

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

**Nidogen-2 in der Pathogenese Kollagen IV-assoziiierter
Nephropathien bei zusätzlicher Podocin-Mutation**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von

Carolin Susanne Prinz

aus

Wolfhagen

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in:	Prof. Dr. med. O. Gross
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Jörg Wilting
Tag der mündlichen Prüfung:	23.11.2016

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
„Nidogen-2 in der Pathogenese Kollagen IV-assoziierter Nephropathien bei zusätzlicher
Podocin-Mutation“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angege-
benen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glomeruläre Basalmembran	1
1.2	Podozyten und die Schlitzmembran	2
1.3	Podocin	3
1.4	Alport-Syndrom	4
1.5	Kollagen IV $\alpha 3/4/5$	6
1.6	Nidogen-2	7
1.7	Aufgabenstellung	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Geräte	10
2.1.2	Puffer und Lösungen	10
2.1.3	Enzyme	12
2.2	Tiermodell	12
2.3	Genotypisierung	12
2.4	Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten	14
2.4.1	Anfertigung der Kryoschnitte	14
2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung	14
2.4.3	Lichtmikroskopie	15
2.5	Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie	15
2.5.1	Präparation und Fixierung des Gewebes	15
2.5.2	Herstellung von kolloidalem Gold und Kopplung an den Antikörper	16
2.5.3	Immunogoldmarkierung	16
2.5.4	Elektronenmikroskopie und quantitative Analyse	17
2.5.5	Statistische Auswertung	17
2.6	Quantitative real-time PCR	17
2.6.1	Materialgewinnung	17
2.6.2	RNA-Isolation und reverse Transkription	19
2.6.3	Durchführung der qPCR	20
2.6.4	Auswertung und Statistik	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Lokalisation von Nidogen-2 im Glomerulus	22

3.2	Ultrastrukturelle Darstellung von Nidogen-2 und Quantifizierung der Proteinmenge innerhalb der glomerulären Basalmembran	26
3.3	Semi-quantitative Analyse der Genexpression	32
4	Diskussion	34
4.1	Aufgabenstellung bei den Untersuchungen	34
4.2	Interpretation der Proteinumverteilung im Glomerulus	34
4.3	Einfluss der untersuchten Genotypen auf die Proteinmenge unter Berücksichtigung der ultrastrukturellen Veränderungen	36
4.4	Beurteilung der Genexpression und Rückschlüsse auf die Funktion von Nidogen-2	37
4.5	Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik und den Ergebnissen . . .	38
5	Zusammenfassung	39
6	Anhang	41
7	Literaturverzeichnis	44

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	cycle threshold
d	Tage
DDR1	Discoidin domain receptor 1
<i>dH₂O</i>	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fläche der Basalmembran
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	glomeruläre Basalmembran
IgG	Immunglobulin G
K	Goldkugel
kDA	Kilodalton
L	Längeneinheit der Basalmembran
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ME	Mercapto-Ethanol

min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
NFW	nukleasefreies Wasser
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative real-time PCR
rpm	revolutions per minute
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UV	ultraviolett
U	Enzymeinheit

1 Einleitung

1.1 Glomeruläre Basalmembran

Basalmembranen stellen hochspezialisierte extrazelluläre Matrizes dar. Sie dienen nicht nur strukturgebend der Stabilität im Gewebe, sondern kommunizieren über Zellrezeptoren auf vielfältige Weise mit den sie umgebenden Zellen. Im Glomerulus kommt es zu Signalübertragungen von der Basalmembran auf das glomeruläre Endothel und die Schlitzmembran bildenden Podozyten (Abrahamson 2012). Diese Interaktionen sind sowohl für die Entwicklung als auch für den Strukturhalt und die Funktion des adulten Gewebes von entscheidender Bedeutung (Krügel und Miosge 2010).

Wie alle Basalmembranen besteht die glomeruläre aus Lamininen, Kollagen IV, den Nidogenen und Heparansulfatproteoglykanen. Gewebsspezifisch sind in der adulten Form Laminin-521, Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ sowie die Proteoglykane Agrin und Perlekan. Laminin und Kollagen IV polymerisieren sich selbst jeweils zu flexiblen Netzwerken. Verbunden durch die Nidogene (siehe Abschnitt 1.6) bilden sie das Grundgerüst der Basalmembran. Über Bindungsstellen für Integrine, den Discoidin domain receptor 1 (DDR1) und Dystroglykan kommt es zu Interaktionen mit den umgebenden Zellen.

Kollagen IV besteht wie alle Kollagene aus drei alpha-Ketten, die sich wiederum aus wiederholenden Gly-X-Y-tripletts zusammensetzen und zu einer superhelikalen Struktur angeordnet sind. Gewebsspezifische Unterbrechungen in den Aminosäuretripletts erhöhen die Flexibilität der glomerulären Basalmembran (Miner 2012). Wegen seiner Schlüsselrolle in der Pathogenese des Alport-Syndroms wird dieses Protein in Abschnitt 1.6 genauer beschrieben.

Laminine sind heterotrimere, kreuzförmige Glykoproteine. Insgesamt existieren mindestens 15 Isoformen, die jeweils aus einer α -, β - und γ -Kette bestehen. Die Nomenklatur des Proteins erfolgt gemäß den jeweiligen Ketten. In der glomerulären Basalmembran kommt es während der Glomerulogenese zu einem Wechsel von Laminin-111 über Laminin-511 zu Laminin-521. Alle Isoformen werden sowohl von Podozyten als auch den Endothelzellen exprimiert (Abrahamson 2012, St. John und Abrahamson 2001). Mutationen in Laminin β -2 sind ursächlich für das Pierson-Syndrom, das mit kongenitalem nephrotischem Syndrom einhergeht (Miner 2012).

Über Laminin erfolgt die strukturelle Ordnung der benachbarten Zellen an der Matrix. Eine am langen Arm des Proteins gelegene globuläre Domäne dient als Ligand für Integrine und weitere Zellrezeptoren (Miner 2012). Das Glykoprotein nimmt darüber Einfluss auf die Anordnung und Architektur der Basalmembran und reguliert Differenzierung, Adhäsion und Migration der Zellen im Gewebe (Tzu und Marinkovich 2008).

Es wird angenommen, dass Laminin bei der Entwicklung der Basalmembran von entscheidender Bedeutung ist. So sind im Mausmodell Knock-outs einer Untereinheit von Laminin-111 schon während der Implantation letal (Tzu und Marinkovich 2008).

In dem Netz aus Kollagen IV und Laminin interagieren die Heparansulfatproteoglykane Agrin und Perlekan. Ihre Glykosaminglykanketten tragen zur negativen Ladung der Basalmembran bei (Miner 1999b).

1.2 Podozyten und die Schlitzmembran

Podozyten sind einzigartige, hochspezialisierte Epithelzellen. Sie produzieren einen Großteil der Basalmembranproteine und sind essenziell für die Filterfunktion der Niere (Toblli et al. 2012). Da nur Podozyten im reifen Glomerulus Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ exprimieren, gelten sie als Schlüsselzellen in der Pathogenese des Alport-Syndroms.

Sie umrahmen mit ihren fußähnlichen Ausläufern die glomerulären Kapillarschlingen. Die Fußfortsätze greifen fingerförmig ineinander und werden durch die sogenannte Schlitzmembran als Teil des glomerulären Filters miteinander verbunden (Pavenstädt et al. 2003).

Die Podozytenfüße sind über Rezeptoren in der Basalmembran verankert. Sie nehmen darüber Einfluss auf die Entwicklung der extrazellulären Matrix, ergänzen im adulten Gewebe essenzielle Bestandteile und erhalten dessen dynamische Flexibilität durch die Sekretion von modifizierenden Enzymen. Im Umkehrschluss ist die Integrität der Zellen von einer intakten Basalmembran abhängig (Lennon et al. 2014). Über komplexe *inside-out*- und *outside-in*-Signalübertragung kommt es zu Interaktionen zwischen Zelle und Matrix (Pavenstädt et al. 2003).

Typisch für Epithelzellen verankern Transmembranrezeptoren wie $\alpha\beta$ -Dystroglykan und Integrine das aktinhaltige Zytoskelett der Podozyten an der glomerulären Basalmembran. Integrin $\alpha 3\beta 1$ ist ein Hauptrezeptor für Laminin. Die $\alpha 3$ -Einheit ist notwendig für die Entwicklung des glomerulären Gewebes. So führt der podozytenspezifische Verlust des Integrin $\alpha 3\beta 1$ kodierenden Gens ITGA3 in Mäusen zu einer Verdickung der Basalmembran bei gleichzeitigem Unvermögen der Podozyten, reife Fußfortsätze zu entwickeln (Lennon et al. 2014, Toblli et al. 2012).

Die zwischen den Zellfortsätzen liegenden Filtrationsschlitze haben eine Breite von 25-60 nm. Sie werden von der mit Poren versehenen Schlitzmembran überbrückt, die entsprechend dem Porendurchmesser Moleküle ab einer Größe von Albumin im Serum zurückhält (Toblli et al. 2012, Rodewald und Karnovsky 1974). Die spezialisierte Membran enthält sowohl für *Tight Junctions* typische Elemente wie ZO-1 als auch für *Adherens*

Junctions spezifische Komponenten wie Fat-1, P-cadherine und Catenine (Schnabel et al. 1990). Sie wird daher als modifizierte *Adherens Junction* bezeichnet (Reiser et al. 2000).

Nephrin ist ein weiterer Bestandteil der Schlitzmembran. Das zu den Immunglobulinen gehörende Transmembranprotein wird ausschließlich in Podozyten produziert. Als Adhäsionsmolekül übernimmt es Signalfunktion zwischen den Epithelzellen und ist notwendig für den strukturellen Erhalt der Filtrationsbarriere. So führen Mutationen im dafür kodierenden Gen *Nphs1* zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ, wobei es bereits beim ungeborenen Kind zu massiver Proteinurie kommt (Ruotsalainen et al. 1999, Holthöfer 2007).

Nephrin reagiert intrazellulär mit CD2AP (CD2-associated protein) und Podocin (siehe Abschnitt 1.3), die innerhalb der Podozyten als Adapterproteine dienen. Weitere für die Zell-Zell-Kontakte notwendige Bestandteile der Schlitzmembran sind die nephrinähnlichen Proteine NEPH1 und NEPH2, die wie Nephrin ausschließlich im Podozyten exprimiert werden (Holthöfer 2007).

Eine schematische Darstellung der Schlitzmembranmoleküle ist in Abbildung 1 gezeigt.

1.3 Podocin

Podocin ist ein für die intakte Funktion des glomerulären Filters bedeutsamer Baustein der Schlitzmembran (Abbildung 1). Homozygote Mutationen des Podocin kodierenden *Nphs2* sind ursächlich für das autosomal-rezessive steroidresistente nephrotische Syndrom. Auch Podocin wird ausschließlich von den Podozyten exprimiert. Das zu den

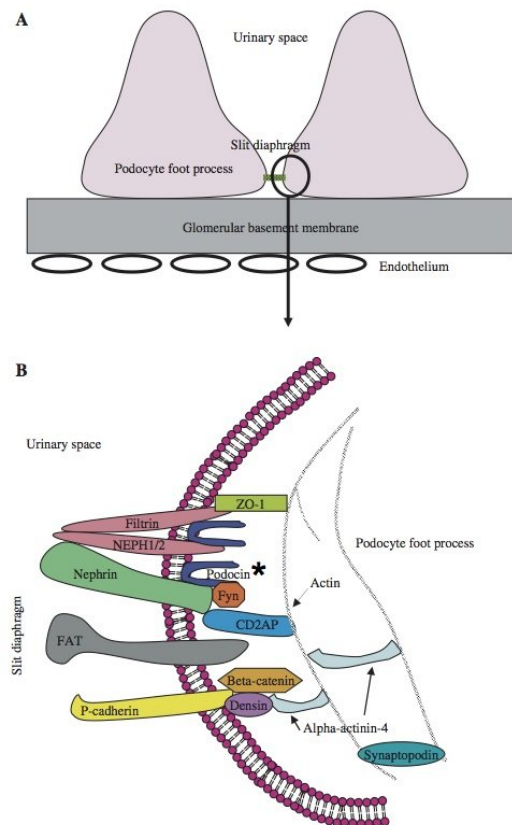


Abbildung 1: A Schlitzmembran B Schematische Darstellung der Zusammensetzung mit Podocin als Bestandteil (*) modifiziert nach Holthöfer 2007, Seite 2125

Stomatinen gehörende Integralprotein hat eine haarnadelähnliche Struktur, dessen N- und C-terminale Enden im Zytosol der Podozyten verankert sind (Boute et al. 2000, Roselli et al. 2002).

Seine Vielzahl an Bindungspartnern macht es zu einem bedeutenden Verknüpfungs- und Signalprotein (Holthöfer 2007). Bei Mutationen in *Nphs2* kann eine veränderte Verteilung von Nephrin und CD2AP nachgewiesen werden, was auf eine Struktur organisierende Funktion Podocins innerhalb der Schlitzmembran hinweist (Roselli et al. 2004). Einflüsse isolierter *Nphs2*-Aberrationen auf die molekulare Ordnung der glomerulären Basalmembran lassen sich hierbei nicht zeigen (Zhang et al. 2004). Studien an *Nphs2*^{-/-}-Mäusen zeigten jedoch eine verstärkte Expression einiger Matrixbestandteile, darunter Nidogen, innerhalb des Mesangiums (Roselli et al. 2004).

Podocindefizienz führt zu postnataler Proteinurie und frühzeitigem Nierenversagen. Heterozygote Mutationsträger in *Nphs2* zeigen im Allgemeinen keine Klinik. Allerdings sind Fälle bekannt, die bei Heterozygotie und zusätzlichem R229Q-Polymorphismus ein steroidresistentes nephrotischen Syndrom entwickelten (Machuca et al. 2009).

Polymorphismen dieser Art beeinträchtigen die Integrität der Schlitzmembran, schädigen den glomerulären Filter und modifizieren dadurch den Krankheitsverlauf. Sie könnten auch bei bestehender heterozygoter Mutation in *COL4A3* Einfluss auf den resultierenden Phänotyp nehmen (siehe Abschnitt 1.4).

1.4 Alport-Syndrom

Unter dem Terminus Alport-Syndrom wird die Trias aus hereditärer hämorrhagischer Nephritis, Innenohrschwerhörigkeit und okulären Veränderungen zusammengefasst. Die Symptome werden durch Mutationen in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* oder *COL4A5* verursacht, welche die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Kette des Basalmembranproteins Kollagen IV kodieren. Es kommt zu strukturellen Veränderungen der glomerulären Basalmembran und der Podozyten. Im Krankheitsverlauf entwickelt sich daraus eine fokal-segmentale Glomerulosklerose (Krügel et al. 2013).

Bei betroffenen Kindern ist bereits in den ersten Lebensjahren niedriggradige Proteinurie und eine leichte Hämaturie nachweisbar. Mit fortschreitender Glomerulosklerose kommt es zum terminalen Nierenversagen. 80 % der Patienten fallen klinisch durch Hochtonschwerhörigkeit auf. Pathologische Veränderungen der Augen reichen von einem anterioren Lenticonus bis hin zum vollständigen Verlust des Sehvermögens. Da eine Deletion in *COL4A5* auch das auf dem X-Chromosom Kopf-an-Kopf liegende *COL4A6* betreffen kann, ist das Alport-Syndrom ferner mit der diffusen Leiomyomatose des Ösophagus

assoziiert (Miner 1999a).

