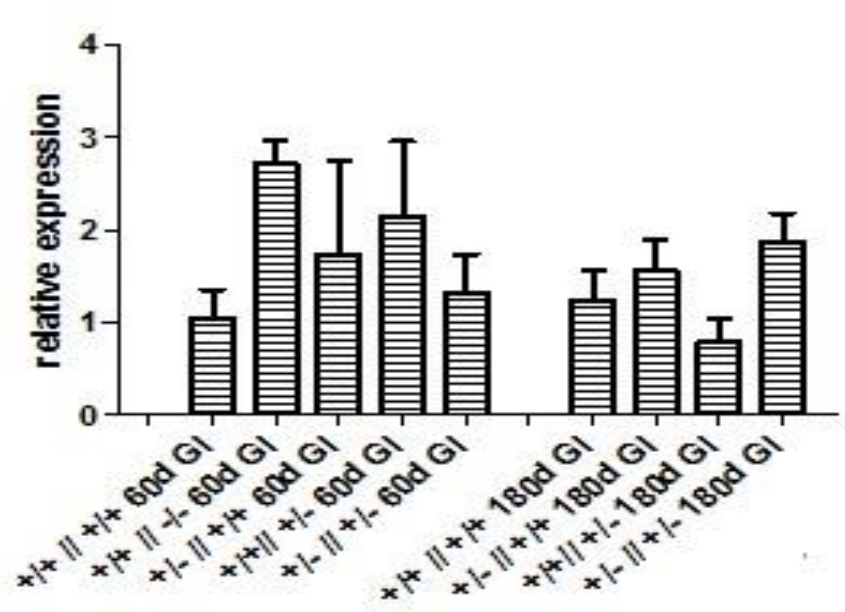


Abbildung 13: PCR-Diagramm Podocin/Kollagen IV

Alle Genotypen versus WT 60T (Glomeruli). Die Nid-1-Expression beim Alport-Syndrom ist am höchsten. Am deutlichsten ist der Unterschied zum WT 60T, wo die Expression des Nid-1 am geringsten war.

Glomeruli

	Signifikanz
+/+ // +/+ 60d Gl vs +/+ // -/- 60d Gl ↑	***
+/+ // +/+ 60d Gl vs +/+// +/- 60d Gl ↑	***
+/+ // +/+ 60d Gl vs +/- // +/+ 60d Gl ↑	***
+/+ // +/+ 60d Gl vs +/- // +/- 180d Gl ↑	***
+/+ // +/+ 60d Gl vs +/- // +/+ 180d Gl ↑	*

+/- // +/- 60d Gl vs +/+ // -/- 60d Gl ↑	***
+/- // +/- 60d Gl vs +/+// +/- 60d Gl ↑	***
+/- // +/- 60d Gl vs +/- // +/- 180d Gl ↑	**
+/- // +/- 60d Gl vs +/- // +/+ 60d Gl ↑	*

+/- // +/+ 60d Gl vs +/+ // -/- 60d Gl ↑	***

+/+// +/- 60d Gl vs +/+ // -/- 60d Gl ↑	**

+/+ // +/+ 180d Gl vs +/+ // -/- 60d Gl ↑	***
+/+ // +/+ 180d Gl vs +/+// +/- 60d Gl ↑	***
+/+ // +/+ 180d Gl vs +/- // +/- 180d Gl ↑	**
+/+ // +/+ 180d Gl vs +/- // +/+ 60d Gl ↑	*

+/- // +/- 180d Gl vs +/+ // -/- 60d Gl ↑	***

Tubuli

Wildtyp 60T vs. Alport 60T

+/+ // +/+ 60d Tu vs +/+ // -/- 60d Gl ↑	***

*** Signifikanz (p-Wert < 0,05)

In den Tabellen (s. Seite 63) sind die Ergebnisse der PCR aufgeführt mit den jeweiligen Mittelwerten und Standardabweichungen. Aus den Mittelwerten und den Standardabweichungen sind die Unterschiede und Signifikanzen (***) zwischen den Genotypen ersichtlich.

Somit konnte festgestellt werden, dass die Nid-1-Expression beim Alport-Syndrom am höchsten ist, gefolgt vom Genotyp Pod/Col IV (+/-//+/-) 180T. Der Mittelwert beim Alport-Syndrom liegt bei 2,71. Verglichen mit dem Genotyp Pod/Col IV 60T wurde Nid-1 um die Hälfte weniger exprimiert. Der Mittelwert liegt hier bei 1,33. Am deutlichsten ist der Unterschied zum WT 60T, wo die Expression des Nid-1 am geringsten war.

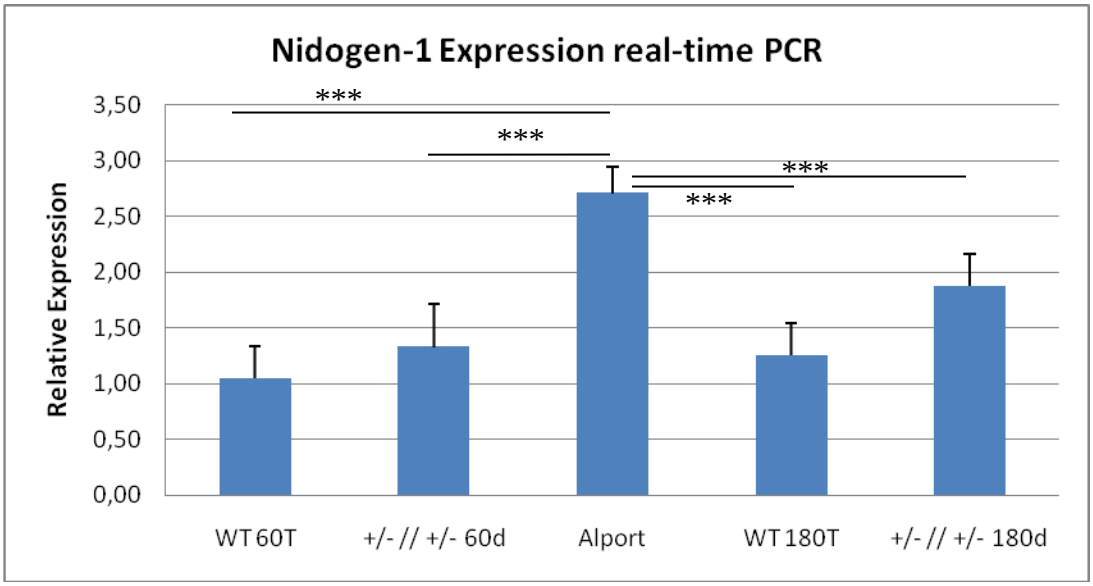
Protein Nidogen-1 **Genotyp verglichen mit:**

