Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie

(Prof. Dr. med. G. A. Müller)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss des DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Genotyps auf die Interaktion zwischen glomerulärer Basalmembran und Schlitzmembran im Tiermodell

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Peter Schütte

aus

Braunschweig

Göttingen 2013

D e k a n:	Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Oliver Gross
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Jörg Wilting
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Mai 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Glomerulärer Filterapparat und physiologische Nierenfunktion 1

1.2 Pathophysiologie des Nierenversagens 3

1.3 Der Podozyt 4

1.3.1 Podozyt und Schlitzmembran 5

1.3.2 Podozyt und glomeruläre Basalmembran 7

1.4 Hypothese der GBM-SM-Interaktion 8

1.5 DDR1 11

1.6 Podocinmutationen und -polymorphismen 12

1.7 Tiermodell und Zielsetzung dieser Arbeit 13

2. Methoden 14

2.1 $DDR1^{+/-}$/$NPHS2^{+/R140Q}$-Tiermodell 14

2.2 Genotypisierung 14

2.3 Elektronenmikroskopie 18

2.4 Proteinurie-Gelelektrophorese 18

2.5 Western Blot 19

2.6 Immunhistochemie 21

2.7 Serumharnstoff 26

3. Ergebnisse 27

3.1 Elektronenmikroskopie 27

3.2 Proteinurie 30

3.3 Western Blot 34

3.4 Immunhistochemie 36

3.5 Serumharnstoff 40

4. Diskussion 41

4.1 Elektronenmikroskopie 41

4.2 Proteinurie 42

4.3 Western Blot 44

4.4 Immunhistochemie 45

4.5 Serumharnstoff 46
4.6 Bewertung und Ausblick 46

5. Zusammenfassung 48

6. Literaturverzeichnis 50

7. Abbildungsverzeichnis 55

8. Verwendete Materialien und Geräte 56
8.1 Genotypisierung 56
8.2 Proteinuriegele 56
8.3 Western Blot 57
8.4 Immunhistochemie 58
8.5 Serumharnstoffanalyse 59

Abkürzungsverzeichnis

BSA	-	Bovine Serum Albumin
bp	-	Basenpaare
°C	-	Grad Celsius
ca.	-	circa
CD2AP	-	CD2-associated protein
COL4A3	-	Gen der α3-Kette von Kollagen IV
CTGF	-	Connective Tissue Growth Factor
Cy 3	-	Cyanin 3
d	-	Tag
DDR1/2	-	Discoidin Domain Receptor 1/2 und das zugehörige Gen
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dATP	-	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	-	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	-	Desoxyguanosintriphosphat
dH_2O	-	destilliertes Wasser
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	-	Desoxythymidintriphosphat
d. h.	-	das heißt
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
EM	-	Elektronenmikroskopie
EtBr	-	Ethidiumbromid
GBM	-	Glomeruläre Basalmembran
kD	-	Kilo-Dalton
Min.	-	Minute
n	-	Anzahl
NPHS1	-	Nephrin-Gen

NPHS2	-	Podocin-Gen
PCR	-	Polymerasekettenreaktion
PVFD	-	Polyvinylidenfluorid
Q	-	Glutamin
R	-	Arginin
rpm	-	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
Sek.	-	Sekunde
SM	-	Schlitzmembran
SRNS	-	Steroid-resistentes Nephrotisches Syndrom
SD	-	Standardabweichung
TAE	-	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	-	Tris-buffered Saline
TBST	-	Tris-buffered Saline/Tween
TGFβ	-	Transforming Growth Factor beta
z. B.	-	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Glomerulärer Filterapparat und physiologische Nierenfunktion

Die kleinste Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, welches aus Glomerulum und Tubulussystem besteht.

Im Glomerulum erfolgt der Übertritt von Blutplasma aus dem Blutgefäßsystem über den glomerulären Filterapparat in das glomeruläre Lumen und damit die Bildung des Primärharns. Der glomeruläre Filter sorgt durch seine selektiven Filtereigenschaften für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion, d. h. die freie Filtration von Wasser und harnpflichtigen Substanzen sowie das Zurückhalten von Makromolekülen im Blutplasma (Brenner et al. 1976). Der Filter setzt sich aus dem Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und der podozytären Schlitzmembran zusammen. Jede Einzelkomponente nimmt durch ihre spezifischen Charakteristika Einfluss auf den Übertritt von Plasmabestandteilen aus der Kapillare in das glomeruläre Lumen. Insgesamt besitzt das glomeruläre Filtersystem sowohl größen- als auch ladungsselektive Filtereigenschaften (Haraldsson et al. 2008).

Mit einer Größe von bis zu 100 nm erlauben die Fenestrationen der glomerulären Endothelzellen theoretisch die freie Filtration von Makromolekülen wie z. B. Albumin. Elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen jedoch auf eine ladungsabhängige Selektion schon auf Endothel-Ebene schließen, welche wahrscheinlich über oberflächengebundene Glykokalixmoleküle vermittelt wird und Makromoleküle des Blutplasmas am Übertritt in das glomeruläre Lumen hindert (Tryggvason und Wartiovaara 2005; Haraldsson und Jeansson 2009).

Die beiden epithelialen Gewebe des glomerulären Filters, das Gefäßendothel und der podozytäre Epithelverband, sind in einem gemeinsamen extrazellulären Netzwerk, der glomerulären Basalmembran (GBM), verankert. Die GBM ist mit 240 bis 370 nm deutlich dicker als die Basalmembranen der Epithelien anderer Organe mit ca. 40 bis 80 nm (Haraldsson et al. 2008). Sie setzt sich aus einer Vielzahl extrazellulärer Matrixmoleküle zusammen, insbesondere Kollagen IV, Laminin, Nidogen, Proteoglykane wie Agrin und Perlecan sowie weiteren Glykoproteine (Miner 2011).

Die Funktion der GBM bezüglich der ladungs- und größenabhängigen Permeabilität des glomerulären Filters ist Gegenstand aktueller Forschung. Für eine große funktionale Bedeutung der GBM spricht, dass genetische Veränderungen von GBM-Komponenten glomeruläre Selektivitätsverluste zur Folge haben. Das Alport-Syndrom, eine hereditäre Nierenerkrankung aufgrund von Mutationen in den Kollagen-IV-Genen, führt zu Hämaturie, Proteinurie und letztlich zu chronischem Nierenversagen (Hudson et al. 2003). Auch zeigte sich im Tierversuch, dass der genetische Verlust von Anteilen der Lamininkomponente der GBM zu Proteinurie und ultrastruktureller Nierenschädigung führt (Noakes et al. 1995). Die strukturelle Unversehrtheit der GBM scheint somit für die Aufrechterhaltung der glomerulären Funktion direkt oder indirekt von entscheidender Bedeutung zu sein.

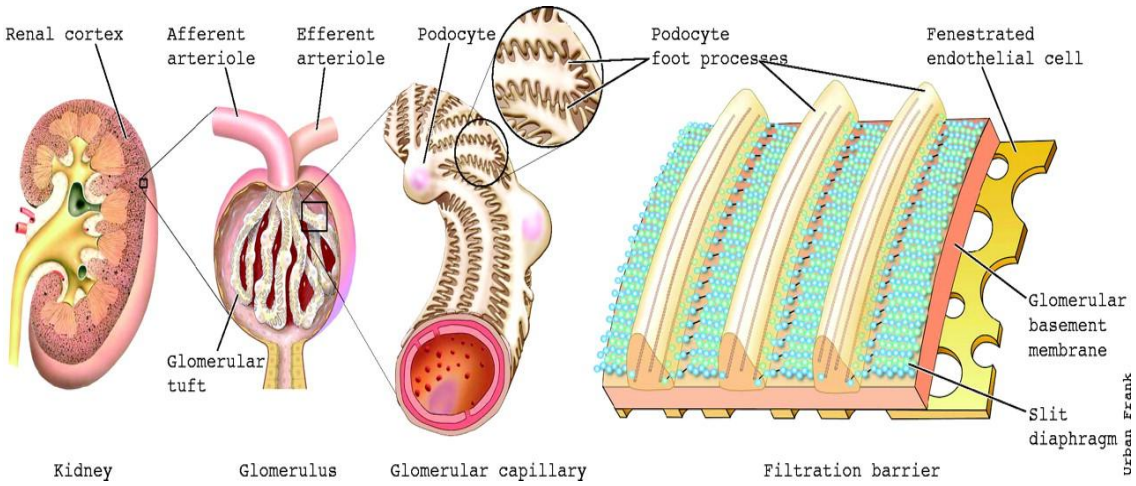


Abbildung 1 Darstellung der glomerulären Architektur und des glomerulären Filterapparates. Die Primär- und Sekundärfortsätze umschließen die glomeruläre Kapillare innerhalb der Bowman-Kapsel. Der glomeruläre Filterapparat setzt sich aus Kapillarendothel, GBM und der zwischen den Sekundärfortsätzen aufgespannten Schlitzmembran zusammen. [Quelle: Tryggvason und Wartiovaara (2005): How Does the Kidney Filter Plasma?]

Eine weitere Komponente des glomerulären Filters wird durch den podozytären Epithelverband gestellt. Zwischen den feinen, ineinander verschränkten Fußfortsätzen dieser hochspezialisierten Zellen bleibt ein etwa 25 bis 60 nm breiter Spalt frei. Über diesen spannt sich die Schlitzmembran (SM) auf, welche sich aus einer Vielzahl von miteinander agierenden Proteinen zusammensetzt (Pavenstädt et al. 2003). Mutatio-

nen in den jeweiligen Genen dieser Einzelkomponenten führen beim Menschen wie auch im Tiermodell zu einem ausgeprägten Selektivitätsverlust des glomerulären Filters, Proteinurie und voranschreitendem Nierenversagen (Piscione und Licht 2011).

Der im Glomerulum gewonnene Primärharn wird über das Tubulussystem des Nephrons weitertransportiert. Hier wird über eine Vielzahl von Absorptions- und Sekretionsmechanismen die Zusammensetzung des Endharns bestimmt (Klinke und Silbernagl 2010).

1.2 Pathophysiologie des Nierenversagens

Kommt es durch eine genetisch bedingte oder erworbene Schädigung zu einem Selektivitätsverlust des glomerulären Filterapparates, ist der vermehrte Übertritt von Plasmaproteinen und anderen Makromolekülen in das Tubuluslumen die Folge. Die Epithelzellen der Tubuli reagieren darauf mit einer vermehrten Reabsorption von Proteinen aus dem Tubuluslumen, um einem Verlust entgegenzuwirken (Christensen und Gburek 2004).

Die gesteigerte Reabsorption ruft in den Tubuluszellen Stoffwechselveränderungen hervor, zum Beispiel reagieren sie mit der Produktion von Wachstumsfaktoren. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Mediatorproteine TGF-β und CTGF (Yard 2001; Phanish et al. 2010). Diese Mediatoren wirken lokal proinflammatorisch und stimulieren in den Tubuluszellen die Bildung von extrazellulären Matrixmolekülen, wobei vor allem Kollagene vom Typ I und IV, aber auch Laminin und Fibronektin eine Rolle spielen. Diese lagern sich im Interstitium des Nierenparenchyms ab und führen so zur Fibrosierung des Organs (Stephan et al. 2004; Boor und Floege 2011).

Vergleichbare inflammatorische und fibrosierende Prozesse sind im Zuge einer ausgeprägten Proteinurie auch in Podozyten zu beobachten. Folge hiervon ist die voranschreitende Glomerulosklerose (Lee 2012).

Die Akkumulation extrazellulärer Matrixmoleküle führt letztlich zur Verdrängung und Zerstörung der physiologischen glomerulären und tubulointerstitiellen Architektur. Die fortschreitende Fibrosierung geht mit einem kontinuierlichen Verlust der renalen Funktion einher und ist das histopathologische Korrelat der chronischen Niereninsuffizienz (Bohle et al. 1990).

Die Abnahme der renalen Funktion führt bei den Betroffenen durch mangelnde Wasserausscheidung zur Entwicklung von Oedemen. Desweiteren kommt es zu chronischer Urämie, d. h. der Akkumulation von Harnstoff und anderen Stoffwechselprodukten im Körper, welche im Normalfall über die Niere ausgeschieden werden. Chronisches Nierenversagen ist mit weiteren internistischen Erkrankungen assoziiert und zieht eine Vielzahl an möglichen Komplikationen und Folgeerkrankungen, insbesondere im kardiovaskulären Bereich, nach sich (Gansevoort et al. 2013).

Kommt es bei einem Patienten unabhängig von der Grunderkrankung zum kompletten Verlust der Nierenfunktion, stellen Nierenersatzverfahren heutzutage die letzte Therapieoption dar, wobei die Hämodialyse und die Nierentransplantation sehr kostenintensive und für den Patienten belastende Therapieverfahren sind (Li et al. 2013).
Um neue Therapieansätze zu entwickeln, die eine gezielte Behandlung vor der Entwicklung des terminalen Nierenversagens erlauben, ist ein umfassendes Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene erforderlich.

1.3 Der Podozyt

Der Podozyt ist eine hoch spezialisierte Zelle, der in der Aufrechterhaltung der physiologischen glomerulären Funktion eine zentrale Rolle zukommt. Die Zellkörper der Podozyten tragen Primärfortsätze, von denen filigrane Sekundärfortsätze ausgehen, welche Fußfortsätze genannt werden. Die Fußfortsätze benachbarter Podozyten sind ineinander verschränkt und umschließen die glomerulären Kapillaren (Pavenstädt et al. 2003).

Im Rahmen einer Reihe glomerulärer Erkrankungen können spezifische morphologische Podozytenveränderungen im Sinne einer Aufhebung der filigranen Fußfortsatzarchitektur beobachtet werden (Mundel und Shankland 2002). Elektronenmikroskopisch ist als Folge einer Dedifferenzierung statt der feinen, ineinander greifenden Sekundärfortsätze eine eher flache, plumpe Struktur erkennbar. Der Verlust der Fußfortsatzstruktur führt zu einer Reduzierung von Filtrationsschlitzen und Schlitzmembranen und geht mit der Entwicklung einer Proteinurie, also der Ausscheidung von Plasmaproteinen mit dem Urin, einher (Murphy et al. 1979). Die morphologische Dedifferenzierung der Podozyten steht somit in direktem Zusammenhang mit glomerulärem Funktionsverlust.

Grundgerüst der Podozytenmorphologie ist das insbesondere in den Fußfortsätzen stark ausgeprägte Zytoskelett, welches durch seinen hohen Anteil an Aktin kontraktile Eigenschaften besitzt und in der Lage ist, morphologische Veränderungen zu vermitteln (Drenckhahn und Franke 1988).

1.3.1 Podozyt und Schlitzmembran

Die Schlitzmembran (SM) ist ein komplexes extrazelluläres Netzwerk, welches die benachbarten Podozytenfußfortsätze untereinander verbindet und einen Teil des glomerulären Filterapparates darstellt. Es konnte eine Vielzahl einzelner Proteine als SM-Komponenten identifiziert werden, darunter Nephrin (Ruotsalainen et al. 1999), Podocin (Roselli et al. 2002), Neph1 (Donoviel et al. 2001) und CD2AP (Shih 1999). Diese und weitere Komponenten der SM interagieren auf unterschiedliche Weise miteinander, d. h. die SM ist keine statische Struktur, sondern eine dynamische Konstruktion, deren Einzelkomponenten ständigen Einfluss aufeinander ausüben (Schwarz et al. 2001; Huber et al. 2001).

Innerhalb des Podozyten rufen diese Interaktionen Veränderungen des Zytoskeletts im Sinne einer Aktinpolymerisation hervor (Garg et al. 2007). Die SM-Komponenten stehen somit am Anfang eines Signalweges, in dessen Rahmen extrazelluläre Vorgänge

Einfluss auf die intrazelluläre Podozytenarchitektur und damit einhergehend auf die glomeruläre Funktion nehmen (George und Holzman 2012).
Sowohl beim Menschen als auch im Rahmen von Tiermodellen führen Mutation oder Verlust von Einzelkomponenten dieser Interaktionsmechanismen zur Entwicklung von morphologischen Podozytenveränderungen sowie glomerulärem Funktionsverlust:

Homozygote Mutationen im NPHS1-Gen, welches für Nephrin kodiert, sind Grundlage des sog. Kongenitalen Nephrotischen Syndroms vom Finnischen Typ. Die Patienten leiden an pränataler Proteinurie und schon bei Geburt bestehender Niereninsuffizienz (Kestilä et al. 1998).
Patienten, welche am Steroid-resistenten Nephrotischen Syndrom leiden, weisen homozygot vorliegende Mutationen im NPHS2-Gen des Podocins auf. Die Erkrankung ist schon im Kindesalter durch ein schweres Nephrotisches Syndrom ohne Ansprechen auf Glukokortikoidtherapie sowie rasches Fortschreiten zum terminalen Nierenversagen gekennzeichnet (Boute et al. 2000).

Auch im Tiermodell führt der Verlust sowohl von NPHS1 als auch von NPHS2 schon früh zu typischen Veränderungen der Podozytenmorphologie und nachfolgend zum Nephrotischen Syndrom mit massivem Proteinverlust und chronischem Nierenversagen (Putaala et al. 2001; Roselli et al. 2004). Für andere SM-Komponenten, welche an der SM-Aktin-Interaktion beteiligt sind, fanden sich vergleichbare Ergebnisse (Donoviel et al. 2001).
Dies verdeutlicht die grundlegende Bedeutung der physiologischen Interaktion von extrazellulären Strukturen der SM mit dem podozytären Zytoskelett für die Aufrechterhaltung der podozytären Morphologie und damit der glomerulären Funktion.