Elektronenmikroskopisch imponiert eine aufgesplitterte Basalmembran mit teilweise stark verdickten oder diffus ausgedünnten Abschnitten (Krügel et al. 2013, Heidet und Gubler, 2009) und korbgeflechtartigem Erscheinungsbild (Miner 2014). Typisch ist auch eine Lösung der Podozytenfußfortsätze von der Membran.

Die geschätzte Prävalenz der Krankheit liegt bei 1:5000 (Miner 1999a). In 85 % der Fälle ist die Erkrankung auf eine X-chromosomal dominant vererbte Mutation des COL4A5-Gens zurückzuführen (Krügel et al. 2013). Bei hemizygoten männlichen Patienten kommt es unbehandelt zu einem schweren, schnell progredienten Krankheitsverlauf. Während männliche Merkmalsträger mit 90-prozentiger Wahrscheinlichkeit bis zum vierzigsten Lebensjahr ein terminales Nierenversagen entwickeln, tritt dies nur bei 12 % der weiblichen Betroffenen ein. Frauen und Mädchen zeigen meist einen milderen Verlauf mit Hämaturie (95 %), Proteinurie (75 %), Hörverlust (28 %) und Augenbeteiligung (15 %) (Jais et al. 2003).

Bei 15 % der Patienten liegen autosomal rezessiv weitergegebene Defekte des COL4A3- oder COL4A4-Gens vor. Während es bei homozygoten Genträgern zum klassischen Phänotyp des Alport-Syndroms kommt, zeigt sich heterozygot ein breites klinisches Spektrum.

So spielen die COL4A3- und COL4A4-Gene auch eine Rolle in der Pathogenese der benignen familiären Hämaturie (Beirowski et al. 2006). Betroffene fallen bei dieser weit verbreiteten, autosomal dominanten Erkrankung durch wiederholte oder persistierende Hämaturie auf, welche sich bei schwerem Verlauf über Proteinurie bis zum chronischen Nierenversagen weiterentwickeln kann. Ultrastrukturell konnte im entsprechenden Mausmodell eine im Vergleich zu Wildtypen signifikant dünnere Basalmembran nachgewiesen werden (Beirowski et al. 2006).

Es wird vermutet, dass mit zusätzlichen, als Triggerfaktoren dienenden Gendefekten auch heterozygote Mutationen zum Bild des Alport-Syndroms führen könnten.

So sind aus der Literatur Fälle bekannt, die bei COL4A3^{+/-} und gleichzeitigem Podocin Nphs2-Polymorphismus ein frühzeitiges Nierenversagen entwickelten. Nphs2 könnte hier als sogenanntes "Modifier-Gen" dienen (Abschnitt 1.3). Der vermutete Zusammenhang dient als Grundlage dieser Forschungsarbeit.

Insgesamt werden Defekte in COL4A3 und COL4A4 mit der Entwicklung von fokal segmentaler Glomerulosklerose assoziiert (Miner, 2014; Malone et al., 2014). Eine Übersicht zum Spektrum der durch COL4A3-, COL4A4- und COL4A5-Mutationen verursachten Phänotypen ist in Abbildung 2 dargestellt.



Abbildung 2: Spektrum der durch COL4A3-, A4- und A5-Mutationen verursachten Phänotypen modifiziert nach Miner 2014, Seite 1083

1.5 Kollagen IV $\alpha 3/4/5$

Kollagen IV setzt sich aus sechs verschiedenen α -Ketten zusammen, die die Protomere $\alpha 1/1/2$, $\alpha 3/4/5$ und $\alpha 5/5/6$ bilden können. Das Protein besteht aus einer N-terminalen 7S-, einer mittleren helikalen und einer C-terminalen NC1-Domäne (Kalluri et al. 1997).

Während in der kindlichen glomerulären Basalmembran sowohl von Podozyten als auch den Endothel- und Mesangialzellen ausschließlich Kollagen IV $\alpha 1/1/2$ exprimiert wird, dominiert im adulten Nierengewebe das Heterotrimer $\alpha 3/4/5$. Dieses Triplett wird im Glomerulus allein von den Podozyten produziert und ist deutlich stabiler bezüglich Proteolyse als die juvenile Variante (Kalluri et al. 1997). Kollagen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ assoziieren exklusiv mit der $\alpha 5$ -Kette zu einem Heterotrimer. Die spezifische Polymerisierung erfolgt über die NC1-Domäne (Abrahamson et al. 2009).

Die fertigen Trimere bilden mit ihren terminalen N- und C-Domänen durch Disulfidbrücken gefestigte dreidimensionale kovalent gebundene Netzwerke, die von essentieller Bedeutung für die Architektur und die Stabilität der Basalmembran sind (Miner und Sanes 1996). Über Bindungsstellen für Integrine und weitere Rezeptoren wie DDR-1 erfolgt die Interaktion mit den umgebenden Zellen. Diese Kontakte sind sowohl für die normale Differenzierung der Podozyten als auch die Integrität der Basalmembran notwendig (Rubel et al. 2014).

Mutationen, die eine der drei α -Ketten betreffen, verursachen Schäden der glomerulären Basalmembran und zeigen sich heterozygot als benigne Hämaturie oder homozygot beziehungsweise X-chromosomal hemizygot mit der Klinik des Alport-Syndroms (Miner 2012). Der Verlust einer α -Kette führt zum Verlust des gesamten Protomers und zu strukturellen Veränderungen der extrazellulären Matrix (Miner und Sanes 1996, Gunwar et al. 1998).

Die veränderte Basalmembran enthält dabei weiterhin Kollagen IV $\alpha 1/1/2$. Das daraus gebildete Netzwerk verfügt über weniger stabilisierende Disulfidbrücken (Cosgrove 2012). Es ist durchlässiger und anfälliger für Endoproteolyse (Kalluri et al. 1997). Bei gleichzeitig erhöhter Expression von Metalloproteasen (MMP-2, MMP-3, MMP-9 und

MMP-12) kommt es zu einer rasch progredienten Schädigung des glomerulären Filters (Cosgrove 2012). Untersuchungen der Nanostruktur mithilfe von Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) zeigten eine gegenüber Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ veränderte Anordnung von Kollagen IV $\alpha 1/1/2$ innerhalb der Basalmembran (Suleiman et al 2013). Außerdem ist bei Kollagen IV $\alpha 3$ defizienten Mäusen eine Verschiebung der Laminine in Richtung $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Laminine zu beobachten, wodurch wiederum die Lösung der Podozytenfüße induziert wird (Cosgrove et al 2000).

Für die Pathogenese scheint auch die Zell-Matrix-Interaktion von Bedeutung zu sein. An COL4A3^{-/-}-Mäusen kann bei gleichzeitiger Abwesenheit des Kollagenrezeptors Integrin $\alpha 2\beta 1$ ein geringerer Fibrosegrad und eine weniger pathologische Ultrastruktur des Glomerulus beobachtet werden. Auch die Expression einiger MMPs war in diesem Modell geringer. Insgesamt kann durch Knock-out des Rezeptors das terminale Nierenversagen der Tiere hinausgezögert und die Lebenszeit verlängert werden (Rubel et al 2014). Ähnliches lässt sich in vivo für die Signalübertragung via Integrin $\alpha 1\beta 1$ nachweisen (Cosgrove et al. 2000).

Der Knock-out der Kollagen IV bindenden Tyrosinkinase DDR-1 führt im Mausmodell zu fokaler Verdickung der Basalmembran bei gleichzeitigem lokalen Verlust der zwischen den Podozytenfußfortsätzen liegenden Schlitzmembran (Gross et al. 2004).

Zusammengefasst entsteht durch Mutationen der Ketten $\alpha 3$, $\alpha 4$ oder $\alpha 5$ eine strukturell veränderte Basalmembran mit herabgesetzter Stabilität. Gestörte Zell-Matrix-Interaktionen führen zu fibrotischem Umbau der Matrix und Schädigung der Podozyten (Abschnitt 1.2).

1.6 Nidogen-2

Nidogen-2, auch als Entactin-2 bezeichnet, ist ein Bestandteil von Basalmembranen (Ho et al. 2008, Kohfeldt et al. 1998). Das Protein ist neben Nidogen-1 die zweite Isoform der Nidogene. Wegen ihrer Vielzahl an Bindungspartnern werden die Nidogene als Verbindungsmoleküle zwischen den beiden strukturgebenden Netzen aus Kollagen und Laminin angesehen (Ho et al. 2008, Kohfeldt et al. 1998). Trotz dieser Adapterfunktion scheinen beide Proteine für die Entwicklung und den Erhalt der Basalmembran nicht notwendig zu sein.

Außerhalb der Extrazellulärmatrix sind sie bei der Entwicklung von Extremitäten und Rippen von Bedeutung. Sie werden in adultem Knorpelgewebe, Muskeln und neuromuskulären Verbindungen exprimiert (Krügel und Miosge 2010). In der Pathophysiologie der Kniegelenksarthrose wird angenommen, dass Nidogen-2 in der Extrazellulärmatrix

des Knorpelgewebes eine regenerative Funktion übernimmt (Krügel et al. 2008). Des Weiteren wird das Protein als Biomarker für das Ovarialkarzinom im Serum diskutiert (Kuk et al. 2010).

1998 konnte Nidogen-2 von Kohfeldt et al. neben dem strukturell ähnlich aufgebauten, in seiner DNA-Sequenz zu 46 % identischen Nidogen-1 als zweite Isoform der Nidogene identifiziert werden. Das etwa 40 bis 50nm große Protein ist ca. 200kD schwer. Es besteht aus den drei globulären Domänen G1-3, die wiederum über flexible link-and-rod-Regionen miteinander verbunden sind (Abbildung 3)(Kohfeldt et al. 1998).

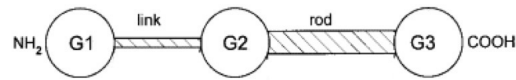


Abbildung 3: Nidogen-2 schematische Struktur modifiziert nach Kohfeldt et al. 1998, Seite 102

Nidogen-1 und -2 werden sowohl in Zellen des Tubulus als auch des Glomerulus exprimiert. Die mRNA beider Isoformen kann in Epithelzellen des Tubulus nachgewiesen werden. Im Glomerulus lässt sich mithilfe elektronenmikroskopischer Analyse mRNA der Nidogene in allen Zellen darstellen. Bei deutlich stärkeren Signalen innerhalb der Podozyten, zeigte sich eine Genexpression auch innerhalb der Endothelzellen (Miosge et al. 2000).

Innerhalb der Niere sind beide Nidogene in den Basalmembranen des Tubulus, des Glomerulus und innerhalb der Bowmannschen Kapsel kolokalisiert (Miosge et al. 2000).

Nidogen-2 hat ebenso wie Nidogen-1 eine hohe Bindungskapazität für die Basalmembrankomponenten Kollagen IV und Perlekan, die Affinität zu Laminin-1 hingegen fällt um das 100-fache niedriger aus (Kohfeldt et al. 1998, Salmivirta et al. 2002).

Die strukturelle Ähnlichkeit, die Kolokalisation und die vergleichbaren Bindungsaffinitäten beider Isoformen lassen vermuten, dass die Proteine ähnliche Funktionen erfüllen (Miosge et al. 2000, Salmivirta et al. 2002). Keines der Nidogene scheint dabei für die Entwicklung und den Strukturerehalt der glomerulären Basalmembran notwendig zu sein. Sowohl Nidogen-1 (Murshed et al. 2000) als auch Nidogen-2 (Schymeinsky et al. 2002) defiziente Mäuse sind überlebensfähig, fertil und zeigen keinerlei pathologische Auffälligkeiten. An der Basalmembran kommt es in Abwesenheit eines der beiden Proteine bei unveränderter Anordnung der übrigen Basalmembrankomponenten zu keinen erkennbaren Veränderungen (Schymeinsky et al. 2002, Murshed et al. 2000, Gersdorff et al. 2007). Das Fehlen beider Nidogene ist nicht mit dem Leben vereinbar und führt zu perinataler Letalität. Erstaunlicherweise konnten bei Mäusen, die sowohl Nidogen-1 als auch

Nidogen-2 defizient waren, dennoch normal entwickelte Nieren mit unveränderter Basalmembran-Komposition beobachtet werden (Bader et al. 2005, Gersdorff et al. 2007). Für den unauffälligen Phänotyp bei isolierter Nidogen-1 Defizienz wird eine Kompensation durch Nidogen-2 diskutiert (Miosge et al. 2002).

1.7 Aufgabenstellung

Die Einheit aus glomerulärer Basalmembran, der zwischen den Podozytenfußfortsätzen liegenden Schlitzmembran und fenestriertem Kapillarendothel bildet in der Niere einen selektiv permeablen Filter. Die dreischichtige Barriere hält Makromoleküle ab einer Größe von Albumin im Glomerulus zurück, für kleinere Partikel und Wasser ist sie frei durchlässig. Über die Podozyten kommt es zu komplexen Signalübertragungen zwischen den einzelnen Bestandteilen. Defekte in einer Komponente stören die Integrität des gesamten Filters. Mutationen, die Kollagen IV als essenziellen Bestandteil der Basalmembran betreffen, können Krankheitsbilder von der benignen familiären Hämaturie bis hin zum Alport-Syndrom verursachen. Es wird angenommen, dass ein zusätzlicher Polymorphismus in *Nphs2*, welches das Schlitzmembranprotein Podocin kodiert, zu einem schwereren Phänotyp führt. Zur Untersuchung von *Nphs2* als Modifier-Gen in der Pathogenese des Alport-Syndroms wurde neben den für die benigne familiäre Hämaturie und das Alport-Syndrom etablierten Mausmodellen eine *Nphs2*^{+/^{R140Q}//*COL4A3*^{+/-}-Mauslinie entwickelt.}

Nidogen-2 ist ein Baustein der glomerulären Basalmembran. Für diese Arbeit wurde die Expression auf mRNA-Ebene und die Lokalisation des Proteins in der glomerulären Basalmembran von Mäusen mit *Nphs2*^{+/^{R140Q}//*COL4A3*^{+/-}, *COL4A3*^{+/-} und *COL4A3*^{-/-}-Hintergrund untersucht. Ziel war es, den Einfluss von *Nphs2*-Mutationen auf Nidogen-2 nachzuweisen, um dadurch weitere Erkenntnisse über die Funktion des Proteins in der Pathogenese Kollagen IV-assoziierter Nephropathien zu gewinnen.}

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Zusätzlich zu der Standardausstattung des Labors wurden für die vorliegende Arbeit folgende Geräte verwendet:

- Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorff)
- Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100TV, ZEISS; UV-Lampe: XBO 75W HBO 100W)
- Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung)
- Diamantenmesser (Diatome[®], Science Services)
- Elektronenmikroskop (EM 10, Zeiss)
- Zellsieb (Cell strainer, REF 352360, BD Falcon)
- Magnethalter (Cat.No. S1507S, New England BioLabs)
- Photometer (Eppendorf) und Küvetten (Cat.No. 952010051, UVette 220-1600nm, Eppendorff)
- Thermocycler (TProfessional, Biometra)
- MX3000P qPCR System (Stratagene)

