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

Die Interaktion zwischen der glomerulären Basalmembran und der Schlitzmembran im col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Tiermodell

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Lisa-Lena Grönemeyer
aus Leer
Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Oktober 2011

### Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1-12
	1.1. Aufgabe und Zusammensetzung des glomerulären Filters	1
	1.2. Aufbau der Schlitzmembran	
	1.2.1. Proteine der Schlitzmembran	
	1.2.1.1. Podocin	
	1.2.1.2. Nephrin	
	1.2.1.3. CD2AP	
	1.2.2. Interaktion zwischen der Schlitzmembran und den Podozyten	5
	1.2.3. Verminderte Podocin-Expression im Tiermodell	
	1.3. Aufbau der glomerulären Basalmembran	
	1.4. Alport-Syndrom	
	1.4.1. Verminderte Typ-IV-Kollagen-Expression im Tiermodell	11
2.	Material und Methoden	13-26
	2.1. Materialien	13
	2.1.1. Geräte	13
	2.1.2. Puffer und Lösungen	13
	2.1.3. Enzyme	15
	2.1.4. Oligonukleotide	15
	2.1.5. Nukleotide	15
	2.1.6. Standards	16
	2.1.7. Antikörper	16
	2.2. Methoden	18
	2.2.1. Col4a3 <sup>+/-</sup> /nphs2 <sup>+/R140Q</sup> -Tiermodell	18
	2.2.2 Genotypisierung	18

	2.2.2.1. DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien	18
	2.2.2.2. Polymerasekettenreaktion	19
	2.2.2.3. Agarosegelelektrophorese	21
	2.2.3. Nachweis von Proteinen im Urin	21
	2.2.3.1. Chloroform-Methanol-Fällung	21
	2.2.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese	22
	2.2.4. Harnstoffbestimmung im Blut	22
	2.2.5. Spezifischer Proteinnachweis in den Nieren	. 23
	2.2.5.1. Western Blot	23
	2.2.5.2. Immunhistochemische Lamininfärbung	25
	2.2.6. Elektronenmikroskopie der Mäusenieren	26
	2.2.7. Statistische Auswertung	26
3.	Ergebnisse27	'-37
	3.1. Genotypische Zuordnung der Mäuse aus dem Tiermodell	. 27
	3.2. Untersuchung und Verlauf der Proteinurie	
	3.3. Harnstoffkonzentrationen im Serum	30
	3.4. Nachweis der profibrotischen Faktoren TGF-ß1 und CTGF	. 31
	3.5. Charakteristik ultrastruktureller Veränderungen in den Nieren	33
	3.5.1. Auswertung der immunhistochemischen Lamininfärbung	. 33
	3.5.2. Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen	36
4.	Diskussion38	3-43
	4.1. Fragestellung der Untersuchungen	
	4.2. Verwandte Tiermodelle	. 38
	4.3. Bewertung der Proteinausscheidung	
	4.4. Einschätzung der Nierenfunktion anhand der Blutharnstoffkonzentration	
	4.5. Analyse der fibrotischen Prozesse	
	4.6. Beurteilung des strukturellen Umbaus an der Blut-Harn-Schranke	
	4.7. Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik der Untersuchungen und	
	deren Ergebnissen	
	4.8 Redeutung für die Erforschung chronischer Nierenerkrankung	42

5.	Zusammenfassung4	4-45
6.	Anhang: Fibrosescore der Laminin-1-Immunhistochemie	46
7.	Literaturverzeichnis4	7-53

#### Abkürzungsverzeichnis

AK Antikörper

BSA bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)

bp BasenpaareC Carboxy(I)

CAM cell adhesion molecule (Zelladhäsionsmolekül)

CD cluster of differentiation (Differenzierungsgruppe)

CD2AP CD2-assoziiertes Protein

CTGF connective tissue growth factor (verbindender

Gewebewachstumsfaktor)

CY3 Indocarbocyanin 3

DNA desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP Desoxynukleotidtriphosphat

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EHS Engelbreth-Holm-Swarm (-Tumor)

FBH familial benign hematuria (familiäre benigne Hämaturie)

GBM Glomeruläre Basalmembran

HRP horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

lg Immunglobulin

kDa Kilodalton

LDS *lithium dodecyl sulfate* (Lithiumdodecylsulfat)

LDS-PAGE lithium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis

(Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

MAP-Kinase Mitogen-aktivierte Protein-Kinase

N Amino

n Anzahl der untersuchten Tiere

NaCl Natriumchlorid

NC noncollagenous (nicht-kollagenös)

mRNA messenger-RNA (Boten-RNA)

p Anzahl der untersuchten Proben

PBS phosphate buffered saline (Phosphatpuffersaline)

PCR polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

PHB Prohibitin

PI3-Kinase Phosphatidylinositol-3-Kinase

PI(3,4)P2 Phospatidylinositol(3,4)bisphosphat PI(3,4,5)P3 Phospatidylinositol(3,4,5)trisphosphat

PVDF Polyvinylidenfluorid

Q Glutamin R Arginin

RNA *ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)

SH Src homolog

Src, SRC Sarkoma

TAE Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TBMD thin basement membrane disease

TBMN thin basement membran nephropathy

TBS Tris-Puffer mit Saline

TBST Tris-Puffer mit Saline und Tween

TGF-ß1 *tissue growth factor-ß1* (transformierender Wachstumsfaktor)

U *unit*s (Enzymaktivitäts-Einheiten in μmol/min)

(v/v) volume per volume (Volumen pro Volumen)

(w/v) weight per volume (Gewicht pro Volumen)

Wo Wochen WT Wildtyp

#### 1. Einleitung

#### 1.1. Aufgabe und Zusammensetzung des glomerulären Filters

Die Hauptaufgabe der Niere besteht in der Ultrafiltration des Blutplasmas an der Blut-Harn-Schranke. Diese ist im Glomerulus lokalisiert und besitzt einen dreischichtigen Aufbau aus fenestriertem Kapillarendothel, glomerulärer Basalmembran und Podozyten, den viszeralen Epithelzellen des Glomerulus. Die Podozyten umkleiden die Kapillarschlingen mitsamt der glomerulären Basalmembran und bilden über Primärfortsätze sekundäre Podozytenfußfortsätze aus, die sich untereinander verzweigen. Die somit erzeugten 25-40 nm schmalen Spalträume werden wiederum von einer elektronendichten Struktur, der Schlitzmembran, überbrückt. Der dreischichtige der Blut-Harn-Schranke erlaubt zwar den Übertritt Plasmamoleküle bis zu 5 kDa auf die Harnseite, verhindert aber die Permeabilität von zellulären Bestandteilen und Makromolekülen wie Albumin (Tryggvason und Wartiovaara 2005).

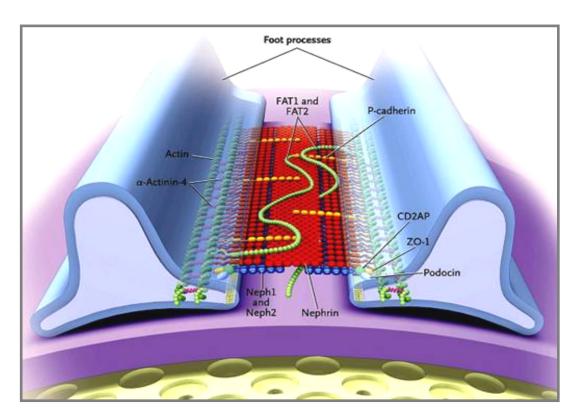


Abbildung 1: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Blut-Harn-Schranke. Podozytenfußfortsätze (blau) mit der dazwischen liegenden Schlitzmembran, glomerulären Basalmembran (violett) und fenestriertes Endothel (gelb). Quelle: Tryggvason et al. (2006), (http://www.nieronline.org/index.php?title=The\_podocyte\_and\_parietal\_epithelial\_c ell in proteinuria and glomerulosclerosis).

#### 1.2. Aufbau der Schlitzmembran

Als größenselektiver Filter für Plasmaproteine überbrückt die Schlitzmembran die 25-40 nm breiten Filtrationsschlitze zwischen den Podozytenfußfortsätzen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Adhäsionsverbindungen des Epithels wird die Schlitzmembran als eine modifizierte *Adherens Junction* angesehen, die den einzigen Zell-Zell-Kontakt zwischen den Podozyten darstellt. Zusätzlich ist die Schlitzmembran durch die Beteiligung an verschiedenen Signaltransduktionen in der Lage, Einfluss auf die zelluläre Organisation der Podozyten zu nehmen. Die intakte Schlitzmembran ist daher für den Strukturerhalt der Blut-Harn-Schranke essentiell (Benzing 2004, Reiser et al 2000).

Neben Proteinen wie ZO-1, P-Cadherin, Neph 1 und FAT wurden Nephrin und Podocin als wesentliche Bestandteile der Schlitzmembran identifiziert (Donoviel et al. 2001, Inoue et al. 2001, Reiser et al. 2000, Roselli et al. 2002, Schnabel et al. 1990, Tryggvason 1999). Letztere sind über das Protein CD2AP mit dem randständigen Podozytenzytoskelett verknüpft, das aus einem Aktinmaschenwerk besteht und mit den zentral gelegenen, durch α-Aktinin-4 gebündelten Aktinfasern interagiert (Kaplan et al. 2000, Ichimura et al. 2003). Die Schlitzmembran steht im engen Kontakt mit den Podozyten und nimmt Einfluss deren zelluläre auf Organisation. Störungen der Schlitzmembranintegrität, wie sie zum Beispiel durch Mutationen in den Genen essentieller Proteine wie Nephrin, Podocin oder CD2AP entstehen, führen über Veränderungen der Zytoskelettarchitektur zu einer Vergröberung und Auflösung der Podozytenfußfortsätze und damit zur Proteinurie (Kerjaschki 2001). Des Weiteren wurden bei Defekten in der Schlitzmembran signifikant erhöhte Apoptose-Raten in den Podozyten festgestellt. Somit scheint das Übermitteln anti-apoptotischer Signale eine zentrale Aufgabe der Schlitzmembran zu sein (Benzing 2004, Huber und Benzing 2005).

#### 1.2.1. Proteine der Schlitzmembran

#### 1.2.1.1. Podocin

Das nphs2-Genprodukt Podocin wird ausschließlich von Podozyten exprimiert und stellt einen wichtigen Bestandteil der Schlitzmembran dar. Nphs2 befindet sich auf dem Chromosom 1q25-q31 und umfasst acht Exone mit insgesamt 1149 Basenpaaren. Podocin besteht aus 383 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von circa 42 kDa und befindet sich an der Verankerungsregion der Schlitzmembran an den Podozyten (Boute et al. 2000).

Seine strukturelle Ähnlichkeit zu dem humanen Stomatin<sup>1</sup> spiegelt sich in der haarnadelförmigen Konfiguration von Podocin wider, wobei die N- als auch die C-terminale Domäne im Zytoplasma der Podozyten liegen (Huber et al. 2003 b, Roselli et al. 2002). Des Weiteren verfügt Podocin, wie andere Proteine der Stomatin-Familie, über eine PHB-Domäne<sup>2</sup>, die eine Interaktion mit Lipiden wie Cholesterin ermöglicht und mit Nephrin interagiert (Huber et al. 2003 b). Als Membran-assoziierte Proteine sind Stomatine an Signalübertragungen und der Regulation von Ionenkanälen beteiligt. Analog stellt Podocin eine bedeutende Verbindung zwischen der Schlitzmembran und dem Zytoskelett der Podozyten her (Huber et al. 2007).

Mutationen in dem Podocin-Gen verursachen das Steroid-resistente nephrotische Syndrom mit autosomal-rezessivem Erbgang. Bei den Erkrankten setzt bereits in einem Alter zwischen drei Monaten und fünf Jahren eine Proteinurie ein, innerhalb von zehn Jahren entwickelt über die Hälfte der Patienten eine terminale Niereninsuffizienz (Boute et al. 2000, Niaudet et al. 1997).

<sup>1</sup> Stomatin (auch Band-7-Protein) ist ein integrales Phosphoprotein, das zunächst aus der Plasmamembran von Erythrozyten isoliert wurde und anschließend auch in anderen Geweben nachgewiesen werden konnte (Boute et al. 2000).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> PHB-Domäne: Proteinfamilie aus über 1300 Proteinen, die alle eine aus ca. 150 AS bestehende Domäne besitzen, die der Domäne des mitochondrialen Proteins Prohibitin ähnelt (Huber et al. 2007).

#### 1.2.1.2. Nephrin

Das nphs1-Gen ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert und kodiert für Nephrin, der zentralen Komponente der Schlitzmembran mit einem Molekulargewicht von circa 185 kDa (Holzmann et al. 1999).

Nephrin wird in der Niere ausschließlich von Podozyten gebildet und ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle Ig-CAM (Kestilä et al. 1998). Es verfügt über sechs linear angeordnete Immunglobulinähnliche Strukturen am N-Terminus seiner extrazellulären Domäne, über die es mit anderen Nephrinmolekülen reißverschlussartige Interaktionen eingeht. Mittels Phosphorylierung der insgesamt neun Tyrosinreste im transmembranären und C-terminalen Abschnitt übt Nephrin eine wichtige Funktion in der Signalübertragung aus und beeinflusst das Überleben der Podozyten sowie deren Zellwachstum (Benzing 2004, Tryggvason 1999).

Mutationen in dem Nephrin-Gen sind verantwortlich für das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ, das bereits pränatal zu einer starken Proteinurie führt und ohne intensive therapeutische Maßnahmen den Tod durch Niereninsuffizienz innerhalb der ersten zwei Lebensjahre verursacht (Putaala et al. 2001).