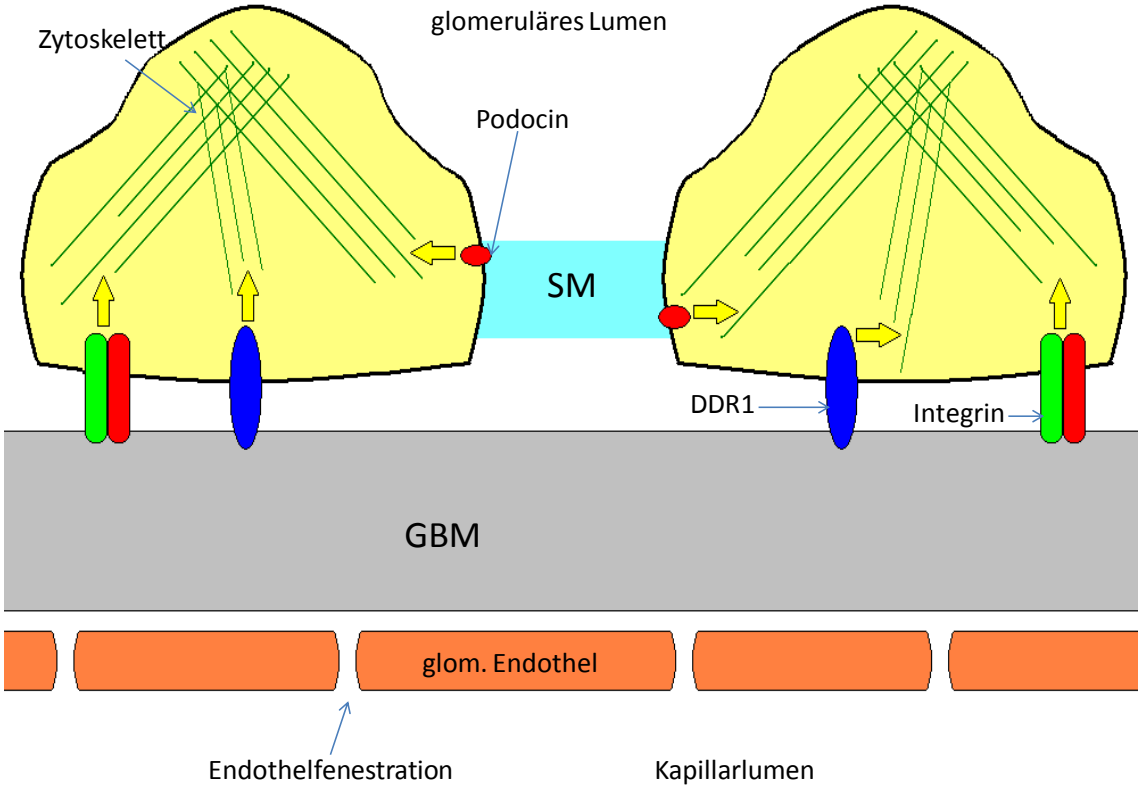


Abbildung 2 Schematische Darstellung des glomerulären Filterapparates. Die podozytären Fortsätze interagieren sowohl mit der SM als auch mit der GBM. Die jeweiligen Kontaktstrukturen beeinflussen das Aktinzytoskelett der podozytären Fußfortsätze.

1.3.2 Podozyt und glomeruläre Basalmembran

Der podozytäre Kontakt zum extrazellulären Netzwerk der glomerulären Basalmembran (GBM) wird über diverse Oberflächenrezeptoren vermittelt.

Von Bedeutung ist zunächst die Gruppe der Integrine. Diese podozytären Rezeptormoleküle werden von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie z. B. Kollagen, Laminin und Fibronektin aktiviert und agieren auf intrazellulärer Seite indirekt mit dem podozytären Zytoskelett (Kreidberg et al. 1996; Blattner und Kretzler 2005). Der genetische Verlust bestimmter Integrin-Gene im Tierversuch führt zu ausgeprägter Proteinurie und terminalem Nierenversagen. (Pozzi et al. 2008).

Auch Dystroglykane vermitteln den podozytären Kontakt mit den extrazellulären Molekülen der GBM. Sie werden von unterschiedlichen Liganden innerhalb der GBM akti-

viert und üben ebenfalls einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett von Podozyten aus (Vogtlander et al. 2009).

Zusätzlich wurden DDR-Moleküle (Discoidin Domain Receptor) als Kontaktstrukturen zwischen Podozyt und GBM identifiziert. DDR1 und DDR2 sind Oberflächenrezeptoren mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität, welche durch Kollagenmoleküle aktiviert werden. Das Vorliegen von Kollagen I und insbesondere Kollagen IV in ihrer physiologischen Tripelhelixstruktur ist dabei entscheidend (Vogel et al. 1997). Die Rolle von DDR1 in Physiologie und Pathologie der podozytären Interaktion mit dem Kollagen der GBM ist auch Gegenstand dieser Arbeit und wird auf den folgenden Seiten näher beleuchtet.

Das Zytoskelett der Podozyten wird somit sowohl vonseiten der SM als auch der GBM in seiner Dynamik und Zusammensetzung beeinflusst. Beide extrazellulären Netzwerke vermitteln über komplexe Signalkaskaden morphologische Veränderungen der podozytären Zelle, die Einfluss auf die glomeruläre Funktion nehmen. Genetische Defekte dieser Signalmechanismen und damit die Unterbrechung der physiologischen Interaktion führen sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell zu Einschränkungen der Nierenfunktion.

1.4 Hypothese der GBM-SM-Interaktion

Bei Eingriffen in die podozytären Interaktionsmechanismen mit GBM und SM, z. B. im Rahmen genetischer Erkrankungen oder homozygoter Mutationen der für die Interaktion entscheidenden Gene im Tiermodell, kommt es, wie beschrieben, zu podozytären Veränderungen und Funktionsverlust mit nachfolgender glomerulärer und tubulointerstitieller Fibrose und chronischer Niereninsuffizienz. Das Vorliegen heterozygoter Mutationen in diesen Genen führt in der Regel nicht zu schweren strukturellen Veränderungen und allenfalls zu milden funktionellen Einschränkungen.
Jedoch haben spezifische genetische Konstellationen auch bei lediglich heterozygoten Genvariationen die Entwicklung ausgeprägter pathologischer Veränderungen zur Folge:

In einer österreichischen Familie kam es bei mehreren weiblichen Familienmitgliedern in jungen Jahren zu Proteinurie und terminalem Nierenversagen. Genetische Analysen ergaben bei den Betroffenen das Vorliegen einer heterozygoten Mutation des COL4A5-Gens, welches für die α5-Kette des Kollagen IV kodiert, eines bedeutenden Anteils der GBM.

Kollagen IV-Moleküle setzen sich aus insgesamt drei Untereinheiten zusammen. In der adulten Niere sind die Untereinheiten α3, α4 und α5 Bausteine der Tripelhelixstruktur von Kollagen IV. Für jede dieser Untereinheiten kodiert ein eigenes Gen: COL4A3 für die α3-Kette, COL4A4 für α4-Kette und COL4A5 für die α5-Kette. Mutationen dieser drei Gene sind Grundlage des Alport-Syndroms, einer vererbbaren Nierenerkrankung. Es weist in den meisten Fällen einen x-chromosomalen (COL4A5) oder seltener einen autosomal-rezessiven (COL4A3 und COL4A4 auf Chromosom 2) Vererbungsmodus auf.

Homozygote Mutationen (bzw. hemizygote bei x-chromosomalem Erbgang) eines dieser drei Gene führen zur Vollausprägung der Erkrankung, wobei das klinische Bild durch Hämaturie, Proteinurie, fortschreitende renale Fibrose und terminale Niereninsuffizienz gekennzeichnet ist (Hudson et al. 2003).
Die Interaktion zwischen GBM und Podozyt über Kollagenrezeptoren wie z. B. DDR1 ist beim AS durch das fehlerhafte Kollagen IV erheblich beeinträchtigt, da für die Aktivierung der Rezeptoren das Vorliegen des Kollagens in seiner physiologischen Struktur von entscheidender Bedeutung ist (Vogel et al. 1997).

Heterozygote Mutationen der Gene COL4A3 und COL4A4 führen nicht zum AS, sondern zum Krankheitsbild der Familiären Benignen Hämaturie, bei der es im Normalfall zu intermittierender Hämaturie und nicht zu ausgeprägter Proteinurie und nachfolgendem chronischen Nierenversagen kommt (Badenas et al. 2002). Ein ähnlich abgeschwächter Verlauf wäre auch bei alleinigem Vorliegen der heterozygoten COL4A5-Mutationen bei den weiblichen Betroffenen aus dem Fallbeispiel zu erwarten gewesen.

Über die heterozygote Alport-Mutation hinaus fand sich bei den betroffenen Familienmitgliedern jedoch ein heterozygoter Polymorphismus (R229Q) im NPHS2-Gen auf Chromosom 1, welches für das SM-Protein Podocin kodiert. Diese Genvariante kommt mit einer Allelfrequenz von ca. 3-4 % in der Bevölkerung vor und hat bei alleinigem Auftreten keine schwerwiegenden Einschränkungen der glomerulären Funktion zur Folge (Tsukaguchi et al. 2002; Pereira et al. 2004).

Genetische Analysen kleinerer Patientenkollektive aus Zypern und Australien bestätigen die Prädisposition für die Entwicklung einer Proteinurie bei gleichzeitigem Vorliegen von heterozygoter Alport-Mutation und Podocinpolymorphismus, wobei das Fortschreiten zur terminalen Niereninsuffizienz nur in einzelnen Fällen beobachtet wurde (Tonna et al. 2008; Voskarides et al. 2012).

Die glomeruläre Funktion wird bei diesen Patienten erst durch das Zusammenspiel der beiden Genvariationen in Mitleidenschaft gezogen. Die alleinige heterozygote Mutation des COL4A5-Gens vermag keinen schwerwiegenden glomerulären Funktionsverlust auszulösen. Erst das Vorliegen eines heterozygoten Polymorphismus innerhalb des Schlitzmembrankomplexes hebt die Funktionsfähigkeit des Filterapparates auf und führt zum glomerulären Funktionsverlust mit Krankheitswert.

Dies führt zu der Hypothese, dass zwischen GBM und SM Zusammenhänge und Interaktionen bestehen, die über den Podozyten als Mediatorzelle vermittelt werden. Bei gleichzeitigem Eingriff in die Interaktion mit der GBM und der SM kommt der Ausfall dieser Mediatorfunktion zum Tragen und es resultiert ein Funktionsverlust der Einheit aus Podozyt, GBM und SM.

1.5 DDR1

Wie schon in 1.3.1 beschrieben, vermitteln membranständige Rezeptorstrukturen vom Typ des Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) den podozytären Kontakt mit dem Kollagen IV der GBM. Die Bindung des Liganden Kollagen IV an die DDR1-Rezeptoren führt zur Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne des Rezeptors (Vogel et al. 1997). Durch diese Aktivierung sind die Rezeptoren in der Lage, intrazelluläre Signalkaskaden in Gang zu setzen.

DDR1-Rezeptoren und die dazugehörigen Gene kommen homolog zum Menschen im Gewebe verschiedener Säugetierarten vor (Vogel 1999).

Im Jahre 2001 konnte ein Tiermodell vorgestellt werden, anhand dessen sich die Bedeutung von DDR1 für die Interaktion zwischen GBM und Podozyt in Physiologie und Pathologie verdeutlichen lässt. In diesem Tiermodell führt eine homozygote Mutation des DDR1-Gens zum Verlust der Rezeptoren auf der Zelloberfläche der DDR1-exprimierenden Zellen (Vogel et al. 2001).

Bei der Maus geht der so induzierte Verlust der DDR1-Rezeptoren mit der Entwicklung einer Proteinurie einher. Zusätzlich kommt es im Glomerulum zu lokalisierten Veränderungen der GBM sowie in der Umgebung dieser Veränderungen auch zu einer Reduktion von Filtrationsschlitzen und Schlitzmembranen (Gross et al. 2004). Diese Beobachtung stützt die aus den oben beschriebenen Fallbeispielen abgeleitete Vermutung einer Interaktion zwischen GBM und SM. Die Aktivierung der DDR1-Rezeptoren könnte am Anfang einer intrazellulären Signalkaskade stehen, an deren Ende Einfluss auf die SM-Architektur genommen wird.

Auch im Rahmen von pathologischen GBM-Veränderungen haben DDR1-Rezeptoren Einfluss auf die renale Funktion: So zeigen Mäuse mit komplettem DDR1-Verlust einen verzögerten Verlauf des Alport-Syndroms (Gross et al. 2010). Das Fortschreiten der renalen Pathologie im Rahmen des Alport-Syndroms scheint somit auch vom Kontakt der DDR1-Rezeptoren mit dem fehlerhaften Kollagen IV der GBM abhängig zu sein. Fehlt die Antwort der DDR1-Rezeptoren auf die pathologisch veränderte GBM, kommt es nur verzögert zu dem erwarteten glomerulären Funktionsverlust.

Liegt bei der Maus eine heterozygote Mutation, und damit nur ein funktionsfähiges Allel des DDR1-Gens vor, reduziert sich die Expression der DDR1-Rezeptoren auf der Podozytenoberfläche um etwa 50% (Gross et al. 2010). Analog zu der heterozygoten COL4A5-Mutation im unter 1.4 beschriebenen Fallbeispiel könnte somit auch die heterozygote Mutation des DDR1-Gens einen empfindlichen Eingriff in den podozytären GBM-Kontakt bedeuten.

1.6 Podocinmutationen und -polymorphismen

Im Podocin-Gen NPHS2 auf Chromosom 1 konnten in der Vergangenheit verschiedene Mutationen und Polymorphismen beschrieben werden. Die Mutationen sind in homozygoter Form Grundlage des Steroid-resistenten Nephrotischen Syndroms (SRNS) mit früh einsetzender terminaler Niereninsuffizienz. Durch die fehlerhafte Zusammensetzung der SM und die beeinträchtigte Interaktion mit dem Podozyten kommt es zu ausgedehnten morphologischen Podozytenveränderungen, Glomerulosklerose und fortschreitender Nierenfibrose. Träger heterozygoter Mutationen zeigen einen weitgehend asymptomatischen Verlauf (Boute et al. 2000).

Die häufigste Ursache des SRNS beim Menschen ist die R138Q-Mutation innerhalb des NPHS2-Gens. Im Tiermodell exprimieren Mäuse mit einer R140Q-Mutation im NPHS2-Gen ein äquivalent verändertes Podocinmolekül. Die homozygote R140Q-Mutation führt bei den Mäusen schon früh zur Entwicklung eines terminalen Nierenversagens. Die heterozygote R140Q-Mutation des NPHS2-Gens hat keine Proteinurie oder histologischen Veränderungen zur Folge (Philippe et al. 2008).

Neben Mutationen wurde auch eine Vielzahl an Polymorphismen innerhalb des NPHS2-Gens beschrieben. In der gesunden Bevölkerung stellt der R229Q-Polymorphismus die häufigste NPHS2-Variante dar, welche bei alleinigem Auftreten allenfalls geringfügige glomeruläre Funktionsverluste im Sinne einer Mikroalbuminurie mit sich bringt (Pereira et al. 2004). In Verbindung mit einer pathologischen Mutation (z. B. R138Q) des zweiten NPHS2-Allels führt der R229Q-Polymorphismus jedoch zu

einer spät einsetzenden Form des Steroid-resistenten Nephrotischen Syndroms (Machuca et al. 2009).

Podocinmoleküle, welche den R229Q-Polymorphismus aufweisen, zeigen in vitro eine verminderte Affinität an das ebenfalls zum Schlitzmembrankomplex gehörende Nephrin zu binden. Die biologische Aktivität des durch den R229Q-Polymorphismus veränderten Podocins innerhalb des SM-Signalkomplexes scheint somit herabgesetzt (Tsukaguchi et al. 2002).
Zusammen mit dem in 1.4 beschriebenen Fallbeispiel deutet dies auf einen starken Einfluss von Podocinvarianten auf die hypothetisch bestehende Interaktionseinheit aus GBM und SM hin.

1.7 Tiermodell und Zielsetzung dieser Arbeit

Die Kombination aus heterozygoter Alport-Mutation und heterozygotem Podocinpolymorphismus führt beim Menschen in einzelnen Fällen zu terminalem Nierenversagen. Dies deutet auf einen kommunikativen Zusammenhang zwischen der GBM und der SM mit dem Podozyten als Mediatorzelle hin.

Die Rolle des Kollagenrezeptors DDR1 und des Schlitzmembranmoleküls Podocin im Rahmen dieser Interaktion soll in der vorliegenden Arbeit näher analysiert werden.
Im untersuchten Tiermodell bestehen sowohl eine heterozygote Mutation des DDR1-Gens, welches den podozytären Kontakt mit der GBM vermittelt, als auch eine heterozygote R140Q-Mutation im Podocin-Gen NPHS2, welche Einfluss auf die podozytäre SM-Interaktion nimmt.

Aus den vorangegangenen Erläuterungen ergeben sich folgende Fragestellungen:
Sind DDR1 und Podocin Teile einer Signal- und Interaktionskette zwischen GBM und SM?
Dient diese Interaktion der Aufrechterhaltung der glomerulären Funktion?
Führt die heterozygote Mutation von DDR1 und NPHS2 zu einer Einschränkung einer solchen Interaktion und zu glomerulärem Funktionsverlust?

2. Methoden

2.1 DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tiermodell

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Mäuse aus einem 129/SvJ-Hintergrund. Die untersuchten Mäuse gingen aus Kreuzungen zwischen Tieren mit heterozygoter Mutation des DDR1-Gens (DDR1$^{+/-}$) und Tieren mit heterozygot vorliegender R140Q-Mutation des Podocingens NPHS2 (NPHS2$^{+/R140Q}$) hervor.

Die Tiere mit R140Q-Mutation des NPHS2-Gens wurden von der Arbeitsgruppe um Professorin Corinne Antignac, Inserm, U574, Hôpital Necker, Paris zur Verfügung gestellt (Philippe et al. 2008). Aufgrund des relativ milden Phänotyps beim Vorliegen einer heterozygoten R140Q-Mutation wurde diese als vergleichbar dem R229Q-Polymorphismus des menschlichen NPHS2-Gens angesehen.
Die Tiere mit heterozygoter DDR1-Mutation stammten aus der Arbeitsgruppe von Professor Wolfgang Vogel, Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto (Vogel et al. 2001).

Ziel der Kreuzung war die Generierung von doppelt heterozygoten Tieren mit dem kombinierten DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Genotyp. Kontrolltiere wiesen entweder einen heterozygoten Genotyp für nur eines der beiden Merkmale oder keine der beiden Mutationen (Wildtyp) auf. Die Mäuse wurden in einer pathogenarmen Umgebung gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt. Gemäß §7 des Tierschutzgesetzes wurden für diese Arbeit keine genehmigungspflichtigen Tierversuche durchgeführt.

2.2 Genotypisierung

Die Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde an Schwanzspitzenbiopsien (ca. 3 mm lang) durchgeführt. Zur Extraktion und Isolation der DNA wurde das *DNeasy® Blood & Tissue* Kit der Firma *Qiagen* verwendet. Die DNA-Extraktion erfolgte dabei nach dem *Spin-Column Protocol for Purification of Total DNA from Animal Tissues* der Firma

Qiagen. Die extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung gelöst in dem im Kit enthaltenen Puffer bei 4°C aufbewahrt. Zur Amplifizierung der gewonnenen DNA wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die beiden zu untersuchenden Gene (NPHS2 und DDR1) erforderten dabei unterschiedliche PCR-Ansätze:

NPHS2 (Podocin):
- 10 µL DNA
- 2,5 µL PCR-Puffer (10x)
- 0,5 µL Podocin forward-Primer (20 pM)
- 0,5 µL Podocin reverse-Primer (20 pM)
- 0,5 µL dNTP (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 10,7 µL dH_2O
- 0,3 µL Taq-Polymerase

DDR1:
- 10 µL DNA
- 2,5 µL PCR-Puffer (10x)
- 0,4 µL DDR1 5-6-Primer (20 pM)
- 0,6 µL DDR1 neo-Primer (20 pM)
- 0,7 µL DDR1 5-2-Primer (20 pM)
- 0,5 µL dNTP (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 10 µL dH_2O
- 0,3 µL Taq-Polymerase

Die Amplifizierung der DNA erfolgte in einem Thermocycler nach folgenden Protokollen:

NPHS2 (Podocin):
1.) 5 Minuten bei 94 °C
2.) 45 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung)
3.) 45 Sekunden bei 52 °C (Annealing)
4.) 45 Sekunden bei 72 °C (Elongation)
5.) 10 Minuten bei 72 °C

Die Schritte 2.) bis 4.) wurden dabei 35 Mal wiederholt, bevor mit Schritt 5.) fortgefahren wurde.