2.1.2 Puffer und Lösungen

- Ansatz 6x Ladepuffer
 - 10 mM Tris pH 7,6
 - 0,03 % Bromphenolblau
 - Xylencyanol
 - 60 % Glycerol
 - 60 mM EDTA
- Tris-Acetat-EDTA-Puffer(TAE)

- 2 M Tris
 - 50 mM EDTA-Tetranatriumsalz
 - pH 8,3 (eingestellt mit Essigsäure)
- Ansatz Marker
 - 105 μ l DNA-Leiter
 - 105 μ l 6x Ladepuffer
 - 420 μ l dH_2O
- Phosphat-Puffer mit Saline (PBS)
 - 137 mM NaCl
 - 2,68 mM KCl
 - 20,4 mM Na_2HPO_4
 - 1,47 mM KH_2PO_4
 - pH 7 (eingestellt mit H_3PO_4)
- Uranylacetat (1 %)
 - 0,1 g auf 10 ml dH_2O
- Bleicitrat (2,66 %)
 - 1,33 g Blei-II-nitrat in 30 ml dH_2O gelöst
 - 1,76 g Tri-Natrium-Citrat-dihydrat, 30 min Umwandlungszeit bei Raumtemperatur zu Bleicitrat
 - 8 ml 1 N NaOH
 - 12 ml dH_2O
- Puffer 1
 - 0,1 M NaH_2PO_4
- Puffer 2
 - 0,1 M NaH_2PO_4
 - 0,1 % BSA

2.1.3 Enzyme

- Proteinkinase K (Dako; 0,4 mg/ml)
- Kollagenase A (Roche, 70365126; 100 mg)

2.2 Tiermodell

Für die Arbeit wurden heterozygote $Nphs2^{+/R140Q}$ -Mäuse aus 129 Sv/Pas-Hintergrund von der Arbeitsgruppe um Prof. Corinne Antignac (INSERM, Paris) bezogen und mit heterozygoten $COL4A3^{+/-}$ -Mäusen aus 129 Sv/J-Hintergrund von Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (WestGrove, PA, USA) gekreuzt. Die Zucht erfolgte durch das Tierpflegepersonal der Universitätsmedizin Göttingen und wurde bei den zuständigen Behörden angezeigt.

Die heterozygote R140Q-Mutation führt im Mausmodell zu einem verhältnismäßig milden Phänotyp. Sie wurde daher als äquivalent zum R229Q-Polymorphismus von $Nphs2$ beim Menschen angenommen. In den dargestellten Abbildungen und Tabellen wird der Genotyp $Nphs2^{+/R140Q} // COL4A3^{+/-}$ vereinfacht als $Nphs2 // COL4A3 +/ - // +/ -$ bezeichnet.

Bei allen Methoden wurden Wildtypen und $Nphs2^{+/R140Q} // COL4A3^{+/-}$ -Mäuse jeweils im Alter von 60 und 180 Tagen und 60 Tage alte $COL4A3^{-/-}$ -Mäuse untersucht. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden außerdem $COL4A3^{+/-}$ -Fälle im Alter von 60 und 180 Tagen und für die real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) zusätzlich $COL4A3^{+/-}$ - und $Nphs2^{+/-}$ -Mäuse jeweils im Alter von 60 und 180 Tagen verwendet. Alle Tiere sind in Tabelle 13-15 aufgeführt.

2.3 Genotypisierung

Für die Bestimmung des Genotyps wurde DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse mithilfe des "NucleoSpin Tissue"-Kits (Machery-Nagel) gewonnen. 0,5 cm lange Gewebestücke wurden mit 180 μ l Puffer T1 und 25 μ l Proteinase K für 45-60 Minuten bei 56°C inkubiert. Das Lysat wurde anschließend 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert und die 200 μ l Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde mit 200 μ l Puffer B3, sowie 210 μ l EtOH gemischt, auf eine Säule gegeben und 1 Minute bei 13500 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf jede Säule wurden 500 μ l BW gegeben. Die Säule wurde erneut für 1 Minute bei 13500 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Es wurden 600 μ l B5 dazugegeben und die Säule wieder für 1 Minute bei 13500 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zum Trocknen

für 1 Minute bei 13500 rpm zentrifugiert. Der Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA in 200 μl BE-Puffer(70°C) durch Zentrifugation für eine Minute bei 13500 rpm und Raumtemperatur eluiert. Abschließend wurde die Säule verworfen und die Probe bei 4°C gelagert.

Die Amplifikation der DNA erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit dem Kit "TopTaq-PCR"(Qiagen). Die Primer stammten von "MWG Operon" (Ebersberg, Deutschland) und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 2 dargestellt. Das Protokoll über die Dauer und Temperatur der einzelnen PCR-Zyklen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

	Primer	Sequenz
COL4A3	forward (5' 3')	CCA GGC TTA AAG GGA AAT CC
	reverse (5' 3')	CCT GCT AAT ATA GGG TTC GAG A
	mutant (5' 3')	AAT CGC CAA TGA CAA GAC G
Nphs2	forward (5' 3')	TAA TTA TAG GGC CGG T
	reverse (5' 3')	TGC CTC TTC TCC CAA CT

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer

10 μl	DNA	
0,5 μl	Primer forward	(20pmol)
0,5 μl	Primer reverse	(20pmol)
0,5 μl	Primer mutant	(20pmol)
0,5 μl	Nukleotide	(10mM)
0,1 μl	<i>Taq</i> -Polymerase	
2,5 μl	10xPuffer	
10,4 μl	<i>dH</i> ₂ O	

Tabelle 2: PCR-Reaktionsansatz

Initiierende Denaturierung		94°C	3 Minuten
Denaturierung	35x	94°C	30 Sekunden
Hybridisierung		60°C	30 Sekunden
Elongation		72°C	1 Minute
Beendende Elongation		72°C	10 Minuten

Tabelle 3: PCR Temperaturprofil

Die Identifizierung der DNA-Moleküle erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose (1,5 %) mit 1xTAE aufgeköcht. Zu 30 ml Agarose wurden dann 10 μ l 0,06 %iges Ethidiumbromid gegeben. 12,5 μ l DNA-Probe und 2,5 μ l 6xDNA Ladepuffer wurden gemischt und nach Aushärtung auf das Gel geladen. Der Gelauf erfolgte für 60 Minuten bei 70 V. Für die Größenkontrolle wurde zusätzlich ein Marker (100bp Leiter Nr. 5M0321, Fermentas) aufgetragen. Zur Analyse wurde abschließend ein Bild unter UV-Licht erstellt.

2.4 Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten

Zum lichtmikroskopischen Nachweis von Nidogen-2 wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten vorgenommen.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung bindet ein primärer Antikörper an das gesuchte Protein. Ein sekundärer, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter und gegen den ersten gerichteter Antikörper dient der Detektion dieser Bindung.

2.4.1 Anfertigung der Kryoschnitte

Die Tötung der Mäuse erfolgte nach kurzer Anästhesie mit Isofluran durch Genickbruch. Die Nieren wurden entnommen, in kleine Stücke zerteilt, mithilfe von "Tissue-Tek" (Miles Inc, USA) fixiert und bei -80°C konserviert. Mithilfe eines Mikrotoms wurden 7 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden bei -20°C gelagert.

2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Das "Tissue-Tek" wurde für die Reaktion vorsichtig mit dem Skalpell vom Objektträger entfernt und der Gewebeschnitt für 10 Minuten bei -20°C in Aceton fixiert. Die an der Luft getrocknete Probe wurde zweimal für 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Der

primäre Antikörper (Acres, APo2274Su-S, Polyclonal Antibody Nidogen-2 Serum, rabbit) wurde 1:500 in 1xPBS/1%BSA (pH 7,4) verdünnt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Probe wurde anschließend dreimal für 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper fungierte der mit dem Farbstoff AlexaFluor 488 gekoppelte goat-anti-rabbit Antikörper A11008 von Invitrogen. Er wurde 1:200 in 1xPBS/1%BSA (pH 7,4) verdünnt. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Die Probe wurde dreimal für 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Die Einbettung erfolgte mit einem Deckgläschen und Fluoreszenz Mounting Medium (DAKO) über Nacht, abgedunkelt bei 4°C.

2.4.3 Lichtmikroskopie

Zur Analyse diente ein Fluoreszenzmikroskop. Es wurden Aufnahmen bei 10-facher Okularvergrößerung mit 20- und 40-facher Vergrößerung gemacht.

2.5 Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie

Die Immunogoldmarkierung diente zum Nachweis von Nidogen-2 im Nierengewebe der einzelnen Genotypen auf elektronenmikroskopischer Ebene.

Bei dieser Technik wird das zu untersuchende Protein durch einen primären Antikörper detektiert. Diese Bindung wird durch einen zweiten, an kolloidales Gold gekoppelten Antikörper markiert. Der primäre Antikörper wurde von Prof. Dr. Nicolai Miosge, Leiter der Arbeitsgemeinschaft "Orale Biologie und Geweberegeneration", Universitätsmedizin Göttingen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.5.1 Präparation und Fixierung des Gewebes

Die Tötung der Mäuse erfolgte wie bereits oben für die Lichtmikroskopie per Genickbruch. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden 1,5x1,5 mm große Nierestücke nach Standardprotokoll in LR-Gold[®] Fixans fixiert und in den hydrophoben Kunststoff LR-Gold[®] eingebettet.

Von den fixierten Proben wurden mit dem Mikrotom Ultradünnschnitte (80 nm) angefertigt. Diese wurden auf Nickel-Grids (ATHENE GRIDS) mit 3,05 mm Durchmesser fixiert.

2.5.2 Herstellung von kolloidalem Gold und Kopplung an den Antikörper

Nidogen-2 wurde in den Gewebeschnitten mit 20 nm großen Goldkugeln markiert. Die Synthese der Kugeln erfolgte in einem sauberen Zwei-Hals-Kolben mit Rückflusskühlung. In diesem Kolben wurden 49,5 ml dH_2O (Bidest) mit bei 4°C gelagerter einprozentiger Tetrachlorgold(III)säure Trihydrat ($HAuCl_4$) erhitzt und für 5 Minuten zum Kochen gebracht. Nach der Zugabe von 1 ml einprozentigem Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat wurde der Farbumschlag der kochenden Lösung von Gelb nach Kirschrot abgewartet. Die Lösung wurde für 5 Minuten in kochendem Zustand gehalten. Abschließend wurde der pH mit 0,2 M K_2CO_3 auf 9,0 eingestellt.

Vor der Kopplung des kolloidalen Golds an den sekundären Antikörper wurde mithilfe von NaCl das richtige Verhältnis beider Substanzen in einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die Stammlösung (goat anti rabbit IgG, Invitrogen, A 10533, 1 mg/ml) wurde mit dH_2O (pH 9,0) auf 1:100 verdünnt. In die Felder einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 60 μ l, 70 μ l, 80 μ l, 90 μ l, 100 μ l, 110 μ l und 120 μ l des verdünnten Antikörpers pipettiert. Es wurden pro Feld 100 μ l kolloidales Gold und 100 μ l NaCl dazugegeben. Anhand des Farbumschlags der einzelnen Ansätze ließ sich die Lösung mit dem richtigen Verhältnis von Antikörper und Gold bestimmen. Es wurde die Konzentration mit Farbumschlag von blau nach rosa gewählt.

Im nächsten Schritt wurde diese Menge des 1:10 verdünnten Antikörpers mit kolloidalem Gold auf 1040 μ l aufgefüllt. Es wurden dann 104 μ l 1xPBS/1 % BSA pH 9 und 556 μ l 1xPBS/1 % BSA pH 7,4 hinzugegeben. Die so entstandenen 1700 μ l kolloidales Gold wurden 20 Minuten bei 21°C und 10000 rpm zentrifugiert. Nach anschließenden 10 Minuten Wartezeit teilte sich die Lösung in ein aus gekoppeltem Antikörper bestehendes Sediment und eine Fahne aus überschüssigem Antikörper. 15 μ l des Sediments wurden mit jeweils 67,5 μ l 1x PBS/1 % BSA pH 9,0 und 1xPBS/1 % BSA pH 7,4 in ein silikonisiertes Eppendorf-Cup überführt und bei 44°C gelagert.

2.5.3 Immunogoldmarkierung

Zuerst erfolgte eine fünfzehnminütige Präinkubation mit 1xPBS.

Die darauf folgende Inkubation mit dem primären Antikörper (1:100 in 1xPBS) dauerte 60 Minuten. Danach wurden die Grids mit 100 ml dH_2O gespült und mit dem sekundären, an kolloidales Gold gekoppelten Antikörper (1:30 in 1xPBS) für 20 Minuten inkubiert. Abschließend wurde erneut mit 100 ml dH_2O gespült.

Um das Gewebe im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen, wurden die Schnitte für 10 Minuten zunächst mit Uranylacetat kontrastiert und dann zur Reinigung 5 mal für

2 Minuten auf einen frischen Tropfen dH_2O gegeben. Danach folgte die Kontrastierung mit Bleinitrat. Abschließend wurde die Reinigung mit dH_2O wiederholt.

Alle Schritte erfolgten in einer abgedeckten Petrischale. Bei jedem Arbeitsschritt wurden jeweils $20 \mu\text{l}$ der Lösung auf Parafilm pipettiert. Die Grids wurden mithilfe einer Pinzette auf die Tropfen gelegt. Alle Reaktionen liefen bei Raumtemperatur ab.

2.5.4 Elektronenmikroskopie und quantitative Analyse

Die Analyse der Immunogoldmarkierung wurde mit einem Elektronenmikroskop durchgeführt. Dabei wurden für die quantitative Auswertung Aufnahmen bei 10000-facher Vergrößerung gemacht.

Die Längenbestimmung der dokumentierten Basalmembranabschnitte und die Zählung der Goldpartikel wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt. Das Verfahren ist exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt.

2.5.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Immunogoldmarkierung erfolgte anhand der Software SAS. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit einem t-Test, wobei die erzielten p-Werte für multiples Testen gemäß der HSD-Methode korrigiert wurden. Das Signifikanzniveau lag bei $\alpha=5\%$. Da bei der Qualitätskontrolle einige Abschnitte mit hoher Variabilität im Vergleich zu den meisten anderen Abschnitten auffielen, wurde durch Bootstrapping mit $r=1000$ Bootstrap-Stichproben eine robuste Modellbildung durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte gemeinsam mit dem Institut für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen.

2.6 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) ist eine Variante der Polymerasekettenreaktion, die die Quantifizierung von DNA ermöglicht. Um Genexpression zu quantifizieren ist die Isolation der RNA aus dem Gewebe und die reverse Transkription dieser in cDNA notwendig.

2.6.1 Materialgewinnung

Die Gewinnung der Glomeruli gelang durch die Perfusion von Metallbeads (Dynabeads[®] M450 Epoxy Invitrogen 14011) in die Nieren der Mäuse.