#### 1.2.1.3. CD2-assoziiertes Protein (CD2AP)

CD2AP befindet sich an der lateralen Seite der Podozytenmembran in direkter Nähe des intrazellulären Ansatzes der Schlitzmembran und wird im Gegensatz zu Podocin auch in Epithelzellen anderer Organe nachgewiesen. Es besitzt ein Molekulargewicht von circa 80 kDa und ist in der Lage, direkt mit den Aktinfasern des Podozytenzytoskeletts zu kommunizieren (Oh et al. 2004, Shih et al. 2001). Auf der anderen Seite interagiert CD2AP direkt mit Nephrin und Podocin und fungiert somit als Adapter zwischen der Schlitzmembran und dem Podozytenzytoskelett (Lehtonen et al. 2002, Schwarz et al. 2001, Yuan et al. 2002). Seine essentielle Bedeutung für die Instandhaltung des glomerulären Filters wird durch ein Modell mit cd2ap<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen untermauert, in dem die Tiere bereits nach sechs Wochen durch eine massive Proteinurie versterben. Haploinsuffiziente Mäuse weisen eine erhöhte Anfälligkeit für glomeruläre Erkrankungen auf (Kim et al. 2003, Shih et al. 1999).

#### 1.2.2. Interaktion zwischen der Schlitzmembran und den Podozyten

Zwischen den Proteinen der Schlitzmembran und den Podozyten besteht eine entscheidende Verbindung, die mittels Signaltransduktion zur Aufrechterhaltung der Podozytenstruktur beiträgt und somit eine wichtige Funktion zur Instandhaltung des glomerulären Filters einnimmt (Huber et al. 2001).

Das Schlitzmembranprotein Nephrin induziert gemeinsam mit CD2AP eine Signalkaskade, die über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase AKT und somit zu einer verminderten Apoptose-Rate der Podozyten führt. Die anti-apoptotische Eigenschaft von AKT liegt in dessen Regulation von Procaspase-9, Bad und anderen Effektoren, die für das Überleben von Zellen verantwortlich sind (Huber et al. 2003 a). Podocin unterstützt diese Signaltransduktion, indem es über seine C-terminale Domäne mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin interagiert und infolgedessen eine Phosphorylierung der Tyrosinreste von Nephrin durch die SRC-homologe<sup>3</sup> Tyrosinkinase Fyn bewirkt (Benzing 2004, Verma et al. 2003). Dieser Vorgang verstärkt das von Nephrin ausgehende Signal, während eine direkte Aktivierung von AKT durch Podocin wahrscheinlich nicht möglich ist (Huber et al. 2003 a). Bedeutend für die Funktion von Podocin ist vermutlich dessen Lokalisation in sogenannten Lipid Rafts, dynamischen Mikrodomänen in der Plasmamembran der Podozyten. Lipid Rafts sind Membranbereiche, die reich an Cholesterin, Sphingolipiden und Proteinen sind und aufgrund ihres Vorkommens in Detergenz-resistenten Membrandomänen aus der restlichen Lipiddoppelschicht isoliert werden können (Simons K und Toomre 2000). Die Nephrin-abhängige Signaltransduktion wird durch die Organisation von miteinander agierenden Proteinen in Lipid Rafts unterstützt (Simons M et al. 2001). Man vermutet, dass Podocin für die Rekrutierung von Nephrin in Lipid Rafts verantwortlich ist (Huber et al. 2003 b, Schwarz et al. 2001). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass zeitweise auch Nephrin in diesen Mikrodomänen nachzuweisen ist, allerdings nur gemeinsam mit Podocin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass häufige krankheitsauslösende Mutationen im nphs2-Gen die Rekrutierung von Nephrin in der Schlitzmembran und somit dessen Signalverstärkung verhindern (Huber et al. 2003 b).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> SRC ist das Genprodukt des gleichnamigen Protoonkogens src

Wie bei der AKT-Aktivierung unterstützt Podocin durch Interaktion mit Nephrin außerdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und erhöht damit die Proteinsynthese und die Proliferation der Podozyten (Huber et al. 2003 b). Daneben reguliert Podocin Ionenkänale in der Umgebung der Schlitzmembran wie den *Transient Receptor Potential Channel* 6 (TRPC6) durch Rekrutierung von Cholesterin (Huber et al. 2007). Beim TRPC6 handelt es sich um einen mechanosensorischen Ionenkanal, der eventuell einen Einfluss auf die kontraktilen Aktinbündel des Podozytenzytoskeletts ausübt und dadurch zu Veränderungen der Fußfortsatzmorphologie und der Permeabilität des Nierenfilters führt (Huber et al. 2007, Schermer und Benzing 2009).

#### 1.2.3. Verminderte Podocin-Expression im Tiermodell

Patienten, die unter einem Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom leiden, besitzen in 32 % der Fälle die Punktmutation p.R138Q im Podocin-Gen nphs2. Durch den Aminosäurenaustausch von Arginin zu Glutamin kommt es zu einem Loss-of-function-Effekt, also einer verminderten Expression funktionsfähiger Proteine. Da Podocin bei Mäusen mit 385 Aminosäuren aus zwei Aminosäuren mehr besteht als beim Menschen, stellt bei dem Tiermodell die R140Q-Mutation das Äquivalent der menschlichen R138Q-Mutation dar (Roselli et al. 2002). Homozygote nphs2R140Q/R140Q-Mäuse mit 129S2/SvPas-Hintergrund sterben im Mittel innerhalb der ersten 14 Lebenstage an Nierenversagen. Bereits ab dem vierten Lebenstag lässt sich eine Albuminurie nachweisen, die bis zum Tod der Eine immunhistochemische Podocinfärbung zunimmt.  $nphs2^{R140Q/R140Q}\text{-Nieren zeigte, dass das mutierte Protein nicht mehr in der}\\$ Podozytenmembran nahe der Schlitzmembranverankerung lokalisiert ist, sondern sich im Endoplasmatischen Retikulum befindet. Histologisch stellt sich zunehmend ein sklerotischer Umbau des Nierenparenchyms mit mesangialer Expansion, Mesangiolyse und interstitiellen Einblutungen dar. Elektronenmikrokopische Untersuchungen zeigen die Verstreichung von Podozytenfußfortsätzen und den Verlust der Schlitzmembran. Dagegen konnte bei heterozygoten nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen bei einer Untersuchungsdauer von einem Jahr weder eine Proteinurie noch histologisch eine schwerwiegende Veränderung der Nieren festgestellt werden (Philippe et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nphs2<sup>R140Q/R140Q</sup>-Mäuse aufgrund ihrer kurzen mittleren Lebenszeit von 14 Tagen nicht gezüchtet und daher nicht untersucht.

#### 1.3. Aufbau der glomerulären Basalmembran

Charakteristische Komponenten aller Basalmembranen sind Typ-IV-Kollagen, Laminin, Nidogen (Entactin) und Proteoglykane, aus denen sich auch die glomeruläre Basalmembran zusammensetzt (Cosgrove et al. 1996, Miner 1999). Entgegen des typischen Aufbaus anderer Basalmembranen fehlt im Glomerulus durch die enge räumliche Beziehung zwischen dem Endothel und den Podozyten die Lamina fibroreticularis. Stattdessen besitzt die glomeruläre Basalmembran eine dreischichtige Struktur aus Lamina rara interna, Lamina densa und Lamina rara externa. Die beiden äußeren Laminae grenzen direkt an die Plasmamembranen der ortsständigen Zellen und sind reich Heparansulfat-Proteoglykanen, die über die Bindung von Laminin, Typ-IV-Kollagen und Nidogen die glomeruläre Basalmembran stabilisieren. Durch den polyanionischen Charakter der Proteoglykane werden negativ geladene Moleküle aus dem Blut zurückgehalten und deren Permeabilität durch den glomerulären Filter verhindert. Den Hauptbestandteil der Lamina densa bilden Laminin das kreuzvernetzte Typ-IV-Kollagen. sowie Laminin nichtkollagenes Glykoprotein aus drei heterogenen Untereinheiten (α, β, γ), die sich zu einer kreuzförmigen Struktur zusammenlagern. Über die Bindung von Typ-IV-Kollagen, Proteoglykanen und Integrinen verankert Laminin die Zellen in der extrazellulären Matrix (Miner 1999).

Typ-IV-Kollagene sind tripelhelikale Moleküle der extrazellulären Matrix, deren Polypeptidketten aus repetitiven Glycin-X-Y-Sequenzen aufgebaut sind. Für die Zusammensetzung des Typ-IV-Kollagens sind sechs verschiedene Polypeptidketten bekannt. Jeweils drei linksgängige Ketten bilden über Wasserstoffbrücken ein rechtsgängiges Kollagen-Monomer mit ca. 1400 Glycin-X-Y-Wiederholungen, das durch nicht-kollagene Sequenzen unterbrochen wird. Jede Kette verfügt über einen aus circa 15 Aminosäuren bestehenden N-Terminus sowie über eine circa 230 Aminosäuren lange hochkonservierte nichtkollagene NC1-Domäne am C-terminalen Ende (Hudson et al. 1993). Über die NC1-Domäne lagern sich je zwei Kollagen-Monomere zu Dimeren zusammen, über das N-terminale Ende bilden jeweils vier Moleküle Tetramere aus. Über

End-zu-End- und Seit-zu-Seit-Interaktionen der Monomere entsteht ein kollagenes Netzwerk, das durch Disulfidbrücken zusätzlich stabilisiert wird (Gunwar et al. 1998).

Die  $\alpha 1(IV)$ - und  $\alpha 2(IV)$ -Ketten kommen ubiquitär vor, die  $\alpha 3(IV)$ -/ $\alpha 4(IV)$ -/ $\alpha 5(IV)$ -/α6(IV)-Ketten zeigen dagegen eine spezifische Organverteilung und sind nur in Lunge, Innenohr, Augenlinse und in der reifen glomerulären Basalmembran der Nieren lokalisiert (Heidet und Gubler 2009). Das Typ-IV-Kollagen der glomerulären Basalmembran besteht in seiner embryonalen Form aus zwei α1(IV)- und einer α2(IV)-Kette und wird postpartal bei Mäusen innerhalb weniger Wochen durch den Austausch mit α3α4α5(IV)-Ketten in seine reife Form überführt, die ausschließlich von Podozyten exprimiert wird (Abrahamson et al. 2009, Miner und Sanes 1994). Durch diesen Isoform-Switch bleibt in dem reifen Glomerulus ausschließlich ein relativ dünnes subendotheliales α1α2(IV)-Kollagennetz erhalten (Cosgrove et al. 2007). Als Ligand von Rezeptoren der ortsständigen Zellen wie dem Tyrosinkinaserezeptor Discoidin-Domain-Rezeptor-1 (DDR-1) oder α1β1-/α1β2-Integrin übernimmt das reife Typ-IV-Kollagen eine wichtige Funktion in der Regulation von Zellkontakten und Proliferation, wobei dessen intakte Tripelhelixstruktur eine entscheidende Voraussetzung für das Rezeptorsignal darstellt (Cosgrove et al. 2000, Gross und Weber 2005, Gross et al 2004 b).

#### 1.4. Alport-Syndrom

Als hereditäre, progressive Erkrankung der Nieren ist das Alport-Syndrom vor allem durch einen unregelmäßigen Aufbau der glomerulären Basalmembran gekennzeichnet, der zu einer Proteinurie und Hämaturie führt. Begleitend treten zudem häufig extrarenale Symptome wie Innenohrschwerhörigkeit oder Einschränkungen in der Sehfähigkeit auf, seltener eine diffuse Leiomyomatose mit Ösophagusbeteiligung. Betroffene entwickeln meist innerhalb von 20 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz (Gross und Weber 2005, Kashtan 2001).

Ursache für das Alport-Syndrom sind Mutationen in den col4a3-/col4a4-/col4a5-Genen, die für die  $\alpha 3$ -/ $\alpha 4$ -/ $\alpha 5$ -Ketten des Typ-IV-Kollagens kodieren. Diese führen zu typischen Veränderungen der glomerulären Basalmembran, die zunächst dünn erscheint, sich allmählich verdickt und schließlich Aufsplitterungen und Lamellierungen aufweist (Gross und Weber 2005, Kim KH

et al. 1995). Der fibrotische Umbau der Nieren ist die Folge einer gestörten Zell-Matrix-Interaktion aufgrund eines defekten Aufbaus des Typ-IV-Kollagens (Gross und Weber 2005).

Die Typ-IV-Kollagen-Gene sind paarweise und gegenläufig auf den Chromosomen Kopf-an-Kopf-artig angeordnet, wobei col4a1 und col4a2 sich auf dem Chromosom 13 befinden, col4a3 und col4a4 auf dem Chromosom 2 lokalisiert sind und col4a5 und col4a6 auf dem X-Chromosom liegen (Hudson et al. 1993). Col4a1 und col4a2 teilen sich einen bidirektionalen Promoter, die anderen Genpaare werden vermutlich auf eine ähnliche Weise bidirektional transkribiert (Miner und Sanes 1994, Pöschl et al. 1988).

Mit einem Anteil von circa 80 % wird das Alport-Syndrom am weitaus häufigsten X-chromosomal über ein mutiertes col4a5-Gen vererbt (Antignac 1995). Bisher sind über 300 Mutationen in diesem Gen bekannt. Die Prävalenz in der Bevölkerung liegt bei 1:5000. Da sich das col4a5-Gen in direkter Nachbarschaft zu dem col4a6-Gen befindet und sich dessen Genprodukt α6(IV)-Kollagen vor allem in der Speiseröhre und im Respirationstrakt nachweisen lässt, kann es bei Patienten mit X-chromosomalem Alport-Syndrom zusätzlich zu einer diffusen Leiomyomatose mit Beteiligung des Ösophagus und der Trachea kommen, sobald auch das col4a6-Gen betroffen ist beziehungsweise sich eine Mutation auf dessen Transkription auswirkt (Zhou et al. 1993, Hudson et al. 1993). Etwa 90 % der männlichen Patienten leiden bereits vor dem 40. Lebensjahr an einem Nierenversagen (Jais et al. 2000). Weibliche Merkmalsträger erkranken dagegen zu 95 % an einer familiären benignen Hämaturie (FBH), die eine bessere Prognose aufweist. Dennoch entwickeln circa zehn bis zwölf Prozent der betroffenen Frauen vor dem 40. Lebensjahr ein terminales Nierenversagen (Jais et al. 2003).

