

Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Rolf Stahl

**Die anti-Podozyten-Nephritis:
Ein neues immunologisch-vermitteltes Mausmodell**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Jan Christian Wahlefeld
aus Bremen
Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 15.05.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. F. Thaiss

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. H. Heinzer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Dr. J.-M. Pollok

Meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
Arbeitshypothese und Fragestellung	6
1. Einleitung	
1.1. Das akute Nierenversagen	7
1.2. Der Podozyt	8
1.3. Tiermodelle mit podozytärer Schädigung	13
2. Material	
2.1. Herstellung des Antikörpers und Immunisierung der Mäuse	18
2.1.1. Herstellung des Antikörpers	18
2.1.2. Behandlung der Versuchstiere	18
2.1.3. Gewinnung von Mausurin zur Analyse	18
2.1.4. Organentnahme	19
2.2. Zellen	19
2.3. Verwendete Antikörper	20
2.4. Verwendete Primer	22
3. Methoden	
3.1. Zellen	25
3.1.1. Zellkultur	25
3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
3.2. Proteinbiochemie	26
3.2.1. Eindimensionale SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	26
3.2.2. Standardproteine für die Gelelektrophorese	27
3.2.3. Auftrennung von Proteinen	27
3.2.3.1. Probenvorbereitung	27
3.2.3.2. Auftrennen der Proben	28
3.2.4. Färbung von Proteingelen	28
3.2.5. Western Blot	29
3.2.6. Immunoblot	29
3.3. Molekularbiologie	30
3.3.1. Isolierung von RNA	30
3.3.2. Bestimmung der RNA Konzentration	31
3.3.3. RT-PCR	31
3.3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
3.3.5. Agarosegelelektrophorese	33
3.4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	33

3.5. Histologie	34
3.5.1. Allgemeines	34
3.5.1.1. Prinzip der Immunhistologie	34
3.5.1.2. Streptavidin-Biotin-Komplex	35
3.5.1.3. Neufuchsin Entwicklungslösung	35
3.5.1.4. Hämalan Kernfärbung nach Böhmer	36
3.5.1.5. Probenvorbereitung	36
3.5.1.6. Auswertung	36
3.5.2. PAS-Färbung	37
3.5.3. F4/80-Färbung	37
3.5.4. CD3-Färbung	38
3.5.5. WT1-Färbung	39
3.5.6. B220-Färbung	39
3.5.7. Zellzählung von CD3- und B220-positiven Zellen	40
3.5.8. Kollagen Typ IV-Färbung	40
3.5.9. Färbung des glatt-muskulären Aktins	40
3.5.10. Anti-Podozyten-Antikörperfärbung von Gewebeschnitten	41
3.5.11. IgG-, IgM- und anti-Podozyten-Antikörper- Immunfluoreszenzfärbung	42
3.5.12. Immunhistologische Färbungen an fixierten Podozyten	42
3.5.12.1. Probenvorbereitung	42
3.5.12.2. Fixieren der Zellen	42
3.5.12.3. Synaptopodin-, Podocin- und Nephrintfärbung in Podozyten	43
3.5.12.4. Elektronenmikroskopie	43
4. Ergebnisse	
4.1. Auswahl der verwendeten Podozyten	44
4.2. Untersuchungen des hergestellten anti-Podozyten-Antikörpers	47
4.3. Ergebnisse der Urinuntersuchungen	49
4.3.1. Qualitative Untersuchungen	49
4.3.2. Ergebnisse der ELISA Untersuchungen der Mausurine	52
4.3.3. Western Blot gegen im Urin enthaltene Immunglobuline	52
4.3.4. Western Blot gegen im Urin enthaltenes Podocalyxin	53
4.4. Ergebnisse der Proteinexpressionsuntersuchungen	54
4.5. Ergebnisse der PCR	58

4.6.	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	60
4.6.1.	PAS-Färbung	60
4.6.2.	Ergebnisse der anti-Podozyten-Antikörperfärbung in der Immunfluoreszenz und in Gewebeschnitten	62
4.6.3.	Ergebnisse der IgG- und IgM-Färbungen	64
4.6.4.	Ergebnisse der Immunzellfärbungen	67
4.6.4.1.	Ergebnisse der B220-Färbung	67
4.6.4.2.	Ergebnisse der CD3-Färbung	68
4.6.4.3.	Ergebnisse der F4/80-Färbung	70
4.6.5.	Ergebnisse der WT1-Färbung	71
4.6.6.	Ergebnisse der Färbungen des glatt-muskulären Aktins und des Kollagens Typ IV	73
4.6.7.	Ergebnisse der Elektronenmikroskopie	75
5.	Diskussion	76
6.	Zusammenfassung	93
7.	Literaturverzeichnis	94
	Lebenslauf	103
	Danksagung	104
	Eidesstattliche Versicherung	105

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APN	anti-Podozyten-Nephritis; in den Abb. als Abkürzung für Versuchstiere gebraucht
BSA	Rinderserumalbumin
BCIP	5 - Bromo - 4 - chloro - 3 - indoxyphosphat
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cDNA	kodierende DNA
D, kD	Dalton, Kilo - Dalton
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-MEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMF	N, N´ - Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylen - diamin - tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
FITC	Fluoresceineisothiocyanat
g	Gramm
<i>g</i>	<i>gravity</i> / Schwerkraft, universelle Konstante, repräsentiert die Erdanziehungskraft. Die relative Zentrifugalkraft (<i>rcf</i> / <i>relative centrifugal force</i> / <i>g-force</i>) wird in dieser Arbeit als Vielfaches von <i>g</i> angegeben (<i>x g</i>).
GBM	glomeruläre Basalmembran
gen	genomisch
HEPES	4 (2 - Hydroxyethyl) - 1 - piperazinethansulfonsäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G

IgM	Immunglobulin der Klasse M
k	kilo ($\times 10^3$)
Ko	Kontrolle, Kontrolltier
L	Liter
LDS	Lithium Dodecylsulfat
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli ($\times 10^{-3}$)
M	Molarität
MES	Morpholinoethan Sulfonsäure
min	Minute(n)
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i> ; Moloney Mäuse Leukämie Virus
MOPS	Morpholinopropan Sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
n	nano ($\times 10^{-9}$)
NBT	4 - Nitroblautetrazoliniumchlorid
PAN	Puromycin Aminonukleosid Nephritis
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium - dodecyl - sulfat
s	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris - Acetat - EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung + Tween 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
Tris	Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
U	Unit, Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute

Arbeitshypothese und Fragestellung

Das akute Nierenversagen ist von erheblicher klinischer Relevanz. Eine spezifische Therapie der Niere steht bislang nicht zur Verfügung. Zur Entwicklung einer spezifischen Therapie müssen die dem akuten Nierenversagen zugrunde liegenden Pathomechanismen besser verstanden werden. Die glomeruläre Epithelzelle ist entscheidend an der glomerulären Funktion der Primärharnproduktion und Filterung des Blutplasmas beteiligt. Daher sollte ein Modell entwickelt werden, bei dem es zur reproduzierbaren podozytären Schädigung in der Maus kommt. Ein immunvermitteltes Mausmodell mit podozytärer Schädigung gibt es bisher nicht. Für dieses Mausmodell wurde ein polyklonaler Antikörper gegen murine Podozyten in Kaninchen hergestellt, der dann in Mäusen, denen diese Antikörper injiziert wurden, einen Nierenschaden hervorrief. Ziel der Arbeit ist es, dieses neue Modell zu charakterisieren.

1. Einleitung

1.1. Das akute Nierenversagen

Das akute Nierenversagen ist eine Komplikation verschiedener Grunderkrankungen, die zu Minderperfusion der Nieren (prärenales Nierenversagen), direktem Parenchymschaden (renales Nierenversagen) oder Abflussbehinderung des Harnes (postrenales Nierenversagen) führen. Während das akute prä- und postrenale Nierenversagen durch die Beseitigung der Ursache behandelt werden kann, ist bis heute keine spezifische Therapie des direkt hervorgerufenen Nierenversagens bekannt. Dieses wird z.B. durch Immunkomplexe oder Autoimmunschäden, Ischämie und Reperfusion oder Nephrotoxine entlang des Nephrons verursacht [1]. Das morphologische Korrelat ist einerseits eine glomeruläre Läsion mit Verlust der Ultrafiltrationsbarriere, andererseits ein akuter Tubulusschaden mit Verlust der epithelialen Schlussleisten. Dieser führt durch Abrundung und Abschilferung der tubulären Zellen zur Obstruktion des Tubulussystems. Über die dabei aktivierten molekularen Mechanismen ist wenig bekannt. Das pathophysiologische Korrelat der beeinträchtigten glomerulären Filtrationseinheit ist die Proteinurie [2]. Betroffen von den Schäden sind vor allem glomeruläre Epithelzellen, Podozyten und Mesangialzellen. Podozyten verlieren und verplumpen ihre Fußfortsätze und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an. Diese Veränderungen führen zu einem Verlust der Filtrationsbarriere zwischen den Fußfortsätzen [3].

Das akute Nierenversagen ist von erheblicher volkswirtschaftlicher Bedeutung. Es ist häufig: Etwa 5% aller Krankenhauseinweisungen und 30% aller Einweisungen auf eine Intensivstation werden durch das akute Nierenversagen kompliziert [4]. Außerdem ist das akute Nierenversagen teuer: Es ist die kostenintensivste urologische und nephrologische Erkrankung. Die Kosten für die Behandlung des akuten Nierenversagens werden in den USA auf über 1 Milliarde Dollar jährlich geschätzt [3, 5]. Letztlich ist das akute Nierenversagen häufig tödlich: Die Mortalität beträgt auf Intensivstationen trotz der Fortschritte der Intensivmedizin auch heute zwischen 50-80% [6-10].

Eine suffiziente Therapie des akuten Nierenversagens ist außerdem von großer Bedeutung für die Verminderung der Progredienz zur terminalen Niereninsuffizienz. Die terminale Niereninsuffizienz mit Nierenersatztherapie stellt mit einer Prävalenz von über 30.000 Patienten einen erheblichen ökonomischen Faktor dar. Die Kosten

der Nierenersatztherapie belaufen sich auf ca. 1,75 Milliarden Euro pro Jahr in Deutschland und steigen rapide mit zunehmendem Alter der Bevölkerung. Der progressive Untergang von funktionsfähigem Nierengewebe mit irreversibler Abnahme des Glomerulusfiltrats ist in der Regel bedingt durch den Untergang der glomerulären Filtrationseinheit, der nachgeschalteten tubulären Rückresorptionseinheit als auch durch fibrotische Schädigung der Nierengefäße.

Trotz der volkswirtschaftlichen Bedeutung des chronischen Nierenversagens ist ähnlich dem akuten Nierenversagen nur wenig über die intrazelluläre Signaltransduktion bekannt und keine kausale Therapie verfügbar.

1.2. Der Podozyt

Podozyten sind Teil der glomerulären Filtrationsbarriere der Nieren. Das gesamte Blutvolumen des Menschen zirkuliert mehrmals stündlich durch das Kapillarschlingenkonvolut der Glomeruli. Die Kapillaren werden von einem fenestrierten Endothel gebildet, das von einer glomerulären Basalmembran (GBM) umgeben wird. Die Podozyten sitzen von außen der GBM auf und bilden so die viszerale Begrenzung zum Bowman'schen Raum, der die gefilterten Blutbestandteile aufnimmt. Zusammen mit den fenestrierten Endothelzellen und der GBM bilden sie einen hochselektiven hydrostatischen Filter [11-13]. Podozyten sind hochdifferenzierte Zellen mit einer komplexen Morphologie. Sie können in drei funktionell und strukturell unterschiedliche Segmente eingeteilt werden - den Zellkörper, den Primär- oder Hauptfortsätzen und den Sekundär- oder Fußfortsätzen. Die Primärfortsätze gehen vom Zellkörper aus, teilen sich weiter und enden in den sekundären Fußfortsätzen. Fußfortsätze benachbarter Podozyten greifen fingerförmig ineinander und bilden eine spezielle Art des Zellkontaktes, die sogenannte Schlitzmembran. Diese Bauweise ermöglicht es ihnen, die Kapillarschlingen vollständig zu umschließen [11-14]. Eine intakte Filtrationsbarriere ist ein wichtiges Element der normalen Nierenfunktion. Heute geht man davon aus, dass der Podozyt mit seinen Fußfortsätzen und der dazwischen liegenden Schlitzmembran den bedeutendsten Anteil an der Funktion dieser glomerulären Filtrationsbarriere hat [3]. Ein Versagen dieser Filtrationsbarriere führt zu dem Leitsymptom der Proteinurie [15].

Abbildung 1 zeigt eine funktionelle Aufteilung der Podozyten in vier Domänen. Man unterscheidet eine luminale oder apikale Seite, eine basale Zellseite, die zwischen

diesen beiden liegende Schlitzmembran und eine zytosolische Domäne.

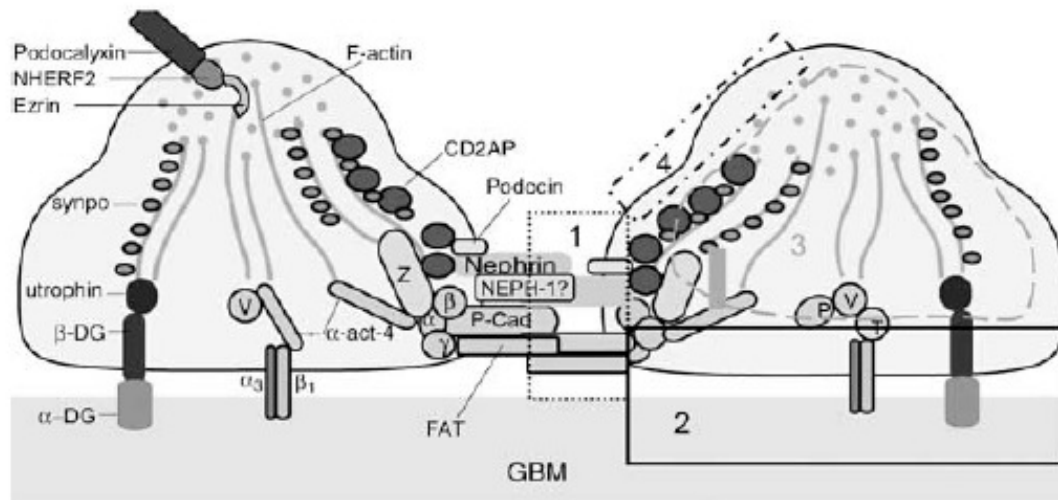


Abbildung 1: molekulare Anatomie der podozytären Fußfortsätze (vereinfachtes Schema). Die Felder 1 – 4 bezeichnen folgende Domänen der Zelle: 1 Schlitzmembran, 2 basale Domäne und GBM, 3 Aktin Zytoskelett und zytosolische Domäne, 4 apikale Plasmadomäne mit Glykokalix. α -act-4, α -Aktinin-4; $\alpha3\beta1$, $\alpha3\beta1$ Integrin; α -DG, α -Dystroglykan; β -DG, β -Dystroglykan; NHERF², Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2; P-Cad, P-Cadherin; P, Paxillin; Synpo, Synaptopodin; T, Talin; V, Vinkulin; Quelle: [15, 16]

Die **Schlitzmembran**, zuerst 1974 von Rodewald und Karnovsky beschrieben [17], besteht aus einem Komplex aus mehreren transmembranären Proteinen, die in den Extrazellulärraum reichen, benachbarte Fußfortsätze verbinden und eine Länge von 30-40 nm haben. Sie ist frei permeabel für Wasser und kleinste gelöste Teilchen [3]. Die Entdeckung podozytärer Proteine wie Nephrin [18, 19], FAT [20], P-Cadherin [21], Podocin [22, 23], CD2AP [24-26], ZO-1 [27] und NEPH1 [28] und ihrer Mutationsanalysen hat die wichtige Rolle der Schlitzmembran und ihrer assoziierten Proteine zur Aufrechterhaltung der normalen Nierenfunktion unterstrichen. Ein Defekt oder Fehlen einiger dieser Proteine kann zu einem Nephrotischen Syndrom führen. Als Nephrotisches Syndrom bezeichnet man einen Symptomkomplex, der bei primären oder sekundären Nierenerkrankungen auftreten kann. Leitsymptome sind große Proteinurie (>3,5g/24 Stunden), Dysproteinämie mit Abnahme des Plasmaalbumins (<2,5g/dl), Hyperlipidämie und als Folge dessen Ödeme und Hyperkoagulabilität [29].

Das Protein Nephrin ist ein 180 kDa großes transmembranäres Protein, das in der Niere nur auf reifen Podozyten exprimiert wird. Es wird von dem Gen NPHS1 kodiert. Mutationen dieses Genes führen zu einem Nephrotischen Syndrom vom Finnischen

Typ. Auch die Injektion eines Antikörpers, der die extrazelluläre Domäne von Nephrin erkennt, führt zur schweren Proteinurie [23, 30, 31]. Extrazellulär bilden mehrere Nephrinmoleküle lipidlösliche Oligomere [28]. Nephrin ist über CD2AP mit dem Aktin des Zytoskeletts assoziiert [3].

CD2 assoziiertes Protein (AP) ist ein 80 kDa großes intrazelluläres Protein, das am NH₂-Terminus eine Bindungsstelle für Aktin besitzt. Im Glomerulus ist CD2AP nur in Podozyten exprimiert. Ein Fehlen von CD2AP führt zu Proteinurie und Nierenversagen [3]. CD2AP kann außer mit Nephrin [25] und Aktin [32] auch mit Podocin [23] interagieren [15].

Podocin ist ein 42 kDa großes transmembranäres Protein mit zytosolischem NH₂- und COOH-Terminus. Es bildet extrazellulär eine Haarnadelstruktur und interagiert mit CD2AP und Nephrin. Podocin bildet lipidlösliche Oligomere [15]. Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen des Podocin kodierenden Gens NPHS2 können bei den Betroffenen zu steroid-resistentem Nephrotischen Syndrom führen [22, 33, 34].

FAT ist ein 512 kDa großes Protein aus der Familie der Cadherine mit 34 extrazellulären Domänen, das im Bereich der Schlitzmembran lokalisiert ist. Fehlt FAT, kann dies bei Mäusen zu einem Verlust der Filtrationsschlitze und zur Fusion der Fußfortsätze führen [20, 35].

Obwohl Podozyten die Merkmale der verbundenen Epithelzellkomplexe verloren haben, gibt es im Bereich der Schlitzmembran das Protein Zonula Occludens 1 (ZO-1), das normalerweise im Bereich von Schlussleisten im Epithelzellverband vorkommt. ZO-1, ein 225 kDa großes Protein aus der Familie der membran-assoziierten Guanylatkinasen, interagiert mit dem Aktin-Zytoskelett und man nimmt an, dass es sich an Signalkaskaden durch Tyrosin-Phosphorylierung beteiligt [27, 36]. ZO-1 scheint außerdem eine Rolle bei der zytoskelettalen Regulation der Schlitzmembran zu spielen [21, 37, 38].

NEPH1 ist ein transmembranäres Protein mit 5 extrazellulären Immunglobulin ähnlichen Domänen. Homozygote *Knockout*-Mäuse zeigen eine Auflösung der Fußfortsätze. NEPH1 ist innerhalb der Schlitzmembran lokalisiert und interagiert mit Nephrin [3, 14]. Man geht heute davon aus, dass die Schlitzmembran eine modifizierte Zonula adherens ist [21].

Die Podozyten liegen mit ihrer **basalen Seite** direkt der GBM an. Die podozytären Fußfortsätze sind in den Bestandteilen der GBM wie Kollagen IV, Fibronectin oder

Laminin über Integrine [39] und α - und β -Dystroglykane [40, 41] verankert. Zellkörper und Primärfortsätze sind normalerweise nicht direkt mit der GBM verbunden [21].

Obwohl auch andere Integrine auf Podozyten beschrieben sind, ist $\alpha_3\beta_1$ -Integrin das von Podozyten hauptsächlich gebildete Integrin [14]. Mäuse mit einem *Knockout* des $\alpha_3\beta_1$ -Integrin Gens haben die Fähigkeit verloren Fußfortsätze zu bilden und versterben wenige Stunden nach ihrer Geburt an den Folgen der glomerulären Dysfunktion [42]. Eine Blockade des Integrin-Bindungsareals führt ebenso zur Auflösung der Fortsätze, Proteinurie und Ablösung der Podozyten von der GBM [39, 43-45]. Dystroglykane kommen in Podozyten nur an ihrer basalen Seite vor. Die Expression von Dystroglykanen korreliert in Tiermodellen umgekehrt mit dem Schweregrad der Proteinurie und ist in der Glomerulonephritis mit Minimal-Läsionen beim Menschen vermindert [40, 41]. Dystroglykane sind über Utrophin, Integrine und über α -Aktinine mit dem Aktin-Zytoskelett der Podozyten verbunden [15]. Die Funktion von α -Aktinin besteht wahrscheinlich in einer Querverbindung von Aktinfilamenten. Eine autosomal-dominant vererbte Mutation des ACTN4 Genes, das α -Aktinin 4 kodiert, führt zu einer kongenitalen Form der fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) [46]. Die FSGS ist eine fokale und segmentale Glomerulonephritis, die von den Podozyten ausgeht. Dabei kommt es zu einer mesangialen Verbreiterung und Sklerose in einigen Glomeruli.

Das Zytosol des Zellkörpers enthält in der Regel einen prominenten Nukleus, einen ausgeprägten Golgi-Apparat, reichlich glattes und raues endoplasmatisches Retikulum und viele Mitochondrien, wohingegen die Fußfortsätze nur wenige Zellorganellen enthalten. Die hohe Dichte an Organellen macht die Leistungsfähigkeit der Zellen deutlich. Viele Bestandteile der GBM werden von den Podozyten gebildet [3]

Die spezifische Gestalt des Podozyten wird durch die Ausbildung eines speziellen Zytoskeletts möglich. Im Zellkörper und den primären Fortsätzen dominieren Mikrotubuli und intermediäre Filamente sowie Desmin und Vimentin, Aktin, α -Aktinin 4 und Synaptopodin. In den Sekundärfortsätzen kommen Mikrotubuli sowie ein dichtes Netz von Aktinfilamenten unterhalb der Zellmembran vor. Zusammen mit Myosin 2, α -Aktinin 4, Vinkulin und Talin bilden sie ein kontraktiles Netzwerk [14, 47-50]. Das auf Aktin basierende Zytoskelett unterliegt einer Umorganisation bei Vorliegen eines Nephrotischen Syndroms [15].

Die Rho G-Protein Familie ist ein wichtiger Bestandteil der zytoskelettalen Morphologie und Adhäsion der Zellen [14]. Mäuse, denen das Rho-regulierende Protein Rho-GDI α fehlt, entwickeln massive Proteinurie. Daher nimmt man an, dass die Rho Familie wichtig ist für die Aufrechterhaltung der Fußfortsätze [51].

Ein wichtiges Regulationsprotein des Podozyten ist WT1. Im Erwachsenenalter ist die Expression ausschließlich in Podozyten zu finden [52]. WT1 hat das PAX2 Gen als Ziel, das einen Transkriptionsfaktor kodiert. Bei hoher WT1 Expression ist der PAX2-Transkriptionsfaktor herunterreguliert. Eine Überexpression von PAX2 führt zu multiplen Fehlern der Podozyten [53], wie zum Beispiel zu einem Bild der diffusen mesangialen Sklerose und zum Denys-Drash- und Frasier Syndrom [15, 54, 55].

An der **luminalen Seite**, die in den Bowman'schen Raum hineinreicht, sind die Podozyten mit einer stark entwickelten Glykokalix überzogen. Diese Glykokalix besteht aus sialysierten Glykoproteinen und sulfatierten Molekülen. Sie trägt zur negativen Ladung der Filtrationsbarriere bei und wird hauptsächlich durch das 140 kD große stark sialysierte Glykoprotein Podocalyxin gebildet. Podocalyxin wird von glomerulären Endothelzellen und von Podozyten gebildet und fügt sich während der Entwicklung der Nieren in die luminaire Domäne der Podozyten ein. Podocalyxin trägt zur Ausprägung und Aufrechterhaltung der Fußfortsätze und der charakteristischen Form der Podozyten bei. Außerdem verhindert Podocalyxin das Anlagern von Parietalzellen des Bowman'schen Raumes an Podozyten [47, 50, 56-58]. Die intrazelluläre Domäne von Podocalyxin bildet mit dem Na⁺/H⁺ Austauscher NHERF2 und dem Protein Ezrin einen Komplex und ist so mit dem filamentösen Aktin Zytoskelett verbunden [3]. Mäuse mit einem *Knockout* des Podocalyxingenes bilden unnatürliche glomeruläre Strukturen mit abgelösten Podozyten [59].

Ein anderes transmembranäres Protein der luminalen Membran ist das glomeruläre Epithel Protein 1 (GLEPP-1), dessen genaue Funktion noch nicht bekannt ist. GLEPP-1 ist eine Tyrosin-Phosphatase. Man nimmt an, dass GLEPP-1 eine Rolle bei der Regulation des glomerulären Filtrationsdrucks durch eine Beeinflussung der podozytären Struktur und Funktion spielt. Außerdem wird eine mögliche Rezeptorfunktion diskutiert [60, 61].

Bezogen auf die Podozyten können Störungen in jeder der vier oben beschriebenen Domänen zu einem Nephrotischen Syndrom führen. Nach einem Nierenschaden haben reife Podozyten im Gegensatz zu Mesangial- und glomerulären

Endothelzellen nicht die Möglichkeit zur Proliferation. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Podozyten in die Mitosephase übergehen können, dass es sogar zur Polyploidie oder zur Kernteilung kommen kann, ihnen aber die Fähigkeit zur finalen Zellteilung fehlt. Die Podozyten haben durch diese fehlende Teilungsfähigkeit nicht die Möglichkeit auf Verlust von Zellen durch Apoptose oder Ablösung adäquat zu reagieren. Dies kann zu einer Progression von glomerulären Schäden führen [3, 16, 62, 63].

Da die zugrunde liegenden Pathomechanismen nur teilweise oder gar nicht verstanden sind, ist es von entscheidender Bedeutung, ein Tiermodell zu entwickeln, das die genauere Erforschung der zur Krankheit führenden Ursachen und der sich abspielenden Mechanismen ermöglicht.

1.3. Tiermodelle mit podozytärer Schädigung

Bis heute gibt es eine Reihe von experimentell induzierten Tiermodellen des akuten Nierenschadens. Hier sollen besonders die Modelle mit podozytärer Schädigung und Proteinurie besprochen werden. Es gibt immunologische, toxische und genetische Modelle.

Das bekannteste **immunologische** Modell einer experimentell induzierten Glomerulonephritis ist die Heyman Nephritis der Ratte. Man unterscheidet ein aktives und ein passives Modell. Die aktive Heyman Nephritis (HN) wird durch Immunisierung von Ratten mit Extrakten aus Nierenrinde ausgelöst. Die passive HN wird durch Injektion heterologer Antiseren in Ratten ausgelöst. Diese Antiseren wurden z.B. in Schafen oder Kaninchen gegen bestimmte Extrakte aus Rattennieren (Fx1A oder RTEa₅ [64]) hergestellt. In beiden Varianten kommt es zur Ausbildung von typischen Immundepots in der GBM und zur massiven Proteinurie. Durch die weitere Erforschung dieses Modells konnten viele pathophysiologische Zusammenhänge verstanden werden, insbesondere konnte ein Antigen entdeckt werden, gegen das die gebildeten Antikörper teilweise banden - das 512 kDa große Glykoprotein Megalin, einem Protein mit vielfältigen Funktionen. Außerdem erlangte man Erkenntnisse über die Entstehung von Immundepots und warum diese nicht von den Podozyten phagozytiert werden, über das Mitwirken der Komplementkaskade und über die Wirkung von reaktiven Sauerstoff Spezies an dieser Glomerulonephritis. Dieses Modell hat den Nachteil, dass es nur in der Ratte funktioniert. Ratten exprimieren Megalin unter anderem an der gesamten Oberfläche der Podozyten -

Maus, Hund und Mensch tun dies nicht [65-69].

Als ein weiteres immunologisches Modell wurde die Injektion eines monoklonalen Nephrin-Antikörpers beschrieben, der die extrazelluläre Domäne von Nephrin erkennt. Die Injektion dieses Antikörpers führt in der Ratte zur Proteinurie [70]. Es kommt zur Umverteilung von Nephrin und ZO-1. Überraschenderweise konnten jedoch keine strukturellen Veränderungen der Filtrationsbarriere entdeckt werden [31, 71, 72].

Ein weiteres immunologisches Modell ist das Aminopeptidase A Modell. In diesem Mausmodell wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Aminopeptidase A hergestellt, einer Hydrolase, die auch in der murinen Niere vorkommt. Dieser Antikörper band in der Niere von Balb/c Mäusen an das 140 kD große Protein Aminopeptidase A. Dieses Protein wird in Teilen des proximalen Tubulus, in den Membranen der Podozyten und in Zellen des juxtaglomerulären Apparates exprimiert. Es kam nach einer einzigen intravenösen Applikation zu einer dosisabhängigen Proteinurie mit Ausbildung einer membranösen Glomerulonephritis innerhalb von 24 Stunden [73].

Ein neues immunologisches Modell der podozytären Schädigung ist das Thy-1.1 Nephritis Modell der Maus. Thy-1.1 ist ein Protein, das auf Mesangialzellen der Ratte, nicht der Maus vorkommt und dort nach Gabe eines monoklonalen anti-Thy-1.1 Antikörpers eine mesangioproliferative Glomerulonephritis auslöst. In dem Modell der Arbeitsgruppe von Smeets et al. wurde ein transgenerischer Mausstamm entwickelt, der das Thy-1.1 Protein auf der Oberfläche von Mauspodozyten exprimiert. Die Injektion des anti-Thy-1.1 Antikörpers löst eine schwere Proteinurie aus, die mit einer schweren Schädigung der Podozyten und einer Reduktion der podozytären Fußfortsätze einhergeht. Nach drei Wochen zeigen die Versuchstiere in diesem Modell eine FSGS, deren Schwere mit der Dosis des eingesetzten Antikörpers korreliert [74].

Ein gut untersuchtes Modell der **toxischen** Glomerulonephritis mit Proteinurie ist das Puromycin Aminonukleosid Nephritis (PAN) Modell der Ratte. Bei diesem Modell wurde den Versuchstieren das Aminonukleosid Puromycin verabreicht. Es gibt die verschiedensten Schemata zu dieser Verabreichung, intraperitoneal oder intravenös, einmalige oder mehrfach wiederholte Gabe, mit oder ohne Nierenablation oder unilateraler Nephrektomie. Das ist der Grund, warum dieses Modell in der Entstehungsgeschwindigkeit und Ausprägung des Nierenschadens sehr heterogen

ist. Bei einer häufig benutzten Variante mit einmaliger intravenöser Applikation kommt es zu einer frühen nephrotischen Phase mit einem Maximum am Tag 10 mit Ähnlichkeit zur Glomerulonephritis mit Minimal-Läsionen. Später nimmt die Proteinurie ab. Es kommt zu beginnender Sklerose und in Woche 18 nach Injektion zeigt sich in 15% der Glomeruli das Bild einer FSGS. Dieses Modell lässt sich durch die Applikationsart, die Applikationshäufigkeit und die unilaterale Nephrektomie noch beschleunigen [75-78].

Die ersten Effekte der Puromycininjektionen scheinen sich am Podozyten abzuspielen. Unter Zellkulturbedingungen kommt es zu morphologischen Veränderungen dieser Zellen und zur direkten Zelltoxizität [79]. Auch hier kommt es zur verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies über das Xanthin/Xanthin-Oxidasesystem wie zum Beispiel H_2O_2 [80, 81], die zur Entwicklung der Proteinurie beitragen. Es kommt weiterhin zur Reduktion der Expression von α -3 Integrin. Dies führt zur Ablösung von podozytären Fußfortsätzen von der GBM. Außerdem kommt es zur Expressionsabnahme der Proteine Nephrin und Podoplanin [82, 83] und zur Unterbrechung der Interaktion des Podocalyxin/NHERF2/Ezrin Komplexes mit dem Aktin-Zytoskelett. Letzteres führt ebenfalls zu einer drastischen Abnahme der ausgebildeten Fußfortsätze [58]. Es kommt zu einem Verlust der negativen Ladungen der Podozyten [3]. Gleiche Veränderungen an Rattennieren wie mit Puromycin Aminoglykosiden konnten auch mit dem Zytostatikum Adriamycin erreicht werden. Das PAN Modell wurde auch in der Maus untersucht. Obwohl die meisten Rattenarten Puromycin und Adriamycin Aminoglykosiden gegenüber empfindlich waren und eine Nephritis entwickelten, zeigte nur der Mausstamm Balb/c ein Ansprechen auf das Toxin Adriamycin, auf Puromycin reagierten die Tiere nicht. Die Balb/c-Mäuse entwickelten Proteinurie, FSGS und tubulointerstitielle Fibrose [84-87].

Eine weitere Möglichkeit eine toxische Schädigung von Podozyten hervorzurufen, ist die Behandlung der Tiere mit dem Polykation Protaminsulfat. Generell kommt es zu ähnlichen Veränderungen in der Niere wie bei der PAN. Eine wesentliche Rolle bei diesem Modell spielt die Ladung des Moleküls. Durch die Infusion des Polykations Protaminsulfat scheinen die oberflächlichen negativen Ladungen der Podozyten neutralisiert zu werden. Bei Polyanionen oder neutral geladenen Teilchen können diese Veränderungen an der Niere nicht beobachtet werden [88]. Diese Neutralisation der Oberflächenladungen resultiert aus einer Unterbrechung des intakten NHERF2/Ezrin Komplexes mit der intrazellulären Domäne von

Podocalyxin [58]. Es bilden sich im Bereich der Schlitzmembran Zonula occludentes aus [73]. Die morphologischen Änderungen der Podozyten sind von einem Anstieg der Tyrosin Phosphatasen begleitet - es kommt zum Anstieg von phosphorylierten Proteinen, vor allem von ZO-1 entlang der umformierten Schlitzmembran [3, 89, 90]. Weiterhin kommt es zu einer Abnahme der Aktinfilamente und einer Reduktion und Umorganisation von Kontakten der Podozyten mit der GBM, was in einer Ablösung der Fußfortsätze endet [11].

Genetische Modelle sind häufig *Knockout*-Modelle, bei denen ein Gen ausgeschaltet wird, das ein bestimmtes Protein kodiert. Bei dem *Knockout*-Modell für CD2AP kommt es zu einem angeborenen Nephrotischen Syndrom mit beginnender Auflösung der Fußfortsätze in der ersten Woche und Proteinurie ab der zweiten Woche [26, 86]. Der *Knockout* des Gens NPHS1, das Nephrin kodiert, führt ebenfalls zu Proteinurie und teilweiser Ablösung der Fußfortsätze [15, 30, 91]. Auch für Podocin existiert ein solches *Knockout*-Modell, bei dem das Gen NPHS2 ausgeschaltet ist. Die Mäuse sind nicht in der Lage Podocin zu produzieren. Es entsteht eine Proteinurie und die Tiere versterben einige Tage nach ihrer Geburt an den Folgen der glomerulären Dysfunktion [92]. Die Nieren zeigen in diesem Modell eine massive mesangiale Sklerose. Weiterhin gibt es ein *Knockout*-Mausmodell für das LMX1B Gen, das einen Lim Transkriptionsfaktor kodiert. Diese Mäuse haben abnormale Podozyten und Schlitzmembranen - die Expression von CD2AP und Podocin ist vermindert. Andere podozytäre Gene wie Nephrin, Synaptopodin, ZO-1 und $\alpha 3$ Integrine sind nicht betroffen [86, 93]. Für α -Aktinin existiert ein *Knockin*-Modell, das die humane autosomal-dominante Mutation des ACTN4 Gens im Mausmodell untersuchbar macht. Die betroffenen Mäuse erkranken ähnlich dem Menschen an einer primären FSGS [94].

Im Sommer 2005 veröffentlichte eine japanische Arbeitsgruppe ein neues Modell mit einem transgenen Mausstamm, der selektiv auf Podozyten humanes CD25 exprimiert. Die Injektion eines Immunotoxins, das an den humanen CD25 Rezeptor bindet, führt bei diesen Mäusen zu einem Verlust der podozytären Fußfortsätze mit Proteinurie, Aszites und Ödemen [95].

Aus der Einleitung wird ersichtlich, dass es eine Reihe von unterschiedlichen Tiermodellen gibt. Einige von ihnen sind ausführlich untersucht worden und haben wertvolle Erkenntnisse über Pathomechanismen bei humanen Erkrankungen geliefert. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es kein immunologisch-vermitteltes Mausmodell

mit podozytärer Schädigung. Da der Podozyt eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression von verschiedenen Nierenerkrankungen spielt und möglicherweise von Autoantikörpern gegen Aktin oder ATP-Synthase in der Glomerulonephritis mit Minimal-Läsionen oder der idiopathischen FSGS attackiert wird [96], ist die Entwicklung eines immunologisch induzierten Mausmodells mit podozytärer Schädigung notwendig. In dem hier beschriebenen Modell der Antikörpervermittelten Schädigung wurden verschiedene funktionelle, histologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um die Pathogenese der podozytären Schädigung zu charakterisieren. Untersucht wurden besonders podozytäre Strukturproteine und Signalproteine, die an einer zytoskelettalen Umbaureaktion der podozytären Fußfortsätze beteiligt sein könnten. Außerdem wurden Entzündungszellen und ihre Botenstoffe charakterisiert, um eine immunvermittelte Entzündungsreaktion nachzuweisen.

2. Material

2.1. Herstellung des Antikörpers und Immunisierung der Mäuse

2.1.1. Herstellung des Antikörpers

Der für dieses immunologische Glomerulonephritis Modell hergestellte Antikörper ist ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen murine Podozytenbestandteile. Hierzu wurde einem Kaninchen ein Gemisch aus 0,5 ml Podozytensuspension an vier Stellen am Rücken subkutan gespritzt. Zur unspezifischen Anregung des Immunsystems wurde zusätzlich 0,5 ml Hunter`s Titer Max Adjuvant (Fa. Sigma) gespritzt. Diese Immunisierung wurde alle vier Wochen insgesamt dreimal zur Auffrischung und Verstärkung wiederholt. Eine Woche nach der vierten Injektion wurde das Tier durch Dekapitation und Ausbluten getötet. Das gewonnene Vollblut (ca. 80 ml) wurde nach Entfernung des Blutkuchens bei 2000x g 20 min zentrifugiert. Das Serum wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems für eine halbe Stunde auf 56 °C im Wasserbad (Fa. Memmert) erhitzt. Die so entstandenen ca. 25 ml Serum wurden über eine Amiconzelle (Fa. Millipore) auf etwa 12,5 ml konzentriert. Dazu wurde das Serum in ein geschlossenes System auf eine Membran gegeben. Unter der Membran wurde ein Vakuum angelegt. Durch den Unterdruck wurden dem Serum flüssige Bestandteile entzogen, nicht aber größere Moleküle wie Immunglobuline.

2.1.2. Behandlung der Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Mäuse des Stamms C57black. Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus 0,25 ml Kaninchenserum (Fa. Sigma) und 0,25 ml Hunter`s Titer Max Adjuvant subkutan am Rücken vorimmunisiert. Nach fünf Tagen, bzw. in späteren Versuchen nach vier Tagen erhielten die Tiere 0,5 ml des von uns hergestellten anti-Podozytenserums intravenös in die Schwanzvene. Die Kontrollen erhielten bei diesem Immunisierungsschritt anstelle des anti-Podozyten Serums das schon zur Vorimmunisierung verwendete Kaninchenserum.

2.1.3. Gewinnung von Mausurin zur Analyse

Die Mäuse wurden zur Gewinnung von Urin für acht Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt. Der Boden der Käfige bestand aus einer 96-Loch Platte (Fa. Falcon). Die Idee dabei war, dass die Mäuse selten in das gleiche Loch urinieren und koten.

Daher war wenig Urin mit Faeces kontaminiert. Zur Steigerung der Urinmenge wurde den Mäusen zu Beginn 2 ml 0,9% NaCl intraperitoneal gespritzt. Nach Abpipettieren des Urins wurde dieser in vorbereitete 1,5 ml Probengefäße überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.1.4. Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte entweder am Tag 10, 15 oder Tag 17 nach der Immunisierung mit anti-Podozyten Serum durch Professor Dr. F. Thaiss (positives Votum der Ethikkommission FII18/04). Dazu wurden die Tiere nacheinander in eine Äthernarkose (Fa. Riedel de Haen) versetzt, gewogen und fotografiert. Nach Freipräparation der Aorta und Nieren wurde mit einer 1 ml Insulinspritze (Fa. Becton Dickinson, Madrid) und einer Sterican 0,3 Kanüle (Fa. Braun) die Aorta auf Höhe der Bifurcatio aortae punktiert und etwa 0,5 ml Blut durch Aspiration entnommen. Das Blut wurde in ein 1,3 ml Serumprobengefäß für Kinder (Fa. Sarstedt) überführt, während die Kanüle in der Aorta verblieb. Durch diese Kanüle wurden beide Nieren mit 2 ml D-MEM Medium (1000 mg/l Glukose, 110 mg/l Natriumpyruvat, Fa. Gibco mit 2 ml Spritze Fa. Becton Dickinson) gespült. Nach Entfernen der linken Niere wurde diese gedrittelt, in vorbereitete 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Proben dienten später der Gewinnung von Protein und RNA und wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Durch die verbliebene Kanüle wurde die rechte Niere nun mit 1 ml 4% Formalin gespült, entnommen, in zwei Teile geteilt und in mit 4% Formalin gefüllten 1,5 ml Probengefäßen gelagert. Diese Proben wurden für die Histologie und die elektronenmikroskopischen Präparate verwendet. Die Proben für die Histologie wurden nach einem Tag in Formalin bei 4 °C in PBS (Fa. Gibco) gelagert, die Proben für die Elektronenmikroskopie verblieben in Formalin.

Alle durchgeführten Arbeiten waren durch das Votum der Ethikkommission (FII18/04) genehmigt.

2.2. Zellen

Gearbeitet wurde mit Podozyten, die wir als Geschenk von P. Mundel erhielten. Die Zellen wurden von P. Mundel immortalisiert, indem sie eine thermosensible Variante des SV-40 T-Antigens (TsA 58) erhielten. SV-40 T-Antigen ist unter der Kontrolle des H-2K^b-Promotors, dessen Aktivität von γ -Interferon kontrolliert wird. Bei 33 °C und in

Anwesenheit von γ -Interferon wird T-Antigen in der Wildtyp-Konformation exprimiert. Bei 37°C und in Abwesenheit von γ -Interferon ist der H-2K^b-Promotor abgeschaltet, das T-Antigen liegt in der Mutanten Konformation vor [97].

Im Laufe der Experimente erhielten wir eine subklonierte Form der beschriebenen Zellen als Geschenk von P. Endlich, mit der wir ab diesem Zeitpunkt arbeiteten [98]. Die Zellen schienen im Wachstumsverhalten beständiger zu sein als die Zellen von P. Mundel.

2.3. Verwendete Antikörper

primäre Antikörper	Spezies	eingesetzte Verdünnung	Firma
		a) Western Blot b) Immunfluoreszenz c) Imm histochemie	
anti-Actin	Maus monoklonal	a) 1:500	Sigma
anti-Actin, glatt muskuläres, biotinyliert	Maus monoklonal	c) 1:200	NeoMarkers
anti-B220	Ratte monoclonal	c) 1:1000	R&D Systems
anti-B7-1	Ratte monoklonal	a) 1:500 oder 1:1000	R&D Systems
anti-CD3	Hase polyklonal	c) 1:100	Dako Cytomation
anti-Complement C3	Ziege polyklonal	a) 1:500	MP Biomedicals
anti-Ezrin	Maus monoklonal	a) 1:2000	Sigma
anti-F4/80 (MCA497GA)	Ratte polyklonal	a) 1:1000 c) 1:50	Serotec
anti-Kollagen Typ 4	Ziege polyklonal	c) 1:400	Southern Biotech
anti-Nephrin	Meerschwein polyklonal	a) 1:2000 b) 1:50	Progen

anti-Phospho Ezrin (Thr567)/ Radixin (Thr564)/ Moesin	Hase polyklonal	a) 1:1000	Cell Signaling
anti-Phospho-Src Family (Tyr416)	Hase polyklonal	a) 1:1000	Cell Signaling
anti-Podocalyxin	Ratte monoklonal	a) 1:250 b) 1:50	R&D Systems
anti-Podocin (G-20)	Ziege polyklonal	a) 1:400 b) 1:50	Santa Cruz Biotechnology
anti-Rho A	Hase polyklonal	a) 1:200	Santa Cruz Biotechnology
anti-Rock 1	Maus monoklonal	a) 1:250	BD Bioscience
anti-Rock 2	Maus monoklonal	a) 1:100	BD Bioscience
anti-c-Src (N-16): sc-19	Hase polyklonal	a) 1:200	Santa Cruz Biotechnology
anti-Synaptopodin	Maus monoklonal	a) 1:1000 b) 1:50	Progen
anti-TGF- β (V-22)	Hase polyklonal	a) 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
anti-WT1 (C-19)	Hase polyklonal	a) 1:500 b) 1:50	Santa Cruz Biotechnology
sekundäre Antikörper			Firma
Esel anti-Ziege Peroxidase gekoppelt			Jackson
Esel anti-Ziege FITC gekoppelt			Jackson
Esel anti-Ziege Biotin gekoppelt			Jackson
Esel anti-Maus FITC gekoppelt			Jackson
Esel anti-Maus Peroxidase gekoppelt			Jackson
Hase anti-Maus Peroxidase gekoppelt			Jackson

Esel anti-Meerschwein Biotin gekoppelt			Jackson
Esel anti-Meerschwein Peroxidase gekoppelt			Jackson
Esel anti-Hase Peroxidase gekoppelt			Jackson
Esel anti-Hase Cy2 gekoppelt			Jackson
Ziege anti-Hase Peroxidase gekoppelt			Jackson
Esel anti-Ratte Biotin gekoppelt			Jackson
Ziege anti-Ratte Peroxidase gekoppelt			Jackson
Pferd anti-Maus Biotin gekoppelt			Vektor
Pferd anti-Hase Biotin gekoppelt			Vektor

2.4. Verwendete Primer

Primer	Quelle	Sequenz	Amplicon	GenBank
α-actinin-forward	Michaud JASN	tgatcaggatcatgcctcctt	ca. 100 bp	
α-actinin-reverse	2003 May	ggcagctctctccgcagttc	gen: 194 bp	
PCR Bedingungen:	60 °C	30 Zyklen		
B7-1-forward	J.Wahlefeld	tgtatgccaggaaacaggt	173 bp	NM_009855.1
B7-1-reverse		agcccgatcaccactgatta	gen: 173 bp	
PCR Bedingungen:	55 °C, 58 °C	40 Zyklen		
CD2AP-forward	C. Meyer-S.	catctcctactccccaca	307 bp	NM009847
CD2AP-reverse		gaaggagccaaactgcaaag	gen: 307 bp	
PCR Bedingungen:	55 °C, 58 °C, 60 °C	35 Zyklen		
Ezrin-forward	J. Wahlefeld	tcccttgagtgagatcagg	235 bp	NM009510
Ezrin-reverse		agctgcttctggtgcttctc	gen: 4645 bp	
PCR Bedingungen:	55 °C, 58 °C	35-40 Zyklen		

FAK-forward	T. Meyer	tgtacttcggacagcgtgag	238 bp	M95408
FAK-reverse	J. Wahlefeld	ccagatacgcgagtgctgta	gen: 4616 bp	NM007982
PCR Bedingungen:	55°C, 58°C	35-40 Zyklen		
GapDH-forward	U. Butzmann	accacagtccatgccatcac	452 bp	
GapDH-reverse		tccaccaccctgttgctgta	gen: 452 bp	
PCR Bedingungen:	58°C, 55°C, 60°C	30 Zyklen		
ICAM 1-forward	Nagatoya	taagaggactcggatgatgg	549 bp	AF290209
ICAM 1-reverse	KI 2002	atgaggctcgattgttcagc	gen: 549 bp	
PCR Bedingungen:	60°C	35 Zyklen		
IP 10-forward	T. Meyer	cccacgtgttgagatcattg	211 bp	NM021274
IP 10-reverse	J. Wahlefeld	cactgggtaaaggggagtgta	gen: ca. 1200 bp	
PCR Bedingungen:	60°C	35 Zyklen		
MCP1-forward	Nagatoya	agccaactctcactgaagcc	256 bp	AF065930
MCP-reverse	KI 2002	cattcaaagggtgctgaagacc	gen: 1461 bp	
PCR Bedingungen:	60°C	35 Zyklen		
Nephrin-forward	J. Wahlefeld	gttcagctgggagagactgg	191 bp	AF191090
Nephrin-reverse		atcggacaacaagacgaacc	gen: ca. 2700 bp	
PCR Bedingungen:	58°C	35 Zyklen		
NHERF 1-forward	C. Meyer-S.	caaagtgcccctcaccagt	209 bp	NM012030
NHERF 1-reverse		aatgaaccaagatgccaag	gen: 209 bp	
PCR Bedingungen:	58°C, 60°C	35 Zyklen		
NHERF 2-forward	C. Meyer-S.	ctcgagctactcgggtcaac	231 bp	NM023055
NHERF 2-reverse		accagtggaacaagacaagg	gen: 231 bp	
PCR Bedingungen:	58°C, 60°C	35 Zyklen		
Podocalyxin-forward	C. Meyer-S.	cgagaggcagacaggatttc	249 bp	
Podocalyxin-reverse		gccgtaagagcaagtgaagg	gen: 249 bp	
PCR Bedingungen:	55°C	35 Zyklen		
Podocin-forward	C. Meyer-S.	gtgtccaaagccatccagtt	232 bp	NM130456
Podocin-reverse		gtctttgtgcctcagcttcc	gen: 4112 bp	
PCR Bedingungen:	58°C	35 Zyklen		
Podoplanin (gp38p)-forward	Boucherot, 2002	tccaacgagaccaagatgtg	540 bp	
Podoplanin (gp38p)-reverse	NephrolDial Transplantation	agctcttagggcgagaacct	gen: ca. 800 bp	
PCR Bedingungen:	58°C, 60°C	40 Zyklen		

RhoA-forward	Nagatoya 2002	ccagttcccagaggtctatgt	375 bp	
RhoA-reverse	KI 2002	gcgccaatcctgtttgccata	gen: 375 bp	
PCR Bedingungen:	58 °C	30 Zyklen		
RhoC-forward	Nagatoya 2002	cgacatcgaagtggatggcaa	ca. 500 bp	AK011599
RhoC-reverse	KI 2002	gggaagtccagagaatgggaca	gen: 2022 bp	U58494
PCR Bedingungen:	58 °C, 55 °C	30 Zyklen		
ROCK 1-forward	C. Meyer-S.	caaacgcatctcttctcaaaaatg	ca. 100 bp	m U58512
ROCK 1-reverse		aatgtcactactaaatcaggcacaact	gen: 6630 bp	NM009071
PCR Bedingungen:	58 °C	40 Zyklen		
ROCK 2-forward	C. Meyer-S.	aattcactgtgtttctgaagataca	ca. 120 bp	
ROCK 2-reverse		acccatttctccaagtcgta	gen: 1889 bp	
PCR Bedingungen:	58 °C	35 Zyklen		
SRC-forward	J. Wahlefeld	agctgtatgctgtgggtcgcg	179 bp	BC039953
SRC-reverse		cacatagttcatccgctcca	gen: 1616 bp	NM009271
PCR Bedingungen:	55 °C, 58 °C, (60 °)	35-40 Zyklen		
SRF-forward	C. Meyer-S.	ctctcgtgacagcagcacaga	ca. 100 bp	
SRF-reverse		ggtagacagcagcgtcatgatggt	gen: 951 bp	
PCR Bedingungen:	58 °C	35 Zyklen		
Synaptopodin-forward	C. Meyer-S.	ccacggctatctgccagaga	67 bp	AK129267
Synaptopodin-reverse		catctggatggctgctgctt	gen: 67 bp	
PCR Bedingungen:	60 °C	40 Zyklen		
TGFβ-forward	Nagatoya	aagaccatcgacatggagc	580 bp	X53654
TGFβ-reverse	KI 2002	tgtcacaagagcagtgagcg	gen: 8863	
PCR Bedingungen:	58 °C	35 Zyklen		
WT1-forward	C. Meyer-S.	aaggactgagagagaaggttttc	89 bp	
WT1-reverse		aagttttactggaatggtttcaca	gen: 890bp	
PCR Bedingungen:	60 °C	35 Zyklen		

3. Methoden

3.1. Zellen

3.1.1. Zellkultur

Podozyten wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Fa. Sarstedt) gezüchtet. Sie wurden mit 15 ml Nährmedium bedeckt, das aus RPMI 1640 und 10% fötalem Kälberserum, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bestand (alle Fa. Gibco).

Undifferenzierte Podozyten:

Das Medium für die Zellkultivierung der undifferenzierten Zellen enthielt 10 U/ml γ -Interferon. Die Zellen wurden im Zellinkubator (Fa. Heraeus) bei einer Temperatur von 33°C und einem Luft-CO₂-Gehalt von 5% und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einer drei- bis viertägigen Wachstums- und Vermehrungsphase im Zellinkubator wurden die Zellen ausgedünnt. In einer sterilen Zellkulturwerkbank wurde das alte Medium durch Absaugen (Pumpe Laboport, Fa. LNF) abgenommen, die Zellen einmal kurz mit PBS gespült und dann für 10 min mit 3 ml Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) angedaut. Zum Stoppen der Proteolyse wurden 7 ml Nährmedium zugegeben und die suspendierten Zellen je nach gewünschter Konzentration in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Im Allgemeinen wurden 1:5 Verdünnungen hergestellt.

Differenzierte Podozyten:

Die Zellen wurden in Abwesenheit von γ -Interferon bei einer Temperatur von 37°C und einem Luft-CO₂-Gehalt von 7,4% für mindestens 14 Tage ausdifferenziert.

3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Trypsinierte Zellen wurden in 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 2000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge Fa. Heraeus). Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium (Nährmedium + 10% DMSO) pro verwendeter Zellkulturflasche versetzt. Anschließend wurde die Suspension in vorgekühlte Kryoröhrchen (Fa. Nalgene) überführt, 2-3 Tage bei -80°C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer (Fa. Nalgene) eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen für 90 s bei 37°C im Wasserbad erwärmt, der Inhalt in 20 ml Nährmedium überführt und

10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Nährmedium resuspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturschale kultiviert.

3.2. Proteinbiochemie

Die Proteinelektrophorese basiert auf Ionenwanderungen innerhalb eines elektrischen Feldes. Die Proteine haben unterschiedliche Gesamtladungen und unterschiedliche pK-Werte, die abhängig von der Anzahl saurer und basischer Aminosäuren sind. Wird ein geladenes Molekül in ein elektrisches Feld gebracht, so ist die elektrophoretische Beweglichkeit des Moleküls von seiner Größe und Gestalt, der Gesamtnettoladung, dem pH-Wert, der Porengröße des Trägers, der Temperatur, der Ionenstärke des Puffers und von der elektrischen Feldstärke abhängig.

Die Proteintrennung wird meistens in Form eines Gels (Agarose, Polyacrylamid) in einer sogenannten Trägermatrix durchgeführt. Durch die variablen Vernetzungsgrade des Gels entsteht ein Siebeffekt, der die Moleküle sowohl nach ihrer Ladung als auch nach ihrer Größe und Gestalt trennt.

3.2.1. Eindimensionale SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Werden Proteine durch das anionische Detergens SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) geladen, ist eine Auftrennung im elektrischen Feld fast ausschließlich nach dem Molekulargewicht möglich. SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, wodurch die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziiert werden. Durch die Bindung wird eine stark negative Ladung in die denaturierten Polypeptid-Ketten eingeführt. Es entsteht ein Komplex mit nach außen gerichteten negativen Sulfat-Gruppen, d.h. die Anzahl der negativen Ladungen verhält sich proportional zur Proteingröße. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Ladung unterschiedlich schnell von der Kathode zur Anode. Im engporigen Trenngel wirkt zusätzlich der Molekularsiebeffekt, wodurch die Proteine ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Zur erfolgreichen Durchführung einer Gelelektrophorese müssen die Proteinproben in ein Medium gebracht werden, das eine Durchmischung der Proben herabsetzt oder verhindert. Das Medium darf weder mit der Probe reagieren noch die Bewegung der Proteinprobe hemmen. Diese Bedingungen werden von Polyacrylamid-Gelen erfüllt. Das Netzwerk des Gels wird durch radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden

bifunktionellen N, N'-Methylen-Bisacrylamids aufgebaut. Als Radikalstarter werden Ammoniumperoxodisulfat und das tertiäre Amin N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) verwendet. Die Porengröße kann durch das Mengenverhältnis der beiden Komponenten variiert werden. Für unterschiedliche Molekulargewichte können so optimale Trennungsbedingungen geschaffen werden.

3.2.2. Standardproteine für die Elektrophorese

Ein Marker ist ein Gemisch aus hoch- oder niedermolekularen Standardproteinen, deren Molekulargewichte bekannt sind. Er wird bei der Elektrophorese zusätzlich auf das Gel aufgetragen, um den zu detektierenden Proteinen ihr entsprechendes Molekulargewicht zuzuordnen. Dafür wurde der Marker SDS-7B (Fa. Sigma) verwendet. Die Standardproteine werden hier mit einem blauen Farbstoff gekoppelt. Dadurch ändert sich das Molekulargewicht der Proteine. Aus diesem Grund wurde nach jeder Farbstoffkopplung eine erneute Berechnung des Molekulargewichts des jeweiligen Standardproteins durch die Firma Sigma nötig. Das Lyophilisat wurde den Angaben des Herstellers (Fa. Sigma) entsprechend in Harnstofflösung und NuPage 4x LDS Probenpuffer (4x LDS + 0,4 M DTT) aufgelöst, 10 min bei 80 °C erhitzt und in Aliquots bei -20 °C eingefroren.

Molekulargewichte:

α 2 - Makroglobulin, humanes Plasma 190 kD

β - Galaktosidase, E. coli 108 kD

Fruktose - 6 - Phosphat - Kinase, Muskel, Kaninchen, 84 kD

Pyruvat - Kinase, Muskel, Huhn, 67 kD

Fumarase, Herz, Schwein, 55 kD

Laktat - Dehydrokinase, Muskel, Kaninchen, 39 kD

Triosephosphat - Isomerase, Muskel, Kaninchen, 35 kD

3.2.3. Auftrennung von Proteinen

3.2.3.1. Probenvorbereitung

Es wurden unterschiedliche Proben zur Proteinauftrennung verwendet, wie Urin, eukariontische Zellkulturzellen- oder Gewebelysate von Mausnieren. Kultivierte Podozyten und Nierenzellen wurden mit T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Fa. Pierce) und Complete Proteasehemmstoff (Fa. Roche) lysiert. Dazu wurde ein Zellpellet suspensierter Zellen pro 100 μ l Zellvolumen mit 1 ml Lysepuffer versetzt

und die Zellen in Lösung gebracht. Gewebe wurde mit 1 ml Lysepuffer pro 0,1 g Gewebe versetzt und mit einem Pestel mechanisch zerkleinert. Nach fünfzehnminütiger Einwirkzeit auf Eis wurde die Suspension 15 min bei 16100x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt.

Die Urinproben wurden 5 min bei 1000x g zentrifugiert. Alle Proben wurden mit der entsprechenden Menge 4x LDS (NuPage Ladungspuffer + 0,4 M DTT) versetzt und zur vollständigen Denaturierung 10 min bei 80°C erhitzt.

3.2.3.2. Auftrennen der Proben

Für das Auftrennen von Proteinen wurden vorgefertigte, reduzierende 4-12% NuPage Bis-Tris Gradientengele (Fa. Invitrogen) benutzt. Das Gel wurde aus seiner Verpackung genommen und kurz mit Wasser gespült, um Reste des zur Konservierung verwendeten Butylalkohols zu entfernen. Danach wurden die Taschen der Gele mit MOPS oder MES (50 mM MOPS bzw. MES, 50 mM Tris Base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA) Laufpuffer gespült.

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (Fa. PeqLab) eingespannt und diese vollständig mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach Beladen der Taschen wurde über ein Netzgerät (Fa. Biorad) eine Stromstärke von 60 mA pro Gel angelegt. Diese Stromstärke wurde beibehalten, bis die ersten Proteine das untere Ende des Gels erreicht hatten.

3.2.4. Färbung von Proteingelen

Um einen Überblick über den Nierenschaden der behandelten Tiere zu bekommen, wurden Eiweiß-Bestandteile der Urine im SDS-PAGE Gel angefärbt. Hierzu wurde GelCode (Fa. Pierce) verwendet, das auf dem Prinzip der Coomassie-Färbung beruht. Die Coomassie-Färbung zählt zu den unspezifischen Färbemethoden und eignet sich zur Detektion größerer analytischer Proteinmengen (> 0.5 µg).

Im Allgemeinen wurden 20 µl Urin mit 8 µl 4x LDS versetzt und 10 min auf 80°C zum Denaturieren der Proteine erhitzt. Von diesem Gemisch wurden anschließend je 25 µl auf das Gel aufgetragen. Nach vollständiger Auftrennung der Proteine wurde das Gel eine halbe Stunde in Aqua dest. unter mehrmaligem Wechsel gewaschen, bevor es mit GelCode versetzt wurde und bis zur vollständigen Eiweißbindung des Farbstoffes auf dem Schütteltisch (Fa. Fröbel) verblieb. Nach der vollständigen

Färbung wurde zwei Stunden unter mehrmaligem Wasserwechsel entfärbt bis der Hintergrund wieder klar erschien.

3.2.5. Western Blot

Die durch die SDS-PAGE getrennten Proteine wurden aus dem Gel durch elektrophoretischen Transfer im Nass-Verfahren auf eine engporige, positiv geladene, aus PVDF bestehende Trägermembran übertragen (Fa. Amersham). Da die Proteine weiterhin durch SDS negativ aufgeladen sind, wandern sie von der Kathode zur Anode.

Zum Proteintransfer wurde eine Novex Mini Cell (Fa. Invitrogen) verwendet. Der Blot erfolgte im Sandwichverfahren zwischen drei Filterpapieren. Dazu wurde die vor Gebrauch ca. 1 min mit Methanol aktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Gel gebracht, zwischen je drei Watman Papiere gelegt und mit je drei Schwämmen in der Blotting-Apparatur fixiert. Die Fixierung erfolgte so, dass das Gel der Kathodenseite, die Membran der Anodenseite zugewandt war. Die Novex Mini Cell wurde dann mit Blotpuffer (25 mM Tris Base, 0,192 M Glycin, 20% Methanol in Aqua dest.) aufgefüllt. Der Transfer fand bei einer Spannung von 30 Volt und einer Temperatur von 4°C über 1,5 Stunden statt. Nach erfolgreichem Transfer wurde der Blot bei 4°C in TBST (10 mM Tris pH 7,4, 107 mM 5 M NaCl, 0,05% Tween 20) bis zur Weiterarbeit gelagert.

3.2.6. Immunoblot

Beim Immunoblot werden durch Gelelektrophorese getrennte und auf eine Membran transferierte Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Antikörper binden hierbei nicht-kovalent an ihr Antigen.

Die PVDF-Membran wurde nach der Entnahme aus der Transfereinheit mit in TBST gelöstem 5% Magermilchpulver 60 min geblockt. Nach kurzem Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem primären Antikörper (gelöst in Superblock, Fa. Pierce) inkubiert. Die Länge der Inkubationszeit, in der der Antikörper binden kann, richtete sich nach der vermuteten Affinität des Antikörpers und der Menge des zu detektierenden Produkts. Nach Entfernen des primären Antikörpers wurde die Membran in viel Volumen TBST unter viermaligem Wechsel über 40 min gewaschen. Danach wurde der sekundäre, Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper

hinzugegeben. Der Antikörper wurde in 20 ml 5% Magermilchpulver in TBST gelöst. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers waren weitere Waschschrte mit TBST über 40 min und mehrmaligem Pufferwechsel nötig. Alle Schritte erfolgten auf einem Schütteltisch (Fa. Fröbel).

Der Immunkomplex wird mit Hilfe eines Enzymkonjugates sichtbar gemacht. Um den Effekt zu verstärken, erfolgt die Detektion indirekt über markierte „Zweitantikörper“, die gegen den am Antigen gebundenen „Erstantikörper“ gerichtet sind. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Detektion. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Detektion mit ECL SuperSignal (Fa. Pierce). Es basiert auf dem Prinzip der hochsensitiven Chemilumineszenz. Diese basiert darauf, dass die an die Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 Luminol oxidiert. Dabei wird Licht freigesetzt, das nach entsprechender Belichtungszeit in einer Filmkassette einen Röntgenfilm (Fa. Fuji, Fa. Kodak) belichtet. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm in einem Entwicklungsautomaten (Optimax, Fa. Protec). Die Sensitivität des Western Blots liegt in einem Bereich von 10 bis 100 femtoMol. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 50 kD ca. 0,5 bis 5 ng Protein.

3.3. Molekularbiologie

3.3.1. Isolierung von RNA

Für die Extraktion von RNA aus Mausnieren wurde ein RNAeasy Mini Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Dabei werden die selektiven Bindungseigenschaften einer auf Silika-Gel basierenden Membran genutzt. In den speziellen Säulen wurde die Gesamt-RNA an das Gel gebunden und Proteine und DNA in drei aufeinander folgenden Waschschrten abgetrennt. Alle Zentrifugationsschrte erfolgten bei Raumtemperatur und 8000x *g*.

Die gedriittelten Mausnieren wurden nach Abtrennen des Nierenhilus mechanisch mit Skalpell und Pinzetten zerkleinert. Die Nierenstücke wurden dann in einem 1,5 ml Probengefäß mit 600 µl Puffer RLT und 6 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Der Puffer RLT lysierte und homogenisierte das Gewebe. Ein wichtiger Bestandteil des Puffers war das stark denaturierend wirkende Guanidin Isothiocyanat, das ebenfalls vorhandene RNasen sofort inhibierte. Durch weiteres Behandeln mit einem Pestel (Fa. Scienceware) wurden die Gewebestücke zu einem homogenen Brei zerkleinert. Das so gewonnene Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule pipettiert und 2 min

zentrifugiert (Fa. Eppendorf). Der Durchlauf wurde mit 600 µl 70% Ethanol gemischt, um in der Säule gute Bindungskonditionen zu schaffen. Das entstandene Homogenisat wurde auf eine RNAeasy-Säule gegeben und 15 s zentrifugiert. Die enthaltene RNA band in dieser Zeit an die Säule. Nach Zugabe von 700 µl Waschpuffer RW1 wurde wieder 15 s zentrifugiert. Nach Transferieren in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß wurde die Säule zur Entfernung möglicher Kontaminationsreste mit 500 µl RPE-Puffer versetzt und anschließend für 15 s zentrifugiert. Die Säule wurde erneut mit RPE-Puffer gewaschen und diesmal für 2 min zentrifugiert. Zur Elution der gebundenen RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt, 30 bis 50 µl RNase freies Wasser dazu pipettiert und 1 min zentrifugiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

3.3.2. Bestimmung der RNA Konzentration

Zur Überprüfung der Qualität und Quantifizierung der RNA wurde eine fotometrische Messung durchgeführt. Hierzu wurde die RNA mit RNase freiem Wasser 1:50 verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 260$ nm und bei $\lambda = 280$ nm gemessen. Der Quotient der Messung dient als Maß für die Reinheit der RNA. Der Quotient sollte zwischen 1,5 und 1,7 liegen, kleinere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen. Die Konzentrationen errechneten sich aus der Extinktion nach der Formel $40 \mu\text{g/ml} \times \text{Extinktion bei } 260 \text{ nm} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ (Messgerät Fa. Pharmacia, Küvette Fa. Hellma).

3.3.3. RT-PCR

Die aus den Zellen extrahierte Gesamt-RNA wurde in cDNA revers transkribiert, die als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden 2-Schritt-RT-PCR-Reaktionen diente. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe der reversen Transkriptase aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus (=MMLV-RT, Fa. BioLabs), die die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aufweist. Eventuell vorhandene RNasen wurden durch Zusatz eines RNase-Hemmstoffes inaktiviert. Es wurde für jeden Ansatz eine Kontrolle (ohne MMLV-RT) pipettiert.

Zur reversen Transkription wurde 1 µg RNA mit 0,5 µl Oligo dt (0,5 µg/ml) versetzt und mit DEPC Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl gebracht. Oligo dt diente in diesem Ansatz als Primer für die Reaktion. Dieser Ansatz wurde 2 min auf 70 °C

erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, und anschließend für 5 min auf Eis heruntergekühlt. Dies verhinderte die Neubildung der RNA-Sekundärstruktur und ermöglichte die Hybridisierung der Primer. Der Ansatz wurde mit 2,5 µl 10x Puffer (Fa. BioLabs), 2 µl dNTPs (10 mM Fa. Peqlab), 1 µl reverser Transkriptase und 0,5 µl des RNase-Inhibitors RNAsin (Fa. Roche) versetzt. Das Reaktionsvolumen wurde mit DEPC Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Die reverse Transkriptase arbeitete 60 min bei 37°C und wurde anschließend für 5 min bei 94°C hitzeinaktiviert. Nach anschließender Zugabe von 75 µl DEPC Wasser und Mischen erreichte man ein Endvolumen von 100 µl cDNA.

3.3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion, nach dem englischen "**P**olymerase **C**hain **R**eaction" PCR benannt, beruht auf der mehrfachen automatisierten Wiederholung eines Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension zweier zueinander weisender Oligonukleotide, wobei ein definierter Abschnitt eines DNA-Moleküls logarithmisch amplifiziert wird. Erst durch die Entdeckung hitzestabiler DNA-Polymerasen, wie der Taq-DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus*, ist die Automatisierung dieses Vorgangs möglich geworden. Für die PCR wurde in dieser Arbeit immer ein HotStarTaq-DNA-Polymerase-Mix (Fa. Qiagen) verwendet, in dem der Puffer, Taq-Polymerase, dNTPs (200 µM) und MgCl₂ (1,5 mM) enthalten sind. Dieser HotStar-Mix benötigt 15 min bei 94°C zur Aktivierung.

Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgt durch die Wiederholung eines bestimmten Zyklusprofils. Ein Zyklus setzt sich im Allgemeinen aus folgenden Teilschritten zusammen: Durch Erhitzen auf 94°C für 40 s wird die DNA denaturiert. Je nach Annealingtemperatur des Primers wird die Temperatur auf 55°C bis 60°C gesenkt und für 40 s gehalten, damit die Primeroligonukleotide mit der Template-DNA hybridisieren können. Durch Inkubation des Ansatzes bei 72°C für 40 s (etwa 60 s pro 1000 Nukleotide) wird in der Extensionsphase das gewünschte DNA-Fragment durch Verlängerung der Primer hergestellt.

Die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl richtete sich nach dem jeweils verwendeten Primer.

3.3.5. Agarosegelelektrophorese

Nach Ablauf des PCR-Programmes wurden 10-15 µl des Ansatzes mit 2,5 µl Probenpuffer zum Beschweren (50% Sucrose und 0,25% Bromphenolblau) versetzt. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde je nach der Größe der Fragmente mit einem 1,5%- bis 2,0%igen Agarosegel gearbeitet. Dazu wurde Agarose (Fa. Serva) in 30 ml 1x TAE (90 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA) unter Erwärmung aufgelöst. Nach der Abkühlung auf ca. 60°C wurde Ethidium-Bromid mit einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben. Das Gemisch wurde in die Elektrophoresekammer gegossen und bis zur vollständigen Aushärtung abgekühlt. Die Agarose wurde mit 1x TAE bedeckt, mit den Proben beladen und die DNS-Fragmente wurden bei einer Spannung von 100 Volt aufgetrennt (Netzgerät Fa. BioRad). Als Größenmarker wurde eine 100 Basenpaare DNS Leiter (Fa. Invitrogen) benutzt. Die Ethidium-Bromid/DNS-Komplexe wurden mit Hilfe eines UV-Transluminators (Fa. Syngene) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert (Fa. Intas).

3.4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA dient der quantitativen Bestimmung von verschiedenen Inhaltsstoffen aus Proben. Dazu wird ein spezifischer monoklonaler Antikörper an eine 96-Loch-Immunsorbplatte gebunden. Durch Hinzugeben der Probe werden die darin zu detektierenden Bestandteile durch den Antikörper gebunden. Durch einen zweiten, Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper wird durch Zugabe von Peroxidasesubstrat die am ersten Antikörper gebundene Probe durch Farbentwicklung detektiert. Diese Farbreaktion kann fotometrisch erfasst werden.

In dieser Arbeit wurde ein ELISA-Kit (Fa. Bethyl) verwendet. Alle verwendeten Materialien und Reagenzien wurden dem Kit entnommen. Die verwendeten 96-Loch-Flachboden-Platten mussten zunächst mit dem bindenden Erstantikörper versetzt werden. Eine 8-Kanal-Pipette (Fa. Labsystems) wurde verwendet, um möglichst gleiche Mengen des Antikörpers auf den Platten zu erhalten. Dazu wurde der Antikörper (anti-Mausalbumin aus Ziege, Verdünnung 1:100) mit dem Bindungspuffer (0,05 M Carbonat-Bikarbonat pH 9,6) versetzt und auf der Mikrotiterplatte für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abwaschen der nicht gebundenen Reste mit Waschlösung (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0) wurden alle nicht besetzten Bindungsstellen mit Blocklösung (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, pH 8,0) behandelt. Das enthaltene BSA besetzte in der dreißigminütigen

Inkubationszeit die noch freien Bindungsstellen. Wieder folgte ein Waschschrift. Dann wurden die zu untersuchenden verdünnten Urinproben hinzugegeben und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein gründlicher Waschschrift, um nicht gebundenes Albumin zu entfernen. Zu dem so gebundenen Albumin wurde der zweite Antikörper (anti-Mausalbumin aus Ziege, Meerrettichperoxidase gekoppelt 1:20000) hinzugegeben und ebenfalls 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier folgte im Anschluss eine Spülung mit Waschpuffer. Um die gekoppelten Antikörper sichtbar zu machen, wurde das mitgelieferte Enzymsubstratgemisch hinzugegeben und ca. 20 min inkubiert. Die Meerrettichperoxidase setzte dieses Substrat um. Es kam zu einer Farbreaktion proportional zur Anzahl des gebundenen Albumins. Durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure wurde diese Reaktion gestoppt. Zur Auswertung wurde ein ELISA Lesegerät (Fa. BioTek, Wellenlänge 450 nm) verwendet. Die gemessene Extinktion konnte dann anhand der Formel $Absorption = (A-D) / (1 + (x/C)^B + D)$ in die Konzentrationen des in den Proben enthaltenen Albumins umgerechnet werden. Die Werte A bis D ergaben sich aus der verwendeten Standardkurve. Als Maß für die Genauigkeit der Messergebnisse wurde der Regressionswert der Standardwerte des ELISAs errechnet. Werte nahe 1 zeigen eine hohe Genauigkeit der Messkurve an. Es wurden keine Ergebnisse mit einer Regression kleiner als 0,9950 verwendet.

3.5. Histologie

3.5.1. Allgemeines

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung von Gewebeschnitten der Versuchs- und der Kontrolltiere histologische und immunhistologische Färbungen angefertigt. Die Einbettung der Gewebeproben und Anfertigung der Schnitte wurden von Frau Dr. C. Meyer-Schwesinger durchgeführt. Im Allgemeinen fertigte sie je nach Fragestellung Schnitte von 1 µm bis 9 µm Dicke an.

3.5.1.1. Prinzip der Immunhistologie

Grundlegendes Ziel der Immunhistologie ist es, mittels Antigen-Antikörperreaktion definierte Epitope auf oder in Zellen oder Geweben zu identifizieren. Das Epitop wird durch einen spezifischen Erstantikörper gebunden. Nach entsprechender Bindungszeit wird das Fc-Fragment des Erstantikörpers mit Hilfe eines Zweitantikörpers detektiert. Die Auswahl des sekundären Antikörpers richtete sich

nach der Herkunftsspezies des verwendeten primären Antikörpers. Der Zweitantikörper ist entweder mit einem Enzym, mit dem Vitamin Biotin oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Der so gebildete Antikörper-Antikörper Komplex wird entweder durch enzymatische Farbreaktion oder durch Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die Methode erlaubt eine Signalverstärkung durch den Zweitantikörper.

3.5.1.2. Streptavidin-Biotin-Komplex

Die Darstellung der Antigene erfolgte teilweise mit der indirekten Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode. Sie beruht auf der Affinität von Streptavidin - einem Protein aus *Streptomyces avidinii* - zum Vitamin Biotin. Der an das Antigen gebundene spezifische Erstantikörper wird mit einem Biotin gekoppelten sekundären, gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichteten Epitop gebunden. Der Nachweis des Sekundärantikörpers geschieht dann durch das mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Biotin. Der verwendete Streptavidin-Komplex hat vier Bindungsstellen für Biotin. Zur Vorbereitung wurde Substanz A (Avidin-Komplex) mit Substanz B (Biotin gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur in 5x TBS inkubiert. In dieser Zeit besetzte im Idealfall Biotin drei der vier freien Bindungsstellen des Avidin-Komplexes. Bei der nachfolgenden Inkubation mit den Proben war die letzte Stelle des AB-Komplexes frei für die Bindung des Biotins am sekundären Antikörper. Vor der Inkubation des AB-Komplexes mit den Proben mussten diese durch zweimaliges Waschen mit 5x TBS umgepuffert werden, da das Phosphat des PBS die Reaktion stören würde. Auch alle nachfolgenden Waschschrte erfolgten in Abwesenheit von Phosphat mit 5x TBS.

3.5.1.3. Neufuchsin Entwicklungslösung

Die mit dem AB-Komplex gefärbten Schnitte wurden in einem Bad mit Neufuchsinlösung im Dunkeln farbentwickelt. Dazu wurden 300 mg Natriumnitrit in 7,5 ml Aqua dest. gelöst und mit Neufuchsin Stammlösung (2,5 g Neufuchsin, Fa. Aldrich und 50 ml 2 M Salzsäure, Fa. Merck) gemischt. Dann wurden 150 ml TNT Puffer (6,35 g Tris, 9 g NaCl, 25 ml 1 M HCL alles Fa. Merck, 1 g Tween 20, Fa. Sigma, in 1025 ml Aqua dest.) hinzugegeben. Diesem Gemisch wurden 800 µl einer Naphtol-Lösung (20 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat; Fa. Fluka und 750 mg NN-Dimethylformamid, Fa. Sigma) zugefügt und vermengt. Die an das Biotin gekoppelte

alkalische Phosphatase spaltete Phosphat vom Naphtol-AS-Bi-Phosphat ab, das dann mit dem Neufuchsin einen unlöslichen Farbkomplex bildete. Zellen, die spezifische Färbungen aufwiesen, stellten sich nach dieser Entwicklung rot dar.

3.5.1.4. Hämalau Kernfärbung nach Böhmer

Um die spezifische, in Neufuchsin entwickelte Färbung deutlicher zu machen, wurden die Schnitte in Hämalau gefärbt. Dazu wurden 10 g 12 X Aluminiumkaliumsulfat in H₂O und 0,1 g Natriumjodat über Nacht in 200 ml Aqua dest. gelöst. Außerdem wurden 1 g Hämatoxylin (Fa. Serva) und 10 g NN-Dimethylformamid ebenfalls über Nacht gelöst. Nach Zusammenfügen der Ansätze färbte diese Lösung die Zellkerne blau. Waren Zellen schon durch Neufuchsin spezifisch rot angefärbt, stellte sich deren Zellkern nun violett dar.

3.5.1.5. Probenvorbereitung

Zur festen Anheftung der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte auf Objektträger (Fa. Menzel) wurden die Schnitte über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (Fa. Heraeus) gebacken. Im Anschluss wurden sie nach kurzer Abkühlungsphase bei Raumtemperatur im Xylolbad (Fa. Riedel de Haen) für dreimal 5 min deparaffiniert. Danach wurden die Schnitte im abfallend konzentrierten Ethanolbad rehydriert, indem sie zweimal für je 5 min in 100%, 95% und 75% Ethanol (Fa. Walter, Kiel) und anschließend in Aqua dest. gegeben wurden. Anschließend begannen die eigentlichen Färbungen nach dem jeweiligen Protokoll.

Die in den Protokollen beschriebenen Inkubationen mit den Antikörperlösungen und dem AB-Komplex, mit den Blocklösungen und die Durchführung der Waschschrte erfolgten stets in einer feuchten Kammer, um das Verdunsten der Lösungen und das Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten diese Schritte bei Raumtemperatur.

3.5.1.6. Auswertung

Die Auswertung der Färbungen erfolgte an einem Mikroskop (Axioskop Fa. Zeiss), die Dokumentation mit einer angeschlossenen Kamera (Axiocam Fa. Zeiss).

3.5.2. PAS-Färbung

Diese Standardfärbung diente der morphologischen Beurteilung des Nierengewebes. Die Gewebeschnitte wurden 1 min in Perjodsäure (Fa. Merck) gegeben. Nach Abwaschen der Reste für 3 min unter fließendem Leitungswasser und Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte für 40 min in Schiff'sches Reagenz (Fa. Sigma) gegeben. Nach Waschen unter fließendem Leitungswasser und in Aqua dest. wurden die Schnitte für 90 s in Hämatoxylin nach Böhmer gefärbt. Nach Abwaschen der Rückstände wurden die Schnitte mit Deckgläsern (Fa. Menzel) eingedeckt.

3.5.3. F4/80-Färbung

Die F4/80-Färbung diente der Darstellung von Makrophagen in den Gewebeschnitten. Der verwendete Antikörper (MCAP497, Fa. Serotec) erkennt das Maus F4/80-Antigen, ein 160 kD großes Glykoprotein, das auf murinen Makrophagen exprimiert wird. F4/80 wird nicht von Lymphozyten oder anderen polynukleären Zellen exprimiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS wurden die Gewebe mit 0,05% Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) bei 37°C für 15 min inkubiert. Um die Trypsinreaktion zu stoppen wurden die Schnitte kurz in 100% Ethanol getaucht. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS für je 5 min. Anschließend wurden die Schnitte in Blockpuffer (2% Pferdeserum, 1% BSA, 0,1% Fischgelantine, 0,1% Triton X-100, 0,05% Tween 20 in PBS) für 30 min zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen geblockt. Die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einer Konzentration von 1:50 in Antikörperpuffer (1% BSA, 0,1% Fischgelantine in PBS). Nach dreimaligem Abwaschen der nicht gebundenen Reste mit PBS für je 5 min erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter anti-Ratten Antikörper, Fa. Jackson) in PBS in einer Konzentration von 1:500 für 30 min.

Nach Abwaschen der nicht gebundenen Reste des sekundären Antikörpers mit PBS für zweimal 5 min bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte mit 5x TBS umgepuffert und anschließend für 30 min mit dem vorbereiteten Streptavidin-Biotin-Komplex inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit 5x TBS wurden die Objektträger in Neufuchsinlösung im Dunkeln farbewickelt. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion in Aqua dest. gestoppt. Im Anschluss erfolgte die Kernfärbung nach Böhmer für 90 s, bevor die Schnitte mit Fluoromount-G (Fa. Southern Biotechnology) eingedeckt wurden. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop.

3.5.4. CD3-Färbung

Die CD3-Färbung dient zur Identifizierung von T-Zellen in den Gewebeschnitten. Die Färbung ist eine Doppelfärbung, bei der erst der anti-Podozyten-Antikörper, der in den Glomeruli gebunden ist, mit sekundärem anti-Hasen-Antikörper gesättigt und farbentwickelt werden muss, bevor mit der eigentlichen CD3-Färbung begonnen werden kann.

Die Schnitte wurden für 35 min bei 680 Watt in der Mikrowelle in Citratpuffer zur Permeabilisierung des Gewebes gekocht. Zum Abkühlen wurden die Schnitte in Citratpuffer für 10 min auf Eiswasser gegeben und anschließend mit Aqua dest. zweimal für 5 min gewaschen, bevor sie 30 min mit Blocklösung (1:20 Ziegen Serum in PBS, Fa. Vektor) versetzt wurden. Dann wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (biotinylierter anti-Hasen-Antikörper, Fa. Vektor) in Blockpuffer in einer Konzentration von 1:100 inkubiert. Nach Waschen mit PBS und Umpuffern mit 5x TBS für je zweimal 5 min wurden die Schnitte mit dem vorbereiteten 1:100 konzentrierten Streptavidin-Biotin-Komplex versetzt. Nach 30 min Inkubation und dreimaligem Waschen mit 5x TBS wurden die Schnitte mit NBT/BCIP (Fa. Dako) entwickelt, bis die Glomeruli eine gräuliche bis schwarze Färbung aufwiesen. Damit war der gebundene anti-Podozyten-Antikörper gesättigt und störte die folgende immunhistochemische Färbung nicht mehr.

Die Schnitte wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und erneut mit Blockpuffer versetzt. Nach 30 min wurde der eigentliche Primärantikörper (anti-CD3 aus Hase, Fa. Vektor) in Blockpuffer in einer Konzentration von 1:20 zugegeben und über Nacht bei 4 °C mit den Schnitten inkubiert. Am nächsten Morgen wurden nicht gebundene Reste durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor der sekundäre Antikörper (biotinylierter anti-Hasen-Antikörper, Fa. Vektor) in Blockpuffer in einer Konzentration von 1:100 zugegeben wurde. Nach 30 min Inkubation folgte erneut Waschen mit PBS, Umpuffern mit 5x TBS und Inkubation mit dem vorbereiteten 1:100 konzentrierten Streptavidin-Biotin-Komplex. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit 5x TBS wurden die Schnitte im Dunkeln in Neufuchsinlösung farbentwickelt, bis die T-Zellen als einzelne rote Zellen sichtbar wurden. Die Reaktion wurde in Aqua dest. gestoppt und mit Hämatoxylin nach Böhmer für 90 s gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. sauber gewaschen und eingedeckt.

3.5.5. WT1-Färbung

Die WT1-Färbung diente in dieser Arbeit zur Identifizierung, Zählung und zur morphologischen Beurteilung der Podozyten in den Gewebeschnitten.

Die Schnitte wurden für 35 min bei 680 Watt in der Mikrowelle in Citratpuffer (2,35 g Natriumcitrat, 0,31 g Zitronensäuremonohydrat, Fa. Merck in Aqua dest.) zur Permeabilisierung des Gewebes gekocht und anschließend zum Abkühlen in Citratpuffer für 10 min auf Eiswasser gegeben. Nach Waschen mit Aqua dest. und Umpuffern mit PBS wurden die Schnitte zuerst 30 min bei Raumtemperatur in Blockpuffer (1:20 Ziegenserum in PBS, Fa. Vektor) und dann mit dem primären Antikörper (polyklonaler anti-WT aus Kaninchen, Fa. Santa Cruz) in einer Konzentration von 1:1000 in Blockpuffer inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde den Schnitten der sekundäre Antikörper (biotinylierter anti-Hasen-Antikörper, Fa. Vektor) in PBS in einer Konzentration von 1:500 für 30 min zugegeben. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min mit PBS wurden die Schnitte dann mit 5x TBS umgepuffert und mit dem vorbereiteten 1:100 konzentrierten Streptavidin-Biotin-Komplex versetzt und 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit 5x TBS wurden die Schnitte im Dunkeln in einer Neufuchsinlösung farbentwickelt. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurden die Schnitte zum Stoppen der Reaktion in Aqua dest. gegeben und anschließend mit Hämatoxylin nach Böhmer gegengefärbt und eingedeckt.

Es wurden zum Zählen der WT1-positiven Zellen zusätzlich Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt und nach dem oben beschriebenen Protokoll gefärbt. Der primäre Antikörper wurde hier über Nacht mit den Proben inkubiert, um ein besseres Ergebnis zu erzielen. Beim Auswerten wurden am Mikroskop je 50 Glomeruli ausgezählt und ihre Fläche und Durchmesser bestimmt. Anschließend wurden die Ergebnisse zur Prüfung der statistischen Signifikanz einem t-Test für unverbundene Proben unterzogen.

3.5.6. B220-Färbung

Die B220-Färbung diente der Identifikation von B-Zellen in den Gewebeschnitten. Die Färbung erfolgte nach demselben Protokoll wie die beschriebene WT1-Färbung. Der Antikörper (anti-B220 aus Hase, Fa. R&D Systems) wurde in einer Konzentration von

1:1000 über Nacht in Blocklösung (1:20 Pferdeserum in PBS, Fa. Vector) inkubiert. Es wurde der gleiche Sekundärantikörper verwendet wie in der WT1-Färbung, jedoch in einer Konzentration von 1:100 in Blocklösung.

3.5.7. Zellzählung von CD3- und B220-positiven Zellen

Die Zahl der CD3- und B220-positiven Zellen wurde in einer verdeckten Auszählung ermittelt. Dabei wurde bei 400X Vergrößerung in je 20 Gesichtsfeldern die Zahl der spezifisch gefärbten Zellen in den Glomeruli und im Interstitium bestimmt. Es mussten per Definition mindestens zwei Glomeruli in den Gesichtsfeldern enthalten sein. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde per t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt.

3.5.8. Kollagen Typ IV-Färbung

Die Färbung diente der Darstellung von Typ IV Kollagen der Basalmembran. Eine vermehrte Kollagen IV Bildung weist auf einen sklerotischen Umbau der Niere hin.

Die Schnitte wurden in 9,1% Protease 24 Lösung in Aqua dest. für 15 min im Brutschrank zum Permeabilisieren des Gewebes bei 37°C inkubiert. Die Proteasereaktion wurde mit 100% Ethanol gestoppt, bevor die Schnitte dreimal für 5 min mit Aqua dest. gewaschen und mit Blockpuffer (1:20 Pferdeserum in PBS) für 30 min inkubiert wurden. Die folgende Inkubation mit dem Primärantikörper (Ziege anti-Kollagen IV, Fa. Biotrend) erfolgte in einer Konzentration von 1:400 in Blockpuffer über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte dreimal für 10 min mit PBS gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:100 für 30 min inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min mit PBS und Umpuffern auf 5x TBS wurden die Schnitte mit dem vorbereiteten 1:100 konzentrierten Streptavidin-Biotin-Komplex versetzt und 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben in ein Neufuchsinbad gegeben und bis zum Erreichen der gewünschten Färbung im Dunkeln entwickelt. Danach wurden die Schnitte nach Böhmer gegengefärbt und mit Fluoromount eingedeckt.

3.5.9. Färbung des glatt-muskulären Aktins

Die Färbung diente der Darstellung von glatt-muskulärem Aktin in den Nierenschnitten der Versuchs- und Kontrolltiere. In der gesunden Niere ist eine

Reaktivität des Antikörpers ausschließlich in den Arterien und Arteriolen bis zum Vas afferens zu sehen. In der kranken sklerotischen Niere kommt es zu einer Expression von glatt-muskulärem Aktin auch in interstitiellen und glomerulären Zellen, die einen myoepithelialen Phänotyp angenommen haben. Die Schnitte wurden nach Backen, Deparaffinisieren und Rehydrieren mit Protease 24 Lösung (25mg/ml in Aqua dest.) 15 min bei 37°C verdaut. Diese Reaktion wurde in 100% Ethanol gestoppt und die Schnitte mit PBS gewaschen, bevor sie mit Blocklösung (1:20 Ziegen Serum in PBS) 30 min inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (biotinylierter, monoklonaler Antikörper in Blocklösung, Konzentration 1:200, Fa. NeoMarkers) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte dreimal für je 10 min mit 5x TBS gewaschen, bevor sie mit dem vorbereiteten Steptavidin-Biotin-Komplex für 30 min inkubiert wurden. Da der verwendete primäre Antikörper an Biotin gekoppelt war, erübrigte sich der Gebrauch eines sekundären Antikörpers bei dieser Färbung. Nach dreimaligem Waschen mit 5x TBS erfolgte die Farbentwicklung der Schnitte mit Neufuchsin im Dunkeln. Nach Erreichen der gewünschten Signalintensität wurde die Färbung in Aqua dest. gestoppt und mit Hämalaun nach Böhmer gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount eingedeckt. Zellkerne stellten sich blau dar, das Zytoplasma von myoepithelialen Zellen und glatten Muskelzellen rot.

3.5.10. Anti-Podozyten-Antikörperfärbung von Gewebeschnitten

Bei dieser Färbung wurden die Proben nur mit sekundärem anti-Hasen-Antikörper inkubiert. Der Antikörper band an den injizierten anti-Podozyten-Antikörper. So war es möglich die Lokalisation der Antikörper im Gewebe aufzuzeigen.

Das Gewebe wurde für 15 min bei 37°C mit Protease 24 Lösung (1% Protease 24 in Aqua dest., Fa. Sigma) verdaut. Diese Reaktion wurde im Ethanolbad gestoppt, bevor die Schnitte 30 min mit Blockpuffer (5% Pferdeserum, 0,001% Tween 20 in PBS) behandelt wurden. Anschließend wurden die Proben mit dem sekundären Antikörper (biotinylierter anti-Hasen-Antikörper, Verdünnung 1:100, Fa. Vector) in Blockpuffer 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte für jeweils 5 min mit PBS wurden die Proben mit 5x TBS umgepuffert und für 30 min mit dem vorbereiteten AB-Komplex inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 5x TBS erfolgte die Farbentwicklung der Schnitte in einer Neufuchsinlösung bis die gewünschte Signalstärke erreicht war. Anschließend wurden die Proben eingedeckt.

3.5.11. IgG-, IgM- und anti-Podozyten-Antikörper-Immunfluoreszenzfärbung

Die folgenden Färbungen entstanden alle nach dem gleichen Protokoll. Die IgG- und IgM-Färbungen dienten dem Nachweis von Immunglobulin-Ablagerungen in den Gewebeschnitten. Die anti-Podozyten-Antikörperfärbung ermöglichte eine gegenüber der Neufuchsinfärbung genauere Lokalisierung der Areale in den Nieren der Versuchstiere, die gebundenen anti-Podozyten-Antikörper enthielten. Die Schnitte wurden mit Protease 24 Lösung versetzt und 15 min bei 37°C zum Aufschließen des Gewebes inkubiert. Die Reaktion wurde durch ein Tauchbad in 100% Ethanol gestoppt. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS für 5 min gewaschen und zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen für 30 min mit Blockpuffer (1:20 Pferdeserum, 0,001% Tween 20) versetzt. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min mit den Antikörpern inkubiert. Bei der anti-Podozyten-Antikörperfärbung war dies ein sekundärer, FITC-gekoppelter anti-Hasen-Antikörper, der an den in den Schnitten gebundenen anti-Podozyten-Antikörper band. Die IgG- und IgM-Färbungen wurden mit einem immunabsorbierten anti-Maus-IgG- bzw. anti-Maus-IgM-Antikörper durchgeführt. Diese sekundären FITC gekoppelten Antikörper banden an das Fc-Fragment der in den Nierenschnitten enthaltenen Immunglobuline. Die Antikörper waren jeweils in Blockpuffer in einer Konzentration von 1:100 gelöst. Nach Abwaschen der nicht gebundenen Reste für dreimal je 5 min mit PBS wurden die Schnitte mit Fluoromount versetzt und eingedeckt.

3.5.12. Immunhistologische Färbungen an fixierten Podozyten

3.5.12.1. Probenvorbereitung

Podozyten wurden in 24-Loch-Platten (Fa. Corning) auf Deckgläsern ausgesät. Dazu wurde je ein steriles Deckglas (Fa. VWR, Durchmesser 12 mm) pro Loch mit Kollagen Typ I Lösung (Fa. Sigma) versetzt und eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnehmen der Kollagenlösung, Trocknen der Deckgläser und Vorlage von 500 µl Nährmedium pro Loch wurden 50 bis 300 µl einer Podozytensuspension zugegeben und bei 33°C oder 37°C kultiviert.

3.5.12.2. Fixieren der Zellen

Nach Erreichen der gewünschten Dichte wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 200 µl Fixierlösung (2% PFA, 4% Sucrose in PBS) versetzt. Nach 8 min bei Raumtemperatur wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen dreimal für jeweils

10 min mit PBS gewaschen, bis sie schließlich luftdicht in PBS bei 4°C gelagert wurden.

3.5.12.3. Synaptopodin-, Podocin- und Nephrintfärbung in Podozyten

Diese Färbung diente dem Nachweis von Differenzierungsmarkern der verwendeten Podozyten. Die Zellen wurden in Permeabilisationslösung (0,3% Triton-X 100 in PBS, Fa. Sigma) für 10 min permeabilisiert. Danach wurden die Zellen 45 min mit Blockpuffer (2% FCS, 2% BSA, 0,2% Fischgelatine in PBS) versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann erfolgte für 60 min die Inkubation mit dem Erstantikörper in Blockpuffer in einer Konzentration von 1:50 bis 1:200. Nach dreimaligem Waschen der Zellen für 10 min mit PBS wurde der Zweitantikörper in Blockpuffer in einer Konzentration von 1:100 zugegeben. Zusätzlich wurde die Lösung mit Phalloidin, einem das filamentöse Aktin des Zytoskeletts rot anfärbenden Farbstoff, in einer Konzentration von 1:100 bis 1:1000 versetzt. Nach Dunkelinkubation der Zellen mit der Antikörper-Phalloidinlösung für 30 min wurden die Zellen dreimal für 10 min mit PBS im Dunkeln gewaschen. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur und auf dem Schütteltisch. Die Deckgläser wurden der 24-Loch-Platte entnommen und mit Fluoromount auf Objektträgern fixiert.

3.5.13. Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde an der Universität Wien unter der Leitung von Professor Dr. D. Kerjaschki durchgeführt. Sein Labor erhielt dazu von uns halbierte, mit D-MEM und 4% PFA gespülte und in 4% Formalin fixierte Nieren der Versuchs- und Kontrolltiere.

Die Gewebelöcke wurden in Wien in 1% Osmium in 0,1 M Natrium-Cacodylat Puffer nachfixiert und danach in 1% Uranylacetat gefärbt. Die halbierten Nieren wurden zur Einbettung mit Epoxy-Resin (Fa. Serva) versetzt und zur Polymerisation für 36 Stunden bei 60°C gebacken. An einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung) wurden Schnitte angefertigt, die mit Uranylacetat in Methanol und anschließend mit Bleizitrat nachkontrastiert wurden. Die Auswertung erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (JEM 1010, Fa. JEOL).

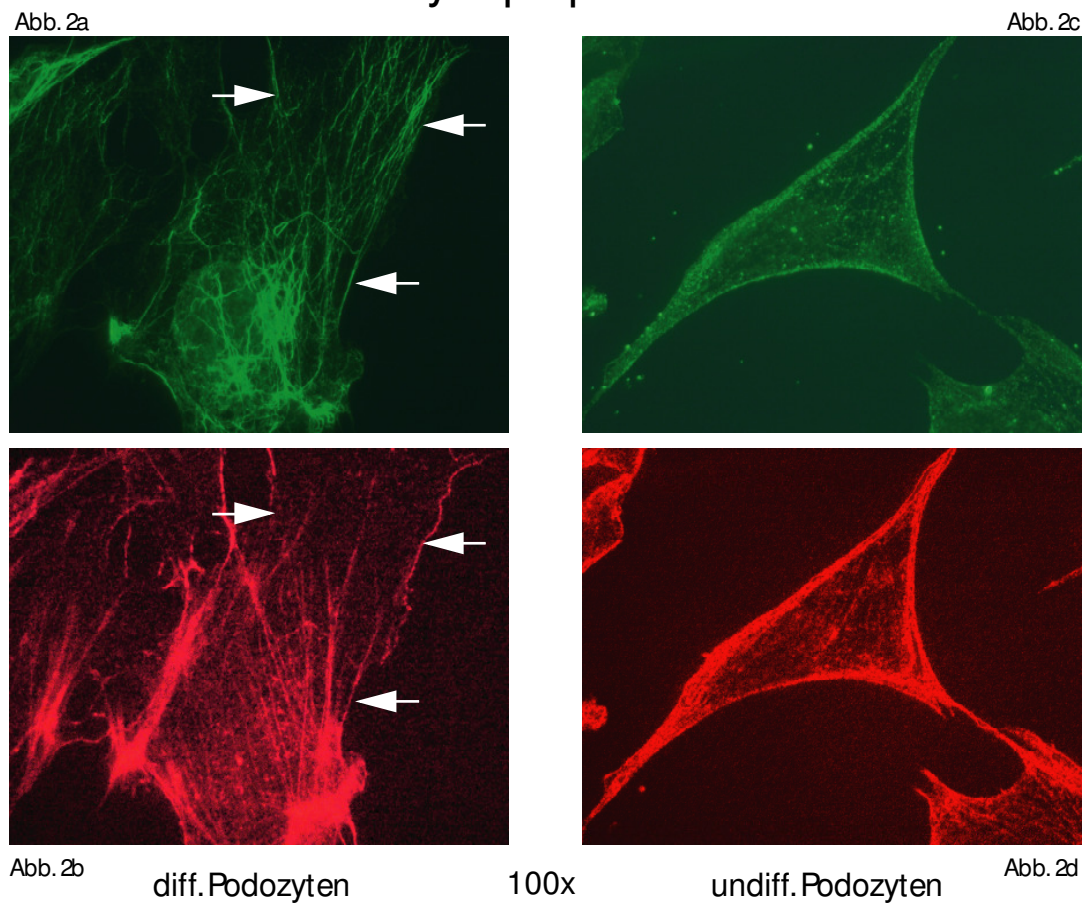
4. Ergebnisse

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse von drei Versuchsreihen des neuen Mausmodells dargestellt: die Staffel 4 mit zwei, die Staffel 5 mit drei und die Staffel 8 mit vier Versuchstieren. In Versuchsreihe 4 gab es ein Kontrolltier, in den Versuchsreihen 5 und 8 gab es zwei bzw. vier Kontrolltiere. In allen Versuchsreihen war mit demselben Antikörper immunisiert worden. Zwischen den Versuchsreihen 5 und 8 wurden zwei Versuchsreihen mit einer weiteren Antikörpercharge durchgeführt. Dieser Antikörper bewirkte an den Versuchstieren eine allergische Reaktion, so dass diese Tiere nicht ausgewertet wurden. In der Versuchsreihe 8 wurden die Tiere zum ersten Mal mit Nummern versehen. Die Mäuse 801 bis 804 bezeichneten die Kontrolltiere und 811 bis 814 die Versuchstiere.

4.1. Auswahl der verwendeten Podozyten

Die verwendeten Podozyten wurden in einem teilungsfähigen, undifferenzierten Zustand bei 33°C gehalten, bis sie für Immunisierungen oder Experimente gebraucht wurden. Die Zellen wurden dann zur Differenzierung dem Temperaturwechsel auf 37°C ausgesetzt und in Abwesenheit von γ -IFN mindestens 14 Tage inkubiert. Um zu überprüfen ob die Zellen in differenzierte Form übergegangen waren, wurden die Podozyten-spezifischen Proteine Nephrin, Podocin, Synaptopodin und Podocalyxin als Differenzierungsmarker gewählt. Diese Proteine kommen typischerweise in differenzierten Podozyten vor. In der Immunfluoreszenz zeigten sich unterschiedliche Fluoreszenzmuster zwischen undifferenzierten und differenzierten Podozyten. In differenzierten Podozyten zeigte Synaptopodin ein spezifisches Fluoreszenzmuster entlang des filamentösen Aktin-Zytoskeletts (Abb. 2a ihre bis 2d). Podocin und Nephrin stellten sich in Vesikeln im Zytoplasma dar (Abb. 3a und 4a). Nephrin war zusätzlich entlang der Zellmembran der Fußfortsätze darzustellen (Abb. 3a). Diese Bindungsmuster konnten in den undifferenzierten Podozyten nicht in dieser Form nachgewiesen werden (Abb. 3b). Ein unterschiedliches Bindungsmuster für Podocalyxin konnte nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Synaptopodin



Die Abb. 2a und 2c zeigen eine Synaptopodin-Immunfluoreszenzfärbung von differenzierten bzw. undifferenzierten Podozyten in 100-facher Vergrößerung. Die Abb. 2b und 2d zeigen die jeweils zugehörigen Phalloidinfärbungen des Aktin-Zytoskeletts. Die Pfeile in Abb. 2a weisen auf die spezifische Synaptopodin-Fluoreszenzfärbung entlang des filamentösen Aktin-Zytoskeletts (korrespondierende Pfeile in Abb.2b) hin.

Nephrin

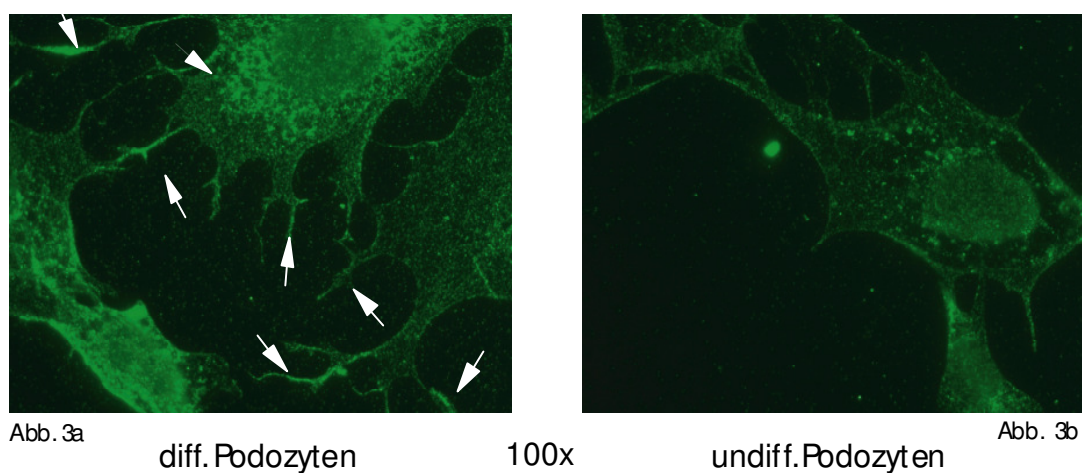


Abb. 3a und 3b zeigen die Nephrin-Immunfluoreszenzfärbungen von differenzierten bzw. undifferenzierten Podozyten in 100-facher Vergrößerung. Es zeigt sich eine intensive Färbung der Zellmembran der differenzierten Podozyten, insbesondere im Bereich der gebildeten Fußfortsätze (Pfeile Abb. 3a). Weiterhin färben sich Vesikel innerhalb des Zytoplasmas an (Pfeilspitze Abb. 3a).

Podocin

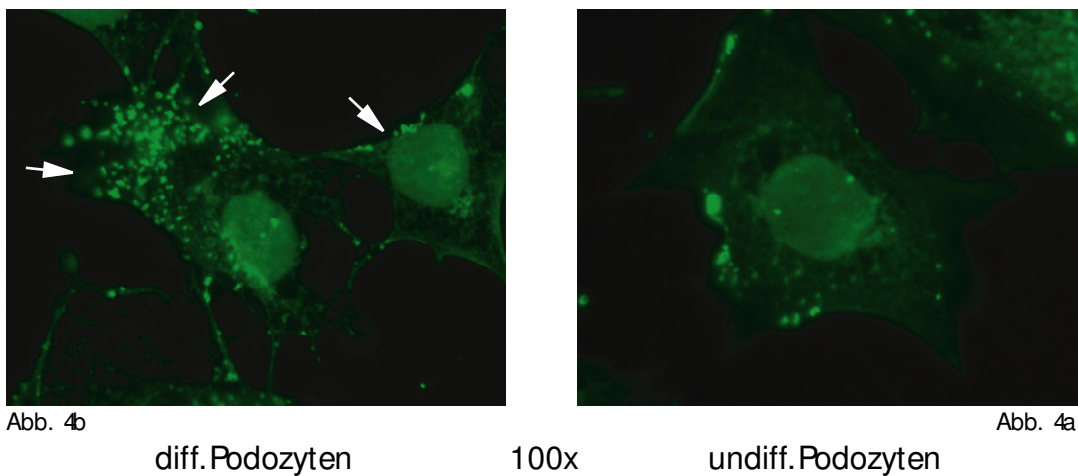


Abb. 4a und 4b zeigen die Podocin-Immunfluoreszenzfärbungen von differenzierten und undifferenzierten Podozyten in 100-facher Vergrößerung. Der Podocin Antikörper färbte in differenzierten Podozyten Vesikel im Zytoplasma der Zellen (Pfeile in Abb. 4a).

Außerdem konnten im Western Blot von Podozytenlysaten spezifische Banden für Synaptopodin, Nephrin und Podocalyxin nachgewiesen werden. Nephrin zeigte eine charakteristische Doppelbande bei ca. 180 kD. Eine Bande für Synaptopodin konnte bei ca. 110 kD und für Podocalyxin bei ca. 140 kD gezeigt werden (Abb. 5). Diese Podozyten-spezifischen Marker zeigten, dass die für die Zellkultur und für die Antikörper-Produktion eingesetzten Zellen zum größten Teil Podozyten waren.

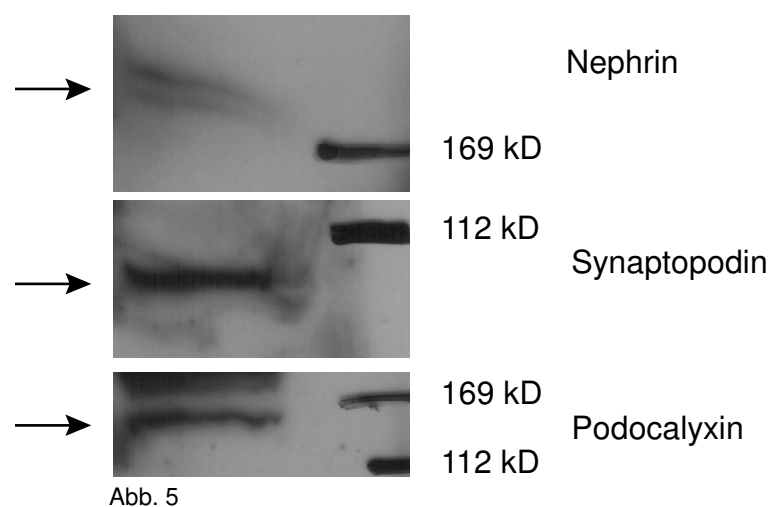


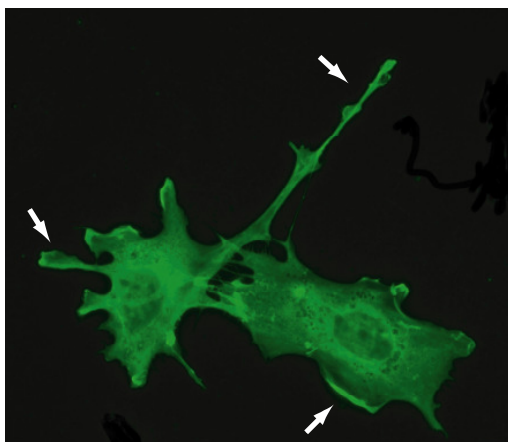
Abb. 5 zeigt den Ausschnitt eines Western Blots, der mit Lysaten von differenzierten Podozyten durchgeführt wurde. Die Lysate wurden mit anti-Podozyten-Antikörper inkubiert. Die Pfeile auf Abb. 5 zeigen die Banden für Nephrin, Synaptopodin und Podocalyxin.

In diesen Versuchen wurde außerdem deutlich, dass die subklonierte Form der Podozyten, die wir von Herrn Prof. Endlich erhielten, ein wesentlich stabileres Wachstums- und Expressionsverhalten zeigte, so dass wir dazu übergingen in der Zellkultur ausschließlich mit dieser Zellreihe zu arbeiten.

4.2. Untersuchungen des hergestellten anti-Podozyten-Antikörpers

Zur Überprüfung des Bindungsmusters des gewonnenen Antikörpers wurden Immunfluoreszenzfärbungen an differenzierten und undifferenzierten Podozyten sowie Western Blots mit differenzierten und undifferenzierten Podozytenlysaten durchgeführt.

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten ein deutliches Bindungsmuster des Antikörpers entlang der Zellmembran, insbesondere im Bereich von entstehenden Fußfortsätzen der Podozyten (Abb. 6a und 6b). Der Antikörper reagierte außerdem mit perinukleären zytosolischen Strukturen und Anteilen des Zellkerns. Die undifferenzierten Podozyten zeigten eine insgesamt schwächere Antikörper-Bindung (Abb. 6d). Da die Zellen weniger Fortsätze bildeten, stellte sich dieser Bereich weniger intensiv dar, wobei auch die Zellmembran geringer angefärbt wurde (Abb. 6d). Die perinukleäre Region zeigte an undifferenzierten Zellen ebenfalls vesikuläre Strukturen, bei denen es sich um Zellorganelle handeln könnte. Insbesondere die peripheren zytoplasmatischen Regionen waren im Vergleich zu den differenzierten Zellen weniger deutlich angefärbt. Der polyklonale Antikörper bindet demnach an Epitope, die auf differenzierten und undifferenzierten Podozyten vorkommen, aber auch an Epitope, die nur auf reifen Podozyten exprimiert werden.



Die Abb. 6a zeigt das Bindungsverhalten des anti-Podozyten-Antikörpers auf differenzierten Podozyten in 100-facher Vergrößerung. Der Antikörper färbt besonders intensiv die Zellmembran im Bereich der gebildeten Fußfortsätze (Pfeile in Abb. 6a).

diff.
Podozyten 100x

Abb. 6a

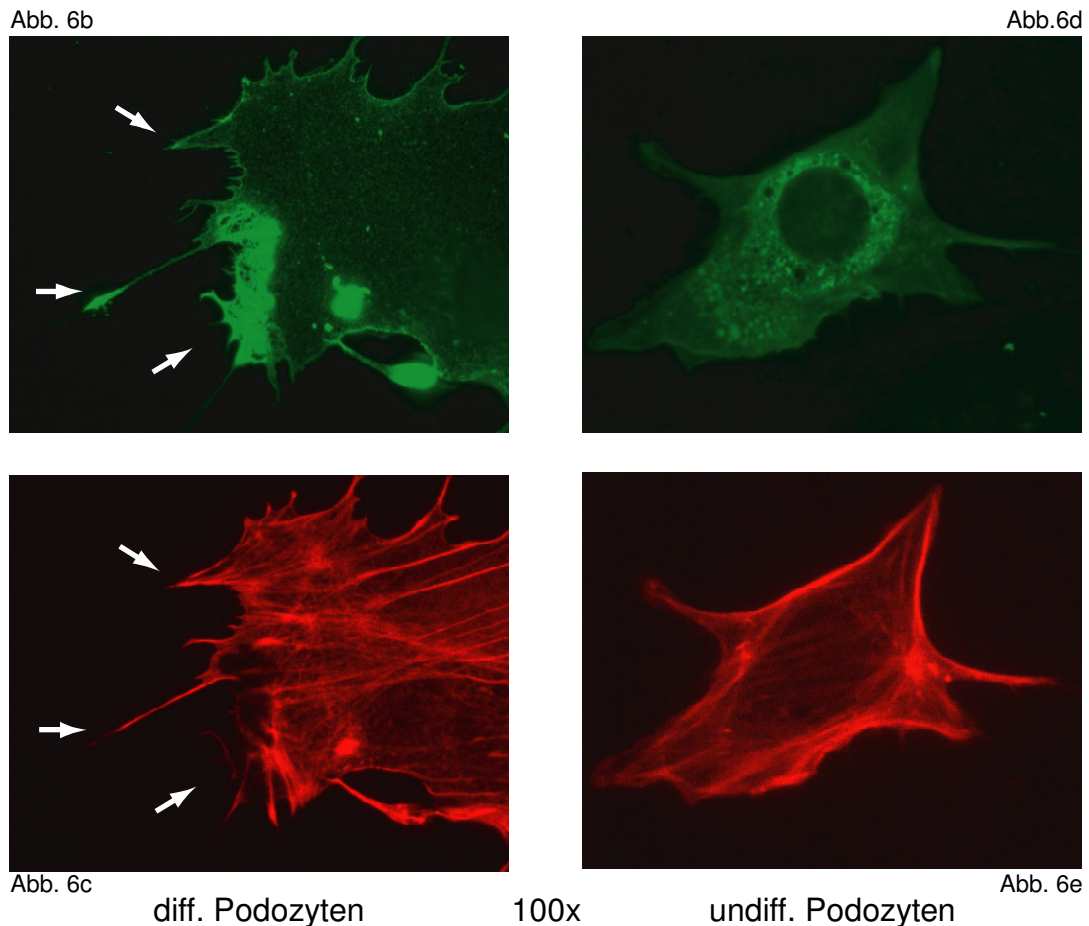


Abb. 6b bis 6c zeigen differenzierte Podozyten, während die Abb. 6d und 6e undifferenzierte Podozyten zeigen. Die Abb. 6a (vorherige Seite), 6b und 6d zeigen das Bindungsverhalten des anti-Podozyten-Antikörpers, während die Abb. 6c und 6e das mit Phalloidin gefärbte Aktin-Zytoskelett der Zellen zeigen. Man erkennt eine Bindung des anti-Podozyten-Antikörpers entlang der Zellmembran, insbesondere im Bereich der Fußfortsätze (Pfeile in Abb. 6a und 6b). Die Pfeile in Abb. 6c weisen auf korrespondierende Bereiche des Zytoskelettes der Zellen hin.

Western Blots mit anti-Podozyten-Antikörper wurden mit Lysaten von undifferenzierten und differenzierten Podozyten der Reihen von P. Mundel und K. Endlich durchgeführt. Der polyklonale Antikörper detektierte Banden unterschiedlicher Molekulargewichte von ca. 200 kD bis 30 kD (Abb. 7). In differenzierten Zellen beider Zelllinien wurden im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen zusätzliche Banden sichtbar (Abb. 7). Diese Banden stellten sich, teilweise schwach, auf der Höhe von ca. 110 kD, 80 kD und 70 kD dar. Weiterhin zeigten die differenzierten Zellen der Reihe von K. Endlich gegenüber den Zellen von P. Mundel ein unterschiedliches Bandenmuster. Neben den beschriebenen Banden waren zwei zusätzliche Banden auf der Höhe von ca. 50 kD und 40 kD nachweisbar, die die differenzierten Zellen von Prof. P. Mundel nicht zeigten (Abb. 7).

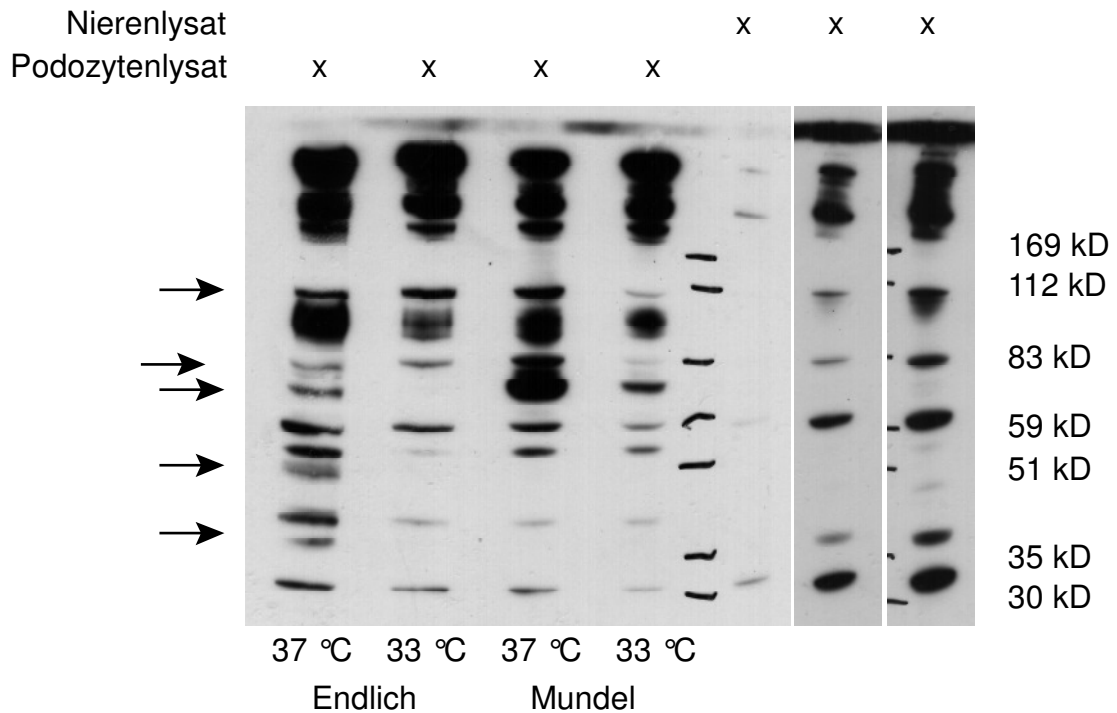


Abb. 7 zeigt den Western Blot von Podozytenlysaten der Reihen von P. Mundel und K. Endlich. An der rechten Seite ist ein Blot eines Nierenlysates nach unterschiedlicher Belichtungszeit dargestellt. Diese Western Blots wurden mit dem anti-Podozyten-Antikörper inkubiert. Man erkennt ein polyklonales Bindungsmuster des Antikörpers, wobei sich einige zusätzliche Banden bei den differenzierten Podozyten im Vergleich zu den undifferenzierten Podozyten zeigen. Die Pfeile markieren diese Banden.

4.3. Ergebnisse der Urinuntersuchungen

Das Leitsymptom der glomerulären Schädigung ist die Proteinurie. Die Ausscheidung von Albumin im Urin wurde als Marker für den vom Antikörper verursachten Nierenschaden untersucht. Um die Schwere des glomerulären Schadens genauer beurteilen zu können, wurde zusätzlich ein Western Blot gegen murines IgG angefertigt. Die Anwesenheit von hochmolekularem IgG zusätzlich zum Albumin gilt als Zeichen eines schwereren Schadens der glomerulären Filtrationsbarriere. Zusätzlich wurden die Urine auf Podocalyxin durch Western Blots untersucht. Podocalyxin ist ein oberflächliches podozytäres Sialoprotein, das im Urin eine Membranschädigung der Podozyten anzeigen könnte.

4.3.1. Qualitative Untersuchungen

Die im Urin enthaltenen Proteine wurden per SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Eine deutliche Bande bei ca. 68 kD machte eine starke Albuminurie wahrscheinlich. Im Western Blot mit einem Antikörper gegen Albumin zeigte sich eine Bande auf derselben Höhe (Abb. 8c). Die Bandenstärke

korrelierte außerdem mit der Stärke der Banden in den Coomassie gefärbten Gelen. Daher war davon auszugehen, dass es sich bei dieser Bande um Albumin handelte.

Um den Zeitverlauf der Proteinurie zu bestimmen, wurden am Tag 2, Tag 5, Tag 7, Tag 10, Tag 15 und Tag 17 Urinproben gewonnen. Fünf Tage nach der Immunisierung mit anti-Podozyten-Antikörper kam es zu einer geringgradigen Proteinurie einiger Versuchstiere (Abb. 8a und b). Sieben Tage nach der Immunisierung hatten nahezu alle behandelten Tiere eine Proteinurie. Am Tag 10 zeigte sich in allen Staffeln die höchste Menge von Albumin im Urin der Versuchstiere. Im Vergleich zu Tag 10 kam es zu späteren Zeitpunkten, also am Tag 15 bzw. 17 nach Immunisierung, zu einem Abfall der Albuminausscheidung mit dem Urin (Abb. 8a und b). Trotzdem war die Proteinurie noch deutlich erhöht. Die verschiedenen Versuchsreihen zeigten diese Zunahme der Proteinurie und spätere Abnahme in unterschiedlicher Deutlichkeit. Am stärksten ausgeprägt schien die Proteinurie in den Versuchstieren der fünften Versuchsreihe zu sein. Die achte Versuchsreihe zeigte zwei Tiere mit einer deutlichen Proteinurie, zwei weitere Tiere hatten eine geringe Erhöhung der Proteinausscheidung. Eine Proteinurie konnte in Coomassie gefärbten Gelen bei den Kontrolltieren nicht dargestellt werden.

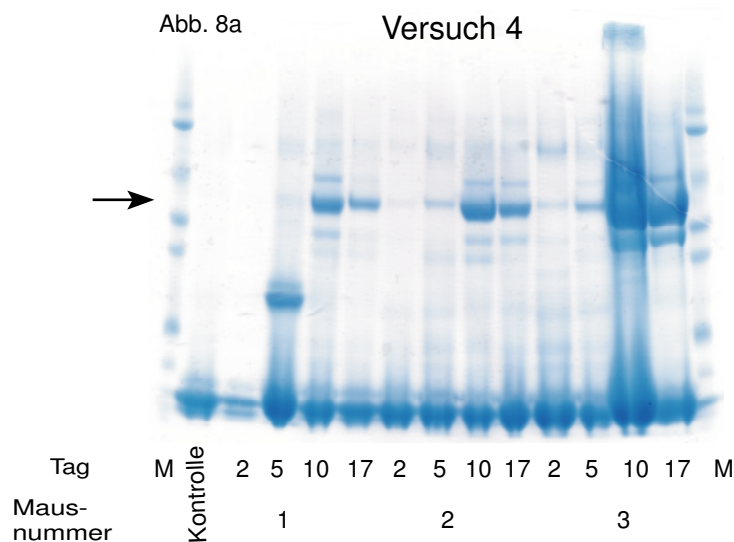
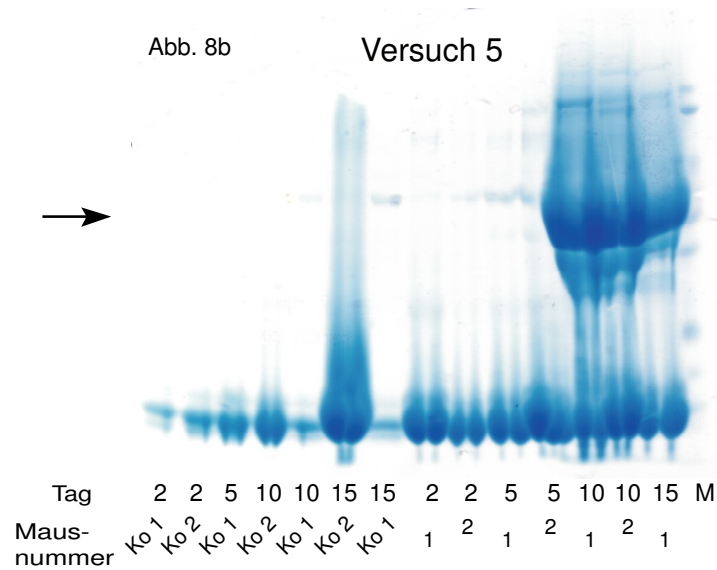


Abb. 8a und 8b (siehe folgende Seite) zeigen die Proteinausscheidungen im Urin der Versuchs- und Kontrollmäuse der Versuchsreihen vier und fünf. Die SDS-Gele sind nach Coomassie gefärbt. Der Pfeil in Abb. 8a weist auf die Höhe der Bande hin, die das im Urin enthaltene Albumin darstellt. Das Maximum der Albuminurie zeigte sich um den zehnten Tag. Zu späteren Zeitpunkten sinkt die Albuminausscheidung wieder ab. M = Marker



Um eine Abschätzung der im Urin enthaltenen Menge Albumin zu erhalten, wurde ein SDS-Gel erstellt, in dem bekannte Mengen Albumin geladen und anschließend nach Coomassie gefärbt wurden (Abb. 8c). 100 μg Albumin waren in etwa vergleichbar mit der Albuminmenge im Urin stark proteinurischer Tiere.

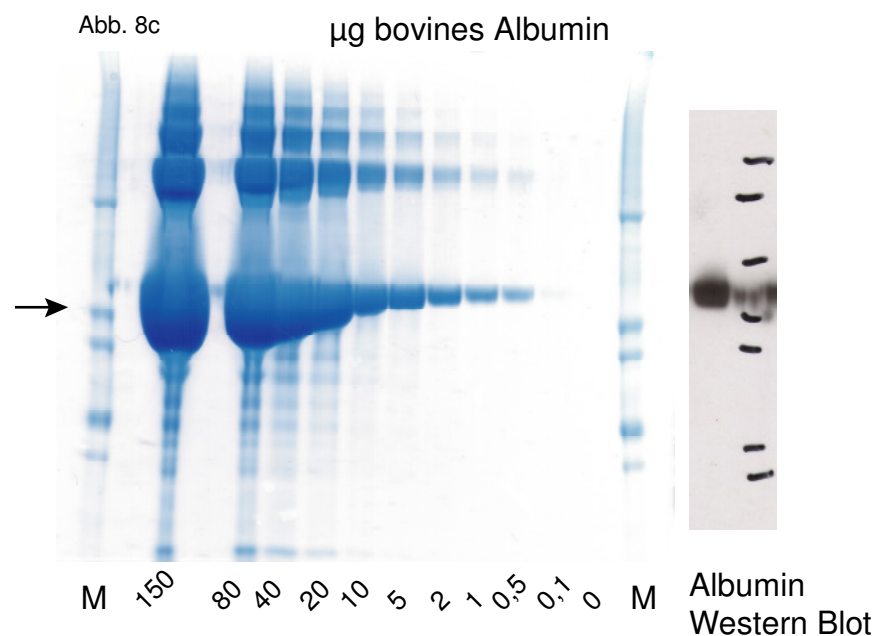


Abb. 8c zeigt eine absteigende Verdünnungsreihe von definierten Albuminmengen. Dieses Gel erlaubt eine ungefähre Abschätzung der Menge murinen Albumins im Urin unserer Versuchstiere. Rechts daneben ist ein Ausschnitt eines Western Blots gezeigt, der mit einem monoklonalen Antikörper gegen murines Albumin hergestellt wurde. Dieser Western Blot zeigt eine Bande auf derselben Höhe wie die nach Coomassie gefärbten SDS-Gele. Die durch den Pfeil markierten Banden verlaufen ungefähr auf der Höhe von 65 kD. M = Marker, 150 = 150 μg bovines Albumin usw.

4.3.2. Ergebnisse der ELISA Untersuchungen der Mausurine

Um die Ergebnisse der in den Coomassie-Färbungen dargestellten Albuminurie zu quantifizieren, wurden von allen Versuchreihen Albumin-ELISA Experimente durchgeführt. Zusätzlich wurde das Kreatinin in den gewonnenen Urinen im Zentrallabor des Uniklinikums Eppendorf bestimmt. Es wurde ein Albumin-Kreatinin Quotient gebildet, um genauere und vergleichbarere Ergebnisse zu erhalten. Die Zunahme der Albuminurie ist in Diagramm 1 aufgezeichnet. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Albuminurie in den Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren um etwa 1,5 Log-Stufen mit einem Maximum am Tag 10 nach der Immunisierung mit dem anti-Podozyten-Antikörper und einem Abfall der Werte am Tag 15 (Diagramm 1).

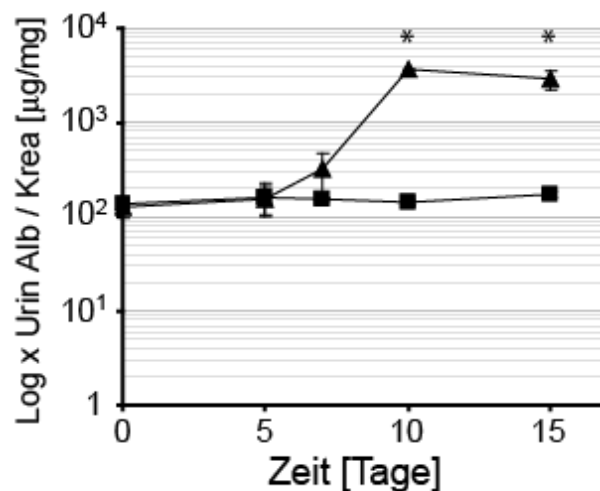


Diagramm 1 zeigt die graphische Darstellung der im Albumin-ELISA ermittelten Daten. Die Albuminkonzentration/Kreatinin [$\mu\text{g}/\text{mg}$] im Urin ist im Verhältnis zur Zeit nach der Injizierung des anti-Podozyten-Antikörpers dargestellt. Die Skalierung ist logarithmisch. Die fünf quadratischen Datenpunkte stehen für die Kontrolltiere. Die fünf dreieckigen Datenpunkte symbolisieren die Versuchstiere. Die Daten für Versuchs- und Kontrolltiere sind gemittelt. Alb = Albumin, Krea = Kreatinin, Log = Logarithmus

4.3.3. Western Blot gegen im Urin enthaltene Immunglobuline

Der Western Blot zeigte nach langer Belichtungszeit bei wenigen der schwer proteinurischen Versuchsmäusen die Anwesenheit von IgG-Ketten im Urin (Abb. 9). Dieser Nachweis gelang nur am Tag 10, dem Tag der maximalen Proteinurie. An anderen Tagen gelang der Nachweis von Immunglobulinen nicht. In den Kontrollmäusen war zu keinem Zeitpunkt IgG zu detektieren. Der Anteil des Albumins im Urin der Versuchsmäuse überwog jedoch dem Anteil der Immunglobuline um ein Vielfaches.

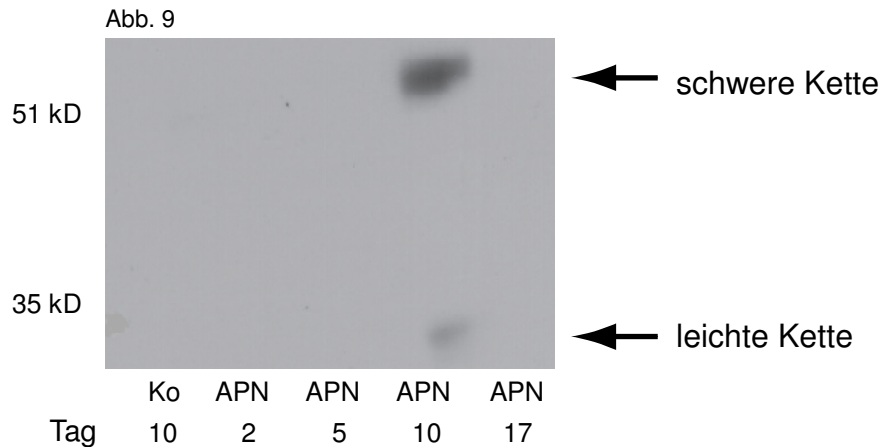


Abb. 9 zeigt einen Western Blot gegen murines IgG im Urin von Kontroll- und Versuchstieren. Nur am Tag des Maximums der Proteinurie ist IgG, in die einzelnen Ketten dissoziiert, nachzuweisen. Die Kontrollen zeigen kein IgG. Ko = Kontrolltier, APN = Versuchstier

4.3.4. Western Blot gegen im Urin enthaltenes Podocalyxin

Um ein Vorkommen von Podocalyxin im Urin aufzuzeigen, wurden Western Blots mit Urin der Versuchs- und Kontrolltiere durchgeführt. Podocalyxin ist ein ca. 140 kD großes Sialoprotein. Die nachgewiesenen Banden waren jedoch mit ca. 55 kD und 30 kD kleiner als das native Podocalyxin (Abb. 10a). Dies hat seine Ursache möglicherweise in der Degradation während der Passage von Podocalyxin durch den Nierentubulus. Um eine Detektion von Immunglobulinen durch den sekundären Antikörper auszuschließen, wurde ein Western Blot nur mit dem sekundären Antikörper durchgeführt. Dieser Blot zeigte keine Banden (Abb. 10b) und ein erneutes Bloten dieser Membran mit anti-Podocalyxin Antikörper enthielt wieder die Banden bei ca. 55 kD und 30 kD.

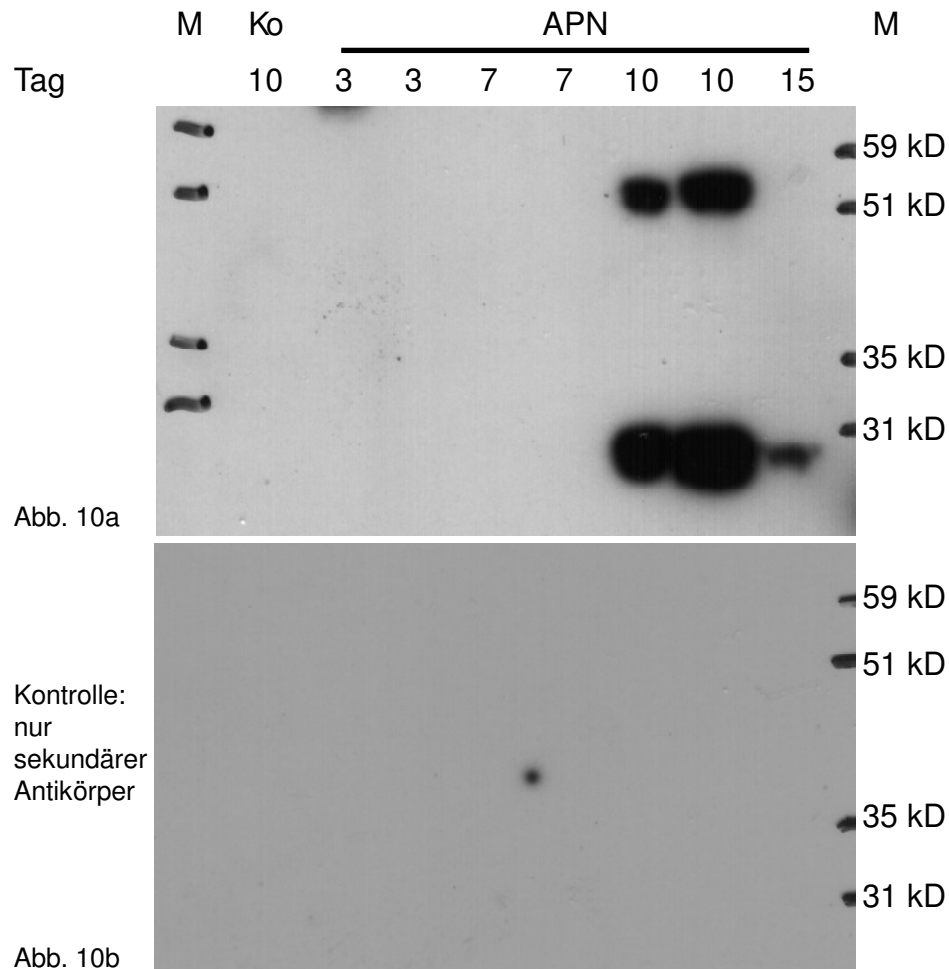


Abb. 10a zeigt einen Western Blot mit einem anti-Podocalyxin Antikörper. Die Banden sind mit ca. 55 kD und 30 kD kleiner als natives Podocalyxin. Die ursprüngliche Größe von Podocalyxin beträgt 140 kD. Abb. 10b zeigt die Kontrolle einer Membran, die nur dem sekundären Antikörper ausgesetzt war. Diese Membran bleibt auch nach langer Belichtungszeit ohne erkennbares Signal. M = Marker, Ko = Kontrolle, APN = Versuchstier

4.4. Ergebnisse der Proteinexpressionsuntersuchungen

Die Proteinexpression wurde in allen Versuchsreihen untersucht. Dazu wurden Western Blots mit Lysaten aus Mausnieren erstellt. Wir untersuchten verschiedene podozytäre Strukturproteine, wie Podocin, Podocalyxin, Synaptopodin und Nephrin, auf eventuelle Unterschiede in ihrer Expression. Weiterhin erwarteten wir eine mögliche Änderung der Expression von Proteinen, die an Signalkaskaden von Epithelzellen der Niere beteiligt sind. Dazu gehören Src und phospho-Src, Ezrin und phospho-Ezrin, die Rho-Kinasen 1 und 2 (Rock 1 bzw. 2) und B7-1. Deshalb wurden Western Blots mit Antikörpern gegen diese Proteine durchgeführt. Um eine mögliche Beteiligung des Komplementsystems am Pathomechanismus des Modells zu untersuchen, wurde ein Blot gegen Komplement C3 durchgeführt. Komplement C3 ist ein Bestandteil der Komplementkaskade.

Um eine vergleichbare Menge Protein der verschiedenen Lysate zu untersuchen, wurde zuerst der Proteingehalt der Proben mit Hilfe eines Aktin Western Blots angeglichen. Dann wurde die Bandenstärke der Proteine im Verlauf des Experiments untersucht.

Die Strukturproteine Podocin und Nephrin zeigten keine Expressionsunterschiede bei den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 11c). Für das Sialoprotein Podocalyxin war jedoch eine Zunahme deutlich erkennbar (Abb. 11a). Im Synaptopodin Western Blot konnten Degenerationsprodukte gezeigt werden, aber nicht das vollständige Molekül bei 110 kD (Abb. 11d). Die Degenerationsprodukte in den Versuchstieren waren gegenüber den Kontrolltieren signifikant vermindert.

Bei den Signal-Proteinen zeigte Ezrin keine Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Die Expression von phospho-Ezrin war jedoch deutlich erhöht (Abb. 11c). Auch für B7-1 konnte ein Anstieg der Expression gezeigt werden (Abb. 11a). Bei Src und phospho-Src (Thr416) kam es in einem vergleichenden Blot zu einer deutlichen Zunahme von phospho-Src in den Versuchstieren (Abb. 11e). Die Tiere mit schwerer Proteinurie waren von dieser Phosphorylierungszunahme von Src stärker betroffen. Die Expression der Rho-Kinasen 1 und 2 stellte sich als reduziert dar, wobei Rock 2 stärker verringert war als Rock 1 (Abb. 11b).

Der Komplement C3 Western Blot zeigte in den Versuchstieren keine Erhöhung des Komplementkaskadenbestandteils C3 gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 11f).

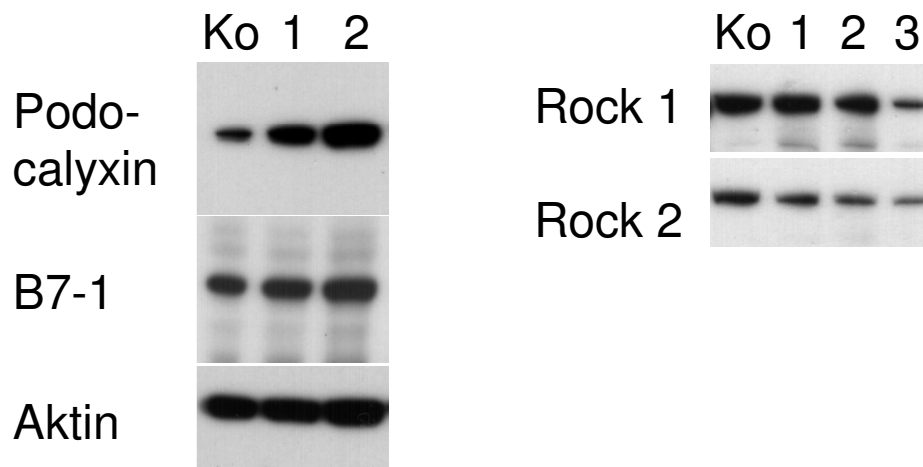


Abb. 11a zeigt die Expression der Proteine Podocalyxin, B7-1 und Aktin. Abb. 11b zeigt die Expression von Rock 1 und 2. Ko = Kontrolle, 1 = Versuchstier Nummer 1 usw.

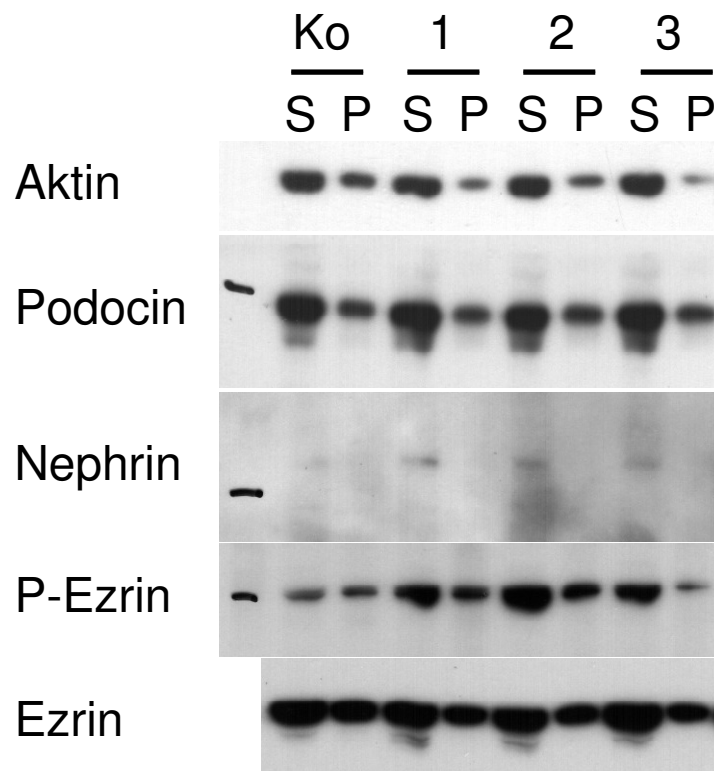


Abb. 11c zeigt die Expression der Proteine Aktin, Podocin, Nephrin, phospho-Ezrin und Ezrin. Ko = Kontrolle, 1 = Versuchstier Nummer 1 usw., S = Überstand, P = Pellet, P-Ezrin = phospho-Ezrin

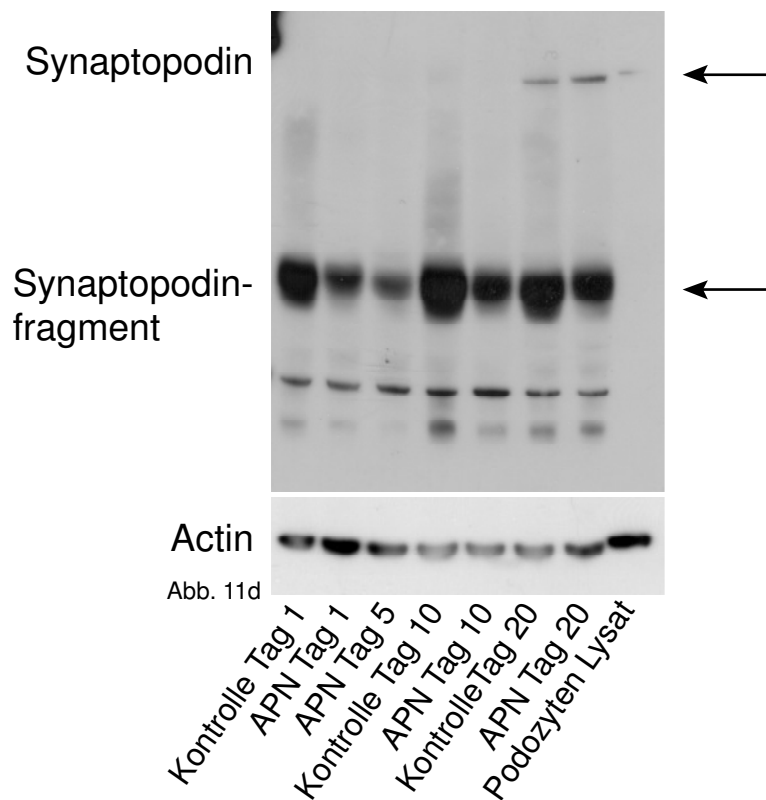


Abb. 11d zeigt einen Synaptopodin Western Blot. Der Nachweis des ganzen Moleküls gelang nicht (oberer Pfeil). Man erkennt ein Synaptopodinfragment mit einer ungefähren Größe von 50 kD (unterer Pfeil). Die Degenerationsprodukte in den Versuchstieren scheinen gegenüber den Kontrolltieren vermindert. APN = Versuchstier

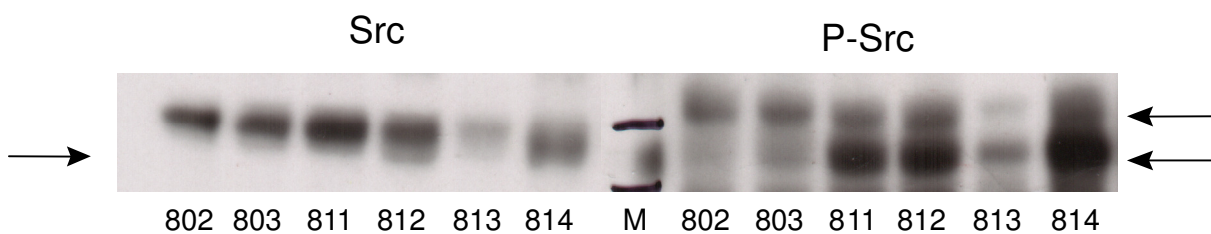


Abb.11e

Abb. 11e zeigt die Expression der Proteine Src und phospho-Src. M = Marker, P-Src = phospho-Src

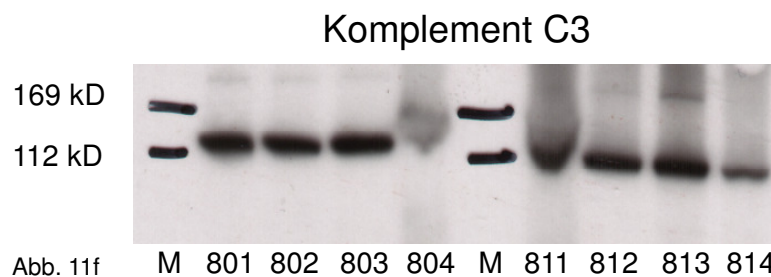


Abb. 11f zeigt die Expression des Komplement Proteins C3 in den Kontrollen zu den Versuchstieren. M = Marker; 801 = Kontrolltier Nummer 801 usw.; 811 = Versuchstier Nummer 811 usw.

4.5. Ergebnisse der PCR

Die mRNA der Nieren von Versuchs- und Kontrolltieren wurde auf eventuelle Expressionsunterschiede in jeder Versuchsreihe untersucht. Da wir auch hier mögliche Veränderungen in der Expression der mRNA von verschiedenen Strukturproteinen, Signaltransduktoren und inflammatorisch wirksamen Proteinen erwarteten, waren die Untersuchungen sehr umfangreich.

Voraussetzung für gleich bleibende und vergleichbare Ergebnisse bei dieser empfindlichen Methode war ein sehr steriles Arbeiten. Durch Wiederholung von Experimenten, bei denen Veränderungen beobachtet wurden, sollten technische Fehler minimiert werden. Nach Angleichung der Bandenstärke für die mRNA des Proteins GAPDH als *house-keeping* Enzym wurden die Primer entsprechend der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen benutzt.

Für die RNA der Strukturproteine Synaptopodin, Podocin, NHERF1 und 2, Podocalyxin und CD2AP konnten keine Veränderungen in der Expression erkannt werden. Die Expression der für die Proteine Nephrin und WT1 kodierenden RNA stellte sich als deutlich erhöht dar. Allenfalls mäßig erhöht war die Expression der RNA des Proteins α -Aktinin. Zusätzlich wurde noch die mRNA von Podoplanin untersucht, einem transmembranären podozytären Glykoprotein. Die Expression war in Versuchstieren deutlich erhöht im Vergleich zu Kontrollen.

Die Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt waren und schon per Western Blot untersucht wurden, prüften wir zusätzlich auf mögliche Unterschiede in der RNA Expression. Darüber hinaus wurde noch die RNA der Proteine Rho A und Rho C, *fokal adhesion kinase* (FAK), ICAM und Srf auf eventuelle Expressionsunterschiede untersucht. Auch diese Proteine spielen möglicherweise eine Rolle bei der podozytären Schädigung der Niere. Keine Unterschiede in der RNA Expression zeigte sich bei Rho A, Src, Srf, FAK, B7-1, ICAM und Ezrin. Mäßig erhöht war die Expression der RNA des Proteins Rho C. Die RNA von ROCK 1 und 2 stellte sich als deutlich erhöht dar.

Die für inflammatorisch wirksame Proteine kodierende RNA wurde ebenfalls untersucht, um Hinweise auf ein eventuelles Entzündungsgeschehen zu erhalten. Hierzu wurden IP-10, MCP-1 und TGF- β untersucht. Die Ergebnisse zeigten für IP-10 und MCP-1 eine sehr deutliche, für TGF- β eine deutliche Erhöhung in der Expression der RNA.

Strukturproteine

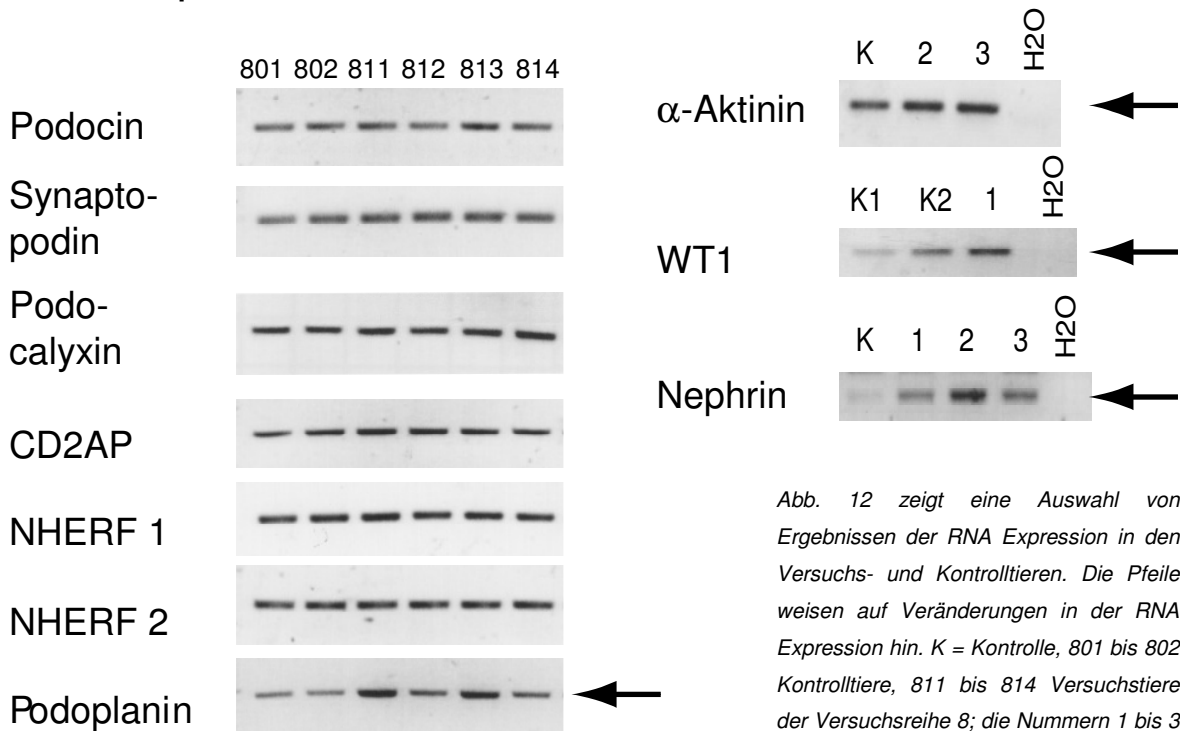
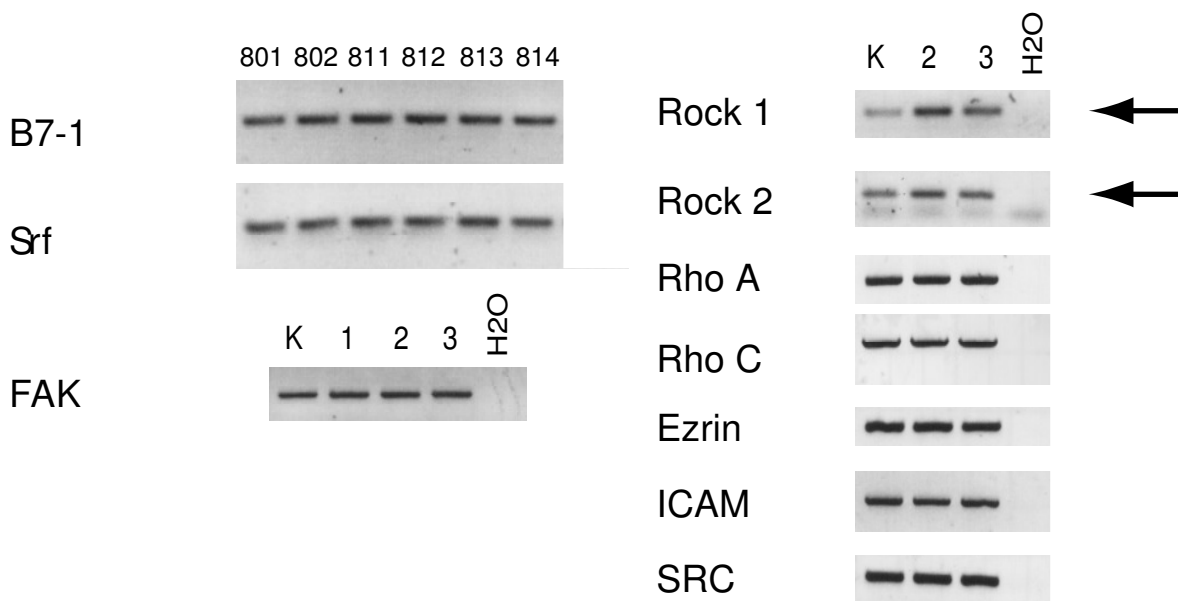
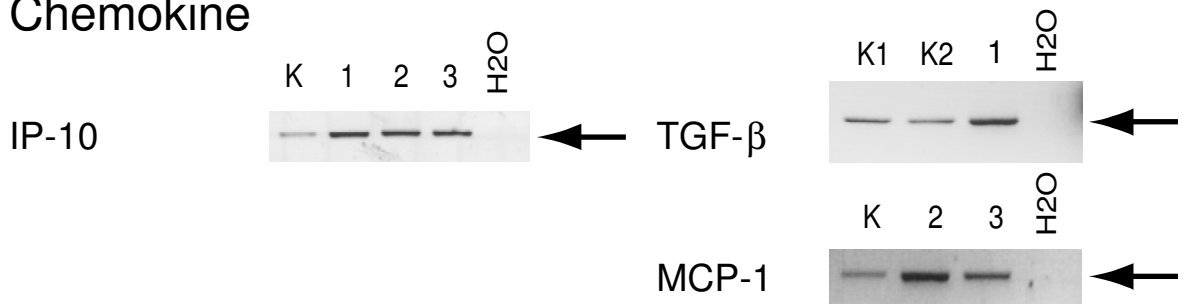


Abb. 12 zeigt eine Auswahl von Ergebnissen der RNA Expression in den Versuchs- und Kontrolltieren. Die Pfeile weisen auf Veränderungen in der RNA Expression hin. K = Kontrolle, 801 bis 802 Kontrolltiere, 811 bis 814 Versuchstiere der Versuchsreihe 8; die Nummern 1 bis 3 bezeichnen ebenfalls Versuchstiere der Versuchsreihe 5. H₂O Negativkontrolle mit Wasser

Signaltransduktion



Chemokine



Bei keiner untersuchten RNA kam es im Vergleich zwischen den Versuchstieren und den Kontrolltieren zu einem signifikanten Abfall der Expression. Die verschiedenen Versuchsreihen zeigten vergleichbare Ergebnisse, wobei die Ergebnisse in der Versuchsreihe 8 am wenigsten deutlich ausgeprägt waren. Kranke proteinurische Tiere zeigten im Allgemeinen die signifikantesten Veränderungen der RNA Expression.

4.6. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

In der Versuchsreihe 8 wurde Material für ausführliche histologische Untersuchungen entnommen. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse beziehen sich auf diese Versuchsreihe. In der Regel waren die gezeigten Ergebnisse bei allen Versuchstieren vorhanden, wobei sie sich mit unterschiedlicher Deutlichkeit darstellten.

4.6.1. PAS-Färbung

Die PAS-Färbung ermöglicht eine Übersicht über die verschiedenen Strukturen der Mausniere. Die PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff Reaktion) stellt Kohlenhydrate mit Hilfe von Perjodsäure und Schiffscher Reagenz rot dar. So werden z.B. Muzine, aber auch α_1 Antitrypsin rot angefärbt. Die Zellkerne stellen sich nach Hämatoxylin Gegenfärbung blau dar.

Die PAS-Färbung zeigte im Vergleich zwischen den Versuchstieren und den Kontrolltieren deutliche Veränderungen. In den Glomeruli der Versuchstiere erschienen die Strukturen verwaschen. Proteinablagerungen im Mesangium und entlang der Kapillaren färbten sich in einigen Glomeruli an. Die Glomeruli der Versuchstiere erschienen im Ganzen größer und geschwollen. Zusätzlich waren glomeruläre und periglomeruläre Infiltrationen von Zellen zu erkennen, wobei sich einige Zellen durch ihren nierenförmigen Kern als mögliche Makrophagen darstellten. Diese beschriebenen Läsionen der Glomeruli stellten sich in der Regel fokal und segmental dar. In der Maus 813, dem am stärksten erkrankten Tier, waren diese Veränderungen sogar als diffuse Läsionen zu beobachten.

In einigen Tubuli der Tiere waren ebenfalls entlang des gesamten Verlaufs ausgefallene Proteine zu erkennen. Diese Ausfällung von Proteinen füllte zum Teil das gesamte Lumen betroffener Tubuli aus. Die Zellen der betroffenen Tubuli zeigten

abschnittsweise Vakuolen, in denen sich ebenfalls Protein anfärbte. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Resorptionsvakuolen. Die Tubuluszellen waren geschwollen und hatten teilweise nach apikal verlagerte Zellkerne. Diese Verlagerung des Zellkerns von basal nach apikal ist ein Zeichen für die bevorstehende Ablösung der betroffenen Zelle (Abb. 13a und 13b).

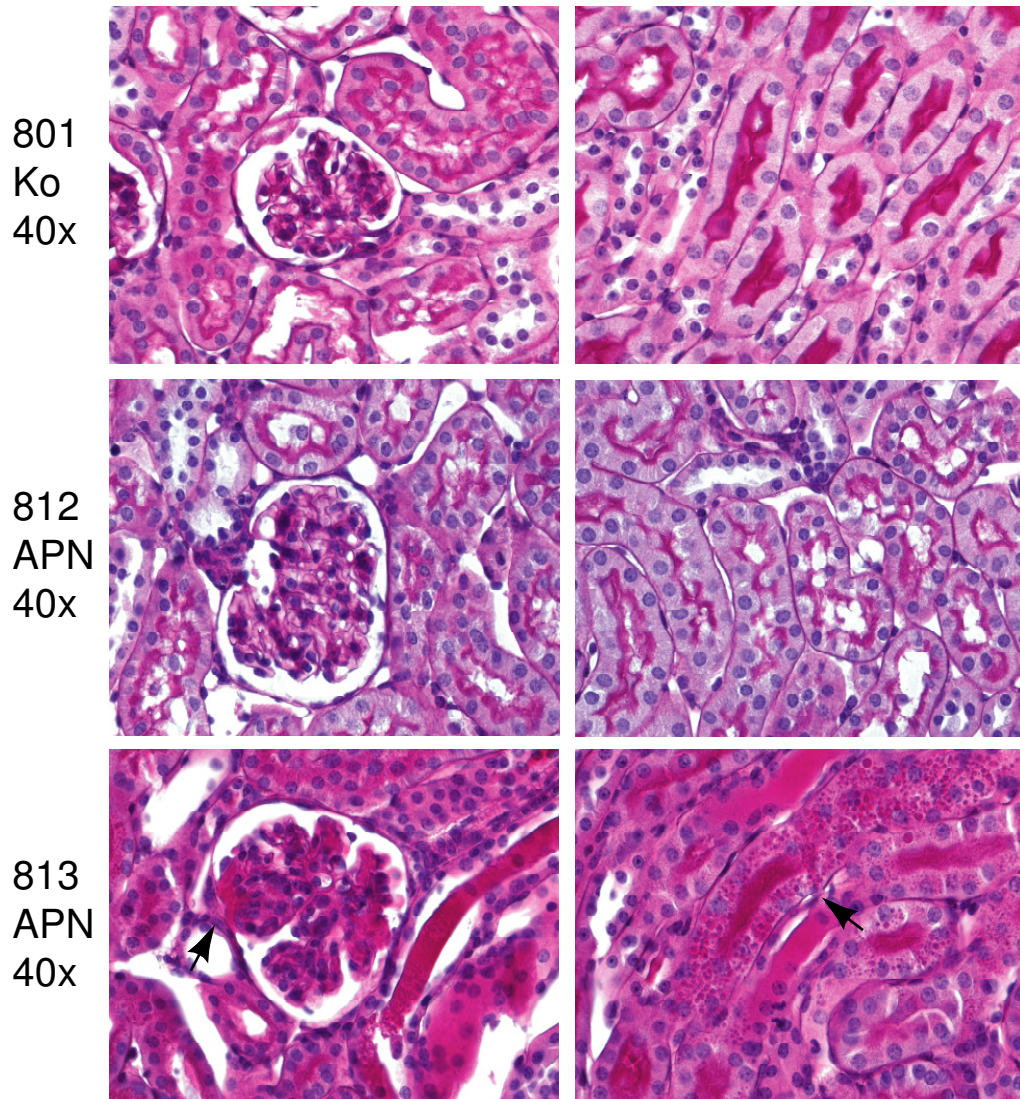


Abb. 13a zeigt die PAS-Färbungen von Kontrolltieren und Versuchstieren in 40-facher Vergrößerung. Die glomerulären und tubulären Strukturen bei den Versuchstieren wirken vergrößert. Die Pfeile bei Maus 813 weisen auf Ablagerungen im glomerulären Schlingenkonvolut (Pfeil linkes Bild) und auf mögliche Resorptionsvakuolen der Tubuli hin (Pfeil rechtes Bild), die mit hyalinem Material gefüllt sind (vergleiche Pfeile rechte Abb. Mausnummer 813). Diese Veränderungen lassen sich in den Gewebeschnitten der Kontrolltiere nicht beobachten. Ko = Kontrolle, APN = Versuchstier

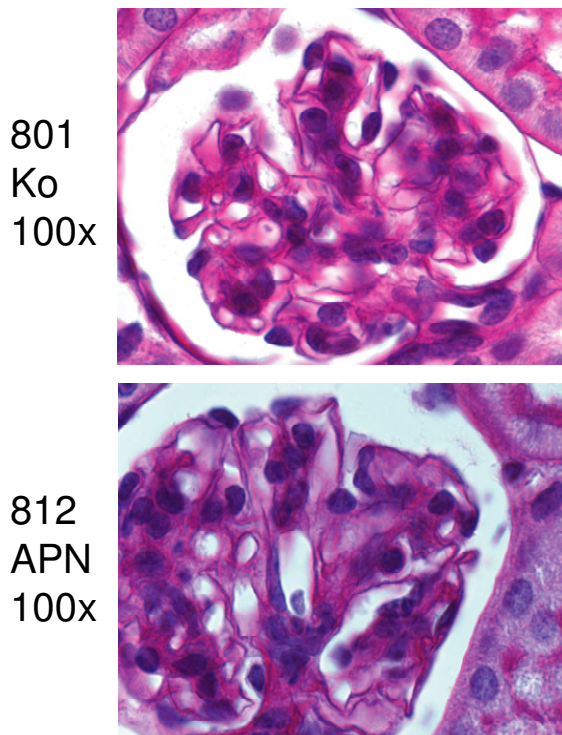


Abb. 13b zeigt die PAS-Färbung in 100-facher Vergrößerung. Ko = Kontrolle, APN = Versuchstier

4.6.2. Ergebnisse der anti-Podozyten-Antikörperfärbung in der Immunfluoreszenz und in Gewebeschnitten

Die Bindung des anti-Podozyten-Antikörpers in Glomeruli der achten Versuchsreihe wurde durch Immunfluoreszenz dargestellt. Das Bindungsmuster der Antikörper stellte in Versuchstieren spezifisch die Glomeruli dar. Die Markregion und die Tubuli in der Rindenregion zeigten keine Antikörperbindung (Abb. 14a). In den Glomeruli war ein lineares Ablagerungsmuster entlang der glomerulären Filtrationsbarriere erkennbar (Abb. 14a). Das Mesangium der Glomeruli war von diesen Antikörperablagerungen weitgehend frei. Der anti-Podozyten-Antikörper schien in den Versuchstieren *in vivo* an Epitope zu binden, die vor allem entlang der GBM exprimiert waren. Diese Anfärbung der Glomeruli war in allen Versuchstieren zu erkennen, während in den Kontrolltieren nach Immunisation mit unspezifischem Hasenserum ein solches Fluoreszenzmuster nicht dargestellt werden konnte.

Analog zu diesen Ergebnissen war in den mit Neufuchsin farbewickelten Gewebeschnitten eine intensive Anfärbung der Glomeruli der Versuchstiere zu erkennen. Die periglomeruläre Rindenregion und die Markzone waren frei von dieser

Anfärbung. In den Kontrolltieren war diese spezifische Anfärbung der Glomeruli nicht nachzuweisen (Abb. 14b). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass der Antikörper vor allem periphere Regionen der Glomeruli anfärbte. Die zentralen Regionen, die dem Mesangium entsprechen, färbten sich deutlich geringer an (Abb. 14b).

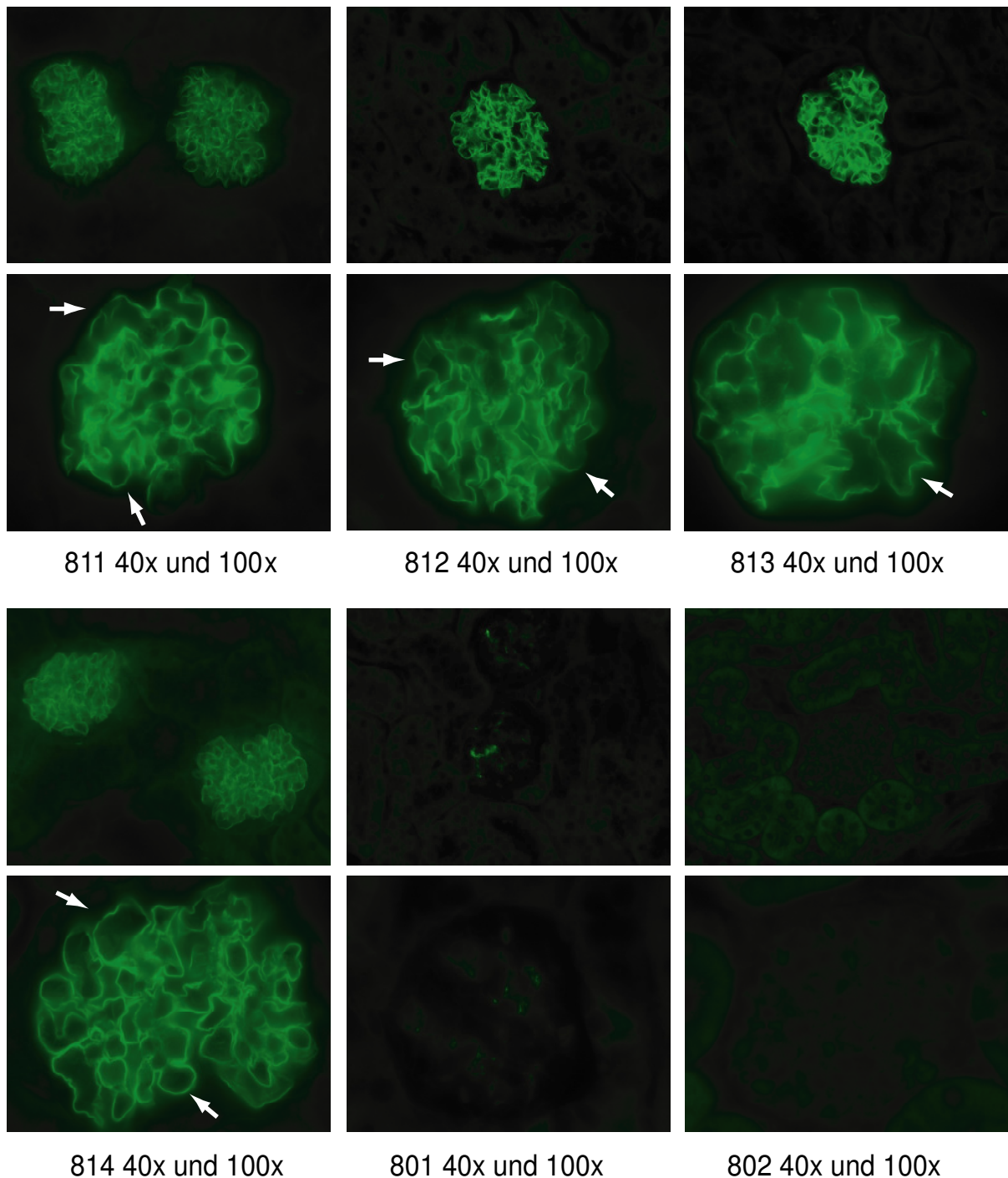


Abb. 14a zeigt die Bindung des anti-Podozyten-Antikörpers im Gewebe in der Immunfluoreszenzfärbung bei 40- und 100-facher Vergrößerung. Man erkennt ein feines lineares Ablagerungsmuster entlang der GBM in allen Versuchstieren (Pfeile). Der Antikörper färbt selektiv nur glomeruläres Gewebe an. Die umgebenen Rindengebiete und das Nierenmark werden vom Antikörper nicht gefärbt. 801 bis 802 Kontrolltiere, 811 bis 814 Versuchstiere

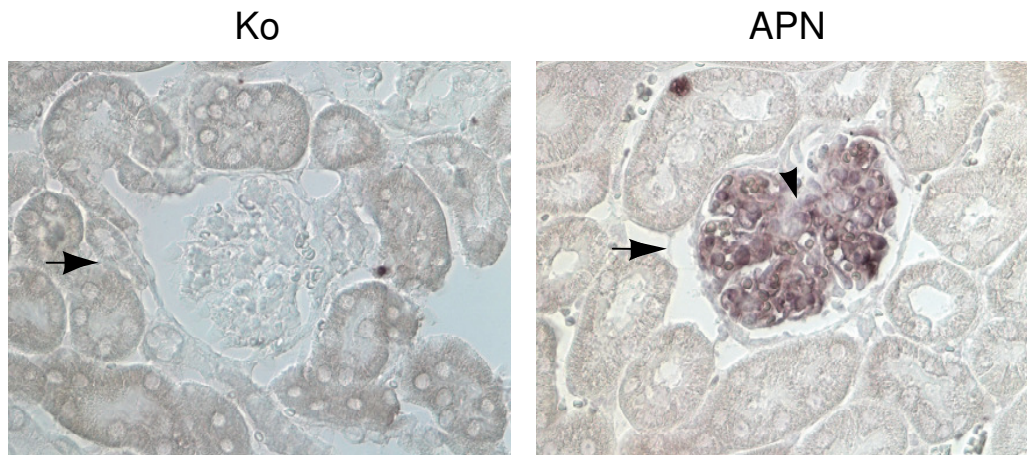


Abb. 14b zeigt die Bindung des anti-Podozyten-Antikörpers im Gewebe in der DAB Färbung bei 40-facher Vergrößerung. Der Antikörper färbt in den Gewebeschnitten der Versuchstiere selektiv das glomeruläre Gewebe an (Pfeil rechte Abb.), während die Glomeruli der Kontrolltiere ungefärbt bleiben (Pfeil linke Abb.). Die zentralen Anteile der Glomeruli erscheinen schwächer gefärbt (Pfeilspitze rechte Abb.)

4.6.3. Ergebnisse der IgG- und IgM-Färbungen

Unspezifische murine IgG- und IgM-Antikörper wurden in Versuchs- und Kontrolltieren immunhistologisch nachgewiesen. Beide Antikörpergruppen können bei verschiedenen humanen Glomerulonephritiden in Immunkomplexen nachgewiesen werden. Das Verteilungsmuster könnte daher einen Hinweis auf die Pathogenese der Podozytenschädigung liefern.

Schon in der Übersichtsaufnahme war zu erkennen, dass sich murines IgG in den Glomeruli der Versuchsmäuse detektieren ließ. Die GBM, die sich in der anti-Podozyten-Antikörperfärbung noch als feine herausstechende Struktur darstellte (vergl. Abb. 14 vorherige Seite), war hier nicht in derselben Deutlichkeit erkennbar. Die Ablagerungen der Immunglobuline zeigten eher eine mesangiale Betonung, die Peripherie der Glomeruli wurde schwächer angefärbt (Abb. 15a). Das Ablagerungsmuster erschien im Ganzen gröber. So wurde deutlich, dass die Ablagerungsmuster des anti-Podozyten-Antikörpers und der murinen IgG-Antikörper nicht deckungsgleich waren. IgG-Antikörper waren vor allem als Depots in Immunkomplexen im Mesangium zu detektieren (Abb. 15a), wohingegen der anti-Podozyten-Antikörper sich entlang der GBM darstellte (Abb. 14a).

Es wurden ebenfalls Ablagerungen von murinem IgM in den Glomeruli der Versuchstiere detektiert. Das Ablagerungsmuster ähnelte dem der IgG-Ablagerungen. Die IgM-Ablagerungen stellten sich ebenfalls als Depots vor allem im

glomerulären Mesangium dar (Abb. 16). Ein lineares Ablagerungsmuster entlang der GBM, ähnlich der Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Podozyten-Antikörper, war nur an wenigen Stellen zu erkennen. Die Ablagerungen der IgM-Antikörper waren im Vergleich zu den IgG-Ablagerungen in allen Mäusen proportional schwächer und nicht in allen Teilen des glomerulären Konvoluts zu beobachten. An den Stellen, an denen sie auftraten, schienen sie jedoch mit den IgG-Ablagerungen deckungsgleich zu sein. Ein gemeinsames Vorkommen in Form von Immunkomplexen erschien als sinnvolle Erklärung.

Zusätzlich konnten in den Tubuli kranker Mäuse Ausfällungen von in den Primärharn gelangten murinem IgG erkannt werden (Abb. 15b). Dieses IgG stellte sich in einigen Tubuli als starkes Signal dar und war wahrscheinlich durch den defekten glomerulären Filter in den Harn gelangt. Eine Detektion von murinem IgM im Lumen einzelner Tubuli gelang bei keiner Maus.

In Kontrollen waren nur minimale Ablagerungen von IgG und IgM nachweisbar. Die Lumen der Tubuli und Sammelrohre waren frei von murinen Antikörpern (Abb. 15a).

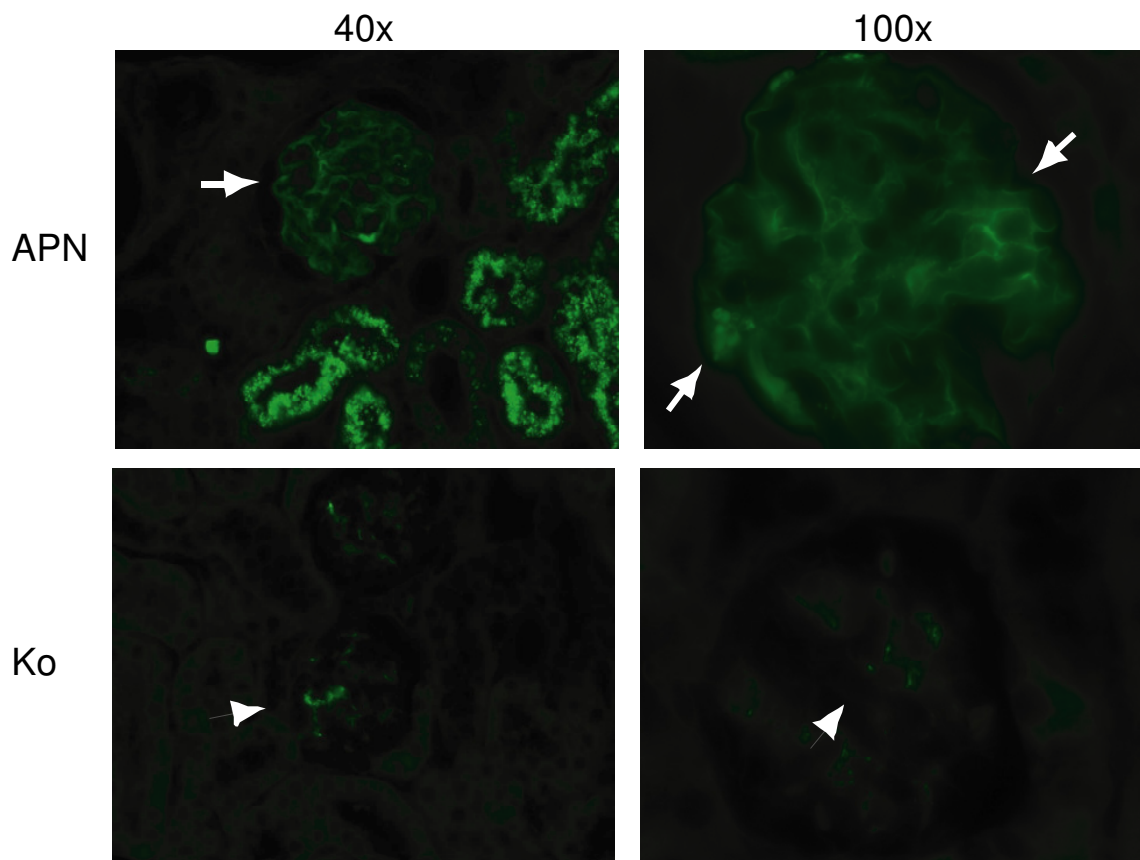


Abb. 15a

Abb. 15a zeigt die IgG-Immunfluoreszenzfärbung in 40- und 100-facher Vergrößerung. Die Nieren der Versuchstiere lassen eine Färbung im Bereich der Glomeruli erkennen (Pfeile). Weiterhin erkennt man in einigen Tubuli ebenfalls murines IgG (linkes oberes Bild). Die Kontrollen sind von diesen glomerulären IgG-Ablagerungen frei (Pfeilspitzen).

100x

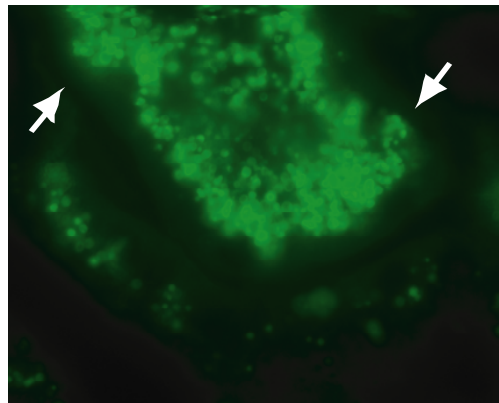
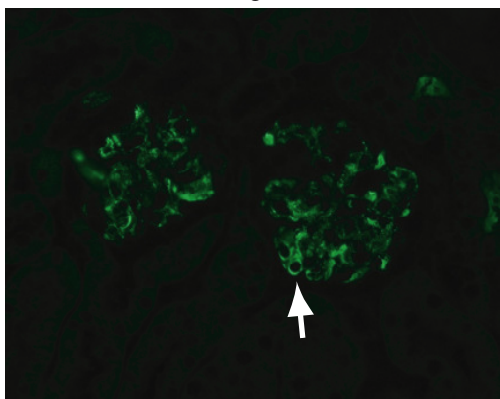


Abb.15b

Abb. 15b zeigt eine 100-fache Vergrößerung von in den Primärharn gelangten murinem IgG in den Nieren der Versuchstiere. In den Kontrollen war kein IgG in den Tubuli nachzuweisen.

40x



100x

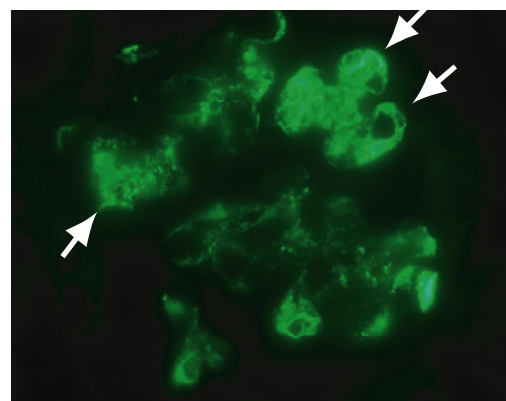
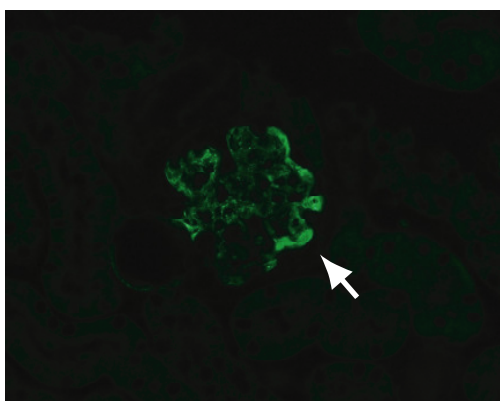
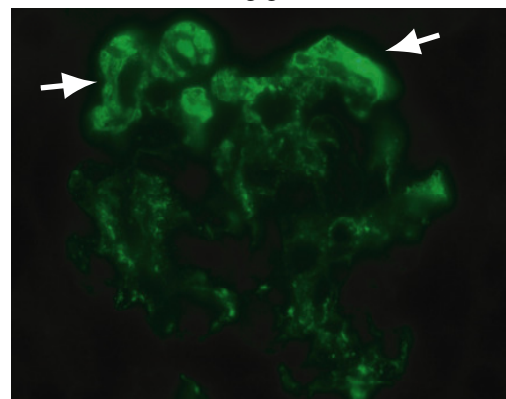


Abb. 16

Abb. 16 zeigt die IgM-Immunfluoreszenzfärbung in 40- und 100-facher Vergrößerung. Die Nieren der Versuchstiere lassen eine deutliche Färbung im Bereich der Glomeruli erkennen (Pfeile). Die Färbung erscheint segmental in Konglomeraten entlang der äußeren Kapilarschlingen. In Kontrolltieren war kein spezifisches IgM zu detektieren (Bilder nicht gezeigt).

4.6.4. Ergebnisse der Immunzellfärbungen

Die folgenden Färbungen dienen der Darstellung von immunkompetenten Zellen und damit dem Nachweis einer eventuell abgelaufenen spezifischen oder unspezifischen Entzündungsreaktion. Nach der immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte randomisiert und geblindet am Mikroskop ausgezählt. Alle Ergebnisse waren durch einen t-Test für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz getestet worden. Die dargestellten Ergebnisse waren alle statistisch signifikant.

4.6.4.1. Ergebnisse der B220-Färbung

Die Färbung diente der Quantifizierung von murinen B-Zellen in Glomerulus, Tubulus und Kapillaren der Nieren von Kontroll- und Versuchstieren. Dazu wurden je 30 Glomeruli und das darumliegende Nierenparenchym begutachtet. In den Versuchstieren 812 bis 814 war eine signifikante Erhöhung der B220-positiven Zellen im tubulären Interstitium gegenüber den Kontrolltieren nachzuweisen (Abb. 17). Maus 811 zeigte diese Veränderung der B220-positiven Zellen nicht. Glomerulär konnten bei keiner Maus signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden. Diagramm 2 zeigt die Ergebnisse der Auszählung. Die Werte der Kontrolltiere sind gemittelt.

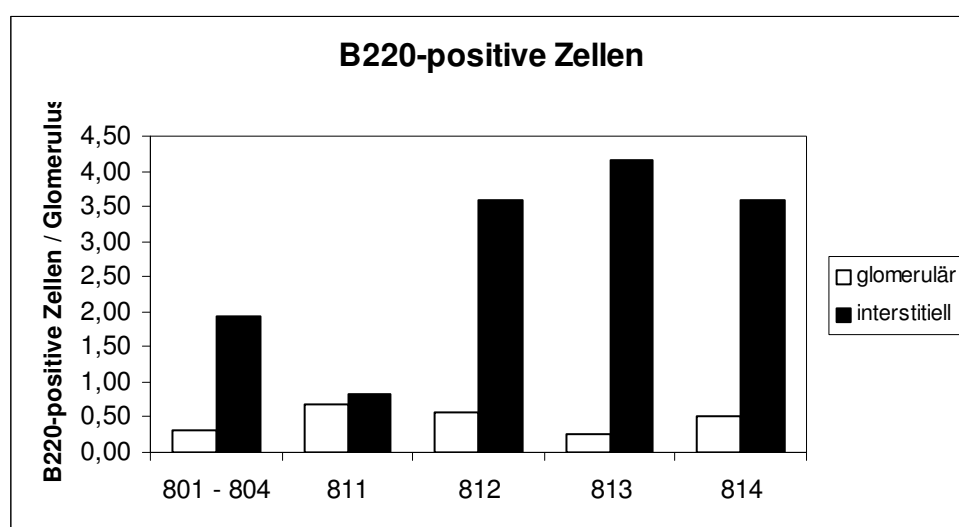


Diagramm 2 zeigt die Anzahl der B220-positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden getrennt im interstitiellen und glomerulären Kompartiment ausgezählt. 801 bis 804 stellt die gemittelten Werte der Kontrolltiere dar, 811 bis 814 zeigt die Versuchstiere

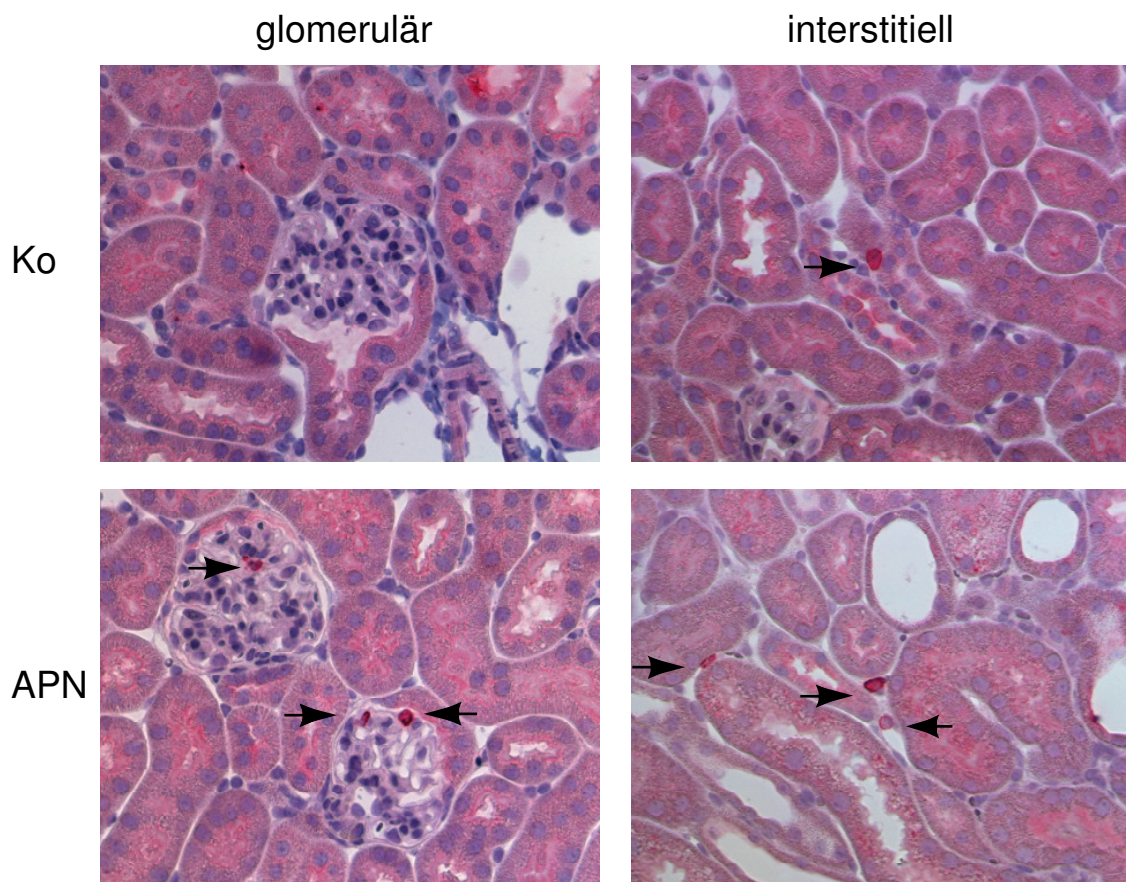


Abb. 17

Abb. 17 zeigt die B220-Färbung der Gewebeschnitte der Kontroll- und Versuchstiere in 40-facher Vergrößerung. Die Pfeile weisen auf die gefärbten murinen B-Zellen hin. Ko = Kontrolle, APN = Versuchstier

4.6.4.2. Ergebnisse der CD3-Färbung

CD3 diente als Marker für T-Lymphozyten. Die Versuchstiere zeigten eine signifikante Erhöhung der CD3-positiven Zellen in den Glomeruli gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 18). Es kam zu einer Verdopplung der CD3-positiven Zellen in den Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren. Bei Maus 813 wurde ebenfalls ein erheblicher Anstieg der Zellen interstitiell deutlich. Dieser interstitielle Anstieg der CD3-positiven Zellen zeigte sich nur bei dieser Maus, so dass die Erhöhung der Zellzahl vor allem glomerulär nachweisbar war. Die Diagramme 3a bis 3b zeigen die Ergebnisse der Zählung der CD3-positiven Zellen.

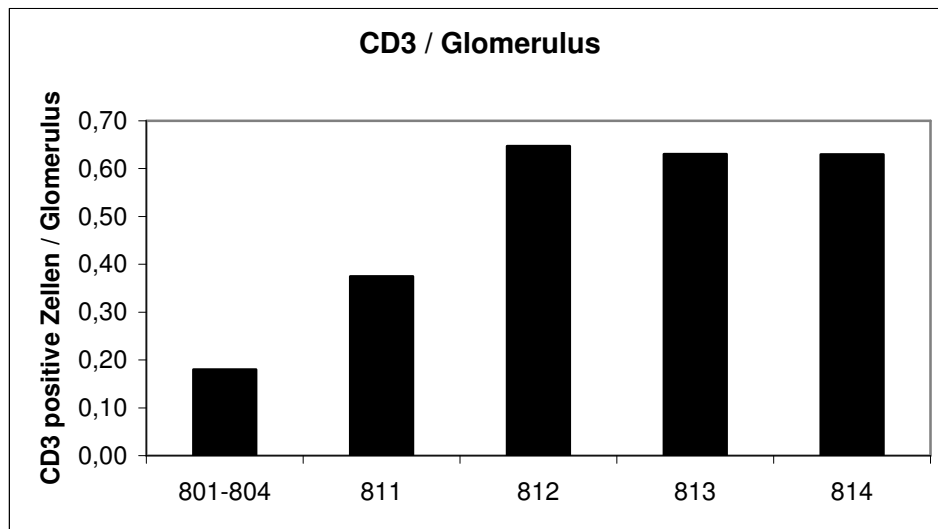


Diagramm 3a zeigt die Anzahl der CD3-positiven Zellen pro Glomerulum in einem Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung. Die Werte der Kontrolltiere (801 bis 804) wurden gemittelt.

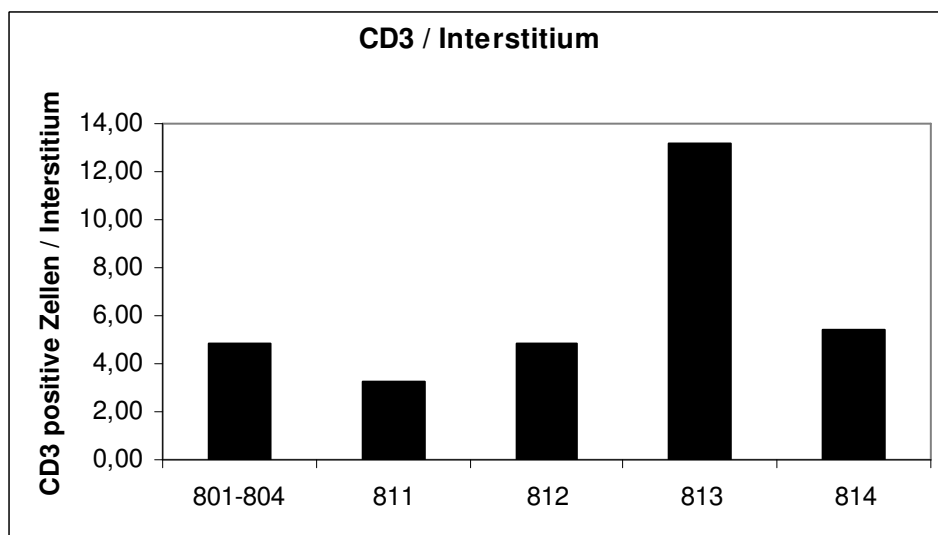


Diagramm 3b zeigt die Anzahl der CD3-positiven Zellen im Interstitium in einem Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung. Die Werte der Kontrolltiere (801 bis 804) wurden gemittelt.

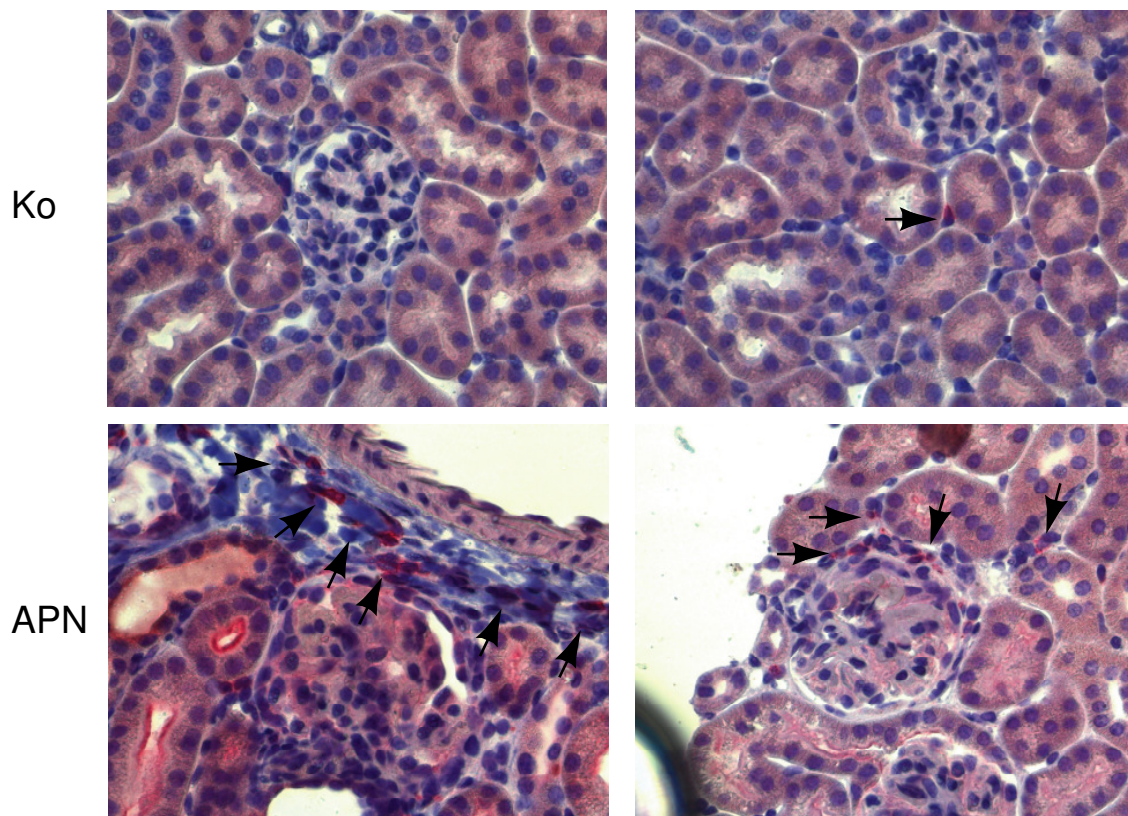


Abb. 18

Abb. 18 zeigt die CD3-Färbung der Gewebeschnitte der Kontroll- und Versuchstiere in 40-facher Vergrößerung. Die Pfeile weisen auf die gefärbten murinen T-Zellen hin. Die Zellen waren vor allem periglomerulär und perivaskulär zu erkennen. Ko = Kontrolle, APN = Versuchstier

4.6.4.3. Ergebnisse der F4/80-Färbung

Das F4/80-Antigen ermöglichte die Identifizierung von Makrophagen in den histologischen Schnitten. Die Färbung zeigte eine massive Erhöhung der F4/80-positiven Zellen in den Versuchstieren gegenüber Kontrollen. Die Zellen waren vor allem perivaskulär und periglomerulär lokalisiert (Abb. 19). Interstitiell waren auch Makrophagen nachweisbar, jedoch in deutlich geringerem Maße (Abb. 19). Die starke unspezifische Anfärbung des Bürstensaumes der proximalen Tubuli ließ eine exakte quantitative Aussage nicht zu.

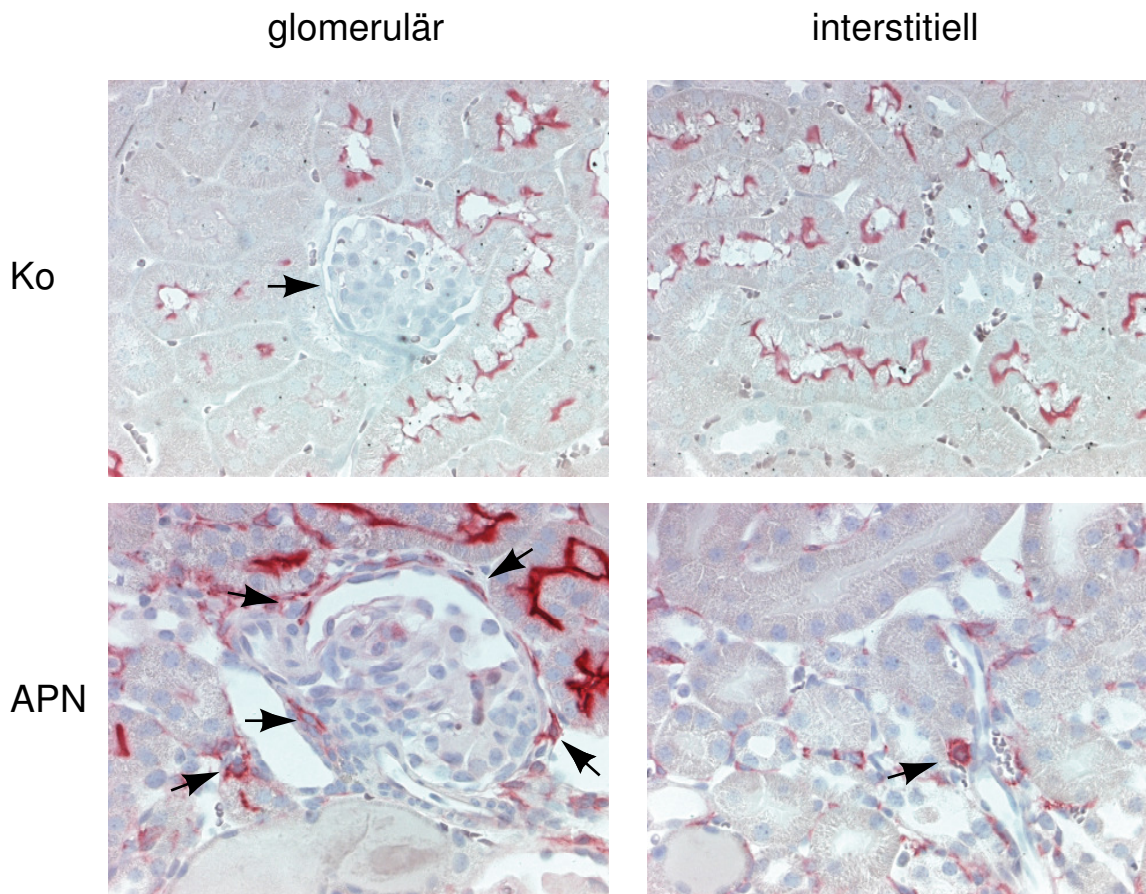


Abb. 19

Abb. 19 zeigt die F4/80-Färbung der murinen Makrophagen in den Gewebeschnitten der Kontroll- und Versuchstiere. Eine quantitative Aussage war auf Grund der starken Färbung des Bürstensaums der proximalen Tubuli nicht möglich. Die schrägen Pfeile zeigen Makrophagen, die hauptsächlich periglomerulär lokalisiert waren. Die geraden Pfeile zeigen auf die schwach gefärbten Glomeruli. Ko = Kontrolle, APN = Versuchstier

4.6.5. Ergebnisse der WT1-Färbung

Die Färbung diente zur Identifizierung und zur morphologischen Beurteilung der Podozyten in den Glomeruli der Gewebeschnitte. Dafür wurden Schnitte von 1 μm Dicke verwendet. Es gab keine morphologisch sichtbaren Unterschiede der Form der einzelnen Podozyten in den Versuchstieren und den Kontrollen, jedoch zeigte sich, dass bei den behandelten Mäusen weniger Podozyten in der Mitte des glomerulären Schlingenkonvolutes zu erkennen waren (Abb. 20).

Eine randomisierte und geblindete Auszählung der WT1-positiven Zellen wurde an Schnitten von 3 μm Dicke durchgeführt. Alle Versuchstiere enthielten signifikant

weniger Podozyten als Kontrolltiere in 50 ausgezählten Glomeruli. Besonders deutlich wurden die Ergebnisse bei den Tieren 813 und 814, die eine erhebliche Verminderung der WT1-positiven Zellen aufwiesen. Bei vermeintlich gesünderen Versuchstieren, wie der Maus 811, war der Abfall geringer. Die Diagramme 4a bis 4c zeigen die Ergebnisse der WT1-Zählung.

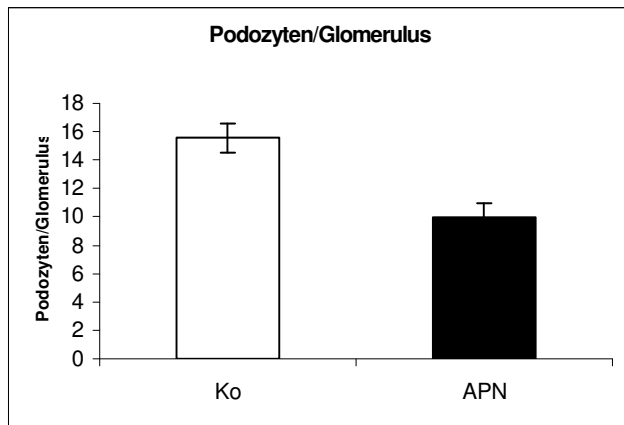


Diagramm 4a zeigt die Anzahl der Podozyten pro Glomerulum. Die Werte der Kontrolltiere und Versuchstiere sind jeweils gemittelt. Ko = Kontrollen, APN = Versuchstiere

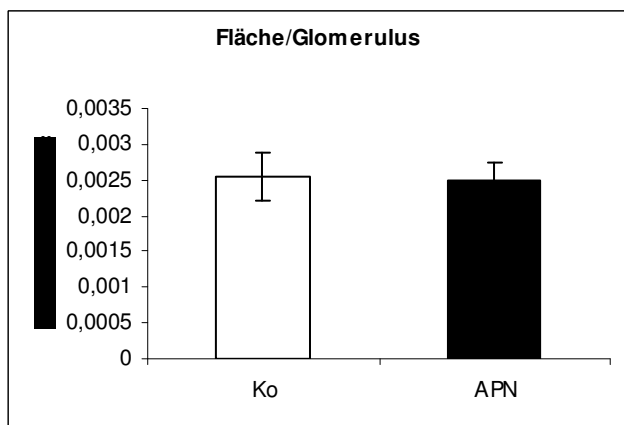


Diagramm 4b zeigt die Summe der Flächen der ausgezählten Glomeruli. Die Werte der Kontrolltiere und Versuchstiere sind jeweils gemittelt. Ko = Kontrollen, APN = Versuchstiere

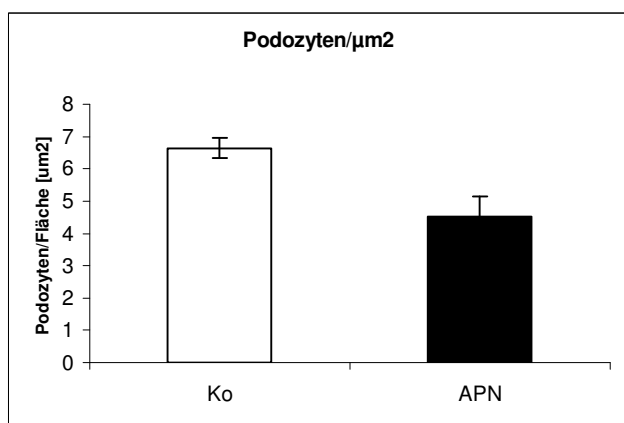


Diagramm 4c zeigt die durchschnittliche Anzahl der Podozyten pro μm^2 . Die Werte der Kontrolltiere und Versuchstiere sind jeweils gemittelt. Ko = Kontrollen, APN = Versuchstiere

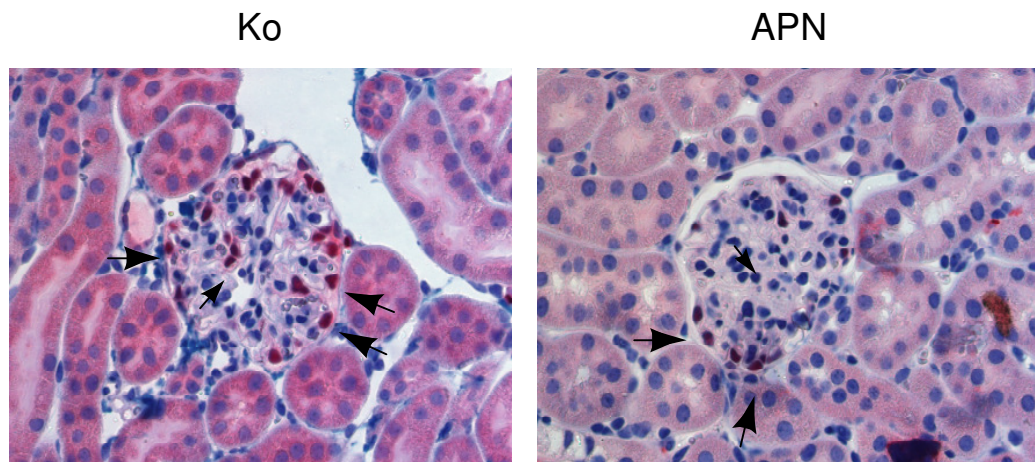


Abb. 20

Abb. 20 zeigt die WT1-Färbung der murinen Podozyten in den Kontrolltieren und Versuchstieren in 40-facher Vergrößerung. Die großen Pfeile zeigen einige der gefärbten Podozyten. Die Glomeruli der Versuchstiere enthält im Vergleich zu den Glomeruli der Kontrolltiere weniger Podozyten. Auch im zentralen Bereich der Glomeruli der Versuchstiere zeigen sich in der Regel keine Podozyten mehr (kleine Pfeile). Ko = Kontrolle, APN = Versuchstier

4.6.6. Ergebnisse der Färbungen des glatt-muskulären Aktins und des Kollagens Typ IV

Diese Färbungen dienten dem Nachweis einer eventuell eingetretenen Sklerose der Nieren der Versuchstiere. Glatt-muskuläres Aktin und Kollagen Typ IV werden bei sklerotischen Umbauprozessen und myoepithelialer Transformation von residenten Nierenzellen vermehrt gebildet. Bei keinem der Versuchstiere konnte eine Vermehrung des glatt-muskulären Aktins gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 21). Die Glomeruli färbten sich unauffällig, während sich das in den glatten Muskelzellen der Nierenarterien und Arteriolen enthaltene glatt-muskuläre Aktin deutlich darstellte (Abb. 21).

Bei der Kollagen Typ IV-Färbung kam es analog zu keiner Vermehrung in den Gewebeschnitten der Versuchstiere am Tag 14 (Abb. 22). Die Maus 813, das Versuchstier mit der stärksten Immunkomplexbildung, zeigte eine Abnahme von Kollagen IV in den Glomeruli. Diese Abnahme wurde jedoch nicht quantifiziert. So war davon auszugehen, dass kein Tier der Versuchsreihe zu diesem Zeitpunkt Anzeichen für sklerotische Umbauprozesse zeigte.

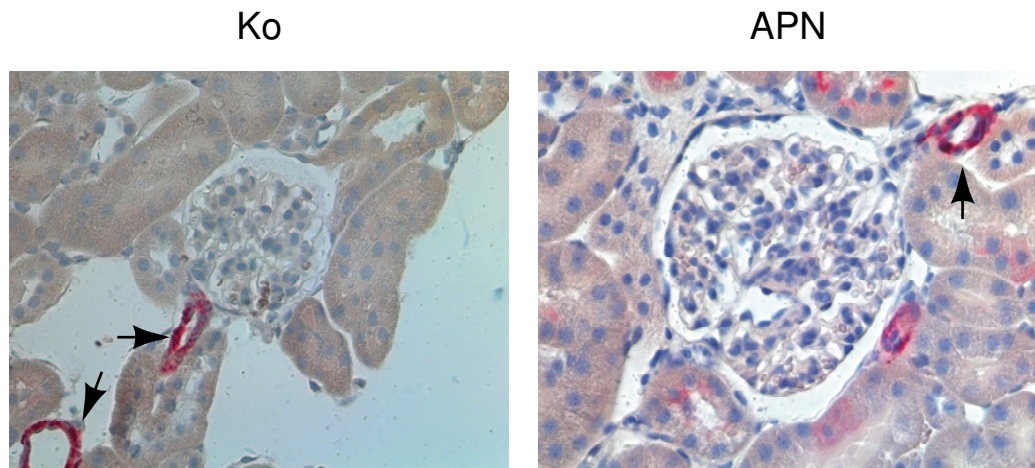


Abb. 21

Abb. 21 zeigt die Färbung des glatt-muskulären Aktins in 40-facher Vergrößerung. Die Pfeile weisen auf das gefärbte Aktin in den Wänden von Gefäßen hin. Die Glomeruli der Kontrolltiere sowie der Versuchstiere sind frei von glatt-muskulärem Aktin.

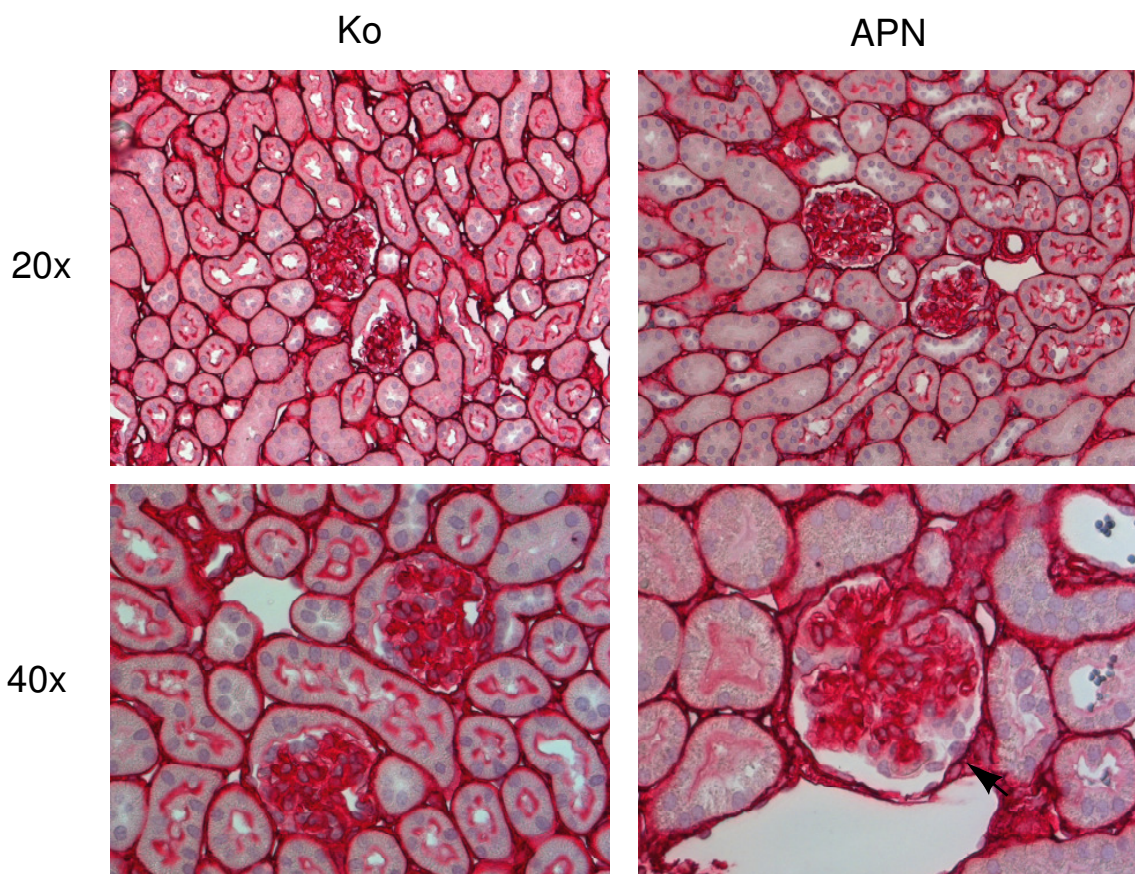


Abb. 22

Abb. 22 zeigt die Färbung des Kollagens vom Typ IV in 20- und 40-facher Vergrößerung. Man erkennt keine Vermehrung dieses Kollagentyps in den Nieren der Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrollen. Stattdessen erscheint der abgebildete Glomerulus eher weniger gefärbt (Pfeil im unteren rechten Bild).

4.6.7. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie

Herr Prof. Kerjaschki übermittelte uns einige von ihm in Wien ausgewertete Übersichts- und Detailbilder. Auf diesen Bildern konnte man mesangiale Depots aus elektronendichtem Material an einigen Stellen der Glomeruli erkennen (Abb. 23). In den Bereichen, in denen diese Depots vorkamen, verloren die Podozyten ihre normale Struktur. Es kam zur Abrundung der Zellen mit Ablösung und Rückbildung der Fußfortsätze. Die GBM war an diesen Stellen nicht mehr von einem dichten Netz podozytärer Fußfortsätze umgeben. An Stellen, an denen diese Depots nicht vorkamen, erschienen die Podozyten und ihre Fußfortsätze morphologisch normal. Laut Aussage von Prof. Kerjaschki könnte es sich bei diesen Depots um mögliche Immunkomplexe handeln. Eine Verdickung der GBM mit einem Vorkommen von Spikes war nicht zu erkennen. In den Kontrolltieren konnten weder Depots noch sichtbare podozytäre Schädigungen nachgewiesen werden.

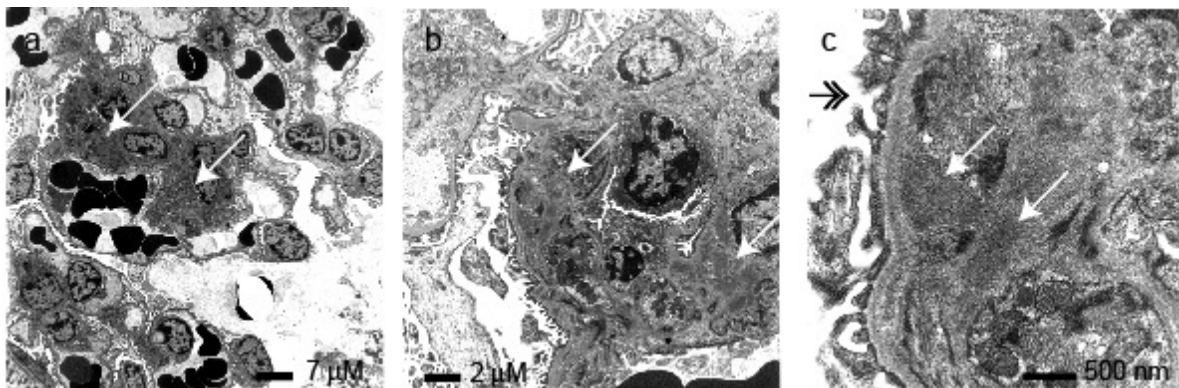


Abb. 23 zeigt die Elektronenmikroskopie eines Glomerulus 10 Tage nach anti-Podozyten-Antikörper Injektion. Vergrößerung a) 1:1200, b) 1:4000, c) 1:15000. Ein Ausschnitt aus a wird in b und c weiter vergrößert dargestellt. Dunkelgraue Immunkomplexe sind durch Pfeile gekennzeichnet. Der Doppelpfeil in c weist auf verschmolzene Fußfortsätze hin.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen selektiven podozytären Schaden in Mausnieren hervorzurufen. Dafür wurde in mit murinen Podozyten immunisierten Kaninchen eine Antikörperbildung hervorgerufen. Diese Antikörper wurden Mäusen appliziert. Um die Selektivität des verwendeten Antikörpers gegen Podozyten zu gewährleisten, mussten möglichst differenzierte Podozyten in der Zellkultur für die Immunisierung der Kaninchen gezüchtet werden. Die von diesen differenzierten Podozyten *in vitro* präsentierten Antigene würden dann *in vivo* im Mausmodell den dort von Podozyten präsentierten Antigenen entsprechen. Der Differenzierungsgrad in undifferenzierten und differenzierenden Podozyten wurde anhand von Markermolekülen bestimmt, die nur in differenzierten Podozyten vorkommen. Der Vergleich der podozytären Proteine Nephrin, Synaptopodin und Podocin in der Immunfluoreszenz in undifferenzierten und differenzierten Podozyten zeigte ein unterschiedliches Expressionsmuster. Nephrin zeigte in den differenzierten Podozyten ein Bindungsmuster entlang der Zellmembran der Fußfortsätze, wohingegen in undifferenzierten Podozyten ein membranäres Bindungsmuster nicht nachweisbar war. Dieses zeigt einen Umbau der Fußfortsätze mit Bildung der funktionell wichtigen Anteile der Schlitzmembran. Außerdem konnte Nephrin in granulären Vesikeln im Zytosol der differenzierten Podozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden sich nur wenige Vesikel in undifferenzierten Zellen, was auf die verstärkte Bildung von Nephrin während der Ausdifferenzierung hinweist. Das Bindungsmuster von Nephrin in differenzierten Zellen entspricht dem von Schiwiek et al. beschriebenen Muster [98]. Diese Arbeitsgruppe zeigte Nephrin in Regionen von Zell-Zell-Kontakten entlang der Zellmembran und in perinukleären Regionen in ausdifferenzierten Podozyten.

Synaptopodin und Podocin konnten in ausdifferenzierten Podozyten entlang von Aktinfilamenten, vor allem in Regionen der Fußfortsätze, dargestellt werden, ähnlich der Darstellung von Schiwiek und Endlich [98]. In undifferenzierten Podozyten war Synaptopodin und Podocin nicht vorhanden, so dass von einem Beginn der Expression im Laufe der Ausdifferenzierung ausgegangen wurde. Da wir bei unseren Experimenten die Podozyten nicht konfluent wachsen ließen, war eine Aussage über die Lokalisation von Nephrin, Podocin und Synaptopodin in Regionen von Zell-Zell-Kontakten nicht möglich.

Analog zu diesen Ergebnissen wurde durch Western Blots mit Podozytenlysaten eine Ausdifferenzierung der Podozyten nachgewiesen. Die Expression der Proteine Nephrin, Synaptopodin und Podocalyxin konnte durch spezifische Banden gezeigt werden und war in differenzierten Zellen stärker als in undifferenzierten Zellen. Die Gruppe von Endlich et al., die diese Zelllinie entwickelte, zeigte das Vorkommen derselben podozytenspezifischen Proteine in dieser Zellreihe in ausdifferenzierten Podozyten [98]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden über 14 Tage ausdifferenzierte Podozyten zur Herstellung des anti-Podozyten-Antikörpers verwendet. Kaninchen wurden über vier Monate wiederholt mit Podozytenlysaten geimpft. Das Serum dieser Kaninchen mit den darin neu gebildeten anti-Podozyten-Antikörpern wurde dann Mäusen injiziert, um eine Antigen-Antikörper-Reaktion auf den Podozyten im Glomerulus der Nieren auszulösen. Das Bindungsverhalten des anti-Podozyten-Antikörpers wurde per Immunfluoreszenzfärbung auf kultivierten undifferenzierten und differenzierten Podozyten überprüft. Der Antikörper band an beide Differenzierungsstufen, erkannte aber verschiedene Antigene *in vitro*. Undifferenzierte Zellen färbte der Antikörper schwächer als differenzierte Podozyten. Vor allem die Zellmembran war in den differenzierten Podozyten deutlicher als in den undifferenzierten Zellen angefärbt. Eine Bindung des Antikörpers stellte sich insbesondere im Bereich der Fußfortsätze dar. Die Bereiche der sich bildenden Fußfortsätze beinhalten die funktionell wichtigen Anteile der Schlitzmembran. Eine starke Bindung des Antikörpers in diesem Bereich macht Membranproteine als mögliche Antigen-Epitope des Antikörpers wahrscheinlich. Der Antikörper färbte außerdem perinukleäre Strukturen und den Nukleus in beiden Differenzierungsstufen. Durch Einfrieren und Auftauen der Zellen vor der Immunisierung der Kaninchen wurden die Podozyten teilweise zerstört. Die immunisierten Kaninchen bildeten aus diesem Grund nicht nur Antikörper gegen Epitope an der Zelloberfläche, sondern auch Antikörper gegen Strukturen des Zytoplasmas und des Kerns, was eine Anfärbung dieser Strukturen erklärt.

Weiterhin wurde das Bindungsverhalten des Antikörpers durch Western Blots untersucht, bei denen der Antikörper mit differenzierten und undifferenzierten Podozytenlysaten inkubiert wurde. Der polyklonale Antikörper detektierte Banden unterschiedlicher Molekulargewichte in beiden Differenzierungsstufen. Es zeigten sich Banden bei den differenzierten Podozyten, die bei den undifferenzierten Zellen auch nach langer Belichtungszeit nicht nachweisbar waren. Diese Banden konnten

bei 110 kD, 80 kD, 70 kD, 50 kD und 40 kD nachgewiesen werden. Bei diesen Banden handelte es sich wahrscheinlich um Proteine, deren Bildung durch den Thermoshift induziert wurde und die aus diesem Grund nur auf differenzierten Podozyten nachweisbar waren. Bei diesen Proteinen könnte es sich um Proteine des Membrankomplexes handeln. Die Molekulargewichte der neuen Banden auf dem Gel erlaubten Spekulationen, welche Proteine dies sein könnten. Bei der Bande bei 50 kD könnte es sich um Podocin handeln, bei der Bande bei 110 kD um Synaptopodin. Die Anwesenheit dieser Proteine konnten wir in unseren differenzierten Podozyten durch Immunfluoreszenzfärbungen nachweisen (siehe oben). Welche Proteine sich hinter den einzelnen Banden des Western Blots verbargen, lässt sich jedoch nicht sagen.

Um einen Überblick über den in den Versuchstieren verursachten Nierenschaden zu erhalten, wurden funktionelle Experimente durchgeführt. Das pathophysiologische Korrelat der beeinträchtigten glomerulären Filtrationseinheit ist die Proteinurie [2]. Daher wurden alle Versuchs- und Kontrolltiere auf eine mögliche Proteinurie hin untersucht. Die Versuchstiere zeigten alle eine - teilweise massive - Proteinurie, so dass von einem Schaden der glomerulären Filtrationseinheit auszugehen war. Bei der dargestellten Proteinurie handelte es sich in erster Linie um eine Albuminurie, was durch die Höhe der prominenten Bande in den Coomassie gefärbten Gelen und durch die Ergebnisse des Albumin ELISAs gezeigt wurde. Ein zusätzliches Auftreten höhermolekularer Proteine im Urin, wie z.B. IgG, deutet auf einen schwereren Schaden der glomerulären Filtrationseinheit hin. Eine Ausscheidung von IgG mit dem Urin ließ sich per Western Blot nur am Tag 10 bei stark proteinurischen Tieren in geringem Maß und nach langer Belichtung darstellen, so dass von einer selektiven Proteinurie auszugehen war. Ein Vergleich zwischen den Coomassie gefärbten Gelen mit Mausurin erkrankter Tiere und einem Gel, das mit bekannten Mengen Albumin beladen wurde, erlaubte eine grobe Abschätzung der im Urin der Versuchsmäuse enthaltenen Albuminmenge. Die Urine der am stärksten proteinurischen Tiere enthielten maximal ca. 100 µg Albumin. Das entsprach einer Menge von 5 mg/ml Albumin im Urin einer stark proteinurischen Maus. Das durchschnittliche Gewicht eines Versuchstiers lag unter 30 g.

Um das Maß der Albuminausscheidung zu quantifizieren, wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Diese unterstrichen den enormen Anstieg der Albuminausscheidung mit dem Urin der Versuchstiere. Es kam zu einer Zunahme der

Albuminurie von 2000 ng/ml in den Kontrolltieren auf bis zu über 9 Mrd. ng/ml in den Versuchstieren. Wahrscheinlich stellten sich die erhobenen ELISA Daten als zu hoch dar, aber sie zeigten dieselbe Tendenz wie die Ergebnisse der Coomassie gefärbten Gele: Die Versuchstiere litten an einer massiven Albuminurie und alle Versuchstiere zeigten eine erhöhte Albuminausscheidung mit dem Urin. Durch die Notwendigkeit die Urine einiger Tiere bis zum 50000-fachen zu verdünnen, waren geringe Fehler in den Verdünnungsreihen und damit in den Messergebnissen unvermeidbar. Bei der anschließenden Errechnung der Albumin-Menge in den unverdünnten Proben wurden diese Fehler durch das Multiplizieren sichtbar und zeigten eine überproportional große Zunahme der Albuminausscheidung an.

Wir beobachteten in unserem Modell ab Tag 5 eine geringgradige Proteinurie. Am Tag 7 war Protein im Urin deutlich nachweisbar, die maximale Proteinausscheidung wurde am Tag 10 erreicht. Nach dem zehnten Tag kam es zu einem Rückgang der Proteinausscheidungen, wobei diese Werte nach zweieinhalb Wochen immer noch signifikant erhöht waren und deutlich über den vor Tag 10 gemessenen Werten lagen. Unsere Ergebnisse unterscheiden sich zu den in anderen Antikörper induzierten Modellen beschriebenen Zeitverläufen der Proteinurie. In allen vergleichbaren, durch spezifische Antikörper induzierten Glomerulonephritis-Modellen kommt es zu einer früher beginnenden Proteinurie. Im Nephritin-Antikörper-Modell kann eine unmittelbar nach Applikation beginnende Proteinurie mit einem Maximum am Tag 8 beobachtet werden und einem Abfall auf normale Werte am Tag 17 [70]. Auch beim Aminopeptidase A Modell ist sofort nach Injektion des Antikörpers eine dosisabhängige Proteinurie feststellbar, die mindestens 16 Tage andauert [73]. In der Thy-1.1 Nephritis der Maus kommt es 10 min nach Antikörpergabe zu einer Proteinurie mit einem Maximum nach fünf Stunden. Nach sieben Tagen ist die Proteinurie bei diesem Modell wieder nahezu normal [74]. Bei der passiven Heymann Nephritis der Ratte zeigt sich um den fünften Tag nach der Injektion eine einsetzende Proteinurie [66]. Der Beginn der Proteinurie und die Ausbildung einer manifesten Proteinurie liegen demnach vor dem Beginn der Proteinurie in unserem Modell. Die Dauer der Proteinausscheidung stellt sich in diesen Modellen insgesamt variabel dar, wobei in keinem der Antikörper-Modelle nach zweieinhalb Wochen noch deutlich erhöhte Urinalbuminwerte beobachtet wurden. Interessant ist in diesem Zusammenhang der späte Zeitpunkt der einsetzenden Proteinurie in unserem Mausmodell. Möglich ist ein immunvermittelter

Prozess mit einer zunächst spezifischen Antikörper-vermittelten Reaktion und einer dann folgenden Einwanderung von Entzündungszellen. Ob die Einwanderung der Entzündungszellen einen Anteil an der spät einsetzenden Proteinurie hat, bleibt unklar, ist aber eine denkbare Erklärung.

Eine starke Albuminurie geht mit einem Defekt der glomerulären Filtrationsbarriere und damit wahrscheinlich einer Schädigung der Podozyten einher [3, 15]. Um Hinweise auf eine Schädigung dieser Zellen in unserem Modell zu erhalten, wurden die Urine auf das von Podozyten gebildete Sialoprotein Podocalyxin untersucht. Die Ausscheidung dieses Proteins wurde von Kanno et al. bei humanen inflammatorischen und nicht-inflammatorischen glomerulären Erkrankungen untersucht. Seine Arbeitsgruppe zeigte, dass Podocalyxin im Urinsediment, besonders bei inflammatorischen, aber auch bei nicht-inflammatorischen glomerulären Erkrankungen gegenüber gesunden Kontrollen erhöht ist [99]. Podocalyxin im Urin kann nach diesen Untersuchungen als prognostischer Marker für die Schwere des glomerulären Schadens verwendet werden [99]. Wir konnten im Urin stark proteinurischer Tiere Podocalyxin Degradationsprodukte darstellen. Obwohl das Vorkommen von Podocalyxin im Urin nicht mit einer definitiven podozytären Schädigung gleichzusetzen ist, da dieses Protein in der Niere auch auf Endothelzellen und parietalen Epithelzellen der Bowman'schen Kapsel exprimiert wird [15], war dies ein erster Hinweis auf eine podozytäre Schädigung durch unseren anti-Podozyten-Antikörper.

Eine histologische Begutachtung der Podozyten gelang durch die WT1-Färbung. Da WT1 in Nieren nur von Podozyten exprimiert wird [3, 52], war bei der Anfärbung einer WT1-positiven Zelle von der Darstellung eines Podozyten auszugehen. Die Auszählung ergab einen signifikanten Abfall der WT1-positiven Zellen per Glomerulum in den Versuchstieren. Podozyten haben nach einem renalen Schaden nicht die Möglichkeit zu proliferieren und damit für Ersatz von apoptotischen oder abgelösten Podozyten zu sorgen [16, 62]. Deshalb ist eine Abnahme der WT1-positiven Zellen mit einem Verlust von Podozyten gleichzusetzen.

Um zu überprüfen, ob der in Kaninchen hergestellte anti-Podozyten-Antikörper für den beobachteten Verlust von Podozyten verantwortlich sein könnte, wurden Färbungen gegen Kaninchen IgG hergestellt, da wir vermuteten, dass der hergestellte anti-Podozyten-Antikörper dieser Subklasse angehören würde. Kaninchen IgG müsste sich entlang der Filtrationsbarriere detektieren lassen, wenn

in vivo Podozyten-Antigene erkannt würden. Tatsächlich stellte sich der anti-Podozyten-Antikörper als feines lineares Band entlang der glomerulären Filtrationsbarriere in der Immunfluoreszenz dar. Im Mesangium war kein Kaninchen IgG nachweisbar. Auch das periglomeruläre Gewebe und die Markregionen der Nieren der Versuchstiere waren nicht angefärbt. Alle extraglomerulären Gefäße der Nieren waren frei von der Antikörperfärbung. Dies zeigt, dass der Antikörper keine Strukturen außerhalb der glomerulären Filtrationsbarriere erkannte. Auch die mit einem anderen Anti-Kaninchen IgG-Antikörper und Neufuchsin entwickelten Gewebeschnitte der Versuchstiere zeigten eine ausschließlich glomeruläre Färbung in den Nieren der Versuchstiere. Die Epitope wurden streng linear entlang der glomerulären Filtrationsbarriere erkannt.

Diese Färbungen schlossen vaskuläre und mesangiale Ziele des Antikörpers weitgehend aus. Das feine lineare Ablagerungsmuster des Antikörpers sprach daher für eine spezifische Bindung entlang der glomerulären Filtrationsbarriere, die wahrscheinlich nicht vaskulären Ursprungs war. Da der Antikörper vor allem periphere Strukturen der Glomeruli anfärbte, war eine Bindung an von Podozyten exprimierten Epitopen wahrscheinlich. Eine mögliche Bindung an kapilläre Endothelzellen oder an die glomeruläre Basalmembran konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Im Vergleich mit anderen Modellen fiel auf, dass unser Antikörper ungewöhnlich lange *in vivo* zu detektieren war. Im Aminopeptidase A Modell kommt es sofort nach der Injektion zu einer Ablagerung des Antikörpers entlang der glomerulären Kapillaren. Dieses Muster ändert sich nach einem Tag in ein eher granuläres punktförmiges Bindungsmuster [3, 73]. Im Nephtrin-Antikörper-Modell kann man schon nach zwei Stunden eine lineare Bindung des Antikörpers erkennen, die sich drei Tage später in ein granuläres Muster ändert [70]. In unserem Modell zeigte der anti-Podozyten-Antikörper auch nach 17 Tagen ein homogenes lineares Ablagerungsmuster. Wann der Antikörper sein Antigen band und ob er sein Antigen erst nach einiger Zeit oder nach einer Demaskierung erkannte, bleibt unklar. Zur Beantwortung dieser Fragen bedarf es weiterer Experimente, in denen man die Nieren von Versuchstieren zu einem früheren Zeitpunkt untersucht.

Eine histologische Übersicht über die renalen Strukturen erlaubte die PAS-Färbung. Die Nieren der Versuchstiere wiesen Unterschiede zu den Nieren der Kontrolltiere auf. In den Glomeruli der Versuchstiere erschienen die Strukturen verwaschen.

Proteinablagerungen im Mesangium und entlang der Kapillaren färbten sich in einigen Glomeruli an. Diese stellten sich in der Regel fokal und segmental dar. Nur ein Tier wies diffus auftretende Läsionen auf. Proteinablagerungen sind normalerweise nicht im gesunden glomerulären Gewebe zu finden. Bei verschiedenen humanen Glomerulonephritiden können IgG und IgM in Immunkomplexen nachgewiesen werden und stellen sich dann als Proteinablagerungen im glomerulären Gewebe dar. Die von uns beobachteten Proteinablagerungen könnten ebenfalls durch Immunkomplexe entstanden sein, die an einigen Stellen des glomerulären Gewebes ausgefallen waren. Die aus dieser Überlegung heraus nachfolgend angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen gegen murines IgG und IgM ergaben ein Vorkommen beider Antikörperklassen im glomerulären Konvolut. Beide Antikörperklassen stellten sich mit einer mesangialen Betonung dar, wobei einige Ablagerungen sogar deckungsgleich erschienen. Das deckungsgleiche Vorkommen beider Antikörperklassen deutet auf ein gemeinsames Auftreten in Immunkomplexen im mesangialen Gewebe hin.

Um die mesangialen Ablagerungen näher zu charakterisieren, wurden elektronenmikroskopische Bilder von Mesangium und von der Filtrationsbarriere durch Prof. Kerjaschki in Wien angefertigt. Diese Bilder zeigten elektronendichtes Material im Mesangium betroffener Glomeruli. Ein solches elektronendichtes Material war weder subendothelial noch subepithelial zu beobachten. Herr Prof. Kerjaschki hielt diese Ablagerungen auch auf Grund unserer Ergebnisse der IgG- und IgM-Färbungen für Immunkomplexe, konnte jedoch eine andere Erklärung für das Vorkommen des elektronendichten Materials nicht mit Sicherheit ausschließen.

Defekte der podozytären Fußfortsätze wurden in elektronenmikroskopischen Bildern nur in Arealen der Filtrationsbarriere nachgewiesen, in deren Nähe elektronendichtes Material vorhanden war. An diesen Stellen war die Anzahl der Fußfortsätze geringer und die verbliebenen Fußfortsätze erschienen abgerundet. Eine Beteiligung der Immunkomplexe an der Pathogenese unseres Modells war daher wahrscheinlich. Der anti-Podozyten-Antikörper stellte auch in Versuchstieren, die geringer von funktionellen und histologischen Veränderungen betroffen waren, das gesamte Schlingenkonvolut dar. Die Elektronenmikroskopie zeigte, dass die Podozyten und ihre Fußfortsätze jedoch nur an einigen Stellen defekt erschienen. Diese Defekte waren in Arealen lokalisiert, die elektronendichtes Material enthielten. Der anti-Podozyten-Antikörper war demnach offensichtlich nicht allein für die Entstehung

eines podozytären Schadens verantwortlich. Das Ablagerungsmuster von anti-Podozyten-Antikörper und murinen Antikörpern war nicht deckungsgleich. Der anti-Podozyten-Antikörper färbte eher die Peripherie, während sich murine Antikörper mehr mesangial ablagerten. Dies schloss ein gemeinsames Vorkommen in möglichen Immunkomplexen weitgehend aus. In anderen immunologisch-vermittelten Tiermodellen zeigt vor allem die Heymann Nephritis eine Bildung von subepithelialen Immundepots [66]. Das Aminopeptidase A Modell, das Nephrin-Antikörper-Modell und die Thy-1.1 Nephritis der Maus zeigen keine Bildung von Immundepots. Es könnte sich also in unserem Modell um eine Immunkomplexnephritis in der Maus handeln.

Bei einigen humanen Glomerulopathien steht eine inflammatorische Reaktion im Zentrum des Geschehens. Um eine mögliche Beteiligung einer Entzündungsreaktion an der Pathogenese unseres Modells aufzuzeigen, wurden histologische Färbungen von murinen Leukozyten in Nierenschnitten angefertigt. Unsere Färbungen zeigten eine signifikante Erhöhung von B- und T-Zellen sowie Makrophagen in den Nieren der Versuchstiere gegenüber den Kontrolltieren. Wir konnten ebenfalls eine Hochregulierung der mRNA von MCP-1 und IP-10 in der rt-PCR zeigen. Zusammen weisen die Hochregulierung der mRNA von MCP-1 und IP-10 und die Absiedlung von B und T-Zellen eine Entzündungsreaktion in unserem Modell nach.

Eine Absiedlung von Leukozyten in der Niere geht in der Regel mit einer Erhöhung von Chemokinen einher. Chemokine nehmen die Rolle von Botenstoffen ein, die Leukozyten zum Ort eines inflammatorischen Geschehens locken. Die Ausschüttung von Chemokinen und die damit verbundene Einwanderung von Immunzellen in die Nieren folgt einem Stimulus. Eine Vielzahl von Schäden in der Niere kann einen Stimulus für die Ausschüttung von Chemokinen darstellen. Ein solcher renaler Stimulus kann beispielsweise ein erhöhter Albumingehalt im Urin, der auf Tubuluszellen wirkt, wie auch die Ablagerung von Immunkomplexen im glomerulären Gewebe sein [100]. Alle renalen Zellen sind in der Lage Chemokine zu bilden. So sind z. B. Tubulusepithel- und Endothelzellen in der Lage, *monocyte chemoattractant Protein 1* (MCP-1) zu bilden. Endothelzellen bilden unter dem Einfluss von Chemokinen Adhäsionsmoleküle, so dass proinflammatorische Zellen haften bleiben und in das Gewebe einwandern [100]. Typische Chemokine, die sich bei renalen inflammatorischen Prozessen erhöht darstellen, sind MCP-1 und IP-10. MCP-1 führt zu einer Anlockung und Absiedelung von Monozyten und Makrophagen [101]. Diese

Zellen bilden ebenfalls MCP-1. So kommt es zu einer Autostimulation und Anlockung weiterer Phagozyten im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus [100]. Auch Tubulusepithelzellen sind ein Ziel von MCP-1. Sie bilden unter dieser Stimulation Interleukin 6 und *intercellular adhesion Molekül 1* (ICAM1) [102]. Makrophagen sind darüber hinaus in der Lage IP-10 zu bilden, wodurch es zur Stimulation von T-Zellen und deren Einwanderung in das Gewebe kommt. Das Chemokin IP-10 ist bei einigen renalen Erkrankungen erhöht, wie z.B. in der membranproliferativen-, der IgA- und der Halbmonde-bildenden Glomerulonephritis (GN), nicht aber in der membranösen GN und der normalen Niere [101]. Hohe Spiegel von Chemokinen erklären die Anwesenheit von Zellen des Immunsystems. Umgekehrt bilden Leukozyten Chemokine, was im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus den deutlichen Anstieg der mRNA von IP-10 und MCP-1 erklärt und weitere Leukozyten anlockt.

Andere immunologisch-vermittelte Tiermodelle - wie das Thy-1.1 Nephritis der Maus [74], das Nephritin-Antikörper-Modell [70, 71] und das Aminopeptidase A Modell [73] - zeigen, soweit bekannt, einen Leukozyten-unabhängigen Pathomechanismus. Weiterhin werden diese Modelle als unabhängig von der Komplementkaskade beschrieben [70, 71, 73, 74]. Eine Komplementaktivierung wurde auch in unserem Modell untersucht. Ein Western Blot wurde für C3 in Gesamt-Nierenlysaten durchgeführt. Nach Beendigung der Experimente für diese Promotion wurde Komplement C3 auch immunhistochemisch in Nieren der Staffel 8 angefärbt. Im Western Blot war der C3-Gehalt in Nierenlysaten in Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren unverändert und nicht erhöht, wie es bei Komplementaktivierung zu erwarten gewesen wäre [71]. Entlang der IgG- und IgM-positiven Immunkomplexe ließ sich jedoch C3 histologisch nachweisen und auch entlang der Filtrationsbarriere war C3 zusammen mit anti-Podozyten-Antikörper vorhanden. Daher scheint eine Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese unseres Modells wahrscheinlich und steht im Gegensatz zu den oben beschriebenen Modellen.

Bei der Heymann Nephritis scheint das Komplementsystem im Gegensatz zu den beschriebenen Modellen eine zentrale Rolle zu spielen. Bei Tieren, die mit Schlangengift dekomplementiert wurden, kommt es zu keiner Proteinurie [103]. Makrophagen oder andere Zellen des Immunsystems scheinen bei der Heymann Nephritis allenfalls eine indirekte Rolle bei der Pathogenese des renalen Schadens zu spielen [66]. In der passiven Heymann Nephritis werden außerdem reaktive Sauerstoffspezies für das Auftreten eines glomerulären Schadens mitverantwortlich

gemacht [3]. Reaktive Sauerstoffspezies werden zudem für das Auftreten einer Proteinurie ohne offensichtliche Veränderungen der glomerulären Strukturen verantwortlich gemacht [104]. Makrophagen sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu bilden [100]. Wir konnten in unserem Modell eine Einwanderung von Makrophagen in die Nieren der Versuchstiere darstellen. Eine Mitwirkung von reaktiven Sauerstoffprodukten an der Pathogenese des glomerulären Schadens ist daher möglich. Ein Nachweis oder Ausschluss dieser reaktiven Sauerstoffprodukte bedarf jedoch weiterer Experimente.

Die Anwesenheit von T-Zellen und Makrophagen kann außerdem zur Bildung von profibrotischen Mediatoren führen. Makrophagen bilden vor allem *fibroblast growth* Faktor (FGF), TGF- β und TNF- α [100]. Der TGF- β Signalweg nimmt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung zellulärer Pathomechanismen ein, die zu glomerulärer Sklerose und interstinaler Fibrose führen [15, 105]. TGF- β kann zu einer Aktivierung von Fibroblasten führen. Im Verlauf vieler renaler Erkrankungen, die mit einer Entzündung einhergehen, kommt es zur Stimulation von Fibroblasten. In späteren Phasen renaler Erkrankungen verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Ablagerung und Abbau von extrazellulärer Matrix zu Gunsten der Ablagerung. Dieses Überwiegen der Bildung von extrazellulärer Matrix ist ein erster Schritt in Richtung einer beginnenden Fibrose. Eine Fibrose kann durch verschiedene Chemokine nicht nur initiiert, sondern auch gefördert werden, z.B. durch TGF- β [106]. Der TGF- β Signalweg kontrolliert eine Reihe zellulärer Antworten auf verschiedene Formen des glomerulären Schadens wie beispielsweise Proliferation, Hypertrophie, Apoptose der Podozyten sowie die vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix [15]. Ein Anstieg der Expression von TGF- β ist für viele Tiermodelle und für einige humane Erkrankungen beschrieben [15, 107]. In Podozyten ist TGF- β in der Lage Apoptose auszulösen [108]. Der Verlust von Podozyten mit nackten Arealen der GBM wird unter anderem für die Entstehung von FSGS verantwortlich gemacht [16]. In dem hier beschriebenen Modell war eine Hochregulierung von TGF- β nachweisbar. Es ist denkbar, dass es in unserem Modell durch einen Verlust von Podozyten zu einer FSGS kommt. Diese wird möglicherweise von einer hohen TGF- β Expression unterstützt und zusätzlich durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies gefördert.

Die Möglichkeit einer beginnenden FSGS ließ uns die Nieren der Versuchstiere auf eine vermehrte Bildung von Kollagen Typ IV und glatt-muskulärem Aktin untersuchen. Entzündungen der Niere mit Bildung von Chemokinen und Anregung des Mesangiums führen zur Bildung von Kollagen Typ IV [100]. Am Tag der Organentnahme, also in der Regel am Tag 17, konnte in keinem Versuchstier eine vermehrte Bildung von Kollagen Typ IV oder von glatt-muskulärem Aktin gezeigt werden. Das schließt eine Sklerose zu diesem Zeitpunkt nahezu aus. Die in diesem Modell vorliegende Entzündungsreaktion in den Nieren, hohe Spiegel von TGF- β und einen Abfall der Podozytenzahlen in den Glomeruli machen das Auftreten einer FSGS in den Versuchstieren nach einem längeren Versuchszeitraum möglich.

Weiterhin wurde die Expression B7-1 untersucht. Reiser et al. beschrieben, dass eine Induktion von B7-1 in Podozyten mit einem Nephrotischen Syndrom assoziiert ist. Die Arbeitsgruppe wies B7-1 in verschiedenen experimentellen renalen Krankheitsmodellen nach - unter anderem in immunologisch-vermittelten Modellen. Die Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) bei Mäusen führte zu einer starken Induktion von B7-1 und zur Ausbildung eines Nephrotischen Syndroms [109]. Mäuse, denen B7-1 fehlte, waren von dieser LPS-induzierten Proteinurie nicht betroffen. *In vitro* kam es bei dem beschriebenen Modell zu einer Umorganisation des podozytären Aktin-Zytoskeletts. Wir konnten keine Unterschiede der mRNA zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren zeigen. Die Proteinexpression von B7-1 war jedoch in den nephrotischen Mäusen erhöht. Da eine Erhöhung von B7-1 mit dem Auftreten eines Nephrotischen Syndroms vergesellschaftet ist, wäre eine Beteiligung von B7-1 in unserem Modell vorstellbar. Eine Umorganisation des podozytären Aktin-Zytoskeletts könnte zur Abrundung der Podozyten und Einziehung der Fußfortsätze beitragen. Die Einziehung von Fußfortsätzen führt zu einem Verlust der glomerulären Filtrationsbarriere an dieser Stelle und somit zur Proteinurie. Da das untersuchte Proteinlysate ein Lysat der gesamten Niere war und B7-1 von B-Zellen und anderen Antigen präsentierenden Zellen exprimiert wird [110-112], könnte die gezeigte Erhöhung auch allein auf die von uns gezeigte Einwanderung von B-Zellen in die Nieren der Versuchstiere zurückzuführen sein.

Herr Prof. Kerjaschki konnte an einigen Stellen der untersuchten Glomeruli eine Rarefizierung von Fußfortsätzen beobachten. Eine solche Rarefizierung der Fußfortsätze geht in der Regel mit einer generellen Abrundung der Podozyten einher. Die Rarefizierung der Fußfortsätze muss durch Umbauvorgänge innerhalb

des Zytoskeletts initiiert werden [3]. Diese zytoskelettale Umorganisation ist mit einer Bildung von so genannten Stressfasern verbunden [3]. Stressfasern sind parallele Bündel von Aktinfilamenten und anderen kontraktilen Molekülen wie beispielsweise Myosin, die sich zwischen Zellbefestigungen (z.B. fokalen Kontakten) spannen [113, 114]. Zur Bildung solcher kontraktilen Fasern sind Veränderungen in Signalkaskaden der Podozyten notwendig. Pavenstädt et al. beschrieben, dass die Bildung von Stressfasern von Kalzium und von RhoGTPasen abhängig ist [3]. Die Familie der RhoGTPasen und deren Signalwegziele, die Rho Kinasen 1 und 2 (Rock) können an verschiedenen Stellen in intrazelluläre Organisationsprozesse eingreifen. Rock 1 und 2 aktivieren die Myosinleichtkettenkinase durch Phosphorylierung und führen so zu einer verstärkten Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette und damit zur Aktivierung der Myosin-Kontraktion. Zusätzlich hemmen sie die Myosinphosphatase, die die Myosin-Leichtkette dephosphoryliert und somit eine Kontraktion abschaltet. So überwiegt die Myosinleichtkettenkinase-Aktivität und eine Stressfaserbildung wird ausgelöst [114]. Eine Behandlung mit einem Rock-Hemmstoff kann die Bildung von Stressfasern verhindern [3]. Ähnlich wirken Rock 1 und 2 auch auf Ezrin, einem Adapterprotein, das zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Zellmembran lokalisiert ist. Rock wirkt über eine direkte Phosphorylierung und über eine Hemmung der Myosinphosphatase, dessen Produkt ebenfalls Ezrin ist [114]. So wird Ezrin phosphoryliert und aktiviert. Phosphoryliertes und damit aktiviertes Ezrin kann beim Vorhandensein von zytoskelettalen Stressfasern deren Zug oder Spannung auf die Zellmembran übertragen. Dies führt zur Abrundung der Zelle mit Einziehung der Fußfortsätze.

Wir beobachteten in unserem Modell eine verstärkte Expression von Rock mRNA und eine Erhöhung der Phosphorylierung von Ezrin bei stabiler Expression des Proteins. Die Aktivierung von Rock führt zu einer Ezrin Phosphorylierung. Rock könnte daher die von uns beobachteten höheren phospho-Ezrin Level in den Versuchstieren erklären. Möglicherweise hat diese Rock-Aktivierung zu der podozytären Schädigung beigetragen. Rho und damit indirekt Rock sind über einen Zwischenschritt praktisch Effektorproteine der *fokal adhesion kinase* (FAK) [113]. Diese Kinase sitzt in Podozyten an den Orten der Zelle, die über Integrine mit der GBM verbunden sind. Fokale Kontakte sind Insertionsstellen von Aktinfilamenten und Stressfasern [113]. FAK kann über mehrere Signalwege aktiviert werden, besonders effektiv ist diese Aktivierung aber über phospho-Src, das mit FAK zusammen einen

Kinasekomplex bildet [113]. Die in unserem Mausmodell gezeigte erhöhte Phosphorylierung von Src könnte also über FAK zu einer Aktivierung von Rho/Rock und damit zu einer verstärkten Bildung von Stressfasern beigetragen haben. Zusammenfassend konnte im Signalweg der Stressfaserbildung die Hochregulierung einiger wichtiger Regulations-Moleküle gezeigt werden. Die Bildung von Stressfasern in den Podozyten in der Pathogenese unseres Modells ist daher anzunehmen. Diese morphologischen Umbauprozesse gehen mit einer Veränderung der Zell-Zell Kontakte im Bereich des Schlitzmembrankomplexes einher und können zu der beobachteten Proteinurie geführt haben [3].

Weitere Informationen über den Pathomechanismus des Modells und Vergleiche mit anderen Modellen könnten einige Strukturproteine liefern. Aus diesem Grund haben wir Nephrin, Podocin und WT1 auf mögliche Änderungen in der Expression untersucht. Nephrin, Podocin und WT1 kommen in der Niere nur in den Podozyten vor. Unsere Untersuchungen der Proteinexpression und der mRNA sind also als Veränderungen dieser Proteine und RNA in den Podozyten zu bewerten.

Für die Proteinexpression von Nephrin konnten wir keine Veränderungen im Lysat der Gesamtniere zeigen, während bei der mRNA eine Hochregulation zu beobachten war. Diese Hochregulation der mRNA von Nephrin könnte ein kompensatorischer Mechanismus auf den von uns ausgelösten Nierenschaden sein. Nephrin wurde auch in anderen Modellen untersucht. In der Heymann Nephritis, dem Nephrin-Antikörper-Modell und den toxischen Modellen der PAN- und der Adriamycin-Nephritis zeigt Nephrin ein deutlich schwächeres Signal. Auch die mRNA von Nephrin war in der PAN und dem Nephrin-Antikörper-Modell relativ schnell nach Injektion und noch vor Einsetzen einer Proteinurie erniedrigt [115]. Im Nephrin-Antikörper-Modell ändert sich die Nephrin Expression z.B. von einem linearen Muster zu einem diskontinuierlichen grobkörnigen und granulären Färbungsmuster. Inwieweit diese Umverteilung von Nephrin passiv im Rahmen der zytoskelettalen Umbaureaktion oder aktiv als Zielmolekül ausgelöst wird, ist unklar [115]. Unser Modell zeigte eine massive Proteinurie, die auf einen Schaden der Schlitzmembran hindeutet. Der genaue Zusammenhang von Nephrin Expression und Nephrin Lokalisation in den Podozyten der Versuchstiere bedarf jedoch weiterer Experimente. Eine Umverteilung von Nephrin, ähnlich wie bei dem Nephrin-Antikörper-Modell, wäre eine durchaus vorstellbare Möglichkeit.

Einige Transkriptionsfaktoren, insbesondere WT1, spielen eine wichtige Rolle bei der

Regulierung podozytärer Funktionen. Wir beobachteten einen deutlichen Anstieg der RNA des Proteins WT1. Dies ist möglicherweise eine Reaktion auf den von uns hervorgerufenen Nierenschaden. Guo et al. vermuteten, dass WT1 für die Regulation des Nephtrin Gens NPHS1 mitverantwortlich sei. So sollen hohe WT1 Expressionslevel zu einer verstärkten Nephtrinbildung führen [116]. Wagner et al. demonstrierten, dass WT1 den Nephtrin Promotor mehr als 10-fach aktivieren kann und Nephtrin so ein direktes Transkriptionsziel von WT1 ist [117]. In WT1 *Knockout*-Mäusen beobachteten Guo et al. nicht nur deutlich herunterregulierte Level des NPHS1 Produktes, sondern auch des Podocalyxin Genproduktes [118]. Dass WT1 die Expression von Podocalyxin reguliert, beobachteten auch Palmer et al. [119]. So wäre es denkbar, dass unsere normalen bis erhöhten Level von Nephtrin und Podocalyxin ein Resultat einer Erhöhung der RNA von WT1 waren. Die Erhöhung der Proteinexpression von Podocalyxin könnte jedoch auch andere Gründe haben. Da mRNA aus Gesamtnierenlysat verwendet wurde und Podocalyxin auch in Endothelzellen gebildet wird, muss die beobachtete Erhöhung nicht podozytären Ursprungs sein. Da sich in unserem Modell die Proteinexpression von Podocalyxin als deutlich erhöht darstellte und Podocalyxin im Urin nachweisbar war, ist ein kausaler Zusammenhang der Proteinurie und der hochregulierten Expression von Podocalyxin anzunehmen. Auch in anderen Tiermodellen mit podozytärer Schädigung, wie der PAN, kommt es zu einer leichten Erhöhung des Proteins [3].

Die Podocin mRNA- und Proteinexpression war in unserem Modell nicht nachweisbar verändert. Die Albuminurie war daher scheinbar Podocin unabhängig. Eine Mutation des für Podocin kodierenden NPHS2 Gens führt bei den Betroffenen zu einem steroid-resistenten Nephrotischen Syndrom im Menschen und unterstreicht die wichtige Rolle von Podocin an der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere [22]. In anderen Tiermodellen, wie z.B. der PAN, kommt es am dritten Tag mit Einsetzen der Proteinurie zu einem Abfall der Podocin Expression, wobei es schon vorher zu einer Umverteilung von Podocin von einem linearen zu einem punktförmigen Verteilungsmuster kam. Die mRNA Level von Podocin waren nicht erheblich verändert [120]. Auch im Thy-1.1 Nephritis Modell der Maus kommt es zu einer solchen granulären Umverteilung von Podocin [74]. Ob es bei unserem Modell zu einer Umverteilung des Podocins kam, bedarf weiterer Untersuchungen, wäre aber durchaus vorstellbar. Diese mögliche Umverteilung könnte zu einem Funktionsverlust der Filtrationsbarriere beitragen.

Vom Strukturprotein Synaptopodin konnten wir im Western Blot Degenerationsprodukte zeigen, nicht aber das vollständige Protein. Diese dargestellten Degenerationsprodukte waren in den Versuchstieren vermindert zu erkennen, was auf einen geringeren Abbau dieses Proteins hinweisen könnte. Durch eine Abrundung der Podozyten mit Retraktion von Fußfortsätzen könnte es zu einer verminderten Synaptopodin Expression kommen. Synaptopodin ist besonders im Bereich von Fußfortsätzen zu finden. In anderen Tiermodellen, z.B. dem Thy-1.1 Nephritis Modell der Maus, kommt es zu keiner Änderung der Synaptopodin Expression [74].

Wie in dieser Arbeit beschrieben, gibt es bereits eine Reihe von Tiermodellen, die sich in ihrer Pathogenese von dem hier vorgestellten Mausmodell unterscheiden. Einige dieser Tiermodelle ähneln in ihrer Pathogenese humanen Erkrankungen und haben in der Erforschung der Pathomechanismen dieser Erkrankungen wertvolle Erkenntnisse geliefert. So ist das Modell der passiven Heymann Nephritis beispielsweise ein Modell, um eine experimentelle membranöse GN hervorzurufen. Dass es sich bei unserem Modell um eine experimentelle membranöse GN handelt, ist jedoch unwahrscheinlich. Elektronenmikroskopisch waren keine Verdickungen der Basalmembran oder typischen Spikes entlang der GBM zu erkennen. Außerdem waren keine subepithelialen Immunkomplexe nachweisbar. Weiterhin ist das Chemokin IP-10 in der Regel in der passiven Heymann Nephritis nicht erhöht. Im Vergleich mit anderen Antikörper-induzierten Modellen ist die signifikante Infiltration von Entzündungszellen auffällig. In diesem Punkt besteht eine Ähnlichkeit zu der bei systemischem Lupus erythematodes auftretenden Nephritis. Bei der Entwicklung einer solchen Nephritis kommt es durch Immunkomplexakkumulation zu einer frühen Chemokinexpression, die zu einer Infiltration von inflammatorischen Zellen führt. Therapien, die diese Infiltration verhindern, unterbrechen die Entwicklung einer GN [121]. Auch hohe B7-1 Spiegel werden bei dieser Nephritis beobachtet [109], ähnlich der in unserem Modell nachgewiesenen Erhöhung von B7-1. Es gibt allerdings auch Unterschiede zur Lupus GN. Beim Lupus können nahezu alle Formen der GN vorkommen [122]. Häufig wird der systemische Lupus von einer mesangioproliferative GN begleitet. Eine mesangioproliferativen GN konnten wir in unserem Modell histologisch zumindest nach 17 Tagen nicht erkennen. Andere Formen der GN, die bei einem Lupus erythematodes auftreten können, wie z.B. membranoproliferative oder Halbmond-bildende Formen, sind ebenfalls nicht

erkennbar. Halbmonde sind in keinem Glomerulus zu erkennen und für eine membranoproliferative GN fehlen typische subendotheliale Immunkomplexe. Zusammenfassend ist eine Lupus GN in unserem Modell eher unwahrscheinlich.

Obwohl wir ca. zweieinhalb Wochen nach Injektion des Antikörpers in die Versuchstiere keinen Anhalt für eine Sklerose hatten, erscheint es möglich, dass die Mausnieren nach einer längeren Versuchszeit das Bild einer FSGS zeigen werden. Durch den Verlust von Podozyten und die fehlende Teilungsfähigkeit ausdifferenzierter Podozyten verbleiben ungenügend Podozyten, um die GBM vollständig zu bedecken. Das führt in diesen Arealen durch den hydrostatischen Druck zu einer Ausbeulung der Kapillarschlingen. Ist die Ausbeulung intensiv, kommt es zu einer Anlagerung der nackten GBM an die parietalen Epithelzellen der Bowman'schen Kapsel [16]. Wie Schwartz et al. beschrieben, ist dies ein wichtiger Schritt zur Entwicklung einer FSGS [3, 123]. Am Ende kommt es zur hyalinen Ablagerung und der Ausbildung von narbigen Veränderungen [16]. Faktoren, die den Prozess der Ausbildung einer FSGS noch unterstützen, sind eine anhaltende Entzündung in der Niere und hohe TGF- β Spiegel. Gegen die Entstehung einer FSGS spricht die scheinbare Abhängigkeit von einer inflammatorischen Reaktion. Eine solche Infiltration von Leukozyten ist für eine FSGS untypisch.

Diese Arbeit charakterisiert also ein neues Mausmodell mit immunvermittelter Schädigung der Podozyten der glomerulären Filtrationsbarriere. Der im Kaninchen produzierte Antikörper erkennt podozytäre Antigene *in vitro* und *in vivo* und ruft eine schwere Proteinurie mit einem Maximum am zehnten Tag nach der Injektion hervor. Der genaue Mechanismus der glomerulären Schädigung bleibt unklar. Die Läsionen stellen sich in der Regel fokal und segmental dar. Es kommt im Laufe der durch das Modell ausgelösten Erkrankung zu einem Verlust von Podozyten. Die Bildung und Ablagerung von murinem IgG und IgM sowie eine zelluläre und Komplement-vermittelte Entzündungsreaktion scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Ob es sich um einen primären oder sekundären podozytären Schaden handelt, bedarf weiterer Experimente. Wahrscheinlicher ist eine sekundäre Genese, die z.B. durch eine entstehende Entzündung erklärt werden könnte. Dafür spricht der späte Anstieg der Proteinurie. Der Vergleich mit bekannten humanen Krankheitsbildern kann erst nach einer weiteren Bearbeitung dieses Modells durchgeführt werden. Um herauszufinden wann der anti-Podozyten-Antikörper an seine Antigene bindet und wann eine Entzündungsreaktion in den Nieren der Versuchstiere einsetzt, müssen zeitliche

Verlaufsuntersuchungen mit frühen und deutlich späteren Organentnahmen durchgeführt werden. Erst der langfristige Verlauf der hier induzierten Erkrankung wird zu einer Zuordnung zu einer bekannten Pathophysiologie führen.

6. Zusammenfassung

Für das akute Nierenversagen im Rahmen immunvermittelter Glomerulonephritiden ist bisher kein Mausmodell etabliert. An der Entstehung und dem Fortschreiten dieser akuten glomerulären Schädigung spielen Podozyten eine zentrale Rolle. Daher wurde ein polyklonaler Antikörper gegen podozytäre Antigene durch Immunisierung von Kaninchen mit immortalisierten differenzierten Podozyten hergestellt. Mäuse wurden nach Präimmunisierung gegen Kaninchen-Immunglobuline mit diesem anti-Podozyten-Antikörper behandelt. Zunächst wurden Urine gewonnen und diese auf eine Proteinurie als Zeichen des Podozytenschadens untersucht. Nieren von Versuchs- und Kontrolltieren wurden dann nach vierzehn bis siebzehn Tagen für molekularbiologische-, proteinbiochemische- und histologische Untersuchungen entnommen. Bei den Versuchstieren kam es zu einer massiven Albuminurie mit einem Maximum am Tag 10 und einer Progression bis zum siebzehnten Tag nach Antikörperinjektion. Der injizierte anti-Podozyten-Antikörper band *in vitro* und *in vivo* in der Niere ausschließlich an Glomeruli entlang der Filtrationsbarriere mit einem feinen linearen Ablagerungsmuster. Lichtmikroskopisch war die glomeruläre Basalmembran normal, es fanden sich jedoch Proteinablagerungen im Mesangium und eine Verplumpung der glomerulären Strukturen. Elektronenmikroskopisch wurden mesangiale elektronendichte Depots mit Ablösungen der Fußfortsätze über diesen Arealen sichtbar. Die Depots entsprachen immunhistochemisch Ablagerungen von IgG und IgM entlang des glomerulären Schlingenkonvoluts. Weiterhin war eine Entzündungsreaktion anhand einer Einwanderung von T- und B-Zellen sowie Makrophagen in die Nieren der Versuchstiere nachweisbar. Eine podozytäre Schädigung konnte durch eine reduzierte Anzahl von Podozyten per Glomerulum direkt gezeigt werden und indirekt durch Nachweis des podozytären Sialoproteins Podocalyxin im Urin. *In vitro* band der anti-Podozyten-Antikörper auf kultivierten Podozyten an perinukleäre Strukturen und vor allem an die von den Podozyten gebildeten Fußfortsätze. Diese Experimente zeigen, dass ein neues immunologisch-vermitteltes Mausmodell mit selektiver podozytärer Schädigung durch den hergestellten Antikörper etabliert werden kann. Dieses Modell bietet in der Zukunft die Möglichkeiten zur Erprobung therapeutischer Optionen. Der Pathomechanismus und die antigenen Ziele des polyklonalen Antikörpers bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Thadhani, R., M. Pascual, and J.V. Bonventre, *Acute renal failure*. N Engl J Med, 1996. **334**(22): p. 1448-60.
2. Remuzzi, G., C. Zoja, and T. Bertani, *Glomerulonephritis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1993. **2**(3): p. 465-74.
3. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 253-307.
4. DuBose, T.D., Jr., et al., *Acute renal failure in the 21st century: recommendations for management and outcomes assessment*. Am J Kidney Dis, 1997. **29**(5): p. 793-9.
5. *The National Kidney and Urological Diseases Advisory Board 1990 long range plan: Window on the 21st Century*. J. Urol., 1991. **145**: p. 568-593.
6. Chertow, G.M., et al., *Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis*. Arch Intern Med, 1995. **155**(14): p. 1505-11.
7. Corwin, H.L., et al., *Prediction of outcome in acute renal failure*. Am J Nephrol, 1987. **7**(1): p. 8-12.
8. Novis, B.K., et al., *Association of preoperative risk factors with postoperative acute renal failure*. Anesth Analg, 1994. **78**(1): p. 143-9.
9. Woodrow, G. and J.H. Turney, *Cause of death in acute renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 1992. **7**(3): p. 230-4.
10. Zanardo, G., et al., *Acute renal failure in the patient undergoing cardiac operation. Prevalence, mortality rate, and main risk factors*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994. **107**(6): p. 1489-95.
11. Endlich, K., W. Kriz, and R. Witzgall, *Update in podocyte biology*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(3): p. 331-40.
12. Somlo, S. and P. Mundel, *Getting a foothold in nephrotic syndrome*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 333-5.
13. Tryggvason, K. and J. Wartiovaara, *Molecular basis of glomerular permselectivity*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(4): p. 543-9.
14. Asanuma, K. and P. Mundel, *The role of podocytes in glomerular pathobiology*. Clin Exp Nephrol, 2003. **7**(4): p. 255-9.
15. Barisoni, L. and P. Mundel, *Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases*. Am J Nephrol, 2003. **23**(5): p. 353-60.

16. Mundel, P. and S.J. Shankland, *Podocyte biology and response to injury*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(12): p. 3005-15.
17. Rodewald, R. and M.J. Karnovsky, *Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse*. J Cell Biol, 1974. **60**(2): p. 423-33.
18. Holzman, L.B., et al., *Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell*. Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1481-91.
19. Kestila, M., et al., *Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 575-82.
20. Inoue, T., et al., *FAT is a component of glomerular slit diaphragms*. Kidney Int, 2001. **59**(3): p. 1003-12.
21. Reiser, J., et al., *The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 1-8.
22. Boute, N., et al., *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 349-54.
23. Schwarz, K., et al., *Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin*. J Clin Invest, 2001. **108**(11): p. 1621-9.
24. Shaw, A.S. and J.H. Miner, *CD2-associated protein and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(1): p. 19-22.
25. Shih, N.Y., et al., *CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2303-8.
26. Shih, N.Y., et al., *Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein*. Science, 1999. **286**(5438): p. 312-5.
27. Schnabel, E., J.M. Anderson, and M.G. Farquhar, *The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1255-63.
28. Barletta, G.M., et al., *Nephrin and Nephr1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19266-71.
29. *Pschyrembel klinisches Wörterbuch*. 258 ed. 1998: de Gruyter. 1538.
30. Putaala, H., et al., *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, 2001. **10**(1): p. 1-8.

31. Topham, P.S., et al., *Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin*. J Clin Invest, 1999. **104**(11): p. 1559-66.
32. Lehtonen, S., F. Zhao, and E. Lehtonen, *CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(4): p. F734-43.
33. Koziell, A., et al., *Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(4): p. 379-88.
34. Tsukaguchi, H., et al., *NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1659-66.
35. Ciani, L., et al., *Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3575-82.
36. Kurihara, H., J.M. Anderson, and M.G. Farquhar, *Increased Tyr phosphorylation of ZO-1 during modification of tight junctions between glomerular foot processes*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 2): p. F514-24.
37. Meyer, T.N., et al., *Galpha12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(5): p. C1281-93.
38. Meyer, T.N., C. Schwesinger, and B.M. Denker, *Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 24855-8.
39. Adler, S., *Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors*. Am J Pathol, 1992. **141**(3): p. 571-8.
40. Raats, C.J., et al., *Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1749-65.
41. Regele, H.M., et al., *Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(3): p. 403-12.
42. Kreidberg, J.A., et al., *Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis*. Development, 1996. **122**(11): p. 3537-47.
43. Adler, S., *Heparin alters epidermal growth factor metabolism in cultured rat glomerular epithelial cells*. Am J Pathol, 1991. **139**(1): p. 169-75.

44. Adler, S. and X. Chen, *Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth*. Am J Physiol, 1992. **262**(5 Pt 2): p. F770-6.
45. Adler, S., et al., *Alteration of glomerular permeability to macromolecules induced by cross-linking of beta 1 integrin receptors*. Am J Pathol, 1996. **149**(3): p. 987-96.
46. Kaplan, J.M., et al., *Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis*. Nat Genet, 2000. **24**(3): p. 251-6.
47. Andrews, P.M., *Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus*. Kidney Int, 1981. **20**(5): p. 549-62.
48. Drenckhahn, D. and R.P. Franke, *Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man*. Lab Invest, 1988. **59**(5): p. 673-82.
49. Mundel, P., P. Gilbert, and W. Kriz, *Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 KD protein*. J Histochem Cytochem, 1991. **39**(8): p. 1047-56.
50. Mundel, P., et al., *Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 193-204.
51. Togawa, A., et al., *Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDIalpha*. Oncogene, 1999. **18**(39): p. 5373-80.
52. Kreidberg, J.A., et al., *WT-1 is required for early kidney development*. Cell, 1993. **74**(4): p. 679-91.
53. Dressler, G.R., et al., *Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 65-7.
54. Mundlos, S., et al., *Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues*. Development, 1993. **119**(4): p. 1329-41.
55. Yang, Y., et al., *WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 181-92.
56. Kerjaschki, D., D.J. Sharkey, and M.G. Farquhar, *Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell*. J Cell Biol, 1984. **98**(4): p. 1591-6.

57. Orlando, R.A., et al., *The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(8): p. 1589-98.
58. Takeda, T., et al., *Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton*. J Clin Invest, 2001. **108**(2): p. 289-301.
59. Doyonnas, R., et al., *Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 13-27.
60. Thomas, P.E., et al., *GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit*. J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 19953-62.
61. Wharram, B.L., et al., *Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate*. J Clin Invest, 2000. **106**(10): p. 1281-90.
62. Kriz, W., *Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11**(9): p. 1738-42.
63. Shankland, S.J., et al., *Cyclin kinase inhibitors are increased during experimental membranous nephropathy: potential role in limiting glomerular epithelial cell proliferation in vivo*. Kidney Int, 1997. **52**(2): p. 404-13.
64. Edgington, T.S., R.J. Glassock, and F.J. Dixon, *Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen. I. Identification and isolation of the pathogenetic antigen*. J Exp Med, 1968. **127**(3): p. 555-72.
65. Farquhar, M.G., et al., *gp330 and RAP: the Heymann nephritis antigenic complex*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **737**: p. 96-113.
66. Kerjaschki, D., *[Molecular pathogenesis of experimental membranous glomerulonephritis (Heymann nephritis)]*. Pathologe, 1996. **17**(4): p. 262-8.
67. Kerjaschki, D. and M.G. Farquhar, *Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats*. J Exp Med, 1983. **157**(2): p. 667-86.
68. Kerjaschki, D., et al., *Identification of a 400-kd protein in the brush borders of human kidney tubules that is similar to gp330, the nephritogenic antigen of rat Heymann nephritis*. Am J Pathol, 1987. **129**(1): p. 183-91.

69. Kerjaschki, D. and T.J. Neale, *Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis)*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(12): p. 2518-26.
70. Orikasa, M., et al., *Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody*. J Immunol, 1988. **141**(3): p. 807-14.
71. Kawachi, H., et al., *Slit diaphragm-reactive nephritogenic MAb 5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 2): p. F984-93.
72. Kawachi, H., et al., *Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states*. Kidney Int, 2000. **57**(5): p. 1949-61.
73. Assmann, K.J., et al., *A nephritogenic rat monoclonal antibody to mouse aminopeptidase A. Induction of massive albuminuria after a single intravenous injection*. J Exp Med, 1992. **175**(3): p. 623-35.
74. Smeets, B., et al., *Podocyte changes upon induction of albuminuria in Thy-1.1 transgenic mice*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(12): p. 2524-33.
75. Anderson, S., et al., *Mechanisms underlying transition from acute glomerular injury to late glomerular sclerosis in a rat model of nephrotic syndrome*. J Clin Invest, 1988. **82**(5): p. 1757-68.
76. Diamond, J.R. and M.J. Karnovsky, *Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside*. Am J Pathol, 1986. **122**(3): p. 481-7.
77. Fogo, A., et al., *Serial micropuncture analysis of glomerular function in two rat models of glomerular sclerosis*. J Clin Invest, 1988. **82**(1): p. 322-30.
78. Glasser, R.J., J.A. Velosa, and A.F. Michael, *Experimental model of focal sclerosis. I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis*. Lab Invest, 1977. **36**(5): p. 519-26.
79. Fishman, J.A. and M.J. Karnovsky, *Effects of the aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro*. Am J Pathol, 1985. **118**(3): p. 398-407.
80. Diamond, J.R., J.V. Bonventre, and M.J. Karnovsky, *A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis*. Kidney Int, 1986. **29**(2): p. 478-83.
81. Kawaguchi, M., et al., *Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury in vitro caused by puromycin aminonucleoside*. Toxicology, 1992. **72**(3): p. 329-40.

82. Ahola, H., et al., *Cloning and expression of the rat nephrin homolog*. Am J Pathol, 1999. **155**(3): p. 907-13.
83. Breiteneder-Geleff, S., et al., *Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 1141-52.
84. Chen, A., et al., *Involvement of immunopathogenic mechanisms in a spontaneously occurring glomerulopathy in mice*. Nephron, 1998. **78**(1): p. 63-72.
85. Chen, A., et al., *Induction of proteinuria by adriamycin or bovine serum albumin in the mouse*. Nephron, 1995. **69**(3): p. 293-300.
86. Fogo, A.B., *Animal models of FSGS: lessons for pathogenesis and treatment*. Semin Nephrol, 2003. **23**(2): p. 161-71.
87. Wang, Y., et al., *Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1797-804.
88. Seiler, M.W., et al., *Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium*. Lab Invest, 1977. **36**(1): p. 48-61.
89. Kurihara, H., et al., *The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1*. Am J Pathol, 1992. **141**(4): p. 805-16.
90. Reiser, J., et al., *Regulation of mouse podocyte process dynamics by protein tyrosine phosphatases rapid communication*. Kidney Int, 2000. **57**(5): p. 2035-42.
91. Hamano, Y., et al., *Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31154-62.
92. Roselli, S., et al., *Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 550-60.
93. Miner, J.H., et al., *Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation*. J Clin Invest, 2002. **109**(8): p. 1065-72.
94. Yao, J., et al., *Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein*. PLoS Biol, 2004. **2**(6): p. e167.
95. Matsusaka, T., et al., *Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 1013-23.

96. Musante, L., et al., *Circulating anti-actin and anti-ATP synthase antibodies identify a sub-set of patients with idiopathic nephrotic syndrome*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(3): p. 491-9.
97. Mundel, P., et al., *Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines*. Exp Cell Res, 1997. **236**(1): p. 248-58.
98. Schiwiek, D., et al., *Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines*. Kidney Int, 2004. **66**(1): p. 91-101.
99. Kanno, K., et al., *Urinary sediment podocalyxin in children with glomerular diseases*. Nephron Clin Pract, 2003. **95**(3): p. c91-9.
100. Anders, H.J., V. Vielhauer, and D. Schlondorff, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease*. Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 401-15.
101. Segerer, S. and C.E. Alpers, *Chemokines and chemokine receptors in renal pathology*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(3): p. 243-9.
102. Viedt, C., et al., *MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(6): p. 1534-47.
103. Couser, W.G., P.J. Baker, and S. Adler, *Complement and the direct mediation of immune glomerular injury: a new perspective*. Kidney Int, 1985. **28**(6): p. 879-90.
104. Yoshioka, T., I. Ichikawa, and A. Fogo, *Reactive oxygen metabolites cause massive, reversible proteinuria and glomerular sieving defect without apparent ultrastructural abnormality*. J Am Soc Nephrol, 1991. **2**(4): p. 902-12.
105. Schiffer, M., et al., *Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling*. Kidney Int Suppl, 2000. **77**: p. S45-52.
106. Segerer, S., *The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(3 Suppl 1): p. S15-8.
107. Border, W.A. and N.A. Noble, *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. N Engl J Med, 1994. **331**(19): p. 1286-92.
108. Schiffer, M., et al., *Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 807-16.
109. Reiser, J., et al., *Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1390-7.

110. Abbate, M., et al., *Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis*. Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 2179-93.
111. Chambers, C.A. and J.P. Allison, *Costimulatory regulation of T cell function*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 203-10.
112. Henry, J., M.M. Miller, and P. Pontarotti, *Structure and evolution of the extended B7 family*. Immunol Today, 1999. **20**(6): p. 285-8.
113. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
114. Amano, M., Y. Fukata, and K. Kaibuchi, *Regulation and functions of Rho-associated kinase*. Exp Cell Res, 2000. **261**(1): p. 44-51.
115. Kawachi, H., H. Koike, and F. Shimizu, *Molecular structure and function of the slit diaphragm: expression of nephrin in proteinuric states and in developing glomeruli*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17 Suppl 9**: p. 20-2.
116. Guo, G., et al., *WT1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(11): p. 2851-6.
117. Wagner, N., et al., *The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3044-51.
118. Guo, J.K., et al., *WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(6): p. 651-9.
119. Palmer, R.E., et al., *WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin*. Curr Biol, 2001. **11**(22): p. 1805-9.
120. Hosoyamada, M., et al., *Nephrin and podocin expression around the onset of puromycin aminonucleoside nephrosis*. J Pharmacol Sci, 2005. **97**(2): p. 234-41.
121. Jorgensen, T.N., M.R. Gubbels, and B.L. Kotzin, *New insights into disease pathogenesis from mouse lupus genetics*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(6): p. 787-93.
122. *Thiemes Innere Medizin*. 1. Auflage ed. 1999: Thieme. Seite 1322.
123. Schwartz, M.M. and E.J. Lewis, *Focal segmental glomerular sclerosis: the cellular lesion*. Kidney Int, 1985. **28**(6): p. 968-74.

Lebenslauf

Name: Jan Christian Wahlefeld

Geburtsdatum: 14.06.1980, Bremen

Eltern: Klaus Wahlefeld, Diplom-Kaufmann, Studienrat
Ursula Wahlefeld, Lehrerin

Geschwister: Stefan Wahlefeld

Wohnort: Hamburg, Mühlenkamp 50

Schulbildung: 1986 - 1990 Grundschule Horner Heerstr.
1990 - 1992 Orientierungsstufe Schulzentrum Rockwinkel
1992 - 1996 Gymnasium Schulzentrum Rockwinkel
1996 - 1999 Gymnasium Vorkampsweg mit Abitur 1999
(Note 1,4)

Zivildienst: 1999 - 2000 Evangelische Kirchengemeinde Bremen-
Oberneuland

Studium: seit Wintersemester 2000 Studium der Humanmedizin in Kiel
Physikum im Herbst 2002 (Note 1,66)
Erstes Staatsexamen im Herbst 2003 (Note 3), danach
Studienortwechsel von Kiel nach Hamburg
September 2004 Beginn der Promotion in der nephrologischen
Abteilung des Universitätsklinikums Eppendorf unter der Leitung
von Dr. med. T. Meyer und Prof. Dr. med. F. Thaiss
Zweites Staatsexamen im Frühjahr 2006 (Note 1,66)
Drittes Staatsexamen voraussichtlich im Frühjahr 2007

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tobias Meyer für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und für das Überlassen eines so interessanten Themas. Ohne die in jeder Hinsicht hervorragende Betreuung und Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit sowie seiner stets freundlichen, offenen und unkomplizierten Art im Umgang mit seinen Doktoranden und Mitarbeitern hätte mich in Momenten des Misserfolges mehrfach der Mut verlassen. Weiterhin bin ich Frau Dr. Catherine Meyer-Schwesinger und Frau Silke Dehde für die Einführungen in die Arbeitstechniken, für ihre stetige Unterstützung bei fachlichen Problemen und für ihre Geduld während der gesamten Zeit überaus dankbar. Das so nette, herzliche und persönliche Klima in der Arbeitsgruppe hat mir die Zeit im Labor zu einer sehr angenehmen Erinnerung werden lassen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. F. Thaiss. Er hatte stets ein offenes Ohr und versuchte zu helfen, wo er konnte. Ohne sein außerordentliches Geschick wäre die Durchführung der Tierversuche nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. R. Stahl danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung. Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Wenzel für die Einführung und die Möglichkeit, an seinem Mikroskop arbeiten zu dürfen. Bei den Mitarbeitern des nephrologischen Hauptlabors unter der Leitung von Herrn Dr. G. Zahner möchte ich mich für die Hilfe bei allen größeren und kleineren Problemen und für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meinem langjährigen Freund Tim Meier danke ich für die Unterstützung bei softwaretechnischen Problemen.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders für sämtliche Unterstützung danken, die sie mir im Laufe der Jahre immer wieder haben zukommen lassen. Ohne sie wäre ich jetzt nicht da, wo ich bin. Meiner Partnerin Johanna Artus danke ich für die Geduld und Toleranz, die sie hatte, meine Launen auch an Tagen von Rückschlägen zu ertragen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Jan Wahlefeld