Für die Verwendung wurden die Beads in Lösung gegeben. Dafür wurde pro Ansatz 1 ml Dynabeads[®] in einem 1,5 ml Eppendorff-Cup für eine Minute an einen Magneten gestellt. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Es wurde 1 ml Puffer 1 hinzugefügt und die Lösung für zwei Minuten resuspendiert. Es folgte eine einminütige Lagerung am Magneten. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde 1 ml Puffer 2 hinzugefügt und erneut für zwei Minuten resuspendiert. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur und 800 rpm in den Thermomixer gestellt. Am nächsten Tag wurde die Lösung erneut für eine Minute am Magneten gelagert und der entstandene Überstand abpipettiert. Es wurde erneut 1 ml Puffer zwei hinzugegeben und die Lösung für eine Minute an den Magneten gestellt. Nach zweimaliger Wiederholung des Vorgangs wurde die fertige Lösung bestehend aus Beads und 1 ml Puffer 2 bei 4°C gelagert. Pro Maus wurde eine Lösung bestehend aus 40ml sterilem PBS und 200 μ l Magnetkugeln verwendet.

Die Mäuse wurden durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran getötet. Mit einer Butterflynadel wurde die Lösung über den linken Vorhof in den Blutkreislauf der Tiere infundiert. Nach erfolgreicher Infusion wurden beide Nieren mit einem Skalpell herausgetrennt, auf einer autoklavierten Glasplatte in ca. 1 mm große Stücke geschnitten und in 15 ml Falkonröhrchen überführt. Das Gesamtvolumen wurde mit 1xPBS auf 1 ml aufgefüllt und 100 μ l 20 mg/ml Kollagenase A (100 mg in 5 ml Hbss (Biochrom L2045)) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und alle 5 Minuten sorgfältig geschüttelt. Das Gewebe wurde mit 14 ml 1xPBS aufgefüllt, kurz resuspendiert und über ein 100 μ l Zellsieb in ein 50 ml Falkonröhrchen überführt. Das Falcon mit insgesamt 15 ml Zellysate wurde für 10 Minuten in den Magnetständer gestellt. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgesaugt und der Überstand erneut durch ein Sieb in ein Falcon gegeben. Das im Falcon verbleibende Pellet wurde mit 14 ml 1xPBS gespült und für weitere 10 Minuten in den Magnetständer gestellt. Der Überstand wurde erneut abgenommen und über ein Sieb zum zuvor abgesaugten Überstand gegeben. Das im Falcon verbleibende Zellpellet wurde mit 500 μ l 1xPBS gespült, in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben und auf Eis gelagert. Der gesammelte Überstand wurde ebenfalls für 10 Minuten in den Magnetständer gestellt und anschließend abgenommen. 1 ml des Überstandes diente als Negativkontrolle und wurde in ein auf Eis gelagertes 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben. Auch das Zellpellet aus dem Überstand wurde mit 500 μ l 1xPBS gespült und zu den zuvor gewonnenen 500 μ l Zellysate gegeben. Die insgesamt 1000 μ l Lysate wurden bei 3250 rpm und 4°C 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Abschließend wurden 350 μ l RLT-Puffer (Diagen) und 3,5 μ l β -ME (β -Mercapto-Ethanol) dazugegeben. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.6.2 RNA-Isolation und reverse Transkription

Die Isolation der RNA aus den Glomeruli wurde mit dem RNeasy Mini Kit (50) Cat. No. 74104 von Qiagen durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektroskopisch mittels eines Biophotometers bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$. Die Absorption der Probe wurde im Verhältnis zur Elutionspufferkontrolle bestimmt. Die Konzentration wurde berechnet mithilfe des durchschnittlichen RNA-Extinktionskoeffizienten $0.025 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1} * \text{cm}^{-1}$, wobei die optische Dichte OD_{260} von 1 bei $\lambda=260 \text{ nm}$ einer RNA Konzentration von $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht.

Die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde mit dem Thermocycler durchgeführt. Das Protokoll ist Tabelle 4 zu entnehmen. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 5 aufgelistet. Alle Komponenten stammten von Invitrogen/life tech.. Zur Isolation der mRNA-Fraktion aus der gesamtRNA wurde ein Oligo(dT)-Primer verwendet. Oligo(dT)-Primer bestehen aus Thymidinnukleotiden und binden spezifisch an den poly(A)-Schwanz von mRNA. Die cDNA wurde mit $161 \mu\text{l}$ nukleasefreiem Wasser versetzt und bei -20°C gelagert.

200 ng RNA	+ 14 μl nukleasefreies Wasser	65°	5 min
		4°	5 min
	+23 μl Mastermix	37°	60 min
		70°	15 min
		4°	Pause
	+RNase H (2 U/ μl , 4x30 U)	37°	20 min

Tabelle 4: reverse Transkription

8 μl	5x Puffer	
1 μl	RNase Out	40 U/ μl ,
4 μl	dNTPs	Mix (10 mM)
1,1 μl	Oligo(dT)	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
2,9 μl	nukleasefr. Wasser	
4 μl	DTT	0,1 M
2 μl	Superscript®II	200 U/ μl ,

Tabelle 5: Mastermix

2.6.3 Durchführung der qPCR

Die cDNA wurde nach dem in Tabelle 6 aufgeführten Schema vorbereitet und die qPCR nach dem in Tabelle 7 aufgeführten Protokoll mit dem Cyclor durchgeführt. Die verwendeten Primer (MWG Operon, Ebersberg, Deutschland), sind in Tabelle 8 aufgeführt. GAPDH diente als Housekeeping-Gen zur statistischen Normierung.

	pro Well
cDNA	2,5 μ l
SYBR-Green+ROX	12,5 μ l
Primer (forward+reverse)	je 10 pmol
nukleasefreies Wasser (NFW)	9 μ l

Tabelle 6: Pipettierschema qPCR

Initiale Denaturierung	10 min	95°C
Denaturierung	40x 30 sek	95°C
Annealing	1 min	60°C
Elongation	1 min	72°C
Letzte Elongation	1 min	95°C
	30 sek	60°C
	30 sek	95°C

Tabelle 7: qPCR Temperaturprofil

Zielgen	Primer forward (5' 3')	Primer reverse (5' 3')
Nidogen-2	CTC AGG TTT GAT AAG CCC GGA AGG A	TTT CCG CTC GGA ACC ATC CA
GAPDH	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA

Tabelle 8: Primer qPCR

2.6.4 Auswertung und Statistik

Die relative Expression wurden anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit dem Housekeeping-Gen GAPDH als internem Standard durch die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ berechnet.

Der Ct-Wert gibt den Beginn der exponentiellen Phase an und ist somit ein Maß für die Menge an vorliegender DNA. Um den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert zu berechnen, wird zunächst der ΔCt -Wert als Differenz zwischen Ct-Wert des zu untersuchenden Gens und des Referenzgens (GAPDH) gebildet. Die Differenz aus ΔCt -Wert der 60 Tage alten Wildtypen (+/+//+/+ 60d) und der ΔCt -Wert des jeweils vergleichend untersuchten Genotypen ergibt den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit einem ANOVA-Test durchgeführt. Getestet wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Rolle von Nidogen-2 in der glomerulären Basalmembran bei heterozygoter COL4A3-Mutation mit zusätzlichem Polymorphismus in Nphs2 im Vergleich zur Pathogenese des Alport-Syndroms. Untersuchungen wurden lichtmikroskopisch und zur Quantifizierung elektronenmikroskopisch durchgeführt. Zur semi-quantitativen Analyse auf mRNA-Ebene diente die quantitative real-time PCR.

3.1 Lokalisation von Nidogen-2 im Glomerulus

Zur Beurteilung der Verteilung von Nidogen-2 im Glomerulus und zur optischen Abschätzung der jeweils vorhandenen Proteinmenge in den untersuchten Genotypen wurde das Nidogen mithilfe von Immunfluoreszenzfärbung lichtmikroskopisch sichtbar gemacht. Die für die Methodik verwendeten Tiere sind in Tabelle 13 aufgeführt.

In den verwendeten Kryoschnitten wurden neben Einzelfärbungen für Nidogen-2 (grün) und Nephritin (rot) auch simultane Immunfluoreszenzen der Proteine durchgeführt. Die Färbung von Nephritin, einem essenziellen Schlitzmembranprotein, diente der besseren Orientierung im Glomerulus. Da es exklusiv von Podozyten in die Schlitzmembran exprimiert wird, konnte dadurch die glomeruläre Schlinge zur Darstellung gebracht werden. Mit der Markierung des Transmembranproteins sollte eine optimierte Beurteilung der Nidogen-2-Verteilung ermöglicht werden.

Wie zu erwarten konnte Nidogen-2 als Basalmembranprotein sowohl in der glomerulären Schlinge als auch im Mesangium nachgewiesen werden. Bei Wildtypen schien die Signalstärke im Mesangium vergleichsweise höher als in der glomerulären Basalmembran.

In Gewebsschnitten von 60 Tage alten Wildtypmäusen (+/+//+/+ 60d) konnten scharf konturierte Glomeruli dargestellt werden (4a-4c). Die glomerulären Schlingen ließen sich gemäß der Nephritinverteilung rot markieren (4b). Hier konnte deutlich die größere Präsenz von Nidogen-2 im Mesangium gegenüber der glomerulären Basalmembran dargestellt werden (4a). Die Glomeruli 180 Tage alter Wildtypen (+/+//+/+ 180d, 4d-4f) und doppelt heterozygoter 60 Tage alter Mäuse (+/-//+/- 60d, 4g-4i) stellten sich vergleichbar dar.

Bei 180 Tage alten doppelt heterozygoten Mäusen (+/-//+/- 180d) und den Alport-Mäusen (+/+//-/ 60d) fielen optisch hingegen Differenzen auf. In den Glomeruli 180 Tage alter doppelt heterozygoter Mäuse (5a-5c) war eine weniger strukturierte Verteilung von Nidogen-2 im Glomerulus zu beobachten. Die Anreicherung des Proteins innerhalb der glomerulären Schlinge wirkte leicht verstärkt gegenüber 180 Tage alten Wildtypen

(5a). Außerdem imponierte hier eine weniger scharf konturierte, verbreiterte Signalgebung von Nephritin (5b). Das Fluoreszenzmuster ähnelte der bei Alport-Mäusen zu beobachtenden Signalgebung. Bei diesen Tieren (5d-5i) ließ sich Nidogen-2 nicht mehr eindeutig lokalisieren. Statt der eindeutig starken Anreicherung im Mesangium imponierten hier bei weniger scharfer Konturierung Signale im gesamten Glomerulus (5d) mit Zunahme der Proteinanreicherung im Bereich der Glomerulosklerose (5g). Die Färbung innerhalb der glomerulären Schlinge war intensiver und hatte gegenüber Nephritin verhältnismäßig zugenommen (5f+5i).

Zusätzlich wurden Immunfluoreszenzen an Kryoschnitten von Nieren einfach COL4A3-heterozygoter 60 und 180 Tage alter Mäuse durchgeführt. Hierbei ließen sich bei starker Anreicherung von Nidogen-2 im Mesangium und deutlicher Markierung von Nephritin innerhalb der glomerulären Schlinge keine morphologischen Veränderungen zum Wildtyp feststellen. Die Ergebnisse sind nicht dargestellt.

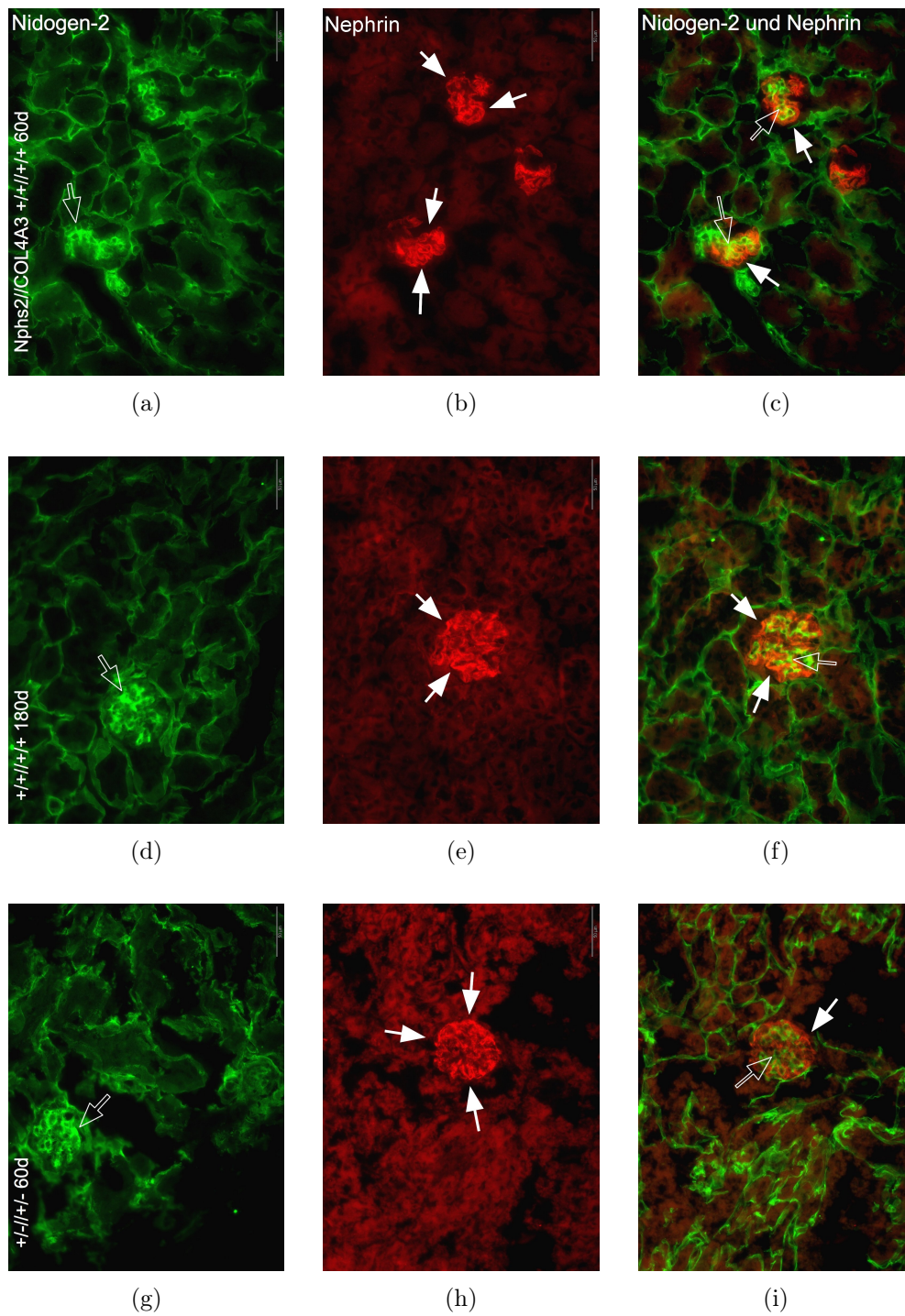


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung: Nphs2//COL4A3 +/+//+/+ 60d (a-c), +/+//+/+ 180d (d-e), +/-//+/- 60d (g-i); Nidogen-2 (links), Nephrin (Mitte), Nidogen-2 und Nephrin (rechts), grün=Nidogen-2 (\Rightarrow), rot=Nephrin (\rightarrow); d=Tage; 1 cm $\hat{=}$ 62,5 μ m