DDR1:

1.) 3 Minuten bei 95 °C
2.) 1 Minute bei 70-58 °C (Annealing)
3.) 1 Minute bei 72 °C (Elongation)
4.) 1 Minute bei 95 °C (Denaturierung)
5.) 5 Minuten bei 72 °C

Die Schritte 2.) bis 4.) wurden dabei im Sinne einer „Touch Down PCR“ mit fallender Annealingtemperatur (Temperaturabnahme pro Zyklus: 2°C) so oft wiederholt, bis diese 58 °C betrug. Danach wurden die Schritte 2.) bis 4.) 35 Mal mit einer Annealingtemperatur von 58 °C wiederholt, bevor sich der finale Elongationsschritt 5.) anschloss.

Das entstandene PCR-Produkt wurde zur Auswertung elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde ein 2%-Agarose-Gel hergestellt: Agarose und TAE-Puffer wurden aufgekocht, mit Ethidiumbromid (10 µL 0,6%-EtBr pro 30 mL TAE) versetzt und in eine 16-well Elektrophorese-Kammer gegossen. Pro Well wurden 10 µL PCR-Produkt mit 2 µL PCR-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70 V für 70 Minuten. Zur Auswertung wurden die Gele auf einem UV-Transiluminator abfotografiert. Abbildungen 3 und 4 zeigen Ergebnisse dieser beiden PCR-Protokolle.

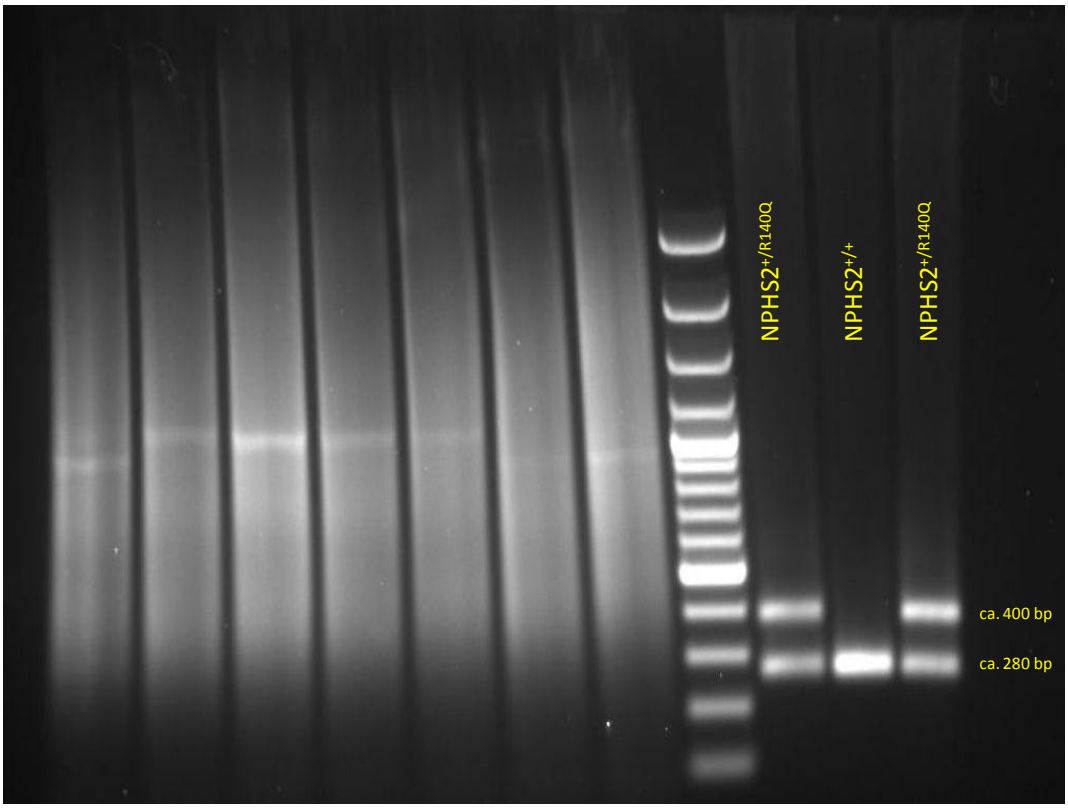


Abbildung 3 PCR zur Bestimmung des NPHS2-Genotyps. Das Vorliegen von zwei Banden mit einer Größe von 280 bzw. 400 Basenpaaren zeigt den heterozygoten Genotyp ($NPHS2^{+/R140Q}$) an.

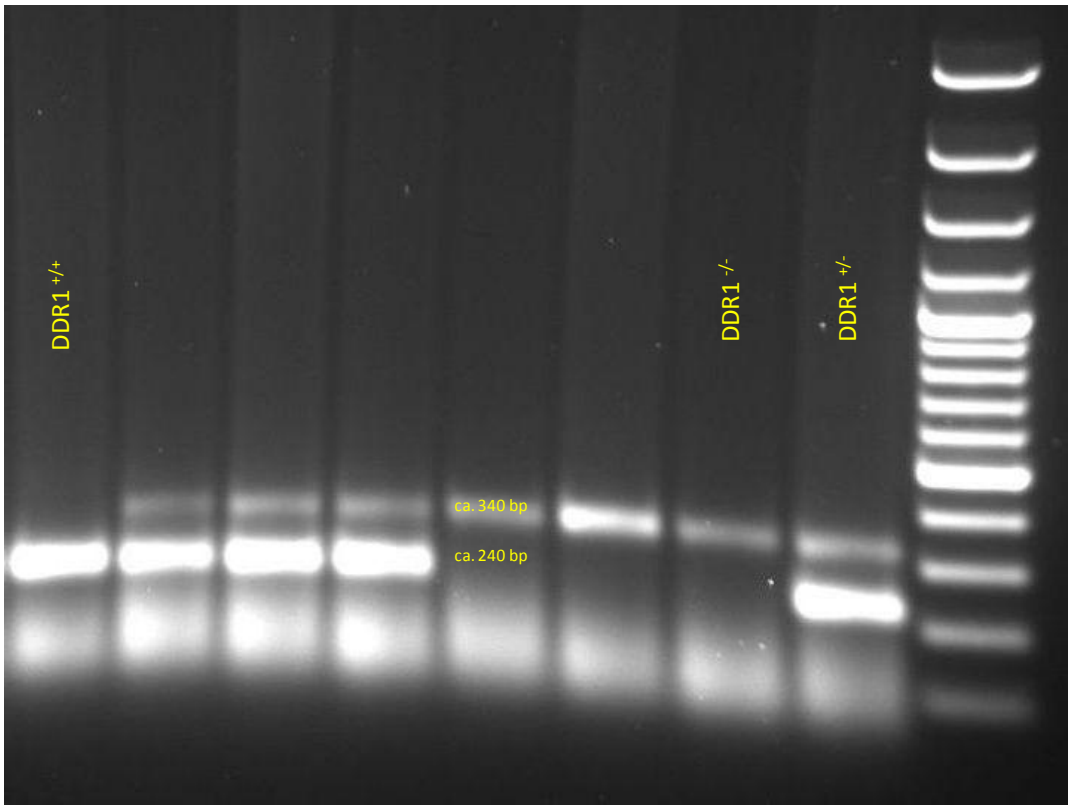


Abbildung 4 PCR zur Bestimmung des DDR1-Genotyps. Das Vorliegen von zwei Banden mit einer Größe von ca. 240 bzw. 340 Basenpaaren zeigt den heterozygoten Genotyp ($DDR1^{+/-)}$ an.

2.3 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Abbildungen in dieser Arbeit wurden von Fr. Dr. med. Jenny Kruegel (Abteilung Prothetik im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universitätsmedizin Göttingen) durch LR-Gold-Präparation hergestellt.

2.4 Proteinurie-Gelelektrophorese

Zur Analyse der mit dem Urin ausgeschiedenen Proteine wurde im Abstand von 14 Tagen der Urin der Mäuse gesammelt, das darin enthaltene Protein ausgefällt und elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die Urinproben aufgetaut und für 60 Sekunden bei 14.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert, um Verunreinigungen von der Probe zu trennen. Anschließend wurden 20 µL jeder Probe in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Zu den jeweiligen Proben wurden nacheinander 80 µL destilliertes Wasser und 400 µL Methanol gegeben. Nach Durchmischen wurden 100 µL Chloroform und 300 µL destilliertes Wasser hinzugefügt.

Nach einminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm waren in den Gefäßen zwei Phasen zu beobachten, zwischen denen sich das ausgefallene Protein als Schicht sammelte. Die obere Phase wurde abgenommen und verworfen. Der Rest wurde mit 400 µL Methanol durchmischt und anschließend bei 14.000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Hiernach befand sich das Protein am Boden der Reaktionsgefäße. Nach Verwerfen des Überstandes schloss sich ein weiterer Waschschritt mit 400 µL Methanol und zweiminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm an. Der Überstand wurde erneut verworfen und die noch feuchten Proteinpellets für ungefähr 30 Minuten im Luftstrom unter der Sterilbank getrocknet.

Die Proteinproben lagen nun als getrocknetes Pellet am Boden der Reaktionsgefäße. Sie wurden in 15 µL Probenpuffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach Eiskühlung wurden 15 µL pro Probe neben einem Molekülgewichtsmarker auf ein Polyacrylamid-Fertiggel aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst für 30 Minuten bei 80 V und anschließend für 60-75 Minuten bei 100 V. Danach wurden die Proteingele über Nacht in Coomassie-Blue-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Gele mit Leitungswasser mehrfach gewaschen, bis der Hintergrund der Gele klar durchsichtig war. Zur Auswertung wurden die Gele eingescannt und die Bandenintensität densitometrisch bestimmt.

2.5 Western Blot

Zur Bewertung der Gewebespiegel der proinflammatorisch und profibrotisch wirksamen Proteine TGFβ und CTGF in den Nieren der Mäuse wurden unterschiedliche Gruppen gebildet.

Die doppelt heterozygote Tiere ($DDR1^{+/-}/NPHS2^{+/R140Q}$) wurden am 60., 120. bzw. 180. Lebenstag getötet. Hinzu kamen drei Kontrollgruppen: Wildtyp, $DDR1^{+/-}$ und $NPHS2^{+/-}$. Die Nieren der Kontrolltiere wurden jeweils am 180. Lebenstag entnommen.

Die Mäuse wurden durch kraniozervikale Dislokation getötet. Die für die Western Blots vorgesehenen Nieren wurden rasch entnommen, geviertelt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Je Tier wurde 1/4 Niere aufgetaut und in 500 µL Lysepuffer mittels eines Messerhomogenisators homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 Min. bei 16.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde durch photometrische Messung bestimmt. Dazu wurden die einzelnen Lysate mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 sowie 1:100 verdünnt. Als Messstandard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA gelöst in TBS-Puffer mit Konzentrationen von 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL und 2,0 mg/mL hergestellt. Jeweils 10 µL der Proben- wie auch der Standardlösungen wurden mit 200 µL Bradford-Reagenz gemischt und auf eine ELISA-Platte aufgetragen.

Im Photometer wurde daraufhin die optische Dichte der Proteinlösungen bei 595 nm Wellenlänge gegen einen Leerwert (10 µL H2O + 200 µL Bradford-Reagenz) bestimmt. Die Extinktionswerte der BSA-Standardreihe ergaben eine Eichkurve, anhand derer die Proteinkonzentration der Nierenhomogenate rechnerisch ermittelt wurde. Anhand dieser Konzentrationswerte konnten Verdünnungen der einzelnen Proben mit einer Zielkonzentration von 40 µg/10 µL hergestellt werden. Für die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Proteinfraktionen wurden 10 µL verdünntes Lysat mit 1 µL Reduktionspuffer und 2,5 µL Probenpuffer versetzt und für 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Nach Eiskühlung wurden die Proben neben einem Molekulargewichtsmarker auf ein Polyacrylamid-Fertiggel aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst für 30 Min. bei 80 V und anschließend für 60-75 Min. bei 100 V. Das Blotten der Proteine erfolgte in einer speziellen Blotting-Kammer. Eine PVDF-Membran wurde für zehn Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Das Elektrophoresegel wurde anschließend zusammen mit der Membran zwischen zwei Whatman-Papieren und zwei Kunststoffvlies-Pads in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingebracht und die Proteine unter Eiskühlung innerhalb von 60 Min. bei 100 V von dem Gel auf die PVDF-Membran transferiert.
Die PVDF-Membran wurde anschließend kurz mit TBST-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit einer Magermilchlösung (5% Magermilchpulver in TBST) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken.
Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Primärantikörper gegen TGFβ bzw. CTGF, verdünnt in Magermilchlösung (5% in TBST), inkubiert.

Anschließend wurde die Membran für 4 x 15 Min. mit TBST-Puffer gewaschen und dann für 60 Min. mit dem in Magermilchlösung (5% in TBST) verdünnten Peroxidase-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut für 4 x 15 Min. mit TBST gewaschen. Danach wurde zur Detektion der gebundenen Antikörper eine Chemolumineszenzreaktion auf der Membran ausgelöst. Hierzu wurde die Membran für eine Minute mit 6 mL eines Chemolumineszenz-Reagenz inkubiert. Röntgenfilme wurden in einer Röntgenkassette je nach Protein für 20–180 Sek. gegen-

über der Membran exponiert. Die Röntgenfilme wurden anschließend entwickelt, eingescannt und die Bandenintensität densitometrisch bestimmt.

Anhand des Molekulargewichtsmarkers und der bekannten Molekulargewichte von TGFβ (25 kD) und CTGF (35-40 kD) konnte die jeweils korrekte Bande identifiziert werden. Die Membran wurde nach der Detektion kurz mit dH2O gespült und dann für 15 Min. mit einem Stripping-Puffer inkubiert, um die gebundenen Antikörper wieder zu entfernen. Der Stripping-Puffer wurde anschließend mit dH2O für fünf Minuten abgespült. Danach konnte mit dem nächsten Primärantikörper gemäß der oben beschriebenen Methode fortgefahren werden.

Die Bestimmung von Aktin diente bei diesem Verfahren als Ladekontrolle. Aktin ist als Bestandteil des Zytoskeletts in jedem Zelltyp vorhanden. Aktin macht in eukaryontischen Zellen ca. 1% des Gesamtproteins aus (Karlson et al. 2005). Der Gehalt der Proben an Aktin wurde mit dem generellen Gehalt an Protein gleichgesetzt und die Werte für TGFβ und CTGF ins Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Proben gesetzt.

2.6 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Bewertung der Mäusenieren wurden verschiedene Gruppen gebildet. Die doppelt heterozygoten Tiere ($DDR1^{+/-}$/$NPHS2^{+/R140Q}$) wurden am 60., 120. Bzw. 180. Lebenstag getötet. Hinzu kamen drei Kontrollgruppen: Wildtyp, $DDR1^{+/-}$ und $NPHS2^{+/-}$. Die Nieren der Kontrolltiere wurden jeweils am 180. Lebenstag entnommen.

Die Mäuse wurden durch kraniozervikale Dislokation getötet. Die für die Immunhistochemie vorgesehenen Nieren wurden rasch entnommen, längs halbiert und für 24 Stunden in 4-% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet.
Von jedem Paraffinblock wurden in einem Mikrotom ca. 10 Organschnitte mit einer Schichtstärke von 3 µm angefertigt. Da die Schnitte das gesamte Organ möglichst gut repräsentieren sollten, wurde versucht, eine Schnittebene nahe der Organfrontalebe-

ne einzustellen, die eine umfassende Übersicht über die gesamte Nierenrinde und möglichst viele Glomeruli bot. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad geglättet, auf Objektträger übertragen und zur Aushärtung und Fixierung auf dem Träger auf eine Heizplatte gelegt.

Die gewonnenen Präparate sollten durch ein immunhistochemisches Verfahren hinsichtlich Fibrose und Vernarbung beurteilt werden. Dazu wurde an jedem Präparat sowohl der Nachweis von Laminin als auch von Fibronektin geführt.

Laminin: Die Objektträger mit den darauf befindlichen Nierenschnitten wurden für 60 Minuten bei 80°C erwärmt, das verflüssigte Paraffin durch 15 Min. Inkubation in Xylol entfernt und die Schnitte anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert.
Anschließend wurden zur Andauung der Präparate 100 µL einer 1%-Proteinase K-Lösung auf die Schnitte gegeben und diese für 23 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal für jeweils zehn Minuten in 1x-TBS-Puffer gewaschen.
Als Nächstes wurden die Schnitte mit einer 5%-BSA in TBS-Lösung bedeckt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.
Nun wurden die Präparate über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper gegen Laminin (1:25 verdünnt in TBS) inkubiert.
Anschließend wurden die Objektträger dreimal für zehn Minuten in TBS-Puffer gewaschen und danach erneut mit einer Blocklösung (5%-Ziegen-Normalserum in 0,8%-BSA in TBS-Lösung) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
Daraufhin wurden die Präparate mit dem Cy3-markierten Sekundärantikörper bedeckt und ebenfalls bei Raumtemperatur für 60 Minuten im Dunkeln inkubiert.
Im Anschluss erfolgte dreimaliges Waschen für je 15 Minuten in TBS sowie die Einbettung unter Deckgläschen mit einem Einbettungsmedium.

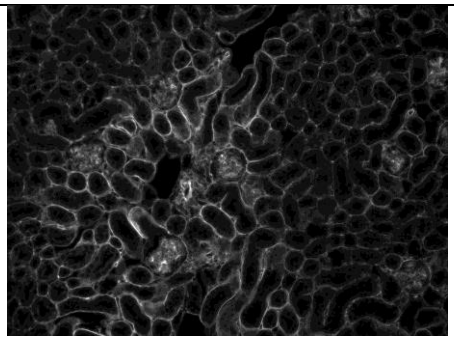
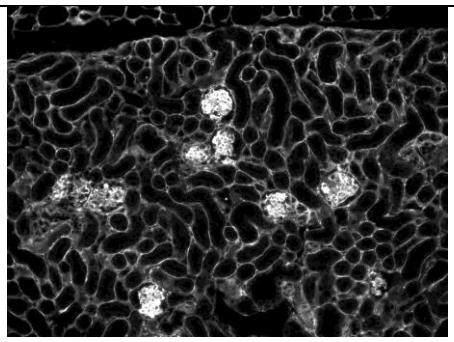
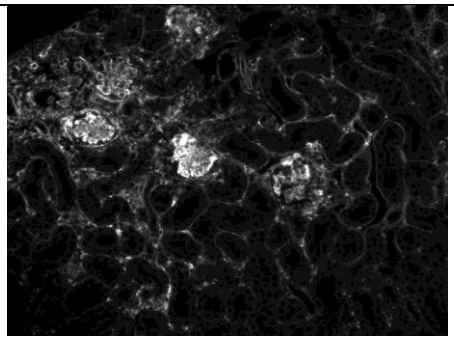
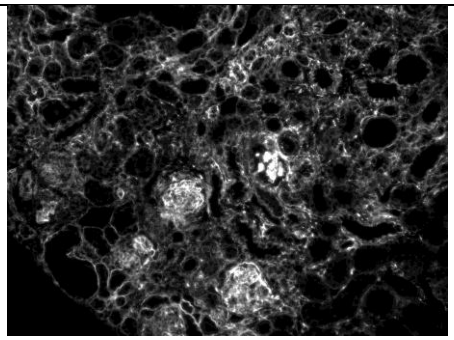
Fibronektin: Die immunhistochemische Behandlung zum Nachweis von Fibronektin erfolgte nach einer ähnlichen Methodik. Zum einen unterschied sich jedoch die Andauung der Präparate: Statt der Behandlung mit einer Proteinase K-Lösung wurden die

Präparate in Citratpuffer getaucht. Der Citratpuffer mit den darin befindlichen Objektträgern wurde dann in der Mikrowelle sechsmal für jeweils fünf Minuten zum Kochen gebracht.
Zum anderen wurden ein Primärantikörper gegen Fibronektin (1:100 in TBS) und ein entsprechender Sekundärantikörper verwendet.