Nidogen-1	Pod/Col IV +/-//+/- **60T**	Pod/Col IV +/+//-/- **(Alport 60T)**
Mittelwert	1,33	2,71
Std-Abw.	0,38764662	0,23938775

Nidogen-1	Pod/Col IV +/+//+/+ **(WT 60T)**	Pod/Col IV +/+//-/- **(Alport 60T)**
Mittelwert	1,04	2,71
Std-Abw.	0,29164025	0,23938775

Nidogen-1	Pod/Col IV +/+//+/+ **(WT 60T)**	Pod/Col IV +/+//+/+ **(WT 180T)**
Mittelwert	1,04	1,25
Std-Abw.	0,29164025	0,29648777

PCR-Ergebnisse: Aufgeführt sind die PCR-Ergebnisse mit den jeweiligen Mittelwerten und Standardabweichungen. Die Nid-1-Expression ist beim Alport-Syndrom am höchsten. Der größte Unterschied ist zum WT 60T, wo die Expression am geringsten war.



*** Signifikanz zwischen zwei Genotypen

Aufgeführt ist die Nid-1-Expression der entsprechenden Genotypen. Signifikant erhöhte Werte zeigen sich bei Alport 60T und +/-//+/- 180T. Der größte Unterschied ist wieder zwischen Alport 60T und WT 60T zu verzeichnen.

4. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob es, wie vermutet, eine Verbindung zwischen der glomerulären Basalmembran (GBM) und der Schlitzmembran (SD) gibt, welche die Podozyten-Struktur beeinflusst und bei gleichzeitigem Auftreten von GBM/SD-Mutationen früher zum Nierenversagen führt. Nidogen-1 sollte eine Schlüsselrolle spielen, da es eine wichtige stabilisierende Funktion in der GBM übernimmt. Dieses wurde an Wildtyp-, Einzel- und doppelheterozygoten Kollagen IV/Podocin-Mäusen auf mRNA- (mittels real-time qPCR) und Proteinebene (mittels Western Blot) untersucht. Mit Hilfe von ultrastruktureller Immunogoldhistochemie wurde die genaue Lokalisation und Quantifizierung von Nid-1 durchgeführt.

4.1 Verwendetes Mausmodell für Fragestellung

Für die vorliegende Arbeit wurden heterozygote Nphs2$^{+/R140Q}$-Mäuse aus 129 Sv/Pas-Hintergrund mit heterozygoten COL4A3$^{+/-}$-Mäusen aus 129 Sv/J-Hintergrund gekreuzt. Das verwendete Mausmodell sollte als Möglichkeit dienen, die Fragestellung über die Rolle von Nid-1 bei podozytären Erkrankungen der Niere zu beantworten. Das Mausmodell wurde gewählt, da es ein geeignetes Modell darstellt, die gewünschten nephrologischen Strukturen genauer zu untersuchen. Zudem konnte Nid-1 somit näher betrachtet werden.

4.2 Grenzen, Schwächen und Stärken der Methodik

Eine kritische Auseinandersetzung mit der durchgeführten Methodik ist wichtig, um die Ergebnisse bewerten und beurteilen zu können.

Somit ist es nicht hundertprozentig auszuschließen, dass Fehler und ungenaues Arbeiten in der Durchführung der einzelnen etablierten Methoden zu falschen Ergebnissen geführt haben könnten. Daher war es u.a. unerlässlich, auch Negativkontrollen wie bei der Immunfluoreszenz oder der Immunogoldhistochemie mitlaufen zu lassen, um die Qualität der Methode zu überprüfen und Fehler der eigenen Arbeit auszuschließen.

Für die statistische Auswertung der Immunogoldhistochemie wurden die Anzahl der Kugeln (=Nidogen-1 an 20 nm Gold gekoppelt) je Glomerulus der Nierenkörperchen in n=14 Mäusen mit den unterschiedlichen Genotypen (Alport 60T Col IV -/-, +/-//+/- 180T, +/-//+/- 60T, WT 180T und WT 60T) untersucht. Je Maus wurden bis zu 4 Glomeruli vermessen und die Messung je Glomerulus erfolgte in verschiedenen Abschnitten, um statistische Werte zu

erhalten. Die Gesamtzahl der ausgemessen elektronenmikroskopischen Bilder belief sich auf n=428. Die Messung der Basalmembranlänge und Auszählung der Kugeln erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ. Eine Erhöhung oder Verringerung der Fallzahl hätte unter Umständen zu anderen Ergebnissen führen können. Die Fallzahl in der vorliegenden Arbeit schien jedoch als absolut ausreichend, um repräsentative statistische Ergebnisse zu erhalten. Mit Hilfe einer Qualitätskontrolle wurden die erhobenen Daten nach Ausreißern geprüft und mit dem Laborprotokoll verglichen und ggf. korrigiert. Das verwendete Programm ImageJ ist ein Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm, welches vielfach für medizinische und wissenschaftliche Bildanalyse benutzt wird.

Die Untersuchungen mittels Western Blot und real-time PCR wurden an isolierten Glomeruli vorgenommen, weil Analysen aus den Tubuli nicht detailliert genug sind, da die BM-Komponenten auch im Tubulointerstitium vorkommen. Um die Struktur der Glomeruli zu erhalten, war es sinnvoll, diese direkt nach der Isolation zu verwenden.

Die Stärken und Schwerpunkte dieser Arbeit liegen im Bereich der Immunogoldhistochemie und der real-time PCR. Die weiteren zahlreich zur Vefügung stehenden Methoden mussten zusätzlich genutzt und ausgeschöpft werden, um die Ergebnisse verdeutlichen und verstärken zu können. Die Immunfluoreszenz bot die hervorragende Möglichkeit die Verteilung von Nidogen-1 genauer zu untersuchen. Nicht nur die Quantität, sondern auch die Verteilung und Lokalisation von BM-Komponenten spielt eine essentielle Rolle für die Funktionalität der GBM und die sie umgebenden Strukturen. Besonders die Immunogold-Technik und die Immunfluoreszenz für Kryo-LM-Schnitte sind mit einem höchst technischen Aufwand verbunden, um auch eine geeignete Bildgebung zu bekommen. Daher sind die Ergebnisse und die Bilder dieser Methoden besonders repräsentativ. Auch der durchgeführte Western Blot war sinnvoll, um zu beurteilen, ob es quantitative Unterschiede in der Proteinmenge von Nidogen-1 gab.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Bedeutung der glomerulären Basalmembrankomponente Niogen-1 bei podozytären Erkrankungen der Niere. Unterstützend durch die zahlreichen Methoden konnte die Vermutung bestärkt werden, dass Nidogen-1 bei podozytären Erkrankungen eine Schlüsselrolle einnimmt.