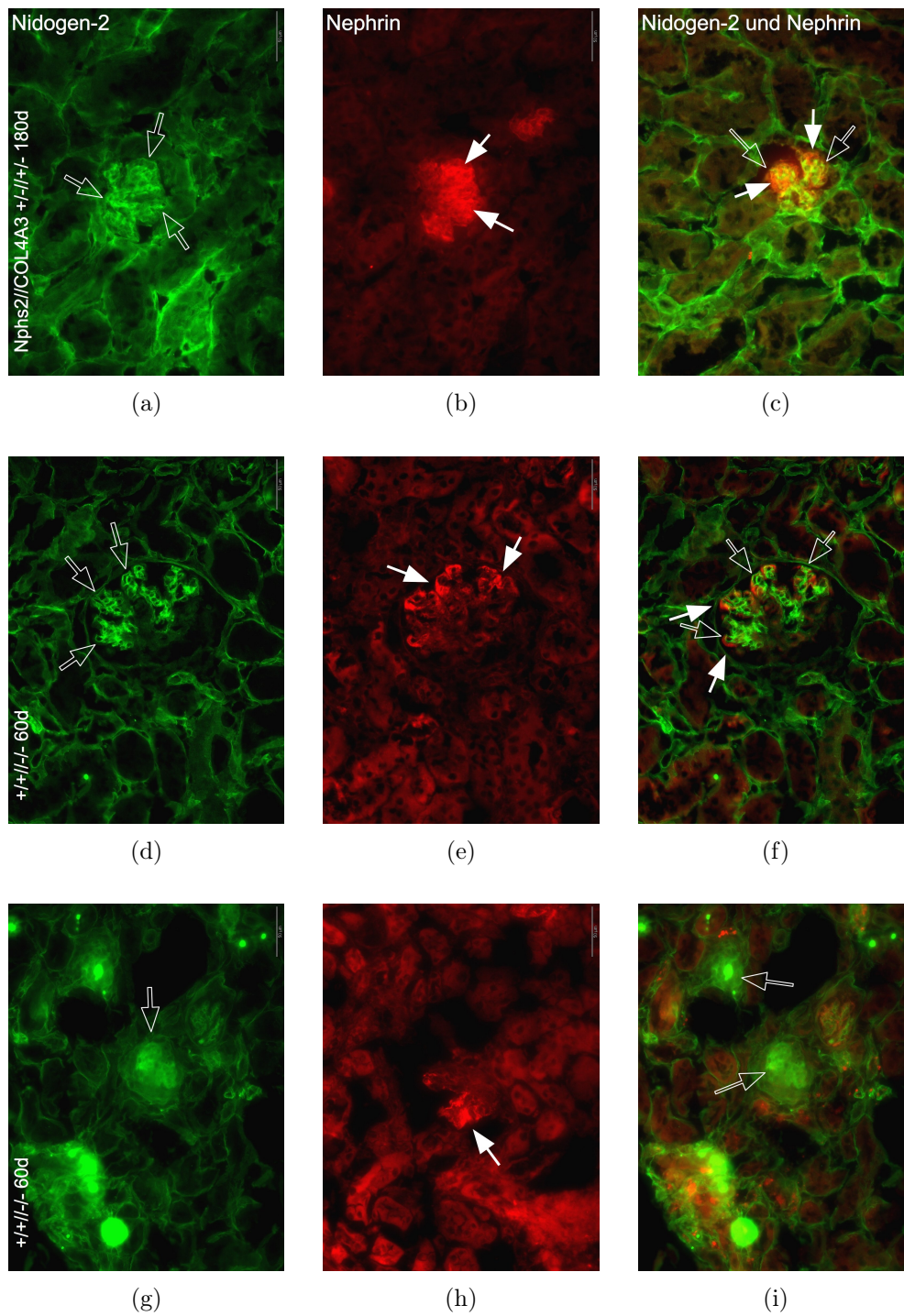


Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbungen: *Nphs2//COL4A3 +/-/+/-* 180 Tage (a)-(c), *+/+///-* 60 Tage (d)-(f), Ausgeprägte Sklerose bei *+/+///-* 60Tage (g)-(i); Nidogen-2 (links), Nephrin (Mitte), Nidogen-2 und Nephrin (rechts); grün=Nidogen-2 (\Rightarrow), rot=Nephrin (\rightarrow); d=Tage; 1 cm $\hat{=}$ 62,5 μ m

3.2 Ultrastrukturelle Darstellung von Nidogen-2 und Quantifizierung der Proteinmenge innerhalb der glomerulären Basalmembran

Um Nidogen-2 in den Basalmembranen darzustellen und die Proteinmenge quantitativ zu vergleichen, wurde das Protein mithilfe von Immunogoldmarkierung in Ultradünnschnitten markiert. Die Goldpartikel wurden elektronenmikroskopisch dargestellt. Pro Genotyp wurden drei Mäuse untersucht. Dabei wurden pro Fall zwei bis sieben Glomeruli ausgewertet. Eine Übersicht zu den verwendeten Mäusen ist in Tabelle 14 aufgelistet.

Nidogen-2 konnte in der glomerulären Basalmembran, der mesangialen Matrix und im Tubulus nachgewiesen werden, wobei das Protein in der glomerulären Basalmembran im Randbereich nahe der Podozytenfußfortsätze und der Endothelzellen lokalisiert war (6b). Auch im Serum kam es zu einer Anreicherung von Goldpartikeln (Übersicht (6a), (6b), Tubulus nicht dargestellt). Wie bei den Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich gegenüber der glomerulären Basalmembran (6b) eine verstärkte Proteinanreicherung im Mesangium (6d).

Ultrastrukturell ließ sich bei 60 Tage alten Wildtypen eine intakte Basalmembran mit daran anliegenden, geordneten Podozytenfüßen darstellen (6a, 6b). Bei 180 Tage alten Wildtypen zeigte sich die gleiche Morphologie (hier nicht dargestellt). Während sich die Basalmembran in 60 Tage alten doppelt heterozygoten Mäusen unauffällig darstellte, waren bei 180 Tage alten Mäusen dieses Genotyps neben intakten Abschnitten (6e) Verschmelzungen der Podozytenfußfortsätze erkennbar (6f). Glomerulosklerose konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

Bei Alport-Mäusen imponierten ausgeprägte Glomerulosklerose (8a) sowie Doppelkonturierungen (8b). Wie ausführlich in der Literatur beschrieben, zeigte sich eine Aufspaltung der Basalmembran (8b). Die Basalmembran erschien bei morphologisch veränderten Podozytenfußfortsätzen teilweise stark verschmälert oder verbreitert (8b). Besonders in den pathologisch veränderten Abschnitten konnte vermehrt Nidogen-2 markiert werden (7c-7d).

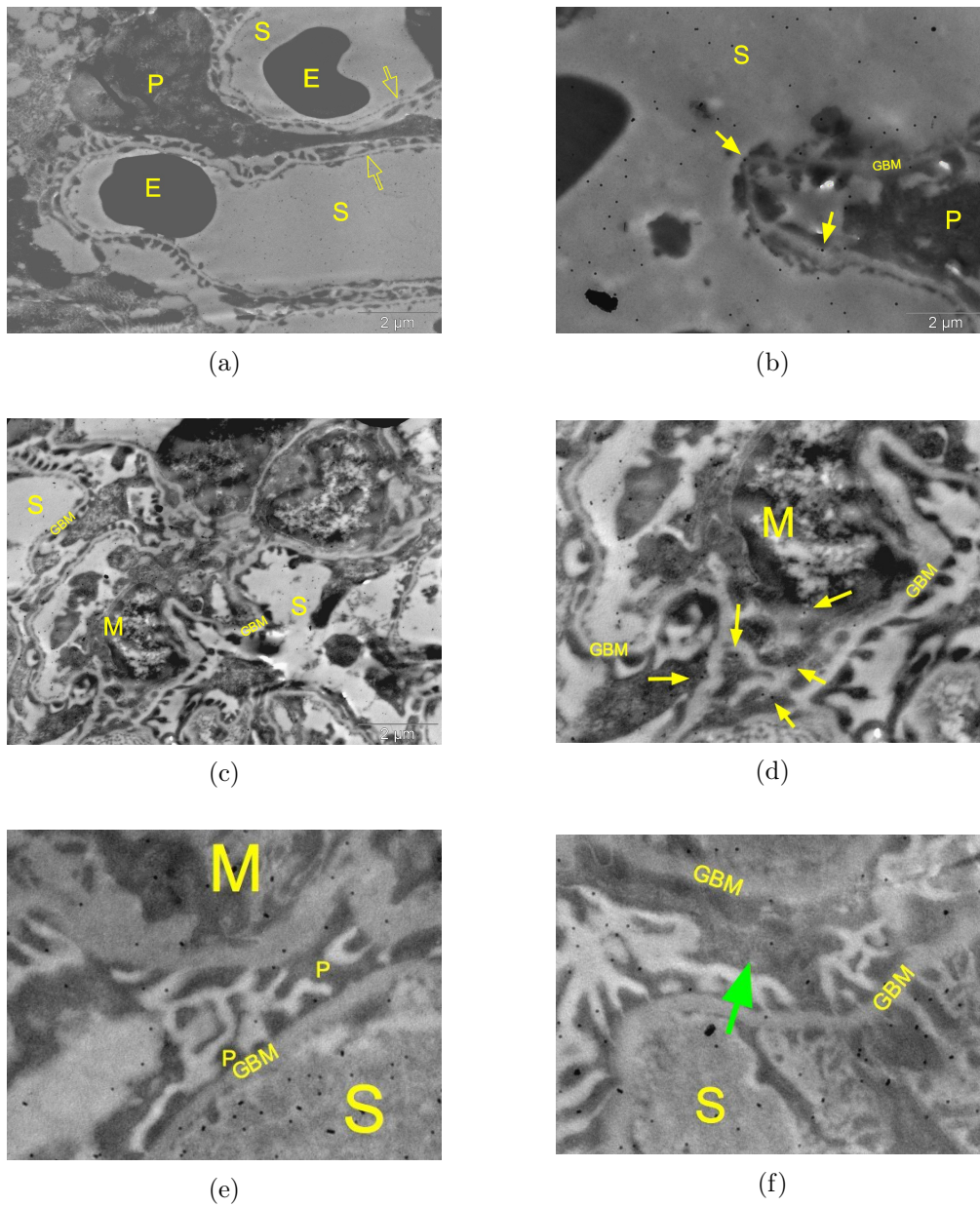


Abbildung 6: Immunogoldmarkierung, Nphs2//COL4A3 +/+//+/+ 60 Tage: Übersichtsaufnahme der glomerulären Schlinge mit intakter Reihung der Podozytenfußfortsätze (⇒) (a), erkennbare Nidogen-2 Anreicherung in der GBM (→) besonders im Randbereich der GBM nahe den umgebenden Zellen und im Serum (S) (b), Übersichtsaufnahme des Mesangiums (c), verhältnismäßig gegenüber der GBM größere Anreicherung im Mesangium (→) (d); +/-//+/- 180 Tage: Intakte Basalmembran mit geordneten Podozytenfußfortsätzen (e), teilweise verstrichene Podozytenfußfortsätze (→ grün) (f); GBM=glomeruläre Basalmembran, P=Podozyt, S=Serum, E=Erythrozyt, M=Mesangium; (a-c) $1\text{ cm} \hat{=} 2\ \mu\text{m}$, (d) $1\text{ cm} \hat{=} 1\ \mu\text{m}$, (e+f) $1\text{ cm} \hat{=} 0,8\ \mu\text{m}$

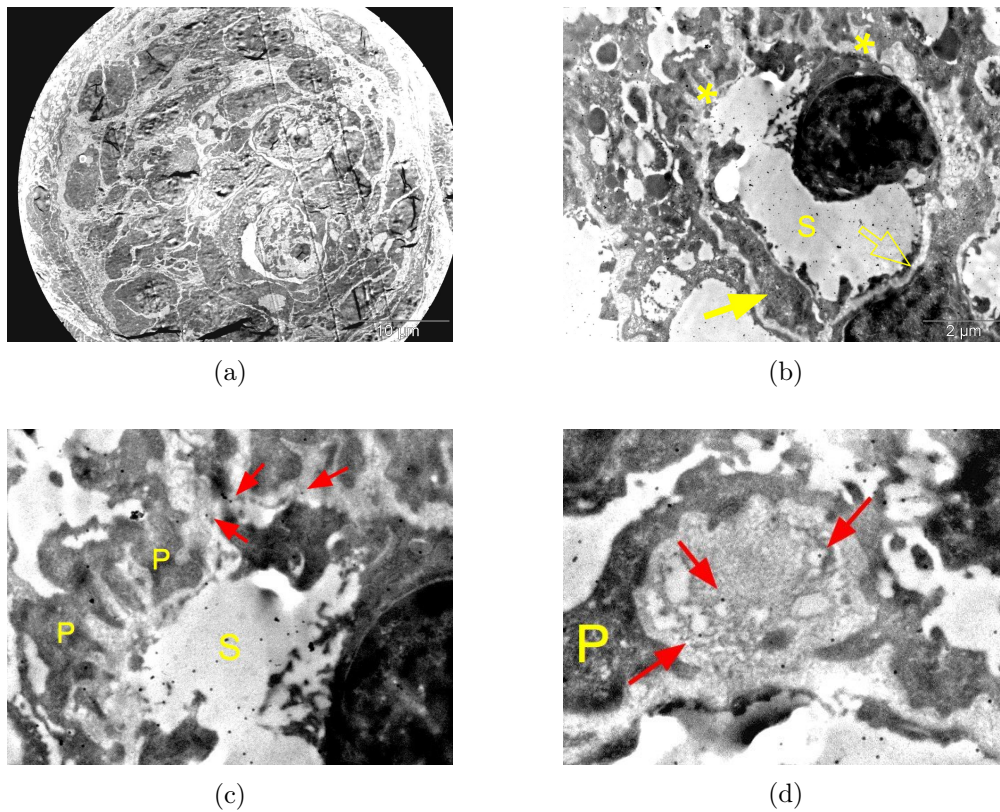


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen Immunogoldmarkierung, Nphs2//COL4A3 ++//-- 60 Tage: Übersichtsaufnahme eines fast vollständig sklerosierten Glomerulus (a), Pathologisch veränderte glomeruläre Schlinge mit Verdickung (*), Doppelkonturierung (→) und Verschmälerung (⇒) der GBM (b), vermehrte Anreicherung von Nidogen-2 in den pathologisch verbreiterten Bereichen der GBM (→ rot) und morphologisch veränderte Podozytenfußfortsätze (P) (c), Verdickung der Basalmembran mit vermehrter Proteinanreicherung (→ rot) (d); P=Podozytenfußfortsatz, S=Serum; (a) $1,4 \text{ cm} \hat{=} 10 \mu\text{m}$, (b) $1 \text{ cm} \hat{=} 2 \mu\text{m}$, (c) $1 \text{ cm} \hat{=} 1 \mu\text{m}$, (d) $1 \text{ cm} \hat{=} 0,66 \mu\text{m}$

Um Unterschiede in der Proteinmenge festzustellen, wurde die glomeruläre Basalmembran in verschiedenen Abschnitten der Nierenkörperchen gemessen und die Menge an markiertem Protein bestimmt. Als vergleichbare Größe diente der logarithmierte Quotient ($\ln(K/L)$) aus der Zahl der Goldkugeln (K) pro Längeneinheit an Basalmembran (L). Die Daten sind in Tabelle 9 dargestellt. Unterschiede wurden anhand eines t-Tests auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=5 \%$ geprüft.