Zur Auswertung wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung betrachtet. Pro Vergrößerung wurden fünf bis zehn Fotografien von repräsentativen Abschnitten des Präparates angefertigt.
Die Fotografien wurden randomisiert und von vier Personen unabhängig voneinander beurteilt. Als Bewertungsgrundlage dienten dabei folgende Schemata:

Laminin-Score:
Der Grad der Fibrosierung des Nierengewebes wurde anhand der in Tabelle 1 beschriebenen Merkmale bestimmt. Dabei sollten sowohl glomeruläre als auch tubulointerstitielle Veränderungen in die Bewertung einbezogen werden. Jedes Bild bekam unter Berücksichtigung beider Bewertungskriterien eine Gesamtnote von 0 bis 3.

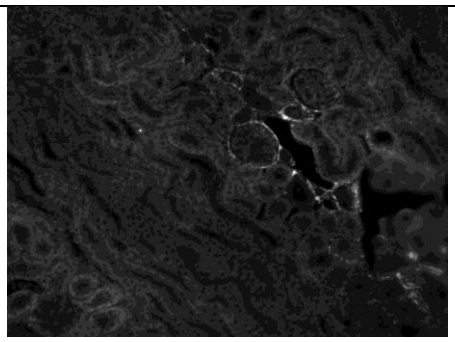
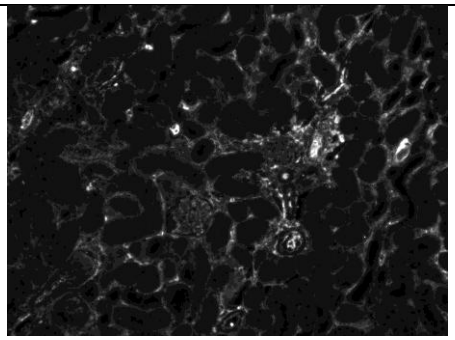
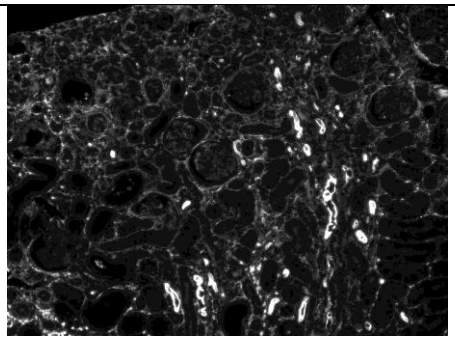
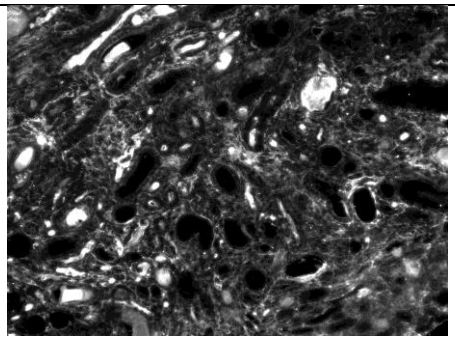
Tabelle 1 Bewertungsschema des Lamininnachweises in der Immunhistochemie

Punkt-wert	**Beispiel**	**Glomerulum**	**Tubulointerstitium**
0		Klar erkennbare, feine Struktur des Kapillar-knäuels, freies Lumen der Bowmankapsel	Klar erkennbare Struktur, schmales Interstitium ohne fibröse Verbreite-rung, keine Fibro-seinseln
1		Klar erkennbare Struktur, Kapil-larschlingen auf-gehellt, begin-nende Kapselfib-rose	Regelmäßige strukturelle An-ordnung der Tubu-li, breites Interstiti-tium mit vereinzel-ten Fibroseinseln
2		Stark veränderte Kapillarstruktur, Aufhellung des Glomerulums, verschmälertes Bowman-Lumen, Kapsel-fibrose	Unregelmäßige strukturelle An-ordnung der Tubu-li, verbreitertes Interstitium mit diffus verteilten Fibrosebereichen
3		Keine Struktur erkennbar, voll-ständige glome-ruläre Sklerose, Verschmelzung von Kapillar-knäuel und Kap-sel	Tubulointerstitielle Struktur durch Fibrosierung auf-gehoben, breite bindegewebige Durchsetzung des Parenchyms

Fibronektin-Score:

Auch die Akkumulation von Fibronektin im Nierenparenchym wurde anhand der in Tabelle 2 aufgelisteten Kriterien mit einem Punktwert von 0 bis 3 bewertet.

Tabelle 2 Bewertungsschema des Fibronektinnachweises in der Immunhistochemie

Punktwert	**Beispiel**	**Beschreibung**
0		Vereinzelte, zarte Signalanreicherung um Glomeruli und Gefäße sowie Gewebsspalten
1		Vermehrte Singnalanreicherung im Interstitium, vereinzelte Fibroseinseln
2		Deutliche Fibrosebereiche im Interstitium, beginnende Verdrängung des Nierengewebes
3		Breite Vernarbung des Gewebes mit starker Signalanreicherung unter Aufhebung der tubulointerstitiellen Architektur

2.7 Serumharnstoff

Das Blut zur Serumharnstoffbestimmung wurde während der Nephrektomie für Western Blot und Immunhistochemie durch intrakardiale Punktion entnommen. Es erfolgte die Zentrifugation für fünf Minuten bei 10.000 rpm, das Serum wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Die Bestimmung von Harnstoff-N im Serum der Tiere wurde von PD Dr. med. Gunnar Brandhorst (Abteilung Klinische Chemie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt und erfolgte mit einem automatischen Analysegerät gemäß den Herstellervorgaben. Aus den Messwerten konnten die Serumharnstoffspiegel rechnerisch ermittelt werden. (Formel: Harnstoff-N in mg/dL x 2,14 = Harnstoff in mg/dL).

3. Ergebnisse

3.1 Elektronenmikroskopie

Durch die Elektronenmikroskopie können mikrostrukturelle Veränderungen des Nierengewebes beurteilt werden. Die glomeruläre Struktur und insbesondere die podozytäre Architektur lagen bei der vorliegenden Fragestellung im Fokus der Betrachtung. Die Aufhebung der podozytären Sekundärfortsatzstruktur, die mit dem Verlust von Filtrationsschlitzen und Schlitzmembranen einhergeht, ist eine typische Veränderung im Rahmen glomerulärer Erkrankungen.

Eine solche Dedifferenzierung der Podozyten konnte bei den DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tieren im Alter von 180 Tagen nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp waren die einzelnen Fußfortsätze an mehreren Stellen nicht mehr voneinander zu unterscheiden und schienen zu einem plumpen Zellfortsatz verschmolzen zu sein. In diesen Bereichen fehlten demzufolge auch die Filtrationsporen mit den dazugehörigen Schlitzmembranen.

Hinsichtlich der glomerulären Basalmembran, der Mesangialzellen und anderer Komponenten des Nierengewebes fielen keine weiteren feinstrukturellen Veränderungen auf.

Abbildungen 5 und 6 zeigen in Ausschnitten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der doppelt heterozygoten Tiere. Abbildung 7 zeigt die physiologische glomeruläre Architektur einer Wildtyp-Maus.

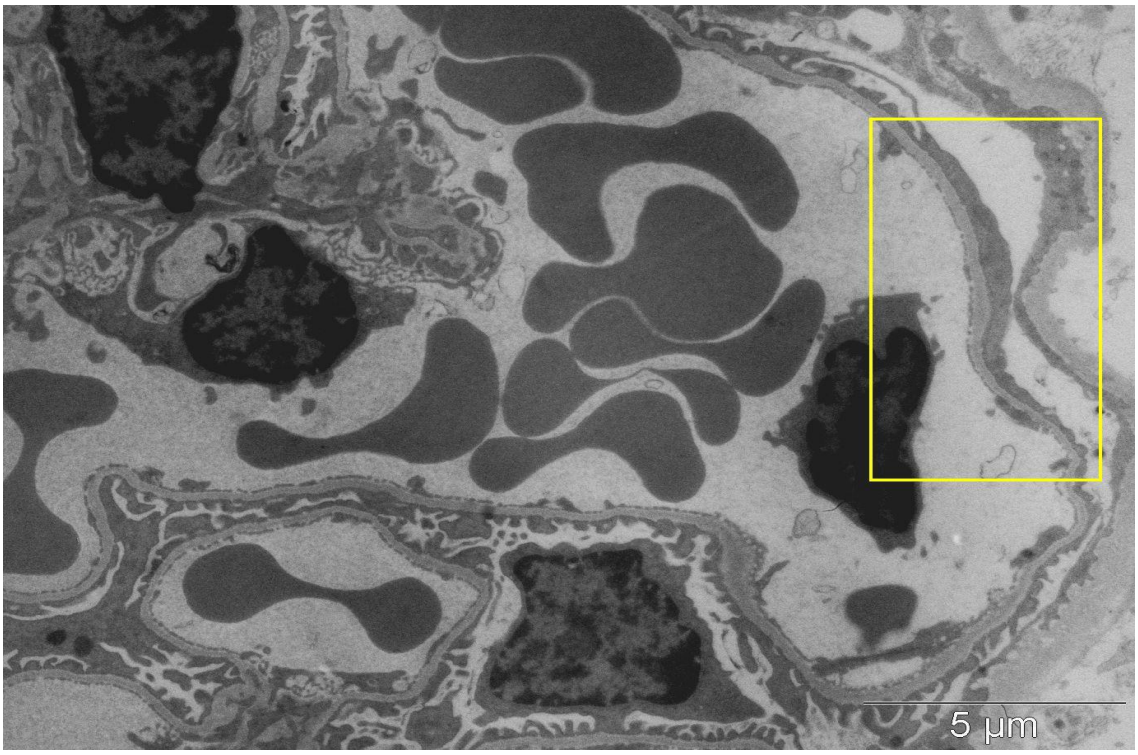


Abbildung 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Versuchstieres. An den glomerulären Kapillarschlingen zeigen sich Podozytenveränderungen im Sinne einer Dedifferenzierung der Fußfortsatzstruktur (gelber Kasten).

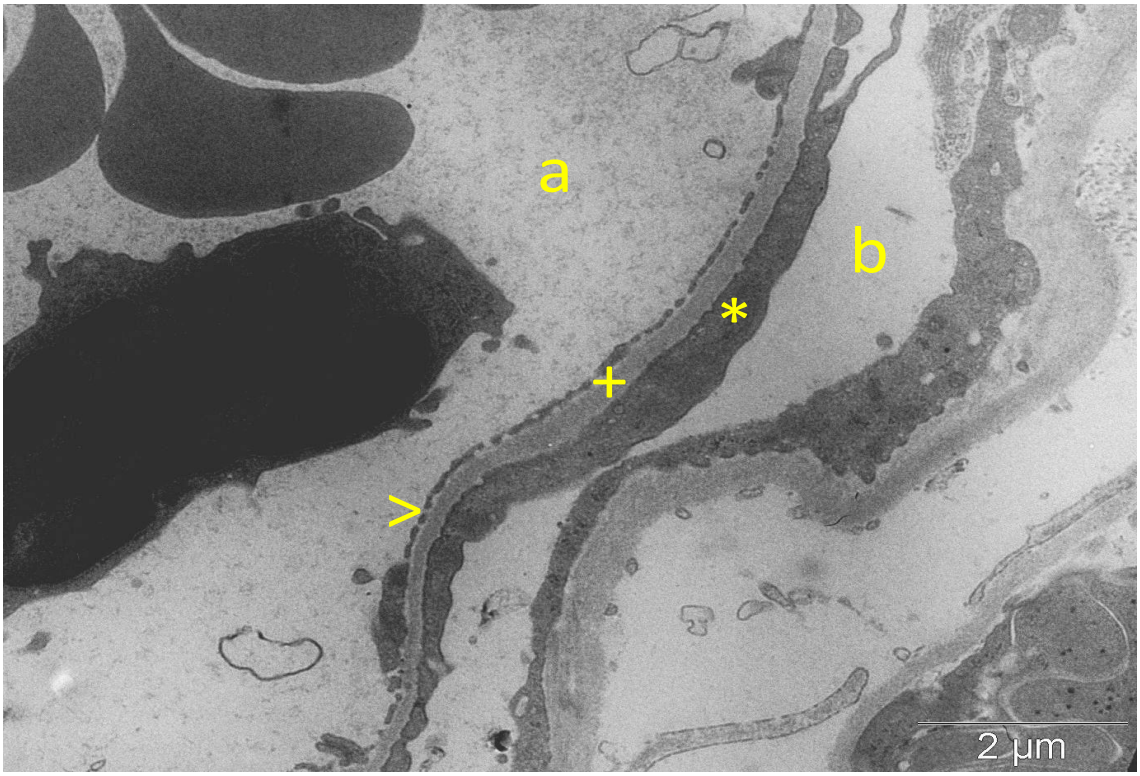


Abbildung 6 Ein vergrößerter Ausschnitt verdeutlicht die veränderte podozytäre Architektur in der Elektronenmikroskopie. Deutlich ist die scheinbare Verschmelzung der Fußfortsätze (*****) zu erkennen. Die GBM (**+**) und das glomeruläre Kapillarendothel (**>**), welche zusammen mit dem podozytären Epithelverband das Kapillarlumen (**a**) vom Bowman-Raum (**b**) trennen, weisen keine Veränderungen auf.

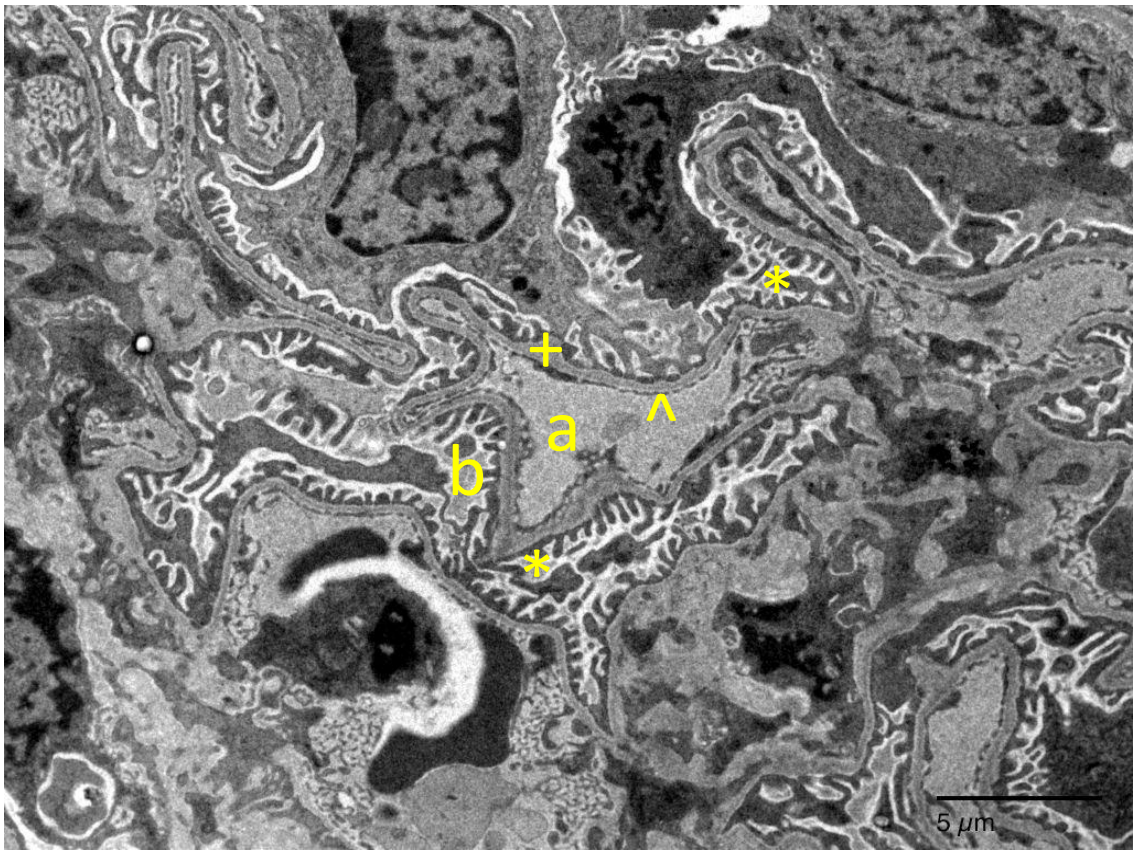


Abbildung 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums einer Wildtyp-Maus. Die feine Struktur der einzelnen, ineinandergreifenden Podozytenfußfortsätze (*****) ist erkennbar. Zusammen mit GBM (**+**) und glomerulärem Kapillarendothel (**>**) bilden sie den glomerulären Filter, welcher das Kapillarlumen (**a**) vom Bowman-Raum (**b**) trennt.

3.2 Proteinurie

Mittels Proteingelelektrophorese wurde bei den Versuchstieren die Menge und die Art der Proteinurie bestimmt. Da es sich hierbei um eine semiquantitative Methode handelt, wird das Ausmaß der Proteinurie als Verhältnis zum Wildtyp angegeben.

Die DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse wiesen eine deutlich erhöhte Proteinurie im Vergleich zum Wildtyp sowie zu den einfach heterozygoten Kontrolltieren auf. Um Rückschlüsse auf die Art der Nierenveränderungen zu erlangen, welche Grundlage dieser Proteinurie sind, wurden bei der Auswertung der Elektrophoresegele drei separate Proteinfraktionen betrachtet.

Zum einen wurde jene Bande identifiziert, die gemäß dem Molekulargewichtsmarker Proteine mit dem ungefähren Molekulargewicht von Albumin (65-70 kD) enthielt. In den Abbildungen 8 und 10 ist diese Bande jeweils durch einen gelben Kasten markiert.

Davon ausgehend wurde eine hochmolekulare Fraktion mit Proteinen bestimmt, die ein höheres Molekulargewicht als Albumin aufwiesen, sowie eine niedermolekulare Fraktion mit kleineren Proteinen. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden desweiteren die Messwerte innerhalb der folgenden Altersintervalle zusammengefasst: 50-90 d, 91-120 d, 121-150 d und 151-180 d.