4.3 Bewertung der Immunfluoreszenz-Ergebnisse

In der Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz dargestellt, die die Nid-1-Färbung, die Nephrin-Färbung und die Immunfluoreszenzdoppelfärbung beinhalten.

Nid-1 und Nephrin sind beim WT 60T und bei Pod/Col IV 60T vermehrt in der Basalmembran lokalisiert. Auffällig ist, dass sich die Lokalisation der Proteine von der Basalmembran ins Mesangium bei WT 180T und Pod/Col IV 180T verändert. Dies scheint vor allem mit dem Alter der Mäuse und der jeweiligen „Aufgabe“ der Proteine zusammenzuhängen. Nephrin, welches ein Zell-Adhäsiosmolekül darstellt (Kestila et al. 1998), wird hauptsächlich in den Podozyten und nahe der Schlitzmembran exprimiert (Ruotsalainen et al. 1999). Mit voranschreitendem Alter könnte Nephrin beim WT als ein „Stabilisierungsprotein“ im Mesangium fungieren, wie auch Nid-1. Tubulär waren keine Unterschiede sichtbar.

Die größten Unterschiede sind sichtbar beim Alport-Syndrom (Col IV -/-) zu allen Genotypen. Nid-1 ist beim Alport-Syndrom in der BM stark vermehrt, was bestätigen könnte, dass Nid-1 als Stabilisierungsprotein der Basalmembranarchitektur fungiert (Aumailley et al. 1993) sowie als Reparaturprotein oder Verknüpfungsprotein. Mesangial und tubulär ist Nid-1 nicht vorhanden.

Nephrin ist eher mesangial und tubulär bei COL4A3 -/- Mäusen mit Alport-Syndrom vorhanden, kaum auf der Basalmembran. Das zeigt, dass Nephrin im Mesangium tatsächlich als „Stabilisierungsprotein“ fungieren könnte.

4.4 Analyse des Western Blots

Um zu beurteilen, ob es quantitative Unterschiede in der Proteinmenge von Nid-1 gibt, wurde der Western Blot durchgeführt. Wie in Abbildung 10a+b ersichtlich ist, gab es keine quantitativen Unterschiede in der Proteinmenge von Nid-1 beim Western Blot. Das könnte daran liegen, dass die Proteinmenge gleich war aber eventuell eine andere Verteilung vorlag oder dass der Western Blot unter Umständen zu ungenau durchgeführt wurde.

In beiden Gelen waren die Nid-1-Fragmente bei 130 kDa. Nidogen-1 wird in der Literatur als 148 kDa schwer beschrieben (Carlin et al. 1981). Des Weiteren zeigte das Gel bei 50 kDa ß-Aktin-Banden.

Um das Ergebnis weiterhin quantifizieren zu können, wurde die Lokalisation und die Menge des Nid-1 mit der elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie genauer untersucht. Das Ergebnis der Immunogoldhistochemie wird im folgenden Punkt diskutiert.

4.5 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Nid-1

Anhand der elektronenmikroskopischen Bilder und der statistischen Auswertung der Immunogoldhistochemie von Nid-1 lässt sich zeigen, dass es signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Genotypen gibt in Bezug auf die Anreicherung des Nid-1 im Verhältnis zur GBM-Länge (K/L).

Wie im Ergebnisteil aufgeführt (s. Seite 56), dürfen beim Alport-Syndrom (Col IV -/-) 2,21 Kugeln je 1000 Pixel (95%-CI: 2,09-2,33) erwartet werden. Dies unterscheidet sich signifikant von den Genotypen Pod/Col IV 60T und WT 60T mit weniger als 0,75 Kugeln je 1000 Pixel (alle p-Werte <0,001). Daraus kann geschlossen werden, dass sich beim Alport-Syndrom (Col IV -/-) 3 bis 5-mal mehr Kugeln auf der Basalmembran ansiedeln, im Vergleich zu beiden 60-Tage-Genotypen. Für den Genotyp Pod/Col IV(+/-//+/-) 180T dürfen 1,29 Kugeln je 1000 Pixel und für WT 180T dürfen 1,89 Kugeln je 1000 Pixel erwartet werden. Auf Basis der gegebenen Stichprobe kann dies jedoch nicht vom Alport-Syndrom (Col IV -/-) signifikant unterschieden werden.

Wie auch auf den elektronenmikroskopischen Bildern ersichtlich ist, lagert sich Nid-1 verstärkt bei den Genotypen Col IV -/- und Pod/Col IV 180T an. Die verbreiterte, aufgesplitterte GBM mit verdickten Podozyten (s. Abb. 11) ist ein typisches Bild des Alport-Syndroms (Kashtan et al. 1994; Gubler et al. 1981).

Es scheint also einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Maus, d.h. auch zunehmende Beschädigung der GBM beim Alport-Syndrom (s. Abb. 11) und der Nid-1-Expression auf der GBM zu geben. Je älter die Maus und je „kranker“ die Maus, desto mehr lagert sich Nid-1 auf der GBM an. Dies bestätigt die Vermutung, dass sich Nid-1 als Regenerationsprotein vermehrt anreichert bei zunehmender Beschädigung der GBM.

Kruegel et al. (2008) stellten die Hypothese auf, dass Nid-1 in den späten Stadien der Osteoarthritis (OA) den Chondrozyten helfe, die Knorpelintegrität wiederherzustellen und somit Nid-1 eine wichtige Schlüsselrolle in der Pathogenese der OA spiele. Da Nid-1 die Fähigkeit besitzt, dreifach Komplexe mit Laminin und Kollagen IV zu bilden (s. Abb. 4), als auch andere Komponenten der Basalmembran miteinander zu verknüpfen, scheint es sehr wahrscheinlich, dass Nid-1 als Linkprotein fungiert (Kramer 2005) und die Basalmembranarchitektur auf supramolekularer Ebene stabilisiert (Aumailley et al. 1993). Dieser Stabilisierungsversuch einer geschädigten GBM bei glomerulären Erkrankungen durch Nid-1 könnte von großer Bedeutung sein. Suh und Miner (2013) hingegen haben beschrieben, dass es keine definitiven Beweise gäbe, dass Nid-1 allein für die Stabilität und Barriereeigenschaften der GBM verantwortlich wäre.

Des Weiteren kann es in diesem Zusammenhang von Wichtigkeit sein, dass Nid-1 über ß1-Integrine mit Podozyten interagieren kann (Salmivirta et al. 2002). Das lässt vermuten, dass Nid-1 glomeruläre Zellen beeinflussen könnte.

4.6 Beurteilung der PCR-Ergebnisse

Die real-time PCR wurde durchgeführt, um die Ergebnisse der Proteinebene (Western Blot) auch auf mRNA-Ebene weiter untersuchen, beurteilen und quantifizieren zu können.

Die PCR-Ergebnisse (s. Punkt 3.4, Seite 60) decken sich mit den Ergebnissen der Immunogoldhistochemie. Die Expression des Nid-1 bei Pod/Col IV 180T und dem Alport-Syndrom ist im Verhältnis zu den anderen Genotypen signifikant erhöht.

So lagen die Mittelwerte bei Pod/Col IV 60T bei 1,33 und beim Alport-Syndrom (-/-) bei 2,71. Die Signifikanz ist dementsprechend hoch beim Alport-Syndrom. Des Weiteren lag der Mittelwert beim WT 60T bei 1,04 und beim Alport-Syndrom wie bereits erwähnt bei 2,71.

Diese Unterschiede vom gesunden zum kranken Genotyp lassen wieder darauf schließen, dass Nid-1 verstärkt exprimiert wird, um möglicherweise die gestörte Struktur der GBM zu stabilisieren und aufrecht zu erhalten (Aumailley et al. 1993).

Im Vergleich von Alport-Syndrom (-/-) zu WT 180T und Pod/Col IV (+/-//+/-) 180T ist ebenfalls eine Signifikanz zu verzeichnen, jedoch kann man sagen, dass die Expression von Nid-1 im Allgemeinen am höchsten beim Alport-Syndrom und bei Pod/Col IV 180T ist. Das bekräftigt die Vermutung, dass das Alter der Mäuse und die zunehmende Destruktion der GBM eine große Rolle spielen mit der damit verbundenen erhöhten Nid-1 – Expression.

5. Zusammenfassung

Die Basalmembrankomposition der Glomeruli stellt einen wichtigen Faktor in der Pathogenese vieler Nierenerkrankungen dar. Das Verständnis der Interaktionen der BM-Komponenten und der Pathogenese von glomerulären Nierenerkrankungen könnten zu neuen Therapieansätzen führen.

Essentielle Bestandteile der Filtrationsbarriere der Niere sind die GBM und die Schlitzmembran. Nach unserer Hypothese besteht eine Verbindung zwischen der glomerulären Basalmembran und der Schlitzmembran. Diese Verbindung könnte die Podozyten-Struktur beeinflussen und bei einem gleichzeitigen Auftreten von GBM/SD–Mutationen glomeruläre Nierenerkrankungen negativ beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob diese Mutationen früher zum Nierenversagen führen. Dies wurde durch Untersuchungen von doppelt-heterozygoten COL4A3$^{+/-}$(GBM) / Nphs2$^{+/R140Q}$ (SD)-Mäusen am Tiermodell überprüft. Hierbei sollte die Zusammensetzung der GBM untersucht werden, da diese essentiell für die Funktion von Zellen im Glomerulum und die Stabilität der GBM ist.

Nidogen-1 (Nid-1) nimmt nach unserer Hypothese eine zentrale Rolle ein, da es eine wichtige stabilisierende Funktion in der GBM übernimmt. Besonders für Kollagen IV und Laminin dient Nid-1 zur Vernetzung und Stabilisierung. Es wurde als Linkprotein zwischen diesen beiden Proteinen beschrieben (Kramer 2005), weshalb gerade in Bezug auf die Kollagen-IV-Erkrankung Alport-Syndrom ein funktioneller Einfluss des Nidogen-1 vermutet werden kann, da sich die BM-Proteine in ihrer Zusammensetzung gegenseitig beeinflussen können. Auch wäre funktionell ein möglicher Link zwischen BM und SD möglich. Mittels ultrastruktureller Immunogoldhistochemie und Immunfluoreszenz wurde die genaue Lokalisation des Proteins und Quantifizierung von Nid-1 in der GBM durchgeführt. Insbesondere bei der elektronenmikroskopischen Immunogoldhistochemie konnte Nid-1 sehr genau untersucht werden in Bezug auf die Lokalisation. Die Ergebnisse zeigen, dass Nid-1 stark exprimiert wird bei den Genotypen Col IV -/- und Pod/Col IV (+/-//+/-) 180T. Die Unterschiede zwischen gesunder GBM (WT) und aufgesplitterter GBM mit Glomerulosklerose und vergrößerten, verschmolzenen Podozyten beim Alport-Syndrom (Col IV -/-) sind deutlich auf

den elektronenmikroskopischen Bildern (s. Seite 55) erkennbar. Es herrscht ein dichtes Nebeneinander von dünnen und dicken glomerulären Basalmembran-Abschnitten. Auch der Verlust der Schlitzmembran ist eindeutig sichtbar. Nid-1 ist beim Alport-Syndrom vermehrt in den Verdickungen der GBM und vermehrt in der mesangialen Matrix lokalisiert. Während sich Nid-1 (gekoppelt an 20 nm Gold) bei den 60T-Genotypen und WT 180T vereinzelt auf der GBM angesiedelt hat, ist es beim Alport-Syndrom und Pod/Col IV 180T stärker vertreten.

Diese unterschiedliche Verteilung und vermehrte Ausschüttung des Nidogen-1, gerade im Bereich der Aufsplitterungen bzw. mit fortschreitendem Alter der Pod/Col IV GBM, spricht für mögliche Regenerationsbemühungen, die GBM besser zu stabilisieren. Dies könnte durch eine vermehrte „Verlinkung“ von Laminin-111 mit dem noch vorhandenen Kollagen IV oder anderen GBM-Proteinen geschehen. Auch wäre ein möglicher frustraner Regenerationsversuch, welcher aufgrund der genetischen Erkrankung in einem Circulus vitiosus mündet, zu diskutieren. Des Weiteren kann es von Bedeutung sein, dass Nid-1 über ß1-Integrine mit Podozyten interagieren kann (Salmivirta et al. 2002). Das lässt vermuten, dass Nid-1 auch einen direkten Einfluss auf glomeruläre Zellen und somit auf das Fortschreiten oder die Regeneration von glomerulären Erkrankungen haben könnte. Dies bedeutet im weiteren Sinne eine Auswirkung auf die Podozyten-Struktur und eine Cytoskelettbeeinflussung. Eine quantitative sowie qualitative Änderung des Nidogen-1 hätte somit einen direkten Einfluss auf das Verhalten der Zellen im gesunden wie auch im erkrankten Milieu.

In weiteren zukünftigen Experimenten sollte die Funktionalität von Podozyten in vitro näher untersucht werden. Es wäre zu klären, ob sich Podozyten von der Differenzierung, Proliferation und Migration verändern, wenn sie mit Nid-1 interagieren. Das Wissen um die genaue Lokalisation und den funktionellen Einfluss von Nidogen-1 auf die GBM und deren Zellen könnte somit neue Therapieansätze bei glomerulären Erkrankungen ermöglichen.

6. Abbildungs– und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Säugerniere **8**

Abbildung 2: Glomerulärer Filter **9**

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Nid-1 **10**

Abbildung 4: Basalmembrankomponenten der adulten GBM **12**

Abbildung 5: Podocin-Nachweis mittels Immunogoldhistochemie **17**

Abbildung 6: GBM & Glomerulus **19**

Abbildung 7: Normale GBM (A) und verdünnte GBM (B) **20**

Abbildung 8a: PCR (COL4A3) **25**

Abbildung 8b: PCR (Nphs2) **25**

Abbildung 9: Immunfluoreszenz **49**

Abbildung 10a: Western Blot **51**

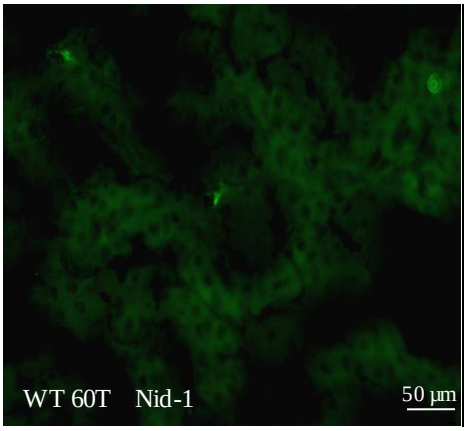
Abbildung 10b: Western Blot **52**

Abbildung 11: EM-Bilder der Immunogoldhistochemie **55**

Abbildung 12: Dissoziations-Kurve **60**

Abbildung 13: PCR-Diagramm Podocin / Kollagen IV **61**

Negativkontrollen Immunfluoreszenz für Kryo-LM-Schnitte **49**



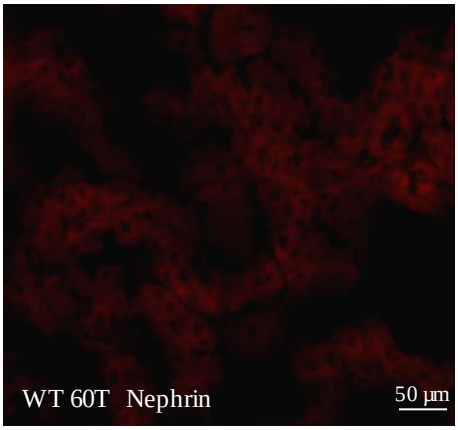
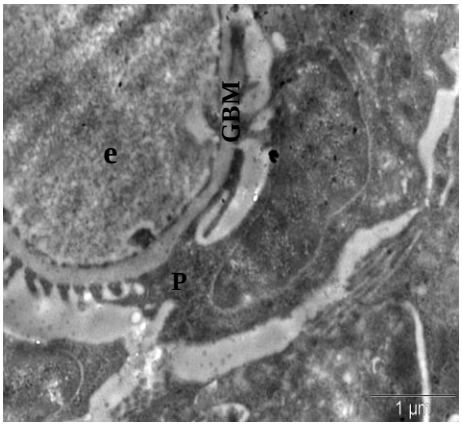


Abbildung: Negativkontrollen Immunfluoreszenz

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Die primären AK wurden dabei nicht mit aufgetragen, sondern nur das 1% PBS/BSA (pH 7,4) (40fache Vergrößerung).

Negativkontrolle elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Nid-1 **55**

WT 60T



GBM = glomeruläre Basalmembran
e = Endothel
P = Podozyt

Abbildung: Negativkontrolle der Immunogoldhistochemie

Für die Negativkontrolle wurde der primäre AK (Nid-1 1052) gegen 1% PBS/BSA (pH 7,4) ersetzt. Es ist keine spezifische Reaktion zu erkennen.

Tabelle 1: Diagnosekriterien für das Alport-Syndrom **19**

Tabelle 2: Elektronenmikroskopie

Genotyp	Alter (d)	Maus-Nr.	LR-GOLD
Nphs2 // COL IV WT	60	968	x
Nphs2 // COL IV WT	60	325	x
Nphs2 // COL IV WT	60	324	x
Col IV +/+//-/-	60	973	x
Col IV +/+//-/-	60	1038	x
Col IV +/+//-/-	60	1054	x
Pod// Col IV +/-//+/-	60	309	x
Pod // Col IV +/-//+/-	60	305	x
Pod // Col IV +/-//+/-	60	295	x
Pod// DDR 1 WT	180	61	x
Pod// DDR 1 WT	180	69	x
Pod// DDR 1 WT	180	79/73	x
Pod// Col IV +/-//+/-	180	340	x
Pod// Col IV +/-//+/-	180	4	x
Pod// Col IV +/-//+/-	180	19	x
Pod// Col IV +/-//+/-	180	20	x

7. Glossar

Adjustiert nach Dunnett → Vergleich gegen eine „Kontrolle“ (hier: Alport) / multipler Mittelwertvergleichstest

Adjustiert nach Tukey-Kramer (HSD-Methode) → Vergleich jeder-mit-jedem (alle Paarvergleiche). Die kleinste noch signifikante Differenz zwischen zwei Gruppenmittelwerten wird berechnet (HSD=Honest Significant Difference).

Adjustierter p-Wert → Der p-Wert ist eine Indikator, ob die Null-Hypothese eines statistischen Tests abgelehnt werden kann (p-Wert muss kleiner als das Signifikanzniveau α sein). Werden mehrere statistische Tests parallel durchgeführt, muss für dieses multiple Testen korrigiert werden; hierfür werden adjustierte p-Werte berechnet.

Bootstrapping → Ein Verfahren zur robusten Schätzung von Modellparametern sowie für robuste statistische Tests. Durch wiederholtes Ziehen mit Zurücklegen aus einem Datensatz werden neue Datensätze generiert. An jeden dieser Bootstrap-Datensätze wird das Auswertungsmodell angepasst. Die Punktschätzer der Parameter ergeben sich als mittlerer geschätzter Parameterwert (hier für K/L) über alle Bootstrap-Replikationen bzw. dessen Standardabweichung (s.e.: standard error). Die Intervallschätzer (95%-CI) ergeben sich aus der Verteilung der Bootstrap-Replikationen.

Boxplot → grafische Darstellung der Verteilung der erhobenen Zielgrößen (mit Streuungs- und Lagemaßen)

CI → Konfidenzintervall = Erwartungsbereich. Der Erwartungsbereich ist definiert als die Schwankungsbreite der Werte um den Mittelwert, die mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit in der Grundgesamtheit nicht überschritten wird. Dafür zieht man vom Mittelwert das 1,96-Fache von der Standardabweichung ab, um das untere Ende des Konfidenzintervalls zu bekommen. Für das obere Ende wird das 1,96-Fache der Standardabweichung addiert (1,96 ergibt sich aus dem Quantil (=Lagemaß) der Normalverteilung bei einem zweiseitigen Test zu einem Signifikanzniveau von 95%)

Replikationen → Anzahl der Bootstrap-Stichproben

8. Literaturverzeichnis

Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL (2009): Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. J Am Soc Nephrol 20, 1471-1479

Ackley BD, Kang SH, Crew JR, Suh C, Jin Y, Kramer JM (2003): The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in Caenorhabditis elegans. J Neurosci 23(9), 3577-3587

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

Antignac C (1995): Molecular genetics of basement membranes: The paradigm of Alport syndrome. Kidney Int Suppl 49, 29-33

Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J et al. (2002): Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. Am J Hum Genet 70(5): 1368-1375

Aumailley M, Battaglia C, Mayer U, Reinhardt D, Nischt R, Timpl R, Fox JW (1993): Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. Kidney Int 43(1), 7-12

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

Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K (1990): Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science 248, 1224-1227

Battaglia C, Mayer U, Aumailley M, Timpl R (1992): Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. Eur J Biochem 208(2), 359-366

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

Benzig T (2004): Signaling at the slit diaphragm. J Am Soc Nephrol 15, 1382-1391

Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C (2000): NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. Nat Genet 24, 349–354

Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J et al. (1994): A new nomenclature for the laminins. Matrix Biol 14, 209-211

Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE (1981): Entactin, a novel basal lamina-associated glycoprotein. J Biol Chem 256, 5209-5214

Cohen NA, Kaufmann WE, Worley PF, Rupp F (1997): Expression of agrin - in the developing and adult rat brain. Neuroscience 76, 581-596.

Cornish T, Chi J, Johnson S, Lu Y, Campanelli JT (1999): Globular domains of agrin are functional units that collaborate to induce acetylcholine receptor clustering. J Cell Sci 112, 1213-1223

Davison AC, Hinkley DV: Bootstrap methods and their application. Reprinted with corrections. Cambridge University Press, Cambridge 1999

Denzer AJ, Schulthess T, Fauser C, Schumacher B, Kammerer RA, Engel J, Ruegg MA (1998): Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. Embo J 17, 335-343

Der G, Everitt B: Statistical analysis of medical data using SAS. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton 2006

Dziadek M, Timpl R (1985): Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. Dev Bio 111, 372-382

Falo MC, Reeves TM, Phillips LL (2008): Agrin expression during synaptogenesis induced by traumatic brain injury. J Neurotrauma 25, 769-783

Farquhar MG, Lemkin MC, Stow JL (1985): Role of proteoglycans in glomerular function and pathology. Nephrology. Edited by RR Robinson. Springer-Verlag, New York, 580-590

Floege J, Kunter U, Weber M, Gross O (2006): Bone marrow transplantation rescues Alport mice. Nephrol Dial Transplant 21(10), 2721-2723

Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J (1991): Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. Embo J 10, 3137-3146

Gersdorff N, Müller M, Otto S, Poschadel R, Hubner S, Miosge N (2005): Basement membrane composition in the early mouse embryo day 7. Dev Dyn 233, 1140-1148

Gesemann M, Denzer AJ, Ruegg MA (1995): Acetylcholine Receptor-Aggregating Activity of Agrin Isoforms and Mapping of the Active-Site. J Cell Bio 128, 625-636

Gesemann M, Cavalli V, Denzer AJ, Brancaccio A, Schumacher B, Ruegg MA (1996): Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor. Neuron 16**,** 755-767

Groffen AJ, Ruegg MA, Dijkman H, van de Velden TJ, Buskens CA, van den Born J, Assmann KJ, Monnens LA, Veerkamp JH, van den Heuvel LP (1998a): Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. J Histochem Cytochem 46(1), 19-27

Groffen AJ, Buskens CAF, van Kuppevelt TH, Veerkamp JH, Monnens LAH, van den Heuvel LPWJ (1998b): Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. Eur J Biochem 254**,** 123-128

Gross O (2008): Hereditäre Erkrankungen der glomerulären Basalmembran. Facharzt Nephrologie, R. T., Editor. Elsevier: Tübingen, Karlsruhe. 7, 725-741

Gross O (2012): Alport-Syndrom und Syndrom der dünnen Basalmembran – Update 2012. Nephrologe 2012

Gross O, Weber M (2005): From the molecular genetics of Alport's syndrome to principles of organo-protection in chronic renal diseases. Med Klin (Munich) 100(12), 826-831

Gubler M, Levy M, Broyer M, Naizot C, Gonzales G, Perrin D, Habib R (1981): Alport`s syndrome. A report of 58 cases and a review of the literature. Am J Med 70(3), 493-505

Heidet L, Grubler MC (2009): The renal lesions of Alport syndrome. J Am Soc Nephrol 20, 1210-1215

Hohenester E, Yurchenco PD (2013): Laminins in basement membranes assembly. Cell Adh Migr 7(1), 56–63

Holthofer H, Ahola H, Solin ML, 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, 1681-1687

Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR (1999): Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. Kidney Int 56, 1481-1491

Hopf C, Hoch W (1996): Agrin binding to alpha-dystroglycan - Domains of agrin necessary to induce acetylcholine receptor clustering are overlapping but not identical to the alpha-dystroglycan-binding region. J Bio Chem 271**,** 5231-5236

Horn A, Wagner H: Krankheiten der Niere und ableitenden Harnwege. In: Wagner H, van Husen N (Hrsg.): Innere Medizin für Zahnmediziner. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1997, 97-128

Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T (2001): Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. J Biol Chem 276, 41543-41546

Hudson BG (2004): The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. J Am Soc Nephrol 15(10), 2514-27

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

Huttunen NP (1976): Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients. Arch Dis Child 51, 344-348

Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F et al. (2000): X-linked Alport syndrome: Natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. J Am Soc Nephrol 11, 649-657

Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F et al. (2003): X-linked Alport syndrome: Natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: A "European community Alport syndrome concerted action" study. J Am Soc Nephrol 14, 2603-2610

Jones G, Meier T, Lichtsteiner M, Witzemann V, Sakmann B, Brenner HR (1997): Induction by agrin of ectopic and functional postsynaptic-like membrane in innervated muscle. Proc Natl Acad Sci USA 94**,** 2654-2659

Kanwar YS, Liu ZZ, Kashihara N, Wallner EI (1991): Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. Semin Nephrol 11, 390-413

Kashtan CE, Michael A, Sibley R, Vernier R (1994): Hereditary Nephritis: Alport syndrome and Thin Glomerular Basement Membrane Disease, in Renal Pathology, J.B. Lippincot Company. 1239-1258

Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R et al. (1998): Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. Mol Cell 1, 575-582

Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG (2008): Mammalian collagen IV. Microsc Res Tech 71(5), 357-370

Kohfeldt E, Sasaki T, Göhring W, Timpl R (1998): Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. J Mol Biol 282(1), 99-109

Kramer JM (2005): Basement membranes. Worm Book 1, 1-5

Kruegel J, Sadowski B, Miosge N (2008): Nidogen-1 and Nidogen-2 in Healthy Human Cartilage and in Late-Stage Osteoarthritis Cartilage. Arthritis Rheum 58(5), 1422-32

Lang F, Kurtz A: Niere. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G (Hrsg.): Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Heidelberg 2005, 29. Auflage, 668-702

Li Z, Massengill JL, Odowd DK, Smith MA (1997): Agrin gene expression in mouse somatosensory cortical neurons during development in vivo and in cell culture. Neuroscience 79, 191-201

Liddington RC (2001): Mapping out the basement membrane. Nat Struc Biol 8(7), 573-574

Machuca E, Hummel A, Nevo F, Dantal J, Martinez F, Al-Sabban E, Baudouin V, Abel L, Grünfeld JP, Antignac C (2009): Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. Kidney Int 75(7), 727-735

Martin GR, Timpl R (1987): Laminin and other basement membrane components. Annu Rev Cell Biol 3, 57-85

Mayer U, Timpl R (1994): Nidogen. A versatile binding protein of basement membranes. In Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. Extracellular Matrix Assembly and Structure. San Diego, Academic Press, 389–416

Maxwell SE, Delaney HD: Designing experiments and analyzing data: a model comparison perspective. 2. Auflage; Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah 2004

Miner JH (2012): The glomerular basement membrane. Exp Cell Res 318(9), 973-978

Miner JH, Sanes JR (1994): Collagen IV α3, α4 and α5 chains in rodent basal laminae: Sequence, distribution, association with laminins and development switches. J Cell Biol 127, 879-891

Miosge N, Sasaki T, Timpl R (2002): Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. Matrix Biol 21, 611-621

Mokkapati S, Bechtel M, Reibetanz M, Miosge N, Nischt R (2012): Absence of the Basement Membrane Component Nidogen 2, but not of Nidogen 1, Results in Increased Lung Metastasis in Mice. J Histochem Cytochem 60(4), 280-289

Mollet G, Ratelade J, Boyer O, Muda AO, Morisset L, Lavin TA, Kitzis D, Dallman MJ, Bugeon L, Hubner N et al. (2009): Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. J Am Soc Nephrol 20, 2181–2189

Morath C, Ritz E, Adrassy K: Niere. In: Greten H, Rinninger F, Greten T (Hrsg.): Innere Medizin. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010, 13. Auflage, 276-323

Murshed M, Smyth N, Miosge N, Karolat J, Krieg T, Paulsson M, Nischt R. (2000): The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. Mol Cell Biol 20, 7007-7012

Netter FH: Innere Medizin. Thieme, Stuttgart 2001

Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR (1991): The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. J Biol Chem 266(34), 22939-22947

O`Connor LT, Lauterborn JC, Smith MA, Gall CM (1995): Expression of Agrin Messenger-Rna Is Altered Following Seizures in Adult-Rat Brain. Mol Brain Res 33, 277-287

Paulsson M, Yurchenco PD, Ruben GC, Engel J, Timpl R (1987): Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane. J Mol Biol 197, 297-313

Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2003): Cell biology of the glomerular podocyte. Physiol Rev 83, 253-307

Philippe A, Weber S, Esquivel EL, Houbron C, Hamard G, Ratelade J, Kriz W, Schaefer F, Gubler M-C, Antignac C (2008): A missense mutation in podocin leads to early and severe renal disease in mice. Kidney Int 73, 1038-1047

Pollak MR (2002): Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint. J Am Soc Nephrol 13, 3016–3023

Prabhu VG, Kozma C, Leftridge CA et al. (1998): Dyssegmental dysplasia Silverman-Handmaker type in a consanguineous Druze Lebanese family. Natural history. Am J Med Genet 75, 164-170

Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J und Tryggvason K (2001): The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. Hum Mol Genet 10, 1-8

Raats CJ, van den Born J, Bakker MA, Oppers-Walgreen B, Pisa BJ, Dijkman HB, Assmann KJ, Berden JH (2000): Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. Am J Pathol 156, 1749-1765

Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, Gubler MC, Antignac C (2002): Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. Am J Pathol 160, 131–139

Rubel D, Kruegel J, Martin M, Leibnitz A, Girgert R, Miosge N, Eckes B, Müller GA, Gross O (2014): Collagen receptors integrin alpha2beta1 and discoidin domain receptor 1 regulate maturation of the glomerular basement membrane and loss of integrin alpha2beta1 delays kidney fibrosis in COL4A3 knockout mice. Matrix Biol 34, 13-21

Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M, Zalewski I, Imm A, Ruf EM, Mucha B et al. (2004): Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. J Am Soc Nephrol 15, 722–732

Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K (1999): Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. Proc Natl Acad Sci USA 96, 7962-7967

Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, Reponen P, Hess M, Kestila M, Holmberg C, Salonen R, Heikinheimo M, Wartiovaara J et al. (2000): Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. Am J Pathol 157, 1905-1916

Rupp F, Payan DG, Magill-Solc C, Cowan DM, Scheller RH (1991): Structure and expression of a rat agrin. Neuron 6**,** 811-823

Salmivirta K, Talts JF, Olsson M, Sasaki T, Timpl R, Ekblom P (2002): Binding of mouse nidogen-2 to basement membrane components and cells and its expression in embryonic and adult tissues suggest complementary functions of the two nidogens. Exp Cell Res. 279(2), 188-201

Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB**,** Mundel P (2001): Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin**.** J Clin Invest 108(11), 1621–1629

Smith MA, Magill-Solc C, Rupp F, Yao YM, Schilling JW, Snow P, McMahan UJ (1992): Isolation and characterization of a cDNA that encodes an agrin homolog in the marine ray. Molecular and Cellular Neuroscience 3**,** 406-417

Smyth N**,** Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D (1999): Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. J Cell Biol 144(1), 151-160

Suh JH, Miner JH (2013): The glomerular basement membrane as a barrier to albumin to albumin. Nat Rev Nephrol 9, 470-477

Suh JH, Jarad G, van de Voorde RG, Miner JH (2011): Forced expression of laminin β1 in podocytes prevents nephrotic syndrome in mice lacking laminin β2, a model for Pierson syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 108(37), 15348–15353

Thomas WS, Jacob MH, O'Dowd DK, Smith MA (1995): Agrin gene expression in ciliary ganglion neurons following preganglionic denervation and postganglionic axotomy. Dev Biol 168, 662-669

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

Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K (1981): A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. Eur J Biochem 120(2), 203-211

Timpl R, Dziadek M, Fujiwara S, Nowack H, Wick G (1983): Nidogen a new self-aggregating basement membrane protein. Eur J Biochem 15, 455-465

Tryggvason K (1999): Unraveling the mechanism of glomerular ultrafiltration: Nephrin, a key component of the slit diaphragm. J Am Soc Nephrol 10, 2440-2445

Tryggvason K, Patrakka J (2006): Thin Basement Membrane Nephropathy. J Am Soc Nephrol 17, 813-822

Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J (2006): Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. N Engl J Med 354, 1387-1401

Tsim KW, Ruegg MA, Escher G, Kröger S, McMahan UJ (1992): cDNA that encodes active agrin. Neuron 8, 677-689

van den Born J, van den Heuvel LP, Bakker MA, Veerkamp JH, Assmann KJ, Berden JH (1992): A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats. Kidney Int 41, 115-123

Viljoen D, Beighton P (1992): Schwartz-Jampel-Syndrome (chondrodrophic myotonia). J Med Genet 29(1), 58-62

Wendler D, Linß W: Harnapparat. In: Linß W, Fanghänel J (Hrsg.): Histologie. Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie. Walter de Gruyter, Berlin 1998, 205-218

Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV (2008): Diverse cell signaling events modulated by perlecan. Biochemistry 47, 11174–11183

Yurchenco PD, Ruben GC (1987): Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. J Cell Biol, 2559-2568

Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Müntefering H, Fenski R, Pitz S, Schumacher V, Royer-Pokora B, Wuhl E et al. (2004): Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. Mol Genet 13, 2625-2632

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Oliver Gross für die hervorragende wissenschaftliche Unterstützung und vor allem für das Vertrauen in mein selbstständiges Arbeiten.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Betreuerin Dr. med. Jenny Frese, die mir stets geduldig und hilfsbereit zur Seite stand. Ich danke ihr herzlichst für die großartige Unterstützung und die vielen gemeinsamen Laborstunden.

Herrn Professor Dr. med. Nicolai Miosge danke ich sehr für die Mitbenutzung seines Labors, seines hilfsbereiten Teams und für die Bereitstellung des Nidogen-1 Antikörpers.

Herrn Albert Rosenberger aus der Genetischen Epidemiologie Göttingen danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Vielen Dank allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung, Diana Rubel und insbesondere Frau Christina Stanischa, die ebenfalls immer ein offenes Ohr hatte und mir wissenschaftlich und privat mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinen Mitdoktoranden Carolin Prinz und Jan Schulz danke ich vielmals für die netten Laborstunden und die gegenseitige Unterstützung.

Lebenslauf

Ich wurde am 17.05.1983 in Göttingen, Niedersachsen geboren. Meine Mutter Sigrid Spieker, geborene Hagerodt und mein Vater Thomas Spieker sind wohnhaft im Landkreis Northeim. Meine Brüder Hendrik und Frederik Spieker sind wohnhaft in Göttingen und Northeim.

Nach meiner Einschulung 1989 besuchte ich zunächst die Grundschule Leinetal Einbeck in Drüber, die Orientierungsstufe Einbeck und anschließend die Realschule in Einbeck. Danach folgte die Einjährige Berufsfachschule Wirtschaft und im Anschluss besuchte ich das Fachgymnasium Ernährung und Hauswirtschaft in Einbeck und erlangte 2003 die allgemeine Hochschulreife.

Im August 2003 begann ich mit der Ausbildung zur Zahntechnikerin in Göttingen und schloss diese im Januar 2007 mit Erhalt des Gesellenbriefs ab. Zum Wintersemester 2007/2008 fing das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen an. Nach erfolgreichem Studium endete das Staatsexamen im Juni 2013 mit Erhalt der Approbationsurkunde. Von Oktober 2013 bis Oktober 2015 war ich als Assistenzzahnärztin in einer Northeimer Zahnarztpraxis tätig. Seit Dezember 2015 bin ich als Zahnärztin in einer Hamburger Praxis angestellt.