In der Basalmembran der Alport-Mäuse war gegenüber 60 Tage alten heterozygoten Mäusen eine statistisch relevante größere Proteinmenge nachweisbar. Weitere Änderun-

gen für die einzelnen Genotypen konnten nicht gezeigt werden. Auch zwischen 60 und 180 Tage alten Mäusen ließ sich keine Evidenz nachweisen. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Genotyp	$\ln(K/L)*100$	Konfidenzintervall
++//++ 60d	51,40	49,09-53,60
++//++ 180d	59,90	54,95-64,19
++//-- 60d	84,70	79,68-90,25
+ - // + - 60d	46,30	43,86-49,00
+ - // + - 180d	59,90	54,95-64,19

Tabelle 9: Quantitative Analyse der Immunogoldmarkierung, Bestimmung von $\ln(K/L)$ als Vergleichsgröße

Genotyp1 (Nphs2//COL4A3)	Genotyp2 (Nphs2//COL4A3)	p-Wert
++//++ 60d	++//++ 180d	0,8782
++//-- 60d	++//++ 60d	0,0938
++//-- 60d	++//++ 180d	0,4987
++//-- 60d	+ - // + - 60d	0,0277*
++//-- 60d	+ - // + - 180d	0,1277
+ - // + - 60d	++//++ 60d	0,9435
+ - // + - 60d	++//++ 180d	0,6002
+ - // + - 60d	+ - // + - 180d	0,9469
+ - // + - 180d	++//++ 60d	0,9976
+ - // + - 180d	++//++ 180d	0,8993

Tabelle 10: Statistische Auswertung Immunogoldmarkierung, $\ln(K/L)$ als Vergleichsgröße, Genotyp 1 im Vergleich zu Genotyp 2, Signifikanzniveau $\alpha=5\%$, $p \leq 0,05$, (* = signifikant, K=Kugeln, L=Länge der Basalmembran, d=Tage)

Da von Beirowski et al. eine signifikant dünnere Basalmembran bei 12 Monate alten COL4A3^{+/-}-Mäusen gegenüber Wildtypen beschrieben wurde, erfolgte eine stichprobenartige Messung der Breite der glomerulären Basalmembranen von 180 Tage alten doppelt heterozygoten Mäusen und Wildtypen (Beirowski et al. 2006). Die Daten ergaben Hinweise auf eine Verschmälerung der Struktur bei den doppelt heterozygoten Tieren. Um die Ergebnisse zu objektivieren, wurde eine weitere statistische Auswertung unter Berücksichtigung der Basalmembranbreite durchgeführt. Gemäß den von Beirowski et al. ermittelten Daten wurde für Wildtypen und Alport-Mäuse eine Basalmembranbreite von 200 nm, für doppelt heterozygote Fälle eine Breite von 167 nm angenommen (Beirowski et al. 2006). Als Vergleichsgröße diente der natürliche Logarithmus aus der Anzahl der Goldpartikel (K) pro Fläche der Basalmembran (F) $\ln(K/F)$. Die Daten sind in Tabelle 11 dargestellt. Hierbei ließen sich eine signifikant höhere Proteinmenge bei Alport-Mäusen gegenüber 60 Tage alten Wildtypen nachweisen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Genotyp	$\ln(F/L)*100$	Konfidenzintervall
++//++ 60d	25,70	24,58-26,81
++//++ 180d	30,00	27,74-32,10
++//-- 60d	50,80	47,77-54,15
+ -//+ - 60d	27,70	26,28-29,21
+ -//+ - 180d	30,80	28,63-32,83

Tabelle 11: Quantitative Analyse der Immunogoldmarkierung, Bestimmung von $\ln(F/L)$ als Vergleichsgröße

Genotyp1 (Nphs2//COL4A3)	Genotyp2 (Nphs2//COL4A3)	p-Wert
++//++ 60d	++//++ 180d	0,8765
++//-- 60d	++//++ 60d	0,0334*
++//-- 60d	++//++ 180d	0,1787
++//-- 60d	+ -//+ - 60d	0,0637
++//-- 60d	+ -//+ - 180d	0,1805
+ -//+ - 60d	++//++ 60d	0,9274
+ -//+ - 60d	++//++ 180d	0,9730
+ -//+ - 60d	+ -//+ - 180d	0,9425
+ -//+ - 180d	++//++ 60d	0,9025
+ -//+ - 180d	++//++ 180d	0,9953

Tabelle 12: Statistische Auswertung Immunogoldmarkierung, $\ln(K/F)$ als Vergleichsgröße, Genotyp 1 im Vergleich zu Genotyp 2, Signifikanzniveau $\alpha=5\%$, $p \leq 0,05$, (* = signifikant, K=Kugeln, F=Fläche der Basalmembran, d=Tage)

3.3 Semi-quantitative Analyse der Genexpression

Nidogen-2 wird in allen Zellen des Glomerulus und im Tubulus exprimiert (Miosge et al. 2000). Um Unterschiede in der Expression festzustellen, wurde die RNA aus Glomerulus- und Tubuluszellen von jeweils drei bis vier Fällen pro Genotyp isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Eine Übersicht zu den verwendeten Mäusen ist Tabelle 15 zu entnehmen. Zur Varianzbestimmung diente ein ANOVA-Test. Getestet wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$, wobei die relative Expression nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode im Vergleich zu den Glomeruli der 60 Tage alten Wildtyp Mäuse (relative Expression=1) bestimmt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nidogen-2 in Glomeruli der Alport-Mäuse gegenüber allen anderen Genotypen hochsignifikant erhöht war. Zwischen Wildtypen und doppelt heterozygoten Mäusen hingegen ließ sich im Glomerulus kein signifikanter Unterschied nachweisen. Die Menge an mRNA blieb sowohl bei Wildtypen als auch bei doppelt heterozygoten Mäusen mit steigendem Alter der Tiere unverändert.

Zusätzlich wurden $\text{Nphs2//COL4A3}^{+//+/-}$ -Mäuse im Alter von 60 und 180 Tagen untersucht. Bei $+//+/-$ -Fällen konnte eine signifikant niedrigere Genexpression im Glomerulus 180 gegenüber 60 Tage alten Fälle festgestellt werden. In beiden Stadien war die Expression im Vergleich zu Alport-Mäusen vermindert. Die Expression in Glomeruli von $+//+/-$ -Mäusen zeigte sich bei 60 Tage alten Fällen gegenüber gleich alten Wildtypen und doppelt heterozygoten signifikant erhöht, im Alter von 180 Tagen dann gegenüber beiden Genotypen desselben Alters signifikant erniedrigt. Ergänzend wurden $\text{Nphs2//COL4A3}^{+/-//+/-}$ -Mäuse untersucht. Hierbei zeigte sich im Alter von 60 Tagen eine signifikant höhere Expression gegenüber 60 Tage alten Wildtypen, die bei 180 Tage alten Mäusen nicht mehr nachweisbar war.

Ergänzend wurde die Expression im Tubulus untersucht. Im alleinigen Vergleich der Tubuli (relative Expression in Tubuli der 60 Tage alten Wildtypen=1) untereinander zeigte sich wie im Glomerulus die Expression in Alport-Mäusen gegenüber allen anderen Genotypen signifikant erhöht. Bei 60 Tage alten $\text{COL4A3}^{+/-}$ -Mäusen konnte gegenüber den Wildtypen im Glomerulus keine signifikante Änderung der Expression festgestellt werden. Gegenüber doppelt heterozygoten und Alport-Mäusen verhielt sich die Expression gleich wie im Glomerulus. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

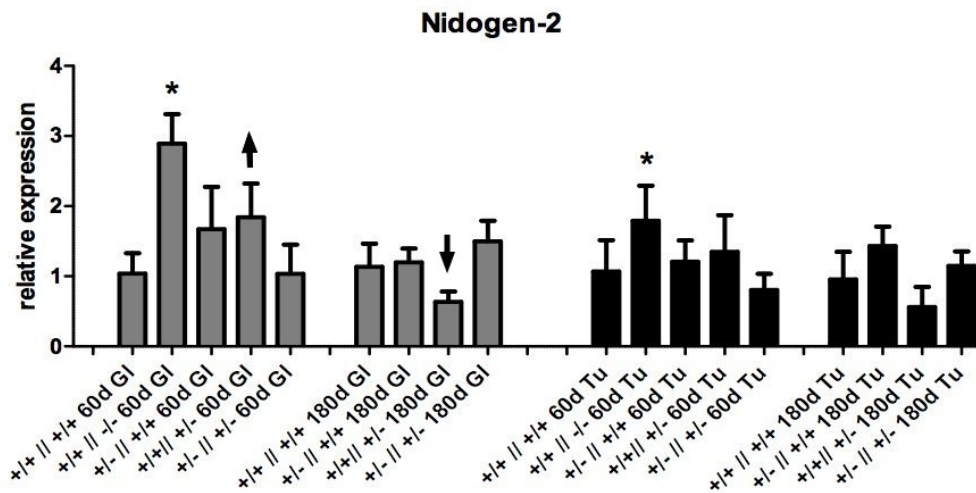


Abbildung 8: Relative Expression von Nidogen-2 im Glomerulus bei *Nphs2*//*COL4A3* +/+//+/+ 60d Gf=1 (grau) und im Tubulus bei +/+//+/+ 60d Tu=1 (schwarz) mit Standardabweichung (Fehlerbalken): Signifikant höhere Expression bei +/+//+/-/- 60d gegenüber allen Genotypen in Glomerulus und Tubulus (*) und bei +/+//+/-/- 60d gegenüber +/+//+/+ 60d, +/-//+/-/- 60d und +/+//+/-/- 180d (†) im Glomerulus; signifikant niedrigere Expression bei +/+//+/-/- 180d gegenüber +/+//+/+ 180d und +/-//+/-/- 180d im Glomerulus (‡) ; (d=Tag; Gf=Glomerulus; Tu=Tubulus)

4 Diskussion

4.1 Aufgabenstellung bei den Untersuchungen

Grundlage für die Untersuchungen waren heterozygote Carrier (Mutter und Tochter) aus einer Familie mit X-chromosomal vererbten Alport-Syndrom, die bei gleichzeitigem Podocin R229Q-Polymorphismus statt der zu erwartenden familiären benignen Hämaturie ein schweres Krankheitsbild mit früh auftretender Proteinurie und terminalem Nierenversagen entwickelten. Dieser ungewöhnlich schwere Krankheitsverlauf lässt vermuten, dass zusätzliche, den glomerulären Filter betreffende Mutationen den Phänotyp Kollagen IV-assoziiierter Nierenerkrankungen beeinflussen können. Zur besseren Kenntnis der molekularen Zusammenhänge zwischen den Podozyten, der Basal- und der Schlitzmembran ist eine genaue Analyse der einzelnen Bestandteile notwendig. Diese Arbeit widmet sich Nidogen-2, welches als Verbindungsprotein zwischen den strukturgebenden Netzen aus Lamininen und Kollagen IV essenzieller Bestandteil der glomerulären Basalmembran ist. Gearbeitet wurde mit den Nieren von 60 und 180 Tage alten Mäusen mit $Nphs2^{+/R140Q}/COL4A3^{+/-}$ -Hintergrund. Vergleichend wurden als etablierte Tiermodelle für das Alport-Syndrom und die benigne familiäre Hämaturie 60 Tage alte $COL4A3^{-/-}$ - und $COL4A3^{+/-}$ -Mäuse im Alter von 60 und 180 Tagen untersucht. Als Referenz dienten Wildtypen im Alter von 60 und 180 Tagen.

4.2 Interpretation der Proteinumverteilung im Glomerulus

Beim Alport-Syndrom kommt es durch das Fehlen von Kollagen IV $\alpha3/4/5$ zu strukturellen Veränderungen der Basalmembran, die zum fibrotischen Umbau des gesamten Glomerulus und schließlich zum vollständigen Funktionsverlusts des glomerulären Filters führen.

Zum besseren Verständnis der molekularen Vorgänge ist es wichtig, zu verstehen, ob eine Umverteilung einzelner Bestandteile innerhalb des Glomerulus erfolgt, welche die Podozyten aufgrund ihrer engen Verknüpfung zur glomerulären Basalmembran und der Schlitzmembran in der Pathologie diverser Nierenerkrankungen beeinflussen können. Als Untersuchungsmethode diente zunächst Immunfluoreszenzfärbung, um einen Überblick über die Proteinverteilung zu bekommen. Cosgrove et al. veröffentlichten im Jahr 1996 bereits Ergebnisse zu Immunfluoreszenzfärbungen für Entactin, respektive Nidogen, an Nieren von vier, acht und vierzehn Wochen alten $COL4A3^{-/-}$ -Mäusen (Cosgrove et al. 1996). Da es sich wegen des zum Veröffentlichungszeitpunkt noch unbekanntem Nidogen-2 um seine Isoform Nidogen-1 handeln muss, vervollständigen die für diese Arbeit

durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen die Ergebnisse. Nidogen-2 kommt im gesunden Nierengewebe sowohl im Glomerulus als auch in der mesangialen Matrix vor (Miosge et al. 2000), was sich durch die Färbung bestätigen ließ. Bemerkenswert ist hierbei die verhältnismäßig größere Proteinmenge innerhalb des Mesangiums.

In den Nieren COL4A3-defizienter Mäuse konnte eine verstärkte Anreicherung von Nidogen-2 innerhalb des Mesangiums und der Basalmembran dargestellt werden. Dies entspricht der beschriebenen Akkumulation extrazellulärer Matrixbestandteile im Rahmen des glomerulosklerotischen Umbaus in der Entwicklung des Alport-Syndroms (Gross et al. 2003). Auffällig ist die deutlich verstärkte Anreicherung innerhalb der Basalmembran. Nidogen-2 verfügt über hohe Bindungskapazitäten für die Hauptbestandteile der Extrazellulärmatrix (Kohfeldt et al. 1998). Die konkrete Umverteilung des Proteins vom Mesangium in die Basalmembran könnte daher durch Interaktionen mit Kollagen und Laminin bedingt sein. Die veränderte Umgebung aus Kollagen IV $\alpha 1/1/2$ und Laminin-111 könnte zu einer Funktionsänderung des Nidogens innerhalb der Basalmembran vom Verbindungsmolekül hin zum regenerativ agierenden Protein führen. Diese Hypothese bedarf weiterer Untersuchungen.

Den Glomeruli COL4A3-defizienter Mäuse ähnliche Verteilungsmuster in Glomeruli 180 Tage alter doppelt heterozygoter Fälle lassen vermuten, dass es bei dieser genetischen Konstellation in höherem Alter zu vergleichbaren Phänomenen kommt. Die Änderung der Nephrinteilung ähnelt den 2004 von Roselli et al. beschriebenen unregelmäßigen, von der Basalmembran entfernten Fluoreszenzmustern von Nephtrin in 10 Tage alten $Nphs2^{-/-}$ -Mäusen (Roselli et al. 2004).

Obwohl Fälle mit benigner familiärer Hämaturie bekannt sind, die sekundär eine fokal segmentale Sklerose entwickelten, konnten bezüglich Nidogen-2 weder bei 60 noch bei 180 Tage alten COL4A3^{+/-}-Mäusen veränderte Fluoreszenzmuster festgestellt werden. In diesem bereits 2006 von Beirowski et al. beschriebenen Mausmodell waren leichte glomerulosklerotische Veränderungen allerdings auch erst bei 12 Monate alten Tieren nachweisbar (Beirowski et al. 2006). Um eine Umverteilung auszuschließen, wäre die Untersuchung älterer Mäuse erforderlich.

Die bei gleichzeitiger heterozygoter Podocinmutation schon im Alter von 180 Tagen beobachtete Proteinumverteilung bestärkt die Vermutung, dass ein Polymorphismus in $Nphs2$ Triggerfaktor für morphologische Veränderungen des glomerulären Filters sein könnte. Da Zhang et al. an Nierengeweben von $Nphs2$ -Patienten keine Änderung der Nidogenverteilung feststellen konnten, ist davon auszugehen, dass eine alleinige Mutation des Schlitzmembranproteins nicht die Verteilung des Proteins beeinflusst (Zhang et al. 2004).

4.3 Einfluss der untersuchten Genotypen auf die Proteinmenge unter Berücksichtigung der ultrastrukturellen Veränderungen

Die dargestellte Umverteilung des Proteins und die Änderung der Signalstärke legten eine Quantifizierung der Beobachtungen durch Immunogoldmarkierung nahe. Gleichzeitig war mithilfe des Elektronenmikroskops die Beurteilung der Ultrastruktur möglich. Der Nachweis von Nidogen-2 in Glomerulus, Mesangium und Tubulus entspricht der von Miosge et al. beschriebenen Verteilung innerhalb der Niere (Miosge et al. 2000). Das Protein wird als Biomarker für das Ovarialkarzinom diskutiert und ist physiologischer Bestandteil des Serums (Kuk et al. 2010). Die deutliche Markierung innerhalb des Blutraums war daher zu erwarten.

Die bei COL4A3^{-/-}-Mäusen beschriebenen Veränderungen entsprechen der in der Literatur ausführlich sowohl für Biopsien aus Patientennieren als auch der für das Mausmodell diskutierten Histologie (Heidet und Gubler 2009, Cosgrove et al. 1996). Für 180 Tage alte doppelt heterozygote Mäuse wurde bereits in einer vorangegangenen Dissertation architektonische Veränderungen des glomerulären Filters mit verschmolzenen Podozytenfußfortsätzen beschrieben (Grönemeyer 2011). Im Gegensatz dazu führen isoliert auftretende COL4A3^{+/-}-Mutationen zu keinen ultrastrukturell erkennbaren Veränderungen (Beirowski et al. 2006). Bezüglich Nidogen-2 konnten außer für doppelt heterozygote 60 Tage alte Mäuse keine signifikanten Unterschiede der Proteinmenge gegenüber Alport-Mäusen nachgewiesen werden. Dieses zu den lichtmikroskopisch beobachteten Veränderungen widersprüchlich erscheinende Ergebnis könnte durch die für das Alport-Syndrom typische stark variierende Breite und den fibrotischen Umbau der Basalmembran bedingt sein. Der als Vergleichsgröße dienende Logarithmus $\ln(K/L)$ ist daher nur eingeschränkt verwendbar.

Für 12 Monate alte COL4A3^{+/-}-Mäuse wurde von Beirowski et al. eine signifikante Verschmälerung der Basalmembran beschrieben (Beirowski et al. 2006). Um die Vergleichbarkeit der Proteinmenge von 180 Tage alten Wildtypen und doppelt heterozygoten Mäusen zu objektivieren, wurde die Breite der Basalmembran in den für diese Arbeit verwendeten Aufnahmen sporadisch überprüft. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es bei 180 Tage alten doppelt heterozygoten Mäusen ebenfalls zu der beschriebenen Ausdünnung kommt. Da sich auch bei Berücksichtigung dieser, von Beirowski et al. analysierten Größe keine signifikanten Unterschiede zeigten, ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % davon auszugehen, dass es zu keinen Änderungen der Proteinmenge kommt (Beirowski et al. 2006). Die tatsächliche Menge an Nidogen-2 scheint daher bei der genetischen Konstellation in diesem Stadium nicht beeinflusst zu sein. Um eine Aussage diesbezüglich

für das klassische Alport-Syndrom treffen zu können, wären genauere Untersuchungen nötig. Eine Möglichkeit könnte das bei Suleiman et al. beschriebene STORM Mikroskopieverfahren darstellen (Suleiman et al. 2013). Da im Alter von 180 Tagen bei doppelt heterozygoten Mäusen auch nur dezente Hinweise für die Schädigung der Filtrationsbarriere erkennbar waren, wäre es außerdem notwendig, Gewebeproben älterer Tiere mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium zu untersuchen.

4.4 Beurteilung der Genexpression und Rückschlüsse auf die Funktion von Nidogen-2

Zur relativen Quantifizierung auf mRNA-Ebene und zur Objektivierung der elektronenmikroskopischen Ergebnisse unabhängig von der divergierenden Basalmembranmorphologie wurde die real-time PCR durchgeführt. Die deutlich höhere mRNA-Menge bei Alport-Mäusen im Vergleich zu den übrigen Genotypen ist kongruent zu der in den Immunfluoreszenzfärbungen festgestellte gesteigerte Signalstärke für Nidogen-2 innerhalb der Basalmembran. Abweichend von der hier diskutierten Erhöhung beschreiben Heidet et al. eine unveränderte Expression von Entactin bei $COL4A3^{-/-}$ -Mäusen (Heidet und Gubler 2009). Da aber keine Unterscheidung der beiden Isoformen Nidogen-1 und -2 getroffen wurde, stehen die Ergebnisse nicht im Widerspruch zueinander. Die Resultate dieser Arbeit sind vielmehr als Ergänzung anzusehen.

Die Steigerung der Expression könnte durch die allgemeinen Überexpression von Matrixbestandteilen bei Glomerulosklerose erklärbar sein. Eine gesteigerte Expression von Nidogen-2 wurde auch bei fortgeschrittener Kniegelenks-Arthrose nachgewiesen. Sie wird in diesem Kontext mit Reparaturmechanismen assoziiert (Krügel et al. 2008). Die erhöhte mRNA-Menge könnte daher auch in der Pathophysiologie des Alport-Syndroms auf regenerative Funktionen des Proteins hinweisen.

Bei $COL4A3^{+/-}$ -Mäusen war bei 60 Tage alten Fällen ein Anstieg der Nidogen-2-mRNA zu beobachten. Die beschriebene Abnahme der expressionellen Aktivität im Alter von 180 Tagen könnte eventuell durch temporären Ausgleich der Veränderungen erklärbar sein. Interessant wäre die Bestimmung der mRNA-Menge bei weiter fortschreitendem Krankheitsverlauf.

Bei doppelt heterozygoten Mäusen blieb ein Anstieg der mRNA aus. Gleichzeitig konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen eine Umverteilung des Proteins innerhalb des Glomerulus beobachtet werden. Eventuell beeinflusst die Schädigung der Schlitzmembran die expressionelle Aktivität der Podozyten. Hieraus ergibt sich ein weiterer Hinweis auf das Zusammenspiel von Podozyten, Schlitz- und Basalmembran. Falls Nidogen-2 tatsäch-

lich eine regenerative Funktion zum Erhalt der extrazellulären Matrix haben sollte, wäre die unveränderte Proteinmenge ein Grund für den ungewöhnlich schweren Phänotyp bei dieser Konstellation.

4.5 Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik und den Ergebnissen

Um die Funktion von Nidogen-2 bei COL4A3-Heterozygotie und gleichzeitigem Nphs2-Polymorphismus mit dessen Rolle in der Entwicklung des Alport-Syndroms zu vergleichen, wurden Mäuse mit Nphs2^{+/R140Q}//COL4A3^{+/-}-Hintergrund im Alter von 60 und 180 Tagen neben dem für das Alport-Syndrom etablierten COL4A3^{-/-}-Mausmodell (Cosgrove et al. 1996) untersucht. Die 60 Tage alten COL4A3-Knock-outs zeigten dabei das vollständige klinische Bild der Nephropathie. Für heterozygote COL4A3-Mutationen bei der benignen familiären Hämaturie ist ebenfalls ein Modell mit COL4A3^{+/-}-Mäusen bekannt (Beirowski et al. 2006). Hierbei werden erste leichte morphologische Veränderungen für 12 Monate alte Tiere beschrieben. Bei gleichzeitigem Nphs2-Polymorphismus wurden anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen für 180 Tage alte Tiere erste Lösungen der Podozytenfußfortsätze als Zeichen für beginnende Schädigung nachgewiesen (Grönemeyer 2011). Die durch Immunfluoreszenz festgestellte Umverteilung von Nidogen-2 ist ein Hinweis auf eine Beteiligung des Proteins. Um eine sichere Vergleichbarkeit zum Alport-Modell herzustellen, wäre es allerdings notwendig, doppelt heterozygote Fälle mit komplett ausgeprägtem Phänotyp in höherem Lebensalter zu analysieren. Falls sich auch bei älteren Tieren kein vollständiges Krankheitsbild einstellen sollte, könnte die durch einen induzierten Hypertonus forcierte Schädigung der Niere zur Beeinträchtigung von Nidogen-2 als Verbindungsprotein und somit zur Erstellung eines äquivalenten Phänotyps beitragen.

Nur eingeschränkt verwendbar sind die quantitativen Daten der Immunogoldmarkierung. Hierbei diente als Vergleichsgröße der $\ln(K/L)$. Die Breite der Basalmembran und die schwerwiegenden morphologischen Veränderungen der Basalmembran im Rahmen des Alport-Syndroms wurden jedoch nicht berücksichtigt. Die in Abschnitt 4.3 erläuterte, nachträglich durchgeführte Schätzung der Proteinmenge bei hypothetisch geringerer Basalmembranbreite bedarf weiterer statistisch relevanter Daten. Die stark abschnittsweise schwankende Breite der Basalmembran und die progressive Fibrose bei COL4A3-Defizienz erschweren allgemein die Vergleichbarkeit von Alport-Fällen mit den übrigen Genotypen. Mithilfe von Immunfluoreszenz und real-time PCR lassen sich hingegen eindeutige Aussagen treffen.

5 Zusammenfassung

Beim Alport-Syndrom führen Mutationen in einer α -Kette des Kollagen IV zu hämorrhagischer Nephritis, Innenohrschwerhörigkeit und Augenschädigungen. Patienten entwickeln frühzeitig ein terminales Nierenversagen. COL4A3 betreffende Mutationen werden autosomal rezessiv vererbt und führen homozygot zum vollständigen klinischen Bild. Da Fälle bekannt sind, die bei COL4A3 +/- und zusätzlichem Podocin R229Q-Polymorphismus einen ungewöhnlich schweren Krankheitsverlauf entwickelten, wird vermutet, dass der Polymorphismus ein Triggerfaktor für die Entwicklung der Nephropathie sein könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, ist eine Analyse aller molekularen Bestandteile des glomerulären Filters, bestehend aus Basalmembran, Podozyten und Endothel, notwendig.

Für diese Doktorarbeit wurde Nidogen-2 auf Protein- und mRNA-Ebene in der Basalmembran von Mäusen mit $Nphs2^{+/R140Q} // COL4A3^{+/-}$, $COL4A3^{-/-}$ und $COL4A3^{+/-}$ -Hintergrund sowie bei Wildtypen untersucht. Das Verbindungsprotein ist die zweite Isoform der Nidogene und Bestandteil der glomerulären Basalmembran. Im Glomerulus wird es hauptsächlich von den Podozyten exprimiert. Nidogen-2 wurde im Jahr 1998 erstmals in der Literatur erwähnt und im Vergleich zu Nidogen-1 verhältnismäßig spät als zweite Isoform der Nidogene bekannt. Eine kompensatorische Funktion von Nidogen-1, sowie Reparaturmechanismen im Knorpelgewebe bei Osteoarthrose werden diskutiert. In vielen Publikationen zum Alport-Syndrom und weiteren Kollagen IV-assoziierten Erkrankungen wird nur Nidogen-1 analysiert oder keine Unterscheidung der beiden Isoformen getroffen. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation beziehen sich daher nicht nur auf die zu diskutierende Fragestellung, sondern ergänzen bereits bekannte Daten und geben weiteren Aufschluss über die allgemeine Rolle von Nidogen-2.

Für einen lichtmikroskopischen Überblick wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Hier konnte bei 180 Tage alten $Nphs2^{+/R140Q} // COL4A3^{+/-}$ -Mäusen eine im Vergleich zum Wildtyp tendenziell gesteigerte Anreicherung von Nidogen-2 in der glomerulären Schlinge gezeigt werden. Das Fluoreszenzmuster ähnelte dem von COL4A3-Knock-outs. Bei diesen konnte gegenüber Wildtypen eine stärkere Anreicherung von Nidogen-2 in der glomerulären Basalmembran festgestellt werden. Während bei Wildtypen die Signalstärke im Mesangium deutlich größer als in der Basalmembran war, war bei $COL4A3^{-/-}$ -Fällen eine tendenzielle Umverteilung vom Mesangium in die glomeruläre Schlinge und zusätzlich die Anreicherung in Bereichen mit ausgeprägter Glomerulosklerose zu beobachten. Die Färbungen von $COL4A3^{+/-}$ -Nieren hingegen stellten sich unauffällig dar.

Elektronenmikroskopisch imponierte bei COL4A3^{-/-}-Nieren die typische Histologie des Alport-Syndroms. Bei 180 Tage alten doppelt heterozygoten Mäusen konnten Verschmelzungen der Podozytenfüße als erste Hinweise für beginnende Veränderungen dargestellt werden. Bezüglich Nidogen-2 wurde durch quantitative Auswertung der Immunogoldmarkierung nur zwischen Alport-Mäusen und 60 Tage alten Nphs2^{+/R140Q}//COL4A3^{+/-}-Fällen ein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge festgestellt.

Mithilfe von quantitativer real-time PCR zeigte sich in der relativen Quantifizierung eine signifikante Steigerung der Expression von Nidogen-2 bei Alport-Mäusen gegenüber allen anderen untersuchten Genotypen sowohl im Glomerulus als auch im Tubulus. Nieren von COL4A3^{+/-}-Mäusen wiesen nach signifikanter Steigerung der Expression im Alter von 60 Tagen einen signifikanten Abfall nach 180 Tagen auf. Die Schwankungen in der Genexpression könnten ähnlich wie im Knorpel auf die Reparaturfunktion des Proteins hinweisen. Bei doppelt heterozygoten Mäusen kam es in keinem Alter zu einer Änderung der mRNA-Menge. Dies könnte auf die stärkere Beeinträchtigung der Podozyten durch den Polymorphismus zurückzuführen sein. Bei COL4A3^{+/-}-Hintergrund und zusätzlichem Nphs2^{+/R140Q}-Polymorphismus war ähnlich wie beim Alport-Syndrom eine Umverteilung von Nidogen-2 im Glomerulus festzustellen. Eine Erhöhung der Genexpression, die für COL4A3^{-/-}-Mäuse gegenüber Wildtypen gezeigt wurde, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Da die Ergebnisse der Untersuchungen an Nphs2^{+/R140Q}//COL4A3^{+/-}-Mäusen sich stark von denen für isolierte Col4A3-heterozygote unterschieden, ist davon auszugehen, dass der Polymorphismus das Basalmembranprotein zusätzlich beeinflusst. Anhand von Nidogen-2 ergeben sich daher weitere Hinweise, dass eine Mutation in Nphs2 ein ungewöhnlich schweres, dem Alport-Syndrom ähnliches Krankheitsbild bei COL4A3^{+/-}-Hintergrund verursachen könnte. Im Hinblick auf die Integrität des gesamten glomerulären Filters ließ sich durch die Analyse des Nidogens zeigen, dass Mutationen innerhalb der Schlitzmembran Einfluss auf die Basalmembran nehmen. Für das Verständnis und die Therapie von hereditären Erkrankungen der glomerulären Basalmembran sind daher die Interaktionen zwischen Podozyten, der Schlitz- und der Basalmembran zu berücksichtigen.

6 Anhang

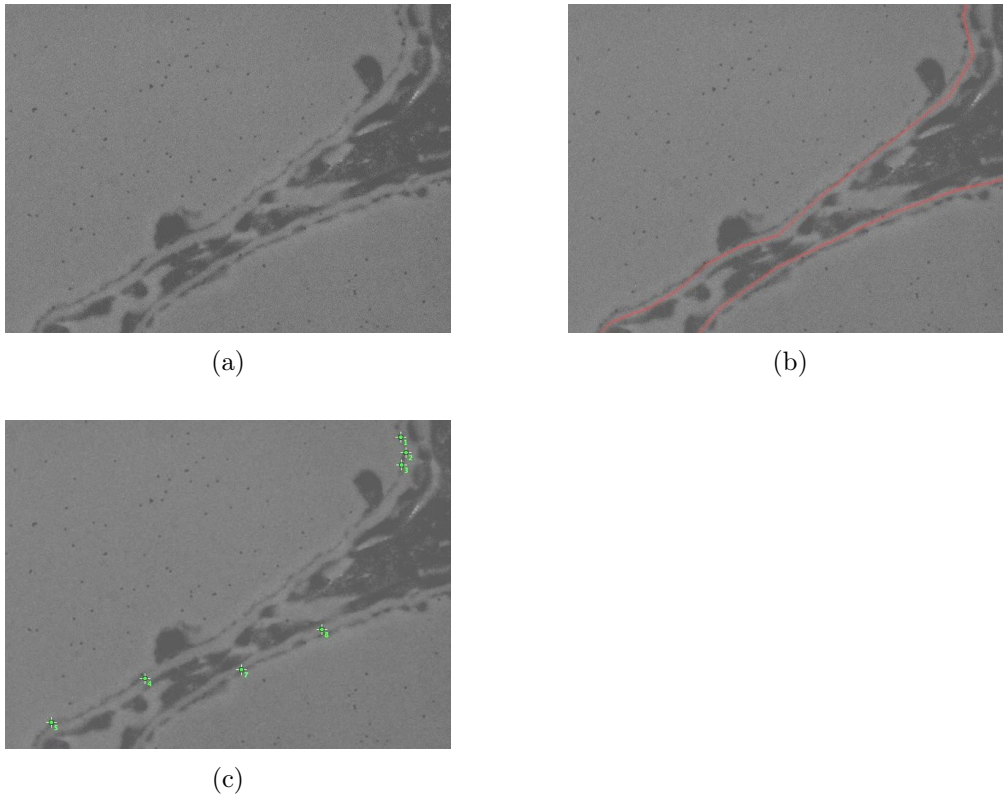


Abbildung 9: Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen Immunogoldmarkierung mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ, Wildtyp 60 Tage, glomeruläre Basalmembran (a), Markierung der Basalmembran (b), Zählung der Goldpartikel (c); $1 \text{ cm} \hat{=} 0,8 \mu\text{m}$

Alter	Genotyp (Nphs2//COL4A3)	Maus-Nummer
60d	++//++	497
180d		508
		516
		480
		485
		500
60d	+-//+-	486
180d		491
		492
		465
		503
		504
60d	++//--	5667
		5668
		5686

Tabelle 13: Übersicht: für Immunfluoreszenzfärbung verwendete Mäuse, d=Tage

Alter	Genotyp (Nphs2//COL4A3)	Maus-Nummer
60d	++//++	968
180d		325
		324
		61
		69
		79
60d	+-//+/-	295
180d		1038
		1054
		19
		99
		340
60d	++//--	1504
		340
		1038

Tabelle 14: Übersicht: für Immunogoldmarkierung verwendete Mäuse, d=Tage

Alter	Genotyp (Nphs2//COL4A3)	Maus-Nummer
60d	++//++	427
180d		430
		448
		380
		391
		392
403		
60d	+-//+-	424
180d		426
		431
		432
		406
		407
419		
60d	++//--	5652
		5653
		5655
60d	++//+-	420
180d		425
		429
		409
		410
		413
60d	+-//++	428
180d		433
		435
		436
		378
		379
418		

Tabelle 15: Übersicht: für quantitative real-time PCR verwendete Mäuse, d=Tage

Literatur

- Abrahamson DR (2012): Role of the Podocyte (and Glomerular Endothelium) in Building the GBM. *Semin Nephrol* 32,342–349
- Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, John PL (2009): Cellular Origins of Type IV Collagen Networks in Developing Glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 20,1471–1479
- Bader BL, Smyth N, Nedbal S, Miosge N, Baranowsky A, Mokkapati S, Murshed M, Nischt R (2005): Compound Genetic Ablation of Nidogen 1 and 2 Causes Basement Membrane Defects and Perinatal Lethality in Mice. *Mol Cell Biol* 25,6846–6856
- 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
- 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
- Cosgrove D (2012): Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective. *Pediatr Nephrol* 27,885–890
- Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10,2981–2992
- Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gildroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A (2000): Integrin alpha1beta1 and Transforming Growth Factor-beta1 Play Distinct Roles in Alport Glomerular Pathogenesis and Serve as Dual Targets for Metabolic Therapy. *Am J Pathol* 157,1649–1659
- Gersdorff N, Otto S, Roediger M, Kruegel J, Miosge N (2007): The absence of one or both nidogens does not alter basement membrane composition in adult murine kidney. *Histol Histopathol* 22,1077–1084
- Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and

- reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int* 63,438–446
- Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorner PS, Smyth N, Addicks K, Bloch W (2004): DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int* 66,102–111
- Grönemeyer LL (2011): Die Interaktion zwischen Basalmembran und der Schlitzmembran im COL4A3+/-/NPHS2+/R140Q-Tiermodell. *Med. Diss.* Göttingen 2011
- Gunwar S, Ballester F, Noelken ME, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG (1998): Glomerular Basement Membrane. *J Biol Chem* 273,8767–8775
- Heidet L, Gubler MC (2009): The Renal Lesions of Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 20,1210–1215
- Ho MS, Böse K, Mokkalapati S, Nischt R, Smyth N (2008): Nidogens-Extracellular Matrix Linker Molecules. *Microsc Res Tech* 71,387–395
- Holthöfer H (2007): Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant* 22,2124–2128
- Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, de Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Oliver O, Netzer KO, Flinter F (2003): X-Linked Alport Syndrome: Natural History and Genotype-Phenotype Correlations in Girls and Women Belonging to 195 Families: A "European Community Alport Syndrome Concerted Action" Study. *J Am Soc Nephrol* 14,2603–2610
- Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG (1997): Isoform Switching of Type IV Collagen Is Developmentally Arrested In X-Linked Alport Syndrome Leading to Increased Susceptibility of Renal Basement Membranes to Endoproteolysis. *J Clin Invest* 99,2470–2478
- Kohfeldt E, Sasaki T, Göhring W, Timpl R (1998): Nidogen-2: A New Basement Membrane Protein with Diverse Binding Properties. *J Mol Biol* 282,99–109
- Kruegel J, Miosge N (2010): Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 67,2879–2895

- Kruegel J, Sadowski B, Miosge N (2008): Nidogen-1 and Nidogen-2 in Healthy Human Cartilage and Late-Stage Osteoarthritis Cartilage. *Arthritis and rheumatism* 58,1422–1432
- Kruegel J, Rubel D, Gross O (2013): Alport syndrome-insights from basic and clinical research. *Nat Rev Nephrol* 9,170–178
- Kuk C, Gunawardana CG, Soosaipillai A, Kobayashi H, Li L, Zheng Y, Diamandis E (2010): Nidogen-2:A New Serum Biomarker for Ovarian Cancer. *Clin Biochem* 43,355–361
- Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ (2014): The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5,160
- Machuca E, Hummel A, Nevo F, Dantal J, Martinez F, Al-Sabban E, Baudouin V, Abel L, Grünfeld JP, Antiganc C (2009): Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int* 75,727–735
- Malone AF, Phelan PJ, Hall G, Cetincelik U, Homstad A, Alonso A, Jiang R, Lindsey T, Wu G, Sparks MA (2014): Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familiar focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 86,1253–1259
- Miner JH (1999a): Alport Syndrome with Diffuse Leiomyomatosis When and When not? . *Am J Pathol* 154,1633–1635
- Miner JH (1999b): Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56,2016–2024
- Miner JH (2012): The Glomerular Basement Membrane. *Exp Cell Res* 318,973–978
- Miner JH (2014): Pathology versus molecular genetics: (re)defining the spectrum of Alport syndrome. *Kidney Int* 86,1081–1083
- Miner JH, Sanes JR (1996): Molecular and Functional Defects in Kidneys of Mice Lacking Collagen alpha 3(IV): Implications for Alport Syndrome. *J Cell Biol* 135,1403–1413
- Miosge N, Köther F, Heinemann S, Kohfeldt E, Herken R, Timpl R (2000): Ultrastructural colocalization of nidogen-1 and nidogen-2 with laminin-1 in murine kidney basement membrane. *Histochem Cell Biol* 113,115–124
- Miosge N, Sasaki T, Timpl R (2002): Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol* 21,611–621,

- Murshed M, Smyth N, Miosge N, Karolat J, Krieg T, Paulsson M, Nischt R (2000): The Absence of Nidogen 1 Does Not Affect Murine Basement Membrane Formation. *Mol Cell Biol* 20,7007–7012
- Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2003): Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol Rev* 83,253–307
- Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P (2000): The Glomerular Slit Diaphragm Is a Modified Adherens Junction. *J Am Soc Nephrol* 11,1–8
- Rodewald R, Karnovsky MJ (1974): Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60,423–433
- Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gluber MC, 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 MC, Antignac C (2004): Early Glomerular Filtration Defect and Severe Renal Disease in Podocin-Deficient Mice. *Mol Cell Biol* 24,550–560
- Rubel D, Frese J, Martin M, Leibnitz A, Girgert R, Miosge N, Eckes B, Müller GA, Gross O (2014): Collagen receptors integrin alpha2beta1 and discoidin domain receptor 1 regulate maturation of the glomerular basement membrane and loss of integrin alpha2beta1 delays kidney fibrosis in COL4A3 knockout mice. *Matrix Biol.* 34,13–21
- Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K (1999): Nephin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96,7962–7967
- Salmivirta K, Talts JF, Olsson M, Sasaki T, Timpl R, Ekblom P (2002): Binding of Mouse Nidogen-2 to Basement Membrane Components and Cells and Its Expression in Embryonic and Adult Tissues Suggest Complementary Functions of the Two Nidogens. *Exp Cell Res* 279,188–201
- Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG (1990): The Tight Junction Protein ZO-1 Is Concentrated Along Slit Diaphragms of the Glomerular Epithelium. *J Cell Biol* 111,1255–1263
- Schymeinsky J, Nedbal S, Miosge N, Pöschl E, Rao C, Beier DR, Skarnes WC, Timpl R, Bader BL (2002): Gene Structure and Functional Analysis of the Mouse Nidogen-2

- Gene: Nidogen-2 Is Not Essential for Basement Membrane Formation in Mice. *Mol Cell Biol* 22,6820–6830
- St John PL, Abrahamson DR (2001): Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int* 60,1037–1046
- Suleiman H, Zhang L, Roth R, Heuser JE, Miner JH, Shaw AS, Dani A (2013): Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *Elife* 2
- Toblli JE, Bevione P, Di Gennaro F, Madalena L, Cao G, Angerosa M (2012): Understanding the Mechanism of Proteinuria: Therapeutic Implications. *Int J Nephrol* 2012,546039
- Tzu J, Marinkovich MP (2008): Bridging structure with function: Structural, regulatory, and developmental role of Laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 40,199–214
- Zhang S, Marlier A, Gribouval O, Gilbert T, Heidet L, Antignac C, MC Gubler (2004): In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephrotic patients with NPHS2 mutation. *Kidney Int* 66,945–954

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Gross für seine hilfreichen Kommentare und bei Dr. Jenny Frese für die leidenschaftliche Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und die Betreuung meiner Dissertation bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Christina Stanischa insbesondere für die Durchführung der Immunfluoreszenzen und der real-time PCR, aber auch für die schöne Zeit im Labor, und meinen Mitdoktoranden, mit denen ich in freundschaftlicher Atmosphäre zusammengearbeitet habe. Bedanken möchte ich mich auch bei Julian Eckhardt, Michael Götte und Farhad Omid, die mich mit ihrem technischen Verständnis unterstützt haben.

Lebenslauf

Am 25. Januar 1990 wurde ich als Tochter von Dr. med. Ingeborg Eick-Prinz und Dr. med. Werner Prinz in Wolfhagen geboren. Von 1996 bis 2000 besuchte ich die Grundschule in Wolfhagen. Danach wechselte ich an den gymnasialen Zweig der Wilhelm-Filchner-Gesamtschule Wolfhagen. Im Jahr 2006 setzte ich meine schulische Ausbildung an der Jacob-Grimm-Schule, Oberstufengymnasium, in Kassel fort. Dort legte ich 2009 mein Abitur ab. Im Wintersemester 2009/2010 nahm ich für zwei Semester das Musikstudium mit Hauptfach Fagott an der Musikhochschule Würzburg auf. Parallel dazu begann ich im Sommersemester 2010 das Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Im März 2012 absolvierte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum). Danach setzte ich im Sommersemester 2012 mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen fort. Im Sommersemester 2012 begann ich unter der Leitung von Prof. Dr. med. Oliver Gross und der Betreuung durch Dr. med. Jenny Frese die experimentelle Arbeit im Rahmen meiner Dissertation in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen (Leitung Prof. Dr. med. G. A. Müller). Neben meinem Studium arbeitete ich von Januar 2014 bis Februar 2016 als studentische Hilfskraft in der Klinik für Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Georg-August-Universität Göttingen. Im April 2015 habe ich den schriftlichen Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung abgelegt. Den mündlich-praktischen Teil werde ich voraussichtlich im Wintersemester 2016 nach Beendigung des Praktischen Jahres absolvieren.