Die hochmolekulare Fraktion bestand in der Regel aus zwei Banden im Größenbereich von etwa 120 kD bzw. 250 kD. In diesem Bereich fand sich bei den doppelt heterozygoten Tieren (n=6) eine gegenüber dem Wildtyp um ein Vielfaches erhöhte Proteinurie, die in allen Altersgruppen auftrat.

Dabei lagen die Mittelwerte in den Altersintervallen 50-90d, 91-120d und 121-150d beim 4,31- (SD ±0,92), 3,92- (SD ±1,04) bzw. 4,14-fachen (SD ±2,59) der Wildtyp-Vergleichsprobe. Im Alter von 151-180d nahm der Wert ab und war um das 2,77–fache (SD ±0,62) gegenüber dem Wildtyp erhöht (Abbildung 9).

Auch in der Albuminfraktion fiel in allen Altersgruppen eine deutliche Proteinurieerhöhung auf. Der mittlere Vergleichswert bewegte sich auf einem relativ konstanten Niveau mit leichten Schwankungen. Er erreichte im Alter von 50 bis 90 Tagen das 8,72-

fache (SD ±2,48) des Wildtyps. Der Höchstwert war im Alter von 151 bis 180 Tagen mit einer 9,04-fachen Erhöhung (SD ±5,45) zu verzeichnen (Abbildung 9).

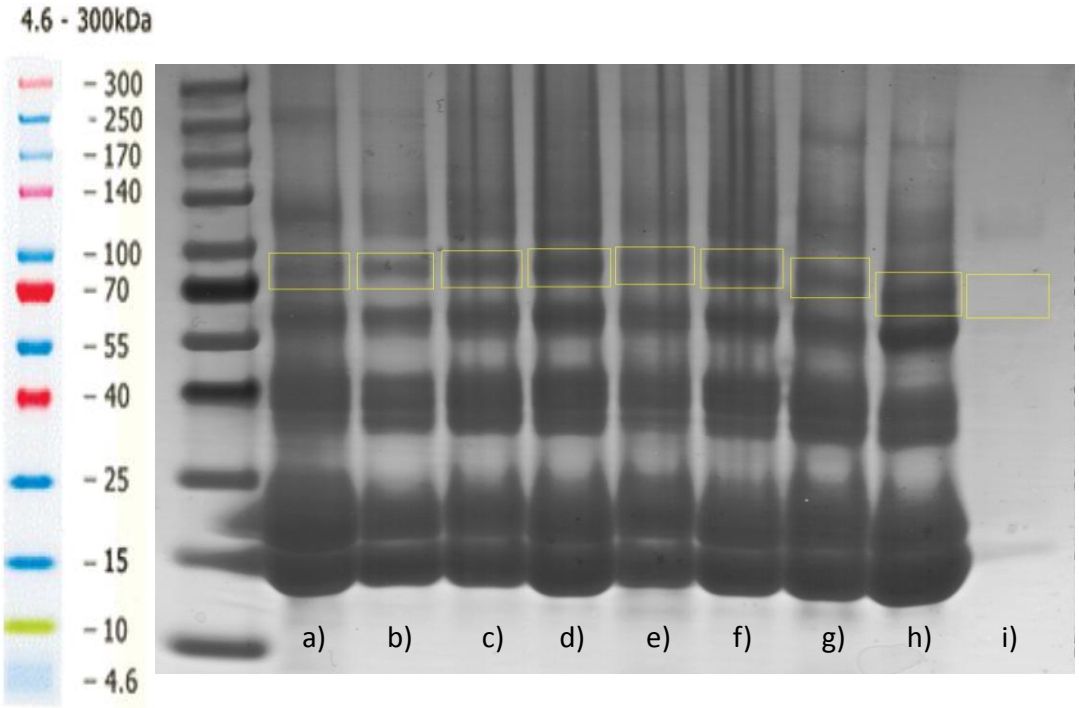


Abbildung 8 Beispiel einer semiquantitaven Proteinuriebestimmung mittels Protein-Gelelektrophorese. Die Reihe **a**) bis **h**) zeigen die Proteinurie einer DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Maus mit ansteigendem Alter (58 – 172 Lebenstage). In der Reihe **i**) ist eine Wildtypprobe zum Vergleich aufgetragen. Der gelbe Kasten markiert jeweils die als Albuminfraktion identifizierte Bande. Die deutlich stärkere Proteinurie im Vergleich zum Wildtyp fällt insbesondere im Bereich der niedermolekularen Proteine (ca. 15-50 kD) auf.

In der niedermolekularen Fraktion war durchweg die deutlichste Erhöhung gegenüber den Wildtypwerten zu beobachten. Sie bestand aus vier Banden bei ca. 15, 20, 40 und 60 kD. Die Proteinurie bewegte sich dabei auf einem konstant hohen Niveau. Im Intervall 121-150d war der niedrigste Wert mit dem 13,10-fachen (SD ±2,05) des Wildtyps zu beobachten. Der höchste Wert ergab sich im Intervall 151-180d mit dem 14,46-fachen (SD ±2,14) des Wildtypniveaus.

In Abbildung 9 ist die altersabhängige Entwicklung der drei Proteinuriefraktionen in ihrer Relation zum Wildtyp aufgetragen:

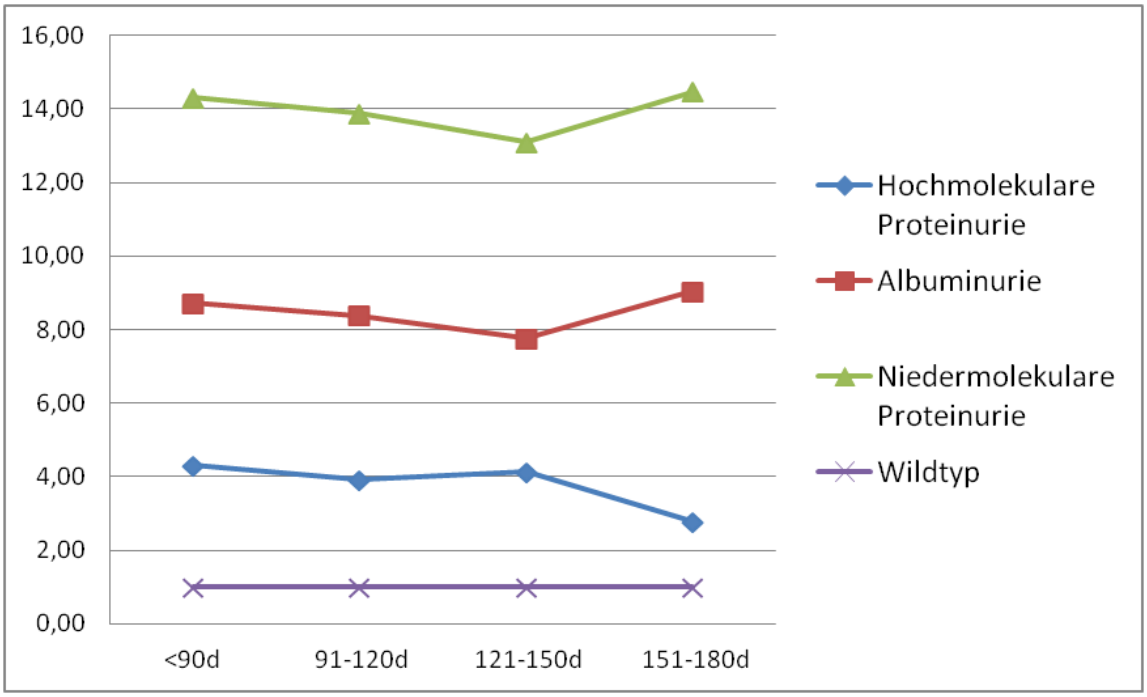


Abbildung 9 Altersabhängiger Verlauf der relativen Proteinurie der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Versuchstiere im Vergleich zum Wildtyp. Die niedermolekulare Proteinurie (grün) ist dabei im Vergleich zum WT am deutlichsten erhöht, die hochmolekulare Fraktion (blau) am geringsten. Zur Veranschaulichung sind die normierten Wildtyp-Werte, welchen der Wert 1,0 zugeordnet wurde, ebenfalls abgebildet (violette Kurve).

Auch im Vergleich zu den einfach heterozygoten Kontrolltieren fiel eine deutliche Proteinurieerhöhung auf:

Im Direktvergleich (Abbildung 10) erreichte eine 118 Tage alte doppelt heterozygote Maus in der hochmolekularen Fraktion den 1,52-fachen Wert einer 120 Tage alten DDR1$^{+/-}$-Kontrolle und den 2,11-fachen Wert einer 114d alten NPHS2$^{+/R140Q}$-Maus.

In der albuminären Fraktion lagen die Werte beim 3,47-fachen gegenüber DDR$^{+/-}$ bzw. bei dem 5,36-fachen gegenüber der NPHS2$^{+/R140Q}$-Kontrolle.

Niedermolekulare Proteine lagen 2,46-fach erhöht gegenüber DDR1$^{+/-}$ und 5,99-fach erhöht gegenüber NPHS2$^{+/R140Q}$ vor.

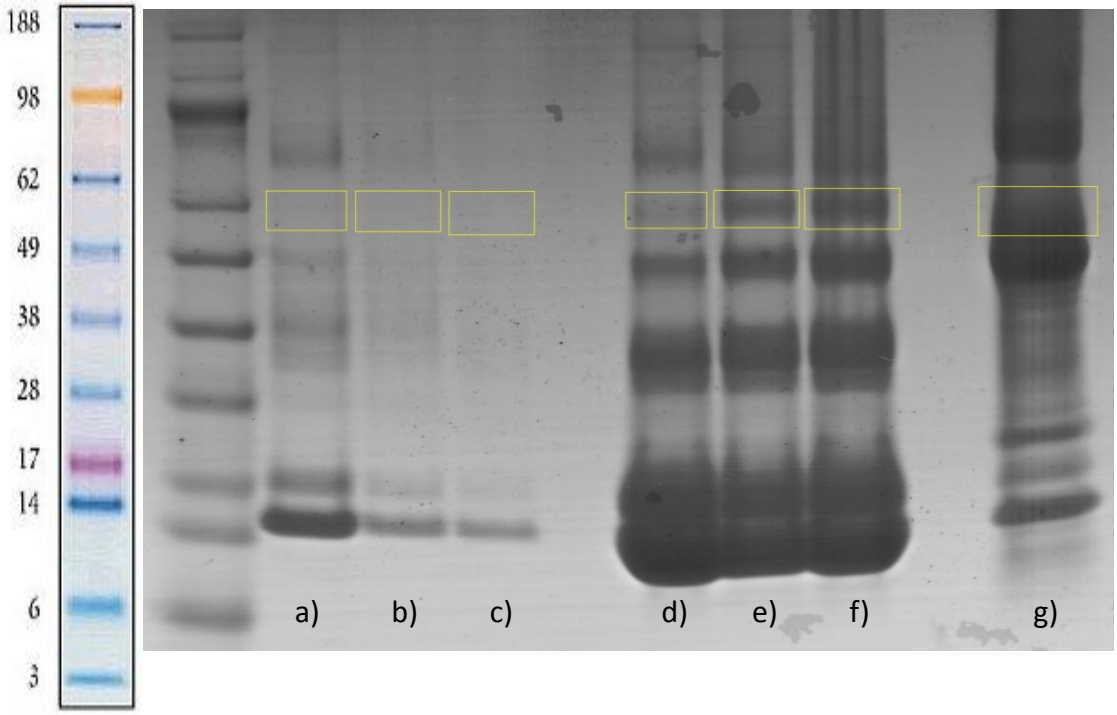


Abbildung 10 Direktvergleich der Proteinuriebestimmung zwischen den DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tieren und den Kontrollgruppen. Im Vergleich fällt die deutliche Proteinurie in der niedermolekularen Fraktion gegenüber den einfach heterozygoten Kontrollen und der COL4A3$^{-/-}$-Maus auf.
a) DDR1$^{+/-}$ **b**) NPHS2$^{+/R140Q}$ **c**) WT **d**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 75d **e**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 118d
f) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 180d **g**) COL4A3$^{-/-}$

Im Vergleich zu einem Kontrolltier mit homozygoter Mutation des COL4A3-Gens, fiel ein qualitativer Unterschied bezüglich der Proteinurie auf. COL4A3$^{-/-}$-Mäuse gelten als etabliertes Tiermodell zur Erforschung des Alport-Syndroms (Cosgrove et al. 1996).

Im Gegensatz zu der Alport-Maus wies das DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tier im Alter von 120 Tagen nur das ca. 0,6-fache an Albumin und hochmolekularen Proteinen im Urin auf. Niedermolekulare Proteine waren jedoch in höherem Maße (2,06-fach) im Urin der doppelt heterozygoten Maus enthalten. Abbildung 10 zeigt den Vergleich von Proben doppelt heterozygoter Versuchstiere mit den einfach heterozygoten Kontrollen und dem COL4A3$^{-/-}$-Tiermodell in der Proteingelelektrophorese.

3.3 Western Blot

Im Western Blot (Abbildung 11) wurden die Gewebespiegel der proinflammatorisch und profibrotisch wirksamen Mediatorproteinen TGFβ und CTGF im Nierengewebe der Versuchstiere bestimmt.

Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers konnten auf der Western Blot-Membran die korrekten Banden identifiziert und densitometrisch ausgewertet werden. Um den unterschiedlichen Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben zu berücksichtigen, wurde auch der Gehalt an Aktin bestimmt. Über das jeweilige Ergebnis konnten die Messwerte für TGFβ und CTGF ins Verhältnis zum Gesamtproteingehalt gesetzt werden.
Da es sich auch hierbei um eine semiquantitative Methodik handelt, wurden die Messwerte mit dem Wildtyp verglichen und als Verhältniswerte angegeben.

Bezüglich TGF-β fielen in den Gewebeproben der $DDR1^{+/-}$/$NPHS2^{+/R140Q}$-Versuchstiere tendenzielle Erhöhungen gegenüber dem Wildtyp auf. Der Wert stieg zudem mit fortschreitendem Alter an. Lag er mit 60 Tagen (n=3) bei dem 1,17-fachen (SD ±0,06) des Wildtyps (n=1), war mit 120 Tagen (n=3) eine 1,42-fache Erhöhung (SD ±0,23) zu verzeichnen. Im Alter von 180 Tagen (n=3) lag der Wert mit dem 1,45-fachen (SD ±0,32) auf gleichbleibendem Niveau (siehe Abbildung 12).

Die TGF-β-Werte lagen für die $DDR1^{+/-}$-Kontrolle beim 1,25-fachen und in der $NPHS2^{+/R140Q}$-Kontrolle beim 1,16-fachen des Wildtyps.

Der TGFβ-Spiegel einer zum Vergleich untersuchten $COL4A3^{-/-}$-Maus lag bei dem etwa 1,11-fachen des Wildtyps und damit ebenfalls unter dem der doppelt heterozygoten Versuchstiere.

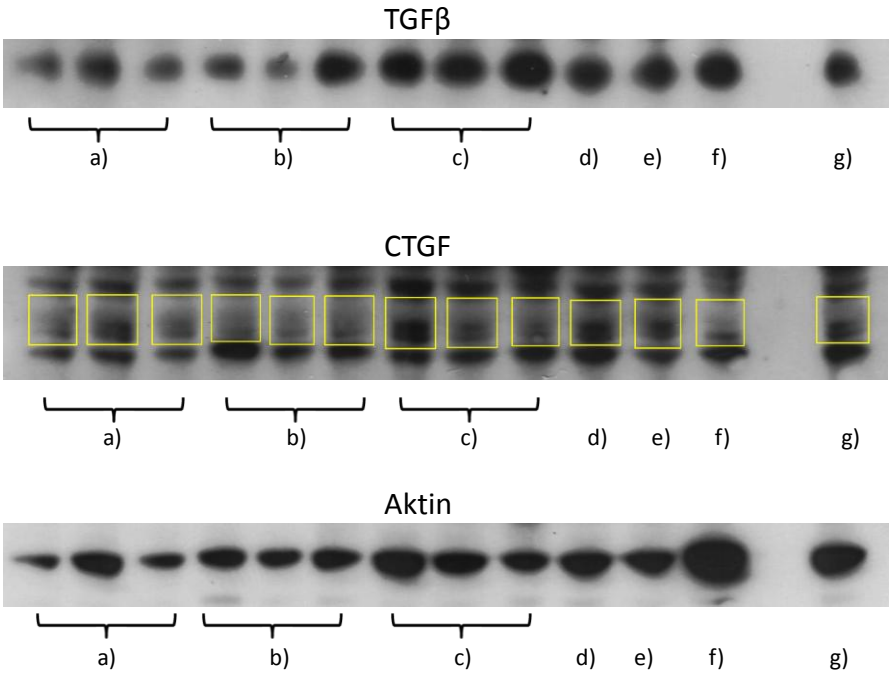


Abbildung 11 Der obere Western Blot zeigt den TGFβ-Gehalt des Nierengewebes der verschiedenen untersuchten Genotypen. Im mittleren Blot ist der Gehalt an CTGF bestimmt worden, wobei die korrekte Bande mit dem gelben Kasten markiert wurde. Unter Berücksichtigung des Gesamtproteingehalts der Einzelproben, welche über den Aktingehalt (unterer Blot) eingeschätzt wurde, konnte eine Erhöhung von TGFβ und CTGF im Nierengewebe der für DDR1 und NPHS2 doppelt heterozygoten Tiere gegenüber dem WT ermittelt werden.
a) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 60d (n=3) **b**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d (n=3) **c**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 180d (n=3) **d**) DDR1$^{+/-}$ **e**) NPHS2$^{+/R140Q}$ **f**) WT, 60 d **g**) COL4A3$^{-/-}$

Auch die CTGF-Gewebespiegel (Abbildung 11, Mitte) der doppelt heterozygoten Tiere lagen über denen der Wildtypkontrolle. Es ließ sich keine kontinuierliche Steigerung der Werte mit dem Alter feststellen. Im Alter von 60 Tagen (n=3) lag der Wert im Durchschnitt beim 2,02-fachen (SD ±0,24) des Wildtyps. Die Werte erreichten ihren Höchstwert bei 120 Lebenstagen (n=3) mit einer 2,65-fachen Erhöhung (SD ±0,37), um im Alter von 180 Tagen (n=3) auf das 1,88-fache (SD ±0,16) abzufallen (Abbildung 12).

Die Werte der DDR1$^{+/-}$ (2,19-fache Erhöhung) und NPHS2$^{+/R140Q}$ (1,88-fach) lagen in einem vergleichbaren Bereich. Auch die Alport-Maus wies mit der 2,29-fachen Erhöhung gegenüber dem WT einen ähnlichen CTGF-Gewebespiegel auf.