10-15 % der Alport-Patienten sind von Mutationen in den col4a3- oder col4a4-Genen betroffen, die einem autosomal-rezessiven Erbgang folgen. Fast ein Prozent der Bevölkerung sind heterozygote Merkmalsträger für eine col4a3-oder col4a4-Mutation, deren phänotypische Auswirkung von völliger Symptomfreiheit über eine isolierte Mikrohämaturie bis hin zur Proteinurie reicht. Ultrastrukturell lässt sich häufig eine *Thin Basement Membrane Nephropathy* (TBMN, TBMD) nachweisen, wenn in mindestens 50 % der Glomeruli die Basalmembran auf 150 bis 225 nm verdünnt ist (Beirowski et al. 2006, Heidet et

al. 2001). Wahrscheinlich kann auch eine col4a3- oder col4a4-Heterozygotie zu einem Nierenversagen führen: Nach Pierides et al. (2009) entwickelten 14% von 127 Patienten mit einer FBH im mittleren Alter von 60 Jahren eine Niereninsuffizienz. In seltenen Fällen können Mutationen in dem col4a3- oder col4a4-Gen für ein Alport-Syndrom mit autosomal-dominantem Erbgang verantwortlich sein (Jefferson et al. 1997).

Die Pathogenese des Alport-Syndroms ist weitgehend unbekannt. Das unreife Typ-IV-Kollagen erscheint zunächst normal, wird aber im Laufe der Zeit durch die fehlende Reifung zerstört und führt zu Aufsplitterungen und Lamellierungen der glomerulären Basalmembran. Man nimmt an, dass das Typ-IV-Kollagen einen bedeutenden Beitrag zur Regulation der Zellfunktion leistet, indem es an Rezeptoren der Endothelzellen und Podozyten (DDR-1, α1β1/α2β1-Integrin) bindet und mit diesen direkt kommuniziert. Dabei nimmt die intakte Tripelhelix des Kollagenmoleküls wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Signalverarbeitung ein (Gross und Weber 2005, Gross et al. 2004 b). Als ein weiterer molekularer Mechanismus wird die erhöhte Anfälligkeit der Basalmembran zur Endoproteolyse beim Alport-Syndrom angenommen (Kalluri et al. 1997).

Obwohl von dem Gendefekt in der Regel nur eine der drei α-Ketten des reifen Kollagens betroffen ist, werden sowohl die  $\alpha 3(IV)$ -,  $\alpha 4(IV)$ - als auch die  $\alpha 5(IV)$ -Ketten durch den Einbau von  $\alpha 1(IV)$ - und  $\alpha 2(IV)$ -Ketten ersetzt. Da sich die mRNA-Konzentrationen von col4a4 und col4a5 in den col4a3-Knockout-Mäusen nicht von denen der Wildtypmäuse unterscheidet, ist die Abwesenheit der von der Genmutation nicht direkt betroffenen Ketten vermutlich auf eine Herunterregulierung ihrer Transkription zurückzuführen (Cosgrove et al. 1996). Die defekte Tripelhelixstruktur des Typ-IV-Kollagens wird von den Rezeptoren der ortsständigen Zellen wahrgenommen und führt zu einer veränderten Signalkaskade mit vermehrter Freisetzung profibrotischer Faktoren wie TGF-ß1, CTGF, Metalloproteinasen und Chemokinen. Dies ist Ausdruck eines Reparaturversuchs der defekten Basalmembran durch die Podozyten und Endothelzellen, der jedoch aufgrund der Alport-Mutation verhindert wird. Somit endet dieser Vorgang in einem fibrotischen Umbau der Niere, der letztlich eine terminale Niereinsuffizienz zur Folge hat (Cosgrove et al. 2000, Gross et al. 2004 a, Sayers et al. 1999)

#### 1.4.1. Verminderte Typ IV-Kollagen-Expression im Tiermodell

Das Modell mit col4a3- $^{-1}$ -Mäusen zeigte, dass diese aufgrund der fehlenden  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(IV)$ -Kollagenketten an dem Vollbild des Alport-Syndroms erkranken und frühzeitig eine Hämaturie sowie eine Proteinurie entwickeln. Alportmäuse mit C57BL/6-Hintergrund zeigen im Vergleich zu 129/Sv-Alportmäusen eine verspätete Manifestation der Erkrankung (Proteinurie ab einem Alter von 100 Tagen versus 35 Tagen) und ein verzögertes terminales Nierenversagen (194 Tage versus 66 Tage). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Krankheitsverläufe ist der Einbau von  $\alpha 5\alpha 6\alpha 5(IV)$ -Ketten zu einem gemeinsamen  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1/\alpha 5\alpha 6\alpha 5$ -Kollagennetzwerk bei C57BL/6J-Alportmäusen, der bei 129/Sv-Mäusen und Menschen mit Alport-Syndrom nicht in diesem Umfang nachzuweisen ist (Cosgrove et al. 2007).

Heterozygote col4a3<sup>+/-</sup>-Mäuse entwickeln eine Hämaturie vergleichbar mit der familiären benignen Hämaturie beim Menschen und besitzen eine verdünnte glomeruläre Basalmembran als Äquivalent der humanen *Thin Basement Membrane Nephropathy*. Durchschnittlich erreichen die col4a3<sup>+/-</sup>-Mäuse mit 129/SvJ-Hintergrund mit ca. 22 Monaten ein geringeres Lebensalter als ihre gesunden Artgenossen mit ca. 30 Monaten (Beirowski et al. 2006).

## 1.5. Die Interaktion zwischen der Schlitzmembran und der glomerulären Basalmembran

Als Teil des glomerulären Filters stellt die intakte Struktur der Podozyten eine Voraussetzung für die renale Filterfunktion dar. Die Ausbildung von Fußfortsätzen wird durch das Podozytenzytoskelett gewährleistet, das sowohl mit den Proteinen der Schlitzmembran interagiert als auch über Rezeptoren mit dem Typ-IV-Kollagen der glomerulären Basalmembran in Verbindung steht. Die Vermutung, dass die Proteine der Schlitzmembran mit dem Typ-IV-Kollagen der glomerulären Basalmembran miteinander interagieren, basiert auf dem Fall einer österreichischen Familie.

Dort wies eine heterozygote Alportträgerin mit einer Mutation im col4a5-Gen bereits in der Kindheit eine Proteinurie sowie Hämaturie auf und entwickelte schon im Jugendalter ein terminales Nierenversagen. Üblicherweise kann bei jungen heterozygoten Merkmalsträgern keine oder eine nur sehr milde Proteinurie nachgewiesen werden. Neben der X-chromosomalen Alport-

Erkrankung des Sohnes leidet auch ihre Tochter an einer früh einsetzenden Proteinurie und Niereninsuffizienz. Genetische Untersuchungen von Mutter und Tochter ergaben, dass beide zusätzlich zu der col4a5-Mutation einen nphs2-Polymorphismus (R229Q (CGA>CAA)) besitzen. Bei Erwachsenen kann dieser Polymorphismus im Zusammenhang mit einer bestehenden nphs2-Mutation für ein Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom verantwortlich sein. Der heterozygote R229Q-Polymorphismus alleine scheint jedoch keine renalen Erkrankungen hervorzurufen.

Der Fall dieser Familie legt die Vermutung nahe, dass zwischen Podocin als Protein der Schlitzmembran und dem Typ-IV-Kollagen als Bestandteil der glomerulären Basalmembran eine bedeutende Interaktion besteht, die anhand von doppelt-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll.

#### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

Neben der Standardausstattung des Labors wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Geräte verwendet: Chemilumineszenzdetektor Medical Film Processor SRX-101A, Konica (Hohenbrunn, Deutschland), Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 TV, Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland), Messerhomogenisator IKA Ultra-Turrax T25, Jahnke und Kunkel (Staufen im Breisgau, Deutschland), Mikrotom Autocut 2040, Reichert-Jung (Nussloch, Deutschland).

#### 2.1.2. Puffer und Lösungen

#### Blockierungslösung

5% Magermilchpulver, Merck (Darmstadt, Deutschland) in TBST (w/v)

#### Coomassie-Färbelösung

Roti Blue (1x), Roth (Karlsruhe, Deutschland) in Methanol 20% (v/v)

#### Formalin-Lösung

4% Formaldehyd (v/v) verdünnt mit PBS

Kaliumphosphat 1	υ	mľ	VI
------------------	---	----	----

EDTA	10 mM
EGTA	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
ß-Glycerophosphat	50 mM
Natriumvanadat	1 mM
Nonoxinol 40	0,5% (w/v)
Polyoxyethylen(23)laurylether	0,1% (v/v)
Phenylmethylsulfonylfluorid	1 mM
Pepstatin	10 µM

Leupeptin 10 μM

pH=7,0

#### **Normalserum**

3% Normalserum goat in 0,8% BSA/TBS

#### Phosphat-Puffer mit Saline (PBS)

NaCl 137 mM KCl 2,68 mM Na $_2$ HPO $_4$  20,4 mM KH $_2$ PO $_4$  1,47 mM

pH 7 (eingestellt mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

#### Polymerasepuffer

Standard Taq-Reaction Buffer (10x), New England BioLabs (Frankfurt, Deutschland)

#### **Tris-Puffer**

Tris-Base 50 mM

pH=7,5 (eingestellt mit HCI)

#### Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

Tris-Base 40 mM  $Na_2EDTA$  1 mM

pH 8,0 (eingestellt mit Essigsäure)

#### Tris-Puffer mit Saline (TBS)

Tris-Base mit NaCl 1,37 M

#### Tris-Puffer mit Saline und Tween (TBST)

 Tris-Base
 20 mM

 NaCl
 17,13M

 Tween 20
 0,0625% (v/v)

#### Waschpuffer 1

0,8% BSA/TBS-Lösung (w/v)

#### Waschpuffer 2

5% BSA/TBS-Lösung (w/v)

#### 2.1.3. Enzyme

Proteinase K Solution, Qiagen (Hilden, Deutschland)

DNA-Polymerase Taq-Polymerase F100L Taq 5 U/µl, Finnzymes (Espoo, Finnland)

#### 2.1.4. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden allesamt von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer** 

Oligonukleotid-Primer Sequenz	
nphs2	
forward	TAA TTA TAG GGC CGG TTG TC
reverse	TGC CTC TTC TCC CAA CTA AA
col4a3	
forward	CCA GGC TTA AAG GGA AAT CC
reverse	CCT GCT AAT ATA GGG TTC GAG A
mutant	AAT CGC CAA TGA CAA GAC G

#### 2.1.5. Nukleotide

Die Nukleotide wurden aus dem dNTP-Set (100mM) von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) entnommen.

#### 2.1.6. Standards

Als Molekulargewichtmarker diente See Blue Plus 2 Pre-Stained Standard, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland).

Proteir	n	Approx	imate N	/lolecular	Weights	(kDa)
	1	Tris- Glycine	Tricine	NuPAGE <sup>®</sup> MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
-	Myosin	250	210	188	191	210
	Phosphorylase	148	105	98	97	111
	BSA	98	78	62	64	71
*	Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
•	Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
400004	Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
	Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
	Lysozyme	16	16	14	14	n/a
	Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
-	Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a
	GE® Novex s 4-12% Gel					

©1999-2002 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

IM-1008F 072602

Abbildung 2: Bandenstruktur und Molekulargewichte des See Blue Plus 2 Pre-Stained Standards. Abbildungen und Angaben übernommen von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), (http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/sds-page-protocol/pre-stained-protein-standards-seeblue-plus2-protein-standard.html#prot2).

#### 2.1.7. Antikörper

#### Primär-AK für TGF-ß1

monoklonaler AK aus Maus anti-TGFß (MAB 240), R&D Systems (Minneapolis, MN)

1:2000 in TBST

#### Primär-AK für CTGF

polyklonaler rabbit-anti-mouse CTGF (ab6992), Abcam (Cambridge,UK) 1:2000 in TBST

#### Primär-AK für Actin

polyklonaler rabbit-anti-mouse ß-Actin (A2103), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)

1:5000 in TBST

#### Primär-AK für Laminin

polyklonaler AK aus rabbit-anti-Laminin (ab11575), Abcam (Cambridge, England)

1:25 in 5% BSA/TBS

#### Sekundär-AK für Maus anti TGFß

HRP-goat-anti-mouse-IgG (P0161), DAKO (Glostrup, Dänemark) 1:20000 in TBST

#### Sekundär-AK für Rabbit anti CTGF

HRP-goat-anti-rabbit-IgG (P0448), DAKO (Glostrup, Dänemark) 1:10000 in TBST

#### Sekundär-AK für Rabbit anti Actin

HRP-goat-anti-rabbit-IgG (P0448), DAKO (Glostrup, Dänemark) 1:10000 in TBST

#### Sekundär-AK für Rabbit anti-Laminin

goat-anti-rabbit-AK CY3-gekoppelt, Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA)

1:200 in 0,8% BSA/TBS

#### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Tiermodell

Für die Zucht doppelt-heterozygoter col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse wurden heterozygote Nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse aus 129 Sv/Pas-Hintergrund mit heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>-Mäusen aus 129 Sv/J Hintergrund gekreuzt. Die nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Corinne Antignac (INSERM, Paris) zur Verfügung gestellt, die col4a3<sup>+/-</sup>-Mäuse wurden von den Jackson Immunoresearch Laboratories (WestGrove, PA, USA) bezogen und sind seit 2006 in Göttingen etabliert.

Die Tierzucht wurde bei den zuständigen Behörden angezeigt und von dem Tierpflegepersonal der Uniklinik Göttingen durchgeführt. Innerhalb von zwei Jahren verstarb kein Tier spontan und es wurden keine Tierversuche im Sinne des Tierschutzgesetzes §7 durchgeführt.