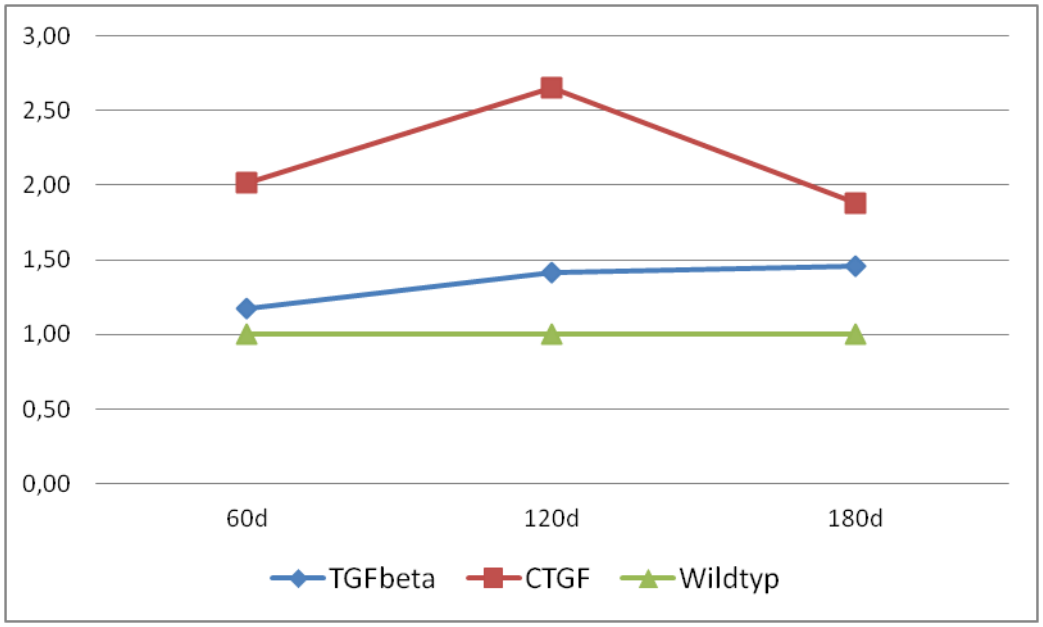


Abbildung 12 Gewebespiegel proinflammatorischer Proteine im Nierengewebe der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse in Relation zum Wildtyp. Während TGFβ zumindest eine leichte Tendenz zum altersabhängigen Anstieg aufweist, erreicht der CTGF-Spiegel seinen Höhepunkt im Alter von 120 Tagen. Zur Veranschaulichung sind die normierten Wildtyp-Werte, welchen der Wert 1,0 zugeordnet wurde, ebenfalls abgebildet (grüne Kurve).

3.4 Immunhistochemie

Das histopathologische Korrelat der chronischen Niereninsuffizienz ist die fortschreitende Fibrosierung von Glomeruli und Tubulointerstitium durch die Akkumulation extrazellulärer Matrixmoleküle. In der Immunhistochemie wurde anhand des Nachweises von Laminin und Fibronektin der Grad der Fibrosierung und Vernarbung des Nierengewebes bestimmt.

Die einzelnen Aufnahmen wurden anhand der unter 2.6 beschriebenen Bewertungsschemata von vier auswertenden Personen beurteilt. Die Mittelwerte der Einzelaufnahmen wurden zusammengefasst und ergaben für jeden untersuchten Genotyp einen altersabhängigen Durchschnittswert bezüglich der Akkumulation von extrazellulärer Matrix und fibrotischen Gewebeveränderungen.

Die Bewertung des Lamininnachweises führte zu folgenden Punktwerten innerhalb des Bewertungsschemas: Die DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tiere (Abbildung 13, a - c) wiesen im

Alter von 60 Tagen (n=2) einen durchschnittlichen Punktwert von 0,27 (SD ±0,03) auf. Im Alter von 120 Tagen (n=3) war dieser Wert auf 0,41 (SD ±0,13) angestiegen. Mit 180 Tagen (n=3) betrug er schließlich 0,78 (SD ±0,08).

In den Kontrollgruppen ergaben sich folgende Werte: NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse kamen im Alter von 180 Tagen (n=3) auf einen Wert von 0,30 (SD ±0,07). DDR1$^{+/-}$ Tiere (n=3) wiesen im gleichen Alter einen Wert von 0,54 Punkten auf (SD ±0,11). Die Wildtypkontrollen (n=2) erreichten in der Lamininfärbung im Durchschnitt den Fibrosewert 0,34 (SD ±0,24).

Damit erreichte der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Genotyp den insgesamt höchsten Wert im Laminin-Score (siehe Abbildung 13).

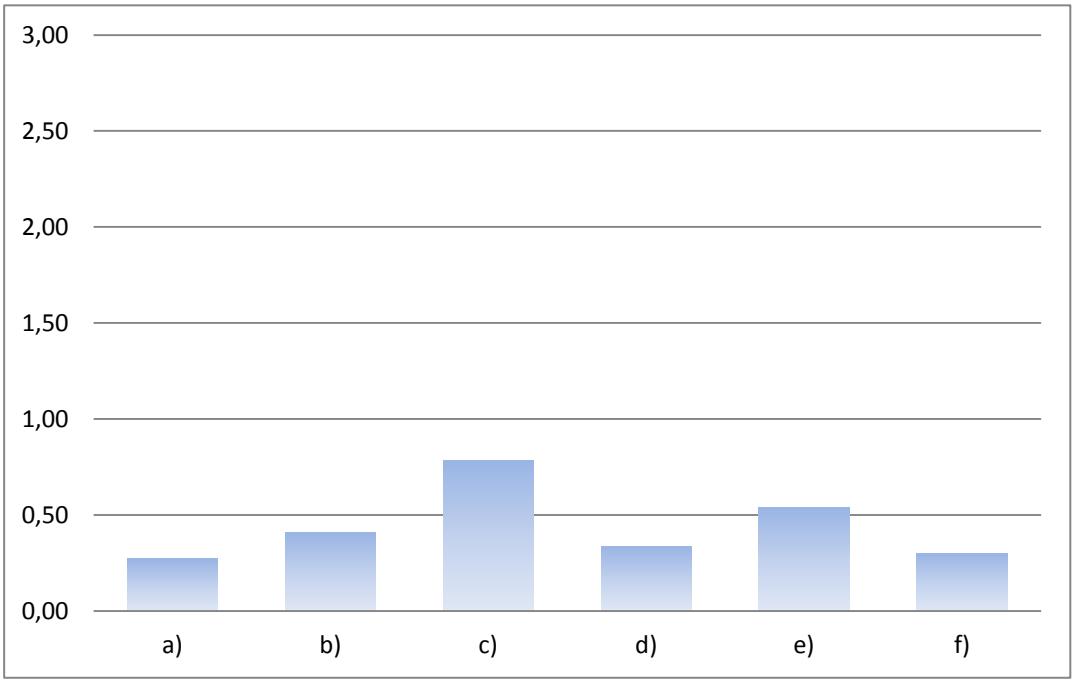


Abbildung 13 Punktwerte des Scores für den immunhistochemischen Lamininnachweis zur Bewertung der Fibrose des Nierengewebes. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse umfasst die y-Achse des Diagrammes Werte von 0 bis 3,0, da dies dem Bewertungsspielraum des zugrundeliegenden Immunhistochemie-Scores entspricht.
a) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 60d (n=2) **b**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d (n=3) **c**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 180d (n=3) **d**) WT, 60d (n=2) **e**) DDR1$^{+/-}$, 120d (n=3) **f**) NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d (n=3)

Die Bewertung des Fibronektinakkumulation im Tubulointerstitium ergab vergleichbare Ergebnisse. Die doppelt heterozygoten Versuchstiere (Abbildung 14, a - c) wiesen im

Alter von 60 Tagen (n=2) einen durchschnittlichen Punktwert von 0,67 (SD ±0,45) auf. Mit 120 Tagen (n=3) lag er bei 0,40 (SD ±0,03) und mit 180 Tagen (n=3) ergab sich ein Durchschnittswert von 0,68 (SD ±0,24).

Die Wildtyp-Kontrollen (n=2) kamen im Durchschnitt auf einen Wert von 0,75 (SD ±0,31), NPHS2$^{+/R140Q}$-Tiere (n=3) auf 0,25 (SD ±0,15) und DDR1$^{+/-}$-Kontrollen (n=3) auf 0,27 Punkte (SD ±0,04).

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse des Fibronektin-Scores der untersuchten Genotypen im Vergleich dargestellt.

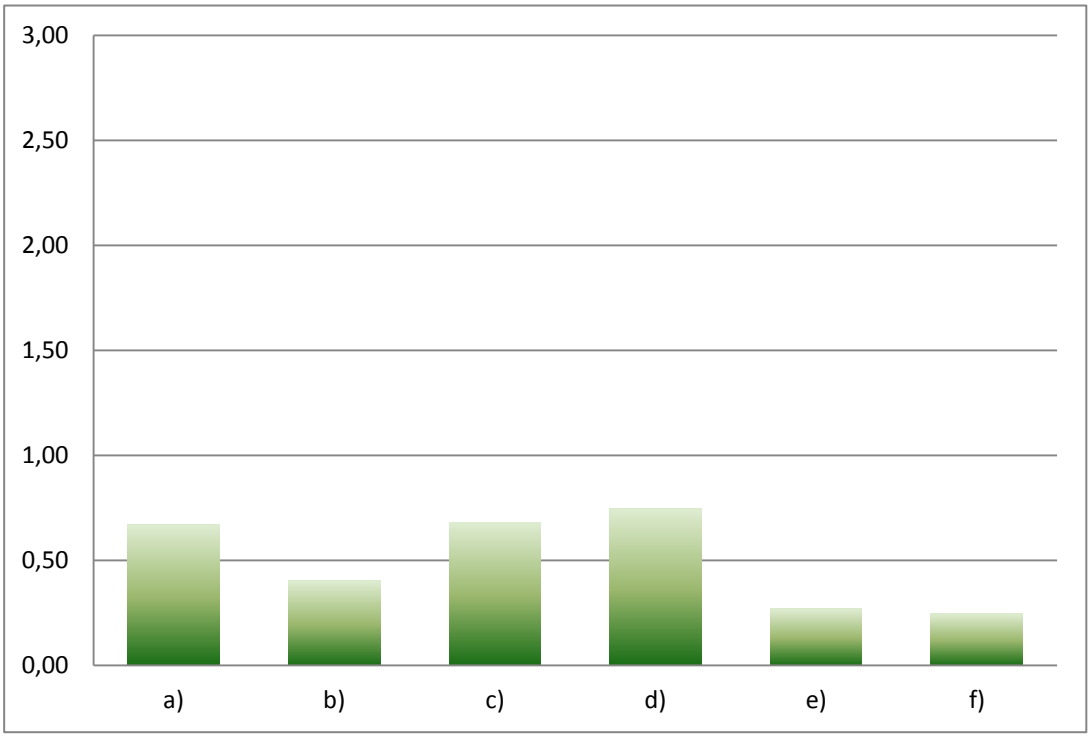


Abbildung 14 Punktwerte des Scores für den immunhistochemischen Fibronektinnachweis zur Bewertung der Fibrosierung des Nierengewebes. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse umfasst die y-Achse des Diagrammes Werte von 0 bis 3,0, da dies dem Bewertungsspielraum des zugrundeliegenden Immunhistochemie-Scores entspricht.
a) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 60d (n=2) **b**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d (n=3) **c**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 180d (n=3) **d**) WT, 60d (n=2) **e**) DDR1$^{+/-}$, 120d (n=3) **f**) NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d (n=3)

In den Abbildungen 15 und 16 sind einige Beispielbilder der wichtigsten untersuchten Genotypen und Altersgruppen in verschiedenen Vergrößerungsstufen dargestellt.

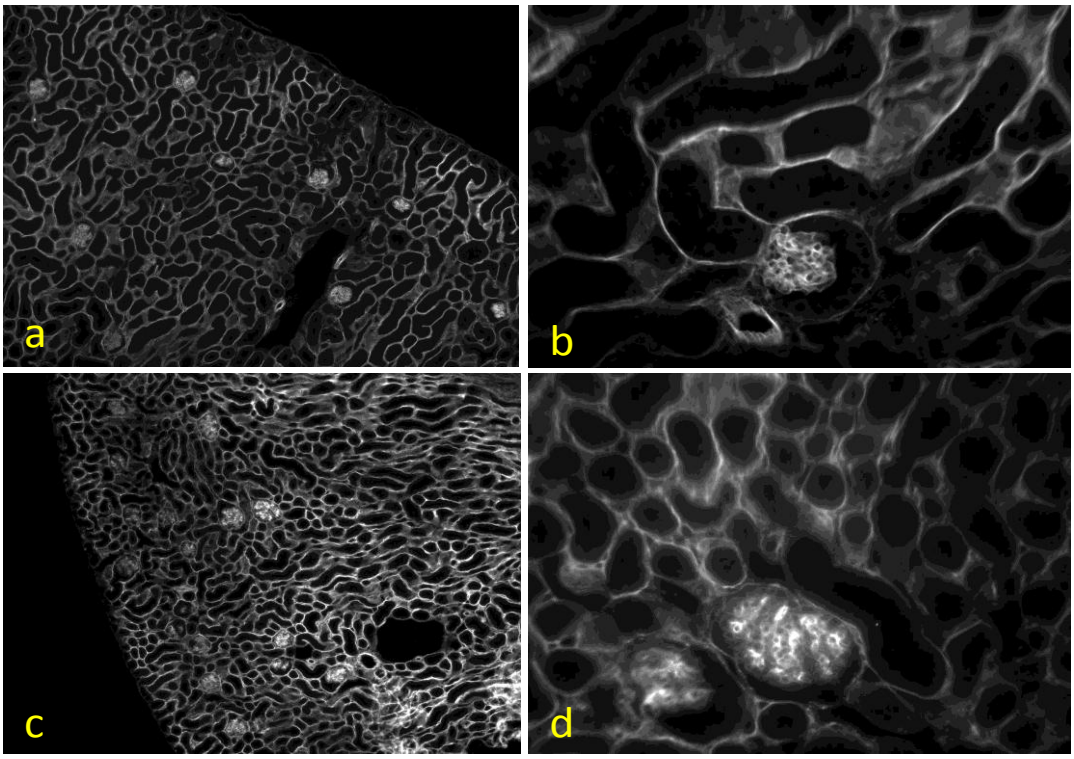


Abbildung 15 Beispielbilder des immunhistochemischen Lamininnachweises. **a**) WT, 60d, 10x Vergrößerung **b**) WT, 60d, 40x Vergrößerung **c**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d, 10x Vergrößerung
d) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d, 40x Vergrößerung

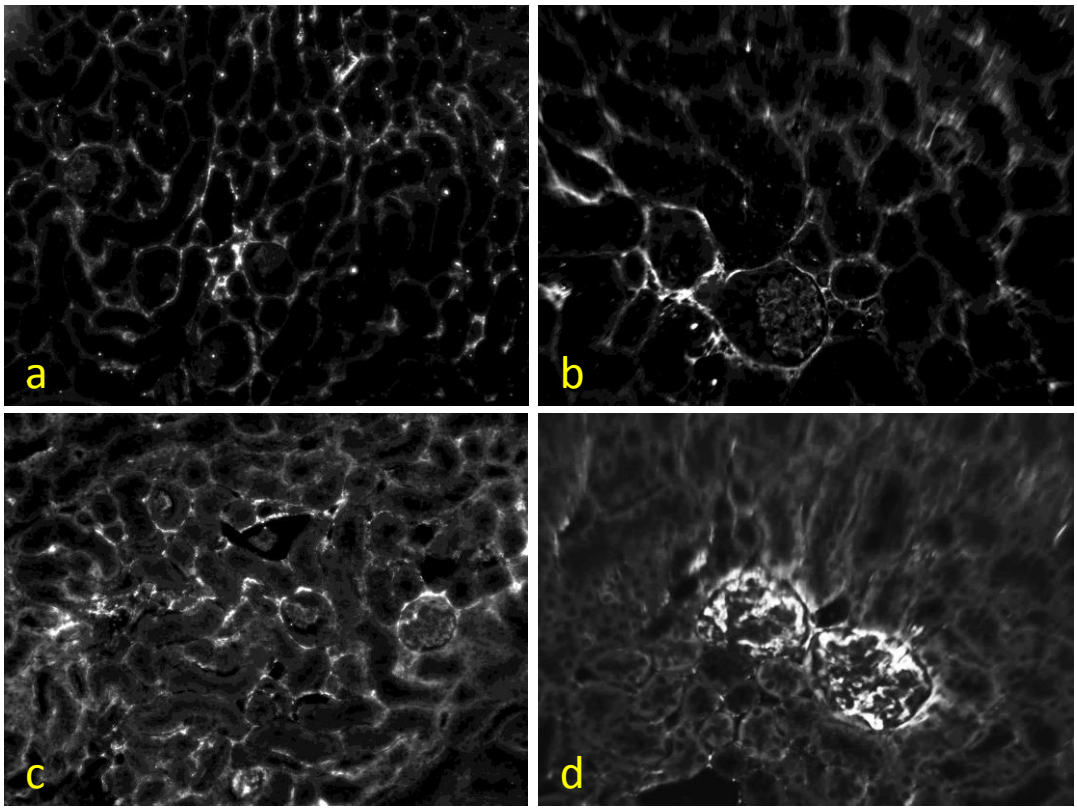


Abbildung 16 Beispielbilder des immunhistochemischen Fibronektinnachweises. **a**) WT, 60d, 20x Vergrößerung **b**) WT, 60d, 40x Vergrößerung **c**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d, 20x Vergrößerung
d) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 180d, 40x Vergrößerung

3.5 Serumharnstoff

Harnstoff ist ein Endprodukt aus dem Abbau stickstoffhaltiger Moleküle. Bei chronischem Nierenversagen wird zunehmend weniger Harnstoff über die Nieren ausgeschieden und dieser verbleibt damit im Blut. Der Harnstoffspiegel im Blutserum kann somit als Marker für die Nierenfunktion herangezogen werden.

Diesbezüglich ergaben sich bei den DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäusen keine Erhöhungen im Vergleich mit den Kontrolltieren (Abbildung 17). Im Gegenteil wiesen die Wildtypkontrollen (n=3) sogar den höchsten Wert mit durchschnittlich 55,93 mg/dL (SD ±31,77) auf.

Die doppelt heterozygoten Tiere erreichten im Alter von 60 Tagen (n=5) 37,86 mg/dL (SD ±6,53). Mit 120 Tagen (n=3) lag der Wert bei 49,73 mg/dL (SD ±9,53) und im Alter von 180 Tagen (n=3) bei 45,13 mg/dL (SD ±10,24).

Die einfach heterozygoten Kontrolltiere wiesen ähnliche Werte auf. In der Gruppe der DDR1$^{+/-}$ Mäuse (n=3) betrug der Durchschnittswert im Alter von 180 Tagen 49,63 mg/dL (SD ±11,84).

Aufgrund mangelnden Probenmaterials konnte nur eine 180 Tage alte NPHS2$^{+/-}$ Maus untersucht werden. Dieser Einzelwert lag bei 45,18 mg/dL und damit in einem vergleichbaren Bereich.

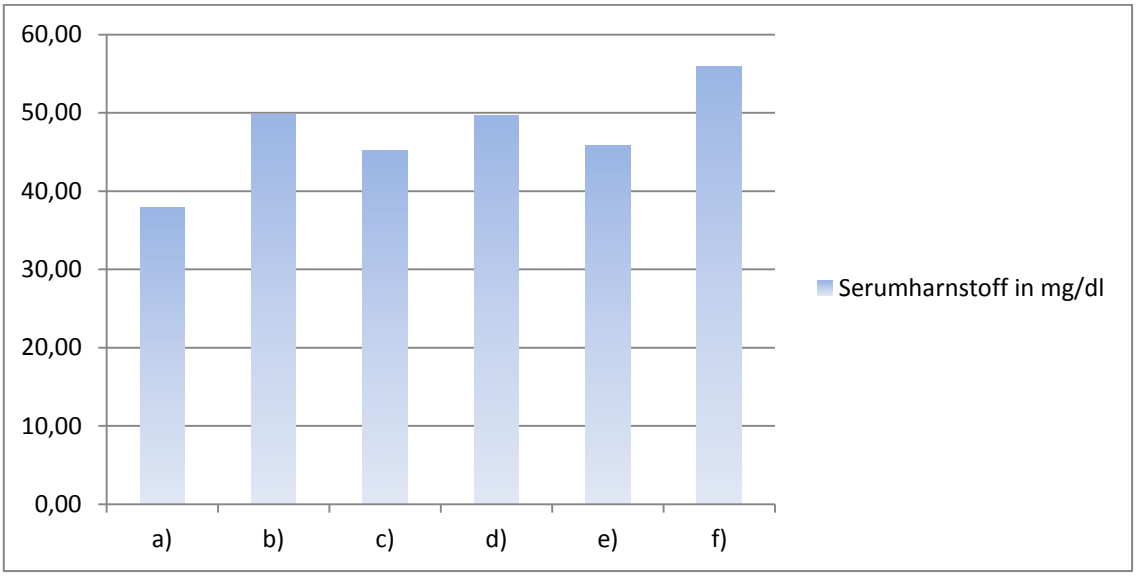


Abbildung 17 Serumharnstoffwerte der verschiedenen Genotypen im Vergleich. Es findet sich keine Erhöhung gegenüber dem Wildtyp oder den einfach heterozygoten Kontrolltieren. Alle Durchschnittswerte liegen in einem physiologischen Bereich.
a) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 60d (n=5) **b**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d (n=3) **c**) DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$, 180d (n=3) **d**) DDR1$^{+/-}$, 120d (n=3) **e**) NPHS2$^{+/R140Q}$, 120d (n=1) **f**) WT, 60-180d (n=3)

4. Diskussion

4.1 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse zeigten Veränderungen der podozytären Morphologie. Statt der fein ineinandergreifenden Sekundärfortsätze war an einigen Stellen eine plumpe, abgeflachte Struktur zu erkennen. Dieser Befund ist ein Zeichen für die lokalisierte Dedifferenzierung der podozytären Sekundärfortsatzstruktur. Filtrationsporen und Schlitzmembranen sind an diesen Stellen verloren gegangen.

Das Auftreten eines solchen podozytären Phänotyps in den Nieren der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse deutet darauf hin, dass die heterozygote Mutation von DDR1 und NPHS2 in Kombination zu einer Beeinträchtigung der Zellorganisation der Podozyten geführt hat. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, nach der es zwischen GBM und SM Interaktionsmechanismen gibt und dass DDR1-Rezeptoren und Podocin bedeutende Komponenten dieser Interaktionskette darstellen.

In den einfach heterozygoten DDR1$^{+/-}$- und NPHS2$^{+/R140Q}$-Kontrollen konnten keine entsprechenden Podozytenveränderungen beobachtet werden. Erst durch die Kombination der beiden heterozygoten Mutationen wird der physiologische Interaktionsmechanismus empfindlich geschädigt, und es resultieren die beschriebenen podozytären Veränderungen.

Diese stehen im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen wie auch in diversen Tiermodellen in Zusammenhang mit der Entwicklung einer Proteinurie (Murphy et al. 1979). Vor diesem Hintergrund wäre auch bei den DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäusen ein glomerulärer Funktionsverlust und der Verlust von Plasmaproteinen mit dem Urin zu erwarten.

4.2 Proteinurie

Die DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse zeigten eine ausgeprägte Proteinurieerhöhung gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Auch im Vergleich zu den einfach heterozygoten Kontrolltieren fiel eine deutliche Proteinurie der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse auf. Diese lag in einem höheren Bereich, als bei einem rein additiven Effekt zu erwarten gewesen wäre.

Die in der Elektronenmikroskopie dokumentierten morphologischen Veränderungen der Podozyten gehen somit auch im DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tiermodell mit einem zumindest partiellen Verlust der glomerulären Funktion einher.

Wie bei einem Verlust der glomerulären Filterfunktion zu erwarten, waren Albumin und höhermolekulare Proteine im Urin der doppelt heterozygoten Mäuse deutlich (etwa acht- bzw. vierfach) gegenüber dem Wildtyp erhöht.

Im Verhältnis dazu kam es zu einer besonders hohen Ausscheidung niedermolekularer Proteine (<60 kD), welche unabhängig vom Alter beim 13- bis 14-fachen des Wildtyps lag.

Dieser Befund wird deutlich im Vergleich mit dem Proteinuriemuster der COL4A3$^{-/-}$-Maus, welche einen weitaus höheren Anteil hochmolekularer Proteine ausschied. Der geringere Anteil hochmolekularer Proteine im Urin des DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tiermodells spricht für einen geringer ausgeprägten glomerulären Funktionsverlust im Vergleich zum COL4A3$^{-/-}$-Modell.

Proteine mit einem Molekulargewicht unter 40 kD können den glomerulären Filter nahezu ungehindert passieren. Im Anschluss werden sie jedoch von den Epithelzellen des proximalen Tubulusabschnitts fast vollständig reabsorbiert. Die niedermolekularen Proteine tauchen nur dann im Urin auf, wenn diese tubuläre Reabsorption im Anschluss an den Übertritt der Proteine über den glomerulären Filter beeinträchtigt ist (D'Amico und Bazzi 2003).

Grundlage hiervon könnte eine schwere glomeruläre Schädigung sein, welche zum massiven Übertritt von großen und kleinen Proteinen über den glomerulären Filterapparat führt. Das Überangebot an Proteinen im Tubuluslumen übersteigt die Kapazität

der tubulären Reabsorptionsmechanismen, und es kommt nicht nur zum Verlust von hoch- sondern auch von niedermolekularen Proteinen mit dem Urin (Vinge et al. 2010). Der im Verhältnis zu den großen Proteinen besonders hohe Anteil niedermolekularer Proteine im Urin der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse erklärt sich jedoch nicht allein aus einem Selektivitätsverlust des glomerulären Filters.

Die Beeinträchtigung der tubulären Reabsorption und damit die Entwicklung einer niedermolekularen Proteinurie kann auch Folge einer Schädigung des Tubulusepithels durch tubulointerstitielle Fibrose oder spezifische tubulär lokalisierte Erkrankungen sein (D'Amico und Bazzi 2003; Drube et al. 2009).

In der Immunhistochemie konnte bei den DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäusen jedoch keine tubulointerstitielle Fibrose nachgewiesen werden (4.4), sodass eine tubuläre Funktionseinschränkung aufgrund von fibrotischen Verdrängungsprozessen nahezu ausgeschlossen werden kann.

Eine tubuläre Schädigung als direkte Folge des DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Genotyps erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da Podocin ausschließlich ein Produkt des Podozyten ist und von tubulären Epithelzellen nicht exprimiert wird (Roselli et al. 2002).
Auch eine pathologische Erhöhung niedermolekularer Plasmaproteine im Sinne einer prärenalen Proteinurie ist vor diesem Hintergrund nicht plausibel.

Zumindest theoretisch könnte die Degradation hochmolekularer Proteine durch Proteolyse zur erhöhten Detektion kleinerer Proteine im Urin der doppelt heterozygoten Tiere geführt haben. Die Proteinelektrophorese der Urinproben wurde erst nach Gewinnung von Proben aller Altersstufen durchgeführt, woraus eine Lagerungsdauer von bis zu 180 Tagen resultierte. Eventuell könnte eine solch lange Lagerung einen negativen Einfluss auf die Stabilität hochmolekularer Proteine gehabt haben.
Gegen diese Theorie spricht das Proteinuriemuster der COL4A3$^{-/-}$-Maus, deren Urin in gleicher Weise gewonnen und gelagert wurde. Wie beschrieben zeigt diese Vergleichsprobe eine ausgeprägte hochmolekulare Proteinurie.

Die immunspezifische Charakterisierung, z. B. durch Western Blot, hätte hier weiteren Aufschluss über die Art der ausgeschiedenen Proteine und damit über den Ursprung der ausgeprägten niedermolekularen Proteinurie geben können.

Insgesamt muss von einer ausgeprägten Einschränkung der glomerulären Selektivität ausgegangen werden. Der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Genotyp hat demnach nicht nur morphologische sondern auch funktionelle Auswirkungen auf den podozytären Phänotyp. Die Ergebnisse aus Elektronenmikroskopie und Proteinurieanalyse sprechen für das Vorliegen einer Interaktionseineit aus SM und GBM, welche durch die kombinierte heterozygote Mutation von DDR1 und NPHS2 in ihrer Funktionsweise beeinträchtigt wird.

4.3 Western Blot

Der spezifische Nachweis im Western Blot ergab eine tendenzielle Erhöhung proinflammatorischer und profibrotischer Mediatorproteine im Nierengewebe der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Versuchstiere.

Die Wildtyp-Probe zeigte den geringsten Gewebespiegel sowohl an TGFβ als auch an CTGF. Die TGFβ-Werte der doppelt heterozygoten Mäuse waren demgegenüber nur geringfügig erhöht. Ebenso zeigte sich CTGF allenfalls tendenziell gegenüber dem Wildtyp erhöht.

Der Direktvergleich mit einer COL4A3$^{-/-}$-Maus als Modellorganismus für renale Fibrose und terminales Nierenversagen im Rahmen des Alport-Syndroms ergab kein eindeutiges Ergebnis. Die Gewebespiegel von TGFβ und CTGF in der Niere der Alport-Maus lagen in einem ähnlich niedrigen Bereich wie im DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Modell und im WT. Normalerweise zeigen COL4A3$^{-/-}$-Tiere massiv erhöhte TGFβ- und CTGF-Werte (Gross et al. 2003; Beirowski et al. 2006).

Vor dem Hintergrund der fehlenden renalen Fibrosierung der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tiere (siehe 4.4) hätte man auch in diesem Vergleich deutlich erhöhte Werte im Nierengewebe der Alport-Maus erwarten können.

Durch den fehlenden Kontrast zum Modellorganismus der Alport-Maus ist die Bewertung der proinflammatorischen und profibrotischen Aktivität innerhalb des Nierengewebes des DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Genotyps somit schwierig. Die allenfalls geringfügige Erhöhung von TGFβ und CTGF gegenüber dem Wildtyp lässt jedoch nicht auf gesteigerte inflammatorische oder fibrotische Prozesse schließen.

4.4 Immunhistochemie

In der Bewertung des immunhistochemischen Lamininnachweises erreichten die DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse im Alter von 180 Tagen den höchsten Punktwert aller untersuchten Genotypen und Altersgruppen. Zwar lag dieser mit 0,78 mehr als doppelt so hoch wie der Wildtyp-Wert (0,34). Im Rahmen des Bewertungsschemas, welches Punktwerte von 0 bis 3 vorsah, ist er allerdings immer noch im niedrigen Bereich anzusiedeln.

Bei der Bewertung der Fibronektinablagerungen im Nierengewebe erreichte die Wildtyp-Gruppe den höchsten Wert mit 0,75. Die doppelt heterozygoten Tiere lagen mit maximal 0,68 in einem vergleichbaren Bereich. Auch die Fibronektinbestimmung erbrachte somit nicht den Nachweis einer Fibrosierung des Nierengewebes.

Die Versuchstiere zeigten demnach in der Immunhistochemie nur andeutungsweise jene typischen histopathologischen Veränderungen, welche im Rahmen der chronischen Nierenfibrose zu beobachten sind (Heidet und Gubler 2009). Histologische Veränderungen, welche im Sinne einer Zerstörung der ursprünglichen glomerulären und tubulointerstitiellen Architektur zu Einschränkungen der Nierenfunktion führen würden, konnten bei keinem der untersuchten Versuchstiere dokumentiert werden.

Im einleitend beschriebenen Fallbeispiel aus Österreich war es bei mehreren Trägerinnen einer heterozygoten Alport-Mutation und eines heterozygoten Podocinpolymorphismus zu fibrotischen Nierenveränderungen und terminaler Niereninsuffizienz gekommen.

Ein solcher Verlauf zeigte sich im untersuchten Tiermodell nicht. Wie in 4.1 und 4.2 beschrieben, hat der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Genotyp durch den Eingriff in die SM-GBM-

Interkation zwar einen klar erkennbaren Einfluss auf die podozytäre Morphologie und Funktion. Die Ergebnisse aus Western Blot und Immunhistochemie sprechen jedoch nicht für darüberhinausgehende Veränderungen im Sinne einer Organfibrosierung.

4.5 Serumharnstoff

Die Serumharnstoffwerte der DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Mäuse deuteten im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht auf eine Einschränkung der Nierenfunktion hin. Im Gegenteil zeigten sich die höchsten Serumharnstoffwerte sogar bei jenen Kontrolltieren mit einem WT-Genotyp.

In anderen Veröffentlichungen fanden sich im Serum gesunder Versuchstiere Serumharnstoffspiegel zwischen 25 und 50 mg/dl und damit vergleichbare Werte wie in dieser Arbeit. Im Gegensatz dazu zeigen COL4A3$^{-/-}$-Mäuse, welche als Tiermodell der chronischen Nierenfibrose gelten und im Alter von etwa 70 Lebenstagen an terminalem Nierenversagen sterben, kurz vor ihrem Tod Werte von ca. 250 mg/dl (Beirowski et al. 2006).

Werte dieser Größenordnung und damit der Hinweis auf eine deutliche Einschränkung der renalen Gesamtfunktion wurden bei keinem der untersuchten Versuchstiere beobachtet. Vor dem Hintergrund der fehlenden fibrotischen Veränderungen in der Immunhistochemie (4.4) wäre eine solche Funktionseinschränkung jedoch auch nicht zu erwarten gewesen.

4.6 Bewertung und Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte DDR1$^{+/-}$/NPHS2$^{+/R140Q}$-Tiermodell wies eine Proteinurie und eine podozytäre Dedifferenzierung auf. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Interaktion zwischen GBM und SM und hebt die Rolle von DDR1 und Podocin im Rahmen dieser Interaktion hervor.

Beim Menschen sind NPHS2-Varianten, vergleichbar mit der im Modell verwendeten R140Q-Mutation, in heterozygoter Form relativ häufig (Tsukaguchi et al. 2002).

DDR1-Mutationen wurden beim Menschen in malignen Tumorzellen nachgewiesen (Davies et al. 2005). Ob sie in gesunden menschlichen Zellen in heterozygoter oder homozygoter Form vorkommen, ist in der bestehenden wissenschaftlichen Literatur nicht beschrieben.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit wäre eine Proteinurie beim Menschen aufgrund der Kombination von heterozygoten DDR1-Mutationen und Podocinpolymorphismen zumindest theoretisch denkbar. Die Frage, ob diese oder ähnliche Kombinationen im Rahmen nephrotischer Syndrome unklarer Ursache eine Rolle spielen, bietet sich als Gegenstand weiterführender wissenschaftlicher Untersuchungen an.

Die Bedeutung von DDR1 geht weit über das hier diskutierte Versuchsmodell hinaus. So verzögerte der genetische Verlust von DDR1-Rezeptoren in diversen Mausmodellen das Fortschreiten glomerulärer Pathologien (Flamant et al. 2006; Gross et al. 2010). Dies führte zu der Annahme, dass die gezielte Blockade von DDR1-Rezeptoren ein vielversprechender Therapieansatz dieser Erkrankungen darstellen könnte: In jüngster Vergangenheit wurde ein spezifischer Antikörper produziert, welcher eine wirkungsvolle selektive Blockade von DDR1-Rezeptoren bewirkt (Kim et al. 2013). Der gezielte pharmakologische Eingriff auf der Ebene podozytärer Interaktionsmechanismen mit extrazellulären Strukturen scheint somit zukünftig eine reale Therapieoption zu sein.

Dies verdeutlicht die Möglichkeiten, welche sich aus Erkenntnissen über pathophysiologische Mechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene im Rahmen glomerulärer Erkrankungen ergeben.
Auch die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf die hohe Bedeutung der Interaktionseinheit aus Podozyt, GBM und SM für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion hin. Ein tiefgreifendes Verständnis dieser Interaktionsmechanismen und ihrer Bedeutung für die Nierenfunktion könnte zur Entwicklung neuer Therapieansätze im Rahmen glomerulärer Erkrankungen führen.

5. Zusammenfassung

Heterozygote Alport-Mutationen in den Genen von Typ IV Kollagen führen beim Menschen zum Krankheitsbild der Familiären Benignen Hämaturie ohne ausgeprägte Proteinurie oder Progression zum terminalen Nierenversagen. Heterozygote Podocin-Polymorphismen haben ebenfalls keine signifikanten Einschränkungen der renalen Funktion zur Folge. Die Kombination aus heterozygoter Alport-Mutation und heterozygotem Podocin-Polymorphismus führt beim Menschen jedoch zu Proteinurie und in einzelnen Fällen zu terminalem Nierenversagen.

Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass zwischen glomerulärer Basalmembran (Typ IV Kollagen) und Schlitzmembran (Podocin) eine über den Podozyten vermittelte Interaktion besteht. Die Beeinträchtigung dieser Interaktion könnte in der Pathogenese glomerulärer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung sein. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Interaktionsmechanismen daher näher beleuchtet werden.

Im Rahmen von Alport-Mutationen ist der podozytäre Kontakt zu Strukturen der glomerulären Basalmembran eingeschränkt. Dieser Kontakt wird unter anderem durch Kollagenrezeptoren vom Typ DDR1 vermittelt.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tiermodell wies sowohl eine heterozygote DDR1-Mutation als auch eine heterozygote Mutation des Podocingens NPHS2 auf. Der Einfluss des $DDR1^{+/-}/NPHS2^{+/R140Q}$-Genotyps auf die glomeruläre und gesamtrenale Morphologie und Funktion stand bei den Untersuchungen im Mittelpunkt des Interesses.

In der Elektronenmikroskopie waren Veränderungen der podozytären Zellorganisation im Sinne einer Dedifferenzierung der Fußfortsätze nachweisbar. Desweiteren zeigte sich eine Proteinurie im hochmolekularen und insbesondere im niedermolekularen Bereich. Diese negativen Auswirkungen des $DDR1^{+/-}/NPHS2^{+/R140Q}$-Genotyps auf die podozytäre Differenzierung und die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrations-

barriere sprechen für eine bedeutende Rolle von DDR1 und Podocin im Rahmen der postulierten Interaktion zwischen glomerulärer Basalmembran und Schlitzmembran.

Die dokumentierten Veränderungen führten jedoch nicht zu einer chronischen Nierenschädigung im Sinne einer Fibrose oder einer funktionellen Einschränkung:

TGFβ und CTGF als Marker für proinflammatorische und profibrotische Aktivität waren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht erhöht nachweisbar.
Auch konnte in der Immunhistochemie keine vermehrte Akkumulation extrazellulärer Matrixmoleküle im Sinne einer Nierenfibrose dokumentiert werden.
Die Messung von Harnstoff im Serum lieferte zudem keinen Anhalt für eine globale Einschränkung der Nierenfunktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine große Bedeutung der Interaktion zwischen glomerulärer Basalmembran und Schlitzmembran für die Aufrechterhaltung der glomerulären Funktion.
In Zukunft könnte ein detailliertes Verständnis dieser Interaktionsmechanismen zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung glomerulärer Erkrankungen führen.