#### 2.2.2. Genotypisierung

Um den Genotyp der Mäuse zu bestimmen, wurde zunächst die DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen und diese anschließend mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion auf Mutationen im nphs2- bzw. col4a3-Gen untersucht.

#### 2.2.2.1. DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien

Zur Isolation der DNA aus dem Gewebe wurde das DNeasy Blood & Tissue-Kit von Qiagen verwendet.

Schwanzbiopsien mit einer Länge von etwa 0,5 cm wurden in einem 1,5 ml Eppendorf mit jeweils 180 µl Puffer ATL sowie 20 µl Proteinase K bei 56°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben sorgfältig durchmischt und für 7 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl AL-Puffer sowie 200 µl Ethanol (100%) vermischt und bei 14000 x g zentrifugiert. Das Gemisch wurde auf eine Säule (DNeasy Mini Spin Columns in 2 ml Collection Tubes) gegeben und für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Auf jede Säule wurden 500 µl Puffer AW1 gegeben und diese für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Nach dem Austausch des Röhrchens (2 ml Collection Tubes)

wurden 500  $\mu$ l Puffer AW2 hinzugefügt und die Proben zunächst für 3 Minuten, nach erneutem Wechseln des Röhrchens für weitere 2 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert.

Zur Mobilisierung der DNA wurden 200 µl AE-Puffer in die Säule gegeben und für mindestens eine Minute inkubiert. Schließlich wurde die DNA über eine einminütige Zentrifugation bei 8000 x g in ein Reaktionsgefäß eluiert.

#### 2.2.2.2. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist ein *in-vitro*-Verfahren, das eine Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten ermöglicht.

Zunächst werden die beiden DNA-Stränge bei einer Temperatur von 95 °C voneinander getrennt (Denaturierung), bei erniedrigter Temperatur hybridisieren im zweiten Schritt selektive Primer an die komplementären Stränge der Matrizen-DNA (*Annealing*). Die Taq-Polymerase verlängert bei 72 °C diese partiell doppelsträngige DNA durch Anlagerung freier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) in 5′-3′-Richtung, was zur Synthese neuer DNA-Stränge führt (Elongation). Über weitere Zyklen entstehen DNA-Abschnitte definierter Länge, die exponentiell vervielfältigt werden.

Die einzelnen Bestandteile der Reaktionsansätze sind der Tabelle 2 zu entnehmen, die Profile der thermischen Zyklen sowie deren Dauer sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2: PCR-Reaktionsansätze

Bestandteil	nphs2	<u>col4a3</u>
DNA	3 - 6 µl	6 -15 µl
dNTP (10 mM)	1 µl	0,5 μΙ
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,3 μΙ	0,5 μΙ
Taq-Polymerase-Puffer (10x)	2,5 μΙ	2,5 μΙ
Aqua dest.	13,2 -16,2 µl	5 - 14 µl
Primer forward (20 pmol)	1 μΙ	0,5 μΙ
Primer reverse (20 pmol)	1 µl	0,5 μΙ
Primer mutant (20 pmol)		0,5 μΙ

Tabelle 3: PCR-Protokoll von nphs2 und col4a3

Gen	nphs2	col4a3
Initiierende Denaturierung	94 °C / 5 min	95 °C / 4 min
Zyklenanzahl	40	a) 6; b) 45
Denaturierung	94 °C / 45 sec	95 °C / 45 sec
Hybridisierung	52 °C / 45 sec	a) 62 °C / 1 min; b) 58 °C / 1 min
Elongation	72 °C / 45 sec	72 °C / 2:30 min
Beendende Elongation	72 °C / 10 min	72 °C / 5 min

#### 2.2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Moleküle wurden anhand einer Agarosegelelektrophorese identifiziert, die deren größenabhängige Auftrennung ermöglicht. Durch die negative Ladung ihres Phosphatrückgrats wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode. Da die Negativität direkt proportional zur Länge der DNA ist, stellt sie selbst keinen Einfluss nehmenden Faktor dar. Die Laufgeschwindigkeit linearisierter DNA-Moleküle verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge.

Um einen effizienten Trennbereich der DNA-Fragmente zu gewährleisten, wurden für die Produkte der nphs2-PCR Gele mit einer Agarosekonzentration von 2% (w/v) hergestellt, für die col4a3-PCR eine Konzentration von 1,5% (w/v) gewählt. Dazu wurden pro Gel 30 ml TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge peqGOLD Universal Agarose, PEGLab (Erlangen, Deutschland) aufgekocht und mit 20 µl Ethidiumbromid (0,02%) versehen. Letzteres interkaliert zwischen die Basenpaare und lässt die DNA-Banden beim Bestrahlen mit ultraviolettem Licht fluoreszieren.

Die Taschen der Gele wurden mit jeweils 20 µl des PCR-Produktes in der Loading Dye Solution (6x) von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) beladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine bereits bekannte DNA-Probe verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 60 Minuten bei 120 Volt, als Laufpuffer diente TAE.

#### 2.2.3. Nachweis von Proteinen im Urin

Zur Feststellung einer möglichen Proteinurie wurde den Mäusen in ca. zweiwöchigen Abständen Urin entnommen und darin enthaltene Proteinkomponenten mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nachgewiesen.

#### 2.2.3.1. Chloroform-Methanol-Fällung

Im Vergleich zu anderen Methoden eignet sich die Fällung mit Chloroform und Methanol insbesondere für geringe Proteinmengen. Hierzu wurden zunächst 18 µl von jeder Urinprobe mit 400 µl Methanol (99,9%) verdünnt und die Proteine durch Versetzen der Lösung mit 100 µl Chloroform ausgefällt. Durch Zugabe von 380 µl destilliertem Wasser erfolgte eine Trennung der Lösung in

zwei Phasen, wobei sich die ausgefällten Proteine in der Interphase sammelten. Die obere wässrige Phase wurde verworfen, 400 µl Methanol hinzugefügt und die Probe für 2 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend befanden sich die Proteine am Boden des Reaktionsgefäßes. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 400 µl Methanol resuspendiert und erneut für 2 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und den Proben im Luftstrom unter dem Abzug für ca. 40 Minuten die restliche Flüssigkeit entzogen. Alle Zentrifugationen fanden bei Raumtemperatur statt.

#### 2.2.3.2. Polyacrylamidgelektrophorese

Die trockenen Proteinpellets wurden in 18 µl LDS Sample Buffer (2x) von NuPage, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. LDS denaturiert als anionisches Tensid die Proteine und überdeckt durch eine unspezifische Bindung deren Eigenladung. Durch die gleichmäßige negative Ladungsverteilung wandern somit die Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts. Die Elektrophoresekammer wurde mit NuPage-Laufpuffer, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) gefüllt und Anschluss die erste Tasche des 4-12%igen NuPage-Polyacrylamidgels, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) mit 10 µl des Molekulargewichtmarkers, die folgenden Taschen mit 20 µl der Proben beladen. Zunächst erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im Sammelgel für 30 Minuten bei einer Spannung von 80 Volt, dann für weitere 60 Minuten im Trenngel bei 120 Volt. Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel über 8 Stunden in Leitungswasser mit dessen mehrmaligem Austausch gewaschen. Das Gel wurde anschließend eingescannt, dokumentiert und die Proteinbanden mit der Kd1-Software, Kodak (Worcester, England) quantifiziert.

#### 2.2.4. Harnstoffbestimmung im Blut

Die Bestimmung des Harnstoffes wurde von Dr. med. Gunnar Brandhorst, Abteilung Klinische Chemie, Universitätsklinikum Göttingen, durchgeführt.

#### 2.2.5. Spezifischer Proteinnachweis in den Nieren

Um den Fibrosegrad der Nieren in Abhängigkeit des Alters der Mäuse zu ermitteln, wurden diese in den entsprechenden Zeitabständen entnommen und mit Hilfe des Western Blots auf eine Anreicherung spezifischer fibrotischer Wachstumsfaktoren sowie mittels Immunhistochemie auf eine Akkumulation des Bindegewebes untersucht.

#### 2.2.5.1. Western Blot

Der Western Blot ermöglicht die Identifizierung von Proteinbanden, indem diese nach einer Gelelektrophorese auf eine Membran übertragen werden und somit zugänglich für eine spezifische Bindung des primären Antikörpers sind. Mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, an dem das Enzym HRP gekoppelt ist, können die Proteine visualisiert werden. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol unter Emission von bläulichem Licht (Chemilumineszenz).

Zur Herstellung der Lysate wurde jede Mausniere in 500 µl Lysepuffer mittels Messerhomogenisator in 5-ml-Röhrchen für 30 Sekunden homogenisiert, anschließend in kleinere Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 16500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren. Die Proteinkonzentration jeder Proben wurde durch die Methode nach Bradford ermittelt. Hierbei erfolgt eine photometrische Messung bei 595 nm gegen die BSA-Standards 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 [mg/ml] des Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Sets von Biorad (München, Deutschland), aus der mit Hilfe einer Eichkurve die Proteinkonzentration errechnet werden kann. Zur Extinktionsbestimmung wurden die Proben zunächst 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend 20 µl der Proben sowie 20 µl der Standards mit 980 µl des Quick Start Bradford Dye Reagent von Biorad (München, Deutschland) versehen.

#### Proteinbestimmung nach Bradford

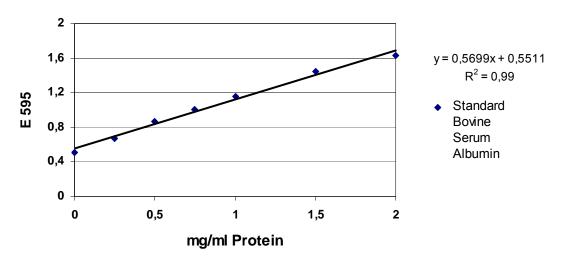


Abbildung 3: Proteinbestimmung nach Bradford

Für die LDS-PAGE wurden je 100 μg Protein/20 μl verwendet und diese mit 2 μl des Sample Reducing Agent (10x) und 5 μl LDS Sample Buffer (4x) von NuPage, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) versehen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 95 °C erfolgte die Auftragung der denaturierten Proteine auf ein 4-12%iges Polyacrylamid-Gel (NuPage, Invitrogen) und die elektrophoretische Auftrennung für 30 Minuten bei 80 Volt, danach für weitere 60 Minuten bei 120 Volt. Der Transfer der Proteine von dem Gel auf eine Immuno-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad (Hercules, CA) fand in einer Tankblot-Apparatur für 60 Minuten bei 100 Volt statt.

Nach dem Blotten wurde die Membran für einige Minuten in TBST gewaschen und im Anschluss unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde mit Blockierungslösung abgesättigt. Zur Detektion von TGFß erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper (1:2000 in TBST) bei 4°C über Nacht. Überschüssiger Antikörper wurde mit Hilfe von TBST für 4 x 15 Minuten entfernt und die Membran anschließend für eine Stunde dem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper (1:20.000 in TBST) ausgesetzt. Nachdem die Membran ein weiteres Mal für 4 x 15 Minuten in TBST gewaschen wurde, erfolgte die Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurden je 1 ml der beiden Bestandteile des Western Lightning Plus ECL von Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA) vermischt und auf die Membran gegeben. Die Expositionszeit des Röntgenfilms, Fuji

medical X-Ray Super RX 100NIF, FujiFilm Europe (Düsseldorf, Deutschland) betrug zwischen 5-90 Sekunden, bis die Proteine mit Hilfe des Chemilumineszenzdetektors nachweisbar waren.

Um den Nachweis weiterer Proteine auf dem selben Western Blot zu ermöglichen, wurde die Membran zunächst für 15 Minuten durch den Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific (Waltham,MA) von den vorherigen Antikörpern befreit, dann für 5 Minuten in destilliertem Wasser und für eine Stunde in Blockierungslösung inkubiert. Die anschließende Detektion von CTGF (Primär-Antikörper 1:2000 in TBST, Sekundär-Antikörper 1:10.000 in TBST) sowie der Nachweis von Actin (Primär-Antikörper 1:5000 in TBST, Sekundär-Antikörper 1:10.000 in TBST) als letzten Schritt erfolgten nach dem für TGFß beschriebenen Prinzip.

#### 2.2.5.2. Immunhistochemische Lamininfärbung

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis antigener Strukturen in Gewebeschnitten. Bei der indirekten Methode bindet ein Primärantikörper an das gesuchte Epitop, gegen den sich im Anschluss ein Sekundärantikörper richtet. Durch dessen Kopplung an Markersubstanzen wie dem rot fluoreszierenden Farbstoff Cy3 werden die im Gewebe gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Nach Entnahme der Mäusenieren folgte deren Fixierung in 4%igem Formalin, die Einbettung in Paraffin und letztlich die Anfertigung 3 µm dünner Nierenlängsschnitte mit dem Mikrotom Autocut 2040 von Reichert-Jung (Nussloch, Deutschland). Die Schnitte wurden zunächst bei 80 °C für 30 Minuten erwärmt und zweimal für 15 Minuten in Xylol entparaffinisiert. Die Rehydratisierung erfolgte für jeweils 5 Minuten in 99%-, 90%-,80%- und 70%-igem Ethanol und für 3 Minuten in destilliertem Wasser.

Die Nierenschnitte wurden mit 10 µl Proteinase K und 990 µl Tris-Puffer (pH 7,5) für 10 Minuten bei 37 °C angedaut und danach dreimal für zehn Minuten in TBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine einstündige Inkubation mit Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur.

Jeder Schnitt wurde mit ca. 100 µl Primärantikörper gegen Laminin in einer Konzentration von 1:25 bedeckt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Eine

Negativkontrolle ohne Primärantikörper wurde parallel angefertigt, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu bestimmen.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte für 3x10 Minuten in TBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit 3% Normalserum in Waschpuffer 2 geblockt. Der Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper wurde im Verhältnis von 1:200 verdünnt und auf alle Schnitte inklusive der Kontrolle aufgetragen und für 60 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Ungebundener Antikörper wurde im Anschluss durch 3x15-minütiges Waschen in TBS entfernt. Nach dem Eindecken in Fluorescent Mounting Medium, Dako (Hamburg, Deutschland) wurden die Nierenschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop digital fotografiert. Zur histologischen Beurteilung der Nieren wurden die Bilder verschlüsselt und nach fibrotischen Veränderungen in fünf Kategorien eingestuft.

#### 2.2.6. Elektronenmikroskopie der Mäusenieren

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Nieren sowie die dafür notwendige Präparation der Nierenschnitte wurden von Jenny Krügel, Doktorandin der Abteilung für Prothetik/Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Göttingen, durchgeführt.

#### 2.2.7. Stastistische Auswertung

Die erhobenen Daten aus den Proteingelen und den Western Blots wurden mithilfe des Statistikprogramm Statistica von StatSoft (Hamburg, Deutschland) unter Anwendung des *t*-Tests ausgewertet. Die Diagramme der Proteinausscheidung im Urin (Abbildung 6, Seite 29) wurden mithilfe von Statistica (StatSoft) erstellt, die restlichen Diagramme basieren auf dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Microsoft Office (Unterschleißheim, Deutschland).

#### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Genotypische Zuordnung der Mäuse aus dem Tiermodell

Innerhalb der ersten Lebenswochen wurde bei den Mäusen der col4a3- und nphs2-Genotyp mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion bestimmt (Abbildung 4). Bei der nphs2-PCR lag neben einem amplifizierten Wildtyp-Allel ein zweites PCR-Produkt vor, das dem mutierten Allel entspricht. Die Identifizierung des col4a3-*Knockout*s basiert auf dem Nachweis einer Neomycin-Kassette im Exon 5 des col4a3-Gens. Der Einbau dieser Neomycin-Kassette verhindert die vollständige Transkription des Genabschnittes der NC1-Domäne und stört somit die Biosynthese des Proteins (Cosgrove et al. 1996). Insgesamt wurden durch diese Methode von 130 Mäusen 22 (16,9 %) als col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/-</sup>-doppeltheterozygot erkannt.

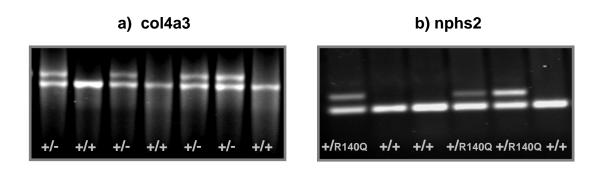


Abbildung 4: Genotypisierung der Mäuse (Polymerasekettenreaktion)
a) Col4a3-PCR. Der durch die obere Bande dargestellte Teilabschnitt des mutierten Allels besteht aus circa 1020 bp, die untere Bande besteht aus etwa 950 bp und weist das Wildtyp-Allel nach. b) Nphs2-PCR. Die obere Bande zeigt ein Fragment des mutierten Allels mit einer Größe von 378 bp, die untere Bande einen Wildtyp-DNA-Abschnitt mit 264 bp.

#### 3.2. Untersuchung und Verlauf der Proteinurie

Der Nachweis einer Proteinurie lässt Rückschlüsse auf die Lokalisation der Nierenschädigung zu. So spricht die Ausscheidung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von > 60 kDa für eine Schädigung der Blut-Harn-Schranke im Glomerulus, kleinere Proteine passieren physiologischerweise die Blut-Harn-Schranke und deuten auf eine mangelnde Rückresorption im Tubulussystem hin.

Zur Quantifizierung einer möglichen Proteinurie der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse wurden Urinproben in zweiwöchigen Abständen gewonnen und mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht. Die Proteinmuster der doppelt-heterozygoten Mäuse wurden zusätzlich mit denen von einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>- und nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen verglichen. Insbesondere lag das Interesse auf der Ausscheidung hochmolekularer Proteine als Zeichen einer glomerulären Schädigung.

Abbildung 5 zeigt, dass sich im Urin der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse neben niedermolekularen Proteinen auch Makromoleküle ≥ 62 kDa befanden. Eine vergleichbares Ausscheidungsmuster war bei einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>bzw. nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen nicht zu finden.

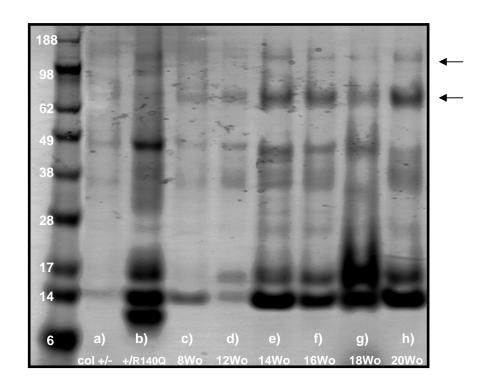


Abbildung 5: Proteinausscheidungsmuster von col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen im Vergleich zu col4a3<sup>+/-</sup> und nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen (Proteingel). Proteinverluste im Urin einer a) einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>-Maus im Alter von 21 Wochen und einer b) einfach-heterozygoten nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Maus desselben Alters verglichen mit c-h) col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen im Alter von 8, 12, 14, 16, 18 und 20 Wochen; Pfeile kennzeichnen die Zunahme der Proteinausscheidung im Bereich von 62 kDa und 98 kDa mit steigendem Alter der Mäuse. Bandengrößen sind in kDa angegeben.

Um den Verlauf der Proteinurie zu analysieren, wurden die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 62 kDa (Molekulargewicht von Albumin), 98 kDa (Molekulargewicht von Phosphorylase) und 188 kDa (Molekulargewicht von Myosin und Immunglobulinen) quantifiziert. Die Diagramme in Abbildung 6 zeigen die Mittelwerte der Proteinausscheidung. Die Bandenintensität diente als

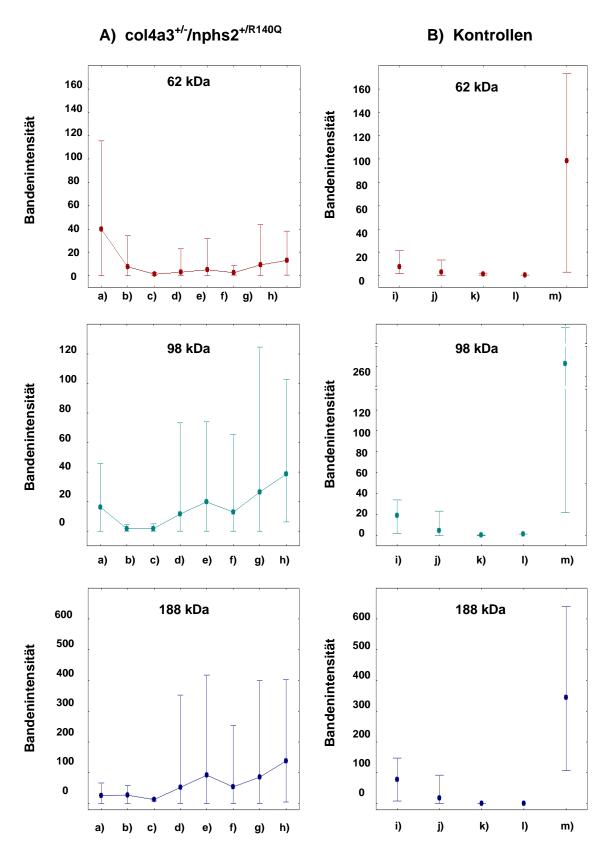


Abbildung 6: Ausscheidung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 62 kDa, 98 kDa und 188 kDa.

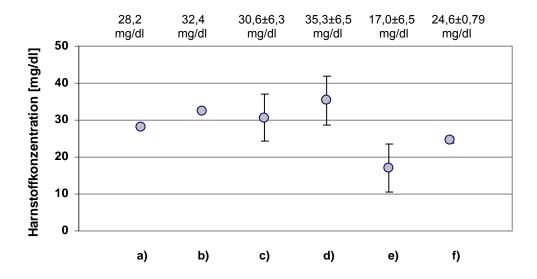
A) Mittlere Proteinausscheidung von **a-h**) col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse im Alter von **a**) 6 (n=5), **b**) 8 (n=6), **c**) 10 (n=2), **d**) 12 (n=10), **e**) 14 (n=10), **f**) 16 (n=6), **g**) 18 (n=5), **h**) 20 (n=3) Wochen. B) Mittlere Proteinausscheidung von **i-j**) Wildtypmäusen im Alter von **i**) 6-13 Wochen (n=5) und **j**) 18-25 Wochen (n=6), **k**) einfach-heterozygoten nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen im Alter von 21-25 Wochen (n=2), **l**) col4a3<sup>+/-</sup>-Mäusen im Alter von 21-25 Wochen (n=2) und **m**) 4-7 Wochen alte Alportmäusen (n=3).

Zusätzlich ist der maximale bzw. minimale Wert angegeben. Bandenintensität x 1000.

Maß für die Stärke der Proteinausscheidung und gibt die absoluten Werte der Quantifizierung an. Col4a3 $^{+/-}$ /nphs2 $^{+/R140Q}$ -Mäuse wiesen im Alter von sechs Wochen eine Albuminurie auf, die sich bereits nach acht Wochen zurückbildete und sich im Anschluss kaum von den Kontrollen mit Ausnahme der Alportmäuse unterscheidet. Im Gegensatz dazu nahm im Verlauf von 20 Wochen eine Proteinurie im Bereich von 98 kDa und 188 kDa tendenziell zu. Allerdings wiesen auch die Wildtypproben im Alter von sechs bis 13 Wochen eine erhöhte Proteinausscheidung auf, die sich jedoch zwischen 18 und 25 Wochen nicht mehr feststellen ließ. In allen drei Molekularbereichen wiesen die Alportmäuse bereits im Alter von vier bis sieben Wochen eine signifikante Proteinurie (Signifikanzniveau  $\alpha$ <0,01) auf.

#### 3.3. Harnstoffkonzentrationen im Serum

Harnstoff Abbau ist ein Stoffwechselendprodukt dem aus von Stickstoffverbindungen und wird als ungeladenes Molekül mit einem geringen Molekulargewicht frei filtriert. Normalerweise werden circa 40 % des filtrierten Harnstoffes in Anhängigkeit glomerulärer Filtrationsrate von und Diurese/Antidiurese **Besteht** eine schwerwiegende ausgeschieden. Nierenschädigung, Filtrationsleistung verringert sich die und die Harnstoffkonzentration im Serum nimmt zu.



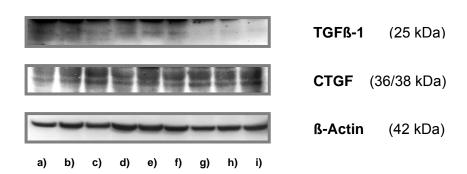
**Abbildung 7: Harnstoffbestimmung im Urin.** Mittelwerte von **a, b)** Wildtypen im Alter von **a)** 60 Tagen (n=1) und **b)** 180 Tagen (n=1) und **c)** einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup> (n=3; 100, 150, 180 Tage) und **d)** nphs2  $^{+/R140Q}$ -Mäusen (n=2; 150,180 Tage) im Vergleich zu **e, f)** col4a3<sup>+/-</sup> /nphs2  $^{+/R140Q}$ -Mäusen im Alter von **e)** 60 Tagen (n=3) und **f)** 180 Tagen (n=3).

Die ermittelten Blutharnstoffkonzentrationen der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse ergaben sowohl im Vergleich mit anderen Mäusen als auch mit einem von Gross et al. (2004 a) ermittelten Grenzwert um 50 mg/dl keinen Hinweis auf eine Einschränkung der Filtrationsleistung.

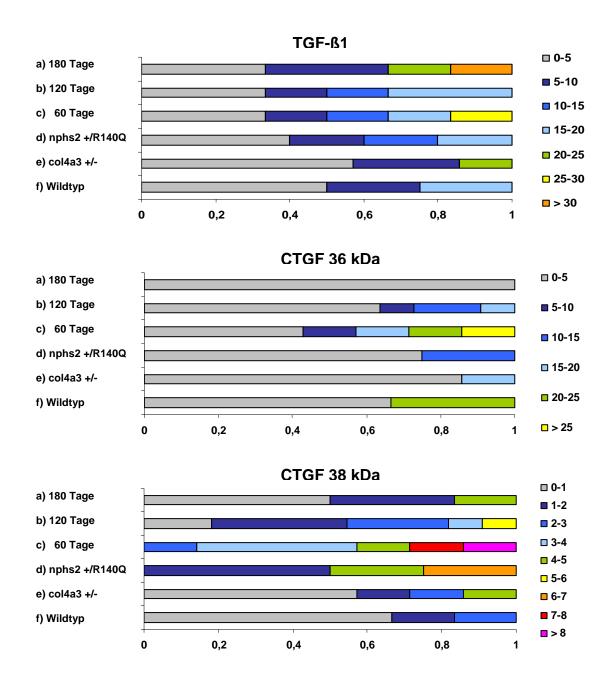
# 3.4. Nachweis der profibrotischen Faktoren TGF-ß1 und CTGF

Progressive Nierenerkrankungen basieren auf einer Akkumulation extrazellulärer Matrix, deren Synthese über verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert wird. Für den *Transforming Growth Factor-ß1* (TGF-ß1) und den *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) konnte gezeigt werden, dass deren Überexpression zu einer Induktion von Genen führt, die für Kollagene, Proteoglykane und andere Matrix-Proteine kodieren. Da die TGF-ß1- und CTGF-Konzentrationen in der Niere mit dem Fibrosegrad korrelieren, dienen sie als profibrotische Marker (Border et al. 1990, Phanish et al. 2010, Sayers et al. 1999).

Die TGF-ß1- und CTGF-Konzentrationen wurden anhand von Western Blots in insgesamt 14 Nieren ermittelt. Im Anschluss folgte ein Vergleich zwischen den Werten der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse im Alter von 60, 120 und 180 Tagen mit denen vom Wildtyp und der einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>beziehungsweise nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Tiere.



**Abbildung 8: Western Blot für TGFß-1, CTGF und ß-Actin**. **a)** Wildtyp im Alter von 180 Tagen; **b-g)** col4a3\*/-/nphs2\*/R140Q-Mäuse im Alter von **b)** 180 Tagen, **c)** 120 Tagen, **d)** 60 Tagen, **e)** 180 Tagen, **f)** 120 Tagen, **g)** 60 Tagen; **h)** nphs2\*/R140Q-Genotyp im Alter von 180 Tagen, **i)** col4a3\*/--Genotyp im Alter von 180 Tagen.



#### Abbildung 9: Quantifizierung der TGF-ß1- und CTGF-Signale

**a-c)** Col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse im Alter von **a)** 180 Tagen (n=2, p=6), **b)** 120 Tagen (n=2, p=6) und **c)** 60 Tagen (n=2, p=6); **d)** nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Maus im Alter von 180 Tagen (n=1, p=4); **e)** col4a3<sup>+/-</sup>-Mäuse im Alter von 100 (n=3, p=3) und 180 Tagen (n=1, p=4); f) Wildtyp im Alter 100 (n=1, p=1), 150 (n=1, p=1) und 180 Tagen (n=1, p=2).

**CTGF (36 und 38 kDa) a-c)** Col4a3\*/-/nphs2\*/ $R^{140Q}$ -Mäuse im Alter von **a)** 60 Tagen (n=2, p=7), **b)** 120 Tagen (n=2, p=11) und **c)** 180 Tagen (n=2, p=6); **d)** nphs2\*/ $R^{140Q}$ -Maus im Alter von 180 Tagen (n=1, p=4); **e)** col4a3\*/-Mäuse im Alter von 100 (n=3, p=3) und 180 Tagen (n=1, p=4); f) Wildtyp im Alter 100 (n=1, p=1), 150 (n=1, p=1) und 180 Tagen (n=1, p=4).

Legende: Einteilungsniveaus der Bandenintensität (dimensionslos) bei TGF-ß1 x 10.000, CTGF 38 kDa x 10.000, CTGF 36kDa x 1000.

Zur Auswertung der Western Blots wurden die Messwerte anhand ihrer Bandenintensität in mehrere Niveaus eingestuft, die zwischen einem geringen bis zu einem sehr hohen Nachweis der profibrotischen Faktoren differenzieren. In Abbildung 9 weisen graue Balken auf eine geringe fibrotische Aktivität hin, rote Balken stellen einen hohen Nachweis von TGF-ß1 und CTGF in den Nieren dar. Details zur Einteilung können der Legende entnommen werden.

Für TGF-ß1 wiesen zwei Drittel der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Proben eine Bandenintensität von über 50000 auf, hingegen erreichte nur die Hälfte der Wildtypproben diesen Wert. Besonders starke Signale für TGF-ß1 zeigten sich bei 60 Tage alten und 180 Tage alten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Tieren. Ein Drittel des Wildtyps zeigte relativ hohe Konzentrationen für die 36-kDa-Fraktion, die sich aber nicht in der 38-kDa-Untereinheit oder in den einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>- oder nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Nieren wiederfanden. Letztere zeigten erhöhte 38-kDa-CGTF-Konzentrationen. Die stärksten Signale für beide Fraktionen konnten in den Nieren von col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen im Alter von 60 Tagen nachgewiesen werden.

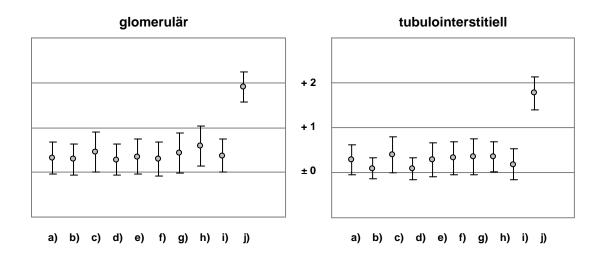
# 3.5. Charakteristik ultrastruktureller Veränderungen in den Nieren

#### 3.5.1. Auswertung der immunhistochemischen Lamininfärbung

col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Auswirkungen der Um die histologischen Genveränderung zu untersuchen, wurden Nierenschnitte der verschiedenen Genotypen angefertigt und Laminin-1 (EHS-Laminin,  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 1) immunhistochemisch angefärbt. Da ein fibrotischer Umbau des Nierengewebes vor allem auf einer gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrix beruht, zeigt die Stärke des Laminin-1 als ein wesentlicher Bestandteil der Extrazellulärmatrix den Grad der glomerulären und tubulointerstitiellen Fibrose an. Insgesamt neun col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Nieren, jeweils drei Nieren für eine Altersgruppe, sowie sieben Kontrollnieren wurden anhand von 397 Fotografien blind in fünf Fibrosegrade von ±0 für keine sichtbaren fibrotischen Veränderungen bis +2 für einen schweren fibrotischen Umbau eingestuft. Die Vorlage für die Einteilung befindet sich im Anhang.

Mit Ausnahme der Alportmäuse, die eine schwere glomeruläre und tubulointerstitielle Fibrose aufwiesen (glomerulär + 1,90; tubulointerstitiell

+ 1,77), wurden die glomerulären Veränderungen aller Nieren im Mittel zwischen den Werten von +0,28 bis +0,58 eingeordnet (Abbildung 10). Abweichungen in dem tubulointerstitiellen Aufbau zwischen den verschiedenen Nierenschnitten waren mit Werten von +0,09 bis +0,40 ebenso relativ gering. Die Abbildung 11 zeigt Beispielbilder der immunhistochemisch angefärbten und beurteilten Nierenschnitte.



**Abbildung 10:** Beurteilung der glomerulären und tubulointerstitiellen Veränderungen. **a, b)** Wildtyp im Alter von **a)** 60 Tagen (n=1) und **b)** 180 Tagen (n=1); **c-e)** col4a3<sup>+/-</sup>-Genotyp, **c)** 60 Tage (n=1), **d)** 100 Tage (n=1) und **e)** 180 Tage alt (n=2); **f)** nphs2<sup>+/R140Q</sup>—Genotyp, 180 Tage alt (n=2); **g-i)** col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>—Genotyp im Alter von **g)** 60 Tagen (n=3), **h)** 120 Tagen (n=3) und **i)** 180 Tagen (n=3); **j)** col4a3<sup>-/-</sup>-Genotyp, 60 Tage alt (n=2). ±0: keine Fibrosezeichen; +1: moderate glomeruläre und tubulointerstitielle Fibrosierung; +2: schwerer fibrotischer glomerulärer und tubulointerstitieller Umbau.

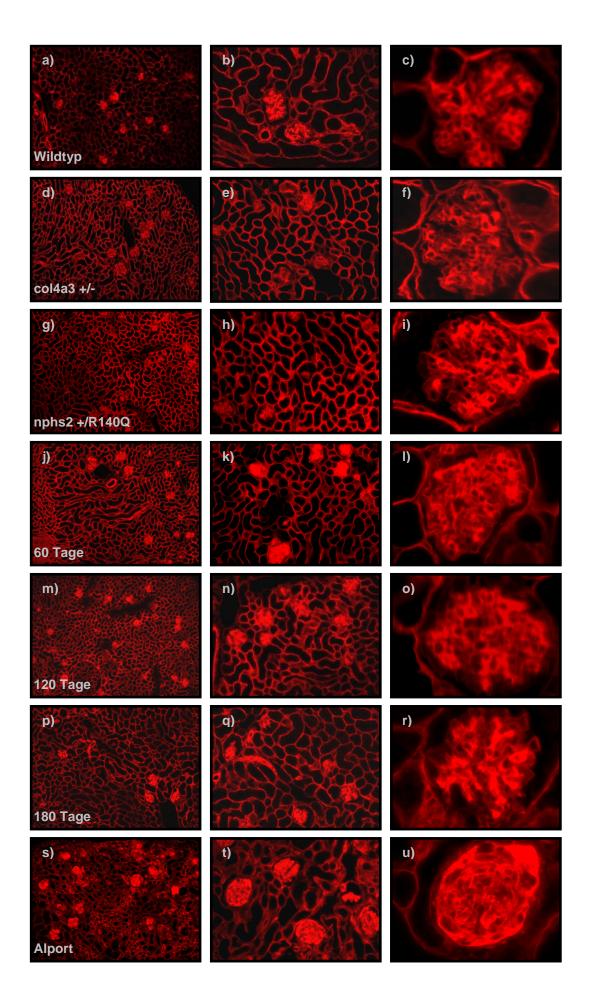


Abbildung 11 (Seite 35): Immunhistochemische Laminin-1-Färbung. Zwischen den 180 Tage alten (a-c) Wildtyp-, (d-f) col4a3<sup>+/-</sup> oder (g-i) nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Nieren und den Nieren der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse zeigen sich im Verlauf von (j-l) 60 Tagen, (m-o) 120 Tagen und (p-r) 180 Tagen nur geringe Abweichungen. (s-u) Fortgeschrittene Glomerulosklerose bei einer Alportmaus im Alter von 50 Tagen. Vergößerung: (a, d, g, j, m, p) x 100; (b, e, h, k, n, q) x 200; (c, f, i, l, o, r) x 400.

## 3.5.2. Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die **Abbildung** 12 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines gesunden Glomerulus. Dieser weist den charakteristischen dreischichtigen Aufbau der Blut-Harn-Schranke aus fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran und den Podozytenfußfortsätzen auf. Deutlich erkennbar sind die Abgrenzungen zwischen den einzelnen Fußfortsätzen. Im Gegensatz dazu zeigen elektronenmikroskopische Bilder von Tage alten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Nieren (Abbildung 13 c, d) deutliche Veränderungen in der Architektur der Blut-Harn-Schranke. Auffällig

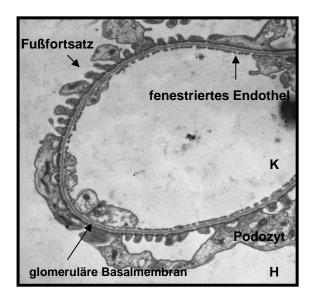


Abbildung 12: Elektronenmikroskopie der glomerulären Kapillarschlinge einer Wildtyp-Maus im Alter von 180 Tagen
Dreischichtiger Aufbau der Blut-Harn-Schranke aus fenestriertem Endothel, glomerulärer Basalmembran und Podozytenfußfortsätzen, die sich deutlich voneinander absetzen. Vergrößerung: 1x7000. K = Kapillarlumen, H = Harnseite. Quelle: O. Gross, unveröffentlichte Aufnahme.

sind die miteinander verschmolzenen Podozytenfußfortsätze und der Verlust der Schlitzmembran als Ausdruck eines fibrotischen Umbaus der Nieren. Des Weiteren verläuft die glomeruläre Basalmembran nicht gleichmäßig, sondern weist an mehreren Stellen Verdickungen auf. Während im Alter von 60 Tagen die Podozytenstruktur weitestgehend intakt erscheint, sieht man bereits bei 120 Tage alten Mäusen an mehreren Lokalisationen den Verlust der physiologischen Podozytenmorphologie (Abbildung 13 a, b).

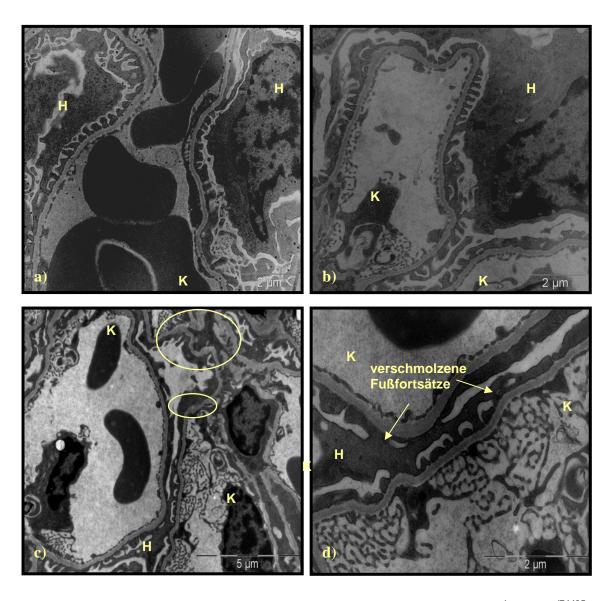


Abbildung 13: Elektronenmikroskopie der Blut-Harn-Schranke der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse. a) Nieren im Alter von 60 Tagen und b) 120 Tagen. Die charakteristische Podozytenstruktur ist vereinzelt aufgehoben. c, d) Nieren im Alter von 180 Tagen. Die Podozytenfußfortsätze sind miteinander verschmolzen, die Integrität der Schlitzmembran ist aufgehoben. Zudem weist die glomeruläre Basalmembran sporadische Verdickungen (Ellipsen) auf. K = Kapillarlumen, H = Harnseite.

#### 4. Diskussion

# 4.1. Fragestellung der Untersuchungen

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob die verminderte Expression von  $\alpha 3(IV)$ -Kollagen und Podocin die Interaktion zwischen der glomerulären Basalmembran und der Schlitzmembran beeinflusst und inwieweit sich doppeltheterozygote col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140</sup>-Mäuse von Tiermodellen mit Veränderungen im col4a3-Gen oder im nphs2-Gen hinsichtlich Nierenfunktion und Nierenstruktur unterscheiden.

#### 4.2. Verwandte Tiermodelle

Das bereits in der Einleitung vorgestellte Modell mit einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>-Mäusen zeigte, dass diese eine Hämaturie vergleichbar mit der familiären benignen Hämaturie beim Menschen entwickeln (Beirowski et al. 2006). Ebenso erkranken Mäuse mit col4a3-*Knockout* parallel zum Menschen an dem Vollbild des Alport-Syndroms und entwickeln frühzeitig eine Hämaturie sowie eine Proteinurie (Cosgrove et al. 2007). Obwohl sich bei nphs2<sup>R140Q/R140Q</sup>–Mäusen bereits wenige Tage nach der Geburt eine Proteinurie feststellen lässt und diese Tiere innerhalb von zwei Wochen an einem terminalen Nierenversagen versterben, wiesen heterozygote nphs2<sup>+/R140Q</sup>–Mäuse bei einer Untersuchungsdauer von einem Jahr weder eine Proteinurie noch histologisch schwerwiegende Veränderungen der Nieren auf (Philippe et al. 2008).

#### 4.3. Bewertung der Proteinausscheidung

Nach einem anfänglichen Proteinverlust im Alter von circa sechs Wochen lässt sich im Urin der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/-</sup>-Mäuse im Alter von acht und zehn Wochen keine Proteinurie nachweisen. Ab einem Alter von zwölf Wochen nimmt die Ausscheidung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 98 kDa und 188 kDa stetig zu und erreicht mit 20 Lebenswochen ihren höchsten Wert. Im Vergleich zeigen die Kontrollen im Alter von 18 bis 25 Wochen eine wesentlich geringere Proteinurie mit Ausnahme der Alportmäuse. Der relativ hohe Proteinnachweis bei sechs Wochen alten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/-</sup>-Mäusen ist eventuell auf eine noch nicht vollständig ausgereifte Blut-Harn-Schranke zurückzuführen.

Zumindest unterscheiden sich die Ausscheidungsmuster zu späteren Urinproben insofern, dass sie keine Verluste von 188-kDa-Proteinen zeigen, sondern vermehrt 62-kDa-Proteine wie Albumin ausgeschieden werden. Ob ein ähnlicher Grund für den erhöhten Verlust von 98-kDa- und 188-kDa-Proteinen in den Wildtypproben zwischen sechs und 13 Wochen verantwortlich sein kann ist fraglich. Eine spätere Albuminurie lässt sich bei den col4a3+/-/nphs2+/--Mäusen nicht nachweisen, obwohl Albumin mit einem geringeren Molekulargewicht ebenfalls nachzuweisen sein müsste, sollte eine glomeruläre Schädigung vorliegen, bei der 98-kDa- und 188-kDa-große Proteine auf die Harnseite übertreten können. Eine signifikante Proteinurie ( $\alpha$  < 0,01) bei vier bis sieben Wochen alten Alportmäusen zeigte sich bereits in früheren Untersuchungen. Nach Sayers et al. (1999) entwickeln diese Mäuse im Alter von sechs Wochen eine milde Proteinurie, die im Alter von acht Wochen ihr Maximum erreicht. Im Einklang mit den von Philippe et al. (2008) dargestellten Ergebnissen konnte in dieser Arbeit bei nphs2+/--Mäusen im Alter von 21 und 25 Wochen keine Proteinurie festgestellt werden. Eine von Beirowski et al. (2006) nachgewiesene milde Proteinurie der col4a3+/--Mäuse ab einer Lebenszeit von drei Monaten zeigte sich nicht.

# 4.4. Einschätzung der Nierenfunktion anhand der Blutharnstoffkonzentration

Die Harnstoffmessung im Blut der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse wies mit Konzentrationen von 17,0±6,5 mg/dl im Alter von 60 Tagen und 24,6±0,79 mg/dl im Alter von 180 Tagen auf keine schwere Nierenschädigung der Tiere hin. Liegt diese vor, entwickeln die Mäuse in der Regel Konzentrationen von über 50 mg/dl im Blut. Alportmäuse (129/SvJ) überschreiten beispielsweise bereits im Alter von sieben Wochen diesen Grenzwert, kurz vor ihrem Tod erreichen sie eine Serum-Harnstoffkonzentration von 247±27 mg/dl (Gross et al. 2004 a). Ebenso zeigt sich im Blut von homozygoten nphs2<sup>R140Q/R140Q</sup>-Mäusen ab dem vierten Lebenstag eine signifikante Zunahme des Harnstoffs, dessen Konzentration bis zum zwölften Lebenstag auf einen Wert von 140 mg/dl (> 50 mmol/l) ansteigt (Philippe et al. 2008).

#### 4.5. Analyse der fibrotischen Prozesse

TGF-ß1 und CTGF sind bekannte Mediatoren für pathophysiologische Prozesse bei chronischen Nierenerkrankungen (Border et al. 1990, Phanish et al. 2010, Sayers et al. 1999). Zwar ist die Pathogenese des Alport-Syndroms bis hin zur Nierenfibrose noch nicht endgültig aufgeklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Injektion eines kompetitiven TGF-ß1-Inhibitors den Untergang der Podozytenfußfortsätze sowie die Ausbreitung von extrazellulärer Matrix bei doppelt-homozygoten col4a3<sup>-/-</sup>/Integrin-α1β1<sup>-/-</sup>-Mäusen (129/Sv-Hintergrund) verzögert. Dieser Effekt scheint jedoch durch die alleinige Therapie mit dem TGF-ß1-Inhibitor nicht erreichbar zu sein (Cosgrove et al. 2000). Alportmäuse mit zusätzlichem Integrin-Knockout weisen ähnlich wie doppelt-homozygote col4a3<sup>-/-</sup>/DDR1<sup>-/-</sup>-Mäuse (129/Sv-Hintergrund) ohnehin eine Manifestation und eine langsamere Progression der Erkrankung auf (Cosgrove et al. 2000, Gross und Weber 2005). Der TGF-ß1-Inhibitor bewirkt jedoch eine verlängerte Überlebenszeit von 18-24 Wochen und zeigt, dass die TGF-ß1-Konzentration als Indikator für fibrotische Veränderungen in der Niere herangezogen werden kann.

In dieser Arbeit zeigte der Wildtyp die geringsten TGF-ß1-Werte, die höchsten Werte wiesen die 60 und 180 Tage alten col4a3+/-/nphs2+/R140Q-Mäuse auf. Bei den 60 Tage alten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen wurden außerdem die höchsten 36-kDa- und 38-kDa-CTGF-Konzentrationen gemessen. Diese Ergebnisse könnten auf einen fibrotischen Prozess hindeuten. Allerdings nahmen die CTGF-Werte bei den älteren Mäusen wieder ab. Der Wildtyp zeigte besonders hohe Werte für die 36-kDa-Fraktion, während auch die nphs2+/R140Q-Kontrolle einen Anstieg für die 38-kDa-Fraktion von CTGF aufwies. Die heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>-Mäuse zeigten im Alter von 25 Wochen kaum Unterschiede zum Wildtyp. Beirowski et al. (2006) stellten fest, dass das TGFß1-Signal und das CTGF-Signal erst im Alter von 30 Wochen deutlich ansteigt. Für einen weiteren Vergleich dienen die Konzentrationen der profibrotischen Faktoren in den Nieren von Alportmäusen. Bei diesen ist die mRNA von TGF-ß1 insbesondere in den Podozyten signifikant erhöht. Mit Beginn der Proteinurie im Alter von sechs Wochen steigt die TGF-ß1-mRNA-Konzentration an und erreicht in der achten Woche mehr als den sechsfachen Wert der Kontrolltiere. Anschließend sinken die mRNA-Werte von TGF-ß1 auf das Fünffache nach

zehn Wochen, nach zwölf Wochen besitzen sie noch die doppelte Konzentration der Wildtypmäuse (Sayers et al. 1999). Diese im zeitlichen Verlauf abnehmende Entwicklung in der Signalstärke zeigte sich auch bei den col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen im Rahmen dieser Arbeit.

# 4.6. Beurteilung des strukturellen Umbaus an der Blut-Harn-Schranke

Eine Einordnung in Fibrosestadien anhand der immunhistochemischen Laminin-Färbung ergab keinen Hinweis auf einen relevanten narbigen Umbau der col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Nieren. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnten dagegen eindeutige ultrastrukturelle Veränderungen nachgewiesen werden. So zeigte sich insbesondere im Alter von 180 Tagen eine unregelmäßig verdickte Basalmembran sowie eine Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze unter dem Verlust der Schlitzmembran als Ausdruck der glomerulären Schädigung. Da sich in früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von col4a3<sup>+/-</sup>- oder nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Nieren keine Auffälligkeiten feststellen ließen (Beirowski et al. 2006, Phillipe et al. 2008), kann angenommen werden, dass die glomeruläre Schädigung der doppelt-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse eine Folge der geringeren Expression von Podocin und der α-Kette des Typ-IV-Kollagens ist.

# 4.7. Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik der Untersuchungen und deren Ergebnissen

Der in der Einleitung beschriebene schwere Verlauf einer erblichen Nierenerkrankung basiert auf eine X-chromosomal vererbte col4a5-Mutation bei einem zusätzlichen Polymorphismus im Podocin-Gen. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass der Podocin-Polymorphismus die heterozygote Erkrankung im col4a5-Gen verstärkt und zur Ausbildung einer frühen Niereninsuffizienz beiträgt.

Grundsätzlich ist anzunehmen, dass die im Tiermodell vorliegende R140Q-Mutation im Podocin-Gen als eine *Loss-of-function*-Mutation die Nierefunktion stärker beeinflusst als der Polymorphismus dieses Gens, der in der österriechischen Familien beschrieben wird und üblicherweise zu keiner phänotypischen Ausprägung führt. Sollten Veränderungen im nphs2-Gen für die Niereninsuffizienz mitverantwortlich sein, würde die heterozygote Podocin-

Mutation im Tiermodell die Entstehung einer Erkrankung unterstützen. Dass dennoch die Genveränderungen vergleichbar waren, wird durch die Untersuchung der einfach-heterozygoten nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäuse in dieser Arbeit unterstützt, bei denen keinerlei Anzeichen einer renalen Beeinträchtigung nachzuweisen waren.

Obwohl eine Mutation in einer der drei  $\alpha 3(IV)$ -,  $\alpha 4(IV)$ - oder  $\alpha 5(IV)$ -Ketten den kompletten Umbau des Typ-IV-Kollagens in eine α1α2α1-Struktur führt, zeigen sich je nach der Lokalisation des primären Defekts unterschiedliche Krankheitsverläufe. Die Expression einer mutierten α5(IV)-Kollagenkette unterliegt bei weiblichen Merkmalsträgern aufgrund einer unterschiedlichen Inaktivierungen eines X-Chromosoms einer Variabilität (Lyon-Hypothese). Wie bereits erwähnt, entwickelten von 288 betroffenen Frauen zehn bis zwölf Prozent noch vor dem 40. Lebensjahr ein terminales Nierenversagen (Jais et al. 2003). Eine col4a3-Heterozygotie weist dagegen insgesamt einen milderen Verlauf auf. Zwar erkrankten auch hier 14 % von 127 untersuchten Patienten an einer Niereninsuffizienz, diese trat jedoch erst in einem mittleren Alter von 60 Jahren auf (Pierides et al. 2009). Somit könnten die in der Einleitung erwähnten Frauen aus Österreich zu den seltenen Personen gehören, die aufgrund einer heterozygoten col4a5-Mutation bereits in jungen Jahren unter einer Niereninsuffizienz leiden. Möglicherweise wird aber auch die col4a5-Heterozygotie stärker von dem Podocin-Polymorphismus beeinträchtigt als die im Tiermodell untersuchte col4a3-Heterozygotie.

## 4.8. Bedeutung für die Erforschung chronischer Nierenerkrankung

Im Sinne von Modellkrankheiten sind monogenetische Nierenerkrankungen besonders geeignet, einzelne Schritte in der Signaltransduktion sowie mögliche Proteininteraktionen zu untersuchen, die an einem fibrotischen Umbau des Nierenparenchyms beteiligt sind (Abbate und Remuzzi 2003, Gross und Weber 2005). Die Pathomechanismen reduzieren sich anscheinend nicht nur auf hereditäre Erkrankungen, sondern spielen auch eine Rolle bei erworbenen chronischen Nierenerkrankungen, da Glomerulonephritiden oder die diabetische Nephropathie letztendlich in einer Nierenfibrose münden (Gross 2005). Mit Hilfe von Tiermodellen können somit nicht nur molekulare Zusammenhänge zur Therapie von erblichen. sondern auch für erworbene chronische

Nierenerkrankungen ermittelt werden (Abbate und Remuzzi 2003). Bei Alport-Mäusen konnte bereits durch die Inhibition von DDR1-Rezeptoren oder TGF-ß1 nachgewiesen werden, dass das Verständnis zwischen den Wechselwirkungen einzelner Gene neue Therapiekonzepte ermöglicht. So führte die Hemmung von DDR1-Rezeptoren zu einer Reduktion der Fibrose in Alportnieren bei Mäusen (Gross und Weber 2005). Ebenso verzögerte sich bei doppelt-homozygoten col4a3-/-/Integrin-α1ß1-/--Mäusen nach der Injektion eines kompetitiven TGF-ß1-Inhibitors der Untergang der Podozytenfußfortsätze sowie die Ausbreitung von extrazellulärer Matrix (Cosgrove et al. 2000). Dass auch eine Interaktion zwischen der Schlitzmembran und glomerulärer Basalmembran besteht, zeigt die renale Beeinträchtigung der untersuchten col4a3+/-/nphs2+/R140Q-Mäuse. Weiterführende Analysen von Podocin und dem Typ-IV-Kollagen, auch im Zusammenhang mit anderen Proteinen, könnte helfen die Pathogenese des fibrotischen Umbaus bei renalen Erkrankungen genauer zu verstehen und therapeutisch zu nutzen.

# 5. Zusammenfassung

Der ungewöhnlich schwere Verlauf einer erblichen Nierenerkrankung in einer österreichischen Familie führte zu der Zielsetzung dieser Arbeit, im Mausmodell die Auswirkungen einer doppelt-heterozygoten Mutation in den col4a3<sup>+/-</sup>- und nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Genen zu untersuchen. Mutter und Tochter leiden aufgrund der Veränderung dieser Gene seit jungen Jahren unter einer Proteinurie und entwickelten bereits im Jugendalter eine terminale Niereninsuffizienz. Die Arbeitshypothese beruhte auf der Annahme, dass zwischen der glomerulären Basalmembran (col4a3-Gen) und der Schlitzmembran (nphs2-Gen) eine wichtige Interaktion besteht.

Die col4a3-/col4a4-/col4a5-Gene kodieren für die  $\alpha$ 3-,  $\alpha$ 4- und  $\alpha$ 5-Kette des Typ-IV-Kollagens der glomerulären Basalmembran, die ausschließlich von Podozyten exprimiert werden (Abrahamson e al. 2009). Homozygote Mutationen sind verantwortlich für das Alport-Syndrom, das in der Regel innerhalb von 20 Jahren zu einer terminalen Niereninsuffizienz führt. Heterozygote Merkmalsträger erkranken in der Regel an einer familiären benignen Hämaturie, ohne eine Proteinurie oder Niereninsuffizienz zu entwickeln (Gross und Weber 2005, Jais et al. 2003).

Podocin ist das Protein des Gens nphs2 und wird als Bestandteil der Schlitzmembran ausschließlich von Podozyten exprimiert. Mutationen in dem Podocin-Gen verursachen das Steroid-resistente nephrotische Syndrom mit einem autosomal-rezessiven Erbgang. Erkrankte leiden frühzeitig unter einer Proteinurie und entwickeln häufig bereits im Kindesalter ein terminales Nierenversagen. Heterozygote Merkmalsträger sind asymptomatisch (Boute et al. 2000).

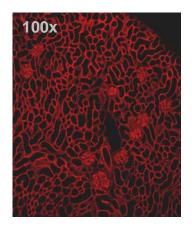
Die Kombination der beiden rezessiven Mutationen wurde im doppeltheterozgoten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Tiermodell hinsichtlich Proteinurie, Nierenfunktion und fibrotischer Veränderungen untersucht. Im Urin konnte im Bereich von 98 kDa und 188 kDa im Verlauf von zwölf bis 20 Wochen eine tendenzielle Zunahme der Proteinurie nachgewiesen werden. Bei gleichaltrigen Wildtyp- sowie einfach-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>- und nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Tieren zeigten sich im Mittel geringere Eiweißausscheidungen. Als Indikatoren für einen fibrotischen Umbauprozess wurden die TGF-ß1- und CTGF-Konzentrationen in

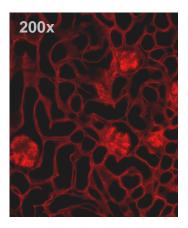
col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Nieren und in Wildtyp-, col4a3<sup>+/-</sup>- und nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Kontrollen mittels Western Blot bestimmt. Die höchsten TGF-ß1-Signale und CTGF-Signale wiesen die 60 Tage alten col4a3+/-/nphs2+/R140Q-Mäuse auf, außerdem konnte bei ihnen im Alter von 180 Tagen eine hohe TGF-ß1-Konzentration nachgewiesen werden. Der geringste Nachweis zeigte sich beim Wildtyp. In der immunhistochemischen Laminin-1-Färbung zeigten sich keine wesentlichen Abweichungen zwischen den col4a3+/-/nphs2+/R140Q-Nieren und den Kontrollen mit Ausnahme der Alportmäuse, die eine erhebliche Akkumulation extrazellulärer Matrix aufwiesen. Unter dem Elektronenmikroskop zeigten sich dagegen bei den doppelt-heterozygoten col4a3+/-/nphs2+/R140Q-Mäusen deutliche Veränderungen des glomerulären **Filters** Unregelmäßigkeiten in der glomerulären Basalmembran und Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze unter dem Verlust der Schlitzmembran.

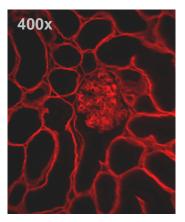
Zusammenfassend konnte in der Arbeit an den doppelt-heterozygoten col4a3<sup>+/-</sup>/nphs2<sup>+/R140Q</sup>-Mäusen gezeigt werden, dass sich die genetischen Veränderungen auf die Proteinausscheidung und den ultrastrukturellen Aufbau in der Niere auswirken, ohne aber im Tiermodell zur terminalen Niereninsuffizienz zu führen.

# 6. Anhang: Fibrosescore der Laminin-1-Immunhistochemie

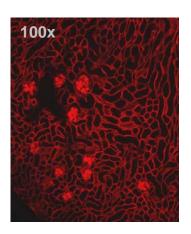
Grad ±0: keine Fibrosezeichen

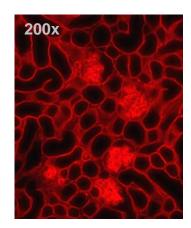


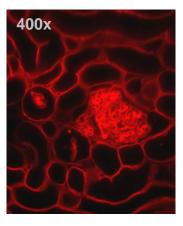




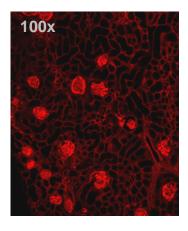
Grad +1: moderate glomeruläre und tubulointerstitielle Fibrosierung

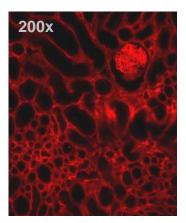


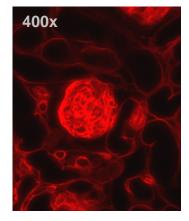




Grad +2: schwerer fibrotischer glomerulärer und tubulointerstitieller Umbau







# 7. Literaturverzeichnis

Abbate M, Remuzzi G (2003): Renoprotection: clues from knockout models of rare diseases. Kidney Int <u>63</u>, 764-766

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 <u>20</u>, 1471–1479

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

Beirowski B, Weber M, Gross O (2006): Chronic renal failure and shortened lifespan in COL4A3 +/- mice: an animal model for thin basement membrane nephropathy. J Am Soc Nephrol <u>17</u>, 1986-1994

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

Border WA, Okuda S, Languino LR, Ruoslahti (1990): Transforming growth factor-ß regulates production of proteoglycans by mesangial cells. Kidney Int <u>37</u>, 686-695

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 <u>24</u>, 349-354

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

Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A (2000): Integrin α1ß1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in Alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. Am J Pathol 157,1649–1659

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

Donoviel D, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, Mathur BN, Turner CA, Geske R, Montgomery CA et al. (2001): Proteinuria and perinatal lethality in mice laking neph1, a novel protein with homology to nephrin. Mol Cell Biol <u>21</u>, 4829-4836

Gross O: Pathogenese und Prävention der Typ IV Kollagenerkrankungen. Alport-Syndrom und Familiäre Benigne Hämaturie. Med. Habil.-Schr. Köln 2005

Gross O, Weber M: Von der Molekulargenetik des Alport-Syndroms zu Prinzipien der Organprotektion bei chronischen Nierenerkrankungen. In: Medizinische Klinik, Band 12, hrsg. v. Ertl G, Fölsch UR, Köbberling J, Märker-Herrmann E, Schölmerich J, Schultze-Werninghaus G, Trümper L, Weber M, Urban & Vogel, München 2005, 826-831

Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML (2004 a): Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE-inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibosis. Nephrol Dial Transplant 19, 1716-1723

Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorner PS, Smyth N, Addicks K, Bloch W (2004 b): DDR1-deficient mice show localized subepithelial BGM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. Kidney Int <u>66</u>, 102-11

Gunwar S, Ballester F, Noelken ME, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG (1998): Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. J Biol Chem <u>273</u>, 8767-75

Heidet L, Gubler MC (2009): The renal lesions of Alport syndrome. J Am Soc Nephrol <u>20</u>, 1210–1215

Heidet L, Arrondel C, Forestier L, Cohen Solal L, Mollet G, Guttierrez B, Stavrou C, Gubler MC, Antignac C (2001): Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. J Am Soc Nephrol 12, 97–106

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 <u>56</u>, 1481-1491

Huber TB, Benzing T (2005): The slit diaphragm: A signaling platform to regulate podocyte function. Curr Opin Nephrol Hypertens <u>14</u>, 211-216

Huber TB, Köttgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T (2001): Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. J Biol Chem <u>276</u>, 41543–41546

Huber TB, Hartleben B, Kim J, Schmidts M, Schermer B, Keil A, Egger L, Lecha RL, Borner C, Pavenstädt H et al. (2003 a): Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH-Kinase and stimulate AKT-dependent signaling. Mol Cell Biol 23, 4917-4928

Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E, Saleem MA, Walz G, Benzing T (2003 b): Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin to targeting to lipid raft microdomains. Hum Mol Genet 12, 3397-3405

Huber TB, Schermer T, Benzing T (2007): Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: Implications for mechanosensation at the slit diaphragm. Nephron Exp Nephrol 106, 27-31

Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K 1993: Type IV collagen: structure, gene organisation and role in human diseases. J Biol Chem <u>268</u>, 26033-26036

Ichimura K, Kurihara H, Sakai T (2003): Actin filament organisation of foot process in rat podocytes. J Histochem Cytochem 51, 1589-1600

Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, Ohshiro K, Kawachi H, Okada H, Suzuki H et al. (2001): FAT is a component of glomerular slit diaphragms. Kidney Int <u>59</u>, 1003-1012

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 <u>11</u>, 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

Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, Hill CM, Smeets HJ, Doherty CC, Maxwell AP (1997): Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collage α3 and α4 genes (COL4A3 and COL4A4). Nephrol Dial Transplant 12, 1595-1599

Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG (1997): Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. J Clin Invest 15, 2470-2478

Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rogriquez-Perez JC, Allen PG, Beggs AH (2000): Mutations in ACTN 4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nat Genet 24, 251-256

Kashtan CE: Collagen IV-related nephropathies (Alport Syndrome and thin basement membrane nephropathy). In: Gene Reviews [Internet], hrsg. v. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, o. Verl., Seattle, 2001 <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=alport">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=alport</a>

Kerjaschki D (2001): Caught flat-flooted: Podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. J Clin Invest <u>108</u>, 1583-1587

Kestilä M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, Mc Cready 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

Kim KH, Kim Y, Gubler MC, Steffens MW, Lane PH, Kashtan CE, Crosson JT, Mauer SM (1995): Structural-functional relationships in alport syndrome. J Am Soc Nephrol <u>5</u>, 1659-1668

Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS (2003): CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. Science 300, 1298-1300

Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E (2002): CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. Am J Physiol Renal Physiol 283, F734-743

Miner JH (1999): Renal basement membrane components. Kidney Int 56, 2016-2024

Miner JH, Sanes JR (1994): Collagen IV  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4, and  $\alpha$ 5 chains in rodent basal laminae: Sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. J Cell Biol 127, 879-891

Niaudet P, Fuchshuber A, Gagnadoux MF, Habib R, Broyer M (1997): Cyclosporine in the therapy of steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. Kidney Int Suppl <u>58</u>, 85-90

Oh J, Reiser J, Mundel P (2004): Dynamic (re)organization of the podocin actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol <u>19</u>, 130-137

Phanish MK, Winn SK, Dockrell MEC (2010): Connective Tissue Growth Factor-(CTGF, CCN2) - A marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. Nephron Exp Nephrol 114, 83-92

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

Pierides A, Voskarides K, Athanasiou Y, Ioannou K, Damianou L, Arsali M, Zavros M, Pierides M, Vargemezis V, Patsias C et al. (2009): Clinico-pathological correlations in 127patients in 11 large pedigrees, segregating one of three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant 24, 2721-2729

Pöschl E, Pollner R, Kühn K (1988): The genes for the  $\alpha 1(IV)$  and  $\alpha 2(IV)$  chains of human basement membrane collagen type IV are arranged head-to-head and seperated by a bidirectional promotor of unique structure. EMBO J 7, 2687-2695

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

Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P (2000): The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. J Am Soc Nephrol 11, 1-8

Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gubler MC, Antignac C (2002): Podocin Localizes in the Kidney to the Slit Diaphragm Area. Am J Pathol <u>160</u>, 131-139

Sayers R, Kalluri R, Rodgers KD, Shield CF, Meehan DT, Cosgrove D (1999): Role for transforming growth factor-beta 1 in alport renal diesease progression. Kidney Int <u>56</u>, 1662-1673

Schermer B, Benzing T (2009): Lipid-protein interactions along the slit diaphragm of podocytes. J Am Soc Nephrol <u>20</u>, 473–478

Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG (1990): The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. J Cell Biol 111,1255-63

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 <u>108</u>, 1621-1629

Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS (1999): Congenital nephrotic syndrom in mice lacking CD2-associated protein. Science <u>286</u>, 312-315

Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS (2001): CD2AP localizes to the slit diaphragm an binds to nephrin via a novel C-terminal domain. Am J Pathol <u>159</u>, 2303-2307

Simons K, Toomre D (2000): Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1, 31-39

Simons M, Schwarz K, Kriz W, Miettinen A, Reiser J, Mundel P, Holthofer H (2001): Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. Am J Pathol <u>159</u>, 1069-1077

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

Tryggvason K, Wartiovaara J (2005): How does the kidney filter plasma? Physiology (Bethesda) <u>20</u>, 96-101

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

Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, Wiggins RC, Killen P, Holzman LB (2003): Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component nephrin. J Biol Chem 278, 20716-20723

Yuan H, Takeuchi E, Salant DJ (2002): Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. Am J Physiol Renal Physiol <u>282</u>, 585-591

Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Paepe A, Tryggvason K, Reeders ST (1993): Deletion of the paired  $\alpha 5(IV)$  and  $\alpha 6(IV)$  collagen genes in inherited smooth muscle tumors. Science <u>261</u>, 1167-1169

# **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Oliver Gross bedanken für den Freiraum zum eigenständigen Arbeiten in Kombination mit hilfreichen Ratschlägen und kritischen Kommentaren.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, in der jeder bei Fragen und Problemen stets hilfsbereit war. Eine besondere Erwähnung gebührt PD Dr. Rainer Girgert, Andrea Bernhard und Diana Rubel für ihre umfassende Unterstützung und ihr Engagement. Ein ganz herzlicher Dank geht ebenfalls an Jenny Krügel für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Mäusenieren und die dafür notwendige Präparation der Nierenschnitte.