6. Literaturverzeichnis

Badenas C, Praga M, Tazón B, Heidet L, Arrondel C, Armengol A, Andrés A, Morales E, Camacho JA, Lens X et al. (2002): Mutations in theCOL4A4 and COL4A3 genes cause familial benign hematuria. J Am Soc Nephrol 13, 1248–1254

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 17, 1986–1994

Blattner SM, Kretzler M (2005): Integrin-linked kinase in renal disease: connecting cell-matrix interaction to the cytoskeleton. Curr Opin Nephrol Hypertens 14, 404–410

Bohle A, Mackensen-Haen S., von Gise H., Grund KE, Wehrmann M., Batz C., Bogenschütz O., Schmitt H., Nagy J., Müller C. et al. (1990): The Consequences of Tubulo-Interstitial Changes for Renal Function in Glomerulopathies: A Morphometric and Cytological Analysis. Pathol Res Pract 186, 135–144

Boor P, Floege J (2011): Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. Clin Exp Pharmacol Physiol 38, 391–400

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

Brenner BM, Baylis C, Deen WM (1976): Transport of molecules across renal glomerular capillaries. Physiol Rev 56, 502–534

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

Christensen EI, Gburek J (2004): Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology. Pediatr Nephrol 19, 714–721

D'Amico G, Bazzi C (2003): Pathophysiology of proteinuria. Kidney Int 63, 809–825

Davies H, Hunter C, Smith R, Stephens P, Futreal PA (2005): Somatic Mutations of the Protein Kinase Gene Family in Human Lung Cancer. Cancer Res 65, 7591–7595

Donoviel DB, 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 Lacking NEPH1, a Novel Protein with Homology to NEPHRIN. Mol Cell Biol 21, 4829–4836

Drenckhahn D, Franke RP (1988): Ultrastructural organization of contractile and cyto-skeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. Lab Invest 59, 673–682

Drube J, Schiffer E, Mischak H, Kemper MJ, Neuhaus T, Pape L, Lichtinghagen R, Ehrich JHH (2009): Urinary proteome pattern in children with renal Fanconi syndrome. Nephrol Dial Transplant 24, 2161–2169

Flamant M, Placier S, Rodenas A, Curat CA, Vogel WF, Chatziantoniou C, Dussaule J (2006): Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertension-induced renal disease. J Am Soc Nephrol 17, 3374–3381

Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJL, Mann JF, Matsushita K, Wen CP (2013): Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemi-ology , mechanisms, and prevention. Lancet 382, 339-352

Garg P, Verma R, Nihalani D, Johnstone DB, Holzman LB (2007): Neph1 Cooperates with Nephrin To Transduce a Signal That Induces Actin Polymerization. Mol Cell Biol 27, 8698–8712

George B, Holzman LB (2012): Signaling From the Podocyte Intercellular Junction to the Actin Cytoskeleton. Semin Nephrol 32, 307–318

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

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

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

Haraldsson B, Nyström J, Deen WM (2008): Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. Physiol Rev 88, 451–487

Haraldsson B, Jeansson M (2009): Glomerular filtration barrier. Curr Opin Nephrol Hypertens 18, 331–335

Heidet L, Gubler M (2009): The Renal Lesions of Alport Syndrome. J Am Soc Nephrol 20, 1210–1215

Huber T, Köttgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T (2001): Interaction with Podocin Facilitates Nephrin Signaling. J Biol Chem 276, 41543–41546

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

Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 15. Auflage; Thieme, Stuttgart 2005

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

Kim H, Tan L, Weisberg EL, Liu F, Canning P, Choi HG, Ezell SA, Wu H, Zhao Z, Wang J et al. (2013): Discovery of a Potent and Selective DDR1 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. ACS Chem Biol 8 2145-2150

Klinke R, Silbernagl S: Physiologie, 6. Auflage; G. Thieme, Stuttgart 2010

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

Lee HS (2012): Mechanisms and consequences of TGF-ß overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. Cell Tissue Res 347, 129–140

Li, Rui P; Bilik, Dori MB; Morton B. Brown P; Ping Zhang P; Susan L. Ettner P; Ronald T. Ackermann MD; Jesse C. Crosson P and Herman, William MD (2013): Medical Costs Associated With Type 2 Diabetes Complications and Comorbidities. Am J Manag Care 19, 421–430

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

Miner JH (2011): Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. Pediatr Nephrol 26, 1413–1417

Mundel P, Shankland SJ (2002): Podocyte Biology and Response to Injury. J Am Soc Nephrol 13, 3005–3015

Murphy W, Moretta F, Jukkola A (1979): Epithelial Foot-process Effacement in Patients with Proteinuria. Am J Clin Pathol 79, 529–532

Noakes PG, Miner JH, Gautam M, Cunningham JM, Sanes JR, Merlie JP (1995): The renal glomerulus of mice lacking s–laminin/laminin β2: nephrosis despite molecular compensation by laminin β1. Nat Genet 10, 400–406

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

Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Pollak MR, Mill JG, Krieger JE (2004): NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. Kidney Int 65, 1026–1030

Phanish MK, Winn S, Dockrell M (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 M, Antignac C (2008): A missense mutation in podocin leads to early and severe renal disease in mice. Kidney Int 73, 1038–1047

Piscione TD, Licht C (2011): Genetics of proteinuria: an overview of gene mutations associated with nonsyndromic proteinuric glomerulopathies. Adv Chronic Kidney Dis 18, 273–289

Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, Eremina V, Hudson BG, Borza D, Harris RC et al. (2008): Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. Dev Biol 316, 288–301

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

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

Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler M, Antignac C (2004): Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. Mol Cell Biol 24, 550–560

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

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

Shih N (1999): Congenital Nephrotic Syndrome in Mice Lacking CD2-Associated Protein. Science 286, 312–315

Stephan JP, Mao W., Filvaroff E., Cai L., Rabkin R., Pan G. (2004): Albumin Stimulates the Accumulation of Extracellular Matrix in Renal Tubular Epithelial Cells. J Am Soc Nephrol 24, 14-19

Tonna S, Wang YY, Wilson D, Rigby L, Tabone T, Cotton R, Savige J (2008): The R229Q mutation in NPHS2 may predispose to proteinuria in thin-basement-membrane nephropathy. Pediatr Nephrol 23, 2201–2207

Tryggvason K, Wartiovaara J (2005): How does the kidney filter plasma?. Physiology (Bethesda) 20, 96–101

Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA, Schachter AD, Poch E, Abreu PF, Appel GB et al. (2002): NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. J Clin Invest 110, 1659–1666

Vinge L, Lees GE, Nielsen R, Kashtan CE, Bahr A, Christensen EI (2010): The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis in the kidney. Nephrol Dial Transplant 25, 2458–2467

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

Vogel W (1999): Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. FASEB J 13, 77-82

Vogel WF, Aszódi A, Alves F, Pawson T (2001): Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. Mol Cell Biol 21, 2906–2917

Vogtlander NPJ, Visch HJ, Bakker MAH, Berden JHM, van der Vlag J (2009): Ligation of alpha-dystroglycan on podocytes induces intracellular signaling: a new mechanism for podocyte effacement? PLoS One 4, e5979

Voskarides K, Arsali M, Athanasiou Y, Elia A, Pierides A, Deltas C (2012): Evidence that NPHS2-R229Q predisposes to proteinuria and renal failure in familial hematuria. Pediatr Nephrol 27, 675–679

Yard BA (2001): Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans. Nephrol Dial Transplant 16, 1769–1775

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schema glomeruläre Architektur 2
Abbildung 2 Schema glomerulärer Filterapparat 7
Abbildung 3 NPHS2-PCR 17
Abbildung 4 DDR1-PCR 17
Abbildung 5 EM $DDR1^{+/-}/NPHS2^{+/R140Q}$ 28
Abbildung 6 EM $DDR1^{+/-}/NPHS2^{+/R140Q}$ Vergrößerung 28
Abbildung 7 EM Wildtyp 29
Abbildung 8 Proteinurie $DDR1^{+/-}/NPHS2^{+/R140Q}$ 31
Abbildung 9 Diagramm Proteinurieverlauf 32
Abbildung 10 Direktvergleich Proteinurie versch. Genotypen 33
Abbildung 11 Western Blot TGFβ, CTGF, Aktin 35
Abbildung 12 Diagramm Western Blot 36
Abbildung 13 Diagramm Laminin-Score 37
Abbildung 14 Diagramm Fibronektin-Score 38
Abbildung 15 Beispielbilder Laminin 39
Abbildung 16 Beispielbilder Fibronektin 39
Abbildung 17 Diagramm Serumharnstoff 40

8. Verwendete Materialien und Geräte

8.1 Genotypisierung

Reagenz/Gerät	Hersteller/Bezeichnung
DNA-Extraktion	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit
DNA-Polymerase	Finnzymes F-100L
Nukleotide	Invitrogen™ dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100mM)
Podocin forward-Primer	Eurofins MWG Operon, „podocin 3 forw“ (Sequenz: TAA TTA TAG GGC CGG TTG TC)
Podocin reverse-Primer	Eurofins MWG Operon, “Podocin 3 rev” (Sequenz: TGC CTC TTC TCC CAA CTA AA)
DDR1 5-6 Primer	Eurofins MWG Operon, „ddr nul 5-6“ (Sequenz: TCC ATA GAC CAG AGG GAT C)
DDR1 neo Primer	Eurofins MWG Operon, “ddr1 neo” (Sequenz: CCT GCT CTT TAC TGA AGG CTC)
DDR1 5-2 Primer	Eurofins MWG Operon, „ddr nul 5-2“ (Sequenz: CAG GGC ATA GCG GCA CTT GG)
Thermocycler	Biometra TProfessional
Probenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromophenol-blau, 60% Glycerol, 60 mM EDTA
Agarose	Biozym LE Agarose
TAE-Puffer	50x, 2 M Tris, 50 mM EDTA, 1 M Essigsäure
Ethidiumbromid	0,06%, Roth
Marker DNA-Bandengröße	Fermentas GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder
UV-Transiluminator	Biometra BioDocAnalyze

8.2 Proteinuriegele

Reagenz / Gerät	Hersteller/Bezeichnung
Chloroform	Sigma, 99+%
Methanol	Merck
Zentrifuge	Hettich Mikro 200 R
Reaktionsgefäße	Biozym, 1,5 mL
Pipetten	Eppendorf Research®
Probenpuffer	Invitrogen™ NuPage® LDS Sample Buffer, 2x
Polyacrylamid-Fertiggel	Invitrogen™ 4-12% Tris-Glycine Gel, 1,5mm x 10 oder 15 well

Molekulargewichtsmarker	Invitrogen™ SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard bzw. Lonza ProSieve® QuadColor™ Protein Marker
Elektrophoresekammer	X Cell SureLock™
Laufpuffer	Invitrogen™ NuPage® MOPS SDS Running Buffer
Coomassie-Färbelösung	Roth, Roti Blue 5x
Heizblock	Liebisch TR-L 288
Elektrophorese-Netzteil	Consort E 741
Scanner	Hewlett Packard Office Jet R 45
Programm zur densitometrischen Auswertung	Image J

8.3 Western Blot

Gerät/Material	**Hersteller/Bezeichnung**
Homogenisator	Ultra-Turrax® T25
Lysepuffer	10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0), 10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Natriumvanadat, 0,5 % NP-40, 0,1 % Brij-35, 1 mM PMSF, 10 µM Pepstatin, 10 µM Leupeptin
Glasröhrchen	Sarstedt Röhren 55.466
Reaktionsgefäße	Biozym, 1,5 mL
Zentrifuge	Hettich Mikro 200 R
BSA	PAA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Protein Assay
ELISA-Platte	Greiner bio-one, 96 well
Photometer	BioTek Synergy™ HT
Programm Extinktionsbestimmung	BioTek KC 4™
Rechnerische Proteinkonzentrationsbestimmung	Microsoft Excel® 2007
Reduktionspuffer	Invitrogen™ NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)
Probenpuffer	Invitrogen™ NuPAGE® LDS Sample Buffer (2x)
Heizblock	Liebisch TR-L 288
Molekulargewichtsmarker	Lonza ProSieve® QuadColor™ Protein Marker
Polyacrylamid-Fertiggel	Invitrogen™ 4-12% Tris-Glycine Gel 1,5mm x 10 oder 15 well
Elektrophoresekammer	X Cell SureLock™
Elektrophorese-Netzteil	Consort E 741

Blotting-Kammer	Bio-Rad Mini Protean™
Blotting-Netzteil	Bio-Rad Power Pac 1000™
Whatman-Papier	Bio-Rad Filter Paper™
Transferpuffer	Invitrogen™ NuPAGE® Transfer Buffer
PVDF-Membran	Bio-Rad Immun-Blot PVDF Membrane™
Methanol	Merck
TBST	10x, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, + HCl bis pH 7,6
Magermilchpulver	Merck
Wippe	Heidolph Duomax 1030
TGF-Primärantikörper	Monoklonaler Antikörper aus Maus, R&D Systems, MAB240
CTGF-Primärantikörper	Polyklonaler rabbit-anti-mouse-Antikörper, Biovision, 5553R
Aktin-Primärantikörper	Polyklonaler rabbit-anti-mouse-Antikörper, Sigma-Aldrich, A2103
TGF-Sekundärantikörper	HRP-rabbit-anti-mouse, DAKO P0161
CTGF-Sekundärantikörper	HRP-goat-anti-rabbit, DAKO P0448
Aktin-Sekundärantikörper	HRP-goat-anti-rabbit, DAKO P0448
Chemolumineszenz-Reagenz, Lösung A	PerkinElmer, Western Lightning ® Enhanced Luminol Reagent Plus
Chemolumineszenz-Reagenz, Lösung B	PerkinElmer, Western Lightning ® Oxidizing Reagent Plus
Röntgenkassette	Fuji
Röntgenfilm	Fuji Safelight Glass No. 8U
Entwickler	Konica SRX 101 A
Scanner	Hewlett Packard Office Jet R 45
Programm Densitometrie	ImageJ
Stripping-Puffer	Thermo Scientific, Restore Western Blot Stripping Buffer

8.4 Immunhistochemie

Reagenz / Gerät	**Hersteller/Bezeichnung**
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik
Formaldehyd	4% PFA in PBS
Entwässerung	Leica TP 1020
Paraffinguss	Medite Tissue Block Dispenser PAG 12
Wasserbad	Vieth, Mikrotome GmbH
Mikrotom	Reichert Jung, AutoCut 2040
Objektträger	Menzel Superfrost 75x25 mm

Thermoplatte	Schütt, Göttingen
Trockenofen	Sanyo Convection Oven
Proteinase K	Qiagen, >600 mAU/mL
Tris-Puffer	50 mM, pH 7,4
Citrat-Puffer	Lsg. A: 4,2 g Citronensäuremonohydrat ad 200 mL dH_2O, Lsg. B: 14,7 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat ad 500 mL dH_2O; 9 mL Lsg. A + 41 mL Lsg. B + 450 mL dH_2O (pH 6,0)
TBS	10x, 50 mM Tris, 150 mM NaCl
BSA	PAA
Primärantikörper Laminin	Abcam, Rabbit-IgG, 11575v
Primärantikörper Fibronektin	Aeris, Mouse-IgG, BM 422
Normalserum	Invitrogen™, Goat-Serum
Sekundärantikörper Laminin	Jackson IR, Goat-anti-Rabbit-Cy3
Sekundärantikörper Fibronektin	Jackson IR, Goat-anti-Mouse-Cy3
Einbettungsmedium	DAKO Fluorescent Mounting Medium
Deckgläser	Menzel, 24x24 mm
Mikroskop	Zeiss Axiovert S100 TV
Programm Mikroskopie	Olympus Cellˆ D

8.5 Serumharnstoffanalyse

Reagenz/Gerät	**Hersteller/Bezeichnung**
Zentrifuge	Hettich Mikro 200 R
Analyseautomat	Roche/Hitachi 917

Lebenslauf

Mein Name ist Peter Johannes Schütte und ich wurde am 19.09.1985 in Braunschweig geboren. Ich bin nicht verheiratet und habe keine Kinder.

Mein Vater, Heinrich Schütte, geboren am 17.07.1954 in Spelle, ist als Volkswirt bei der Commerzbank in Hannover tätig.

Meine Mutter, Christine Schütte geb. Rauen, geboren am 30.06.1955 in Venhaus, arbeitet als Zahnarzthelferin in einer Zahnarztpraxis in Langenhagen.

Meine Schwester Ute arbeitet als Pharmazeutin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Bonn. Mein Bruder Klaus arbeitet als Jurist und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der RWTH Aachen.

Meine Schulausbildung absolvierte ich von 1992 an in Salzgitter Bad und Langenhagen. Im Jahr 2005 legte ich das Abitur am Gymnasium Langenhagen ab.

Nach dem Abitur leistete ich von August 2005 bis April 2006 meinen Zivildienst im Ambulanz- und Aufnahmezentrum des Kinderkrankenhauses auf der Bult in Hannover.

Zum Wintersemester 2006 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich nach den vorgesehenen vier Semestern im September 2008 ab.

Auch den klinischen Studienabschnitt von Oktober 2008 bis Juli 2011 durchlief ich in Göttingen. Im Anschluss nutzte ich ein Freisemester, um im Labor von Prof. Dr. Oliver Gross in der Klinik für Nephrologie der Universitätsmedizin Göttingen an meiner experimentellen Promotion zu arbeiten.

Von Februar 2012 bis Januar 2013 absolvierte ich das Praktische Jahr (PJ) an verschiedenen Kliniken in Bremen, Bremerhaven und Oldenburg.

Hieran schloss sich der Zweite Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an, welchen ich am 17. Mai 2013 erfolgreich abschließen konnte.

Nachdem ich im Sommer und Herbst 2013 meine Promotionsarbeit mit dem Thema „Der Einfluss des $DDR1^{+/-}$/$NPHS2^{+/R140Q}$-Genotyps auf die Interaktion zwischen glomerulärer Basalmembran und Schlitzmembran im Tiermodell“ fertigstellte, trat ich im Januar 2014 eine Stelle als Assistenzarzt an der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover an.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Oliver Gross danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Fülle an Ratschlägen und inspirierenden Diskussionen in den Laborbesprechungen und darüber hinaus.

Auch Frau Dipl.-Biol. Diana Rubel bin ich für die unermüdliche Anleitung und Unterstützung während meiner Arbeit im Labor zu Dank verpflichtet.

Herrn PD Dr. Rainer Girgert danke ich für die Hilfestellung und Beratung in statistischen und labormethodischen Fragen.

Desweiteren möchte ich Frau Andrea Bernhardt für die geschickte Anleitung beim Erlernen von Labormethoden und für die Hilfe beim Anfertigen der histologischen Präparate danken.

Frau Dr. med. Jenny Kruegel danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder.