

**Die Rolle des Aktinnukleators Spire-1 in der
Anti-Podozyten Glomerulonephritis
der Maus (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758)**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr.rer. nat.)
im Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg**

Vorgelegt von
Philipp Klug
Hamburg 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. F. THAISS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 18. Dezember 2009

Hamburg, den 03. Dezember 2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	5
3	Abkürzungsverzeichnis	7
4	Einleitung	12
4.1	Das Nephron	12
4.1.1	Das Tubulussystem	13
4.1.2	Der Podozyt	14
4.2	Das Zytoskelett	15
4.2.1	Das Aktinzytoskelett	15
4.2.2	Das Tubulussystem	16
4.2.3	Das podozytäre Zytoskelett	16
4.3	Aktinnukleatoren	18
4.3.1	Spire Proteine	19
4.3.1.1	Struktur	19
4.3.1.2	Expression und Funktion	20
4.3.2	Glomeruläre Nephropathien	21
4.4	Tiermodelle mit glomerulärer Schädigung	22
5	Hypothese und Ziel der Arbeit	24
6	Material	25
6.1	Verbrauchsmaterial	25
6.2	Chemikalien	26
6.3	Geräte	27
6.4	Kits	29
6.5	Allgemeine Puffer	29
6.5.1	Blockpuffer für Dynabeads	29
6.5.2	Puffer für Western Blot	29
6.5.3	Puffer für Agarosegele	30
6.5.4	Lösungen für ELISA	31
6.5.5	Lösungen für Immunhistochemie	31
6.5.6	Lösungen für Silbernitratfärbung	32
6.5.7	Lösungen für die Generierung von miRNA Zelllinien	33

Inhaltsverzeichnis

6.6	Zellkulturmedien	34
6.6.1	Podozyten-Medium für non permissive Bedingungen	34
6.6.2	Podozyten-Medium für permissive Bedingungen	34
6.7	Antikörper	34
6.8	Primer	36
6.9	Größenstandards	36
6.10	Vektoren	37
6.11	miRNA Sequenzen	37
6.12	Computerprogramme	37
7	Methoden	39
7.1	Die Anti-Podozyten-Nephritis (APN)	39
7.1.1	Immunisierung des Schafes.....	39
7.1.2	Serumherstellung	40
7.1.3	Tierhaltung	41
7.1.4	Induktion der APN	41
7.1.5	Gewinnung von Mausurin zur Analyse	42
7.1.6	Organentnahme	42
7.1.7	Gewinnung von Mausglomeruli über Dynabeads	42
7.1.8	Organfixierung und Einbettung	43
7.2	Proteinbiochemische Methoden	43
7.2.1	Herstellung von Proteinlysaten	43
7.2.2	Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
7.2.3	Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE	44
7.2.4	Silbernitrat-Färbung.....	44
7.2.5	Western Blot und Immunodetektion.....	45
7.3	Urindiagnostische Parameter	46
7.3.1	Messung der Kreatininkonzentration im Mausurin.....	46
7.3.2	Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin	46
7.3.2.1	Semiquantitative Bestimmung von Protein im Urin mittels Urinsticks.....	46
7.3.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
7.4	Immunhistochemische Methoden	48
7.4.1	Deparaffinierung der Schnitte.....	48
7.4.2	PAS-Färbung	49
7.4.3	PAS Score	49

Inhaltsverzeichnis

7.4.4	Schaf- und Maus-IgG Färbung auf Paraffinschnitten.....	50
7.4.5	Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie	51
7.5	Molekularbiologische Methoden.....	51
7.5.1	RNA Aufreinigung	51
7.5.2	Reverse Transkription	52
7.5.3	Qualitative RT-PCR.....	52
7.5.4	Agarose-Gelelektrophorese	53
7.5.5	Quantitative-PCR (qRT-PCR).....	53
7.6	Zellkultur	55
7.6.1	Podozytenkultivierung und Differenzierung	55
7.6.2	Auftauen von Zellen.....	55
7.6.3	Passagieren von Podozyten.....	56
7.6.4	Einfrieren von Zellen.....	56
7.6.5	Schaf Immunglobulin G Färbung auf Podozyten	57
7.6.6	Vitalitäts-Assay	57
7.6.7	Aktin- und Tubulin-Färbung im sAPN Modell.....	58
7.7	Generierung und Analyse von Spire-1 miRNA Zelllinien	58
7.7.1	Klonierung der Spire-1 miRNA Vektoren	58
7.7.2	Transformation von Bakterien (Hitzeschock Methode)	60
7.7.3	Analyse der miRNA Klone.....	61
7.7.3.1	Plasmidaufreinigung in kleinem Maßstab (Miniprep).....	62
7.7.3.2	Sequenzierung	62
7.7.3.3	Plasmidaufreinigung in mittlerem Maßstab (Midiprep)	63
7.7.4	Transfektion der Podozyten Einzelklon Zelllinie.....	64
7.7.5	Herstellung der Einzelklon Zelllinien.....	65
7.7.6	IF Spire 1 in Podozyten.....	65
7.8	Statistik.....	66
8	Ergebnisse	67
8.1	APN Seren.....	67
8.1.1	Vergleich der Schafseren	67
8.1.2	Antigene der Schafseren im Podozyten	68
8.2	APN in der Maus	69
8.2.1	Bindung von Schaf-IgG im Glomerulum.....	69
8.2.2	Bindung von Schaf-IgG (Immunogold Tag 1).....	71

Inhaltsverzeichnis

8.2.3	Bindung von Maus-IgG im Glomerulum.....	73
8.2.4	Nierenfunktion in der APN.....	74
8.2.4.1	Nierenfunktion.....	74
8.2.4.2	Proteinurieverlauf.....	75
8.2.5	Schädigung der Glomeruli.....	76
8.2.6	Morphologie der Fußfortsätze.....	78
8.2.6.1	Morphologie der Filtrationsbarriere zum Endpunkt der Erkrankung.....	80
8.3	Spire-1 Genexpression.....	82
8.3.1	Spire-1 Proteinexpression in der AP-Nephritis.....	84
8.4	APN-Modell in Zellkultur.....	85
8.4.1	Podozytenkultivierung und Differenzierung.....	85
8.4.2	FCS Dosis-Wirkungs-Kurve.....	87
8.4.3	Dosis-Wirkung des APN-Modells.....	89
8.4.4	Antigenbindung auf differenzierten Podozyten.....	91
8.4.5	Vitalitäts-Assay.....	93
8.4.6	Morphologische Veränderungen des Zytoskeletts im APN-Modell.....	94
8.5	Gene-silencing von Spire-1.....	98
8.5.1	EmGFP Expression der Spire-1 miRNA Einzelklon Zelllinien.....	98
8.5.2	Gene-silencing.....	99
8.5.3	Morphologische Veränderungen im APN-Modell bei Spire-1 Silencing.....	101
8.5.4	Zytoskelettale Veränderungen APN-Modell bei Spire-1 Silencing.....	103
8.5.5	Spire-1 im APN-Modell.....	106
9	Diskussion.....	109
10	Abbildungsverzeichnis.....	118
11	Literaturverzeichnis.....	120
12	Danksagung.....	128
13	Lebenslauf.....	130
14	Publikationen.....	131

2 Zusammenfassung

Glomeruläre Nephropathien sind der häufigste Grund proteinurischer Nierenerkrankungen (Wasserstein AG, 1997; Glassock RJ, 2003; Fervenza FC, *et al.*, 2008). Häufig kommt es in diesen Erkrankungen zu einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere. Diese besteht aus drei Elementen: der vaskulären Endothelzellen, der GBM und den glomerulären Epithelzellen, den Podozyten. Den Podozyten wird durch die Ausbildung der Schlitzmembran die ausschlaggebende Funktion der Blutfiltration, hinsichtlich der Größenselektivität und Effizienz zugeschrieben. Podozyten spielen häufig eine entscheidende Rolle bei der Initiation und Progression immun- und nicht immunmediierter glomerulärer Schädigung. Dabei führt die Schädigung der Podozyten durch Fußfortsatzverschmelzung und/oder Schlitzmembranreorganisation zu massiver Proteinurie. Daher sind intakte Podozyten mit ihrem hochdifferenzierten Zytoskelett unabdingbar für eine ungestörte Funktion. Die zugrundeliegenden Mechanismen für podozytäre Fußfortsatzverschmelzung ist bis heute weitgehend ungeklärt. Um diese zu untersuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Modell einer immunvermittelten Podozytenschädigung, Anti-Podozyten-Nephritis genannt, in der Maus und der Zellkultur generiert. Dafür wurde ein Schaf-anti-Podozyten Serum produziert. Dieses sollte bei intravenöser Applikation in Mäusen eine glomeruläre Schädigung direkt am Podozyten induzieren. Schaf IgG Färbungen AP-Serum behandelte Tiere wiesen ein lineares Ablagerungsmuster entlang der GBM und den Podozyten auf, wogegen Kon-Serum behandelte Tiere kein solches Ablagerungsmuster aufwiesen. AP-Tiere wiesen weiterhin starke PAS positive Ablagerungen innerhalb der Glomeruli mit hochwahrscheinlichem Podozytenverlust auf. Eine immunologische Reaktion der AP-Tiere auf das injizierte Schafantiserum konnte durch Ablagerung von Maus IgG bestätigt werden. Diese Ablagerung fand ebenfalls linear entlang der GBM statt. Die renale Funktion war analog dazu schwer beeinträchtigt. AP-Tiere entwickelten ab etwa Tag 5 nach Injektion eine schwere Proteinurie mit progressivem Verlauf. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten proteinurische AP-Tiere starke Fußfortsatzverschmelzungen, subepitheliale Depots und Schaf IgG Ablagerungen in der GBM und an Podozyten. Im Rahmen der Experimente konnte der Aktinnukleator Spire-1 erstmals in der Mausniere dargestellt werden. Proteinurische Tiere wiesen in immunhistochemischen Färbungen von Organschnitten eine

Zusammenfassung

verstärkte Spire-1 Expression auf. Zusammengefasst wurde ein neues Modell muriner glomerulärer Nephropathie mit schwerer podozytärer Schädigung generiert. Für weitere Untersuchungen podozytärer Reorganisation wurde ein analoges APN-Modell in Zellkultur etabliert. AP-Serum behandelte differenzierte Podozyten zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen mit „arborisierten“ Phänotyp mit langen Zellfortsätzen und filigranen Zell-Zell Kontakten eine ausgeprägte Retraktion ihrer Fortsätze. Zell-Zell Kontakte zwischen AP-Serum behandelten Zellen erschienen verschmolzen, wobei die Zellmembranen benachbarter Zellen direkt aneinander anlagen. Diese Veränderungen sind Fußfortsatzverschmelzungen *in vivo* sehr ähnlich. Die Veränderungen waren ebenfalls auf zytoskeletaler Ebene sichtbar. Sowohl Aktin- als auch Tubulinfilamente erschienen zurückgezogen. Das hier vorgestellte Modell zeigt einen bemerkenswerten Unterschied zu anderen Zellkulturmodellen podozytärer Schädigung. Durch AP-Serum geschädigte Tiere zeigen weder aktinreiche Zentren (ARC) noch häufig auftretende Stressfasern wie sie für Schädigung durch mechanischen Stress oder LPS nachgewiesen sind, was einen von diesen abweichenden Mechanismus impliziert.

Um die Beteiligung von Spire-1 im Kontext dieser Veränderungen zu untersuchen, wurden stabile Spire-1 miRNA Einzelzelllinien generiert, bei denen die Expression um 72-77 % reduziert war. Diese Zellen wiesen keinen von Kontrollzellen abweichenden Phänotyp auf. Auch nach Induktion des APN-Modells wiesen sie weder in ihrer Morphologie noch auf zytoskeletaler Ebene Unterschiede zu Kontrollzellen auf. Demzufolge spielt Spire-1 keine nennenswerte Rolle bei der Fortsatzretraktion in diesem Modell. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der einzig erhältliche Spire-1 Antikörper in den durchgeführten Untersuchungen nicht geeignet ist Spire-1 zweifelsfrei darzustellen.

Zusammengefasst wurde ein neues immunmediertes Modell glomerulärer Schädigung mit Analogien zur membranösen Nephropathie im Mensch in der Maus und einem korrespondierenden Zellkultur Modell generiert werden. Dadurch wird es in Zukunft möglich sein immunvermittelte Pathologien podozytärer Schädigung *in vivo* und *in vitro* simultan in vergleichbaren Modellen zu untersuchen.

3 Abkürzungsverzeichnis

A

AgNO ₃	Silbernitrat
APN	anti-Podozyten-Nephritis
AP-	anti-Podozyten-
AP	alkalische Phosphatase
AMCA	7-Amino-4methylcoumarin
ATS	anti-Thymocyte-Serum
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser

B

bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise

C

ca.	circa
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
Cl	Chlor
CT	cycle threshold

D

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds oligo	doppelsträngige Oligos
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EmGFP	Emerald Green Fluorecent Protein

Abkürzungsverzeichnis

E

FACS fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)

FCS Fötale Kälberserum

FSGS fokale segmentale Glomerulosklerose

FW Forward

G

°C Grad Celsius

g Gramm

g gravity / Schwerkraft, universelle Konstante, repräsentiert die Erdanziehungskraft. Die relative Zentrifugalkraft (rcf / relative centrifugal force / g-force) wird in dieser Arbeit als Vielfaches von g angegeben.

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GBM glomeruläre Basalmembran

H

h Stunden

H₂O Wasser

H₂SO₄ Schwefelsäure

HBSS Hanks' Balanced Salt Solution

HEPES 4 (2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

HCl Salzsäure

HRP Horseradish peroxidase

I

IF Immunfluoreszenz

IgA Immunglobulin der Klasse A

IgG Immunglobulin der Klasse G

J

K

K Kalium

kb Kilobasen

KCl Kaliumchlorid

kDa Kilodalton

Ko Negativkontrolle

Kon- Kontroll-

Abkürzungsverzeichnis

L

l	Liter
LB Medium	Lysogeny Broth Medium
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPS	Lipopolysaccharid

M

M	Marker
M	Molarität
mA	Milliampere (Ampere x 10^{-3})
MBD Buffer	Membrane Desalting Buffer
mg	Milligramm (Gramm x 10^{-3})
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
Mio	Million
miRNA	microRNA
ml	Milliliter (Liter x 10^{-3})
M-MLV	moloney murine leukemia virus; Moloney Mäuse Leukämie Virus
MOPS	Morpholinopropanol Sulfonic acid
MPC	Magnetic Particle Concentrator
mRNA	messenger RNA

N

N	Normalität
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm (Gramm x 10^{-9})
nm	Nanometer (Meter x 10^{-9})
nM	Nanomolar (Mol x 10^{-9})
NTN	Nephrotoxische Serum Nephritis

O

P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
------	---------------------------------

Abkürzungsverzeichnis

PAS	Periodic acid-Schiff stain
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Pikogramm (Gramm x 10 ⁻¹²)
PS	Protaminsulfat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<u>Q</u>	
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<u>R</u>	
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	ribosomal RNA
RNase	Ribonukleasen
RPMI 1640	Zellmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute, daher RPMI
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RW	Reverse
<u>S</u>	
s	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SOC Medium	SOB (Super Optimal Broth) Medium + 20 mM Glucose
<u>T</u>	
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBM	tubuläre Basalmembran
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung + Tween 20
T-Per	Tissue Protein Extraction Reagent
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
<u>U</u>	
µg	Mikrogramm (Gramm x 10 ⁻⁶)
U	Unit, Einheit

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolett
∞	unendlich
<u>V</u>	
Vas afferens	Arteriola glomerularis afferens
Vas efferens	Arteriola glomerularis efferens
<u>W</u>	
WH 2	Wiscott-Aldrich Syndrome Protein homology domain 2
WT	wildtyp (C57Bl6/J)
<u>X</u>	
<u>Y</u>	
<u>Z</u>	

4 Einleitung

Die Aufgaben der Niere sind vielfältig und für den Körper von so großer Bedeutung, dass 25 % des Herz-Zeitvolumens des Blutes an die Nieren gesandt werden, egal ob wir schlafen oder uns körperlich stark betätigen. Somit sind die Nieren mit nicht einmal 0,5 % des Körpergewichtes proportional das am stärksten durchblutete Organ des Körpers. Die Funktion der Niere kann in multiple Aufgaben unterteilt werden.

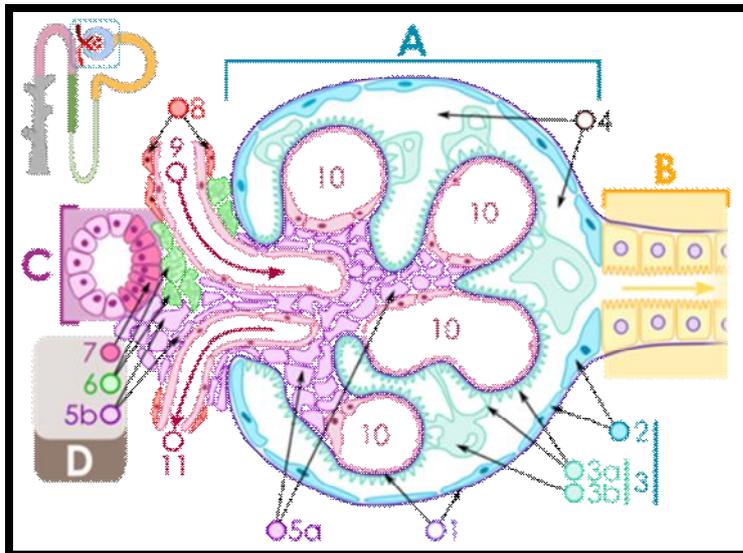
1. Über die Nieren werden Abfallstoffe ausgeschieden. Das sind im Wesentlichen Harnsäure, Harnstoff, Kreatinin und das aus dem Proteinmetabolismus stammende Ammoniak und Ammonium.
2. Ausscheidung toxischer Substanzen wie beispielsweise Abbauprodukte von Medikamenten.
3. Die Niere ist maßgeblich an der Wasser- und Elektrolyt-Homöostase und der Aufrechterhaltung des Blut pH-Wertes bei ca. 7,4 beteiligt.

4.1 Das Nephron

Die funktionelle Untereinheit der Niere ist das Nephron. Jede besitzt ca. eine Millionen dieser funktionellen Einheiten. Jedes Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen und Tubulussystem. Im Nierenkörperchen wird durch Abpressen von ca. 180 l Primärharn das Blut filtriert (Hamano Y, *et al.*, 2002). Es besteht aus dem Glomerulum, einer im Cortex der Niere lokalisierten kugelförmigen Struktur, die aus einem kapillären Gefäßknäuel besteht.

Das Glomerulum wird von der Bowmanschen-Kapsel (nach William Bowman, 1816-1892) umschlossen. Jedes Glomerulum hat einen Gefäß- und einen Harnpol. Am Gefäßpol eines jeden Glomerulus führt eine Arterie (Arteriola glomerularis afferens, kurz das Vas afferens) in das Glomerulum hinein. Sie stammt aus der Nierenarterie (Arteria renalis) und splittet sich über eine Folge von Verzweigungen in ein Kapillargeflecht auf. Dieses mündet schließlich in eine aus dem Glomerulus herausführende Arterie (Arteriola glomerularis efferens, kurz das Vas efferens). An das Vas afferens und das Vas efferens ist der sogenannte juxtaglomeruläre

Apparat mit der Macula densa angelagert, dessen Aufgabe in der Steuerung des Blutdrucks und des Elektrolyt- und Wasserhaushalts besteht.



- A - Nierenkörperchen
 - B - Hauptstück
 - C - Mittelstück
 - D - Juxtaglomeruläre Apparat
 - 1 - Basalmembran
 - 2 - Bowmansche Kapsel, parietales Blatt
 - 3 - Bowmansche Kapsel, viszerales Blatt
 - 3a - Podozytenfüßchen
 - 3b - Podozyt
 - 4 - Lumen der Bowman-Kapsel (Harnraum)
 - 5a - Mesangium - Die extraglomerulären Mesangiumzellen
 - 5b - Mesangium - Die intraglomerulären Mesangiumzellen
 - 6 - Juxtaglomeruläre Zellen
 - 7 - Macula densa
 - 8 - Myozyten (Muskelzellen der Arteriolenwand)
 - 9 - Arteriola afferens
 - 10 - glomeruläre Kapillaren
 - 11 - Arteriola efferens
- Quelle Wikipedia: Komorniczak M

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Nierenkörperchens.

Die Filtration des Blutes findet in den glomerulären Kapillaren an der sogenannten Filtrationsbarriere statt. Sie besteht aus drei Elementen.

- 1.) Den kapillaren Endothelzellen: Es handelt sich um eine fenestrierte Endothelzellschicht die aus einer stark negativ geladenen Glykokalix aus Sialoglykoproteinen besteht.
- 2.) Der glomerulären Basalmembran (GBM): Sie enthält viele negativ geladene Proteoglykane, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin und weitere Matrixkomponenten (Miner JH, 1999). Gebildet wird sie aus den Basallaminae der Endothel- und visceralen Epithelzellen.
- 3.) Der visceral auf der GBM aufliegenden Schicht glomerulärer Epithelzellen, den **Podozyten**.

Zusammengenommen bilden diese Strukturen einen hochselektiven, hydrostatischen Filter (Endlich K, *et al*, 2001/ Somlo S and Mundel P, 2000/ Tryggvason K and Wartiovaara J, 2001).

4.1.1 Das Tubulussystem

Das Tubulussystem lässt sich in drei Segmente aufteilen. 1. Dem proximalen Tubulus: Seine Hauptfunktion liegt in der Wasserrückresorbtion. 2. Der Henleschen Schleife: Der absteigende Teil ist permeabel für Wasser, jedoch vollständig impermeable für Salze. Der

Urin wird in diesem Teil durch weitere Wasserresorption hypotonisch. Der aufsteigende Schenkel ist impermeable für Wasser, enthält aber eine Vielzahl Na-K-Cl Co-Transporter. Durch die Absorption von Elektrolyten wird der Harn hypertonisch. Die Aufkonzentration des Urins erfolgt nach dem sogenannten Gegenstromprinzip. 3. Dem distalen Tubulus: In ihm findet eine Vielzahl von aktivem Elektrolyt-Transport statt. Dort werden zum Beispiel Hydrogen Ionen und Ammonium sezerniert, um den pH Wert des Blutes zu regulieren. Nach dem Passieren des distalen Tubulus bleiben lediglich ein Prozent des vom Glomerulus abgepressten Primärharns zurück und die Salzkonzentration ist marginal. Der aufkonzentrierte Sekundärharn aus den Tubuli vereint sich schließlich in Sammelrohren und werden über den Harnleiter in die Blase abgeleitet.

4.1.2 Der Podozyt

Podozyten sind hoch spezialisierte Zellen mit einer Vielzahl von Aufgaben. Sie stabilisieren die glomeruläre Struktur (Kriz W, *et al.*, 1995), synthetisieren maßgebliche Bestandteile der GBM (Natori Y, *et al.*, 1992) und tragen durch Pinozytose zur Resorption filtrierter Proteine bei (Huber TB, 2008). Die Hauptfunktion der Podozyten besteht allerdings in der Bildung der Filtrationsbarriere, dessen Hauptbestandteil nach heutiger Ansicht von ihnen gebildet wird (Pavenstädt H, *et al.*, 2003).

Podozyten haben einen voluminösen Zellkörper, der sich in den Harnraum der Bowmanschen Kapsel wölbt (Pavenstädt H., *et al.*, 2003 / Shankland SJ., 2006). Sie haben eine hoch komplexe Morphologie in Form langer Primärfortsätze, welche sich zu einer Vielzahl von Fußfortsätzen auffasern. Diese Fußfortsätze haften sich harnseitig, getrennt von der GBM, an die Kapillaren an, wobei die Fußfortsätze benachbarter Podozyten interdigitierend ineinander greifen. Zwischen den Fortsätzen bildet sich eine spezielle Art des Zellkontaktes. Sie wird Schlitzmembran genannt und erzeugt über einen Multiproteinkomplex ein Filtrationssieb mit 4 x 14 nm breiten rechteckigen Maschen aus (Rodewald R and Karnovsky MJ, 1974). Diese Bauweise ermöglicht eine vollständige Umschließung der Kapillaren (Endlich K, *et al.*, 2001 / Somlo S and Mundel P, 2000 / Tryggvason K and Wartiovaara J, 2001 / Asanuma K and Mundel P, 2003). Durch die Ausbildung der Schlitzmembran werden die Podozyten polarisiert. Dabei ist

die luminale oder apikale Seite zum Bowman'schen Raum und die basale Seite zur GBM gerichtet.

Die **luminale** Seite der Podozyten und die Schlitzmembran ist von einer dicken Glycokalix bedeckt, welche Podocalyxin, Sialoglykoproteine, Podoendin und weitere Proteine enthält, wobei vor Allem Podocalyxin für eine negativ geladene Oberfläche sorgt. (Huang TW and Langlois JC, 1985 / Sawada H, *et al.*, 1986 / Kerjaschki D, *et al.*, 1984). Durch seine Verbindung mit dem podozytären Aktinzytoskelett trägt Podocalyxin zur Ausprägung und Aufrechterhaltung der Fußfortsätze und der Podozytenmorphologie bei (Pavenstädt H *et al.*, 2003).

Die **basale** Seite der Podozyten liegt direkt auf der GBM auf und ist durch die Fußfortsätze über Integrine und α - und β -Dystroglykane mit ihr verbunden (Raats, CJ, *et al.*, 2000 / Adler S, 1992 / Regele HM, *et al.*, 2000).

Heute ist allgemein akzeptiert, dass der Podozyt mit seiner Filtrationsbarriere die ausschlaggebende Komponente, im Hinblick auf die Größenselektivität und Effizienz der Blutfiltration ist.

4.2 Das Zytoskelett

4.2.1 Das Aktinzytoskelett

Aktin findet sich in jeder eukaryotischen Zelle und ist in diesen eines der fünf häufigsten Proteine. Es kommt in zwei verschiedenen Formen vor, als monomeres, globuläres Aktin (G-Aktin), welches zu filamentösem Aktin (F-Aktin) polymerisieren kann. Dieser reversible Prozess unterliegt in der Zelle einer strengen Regulation.

Monomeres Aktin (G-Aktin) ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa.

Filamentöses Aktin (F-Aktin) besteht aus zwei Aktinketten, die zu einer Doppelhelix mit 6-7 nm Durchmesser verdrillt sind (Holmes KC, *et al.*, 1990). Der initiale Nukleationsschritt beginnt mit der Assoziation zweier ATP gebundener G-Aktin Monomere. Anschließend wird an dieses Dimer ein weiteres ATP-Aktin zu einem stabilen Trimer angelagert und so weiter. Das

resultierende Filament erhält durch die stets gleiche Kopf zu Schwanz Orientierung der G-Aktin Monomere seine strukturelle Polarität, wobei die G-Aktin Monomere durch schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. (Wegner A, 1976; Holmes KC, *et al.*, 1990).

Die Aufgaben der Aktinfilamente sind vielfältig und ihre Stabilität dabei hoch verschieden. Stabile Aktinfilamente finden sich neben dem Gleitfilamentsystem im Muskel (Voet D und Voet JG, 1992) auch in nicht muskulären Zellen. Dort bilden sie kontraktile Aktinomyosinbündel in Form von **Stressfasern**, welche eine große Rolle bei der Zelladhäsion und Zellmotilität spielen (Huxley HE, 1973; Svitkina TM, *et al.*, 1997; Small JV und Resch GP, 2005).

4.2.2 Das Tubulussystem

Tubuline sind ca. 55 kDa große, 450 Aminosäuren lange, globuläre Proteine, die in eukaryotischen Zellen vorkommen. α - und β -Tubuline bilden den Hauptteil der Mikrotubuli (Cleveland DW und Sullivan KF, 1985; Joshi HC und Cleveland DW, 1990). Jeweils ein α - und ein β -Tubulin verbinden sich über nicht kovalente Wechselwirkungen zu einem Heterodimer, Protofilament genannt, die sich nachfolgend zu Mikrotubuli zusammenlagern. Durch die immer gleiche Kopf zu Schwanz Orientierung der Protofilamete entsteht ein helikaler Hohlkörper mit 13 Dimeren pro Windung und gerichteter Polarität. (Haimo LT, 1982; Heidemann SR, 1991). Die Funktion des Tubulussystems ist vielfältig. Einerseits erfüllen sie wichtige Transportprozesse innerhalb der Zelle, indem Vesikel und Granulae mittels tubulinspezifischer Motorproteine an ihnen transportiert werden. Andererseits stellen sie durch Ausbildung der Mitosespindel die tragende Struktur der Mitose, an der die Chromatiden zu den Polen der Zelle gezogen werden. Nicht zuletzt bilden Mikrotubuli den Hauptbestandteil des Bewegungsapparates von Zilien und Geißeln.

4.2.3 Das podozytäre Zytoskelett

Der ausdifferenzierte Podozyt weist ein ausgeprägtes Zytoskelett auf, welches je nach subzellulärer Lokalisation von unterschiedlichen Strukturen gebildet wird. Im Zellkörper und

Einleitung

den Primärfortsätzen wird das Zytoskelett hauptsächlich von Mikrotubuli und Intermediärfilamenten aufgebaut. Zusätzlich existiert unter der Zellmembran ein dünnes, kortikales Netzwerk aus Aktinfilamenten (Drenckhahn D und Franke RP, 1988; Smoyer WE und Mundel P, 1998; Pavenstädt H, *et al.*, 2003). Einige Mikrotubuli sind untereinander zu dicken Bündeln zusammengefaßt und verlaufen parallel zum Filament. Andere Filamente sind nahe anderer zytoskeletaler Elemente oder Zellorganellen lokalisiert. Damit wird ihm eine erhebliche Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie (Kobayashi N, *et al.*, 1998; Andrews PM, 1977; Kobayashi N, *et al.*, 2001) zugeschrieben. Bei mechanischem Stress wird eine Schutzfunktion durch die Ausbildung eines dichten, filamentösen Netzwerkes diskutiert (Kobayashi N und Mundel P, 1997).

In den Fußfortsätzen hingegen wird das Zytoskelett exklusiv von Aktinfilamenten gebildet. Diese formen „schlaufenförmige“ Fibrillen, die Teil eines komplexen kontraktilen Apparates sind (Drenckhahn D und Franke RP, 1988; Ichimura K, *et al.*, 2003; Smoyer WE und Mundel P, 1998). Sie laufen entlang der longitudinalen Achse von einem Fußfortsatz in den angrenzenden. Die Kurven dieser Schlaufen liegen dabei an den Übergängen zu den Primärfortsätzen und sind dort wahrscheinlich über Linkerproteine wie zum Beispiel Tau direkt mit dem Tubulussystem verbunden (Sanden S, *et al.*, 1995; Lee G und Rook SL, 1992; Smoyer WE und Mundel P, 1998; Pavenstädt H, *et al.*, 2003). In der Peripherie sind die Aktinfibrillen über die Zellmembran durch ein hochkomplexes Proteinnetzwerk mit dem des Schlitzmembrankomplexes verbunden (Faul C, *et al.*, 2007). Über die Regulation dieser beiden zytoskeletalen Strukturen und dessen Interaktion ist bis heute wenig verstanden.

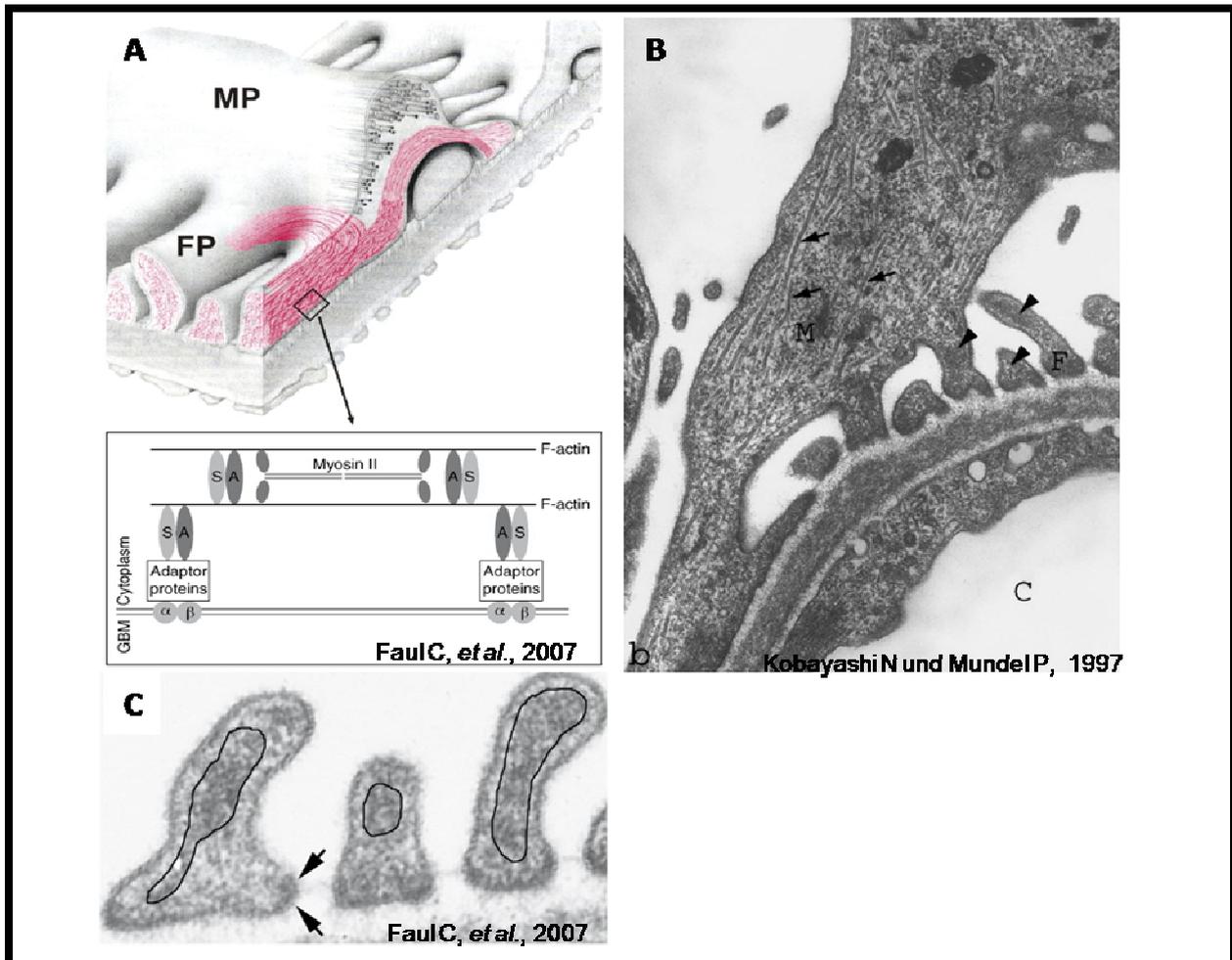


Abbildung 2: Integrales Zytoskelett der Podozytenfortsätze.

A) Vereinfachtes Modell für die zytoskeletale Organisation in podozytären Fortsätzen. Primärfortsätze (MP für major processes) enthalten Mikrotubuli, wogegen Fußfortsätze (FP) durch ein kontraktiles Netzwerk, bestehend aus F-Aktin, Myosin II, α -Aktinin-4 (A) und Synaptopodin (S) verbunden sind. Die Verlinkung mit der GBM erfolgt über Adapterproteine und α -(α) und β -(β) Integrin Heterodimere B) Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozyten. Dargestellt ist ein Podozyt der eine Kapillare (C) abdeckt. Primär-(Major)-Fortsätze (M) enthalten Mikrotubuli (Pfeile), wogegen Fußfortsätze (F) große Bündel aus Aktinfilamenten (Keile) enthalten. C) Vergrößerte EM Aufnahme der Fußfortsätze. Kontraktile Aktinbündel im Zentrum der Fortsätze sind durch schwarze Linien eingekreist, das elektronendichte Areal markiert die Insertionsstelle der Schlitzmembran (Pfeile).

4.3 Aktinnukleatoren

Die Dynamik des Aktinzytoskeletts wird durch zahlreiche Proteine reguliert. Diese findet sowohl auf Ebene der Monomere als auch der Filamente über verschiedenste Signaltransduktionswege statt. Auf Grund der energetisch ungünstigen, spontanen Polymerisation fällt den aktinnukleierenden Proteinen eine besondere Bedeutung zu, da sie

einen schnellen regulierten Auf- und Abbau der Aktinfilamente in spezifischen Arealen der Zelle ermöglichen. Drei Familien von Aktinnukleatoren sind beschrieben. Es handelt sich um den Actin Related Protein-(Arp)2/3-Komplex, die Formine und die kürzlich beschriebene Spire-Proteinfamilie.

4.3.1 Spire Proteine

4.3.1.1 Struktur

Spire Proteine stellen eine eigene Klasse von Aktinnukleatoren dar. Sie wurden zuerst in *Drosophila melanogaster* beschrieben (Manseau LJ, und Schubach T, 1989) und konnten bisher nur in Metazoen nachgewiesen werden. Die Seescheide *Ciona savignyi* und die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* besitzen jeweils ein Gen, posterior end mark-5 (pem-5) bzw. spire (p150-spir) (Kerkhoff E, et al., 2001; Ciccarelli FD, et al., 2003; Wellington A, et al., 1999). In Säugern wurden zwei spire Gene, Spire-1 und Spire-2 identifiziert (Schumacher N, et al., 2004). Das Spire-1 Gen in Mäusen ist auf Chromosom 18 lokalisiert und umfaßt 5033 bp (NM_194355). Von diesem wird eine 1931 bp lange mRNA kodiert. Daraus resultiert das murine Spire-1 Protein von 643 Aminosäuren Länge (NP_919336.1).

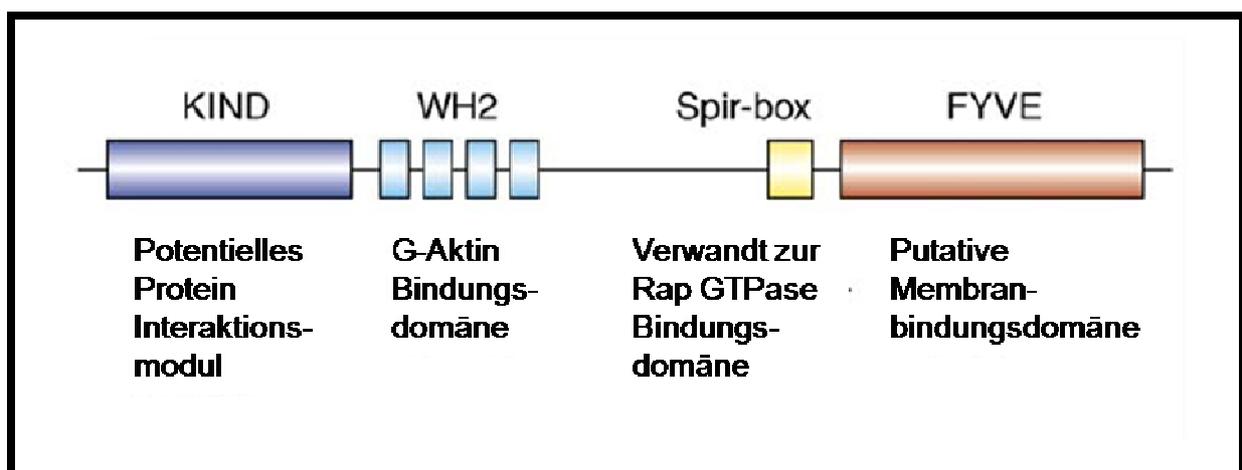


Abbildung 3: Struktur von Spire-Proteinen
(aus Kerkhoff E, 2006)

Spire-1 besteht aus multiplen Domänen, die in allen Spezies konserviert sind. Eine kritische Barriere bei der Aktinnukleation ist die Bildung des Aktindimeres. Es wird postuliert, dass Spire-1 diese Barriere überwindet, indem die aktin gebundenen WH2-Domänen WH2 C und

WH2 D die Bildung des Dimers forcieren. Über WH2 A und WH2 B werden anschließend zwei weitere Aktinmonomere angebaut. (Quinlan ME, *et al.*, 2005; Kerkhoff E, 2006; Qualmann B und Kessels MM, 2009; Bosch M, *et al.*, 2007; Rebowski G, *et al.*, 2008).

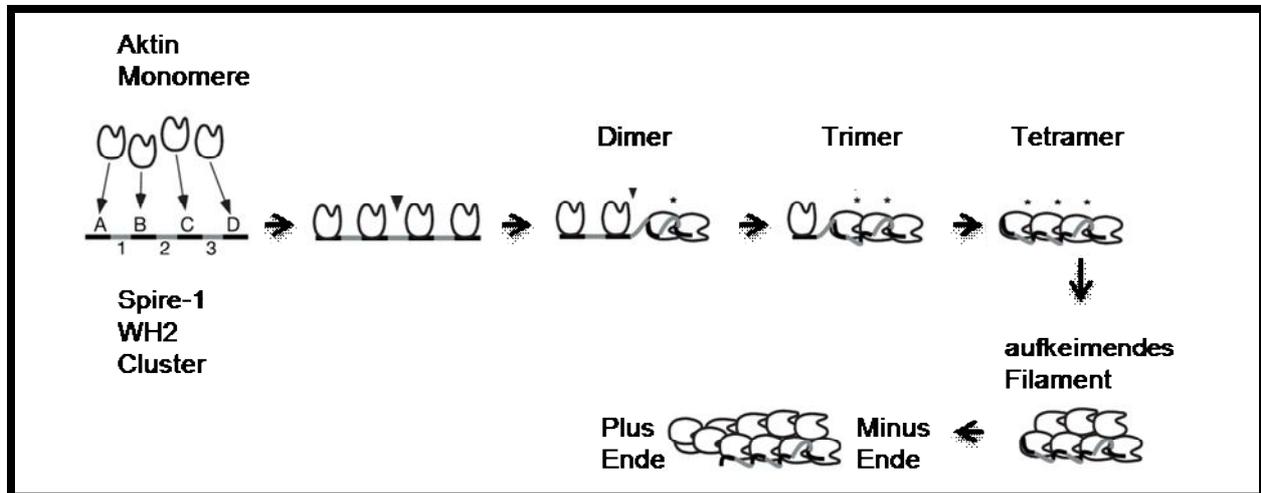


Abbildung 5: Mechanismus der Aktinnukleation durch Spire Proteine
(modifiziert aus Quinlan ME, *et al.*, 2005)

4.3.1.2 Expression und Funktion

Die exakte zellbiologische Funktion von Spire-1 ist bisher ungeklärt. Die Fähigkeit Aktin zu polymerisieren konnte am Beispiel von Spire-1 aus *Drosophila melanogaster in vitro* bereits gezeigt werden (Quinlan ME, *et al.*, 2005; Bosch M, *et al.*, 2007). Neuere Studien weisen auf eine wichtige Rolle von Spire-1 bei der Verankerung von Mikrotubuli an einem zytoplasmatischen Aktin Netz hin (Wang Y und Riechmann V, 2008; Rosales-Nieves AE, *et al.*, 2006; Dahlgaard K, *et al.*, 2007; Qualmann B und Kessels MM, 2009). Auf welche Weise Spire-1 bei der Aktinnukleation und Verknüpfung von Aktin- und Tubulinfilamenten bei Vertebraten involviert ist, ist bisher weitestgehend ungeklärt. Auch Interaktionen mit anderen Aktinnukleatoren wie Formin (Rosales-Nieves AE, *et al.*, 2006; Bosch M, *et al.*, 2007; Dahlgaard K, *et al.*, 2007; Wang Y und Riechmann V, 2008; Quinlan, ME *et al.*, 2007) das die Spire-1 Funktion moduliert ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Kerkhoff, E. *et al.*, 2001).

Bei Mäusen wird Spire-1 während der Embryogenese im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert. In adulten Mäusen wird Spire-1 vornehmlich in Purkinje Zellen des Cerebellums, neuronalen Zellen des Hippocampus und der granularen Schicht des Dentate Gyrus, nicht aber im Darm, Thymus, Lunge, Hoden und der Niere exprimiert (Schumacher N, *et al.*, 2004).

Neuronale Zellen weisen ebenso wie Podozyten ein stark ausgeprägtes Zytoskelett auf. Daher könnte Spire-1 auf Grund der nachgewiesenen Funktionen auch in diesen Zellen eine tragende Rolle beim zytoskelettalen Auf- und Umbau spielen.

4.3.2 Glomeruläre Nephropathien

Bei vielen Nierenerkrankungen mit glomerulärer Schädigung wird angenommen, dass sie durch Autoimmunreaktionen gegen körpereigene Strukturen ausgelöst werden (Ronco P und Debiec H, 2006; Ronco P und Debiec H, 2007). Klassische Beispiele dafür sind die membranöse Nephropathy (Couser WG, 2005), das Goodpasture's Syndrom (anti-GBM Antikörper), die IgA Nephropathie und die membranoproliferative (Couser WG, 1999). Teilweise sind auch die Podozyten geschädigt, was sich im Verlust der podozytären Fußfortsätze in Form von Verschmelzungen äußert (Smoyer WE und Mundel P, 1998; Pavenstädt H, *et al.*, 2003). Fußfortsatzverschmelzungen werden auf zytoskelettaler Ebene initiiert und bewirken eine Veränderung der Zell-Zell-Kontakte an den Schlitzmembranen (Andrews PM, 1975; Farquhar MG, *et al.*, 1957; Kerjaschki D, 1978; Ryan GB und Karnovsky MJ, 1975; Seiler MW, *et al.*, 1975; Shirato I, *et al.*, 1996). Das Verschmelzen der Podozytenfortsätze geht mit einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts einher (Shirato I, *et al.*, 1996; Morigi M, *et al.*, 2005). Die Zerstörung der Aktinfilamente konnte in einer komplementvermittelten Schädigung sowie der Protaminsulfat (PS) und Puromycin Aminonukleosid induzierten Nephritis der Ratte nachgewiesen werden (Topham PS, *et al.*, 1999; Whiteside CI, *et al.*, 1993). Auch die Zerstörung der Mikrotubuli durch Vinblastin führt *in vivo* zu einer schweren podozytären Schädigung (Andrews PM, 1977, Andrews PM, 1981; Tyson GE, 1977) und blockiert Fortsatzbildung *in vitro* (Kobayashi N, *et al.*, 2001).

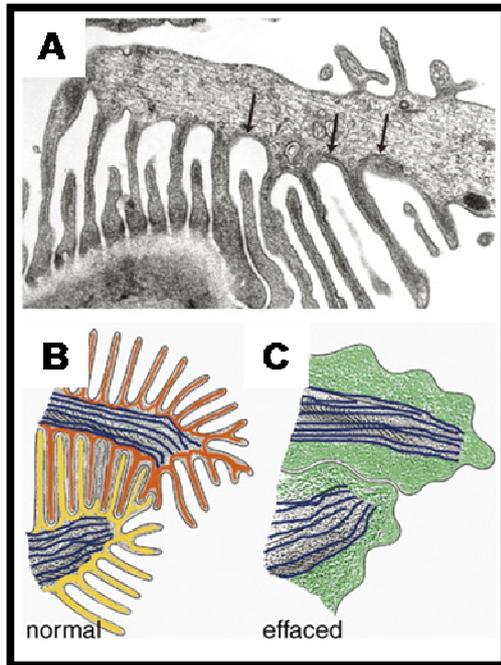


Abbildung 4: Podozytäre Fußfortsatzarchitektur mit und ohne Schädigung.

A) Dargestellt sind die interdigitierenden Fußfortsätze zweier benachbarter Podozyten. Im Primärfortsatz sind Mikrotubuli und Intermediärfilamente zu sehen. Die Fußfortsätze enthalten Aktinfilamente die von einem in den benachbarten Fortsatz verlaufen (Pfeile). B) Dargestellt ist die schematische Aufsicht auf gesunde Podozyten. Die Fußfortsätze interdigitieren regelmäßig. Die hochorganisierten Aktinbündel interdigitierender Fußfortsätze benachbarter Podozyten sind in rot und gelb dargestellt, Mikrotubuli in primären Fortsätzen sind in Blau dargestellt. C) Im Kontrast dazu ist bei Schädigung eine abgeflachte Zell-Grenze zwischen verschmolzenen Fußfortsätzen zu sehen. Es bildet sich eine „Matte“ aus reorganisierten, kurzen und hochverzweigten Aktinfilamenten, hier grün dargestellt. (Faul C. *et al.*, 2007)

Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind bis heute nur unzureichend erforscht. Deshalb ist die Entwicklung entsprechender Tiermodelle von entscheidender Bedeutung.

4.4 Tiermodelle mit glomerulärer Schädigung

Für die membranöse Nephropathie existiert ein gut erforschtes Tiermodell, die passive Heymann Nephritis in der Ratte (Heymann W, *et al.*, 1959). Sie wird durch Injektion eines in Schafen oder Kaninchen generierten Antiserums, das gegen ein unverarbeitetes Extrakt aus Rattennieren gerichtet ist, induziert (Heymann W, *et al.*, 1959, Edgington TS, *et al.*, 1968). Ebenso wie beim Menschen kommt es im Rattenmodell zu Fußfortsatzverschmelzungen und subepithelialen Immunkomplexen, einem Markenzeichen der membranösen Nephropathie (Nangaku M, *et al.*, 2005; Couser WG, 2005; Couser WG, 1998; Salant DJ, Darby C und Couser WG, 1980 Couser WG und Salant DJ, 1980).

Ein weiteres immunologisches Modell der glomerulären Schädigung ist das anti-Thymocyte Serum (ATS) Nephritis Modell der Ratte. Dabei wird durch die Gabe eines monoklonalen Thy-1.1 Antikörpers eine mesangioproliferative Glomerulonephritis ausgelöst. Thy-1.1 ist ein auf Ratten-Mesangialzellen exprimiertes Protein. Bei Applikation des Antikörpers kommt es in diesem Modell zu nekrotischen Veränderungen der Mesangialzellen, gefolgt von einer

mesangioproliferativen Glomerulonephritis einhergehend mit einer schweren Proteinurie (Ishizaki M, *et al.*, 1986).

Die Nephrotoxische Serum Nephritis (NTN) ist ein weit verbreitetes Mausmodell für eine anti-Basalmembran (anti-GBM) Nephritis. Sie wird durch eine einzige Injektion eines polyklonalen, in Schafen generierten, Antiserums induziert. Das Serum ist gegen eine grobe GBM Aufreinigung gerichtet. Es enthält multiple Antigene gegen die GBM, die tubuläre Basalmembran (TBM), und endotheliale, epitheliale und mesangiale Zellwände (Anders HJ, und Schlöndorf, 2008; Assmann KJ, *et al.*, 1985; Schriver G, *et al.*, 1990).

Ein immunvermitteltes Modell mit primärer Podozytenschädigung ist in der Maus bisher nicht etabliert. Erste vielversprechende Ergebnisse wurden mit einem gegen differenzierte Podozyten gerichteten Antiserums aus Kaninchen erzielt. In diesem Modell kommt es zu podozytärer Schädigung einhergehend mit einer Proteinurie (Meyer TN, *et al.*, 2007). Das Modell zeigt eindrucksvoll die zentrale Bedeutung der podozytären Morphologie für die Filtrationsfunktion der Niere.

5 Hypothese und Ziel der Arbeit

Merkmale glomerulärer Erkrankungen ist die Entstehung einer Proteinurie durch die Schädigung der glomerulären Filtrationseinheit. Das komplexe Zytoskelett der Podozyten wird schon früh im Verlauf von glomerulären Erkrankungen umgebaut und es kommt zu einer Retraktion der Fußfortsätze und somit zu einem Verlust der Filtrationsbarriere. Bei diesen podozytären Umbauprozessen spielt die Interaktion von filamentösem Aktin und Mikrotubuli mit kontraktilen Zellstrukturen und der Zellmembran, unter Umständen unter Beteiligung des Aktinnukleators Spire-1, eine wichtige Rolle.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es zunächst die glomeruläre Schädigung durch ein neues im Schaf generiertes AP-Serum zu charakterisieren. Anschließend soll die renale Genexpression von Spire-1 im APN-Modell der Maus nachgewiesen werden, um ein vergleichbares AP-Modell an kultivierten Mauspodozyten zu etablieren. Am *in vitro* Modell soll abschließend die putative Rolle von Spire-1 bei krankheitsbedingten Umbauprozessen des podozytären Zytoskeletts näher untersucht werden.

6 Material

6.1 Verbrauchsmaterial

- Agar (Invitrogen, Kanada)
- Bechergläser (Schott, Deutschland)
- Blotkassette Novex Mini Cell (Invitrogen, Kanada)
- Deckgläschen 1,8 mm Durchmesser (Assistent, Deutschland)
- Deckgläschen eckig (Marienfeld, Deutschland)
- Dynabeads M450 Tosylactivated (Invitrogen, Kanada)
- Einwegpipette 25 ml (Sarstedt, USA)
- Einwegpipette 10 ml (Sarstedt, USA)
- Einwegpipette 5 ml (Sarstedt, USA)
- Einwegpipette 2 ml (Sarstedt, USA)
- Eukit (Kindler, Deutschland)
- Gefriercontainer (Nalgene, USA)
- Greiner Röhrchen 15 ml (Greiner, Deutschland)
- Greiner Röhrchen 50 ml (Greiner, Deutschland)
- Entwicklungskassette Kodak X-Omatic (Kodak, USA)
- Filme Super RX (Fuji, Japan)
- Filme Hyperfilm™ ECL (Amersham, USA)
- Flexiperm (Greiner, Deutschland)
- Gummi Arabicum (Fluca, Deutschland)
- Hydrophober Stift (Dako, Dänemark)
- Insulinspritze 1 ml (BectonDickinson, Spanien)
- Kryoröhrchen (Nalgene, USA)
- Kulturschalen TC75 (Sarstedt, USA)
- Kulturschalen TC25 (Sarstedt, USA)
- Kulturplatten 96 Well (Falcon, USA)
- Kulturplatten 12 Well (Falcon, USA)
- Kulturplatten 6 Well (Falcon, USA)
- Multipette 8 Kanal (Labsystems, USA)
- Multistix (Siemens, USA)
- NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gel (Invitrogen, Kanada)
- Petrischalen (Sarstedt, USA)
- Pinzetten (Aesculap, Deutschland)
- Pipette 1000 µl (Gilson, USA)
- Pipette 200 µl (Gilson, USA)

Material

- Pipette 20 μ l (Gilson, USA)
- Pipette 10 μ l (Gilson, USA)
- Pipettenspitze 1000 μ l (Sarstedt, USA)
- Pipettenspitze 200 μ l (Sarstedt, USA)
- Pipettenspitze 20 μ l (Sarstedt, USA)
- Pipettenspitze 10 μ l (Sarstedt, USA)
- Pistill (Bel Art Products, USA)
- Polystyrol Objektträger (Nunc, USA)
- PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) (Millipore, USA)
- Reaktionsgefäß 2, ml (Sarstedt, USA)
- Reaktionsgefäß 1,5 ml (Sarstedt, USA)
- Reaktionsgefäß 0,5 ml (Sarstedt, USA)
- RNasefreie Pipettenspitze 1000 μ l (Sarstedt, USA)
- RNasefreie Pipettenspitze 200 μ l (Sarstedt, USA)
- RNasefreie Pipettenspitze 20 μ l (Sarstedt, USA)
- RNasefreie Pipettenspitze 10 μ l (Sarstedt, USA)
- Sample cubs (Videl, Deutschland)
- Schwämme (Invitrogen, Kanada)
- Sieb Maschenweite 90 μ m (ASTM, Deutschland)
- Skalpell Nr. 23 (Braun, Deutschland)
- Sterilfilter 0,2 μ m (Sarstedt, USA)
- Spectinomycin (Invitrogen, Kanada)
- Urin- Stix (Multistix 10S6) (Bayer, Deutschland)
- Vivaspin 15 concentrator Säule (Sartorius, Frankreich)
- Whatmanpapier (Schleicher & Schuell, UK)
- 96-Well-Platte (MicroAmp) (Applied Biosystems, USA)

6.2 Chemikalien

- Aqua ad injectabilia (Braun, Deutschland)
- Blastocidin (Invitrogen, Kanada)
- Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Collagenase (Sigma-Aldrich, USA)
- Complete Proteasehemmer (Roche, land)
- DTT (Sigma-Aldrich, USA)
- DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
- DNase I (Sigma-Aldrich, USA)
- EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

Material

- Eis
- Ethanol, vergällt (Walter, Deutschland)
- Ethanol, absolute (J.T. Baker, NL)
- Ethidium-Bromid (Sigma-Aldrich, USA)
- FCS (Invitrogen, Kanada)
- Filmentwickler Roentoroll 25 (Tetenal, Deutschland)
- Filmfixierer Superfix 25 (Tetenal, Deutschland)
- Flouromount G (Vector Labs, USA)
- Flouromount mit DAPI (Vector Labs, USA)
- Flüssig Stickstoff
- Formalin (Merk, Deutschland)
- Gelcode Blue stain # 24590 (Pierce, USA)
- HBSS Puffer (Invitrogen, Kanada)
- Isofluran (Abbot, USA)
- Magermilchpulver (Spinnrad, Deutschland)
- Methanol (J.T. Baker, NL)
- Pferdeserum (Vector Labs, USA)
- Perjodsäure 1 % ig (Merk, Deutschland)
- Proteinase XXIV 5mg/ml (Roche, Deutschland)
- Salzsäure (Merk, Deutschland)
- Sodium-dodecyl-sulfat (Merk, Deutschland)
- Spectinomycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Sterile, isotone NaCl-Lösung (Braun, Deutschland)
- steriles PBS (Lonza, USA)
- Super Signal[®] west pico Chemiluminescent (Thermo Scientific, USA)
- Trypsin (Invitrogen, Kanada)
- Xylol (Merk, Deutschland)

6.3 Geräte

- Analysenwaage H45 (Mettler, Deutschland)
- Autoklav (Systec, Deutschland)
- Biofuge (Heraeus, Deutschland)
- Brutschränke (Heraeus, Deutschland)
- Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)
- Eismaschine (Hoshikazi, Japan)
- Elektrophoresekammer für DNA (PeqLab, Deutschland)
- ELISA-Reader MRX II (Dynatech Laboratories, USA)

Material

- Gefrierschrank -20 °C (Privileg, Deutschland)
- Gefrierschrank -80 °C (Heraeus, Deutschland)
- Gelelektrophorese-Apparatur (PeqLab, Deutschland)
- Grobwaage (Scaltec, Deutschland)
- Heizblock (neoLab[®], Deutschland)
- Kamera Axiocam MRm (Zeiss, Deutschland)
- Kamera Axiocam HRc (Zeiss, Deutschland)
- Kühlschrank (Liebherr, Deutschland)
- Maushalter für Injektion
- Magnetic Particle Concentrator (MPC) (Invitrogen, Kanada)
- Magnetrührer (IKA[®], Deutschland)
- Mikroskop Axioskop (Zeiss, Deutschland)
- Mikroskop AxioObserver.A1 (Zeiss, Deutschland)
- Nanodrop[™] Spektrophotometer (ND 1000) (Thermo Scientific, USA)
- Netzgerät (BioRad, Deutschland)
- Nucleofector[®] (Amaxa, Deutschland)
- Ofen (Heraeus, Deutschland)
- PC (LG, Südkorea)
- Photoprinter (Intas, Deutschland)
- Real Time Cycler 7000
Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA)
- Röntgenentwickler (CP 1000) (Agfa, Belgien)
- Schwenktisch (Fröbel, Belgien)
- Thermocycler (Biometra, Deutschland)
- Thermomixer (Eppendorf, Deutschland)
- Tischzentrifuge 5415 P (Eppendorf, Deutschland)
- UV-Transluminators (Syngene, UK)
- Wasserbad (Julabo, Deutschland)
- Vortex (IKA[®], Deutschland)
- Vortex (Heidolph, Deutschland)
- Wecker (Roth, Deutschland)
- Werkbank (Hera Safe) (Heraeus, Deutschland)
- Zählkammer Neubauer

6.4 Kits

- | | |
|---|-------------------------------|
| • Live/Dead [®] CellVitality Assay Kit | (Invitrogen, Kanada) |
| • Sybr-Green [®] Jump Start Kit | (Sigma-Aldrich, USA) |
| • Block-it [™] Pol II miR RNAi Expression Vector Kit | (Invitrogen, Kanada) |
| • HotStartTaq-DNA-Polymerase-Mix | (Invitrogen, Kanada) |
| • Qiaprep Spin Mini Kit | (Qiagen, Deutschland) |
| • PureLink [™] HiPure Plasmid Midiprep Kit | (Invitrogen, Kanada) |
| • Cell Line Nucleofector [®] Kit V | (Amaxa, Deutschland) |
| • NucleoSpin [®] RNA II Mini Kit | (Macherey-Nagel, Deutschland) |
| • ELISA Kit, E101 | (Bethyl Laboratories, USA) |

6.5 Allgemeine Puffer

T-Per Tissue Protein Extraction Reagent	(Pierce, USA)
---	---------------

6.5.1 Blockpuffer für Dynabeads

0,2 M Tris pH 8,5;	(Sigma-Aldrich, USA)
0,1 % BSA (w/v)	(Sigma-Aldrich, USA)

6.5.2 Puffer für Western Blot

4x LDS Beladungspuffer

NuPage LDS 4x	(Invitrogen, Kanada)
0,4 M DTT	(Sigma-Aldrich, USA)

MOPS Laufpuffer

50 mM	MOPS	(Biomol, Deutschland)
50 mM	Tris Base pH 7,4	(Sigma-Aldrich, USA)
0,1 %	SDS	(Merk, Deutschland)
1 mM	EDTA	(Sigma-Aldrich, USA)

Material

Blotpuffer

50 mM	Tris Base pH 7,4	(Sigma-Aldrich, USA)
0,192 M	Glycin	(Roth, Deutschland)
in Aqua dest		

Waschpuffer TBST

10 mM	Tris Base pH 7,4	(Sigma-Aldrich, USA)
107 mM	NaCl	(Serva, Deutschland)
0,05%	Tween 20	(Sigma-Aldrich, USA)

Superblock

(Pierce, USA)

6.5.3 Puffer für Agarosegele

TAE Laufpuffer

90 mM	Tris-Acetat	(Sigma-Aldrich, USA)
2 mM	EDTA	(Sigma-Aldrich, USA)
ad 1 l H ₂ O		

Agarosegel 2 %

2 g	Agarose	(Lonza, USA)
100 ml	TAE	
0,2 µg/ml	Ethidium-Bromid	(Sigma-Aldrich, USA)

10x DNA Beladungspuffer

50 %	Glycerol	(Merck, Deutschland)
100 mM	EDTA	(Sigma-Aldrich, USA)
0,05 %	Xylenecyanol FF	(Sigma-Aldrich, USA)
0,05 %	Bromphenolblau	(Merck, Deutschland)

6.5.4 Lösungen für ELISA

Coating Buffer

0,05 M Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6(Bethyl, USA)

Waschlösung

50 mM Tris, pH 8,0 (Bethyl, USA)

0,05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)

Postcoat Buffer

50 mM Tris pH 8,0 (Bethyl, USA)

0,1 % BSA (Sigma-Aldrich, USA)

Sample/Conjugate Diluent

Postcode Buffer

0,05 % Tween 20

Enzyme Substrate

60 ml TMB Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry, USA)

60 ml Peroxidase Solution B (Kirkegaard & Perry, USA)

6.5.5 Lösungen für Immunhistochemie

Sörensen Puffer(1 Liter)

3,03 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Deutschland)

14,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Deutschland)

vor dem Auffüllen auf 1 Liter mit 2M HCL auf pH 7,4 einstellen

Formalin Lösung in Sörensen Puffer(1 Liter)

111 ml 37% Formalin (Formaldehydlösung 37 säurefrei
(Merck, Deutschland)

889 ml Sörensen Puffer

Material

TNT Puffer

9,09 g	NaCl	(Serva, Deutschland)
6,35 g	Tris Base	(Sigma-Aldrich, USA)
25 ml	HCl	(Merk, Deutschland)
ad 1 l	mit H ₂ O auffüllen	
0,1 %	Tween	(Sigma-Aldrich, USA)

Naphtol-AS-Biphosphat Lösung

250 µg	Naphtol-AS-Biphosphat	(Fluka; Deutschland)
9 ml	NN-Dimethylformamid	(Sigma-Aldrich, USA)

Neufuchsin Lösung

150 ml	TNT Puffer	
300 mg	Natriumnitrit in 7,5 ml H ₂ O	(Sigma-Aldrich, USA)
300 µl	Neufuchsin Sammlösung	(Chroma; Deutschland)
800 µl	Naphtol-AS-Biphosphat Lösung	

Hämalaunlösung nach Böhmer

10 g	Aluminiumkaliumsulfat x 12 H ₂ O	(Merck, Deutschland)
0,1 g	Natriumjodat in 200 ml H ₂ O	(Merck, Deutschland)
	+	
1 g	Hämatoxylin in 10 g Ethanol abs.	(Serva, Deutschland)

Schiff'sches Reagenz

(Sigma-Aldrich, USA)

6.5.6 Lösungen für Silbernitratfärbung

Silbernitratlösung

0,2 %	AgNO ₃ in H ₂ O	(Merck, Deutschland)
0,03 %	Formaldehyd	(Merck, Deutschland)

Fixierer

40 %	Methanol	(J.T. Baker, NL)
12 %	Essigsäure	(Roth, Deutschland)

Entwickler

6 %	Na ₂ CO ₃	(Merck, Deutschland)
0,02 %	Formaldehyd	(Merck, Deutschland)
0,02 %	Na-Thiosulfat	(Merck, Deutschland)

Na-Thiosulfatlösung

0.02 % Na-Thiosulfat in H₂O

30 % Ethanol

(Walter, Deutschland)

Aqua dest

6.5.7 Lösungen für die Generierung von miRNA Zelllinien

10x OligoAnnealing Buffer

100 mM	Tris-HCl, pH 8.0	(Invitrogen, Kanada)
10 mM	EDTA, pH 8.0	(Invitrogen, Kanada)
1 M	NaCl	(Invitrogen, Kanada)

5X Ligation Buffer

250 mM	Tris-HCl, pH 7.6	(Invitrogen, Kanada)
50 mM	MgCl ₂	(Invitrogen, Kanada)
5 mM	ATP	(Invitrogen, Kanada)
5 mM	DTT	(Invitrogen, Kanada)
25% (w/v)	Polyethyleneglycol-8000	(Invitrogen, Kanada)

T4 DNA Ligase 1 (Weiss) U/μl in

10 mM	Tris-HCl, pH 7.5	(Invitrogen, Kanada)
50 mM	KCl	(Invitrogen, Kanada)
1 mM	DTT	(Invitrogen, Kanada)
50% (v/v)	Glycerol	(Invitrogen, Kanada)

S.O.C. Medium

2%	Tryptone	(Invitrogen, Kanada)
0.5%	Yeast Extract	(Invitrogen, Kanada)
10 mM	NaCl	(Invitrogen, Kanada)
2.5 mM	KCl	(Invitrogen, Kanada)
10 mM	MgCl ₂	(Invitrogen, Kanada)
10 mM	MgSO ₄	(Invitrogen, Kanada)
20 mM	Glucose	(Invitrogen, Kanada)

Agarplatten

X g Agar in X ml sterilem H ₂ O		
+ Spectinomycin (50 μg/ml)		(Invitrogen, Kanada)

6.6 Zellkulturmedien

6.6.1 Podozyten-Medium für non permissive Bedingungen

RPMI 1640	(Invitrogen, Kanada)
+ 10% FCS	(Invitrogen, Kanada)
+ 1 mM Natriumpyruvat	(Invitrogen, Kanada)
+ 15 mM HEPES	(Invitrogen, Kanada)
+ 100 U/ml Penicillin	(Invitrogen, Kanada)
+ 100 mg/ml Streptomycin	(Invitrogen, Kanada)

6.6.2 Podozyten-Medium für permissive Bedingungen

RPMI 1640	
+ 10% FCS	
+ 1 mM Natriumpyruvat	
+ 15 mM HEPES	
+ 100 U/ml Penicillin	
+ 100 mg/ml Streptomycin	
+ γ -Interferon 10 U/ml	(PeproTech [®] , UK)

Im Fall der stabil transfizierten Zelllinien wurde beiden Medien 10 μ g/ml Blasticidin hinzugegeben.

6.7 Antikörper

Primärantikörper für Westernblot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen anti-Spire-1	Geschenk von E. Kerkhoff	1:60 in Superblock
MAP Kinase p42/p44	Cell Signaling	1:1000 in Superblock
Kon-Serum		1:1000 in Superblock
AP-Serum		1:1000 in Superblock

Sekundärantikörper für Westernblot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
anti-Kaninchen HRP (Esel)	Jackson Labs	1:10000 in 5 % MMP in TBST
anti-Maus HRP (Esel)	Jackson Labs	1:60000 in 5 % MMP in TBST
anti-goat HRP (Esel)	Jackson Labs	1:10000 in 5 % MMP in TBST

Primärantikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
anti- α -Tubulin (Maus)	Sigma	1:100 in PBS
anti-Spire-1 (Kaninchen)	Geschenk von E. Kerkhoff	1:10 in PBS

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Biotin Anti-Schaf IgG (Esel)	Jackson Lab	1:200 in PBS
Biotin anti-Maus IgG(Esel)	Jackson Lab	1:100 in PBS
Biotin anti-Kaninchen IgG(Esel)	Jackson Lab	1:100 in PBS

Reagenzien für Fluoreszenzfärbung

Reagenz	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor [®] 568 Phalloidin	Invitrogen	1:60 in PBS
Fluorescein Avidin D	Vector Labs	1:100 in PBS
AMCA Avidin D	Vector Labs	1:100 in PBS

Primärantikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Biotin anti-Schaf IgG (Esel)	Jackson Lab	1:400 in 5 % Pferdeserum in PBS
Biotin anti-Maus IgG (Esel)	Jackson Lab	1:400 in 5 % Pferdeserum in PBS

Reagenzien für Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Streptavidin AP	Jackson Lab	1:100 in PBS

6.8 Primer

RT-PCR

Primer	Sequenz
Spire-1 FW2-Primer	GGAAACCCTCAAAGGAGGAA
Spire-1 RW-Primer	CGGGCCTCTTACAGAACTGA
GAPDH FW-Primer	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH RW-Primer	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Firma Invitrogen (Kanada)

qRT-PCR

Primer	Sequenz
Spire-1 FW2-Primer	CTGGAGGACCTGAAAAATGC
Spire-1 RW3-Primer	ATGGGCAGAGGGTTGACTG
18S FW-Primer	TTCGAACGCTGCCCTATCAA
18S RW-Primer	CTGCCTTCCTTGATGTGGTA

Firma Invitrogen (Kanada)

Sequenzierung

Primer	Sequenz
miRNA EmGFP Forward Sequencing Primer	5'- GGCATGGACGAGCTGTACAA -3'
miRNA Reverse Sequencing Primer	5'- CTCTAGATCAACCACTTTGT -3'

Die Konzentration der Primerstocklösungen (Invitrogen, Kanada) betrug 100 ng/μl.

6.9 Größenstandards

- PCR Marker (NEB, USA)
- SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard (Invitrogen, Kanada)

6.10 Vektoren

- pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR (Invitrogen, Kanada)
5 ng/μl in
10 M Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0
- pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR neg control plasmid (Invitrogen, Kanada)
5 ng/μl in
10M Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0

6.11 miRNA Sequenzen

Oligobezeichnung	Sequenz
Mmi 568416 top strand	tgctgtttgtagccagcaccaggctgtttggccactgactgacagcctggttgctaacaaa
Mmi 568416 bottom strand	cctgtttgtagccaaccaggctgtcagtcagtgccaaaacagcctggtgctggctaacaaac
Mmi 568417 top strand	tgctgatcactgtaccagaaccgggtttggccactgactgaccggttctgtacaagtgat
Mmi 568417 bottom strand	cctgatcactgtacagaaccgggtcagtcagtgccaaaaccggttctgggtacaagtgatc
Mmi 568418 top strand	tgctgagcacatggcctccagtactggtttggccactgactgaccagtactgggccatgtgct
Mmi 568418 bottom strand	cctgagcacatggcccagtactggtcagtcagtgccaaaaccagtactggaggccatgtgctc
Mmi 568419 top strand	tgctgagaacctggcaatactcgaagtttggccactgactgactcgaagttgccaggttct
Mmi 568419 bottom strand	cctgagaacctggcaactcgaagtcagtcagtgccaaaactcgaagtattgccaggttctc

6.12 Computerprogramme

- ABI PRISM (Applied Biosystems, USA)
- Axiovision (Zeiss, Deutschland)
- StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems, USA)

Material

- Excel (Microsoft, USA)
- Photoshop (Adobe Systems, USA)
- CellQuest™ Pro (Becton Dickinson, USA)
- Windows XP und Vista (Microsoft, USA)
- Image J (NIH, USA)

7 Methoden

7.1 Die Anti-Podozyten-Nephritis (APN)

7.1.1 Immunisierung des Schafes

Ein Schaf wurde mit Proteinlysaten aus differenzierten Podozyten immunisiert. Dazu wurden zehn eingefrorene Zellpellets aus TC75 Kulturflaschen in insgesamt 5 ml PBS resuspendiert und mit derselben Menge kompletten Freund-Adjuvans homogenisiert. Dieses Gemisch wurde einem Schaf in mehreren Stellen subcutan injiziert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurde dem Schaf im Abstand von einem Monat drei weitere Male zehn TC75 Pellets in inkomplettem Freund-Adjuvans nach beschriebener Methode gespritzt. Anschließend wurde dem Schaf 500 ml Blut entnommen. Aus dem Blut dieses Schafs wurde im Folgenden ein Serum gewonnen, welches direkt gegen murine Podozyten gerichtet ist. Die Immunisierung wurde nach Anweisung von Dr. Catherine Meyer-Schwesinger von der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt. Das Blut des immunisierten Schafs (im Folgenden: AP, für Anti-Podozyten) wurde dem Schaf von Mitarbeitern der Zentralen Tierhaltung abgenommen. Das präimmunisierte Blut (im Folgenden: Kon, für Kontrolle) wurde dem Schaf vor Immunisierung auf gleichem Wege entnommen und wie das Blut nach Immunisierung behandelt.

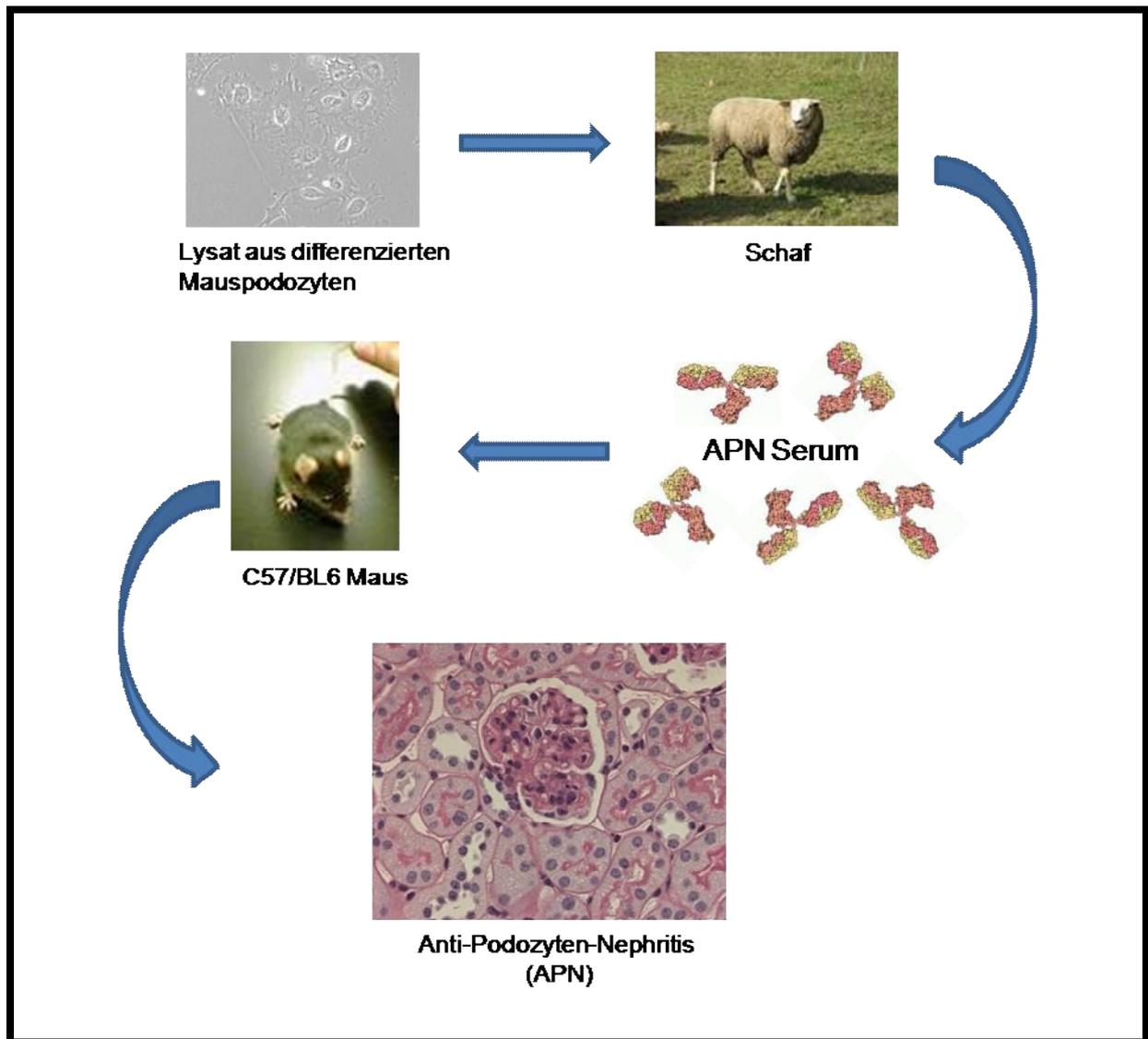


Abbildung 5: Herstellung des Serums für die APN.

7.1.2 Serumherstellung

Zur vollständigen Koagulation wurde das Blut über Nacht bei 4 °C gelagert. Danach wurde das Blut zehn Minuten bei 4 °C bei 5000 g zentrifugiert und die Überstände (Kon-Serum und AP-Serum) abgenommen. Das Serum wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Zur Komplementinaktivierung wurde das aufgetaute Serum vor Verwendung im Experiment für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde es über eine Vivaspin 15 concentrator Säule zweifach aufkonzentriert und in 1 ml Aliquots aufgeteilt, die bei -80 °C gelagert wurden. Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Versuche mit diesem

aufkonzentrierten Serum durchgeführt. Aufgetaute Aliquots wurden für die Dauer der Nutzung bei 4 °C gelagert.

7.1.3 Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 25 bis 30 Gramm schwere, 12 bis 14 Wochen alte, männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 der Firma Charles River. Die Versuchstierhaltung erfolgte durch das Fachpersonal der Zentralen Versuchstierhaltung des UKE. Die Haltung der Versuchstiere des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ist durch das Gesetz zum Europäischen Übereinkommen vom 18. März 1986 sowie die EU-Richtlinien 86/609 EWG geregelt. Sie erfolgte tiergerecht unter standardisierten Bedingungen, bei einer Raumtemperatur von 25 °C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils zwölf Stunden. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und wurden mit Trockenpellets (V1536-000 sniffR/M-H, Sniff, Deutschland) gefüttert.

7.1.4 Induktion der APN

Zur Induktion der APN-Nephritis wurden 300 µl des jeweiligen Schafserums (AP- oder Kon-Serum) intravenös appliziert. Wildtyp-Kontrollen erhielten anstelle des Serums 300 µl isotone NaCl-Lösung. Dazu wurden die Tiere zunächst durch Isofluran in eine adäquate Narkose versetzt. Bei ausreichender Narkotisierung wurden die Mäuse in einen eigens für diese Anwendung hergestellten Maushalter aus Plexiglas überführt. Durch Eintauchen des Schwanzes in warmes Wasser wurde eine ausreichende Dilatation der Schwanzvene erreicht, in die das Serum anschließend mit einer 1 ml Insulinspritze injiziert wurde. Die Entwicklung der APN wurde über einen Zeitraum von maximal 15 Tagen verfolgt.

7.1.5 Gewinnung von Mausurin zur Analyse

Vor Urinnahme wurden den Tieren 1 ml NaCl ad injectabilia intraperitoneal gespritzt. Anschließend wurden die Mäuse auf eine 96 Well-Platte gesetzt und mit einem Kasten abgedeckt. Nach 6 Stunden wurde der Urin, der nicht mit Kot verunreinigt war, gesammelt und bei -20 °C eingefroren.

7.1.6 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte nach 4 Stunden sowie an Tag 4, 7, 9 und als Endzeitpunkt an den Tagen 13 bis 15. Die Nieren wurden gemeinsam mit Frau Dr. Catherine Meyer-Schwesinger (positives Votum der Ethikkommission FII 82/06) entnommen. Dazu wurden die Tiere mittels Isofluran in eine adäquate Betäubung versetzt und die Bauchhöhle über einen Bauchschnitt geöffnet. Anschließend wurden beide Nieren freipräpariert und entnommen. Nieren aus denen die Glomeruli mittels Nanobeads aufgereinigt werden sollten, wurden vor der Entnahme mit diesen perfundiert. Dazu wurde die Aorta oberhalb der Niere abgeklemmt und beide Nieren gleichzeitig durch die Aorta mit 200 µl Dynabeadsuspension in 50 ml PBS perfundiert (Takemoto M, *et al.*, 2002).

7.1.7 Gewinnung von Mausglomeruli über Dynabeads

Zur Vorbereitung wurden tags zuvor 200 µl Dynabeadsuspension pro Tier unter exzessivem Resuspendieren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Dynabeads wurden am Magnetic Particle Concentrator (im Folgenden MPC) gesammelt und der Überstand entfernt. Die Beads wurden zweimal mit PBS gewaschen und in je 200 µl Blockpuffer resuspendiert und für vier Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es war darauf zu achten, dass die Beads dabei zu keinem Zeitpunkt sedimentierten. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und die am MPC gesammelten Dynabeads bis zur Benutzung in 200 µl PBS bei 4 °C gelagert. Die Perfusion der Mausnieren mit den Dynabeads ist im Abschnitt Organentnahme beschrieben.

Der Nierencortex wurde in 1 ml einer Verdauungslösung (1 mg/ml Collagenase; 100 U/ml DNase I in HBSS) für 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln im Wasserbad verdaut, kurz sedimentieren gelassen, der Überstand vorsichtig abgenommen, auf ein Sieb mit 90 µm Maschenweite überführt, mit etwas HBSS gespült und das gesammelte Filtrat in ein Röhrchen überführt. Es wurde für 5 Minuten bei 4 °C und 200xg zentrifugiert, die Pellets in 1 ml HBSS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachfolgend wurden die Glomeruli dreimal mit HBSS gewaschen, wobei sie dazwischen jeweils mit dem MPC gesammelt wurden. Zum Abschluß wurden die Überstände verworfen und die Glomeruli weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

7.1.8 Organfixierung und Einbettung

Nierenviertel wurden in einem 15 ml Falcon Tube über Nacht bei 4 °C in 4% Formalin in Sörensenpuffer fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gewebe über den folgenden Tage verteilt mindestens dreimal mit 8 ml PBS auf einem Wipptisch gewaschen und anschließend bis zur Einbettung bei 4°C gelagert.

Die Einbettung und Herstellung der 1,5 µm dicken Organschnitte wurde im histologischen Labor der III. Medizinischen Klinik durchgeführt.

7.2 Proteinbiochemische Methoden

7.2.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung eines Proteinlysats wurden alle Inkubationen bzw. Zentrifugationen auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Es wurden jeweils 10 µl vorgekühlter T-Per⁺ Puffer (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent + 1x Complete Proteasehemmstoff) pro mg Gewebe oder Zellpellet zu der Probe gegeben. Die Zellpellets wurden unter gelegentlichem Mischen für 15 min inkubiert. Die Nierenstücke wurden mit 1/10 Volumen des Endvolumens versetzt und mit einem Pistill homogenisiert. Anschließend wurde der restliche T-Per⁺ Puffer zugegeben und ebenfalls 15 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben für 20 min bei 16000

g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues, vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt mittels Nanodrop bei 280 nm bestimmt. Die Lysate wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

7.2.2 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zuvor gewonnenen Proteinlysate wurden mit $\frac{1}{4}$ Volumen Lithiumdodecylsulfat (LDS) versetzt und für 10 min bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Anschließend wurden die Proben abgekühlt und die Taschen eines vorgefertigten, reduzierenden 4-12% NuPAGE[®]-Gradientengels mit jeweils gleichen Proteinmengen sowie einem Größenstandard beschickt. Die Elektrophorese wurde standardisiert mit 60 mA pro Gel für eine Stunde bei Raumtemperatur in MOPS-Puffer durchgeführt.

Auch Proteine im Urin wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde der Urin auf Eis aufgetaut und 2 Minuten lang bei 16000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurde 10 μml Urin mit $\frac{1}{4}$ Volumen LDS versetzt und weiter wie mit Proteinlysaten verfahren.

7.2.3 Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE

Für die Coomassie Färbung eines Uringels wurde das Gel nach der Elektrophorese dreimal für jeweils fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel 30 Minuten in ca. 15 ml unverdünnten Gelcode geschwenkt. Das Gel wurde zweimal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht in destilliertem Wasser geschwenkt. Für die langfristige Sicherung der Daten wurde das Gel mit einem Scanner eingescannt.

7.2.4 Silbernitrat-Färbung

Für die Silbernitrat-Färbung wurde das Gel für eine Stunde in Fixierer inkubiert. Das Gel wurde zweimal 20 Minuten mit 30 % Ethanol gewaschen und für eine Minute in Na-

Thiosulfatlösung inkubiert. Es wurde dreimal für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und zwanzig Minuten in Silbernitratlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurde das Gel in Entwickler inkubiert, bis das erwünschte Färbungsergebnis erreicht war. Die Färbung wurde mit Aqua dest. gestoppt, das Gel zwei weitere Male mit Aqua dest. gewaschen und anschließend fotografiert. Alle Schritte der Färbung fanden bei Raumtemperatur statt.

7.2.5 Western Blot und Immunodetektion

Zur Detektion spezifischer Proteine in dem aufgetrennten Proteinlysate wurde ein Westernblot durchgeführt. Dabei wird das Gel auf eine methanolaktivierte PVDF-Membran gelegt und die Proteine durch Anlegen eines senkrecht zum Gel gerichteten, elektrischen Felds auf die Membran übertragen. Die Proteine werden dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Membran fixiert.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in MOPS Puffer bei konstanter Spannung von 30 Volt für eine Stunde unter Eiskühlung.

Für die Detektion der spezifischen Proteine wurde die Membran dreimal kurz mit TBST gewaschen und mit 3 % Magermilchpulver in TBST für eine halbe Stunde auf einem Wipptisch geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Wipptisch. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran viermal für je 10 Minuten gewaschen und anschließend für eine halbe Stunde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper auf der Wippe inkubiert. Nachfolgend wurde, nach erneutem viermaligem Waschen mit TBST für 10 Minuten, die Membran für fünf Minuten mit Detektionslösung inkubiert. Die Membran wurde in eine Entwicklungskassette gelegt, für unterschiedliche Zeiten Röntgenfilme belichtet und in einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

Für die Detektion der Beladungskontrolle wurde die Membran als ein zweites Mal gegen ein Referenz Gen (MAP-Kinase p42/p44) detektiert. Die Blotmembran wurde, nach dem Abwaschen der Detektionslösung mit TBST erneut mit einem weiteren Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert und wie oben beschrieben, verfahren.

Für die densitometrische Auswertung wurden die Filme mit Adobe Photoshop eingescannt. Die Densitometrie der Banden und die abschließende Auswertung des Westernblots erfolgten mit Image J und Excel.

7.3 Urindiagnostische Parameter

7.3.1 Messung der Kreatininkonzentration im Mausurin

Zur Messung der Kreatininkonzentration wurden die gefrorenen Urine zunächst auf Eis (oder über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C) aufgetaut und nachfolgend bei 4 °C bei 16000 g für zwei Minuten zentrifugiert, um Verunreinigungen zu pelletieren. Anschließend wurden 200 µl des Urins in Sample Cubs überführt.

Bei nicht hinreichender Menge des zur Verfügung stehenden Urins konnte der Urin mit Aqua ad injectabilia auf 200 µl aufgefüllt werden. Die Messung der Kreatininkonzentration wurde im Zentrallabor des UKE durchgeführt.

7.3.2 Quantifizierung der Albuminausscheidung im Urin

7.3.2.1 Semiquantitative Bestimmung von Protein im Urin mittels Urinsticks

Zur groben Abschätzung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Urinproben wurde der Urin mittels Multistix auf Proteine untersucht. Dafür wurden 9 µl der Urinprobe auf das Proteinfeld des Teststreifens pipettiert, eine Minute inkubiert und abgelesen. Zur Einschätzung der Proteinkonzentration wurde die Farbe des Testfeldes mit einem Referenzstandard verglichen und dadurch dem entsprechenden Wert zugeordnet.

7.3.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In dieser Arbeit wurde ein ELISA-Kit (Bethyl Laboratories) verwendet, aus dem alle verwendeten Materialien und Reagenzien stammen. Zunächst wurden je 100 µl der Coating Antikörper Lösung (1:100 in Coating Buffer) in die Löcher einer 96 Well Mikrotiterplatte

Methoden

pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde zweimal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und mit 150 µl/Well Postcoat Buffer für 30 Minuten geblockt. Nach erneuten dreimaligem Waschen mit je 200 µl/Well Waschpuffer wurden je 100 µl/Well der zu untersuchenden Urinverdünnungen hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Berechnung der Albuminkonzentration wurde ebenfalls eine Standardreihe mit bekannter Albuminkonzentration auf die 96 Well Platte gegeben. Dazu wurden 2 µl des im Kit enthaltenen Mouse Reference Serum mit 9 µl Sample Diluent versetzt, um eine Lösung mit 10.000 ng/ml Albumin zu erhalten. Aus dieser wurde die in nachfolgender Tabelle angegebene Standardreihe hergestellt und in vorbereitete Löcher der 96 Well Platte gegeben. Alle Messwerte wurden per Doppelbestimmung mit anschließender Mittelwertbildung gemessen.

Es folgte eine fünfmalige Waschung mit je 200 µl/Well Waschpuffer, um nicht gebundenes Albumin zu entfernen. Die Inkubation mit 100 µl/Well des HRP-gekoppelten Detektionsantikörper (in Sample/Conjugate Diluent) erfolgte ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde wieder fünfmal mit je 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Die Farbreaktion mit der Enzymsubstratmischung (1:1) erfolgte für 15 Minuten im dunklen bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 2M H₂SO₄ gestoppt und die Mikrotiterplatte im Photometer bei 450 nm vermessen.

Der zulässige Messbereich des verwendeten Elisa liegt bei ca. 7,8 bis 500 ng/ml Albumin liegt. Die Proteinausscheidung einiger nierengeschädigter Mäuse lag jedoch im dreistelligen mg/ml Bereich. Um exakte Messungen im ELISA zu erhalten, mußten entsprechende Verdünnungen der Urine vorgenommen werden. Der Verdünnungsfaktor für die jeweilige Urinprobe wurde anhand der Ergebnisse des Multistix eingeschätzt und die Urinprobe mit Sample Diluent aus dem ELISA Kit nach folgender Tabelle verdünnt.

Ergebnis Multistix	Verdünnungsfaktor
negativ/Spur	1:100
+	1:1000
++	1:10000
+++	1:25000
++++	1:100000 bis 1:400000

Tabelle 1: Ergebnisse Multistix

Standard	Albuminkonzentration (ng/ml)	Albuminstandard		Sample Diluent
0	10.000	2µl Mouse Reference Serum	+	9ml
1	500	0,5ml der 10.000ng/ml-Verdünnung	+	9,5ml
2	250	0,5ml der 500ng/ml-Verdünnung	+	0,5ml
3	125	0,5ml der 250ng/ml-Verdünnung	+	0,5ml
4	62,5	0,5ml der 125ng/ml-Verdünnung	+	0,5ml
5	31,25	0,5ml der 62,5ng/ml-Verdünnung	+	0,5ml
6	15,625	0,5ml der 31,25ng/ml-Verdünnung	+	0,5ml
7	7,8	0,5ml der 15,625ng/ml-Verdünnung	+	0,5ml

Tabelle 2: Standardreihe für Albumin ELISA

Die gemessenen Extinktion wurde anhand der Formel $Absorption = \frac{(A-D)}{1+(x/C)B+D}$ in die Konzentrationen des in den Proben enthaltenen Albumins umgerechnet. Die Werte A bis D ergaben sich aus der erstellten Standardkurve. Als Maß für die Genauigkeit der Messergebnisse wurde der Regressionswert der Standardwerte des ELISAs errechnet. Es fanden keine Ergebnisse mit einer Regression kleiner als 0,9950 Verwendung.

7.4 Immunhistochemische Methoden

7.4.1 Deparaffinierung der Schnitte

Bevor die Organschnitte auf ihre jeweiligen Parameter gefärbt werden konnten, mußten sie deparaffiniert werden. Dazu wurden sie zunächst bei 40 °C über Nacht im Ofen inkubiert. Die Objektträger wurden abkühlen gelassen und die Organschnitte mit einem hydrophoben Stift umrandet. Zur eigentlichen Deparaffinierung wurden die Objektträger dreimal für fünf Minuten in Xylol getaucht.

Es folgte eine Inkubationsreihe in sinkender Ethanolkonzentration zur Entfernung des Xylols. Dabei wurden die Objektträger jeweils zweimal für zwei Minuten in 100, 95, 75 und 50 %

Ethanol in Aqua dest. getaucht. Anschließend wurden sie noch zweimal für zwei Minuten in Aqua dest. rehydriert und zum Abschluß dreimal für fünf Minuten in PBS getaucht.

7.4.2 PAS-Färbung

Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden für 13 Minuten in 1 %iger Perjodsäure inkubiert und anschließend für 3 Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült. Nachfolgend wurden sie einmal mit Aqua dest. gewaschen und für 50 Minuten in Schiff'schen Reagenz inkubiert. Um überschüssige fuchsinschwefelige Säure zu entfernen, wurden die Schnitte 7 Minuten lang unter fließendem, warmem Leitungswasser gewaschen und wiederum einmal mit Aqua dest. gespült. Für die Kernfärbung nach Böhmer wurden die Schnitte 12 Minuten in Hämatoxylin-Lösung getaucht und darauf folgend 3 Minuten unter fließendem, warmem Leitungswasser gespült. Zur Erhöhung des Kontrastes wurde gegebenenfalls mit 1 N HCl in Ethanol differenziert. Zuletzt wurden die Schnitte zur Konservierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe der Konzentrationen 70%, 96% und 100% Ethanol, und abschließend 100% Xylol dehydriert und mit Deckgläsern in Eukit eingedeckelt.

7.4.3 PAS Score

Zur Quantifizierung der glomerulären Schädigung wurden die PAS-gefärbten Schnitte durch einen arbiträren PAS Score bewertet. Einbezogen wurde zum einen die Einlagerung PAS positiven Materials. Diese ist charakterisiert durch die Vermehrung der mesangialen Matrix durch Zunahme PAS-positiver Kollagene und die glomeruläre Einlagerung von Proteininfiltraten, welche in der PAS Färbung als Zunahme positiver Areale sichtbar wird.

Außerdem wurde die Zellzahl innerhalb der Glomeruli bewertet. Bei einer stärkeren Schädigung des Glomerulums und steigender Einlagerung PAS positiven Materials kommt es zu einer Abnahme der Zellzahl, da sich die Podozyten von der glomerulären Basalmembran ablösen und über den Harn ausgeschieden werden.

Für die Quantifizierung wurden pro Schnitt 30 Glomeruli unter einem Hellfeldmikroskop bei 200-facher Vergrößerung bewertet. Dafür wurde 0 für einen völlig gesunden Glomerulus und

4 für einen vollständig geschädigten Glomerulus gewählt. Die Definition der einzelnen Abstufungen wurde wie folgt festgelegt:

PAS Score	Schädigung
0	völlig gesunder Glomerulus
1	leichte Einlagerung PAS-positivem Materials
2	vermehrte Einlagerung PAS-positivem Materials
3	massive Einlagerung PAS-positivem Materials und mittlerem Zellverlust
4	massive Einlagerung PAS-positivem Materials mit starkem Zellverlust

Tabelle 3: arbiträrer PAS Score

Die erhobenen Daten wurden mit dem Computerprogramm EXCEL ausgewertet.

7.4.4 Schaf- und Maus-IgG Färbung auf Paraffinschnitten

Zur Demaskierung des Antigens wurden die deparaffinierten und rehydrierten Schnitte zunächst bei 37 °C für 15 Minuten mit Proteinase XXIV (5mg/ml) inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch einmaliges Dippen der Schnitte in 100 % Ethanol gestoppt. Es wurde dreimal für fünf Minuten mit Leitungswasser gewaschen und für 30 Minuten mit 5 % Pferdeserum in PBS geblockt. Die Inkubation des Primär-Antikörpers erfolgte für weitere 30 Minuten. Es wurde dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit Streptavidin AP inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für fünf Minuten, erfolgte die Farbreaktion mit Neufuchsin. Der alkalischen Phosphatase (AP) wurde dabei die organische Phosphatverbindungen Neufuchsin als Substrat angeboten.

Zum Stoppen der Farbreaktion wurde der Schnitt für einige Minuten mit Leitungswasser gewaschen und die Kerne abschließend mit Hämalaun nach Böhmer gefärbt. Nach dem Differenzieren der Kernfärbung in HCl/H₂O wurden die Schnitte für einige Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen und mit Gummisirup eingedeckelt. Die Dokumentation der Antikörperbindung erfolgte fotografisch im Lichtmikroskop.

7.4.5 Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie

Die Immunogoldfärbungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Jan U. Becker im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hannover nach den dort etablierten Protokollen angefertigt.

7.5 Molekularbiologische Methoden

7.5.1 RNA Aufreinigung

Die Aufreinigung der mRNA erfolgte mittels NucleoSpin[®]RNA II Mini Kit nach Instruktion des Herstellers. Alle Zentrifugationen wurden dabei bei Raumtemperatur und 11000 x g durchgeführt. Gewebestücke oder Zellpellets aus differenzierten Podozyten wurden zunächst in je 350 µl Buffer RA1 + 3,5 µl β-Mercaptoethanol energisch gevortext und auf eine NucleoSpin[®] Filter Säule überführt. Nach einminütiger Zentrifugation wurde dem Durchlauf 350 µl 70 % Ethanol zugegeben, homogenisiert und die Lösung auf eine NucleoSpin[®]RNA II Säule pipettiert. Nach 30 sekundiger Zentrifugation wurde der Durchlauf verworfen und die nun membrangebundene RNA durch Zugabe von 350 µl MBD Buffer und anschließender einminütiger Zentrifugation entsalzt. Der Durchfluß wurde verworfen. Zur Entfernung der ebenfalls membrangebundenen, genomischen DNA wurde 95 µl DNase Reaction Mixture (90 µl DNase Reaction Buffer + 10 µl DNase I Konzentrat) auf die Membran gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde mit 200 µl RA2 Buffer, 600 µl RA3 buffer und nochmals mit 250 µl RA3 Buffer gewaschen und abschließend mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA Eluate wurde durch photometrische Messung mit Hilfe eines Nanodrop[™] bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm vorgenommen sowie über den Quotienten 260/280 nm deren Reinheit bestimmt.

7.5.2 Reverse Transkription

200 ng der aufgereinigten RNA wurde mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und Random Hexamer Primern nach unten stehendem Ansatz für fünf Minuten auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.

Ansatz I

1 µl Random Hexamer Primer (100ng/µl, Invitrogen)

1 µl dNTPs 10 mM (2,5 mM von jedem)

x µl H₂O (RNasefrei)

x µl RNA

10,5 µl

Danach wurde jedem Ansatz 7,5 µl des unten angegebenen Mastermixes hinzugegeben und für 50 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert und im Thermocycler nach beschriebenenem Programm inkubiert.

Mastermix

4,0 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen)

2,0 µl DTT (0,1 M, Invitrogen)

1,0 µl M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen)

0,5 µl RNaseOUT (Invitrogen)

7.5.3 Qualitative RT-PCR

Für die Detektion von Spire-1 in verschiedenen Gewebe oder Zellen wurden die cDNA Proben wie unten angegeben angesetzt. Als Positivkontrolle wurde von den Proben dieselbe PCR ebenfalls gegen den Housekeeper GAPDH durchgeführt.

PCR Ansatz

1 µl Primer Forward (10 µM)

1 µl Primer Reverse (10 µM)

12,5 µl 2x HotStartTaq-DNA-Polymerase-Mix

8,5 µl H₂O

2 µl cDNA

Dieser Ansatz wurde im Thermocycler folgendem PCR Programm unterzogen.

PCR Programm

- | | |
|-----------------------|--|
| 1. 95 °C, 15 Minuten | → Aktivierung der HotStartTaq-Polymerase |
| 2. 94 °C, 40 Sekunden | → Denaturierung der DNA |
| 3. 60 °C, 40 Sekunden | → Annealing der Primer |
| 4. 72 °C, 40 Sekunden | → Elongation der DNA |
| 5. 72 °C, 7 Minuten | |
| 6. 4 °C, ∞ | → Beenden der Reaktion |

Es wurden 30 Zyklen der Reaktionsfolge 2 bis 4 durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese detektiert. Die erwarteten Amplikongrößen betragen 228 bp für Spire-1 und 452 bp für GAPDH.

7.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR Ansätze wurden mit jeweils 2,5 µl des 10x DNA Beladungspuffer versetzt. Jeweils 14 µl der Spire-1 PCR und 3 µl der GAPDH PCR Proben wurden auf ein 2 %iges Agarosegel geladen und für eine Stunde bei 100 Volt in TAE aufgetrennt. Als Größenstandard diente ein PCR Marker. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die DNA Fragmente unter einem UV-Transluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

7.5.5 Quantitative-PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR Mix

- 2,00 µl H₂O steril
- 1,25 µl Primer Forward (900 nM) Spire-1 FW2
- 1,25 µl Primer Reverse (900 nM) Spire-1 Rev3
- 0,25 µl ROX Standard Dye
- 6,25 µl SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix

Für die Quantifizierung der Spire-1 Expression in den Spire-1 miRNA Zell- sowie der Kontroll-Zelllinie wurden jeweils 1,5 µl der zuvor synthetisierten cDNA als Template mit 11 µl des qRT-PCR Mix in der Reaktion eingesetzt. Als Housekeeper Gen wurde 18S rRNA benutzt, zu dessen Detektion 1,5 µl einer 1:500 Verdünnung der cDNA in der PCR eingesetzt wurden. Die

Methoden

Reaktionen wurden in einer 96-Well-Platte angesetzt und in einem Real Time Cycler dokumentiert und ausgewertet. Das verwendete PCR Programm bestand aus folgenden Schritten.

qRT-PCR Programm

- | | |
|-----------------------|--|
| 1. 95 °C, 10 Minuten | → Aktivierung der JumpStart Taq-Polymerase |
| 2. 95 °C, 15 Sekunden | → Denaturierung der DNA |
| 3. 60 °C, 1 Minute | → Hybridisierung und Elongation |
| 4. 95 °C, 15 Sekunden | → Denaturierung der DNA |
| 5. 60 °C, 1 Minute | → Schmelzkurve |
| 6. 95 °C, 15 Sekunden | |

Amplikon Spire-1 PCR: 116 bp.

Amplikon 18S PCR: 70 bp.

Insgesamt wurden 40 Zyklen der Schritte 2-4 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Computer unter Zuhilfenahme des Computerprogramms ABI PRISM nach der Delta-Delta-CT-Methode. Dabei wurde zunächst der CT-Wert (cycle threshold) jeder Probe bestimmt. Je niedriger der CT-Wert war, desto stärker war das Gen in dieser Probe exprimiert. Zunächst wurden von den ermittelten CT-Werten des untersuchten Gens die zugehörigen 18S CT-Werte abgezogen. Dabei wurde angenommen, dass 18S rRNA in allen Proben konstant exprimiert wurde und somit als Normierung für die eingesetzte cDNA Menge herangezogen werden konnte. Anschließend wurde von dem Δ CT-Wert der Kontrolle der Δ CT-Wert der jeweiligen Probe abgezogen. Der erhaltene $\Delta\Delta$ CT-Wert gibt an ob das Gen im Vergleich zur Kontrolle stärker oder schwächer exprimiert wurde. Positive $\Delta\Delta$ CT-Werte zeigen eine stärkere, negative $\Delta\Delta$ CT-Werte eine schwächere Expression im Bezug zur Kontrolle an. Die relative Expression wurde durch die Formel $2^{\Delta\Delta\text{CT-Wert}}$ berechnet, der die Expression im Vergleich zur Kontrolle in der Einheit fold Induction (x-fache Induktion) angibt.

7.6 Zellkultur

7.6.1 Podozytenkultivierung und Differenzierung

Für die Untersuchungen in Kultur wurde mit murinen Podozyten gearbeitet (ein freundliches Geschenk von Prof. Dr. Karlhans Endlich) (Mundel P, *et al*, 1997; Schiwiek D, *et al.*, 2004; Jat PS, *et al.*, 1991). Diese Zellen stammen aus einer konditionell immortalisierten Maus, die eine thermosensible Variante des SV-40 T-Antigen (tsA58 T-Antigen) exprimiert. Dieses Antigen steht dabei unter der Kontrolle des *H-2K^b*-Promotors, dessen Aktivität von γ -Interferon kontrolliert wird. Somit ist es möglich die Zellen unter zwei unterschiedlich Kondition zu kultivieren. Bei 33 °C und in Anwesenheit von γ -Interferon (permissiven Bedingungen) ist der *H-2K^b*-Promotor aktiv und die Zellen exprimieren das TsA58 T-Antigen, wodurch die Zellen im immortalisierten Zustand proliferieren. In Abwesenheit von γ -Interferon und 38 °C (non-permissiven Bedingungen) wachsen die Zellen in Wildtyp Konformation. Ohne γ -Interferon ist der *H-2K^b*-Promotor abgeschaltet und das Antigen wird nicht mehr exprimiert. Der Temperaturwechsel auf 38 °C bewirkt, dass das verbleibende T-Antigen denaturiert und die Zellen in Wildtyp Konformation ausdifferenzieren. Um die vollständige Entfernung und somit maximalen Differenzierungsgrad zu gewährleisten, wurden die Zellen vor jedem Experiment 11 Tage unter non-permissiven Bedingungen ausdifferenziert. Im Gegensatz zu *Mundel, et al.*, (1997), der einen Temperaturwechsel auf 37 °C für seine Zelllinie beschreibt, wurde wie von *Schiwiek, et al.*, (2004) beschrieben, für 38 °C entschieden, da dies eher der Körpertemperatur von Mäusen (38 – 39 °C) entspricht.

7.6.2 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Podozyten erfolgte bei 37 °C im Wasserbad für ein bis zwei Minuten. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und in eine TC25 Kulturflasche mit 9 ml Medium mit erhöhter γ -Interferon Konzentration überführt (25 U/ml) und bei 33 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium mit erhöhter γ -Interferon Konzentration gewechselt und die Zellen nach 3 bis 4 Tagen auf die gewohnte γ -Interferon Konzentration gesetzt.

7.6.3 Passagieren von Podozyten

Die murinen Podozyten wurden je nach benötigter Menge in TC75 oder TC25 Kulturflaschen propagiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 – 3 Tage. Unter permissiven Bedingungen wurden die Zellen bei Erreichen von 80 - 85 % Konfluenz passagiert. Unter non-permissiven Bedingungen wurden die Zellen bis zu Experiment einmal passagiert, wobei dafür Sorge getragen wurde, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Experimente eine Konfluenz zwischen 60 und 80 % hatten, um Ausdifferenzierung und Zell-Zell Kontakte in Form von Primär- und Fussfortsätzen zu ermöglichen.

Bei Erreichen der kritischen Konfluenz unter permissiven Bedingungen wurden die entweder zu Ausdifferenzierung oder Weiterkultivierung in das jeweilige Medium umgesetzt. Dazu wurde die TC75 (TC25) Flasche einmal mit sterilem PBS gespült, 3 (1) ml Trypsin-EDTA zugegeben und für ca. 3 Minuten bei 33 °C inkubiert. Die Ablösung der Podozyten wurde unter einem Mikroskop begutachtet und der Verdau durch Zugabe von 9(3) ml Medium gestoppt. Abschließend wurde die Zellsuspension je nach Bedarf in 3 bis 5 neue Kulturflaschen mit jeweiligem Medium aufgeteilt.

Die Podozyten (außer den miRNA Zell Linien, auf Grund der Herstellung der Einzelklon Zelllinien) wurden für Experimente im Bereich von zehn Passagen benutzt. Danach wurde eine neue Charge aufgetaut, um Nebeneffekte durch Zellveränderungen, auf Grund von Überpassagierung zu vermeiden.

7.6.4 Einfrieren von Zellen

Podozyten wurden aus einer TC75 Kulturflasche durch Trypsinverdau geerntet und durch 10 minütige Zentrifugation bei 90 x g pelletiert. Das Medium wurde abgegossen und die Zellen in 5 ml Medium plus 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 5 Kryoröhrchen aufgeteilt, und für 24 Stunden bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer inkubiert. Zuletzt wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

7.6.5 Schaf Immunglobulin G Färbung auf Podozyten

Um das Bindungsmuster des AP- sowie des Kon-Serums an die Podozyten in Zellkultur darzustellen, wurden differenzierte Zellen in einer 12 Well Kulturplatte einmal mit sterilem PBS gewaschen und das APN Modell induziert. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit Formalin fixiert, dreimal für fünf Minuten mit PBS unter Schütteln auf dem Wipptisch gewaschen und für 30 Minuten mit 5 % Pferdeserum geblockt.

Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5 Minuten wurden die Zellen für 30 Minuten mit Biotin gekoppelten Anti-Schaf Antikörper (1:200 in PBS) inkubiert. Nachfolgend wurde nach erneutem dreimaligem, fünfminütigem Waschen mit PBS, für 30 Minuten mit Fluorescein gekoppelten Avidin (1:100 in PBS) inkubiert und wiederum dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Alle Waschungen und Inkubationen nach Bindung des Fluoreszenz gelabelten Antikörpers fanden im Dunkeln statt. Abschließend wurden die Zellen in Fluoromount mit DAPI eingedeckelt und das Bindungsmuster der Seren auf den Podozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 200-facher Vergrößerung detektiert.

7.6.6 Vitalitäts-Assay

Dafür wurde der Live/Dead[®] CellVitality Assay der Firma Invitrogen gewählt. Dazu wurden in TC25 Kulturflaschen differenzierte Podozyten kultiviert und das APN-Modell induziert. Als Kontrolle dienten Podozyten die in normalem Podozyten-Medium für non-permissive Bedingungen kultiviert wurden. Nach der Induktion des Schadens wurden zunächst die Überstände in ein 15 ml Falcon Tube überführt. Die schon abgelösten Zellen mussten in der Analyse inbegriffen sein, um eine Aussage über die Schädigung aller Zellen treffen zu können. Die Zellen wurden vorsichtig mit ca. 2 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin abgelöst. Die Verdauung wurde mit 4 ml Podozyten-Medium gestoppt, die Zellen mit ihren zuvor abgenommenen Überständen vereinigt und für fünf Minuten bei 1200 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden in je 100 µl SYTOX-Lösung (1 µM in PBS) resuspendiert und für 15 Minuten im Brutschrank bei 38 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben im Durchflusszytometer durch

Fluoreszenzmessung von 10000 Zellen pro Probe analysiert. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte bei 488 nm wogegen die Emission bei 530 nm gemessen wurde.

7.6.7 Aktin- und Tubulin-Färbung im sAPN Modell

Die Zellen wurden nach der Fixierung mit 4 % Formalin dreimal für fünf Minuten auf der Wippe gewaschen, mit 5 % Pferdeserum in PBS für 30 Minuten geblockt und erneut für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper gegen Tubulin (1:100 in PBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde dreimal für fünf Minuten auf der Wippe mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Biotin gekoppeltem Anti-Maus-Antikörper (1:100 in PBS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für fünf Minuten wurden die Zellen für eine halbe Stunde im Dunkeln mit Fluorescein gekoppeltem Avidin D (1:100) inkubiert. Ab hier fanden alle weiteren Schritte in Dunkeln statt. Die Zellen wurden dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, für 15 Minuten mit Alexa Phalloidin (1:60 in PBS) inkubiert und wie zuvor dreimal gewaschen. Zum Abschluß wurden die Zellen in Fluoromout mit DAPI eingedeckelt und die Färbungen mittels Fluoreszenzmikroskopie in 200 und 400-facher Vergrößerung dokumentiert.

7.7 Generierung und Analyse von Spire-1 miRNA Zelllinien

7.7.1 Klonierung der Spire-1 miRNA Vektoren

Die Sequenzen für die Single-Stranded DNA Oligos wurden von dem RNAi Designer von Invitrogen erstellt. Dazu wurde dem Programm die Gensequenz für das murine Spire-1 aus der Online Bibliothek Pubmed mit der Nummer NM_194355; gi:116686104 angegeben. Das Programm errechnete durch einen urheberrechtlich geschützten Algorithmus vier verschiedene Oligos (jeweils einen top und einen bottom strand) der Nummern Mmi 568416, Mmi 568417, Mmi 568418, Mmi 568419, die jeweils eine putativ funktionierende miRNA

Methoden

Sequenz für dieses Gen darstellten. Der Einfachheit halber werden die Sequenzen im Folgenden durch die letzten beiden Ziffern, also 16, 17, 18 und 19 bezeichnet.

Für die Klonierung des miRNA Vektors mußten die die top und bottom strands zunächst hybridisiert werden. Dadurch entsteht ein doppelsträngiges DNA mit TGCT 5' Überhang am top und CCTG 5' Überhang am bottom strand über den die Oligos in das linearisierte Zielplasmid inkloniert werden konnten. Für jede Sequenz wurde folgender Ansatz für 4 Minuten bei 95 °C inkubiert und für zehn Minuten auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

Hybridisierung

5 µl top strand oligo (200 µM)
5 µl bottom strand oligo (200 µM)
2 µl 10X Oligo Annealing Buffer
8 µl DNase/RNase freies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten herunterzentrifugiert und 1:5000 (durch 1:100 Verdünnung in RNase freiem Wasser und 1:50 Verdünnung in Oligo Annealing Buffer) in eine Endkonzentration von 1nM verdünnt. Die doppelsträngigen DNA Oligos (ds oligo) wurden durch folgenden Ligationsansatz in den linearisierten Vektor pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR kloniert.

Ligation

4 µl 5X Ligation Buffer
2 µl pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR (5 ng/µl), linearized
4 µl ds oligo (10 nM; 1:5,000 dilution)
9 µl DNase/RNase-freies Wasser
1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl)

Der Ansatz wurde gut geschüttelt, und für die Ligation fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Damit war die Klonierung der miRNA Vektoren beendet. Der miRNA kodierende Bereich ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

7.7.2 Transformation von Bakterien (Hitzeschock Methode)

Im Folgenden wurden Transform One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli Bakterien mit den erhaltenen miRNA Vektoren transformiert. Die Transformation erfolgte nach der Hitzeschock Methode. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls Bakterien mit einem im Kit enthaltenen Negativkontroll Vektor (Ko) transformiert. Die von ihm exprimierte miRNA Sequenz kodiert laut Hersteller für kein in Vertebraten bekanntes Gen und kann somit als Negativkontrolle herangezogen werden. Es wurden jeweils 2 µl der Ligationsansätze und der Negativkontrolle in ein Gefäß mit Bakterien gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 30 Sekunden bei 42 °C durchgeführt und die Ansätze im Anschluß sofort auf Eis gekühlt. Den Ansätzen wurde 250 µl warmes SOC-Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Abschluß wurden jeweils 10 µl und 100 µl des Transformationansatzes für jede Sequenz auf eine Agarplatte mit 50 µg/ml Spectinomycin als Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

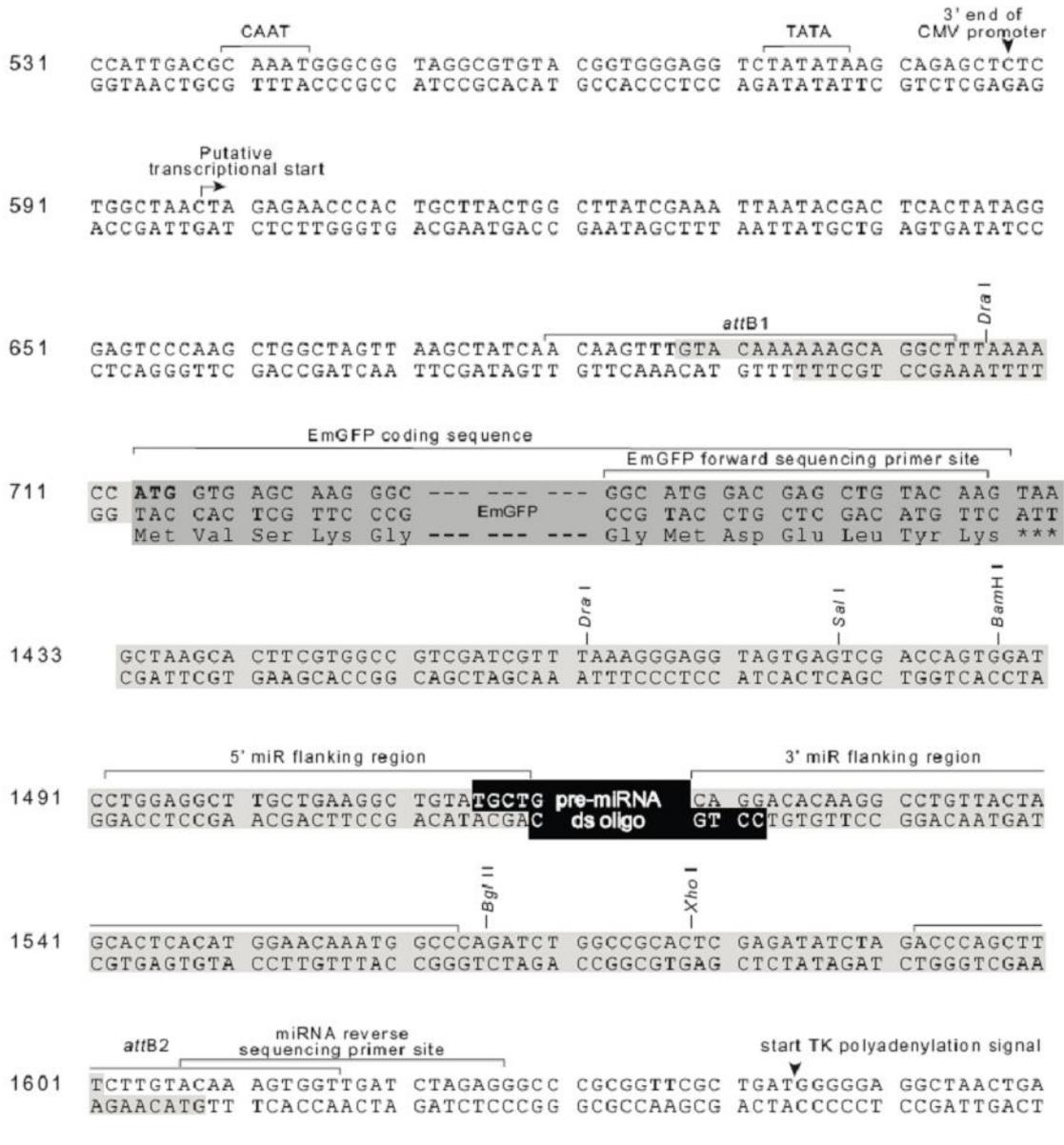


Abbildung 6: Multiple Cloning Site und Recombination Region des pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR Vektors

7.7.3 Analyse der miRNA Klone

Für die Analyse der transformierten Bakterien wurden für jede Sequenz jeweils fünf resistente Kolonien (bezeichnet mit Sequenz.Nummer; z.B. 17.1 bis 17.5) von der Agarplatte gepickt und über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB Medium mit 50 µl/ml Spectinomycin inkubiert. Die Inkubation verlief unter Schütteln über Nacht bei 37 °C.

7.7.3.1 Plasmidaufreinigung in kleinem Maßstab (Miniprep)

Am folgenden Tag wurde die Plasmid DNA der transformierten Bakterien per QIAprep Spin Mini Kit aufgereinigt. Dazu wurden die Bakterien bei 6800 x g für drei Minuten pelletiert. Die Pellets wurden in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurde 250 µl Puffer P2 hinzugegeben und vorsichtig durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Es wurden jeweils 350 µl Puffer P3 hinzugegeben und sofort durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Die Ansätze wurden für 10 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert und die Überstände in eine QIAprep spin Säule überführt. Es wurde für eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert und dreimal mit 500 µl Puffer PB gewaschen. Die Zentrifugationen zwischen den Waschungen erfolgten mit 16000 x g für 1 Minute. Es wurden 750 µl Puffer PE hinzugegeben, für eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Ansätze nochmals für eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde die DNA mit 40 µl sterilem Wasser durch einminütige Inkubation mit nachfolgender einminütiger Zentrifugation von der Säule eluiert. Die Konzentrationen und Reinheit der aufgereinigten Plasmid DNA wurde per Nanodrop™ bestimmt.

7.7.3.2 Sequenzierung

Jeweils drei Ansätze der aufgereinigten Plasmide wurden für jede Sequenz durch folgende Sequenzierungs-PCR analysiert.

Sequenzierungs-PCR

X µl	DNA Ansatz (300 ng)
0,25 µl	miRNA EmGFP Forward Sequencing Primer (100 ng/µl)
0,25 µl	miRNA Reverse Sequencing Primer (100 ng/µl)
3 µl	Big Dye
8 µl	Puffer
<u>X µl</u>	<u>Wasser</u>
20 µl	Endvolumen

Die auf die PCR folgende Sequenzierung wurde durch die Sequenzier Einrichtung des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf durchgeführt.

Für jede miRNA Sequenz sowie die Negativkontrolle wurde ein Bakterienklon mit verifiziertem Expressionsvektor ausgewählt (16.3, 17.1, 18.2, 19.2, Kon). Mit den Klonen

wurden 100 ml LB Medium mit 50 µl/ml Spectinomycin angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid DNA wurde per PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit der Firma Invitrogen aufgereinigt

7.7.3.3 Plasmidaufreinigung in mittlerem Maßstab (Midiprep)

Dazu wurden die Bakterien durch zehnminütige Zentrifugation bei 4000 x g pelletiert. Die Pellets wurden in 4 ml Resuspendierungspuffer P1 (plus RNase A) resuspendiert, 4 ml Lysepuffer L7 hinzugegeben, durch leichtes Schwenken gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 4 ml Präzipitationspuffer N3 zugegeben, sofort durch vorsichtiges Invertieren gemischt und für zehn Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden auf eine zuvor mit 10 ml Äquilibrierungspuffer EQ1 äquilibrierte PureLink™ HiPure Midi Säule gegeben und durchlaufen gelassen. Anschließend wurde zweimal mit 10 ml Waschpuffer W8 gewaschen. Eluiert wurde in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml Elutionspuffer E4. Zu jedem Ansatz wurden 3,5 ml Isopropanol gegeben, sorgfältig gemischt und bei 15000 x g bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgegossen, die Pellets in 5 ml 70 %igem Ethanol aufgenommen und wie zuvor zentrifugiert. Abschließend wurden die Überstände vorsichtig abgegossen, die Pellets für zehn Minuten an der Luft getrocknet und in 200 µl sterilem H₂O aufgenommen. Die Konzentrationen und Reinheit der aufgereinigten Plasmid DNA wurde ebenfalls per Nanodrop™ bestimmt. Die erhaltenen Plasmide sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

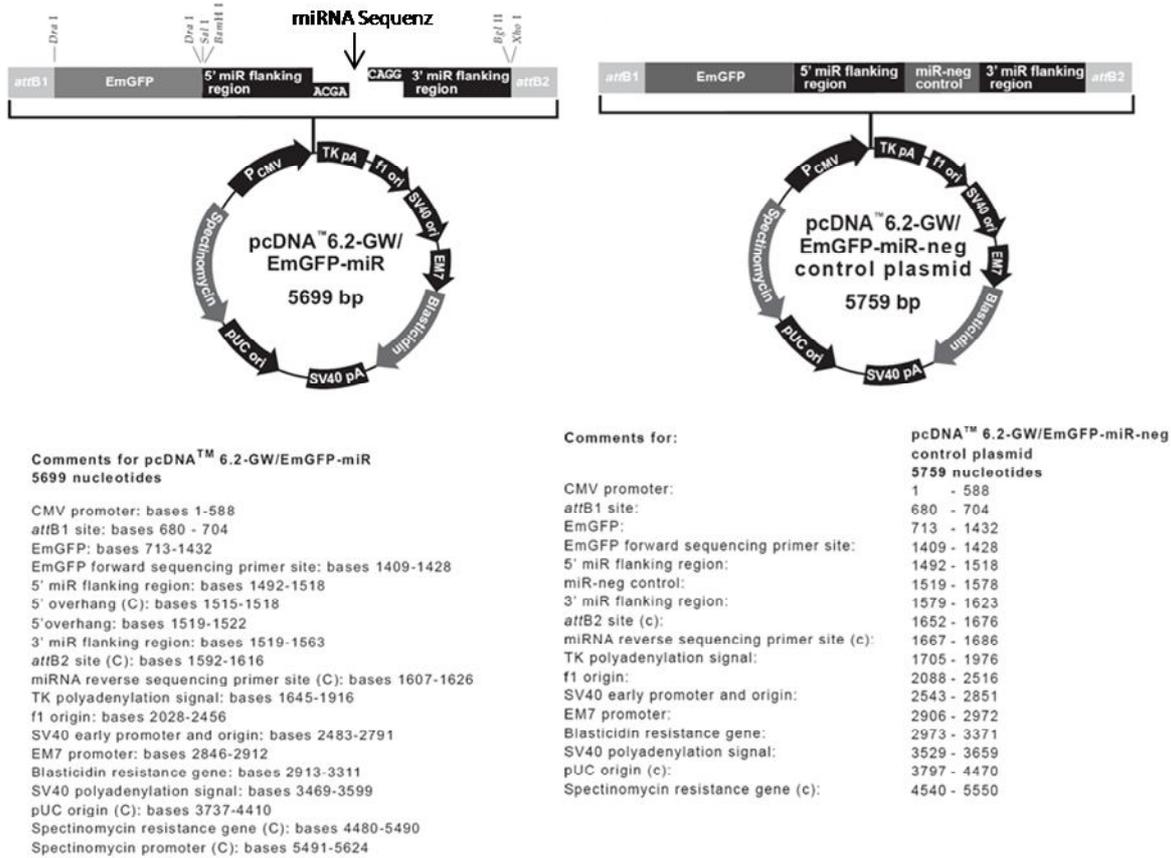


Abbildung 7: Karte und Funktionen der miRNA Expressionsvektoren und des Negativkontrollvektors

7.7.4 Transfektion der Podozyten Einzelklon Zelllinie

Für die Generierung einer stabilen Spire-1 miRNA Einzelklon Zelllinie wurden Podozyten mit Hilfe eines Nucleofactors® transfiziert. Benutzt wurde das Cell Line Nucleofector® Kit V für adhärenzte Zellen. Zunächst wurden 1,5 Mio Podocyten pro Ansatz durch Trypsinieren aus TC75 Kulturflaschen geerntet und bei 90 x g für 10 Minuten pelletiert. Es wurde darauf geachtet, dass die geernteten Zellen eine Konfluenz von 70 bis 85 % hatten Die Zellpellets wurden in 100 µl Nucleofector® Solution resuspendiert, mit 2 µg der jeweiligen Plasmid DNA gemischt und in eine Transfektionsküvette überführt. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsprogramm T30, Es wurden 500 µl vorgewärmtes Zellkulturmedium für permissive Bedingungen mit 10 µg/ml Blastocidin hinzugegeben und in 6 Well Plates in selbigem Medium ausplattiert.

7.7.5 Herstellung der Einzelklon Zelllinien

Zur Herstellung einer stabilen miRNA exprimierenden Massenkultur wurden die transfizierten Zellen drei Wochen lang unter Selektion mit 10 µg/ml Blasticidin kultiviert. Das Medium wurde dabei alle drei Tage ersetzt. Die Selektion wurde unter optischer Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop überwacht.

Nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl mit grüner Fluoreszenz wurden für alle vier miRNA Massenkulturen sowie für die Negativkontrolle Einzelklon Zelllinien durch Limited Dilution herangezüchtet. Da Podozyten in Zellkultur sehr anfällig sind und ohne Kontakt zu anderen Podozyten sehr schlecht wachsen, wurden statistisch gesehen fünf Zellen pro Loch in 96 Well Plates ausplattiert. Über 14 Tage wurden bei den Zellen das Selektionsmedium alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Anschließend wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop die Löcher mit nur einer grün fluoreszierenden Kolonie ausgewählt und diese bis Erreichen einer Zellmenge, ausreichend für eine TC75 Flasche, kultiviert. Die EmGFP Expression wurde mittels Fotografie bei 200-facher Vergrößerung dokumentiert.

7.7.6 IF Spire 1 in Podozyten

Sterile Flexiperm Zellkulturkammern wurden auf Objektträger aufgebracht. Diese bestanden zum Vergleich mit früheren Versuchen ebenso wie die 12 Well Kulturplatten aus Polystyrol. Anschließend wurden die differenzierten Zellen in diesen Kulturkammern kultiviert und das APN-Modell induziert. Die Podozyten wurden 10 Minuten lang mit 4 % Formalin fixiert, dreimal mit PBS für fünf Minuten auf der Wippe gewaschen und für 30 Minuten mit 5 % Pferdeserum geblockt. Die Inkubation des Primärantikörpers gegen Spire-1 fand bei 4 °C über Nacht statt. Es wurde dreimal für fünf Minuten auf der Wippe gewaschen und mit dem biotinylierten Sekundärantikörper gegen Kaninchen für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für fünf Minuten auf der Wippe wurden die Zellen für eine halbe Stunde im Dunkeln mit AMCA Avidin D inkubiert. Ab hier wurden alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt. Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit PBS für

fünf Minuten auf der Wippe wurden die Objektträger mit Fluoromount G eingedeckelt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung.

7.8 Statistik

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student'schem T-Test ermittelt.

Die Wahrscheinlichkeit des Fehlers erster Art wurde mit $\alpha = 0,05$ angenommen, als Signifikanzniveau wurde dementsprechend ein $p = 0,05$ festgelegt.

8 Ergebnisse

8.1 APN Seren

8.1.1 Vergleich der Schafseren

Für den direkten Vergleich von Kon- und dem AP-Serum auf gravierende Unterschiede in der Proteinzusammensetzung wurde eine Silbernitrat-Färbung durchgeführt (Abbildung 8). Zusätzlich sollte überprüft werden inwieweit das Aufkonzentrieren der Seren die Proteinqualität beeinflusst. Aufgetragen wurde Kon- und AP-Serum jeweils in aufgereinigter und zweifach aufkonzentrierter Form.

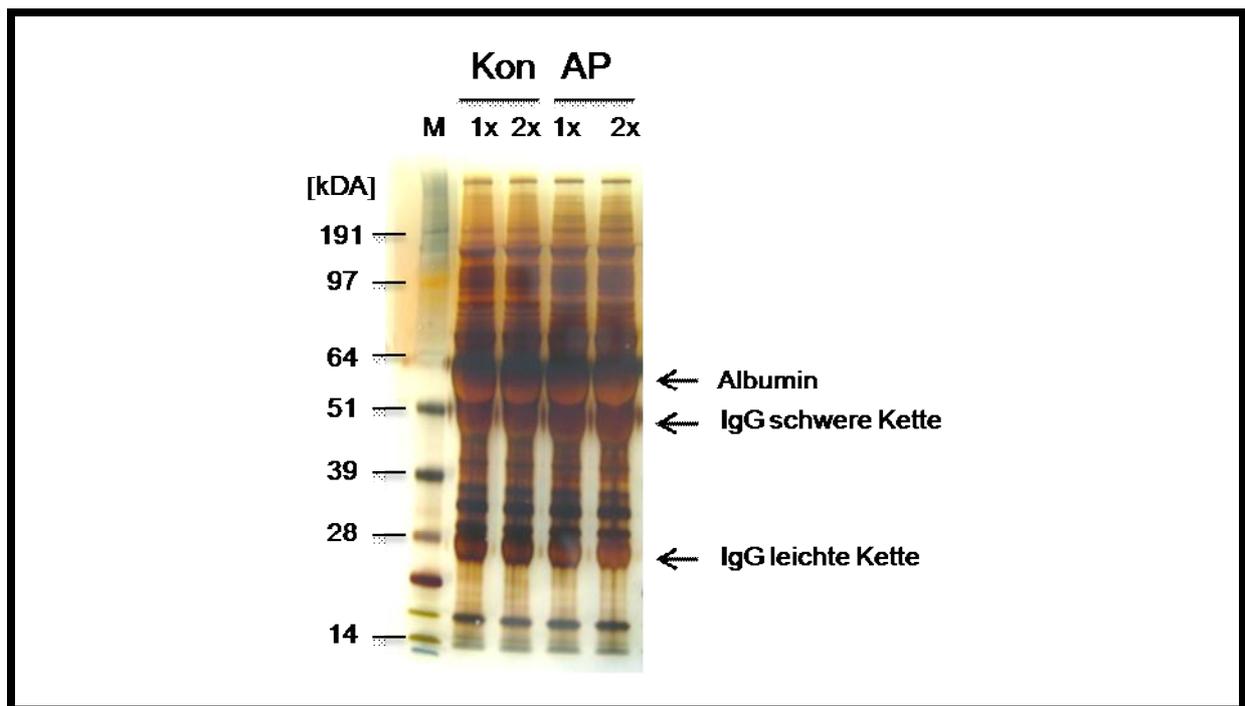


Abbildung 8: Vergleich der Schafseren.

Dargestellt ist die Silberfärbung eines SDS-PAGE von Kon und AP-Serum. Es sind keine großen Unterschiede im Bandenmuster zwischen dem Kontroll- und dem AP-Serum zu erkennen. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg Protein von Kon und AP-Serum Lysaten 1-fach und 2-fach aufkonzentriert. Das Aufkonzentrieren hat die Seren nicht verändert. In beiden Seren sind prominente Banden bei ca. 60, 50 und 22 kDa zu sehen, welche Albumin, die schwere und leichte IgG Kette darstellen.

Ergebnisse

Die Bandenmuster in allen Spuren sind sowohl qualitativ als auch quantitativ vergleichbar. Beide Seren weisen darüber hinaus keine Degradation durch die Aufkonzentrierung auf. Für die weiteren Experimente wurde daher die aufkonzentrierte Form genutzt.

8.1.2 Antigene der Schafseren im Podozyten

Werden Protein-Lysate ausdifferenzierter Podozyten mit AP- und Kon-Serum im Immuno-Blot behandelt, so zeigt das polyklonale AP-Serum detektierbare Antigene verschiedener Molekulargewichte im Bereich von 20 bis 300 kDa in variabler Intensität (Abbildung 9). Auffallend sind vier besonders prominente Banden der Größen 205, 230, 45 und 48 kDa. Dieser Befund unterstreicht die Tauglichkeit des AP-Serums.

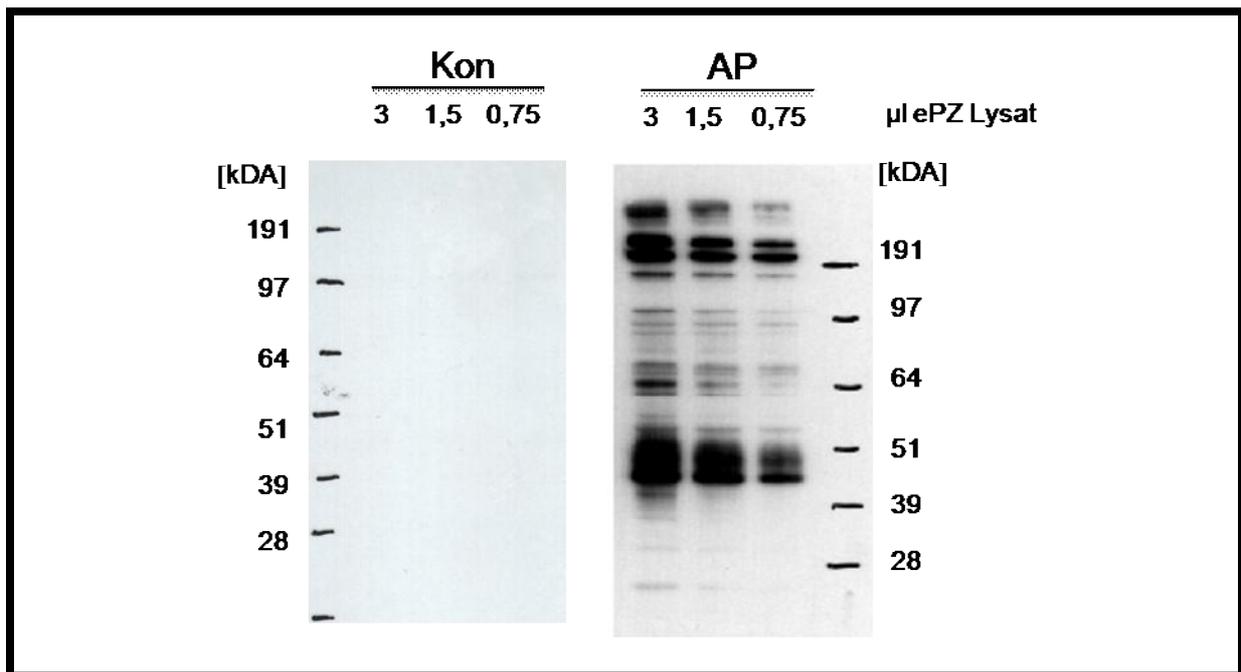


Abbildung 9: Bindungsmuster beider Schafseren auf Podozyten-Lysat.

Die Abbildung zeigt einen Immuno-Blot von Lysat aus differenzierten Podozyten gegen Kon und AP-Serum bei identischer Belichtung. Im Kon-Serum sind keine Antigene zu detektieren, wogegen das AP-Serum zahlreiche Antigene unterschiedlicher Größe detektiert.

8.2 APN in der Maus

Der Verlauf vieler immunvermittelter Glomerulopathien beinhaltet zwei Phasen. In der heterologen Phase lagern sich artfremde Antikörper an. Darauf folgt wie beispielsweise in der Heymann Nephritis der Ratte, eine autologe Phase (Heymann, *et al.*, 1959; Couser WG, 2005; Salant DJ, Darby C und Couser WG; 1980). In dieser binden körpereigene Antikörper an den primären Antikörper und bilden so Immunkomplexe. Auch bei verschiedenen humanen Glomerulonephritiden, z.B. der membranösen Glomerulonephritis können solche Immunkomplexe nachgewiesen werden.

8.2.1 Bindung von Schaf-IgG im Glomerulum

Zur Darstellung der initialen renalen Bindung der, im AP-Serum enthaltenen, Antikörper, wurden immunhistochemische Färbungen gegen Schaf IgG auf Paraffinschnitten von Mausnieren drei Stunden und Tag 1 nach Seruminjektion hergestellt (Abbildung 10).

In AP-Tieren stellt sich das Antikörperbindungsmuster nach drei Stunden und einem Tag ausschließlich in Glomeruli dar. Das Interstitium und die Tubuli im Cortex weisen keinerlei Ablagerung von Schaf IgG auf. Im Glomerulum selbst ist ein lineares Ablagerungsmuster von Schaf IgG entlang der GBM erkennbar. Das Mesangium und die Zellkörper der Podozyten weisen eine eher schwache Färbung auf.

Im Vergleich dazu ist in den Kon-Tieren nach drei Stunden und einem Tag ebenfalls keinerlei Färbung im Interstitium und in den Tubuli zu sehen. In den Glomeruli ist nur eine schwache diffuse Färbung zu erkennen.

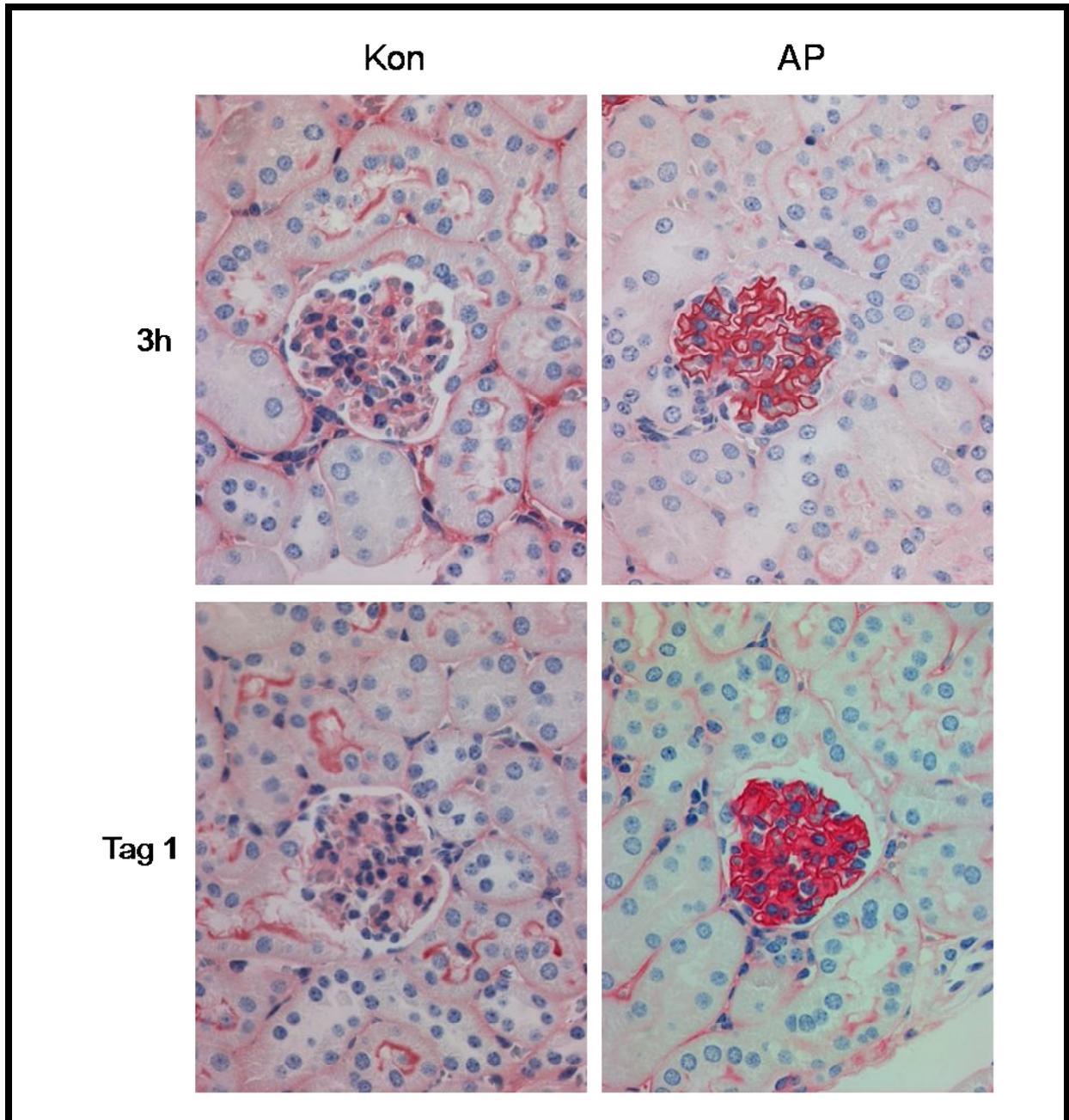


Abbildung 10: Bindung von Schaf-IgG in Glomeruli zu verschiedenen Zeitpunkten.

Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen von Schaf-IgG in Paraffinschnitten von Mausnieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten in 400-facher Vergrößerung. Den Mäusen wurde jeweils 300 µl Serum intravenös injiziert. In den Kon-Mäusen ist nach drei Stunden eine sehr schwache, am Tag 1 nach Applikation keine Färbung zu sehen. In den AP-Mäusen ist sowohl nach drei Stunden als auch an Tag 1 ein lineares Ablagerungsmuster entlang der glomerulären Basalmembran zu erkennen.

8.2.2 Bindung von Schaf-IgG (Immunogold Tag 1)

Für die Darstellung der initialen Bindung auf zellulärer Ebene wurde eine Immunogold-Färbung von Kon- und AP-Tieren gegen Schaf IgG an Tag 1 durchgeführt. Das polyklonale AP-Serum sollte primär gegen Podozyten gerichtet sein. Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit liegt auf dem Umbau der Podozyten nach Schädigung. Deshalb wurde die Betrachtung vornehmlich auf die Struktur der Filtrationsbarriere gerichtet.

In Abbildung 11 ist das Bindungsmuster des AP-Serums vornehmlich im Bereich der GBM in Form kleiner, schwarz erscheinender Goldpartikeln zu erkennen. Schaf Antikörper finden sich gleichsam in allen Schichten der Basalmembran. Das AP-Serum bindet aber nicht nur die Basalmembran. Zusätzlich sind Antikörperbindungen subepithelial sowie an Fußfortsätzen von Podozyten zu erkennen (Peile).

In Kon-Tieren hingegen können Antikörper glomerulär nachgewiesen werden. Sie verteilen sich jedoch eher im gesamten Glomerulum. Trotz einiger Ablagerungen an Podozyten und der GBM ist die Menge des gebundenen Schaf IgG weitaus geringer und diffuser verteilt.

Morphologisch sind die Filtrationsbarrieren sowohl bei AP- als auch bei Kon-Tiere zu diesem Zeitpunkt völlig unauffällig. Weiterhin sind keinerlei Veränderungen im Bereich des Endothels, der GBM oder der podozytären Fußfortsätze nachzuweisen.

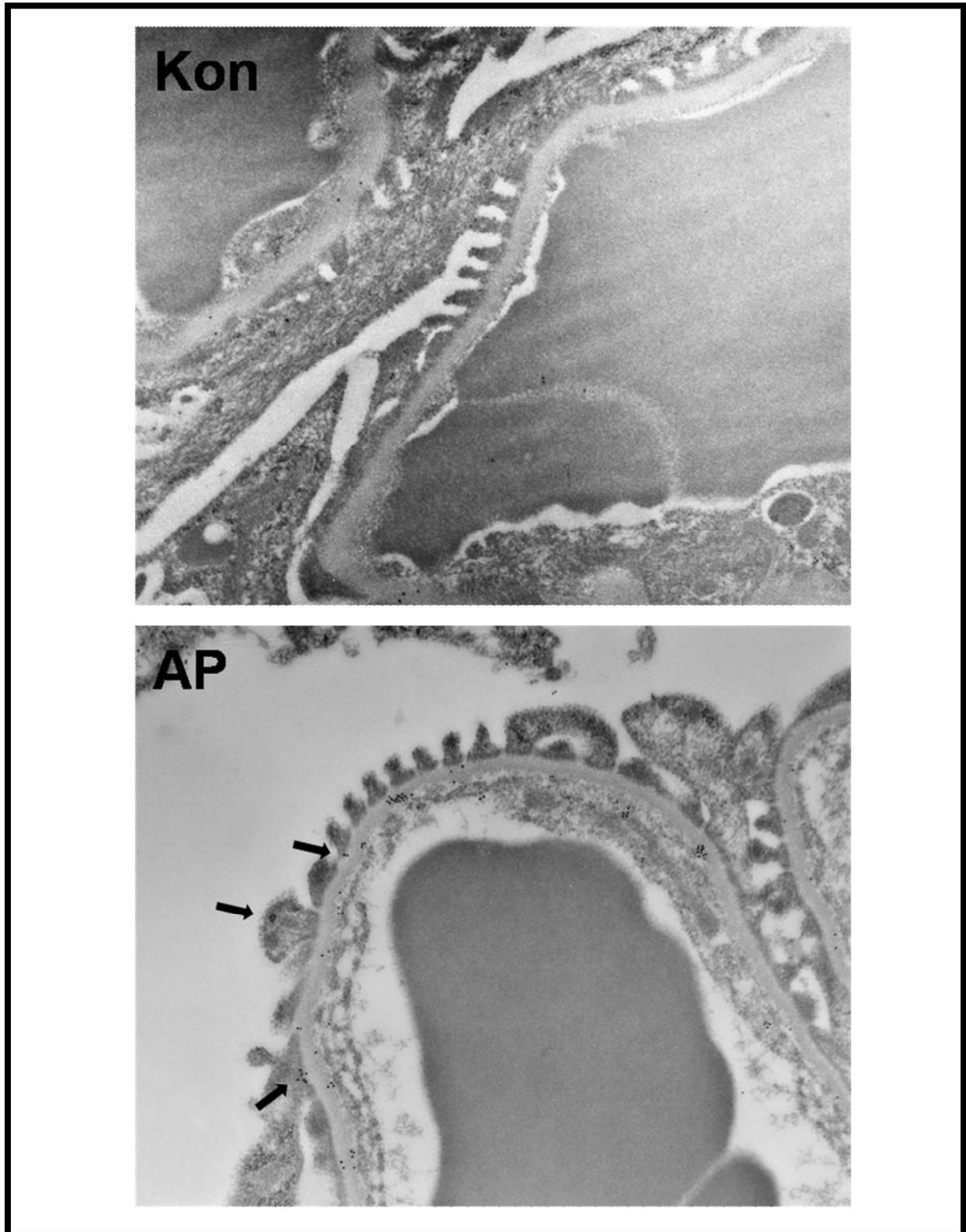


Abbildung 11: Immunogold-Färbung von Schaf IgG im Glomerulum an Tag 1.

Dargestellt sind die Immunogold-Färbungen eines Kon- und eines AP-Tieres vor Einsetzen der Proteinurie. Im Kon-Tier (Originalvergrößerung 6300x) ist eine diffuse Ablagerung des Schaf IgG im Glomerulum zu sehen. Die Ablagerung im AP-Tier (Originalvergrößerung 12500x) findet überwiegend in der GBM, aber auch an den Podozyten (Pfeil) statt. (Färbung hergestellt von Dr. Jan Becker, Hannover)

8.2.3 Bindung von Maus-IgG im Glomerulum

Um die Bindung von Maus IgG in der autologen Phase an das Schaf IgG darzustellen, wurde eine immunhistochemische Färbung am Tag 7 nach Applikation der Seren auf Paraffinschnitten von Mausnieren durchgeführt (Abbildung 12).

In den AP-Tieren fand eine starke Ablagerung von Maus IgG im Glomerulum statt. Die Tubuli und das Interstitium sind frei von Maus IgG. Im Gegensatz zur Schaf IgG Bindung lagert sich das Maus IgG breiter ab, was auf eine Verdickung der GBM schließen lässt. Weiterhin sind im Glomerulum Areale zu sehen, in denen eine eher diffuse Bindung von Maus IgG zu erkennen ist (Pfeil). In diesen Arealen ist keine intakte GBM Struktur mehr zu erkennen, was auf eine mögliche Zerstörung der GBM in diesen Bereichen hindeutet. Wie erwartet sind auf Grund des, in den Kon-Tieren, glomerulär kaum vorhandenen Schaf IgGs keine Maus IgG Ablagerungen in den Glomeruli gesunder Kontrolltieren zu erkennen.

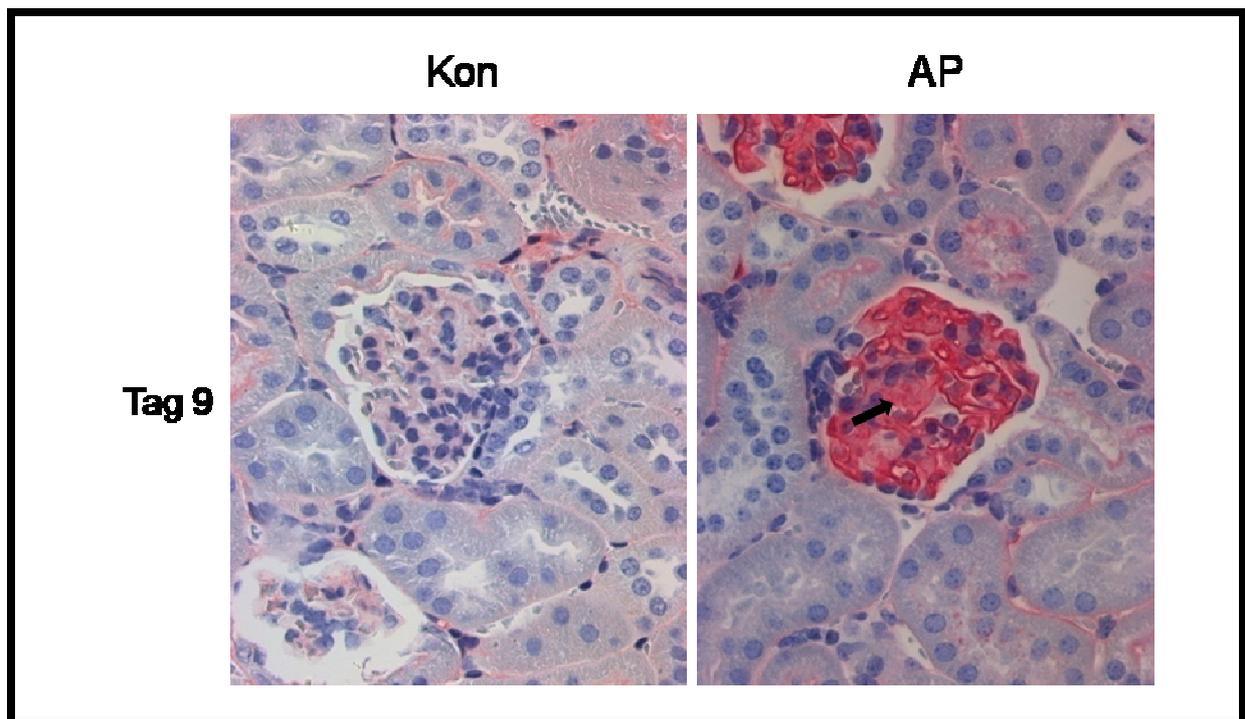


Abbildung 12: Bindung von Maus-IgG.

Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen von Maus-IgG in Paraffinschnitten von Mausnieren an Tag 9 in 400-facher Vergrößerung. Den Mäusen wurde jeweils 300 µl Serum intravenös injiziert. In den Kon-Mäusen ist nach Applikation nahezu keine Ablagerung von Maus IgG zu sehen. In den AP-Mäusen ist ein lineares Ablagerungsmuster entlang der glomerulären Basalmembran zu erkennen. Weiterhin finden sich Areale an denen das Ablagerungsmuster diffus verteilt ist (Pfeil).

8.2.4 Nierenfunktion in der APN

8.2.4.1 Nierenfunktion

Um die Nierenfunktion der Tiere mit APN und der Kontrollen zu quantifizieren, wurde die Albumin/Kreatinin Ratio bestimmt. Die Ausscheidung von Kreatinin erfolgt relativ konstant und größtenteils glomerulär. Daher wird dieser Parameter zur Einbeziehung der Urinmenge und somit der Normierung der Albuminausscheidung herangezogen. In Abbildung 13 sind die Daten aus fünf unabhängigen Experimenten ($n = 5$ Willdtyp Tiere, $n = 8$ Kon-Tiere und $n = 26$ AP-Tiere) dargestellt.

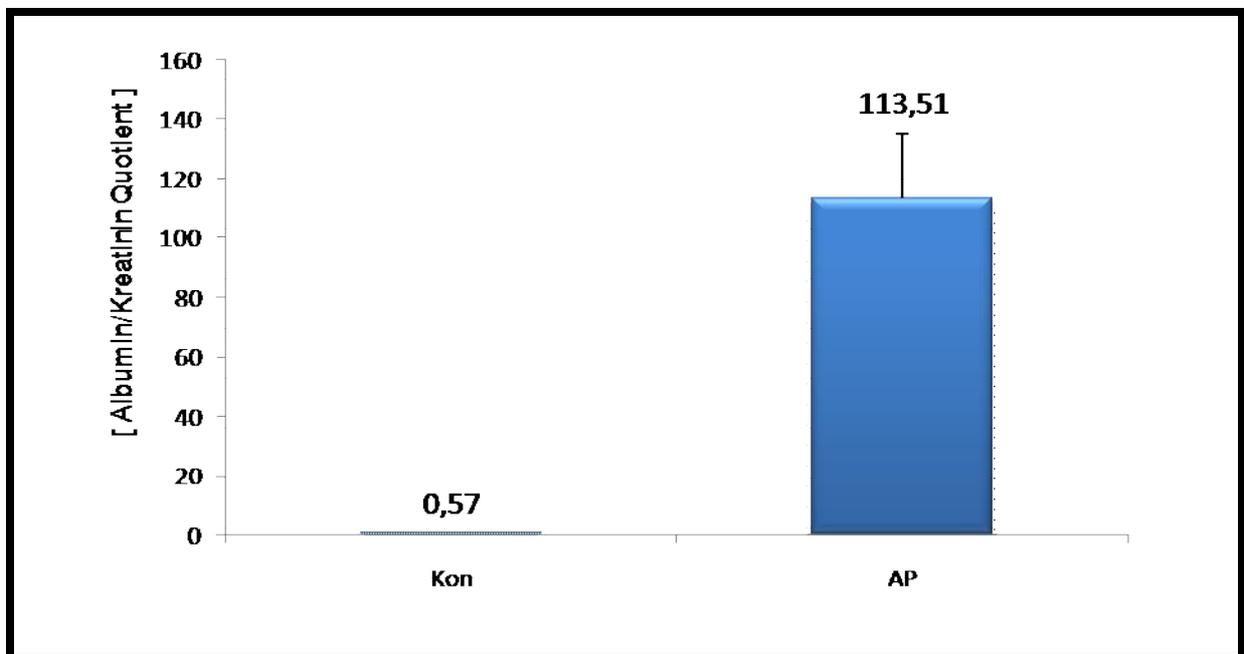


Abbildung 13: Nierenfunktion.

Dargestellt ist der Albumin/Kreatinin Quotient von Tieren an Tag 7 bis 10. Das Diagramm beinhaltet Daten aus fünf unabhängigen Mausstaffeln mit $n = 13$ Kon-Tieren und $n = 26$ AP-Tieren.

Zwischen Tieren mit und ohne Kon-Serumgabe ist kein Unterschied zu verzeichnen. Deshalb wurden sie zu einer Gruppe zusammengefaßt. In der Darstellung wird diese als „Kon“ bezeichnet. Die Urine wurden zwischen Tag 7 und 10 nach Induktion der APN gesammelt. In dieser Zeitspanne ist in den meisten AP-Tieren eine starke Proteinurie vorhanden und sie befinden sich in der autologen Phase der Erkrankung. Der Mittelwert der Albumin/Kreatinin Ratio der Kon-Gruppe lag bei $0,57 \pm 0,16$. Ein Anhaltspunkt für eine Nierenschädigung in der Kon-Gruppe war dementsprechend nicht gegeben. In der AP-Gruppe ergab sich ein

Ergebnisse

Mittelwert der Albumin/Kreatinin Ratio von $113,51 \pm 21,44$. In diesen Tieren lag somit eine schwere Albuminurie vor. Der Anstieg der Albuminausscheidung ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,059$). Grund hierfür ist die Heterogenität des APN-Modells, durch die sechs der betrachteten AP-Tiere erst später eine Proteinurie entwickelten.

8.2.4.2 Proteinurieverlauf

Der Proteinurieverlauf in der APN wurde durch eine Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE von Urinproben dargestellt. Dazu wurden Urine zum Zeitpunkt Tag 0, 2, 5, 8 und 14 von AP- und Kon-Tieren gesammelt und der Proteinurieverlauf von repräsentativen Tieren in der Coomassie-Färbung dargestellt (Abbildung 14).

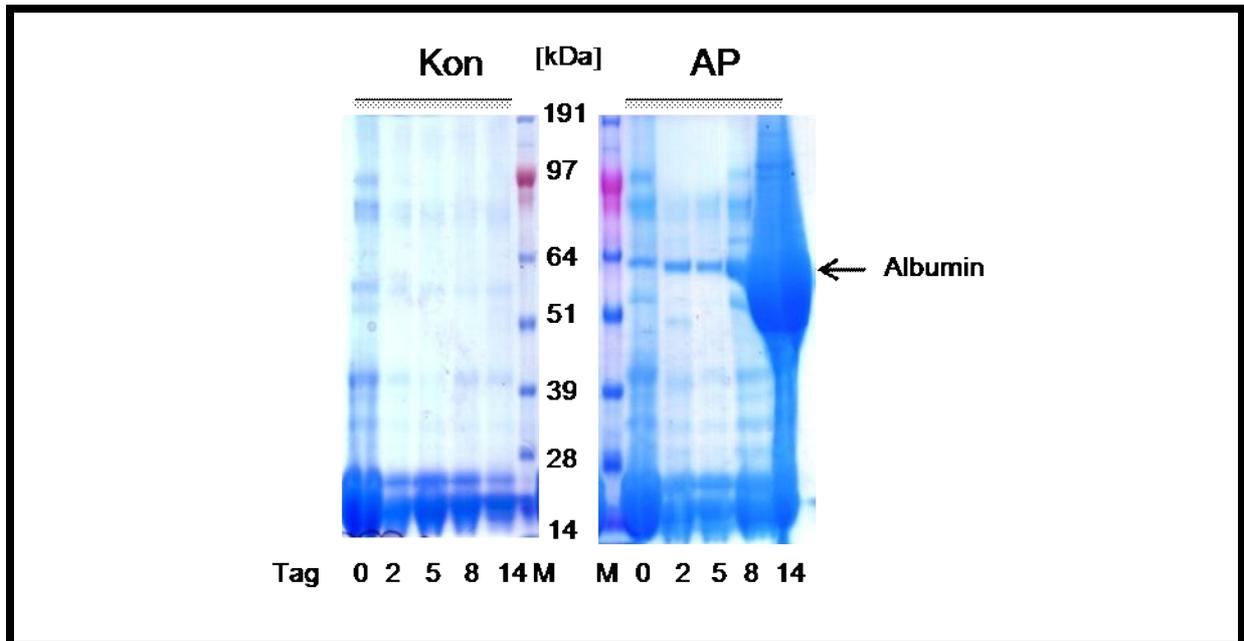


Abbildung 14: Proteinurieverlauf im APN Modell.

Dargestellt ist ein Coomassie-Blue gefärbtes SDS-PAGE von Mausurin. Bei Applikation von 300 μ l Kon-Serum kommt es im Verlauf von 2 Wochen zu keiner erhöhten Proteinausscheidung. Die Gabe von 300 μ l AP-Serum führt innerhalb dieser Zeit zu einer starken Proteinurie mit progressivem Beginn ab Tag 5. Bei dem ausgeschiedenen Protein handelt es sich hauptsächlich um Albumin, welches durch die Bande bei 62 kDa repräsentiert wird.

Bei den AP-Tieren kommt es zu einer progressiven Proteinurie ab Tag fünf nach Induktion der APN. Bei dem hauptsächlich, mit dem Molekulargewicht von ca. 62 kDa ausgeschiedenen Protein handelt es sich höchstwahrscheinlich um Albumin. Die Verlagerung der

Albuminbande hin zu kleineren Molekulargewichten lässt sich durch die zunehmende Überladung des Gels erklären.

In den Kon-Tieren kommt es im Verlauf von 14 Tagen zu keiner vermehrten Proteinausscheidung.

8.2.5 Schädigung der Glomeruli

Abbildung 15 zeigt PAS-gefärbte renale Schnitte neun Tage nach Induktion der AP Nephritis. Bei der PAS-Färbung handelt es sich um eine histochemische Standardfärbung zur Detektion morphologischer Veränderungen. Angefärbt werden Muko- und Glykoproteine, Glykogen, Cellulose, neutrale Mukopolysaccharide sowie Glykolipide. Diese Substanzen sind beispielsweise in Basalmembranen, Bindegewebe, Zellwänden (Glykokalix) und in neutralen Schleimen vorhanden.

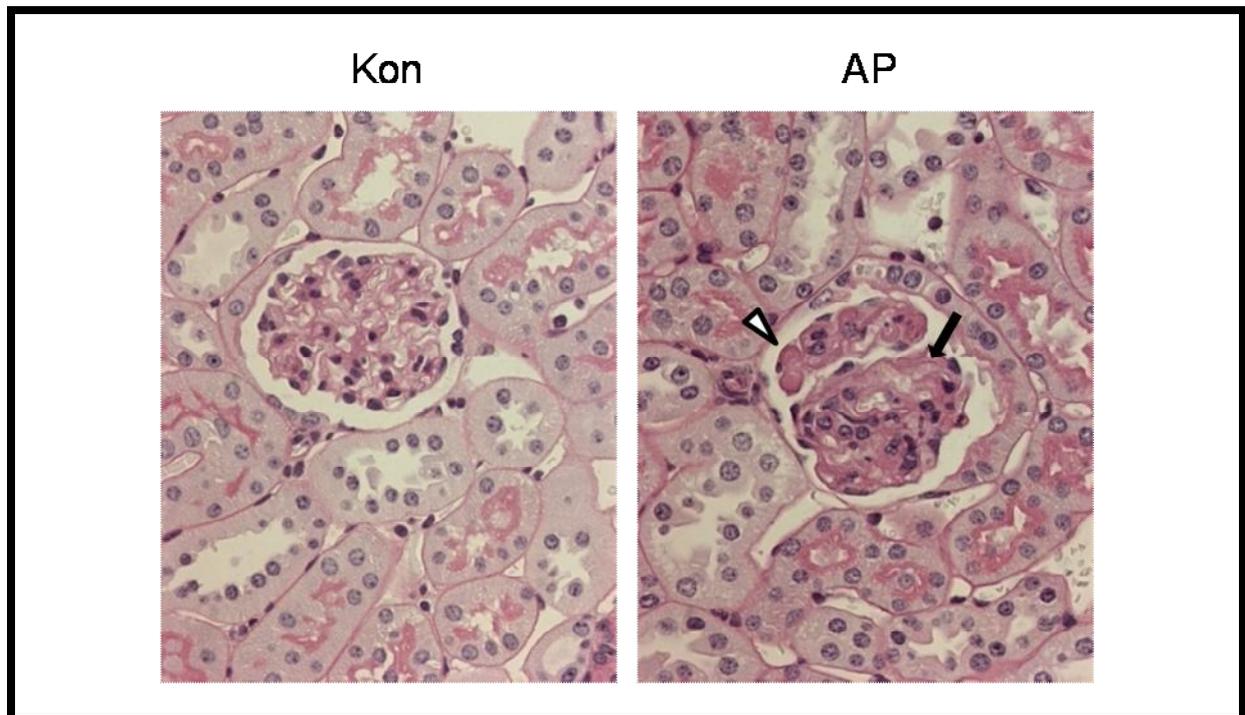


Abbildung 15: Schädigung des Glomerulus in der APN.

Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen einer PAS-Färbung in 400-facher Vergrößerung aus einer Kon- und einer AP-Maus an Tag 9. Bei Kon-Tieren sind keine größeren PAS positiven Areale im Glomerulum zu sehen. In AP-Tieren sind starke Einlagerungen von PAS positivem Material (Pfeilspitze) sowie Zellverlust (Pfeil) im Glomerulum zu erkennen.

Ergebnisse

Besonderes Augenmerk wurde auf PAS positive Einlagerungen innerhalb der Glomeruli gelegt. Diese waren in Kon-Tieren kaum und, falls vorhanden, ausschließlich fokal und extrem schwach vorhanden. Dies entspricht dem gesunden Normalzustand, da auch in unbehandelten Wildtyp Mäusen einzelne Minimalläsionen in einzelnen Glomeruli vorkommen. Die Beurteilung des Tubulussystems und des Interstitiums war ebenfalls unauffällig. Es wurden weder Präzipitate im Tubuluslumen noch Hyper- oder Atrophien des Tubulusepithels gefunden. Auch das Interstitium wies keine Veränderung wie beispielsweise Verbreiterungen auf.

In AP-Tieren hingegen waren starke glomeruläre Schädigungen in Form von intraglomerulären Ansammlungen PAS-positiven Materials zu finden (Keil). Charakteristisch dafür ist die Verbreiterung der mesangialen Matrix unter Ansammlung PAS positiver Kollagene und Proteoglykane. Ebenso kann es durch die Schädigung der Filtrationsbarriere zur Ablagerung von PAS positiven Proteinen aus zerstörten Zellen kommen.

In stark geschädigten Glomeruli kam es zudem zu einem Verlust an Zellen innerhalb des Glomerulums (Pfeil). Die glomerulären Veränderungen erschienen fokal aber weniger segmental. Halbmonde wie in der Focal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) wurden nicht beobachtet. In Bereichen stark geschädigter Glomeruli kam es zudem zu stark dilatierten Tubuli mit PAS positiven, intraluminären Einlagerungen sowie intrazellulären Proteinpräzipitaten in Epithelzellen des Tubulus. Das in der Abbildung gezeigte repräsentative Glomerulum des AP-Tieres wurde im PAS Score mit 2 bewertet.

Zur Quantifizierung der glomerulären Schädigung wurden Tiere aus drei unabhängigen Mausstaffeln mit einem arbiträren PAS Score bewertet (Abbildung 16). Betrachtet wurde wie in obiger Färbung der Tag 9 und 10. Die folgende graphische Darstellung des Scores beinhaltet eine APN Gruppe, die aus n = 9 AP-Tieren und eine Kontrollgruppe, die aus n = 6 Kontrolltieren besteht. Die Kontrollgruppe setzt sich aus n = 2 Wildtyp und n = 4 Kon-Tieren zusammen.

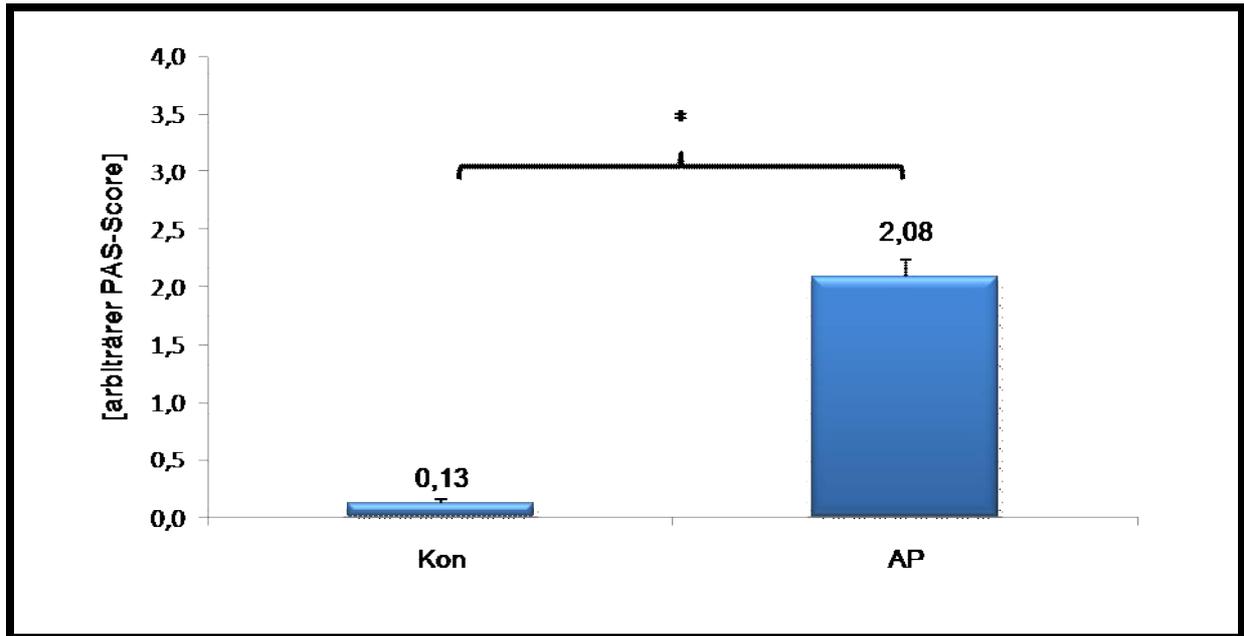


Abbildung 16: Quantifizierung glomerulärer Schäden in der APN.

Dargestellt ist der arbiträrer PAS-Score von Kontrolltieren (n = 6 Kon-Tiere) gegen AP-Tiere (n = 9) an Tag 9 und 10. Die Datensätze wurden aus drei unabhängigen Mausstaffeln generiert. Im Vergleich zur Kontrolle kam es zu einem signifikanten (*) Anstieg ($p < 0.01$) der glomerulären Schädigung durch das AP-Serum.

Der für die AP-Tiere ermittelte PAS Score von $2,08 \pm 0,16$ lässt, im Gegensatz zu den Kontrolltieren ($0,13 \pm 0,03$), auf eine massive glomeruläre Schädigung in der APN schließen. Dieser Wert war im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $p = 0,00000017$ hochsignifikant verändert, was mit den funktionellen Daten aus Abbildung 13 korreliert.

8.2.6 Morphologie der Fußfortsätze

Zur Charakterisierung glomerulärer Schäden an der Filtrationsbarriere wurde eine Immunogold-Färbung gegen Schaf IgG sieben Tage nach Serenapplikation durchgeführt (Abbildung 17). Hierbei sollte die Antikörperbindung sowie Veränderungen bei beginnender Proteinurie untersucht werden. Zur Analyse glomerulärer Endschäden der APN wurden elektronenmikroskopischen Aufnahmen 13 und 14 Tage nach APN Induktion ausgewertet.

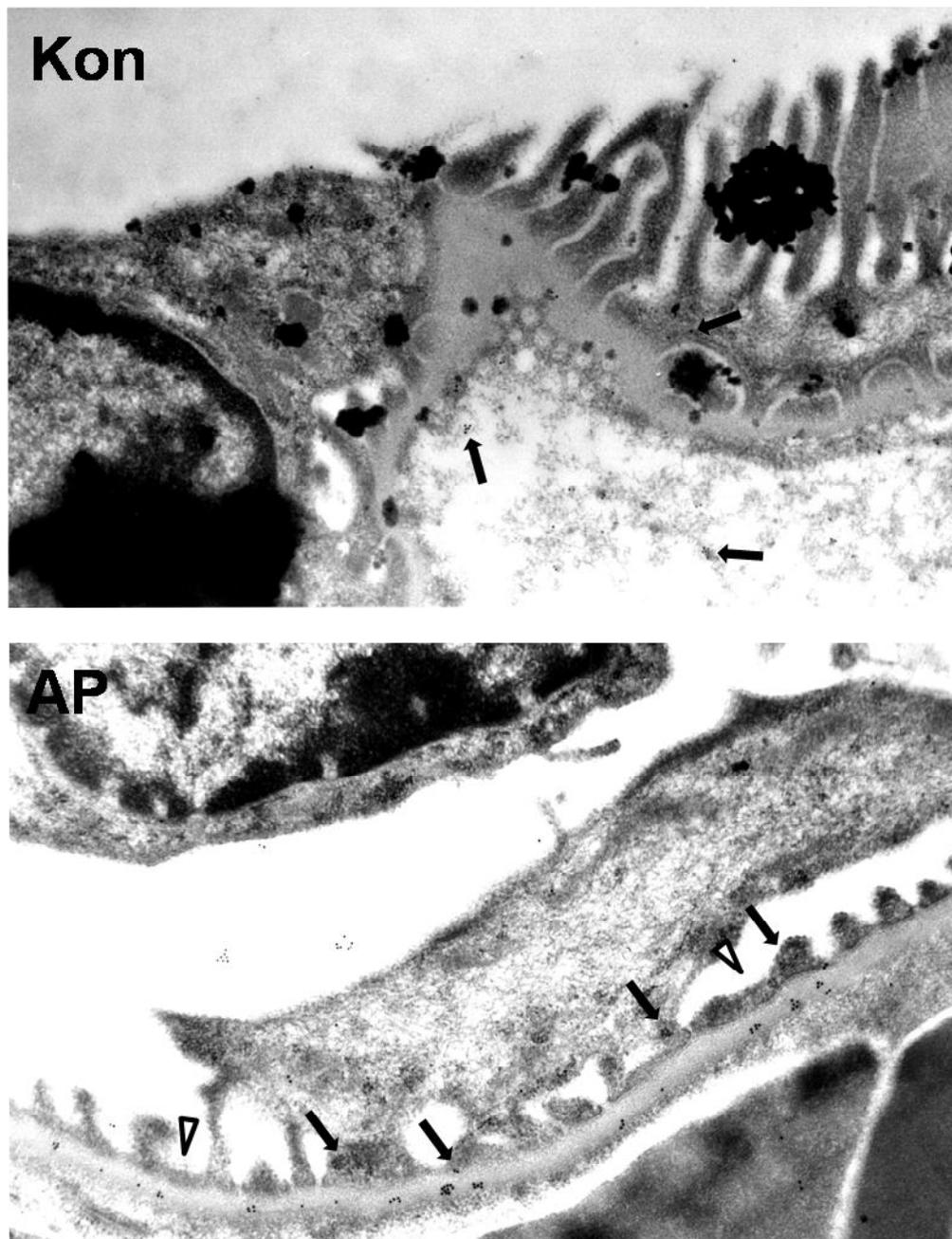


Abbildung 17: Immunogold-Färbung von Schaf IgG im Glomerulum an Tag 7.

Dargestellt sind die Immunogold-Färbungen eines Kon- und eines AP-Tieres bei Einsetzen der Proteinurie in 12500-facher Vergrößerung. Im Kon-Tier ist eine diffuse Ablagerung des Schaf IgG im Glomerulum zu sehen (Pfeil). Auch zu diesem Zeitpunkt ist das Schaf IgG im AP-Tier überwiegend in der GBM und an den Podozyten (Pfeil) statt. Es kommt zu leichten Fußfortsatzverschmelzungen (Keil). (Färbung hergestellt von Dr. Jan Becker, Hannover)

An Tag 7 sind in Kon-Tieren einzelne diffus verteilte Antikörper zu erkennen. Bei den großen schwarzen Präzipitaten handelt es sich um Artefakte, die mit der Färbeprozedur

zusammenhängen. Kon-Tiere zeigen weder eine Veränderung in der Basalmembran noch am Endothel. Auch die Podozytenmorphologie ist vollständig intakt. Die Fußfortsätze stellen sich als sehr feingliedrig und regelmäßig dar, Verschmelzungen sind nicht zu erkennen.

Im Gegensatz zeigen AP-Serum behandelte Tiere ein membranöses Bindungsmuster. Die Schaf-Antikörper sind, kohärent zur Schaf IgG Bindung einen Tag (Abbildung 11) nach Serumapplikation, hauptsächlich in der GBM nachzuweisen. Diese zeigt auch zu diesem Zeitpunkt keine Veränderung der GBM in Form einer Verdickung. Zusätzlich haben Antikörper an Podozyten gebunden, die subepithelial und im Bereich der Fußfortsätze zu finden sind (Pfeile). Bei den Podozyten ist eine deutliche Abflachung und Verschmelzung der Fußfortsätze nachzuweisen (Keile). Dieser Befund korreliert sehr gut mit einer beginnenden Proteinurie wie sie funktionell nachgewiesen wurde.

8.2.6.1 Morphologie der Filtrationsbarriere zum Endpunkt der Erkrankung

In Abbildung 18 ist repräsentativ die Filtrationsbarriere eines Kon-Tieres 15 Tage sowie eines stark proteinurischen AP-Tieres 13 Tage nach Serumapplikation gezeigt.

Bei Kon-Tieren sind keinerlei-Veränderungen im Bereich der Filtrationsbarriere zu finden. Es ist deutlich die Fenestrierung des Endothels und die gleichmäßige GBM zu erkennen. Auch die Fußfortsätze der Podozyten sind sehr regelmäßig und von gleichmäßiger Höhe und Form. Ein ganz anderes Bild zeigt die Aufnahme des AP-Tieres. Im Endstadium der Erkrankung sind massive Veränderungen sichtbar. Die Fußfortsätze der Podozyten sind vollkommen verschmolzen und es ist keinerlei intakte Schlitzmembran mehr vorhanden. Weiterhin kam es zur Ablagerung subepithelialer Depots (Pfeile). Es handelt sich dabei möglicherweise um Immunkomplexe. Diese sind für das Stadium I einer membranösen Glomerulonephritis charakteristisch. Die GBM ist an einigen Stellen erheblich verbreitert und das Mesangium erscheint stark sklerosiert. Insgesamt führt die APN zu massiven glomerulären Veränderungen.

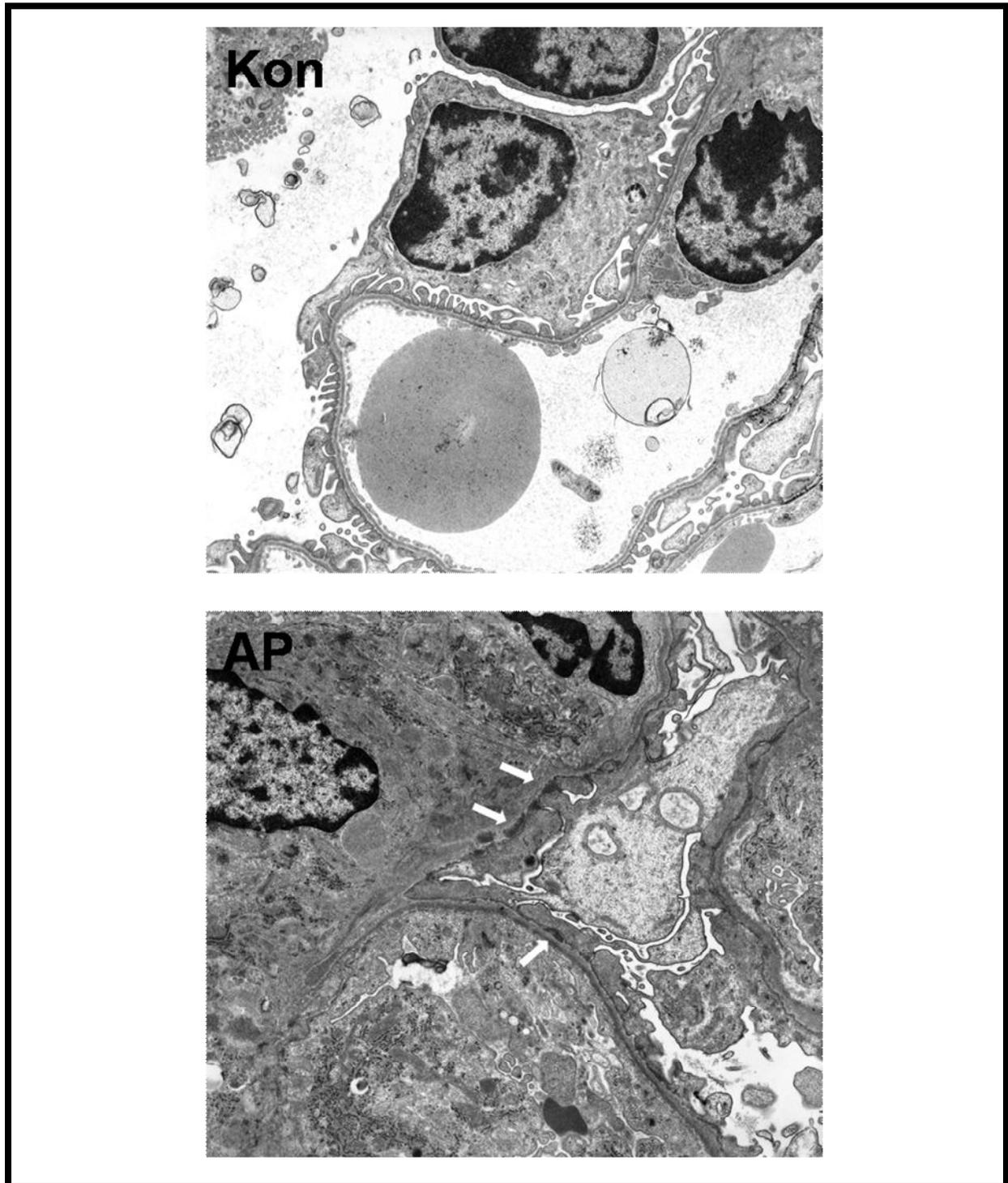


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Glomeruli Tag 13 und 15.

Zum späten Zeitpunkt der APN sind die Fußfortsätze der Kontrolle unauffällig. Im AP-Tier sind massive Verschmelzung der Fußfortsätze zu erkennen. Es kommt zu elektronendichten Ablagerungen zwischen Podozyt und Basalmembran. Die Vergrößerung betrug 6300x.(Aufnahmen hergestellt von Dr. Jan Becker, Hannover)

8.3 Spire-1 Genexpression

In Abbildung 19 ist die Spire-1 mRNA Expression mit Hilfe einer RT-PCR aus Gesamtniere, Glomeruli und kultivierten Podozyten der Maus gezeigt. Als Referenzgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) herangezogen. Referenzgene werden unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert. In diesem Fall diente es als Positivkontrolle der PCR.

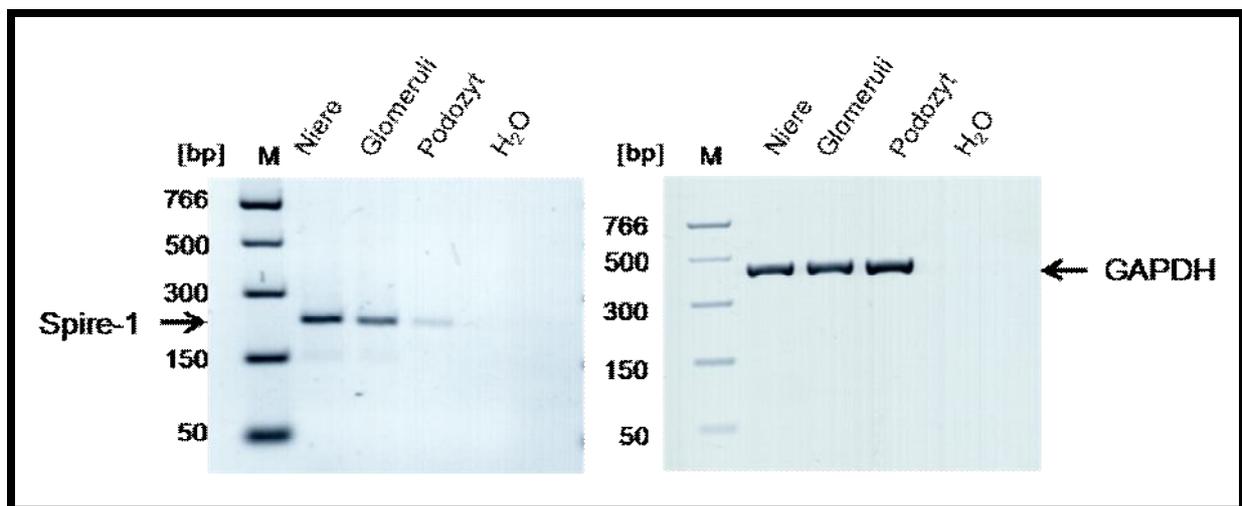


Abbildung 19: mRNA-Nachweis von Spire-1 in der Mausnieren.

Die Agarosegele (2%) zeigen die qualitative PCR von Spire-1 (228 bp) in Mausnieren, Mausglomeruli und Podozyten sowie GAPDH (452 bp) in diesen Proben als Positivkontrolle. In allen drei Proben kann die Expression von Spire-1 auf mRNA Ebene nachgewiesen werden.

Spire-1 konnte hierbei in allen Proben nachgewiesen werden. Die Bandenstärke der Probe Gesamtniere und Glomeruli sind vergleichbar. Kultivierte murine Podozyten scheinen dagegen weniger Spire-1 zu exprimieren. Damit ist, im Widerspruch zu Schuhmacher, *et al.*, (2004) eine Spire-1 RNA Expression in der Mausnieren vor Allem im Glomerulus und Podozyten gezeigt.

Übereinstimmend zur Spire-1 RNA-Expression zeigt Abbildung 20 die Spire-1 Proteinexpression in der Mausnieren und in kultivierten murinen Podozyten. Als Positivkontrolle wurde Proteinlysate aus Mäusehirn verwendet (Schuhmacher N, *et al.*, 2004).

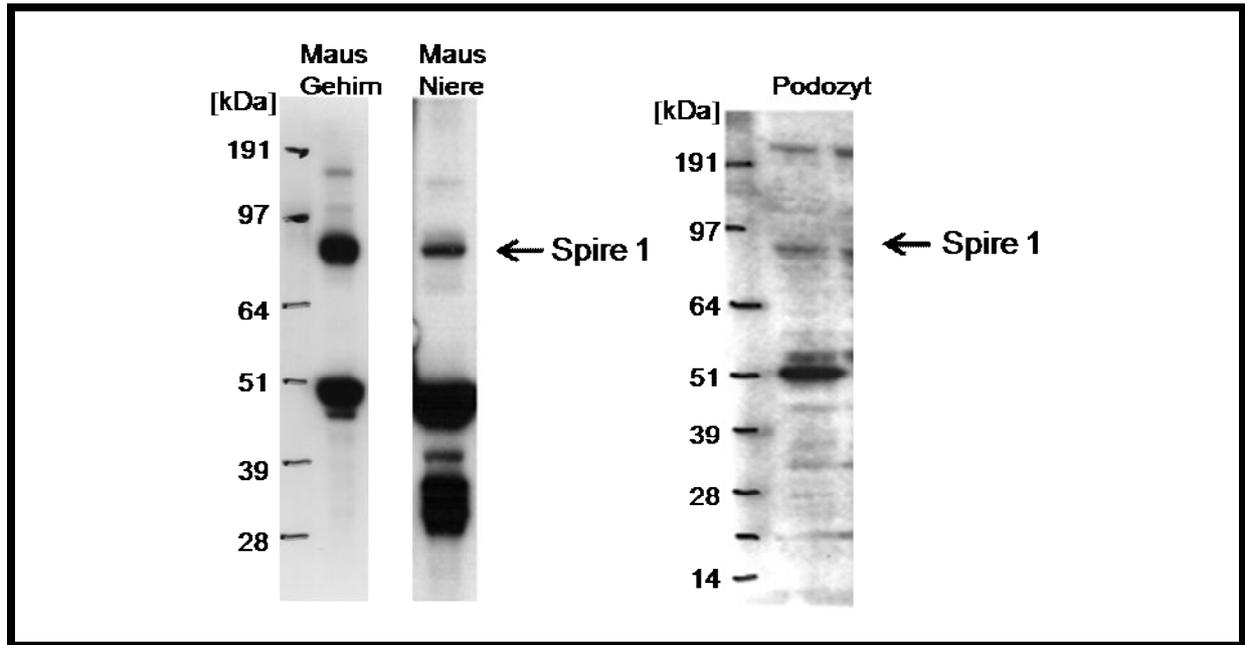


Abbildung 20: Protein-Nachweis von Spire-1 in der Mausniere.

Die Immuno-Blots von Lysaten von Mausgehirn, Mausniere und differenzierten Podozyten gegen Spire-1 zeigen auf Höhe, der in Publikationen angegebenen Größe von ca. 95 kDa eine Bande. Zusätzlich ist in allen Proben eine Bande bei ca. 50 kDa detektiert worden. Des Weiteren wurden in allen Proben weitere Banden detektiert, die sowohl größer als auch kleiner als 95 kDa sind.

In Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen detektiert der Spire-1 Antikörper in Gehirnlisat zwei Proteinbanden bei 95 und 50 kDa. Erstere repräsentiert laut Literatur das Spire-1 Protein. Dort wird in Gehirnlisat ebenfalls eine unspezifische Bande bei ca. 35 kDa detektiert. Diese konnte hier im Gehirnlisat nicht detektiert werden.

In murinem Nierenlisat wurden Banden der Größe 95 kDa, 50 kDa und auch Banden kleinerer Molekulargewichte, um 35 kDa nachgewiesen. Diese fanden sich ebenfalls im Lisat aus kultivierten murinen Podozyten.

8.3.1 Spire-1 Proteinexpression in der AP-Nephritis

Immunhistochemie

In der APN findet eine massive Schädigung der Podozyten statt. Dies zeigt sich am terminalem Verlust der podozytären Fußfortsätze. Eine mit diesen Prozessen einhergehende Veränderung des Zytoskeletts und damit auch möglicher relevanter Kofaktoren wie Spire-1, scheint naheliegend. Deshalb wurde immunhistochemisch gegen Spire-1 gefärbt.

In Abbildung 21 sind repräsentative Bilder von Kon- und AP-Tieren nach neun und 15 Tagen abgebildet.

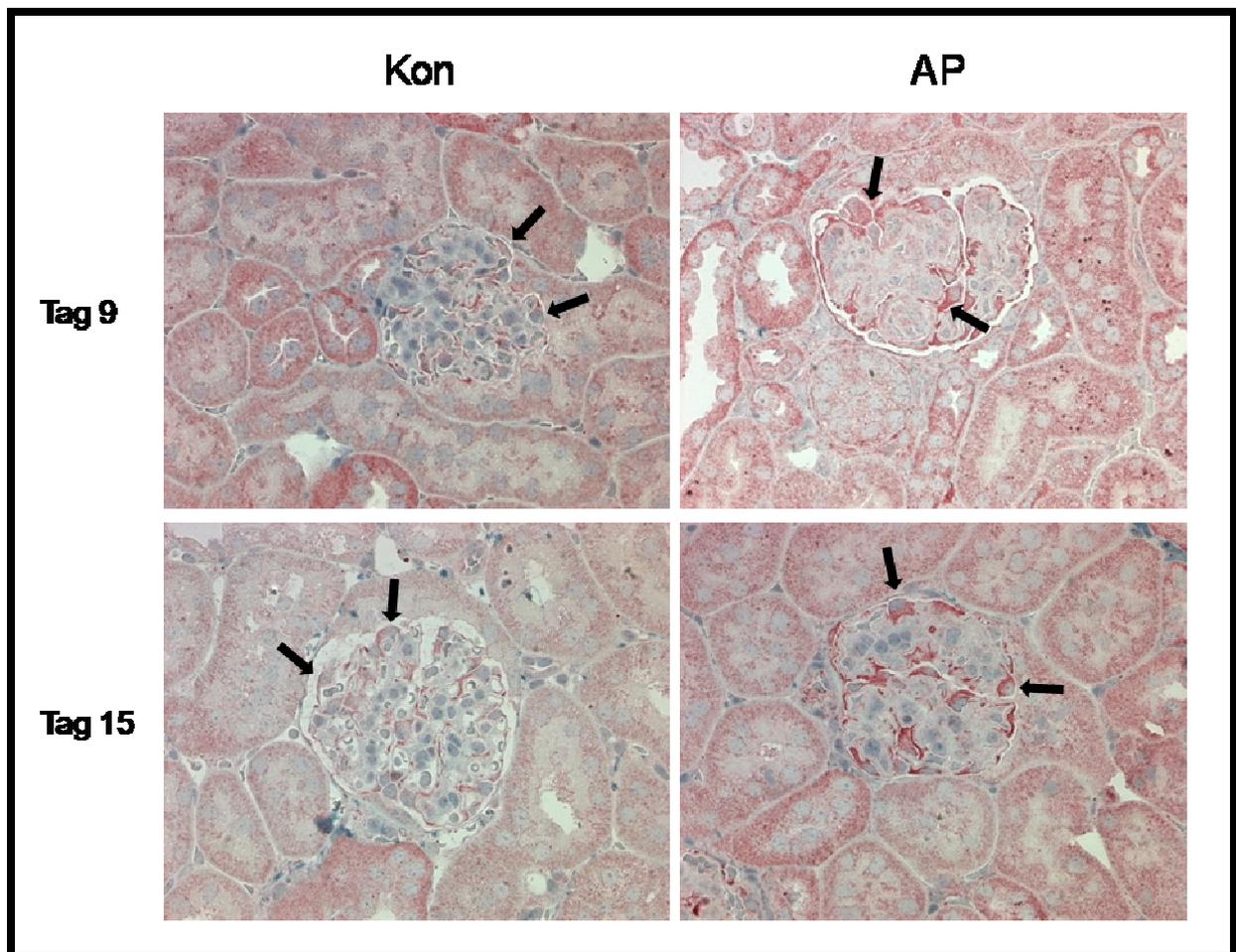


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von Spire-1 in der Mausniere im APN-Modell.

Die dargestellten Bilder zeigen die immunhistochemische Färbung von Spire-1 auf Paraffin-Schnitten von Mausnieren in 400-facher Vergrößerung. Abgebildet sind exemplarisch ein Kontroll- und ein AP-Tier an Tag 9 und Tag 15 nach Injektion. Sowohl an Tag 9 als auch Tag 15 scheint die Spire-1 Expression in den Podozyten in den AP-Tieren im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Pfeil).

Im Glomerulum scheint die Expression von Spire-1 sowohl bei Kon- als auch AP-Tieren auf Podozyten beschränkt zu sein (Pfeile), wobei nach AP-Serum Gabe Spire-1 hochreguliert wird. Zusammengefaßt kommt es in der APN der Maus zu einer deutlichen Schädigung der Podozyten in Form von Fußfortsatzverschmelzungen. Hierbei könnte der Aktinnukelator Spire-1 eine Rolle spielen.

Das Modell weist jedoch einige erhebliche Nachteile auf. Die Heterogenität der APN und mangelnde Auflösung der Podozyten in der Lichtmikroskopie erschwert eine Untersuchung der Pathologie auf struktureller Ebene *in vivo*. Weiterhin ist die funktionelle Untersuchung von Spire-1 *in vivo* sehr limitiert, da eine Spire-1 Knock Out Mauslinie bis dato nicht verfügbar ist. Deshalb wurde im Folgenden ein APN-Modell in Zellkultur etabliert, anhand dessen die Funktion von Spire-1 in durch Gene-Silencing Studien untersucht werden konnte.

8.4 APN-Modell in Zellkultur

8.4.1 Podozytenkultivierung und Differenzierung

Podozyten in Zellkultur können auf Grund ihrer Monokultur und Immortalisierung keine Schlitzmembran ausbilden. In Kultur fehlt dazu vor allem eine ausgebildete GBM sowie an deren Bildung beteiligte Mesangial- und Endothelzellen. Außerdem sind immortalisierte Podozyten nicht mehr mit naiven gleichzusetzen. Deshalb wurden zunächst die Kulturbedingungen für einen möglichst hohen Ausdifferenzierungsgrad der Podozyten ausgetestet.

In undifferenziertem Zustand zeigen die Podozyten einen epithelialen Phänotyp, der als „kopfsteinplasterartig“ beschrieben ist (Mundel P, *et al*, 1997; Shankland SJ, *et al.*, 2007; Krttil J, *et al.*, 2007). Sie weisen eine konstante Proliferationsrate auf und haben wenige Fortsätze. Die Zell-Zell Kontakte sind sehr ausgeprägt. Oft sind Bereiche zu finden an denen die Membranen direkt aneinander anliegen und über tight junctions verbunden sind (Mundel P, *et al.*, 1997). Die einsetzende Differenzierung unter non-permissiven Bedingungen geht mit einem drastischen Rückgang der Proliferationsrate einher. Nach 11 Tagen haben die Podozyten eine dramatische Veränderung im Phänotyp vollzogen. Ihre Zellkörper haben sich abgeflacht und

Ergebnisse

erscheinen insgesamt größer. Es haben sich zahlreiche, teilweise verzweigte Fortsätze gebildet. Viele filigrane Zell-Zell Kontakte, über die die Podozyten miteinander netzartig verbunden sind, sind zu sehen (Abbildung 22).

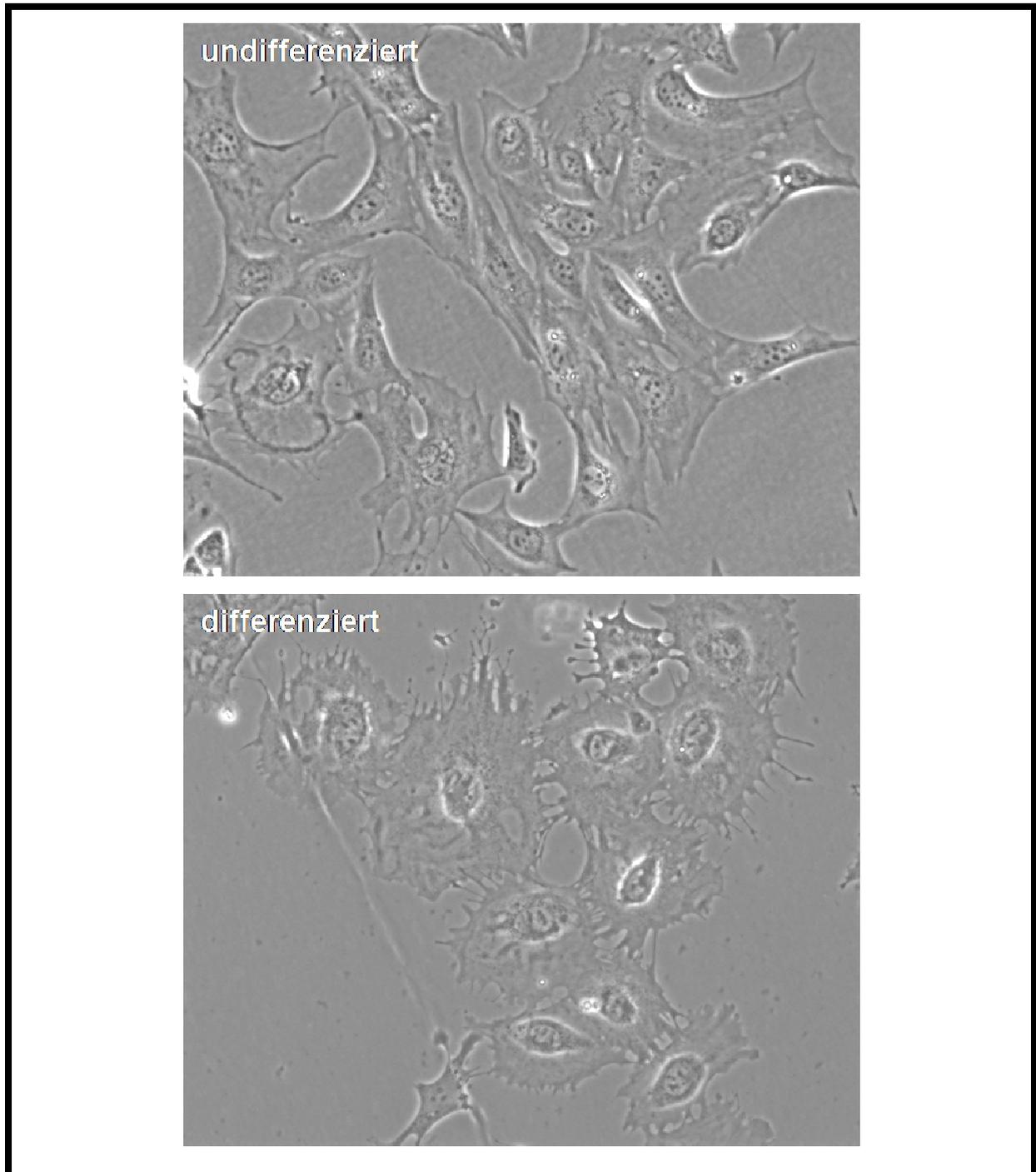


Abbildung 22: Morphologie von kultivierten Maus-Podozyten.

Die Bilder zeigen die phänotypischen Unterschiede zwischen differenzierten und undifferenzierten Podozyten in Medium mit 10% FCS in 200-facher Vergrößerung. Es ist zu sehen, dass die Podozyten von ihrem kopfsteinpflasterartigen Phänotyp im undifferenzierten Zustand zu ihrem differenzierten Phänotyp mit vielen Fortsätzen und filigranen Zell-Zell Kontakten auswachsen.

8.4.2 FCS Dosis-Wirkungs-Kurve

In der Regel werden Zellkulturexperimente unter Abwesenheit von FCS durchgeführt. Das nachvollziehbare Argument dafür ist die nicht genau bekannte Zusammensetzung des fötalen Kälberserums. In ihm sind beispielsweise Wachstumshormone und Immunglobuline enthalten, welche für Nebeneffekte im Experiment verantwortlich sein können. Für die Etablierung des APN Modells in Kultur sollten die Zellen in einem möglichst ausdifferenzierten Zustand vorliegen. Stark ausdifferenzierte Zellen sind hinsichtlich ihren Kulturbedingungen häufig besonders anspruchsvoll. Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluß unterschiedlicher FCS Konzentrationen auf phänotypische Veränderungen ausdifferenzierten Podozyten untersucht.

Ausdifferenzierte Podozyten wurden für 24 Stunden in Medien mit unterschiedlichem FCS-Konzentration (10, 5, 1, und 0 % inkubiert und anschließend fotografiert (Abbildung 23).

Wie zuvor beobachtet zeigen die Podozyten mit 10 % FCS im Medium wiederum den hoch differenzierten Phänotyp mit multiplen Fortsätzen und filigranen Zell-Zell Kontakten. Nach Reduktion der FCS-Konzentration auf 5 % FCS ist eine deutliche Verringerung der Fortsätze zu beobachten. Auch die Zell-Zell Kontakte werden zahlenmäßig weniger und erscheinen weniger filigran als mit 10 % FCS. Dieser Trend setzt sich mit sinkender FCS Konzentration fort. Bei einem bzw. 0 % FCS im Medium sind nahezu keine Fortsätze mehr zu sehen. Auch die filigranen Zell-Zell Kontakte sind nicht mehr vorhanden. Die Membranen erscheinen vielmehr direkt aneinander zu liegen. Alles in Allem ähneln die Podozyten eher dem undifferenzierten Zustand.

Nach der Auswertung dieser Daten wurden alle folgenden Zellkulturexperimente mit 10 % FCS im Medium durchgeführt, da die Podozyten im höchstmöglichen Differenzierungsgrad gehalten werden mußten.

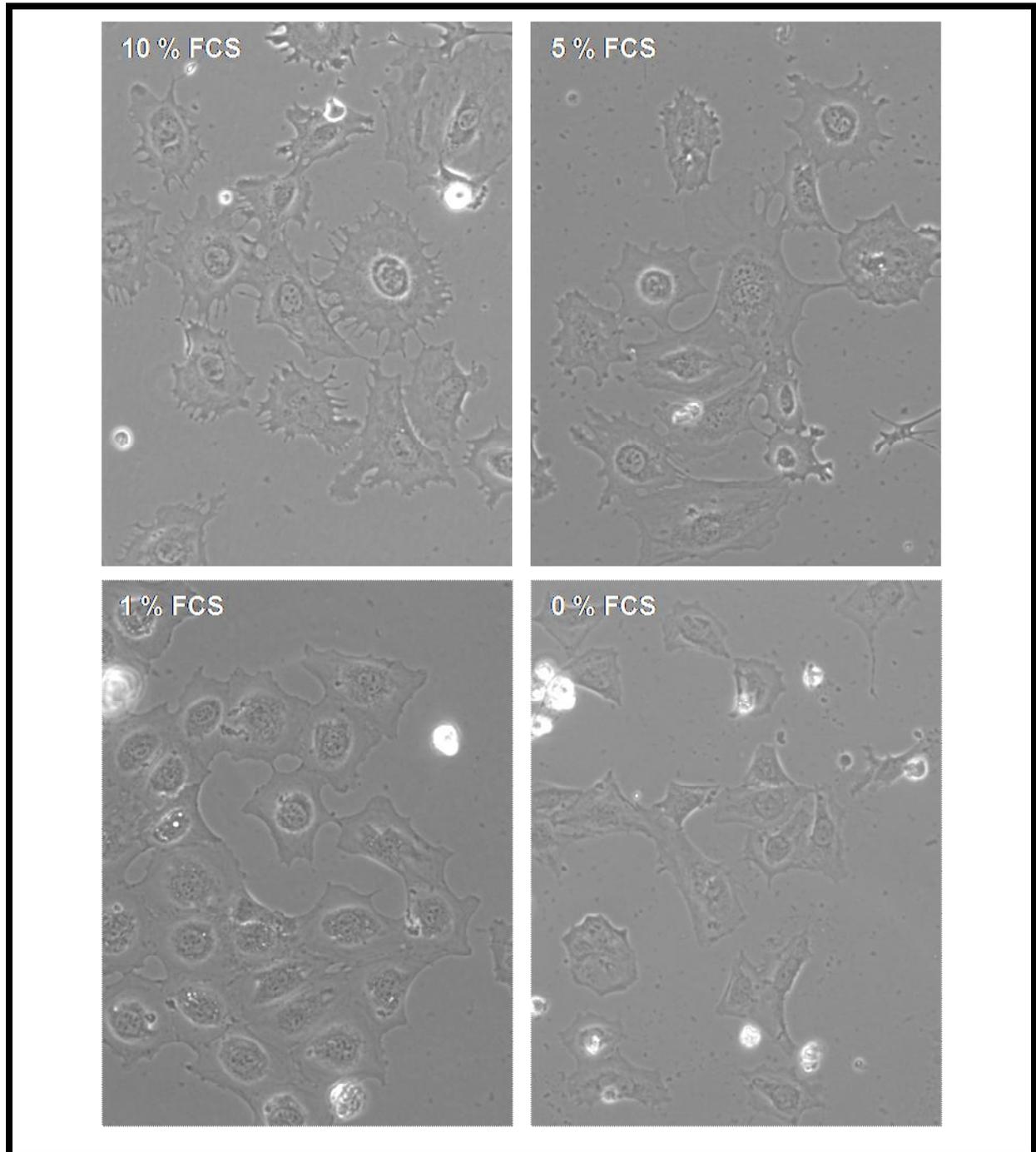


Abbildung 23: Dosis-Wirkungs-Kurve FCS Konzentration.

Differenzierte Podozyten wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen FCS Konzentrationen kultiviert. Es kommt zu deutlichen morphologischen Veränderungen, wobei die Länge und Anzahl der Fortsätze in Abhängigkeit der sinkenden FCS Konzentration abnimmt. Die Aufnahmen wurden in 200-facher Vergrößerung gemacht.

8.4.3 Dosis-Wirkung des APN-Modells

Zur Bestimmung der optimalen AP-Serum Konzentration wurden ausdifferenzierte Podozyten für 24 Stunden mit 50, 75 und 100 µg/ml des jeweiligen Serums inkubiert (Abbildung 24).

Nach Inkubation aller AP-Serum Konzentrationen waren dramatische Umbauten in der Zellmorphologie zu verzeichnen. Es kam es zu einer sehr starken Reduktion der Fortsätze in Anzahl und Länge (Keil). Die Zellen erschienen abgerundet. Die Zell-Zell Kontakte waren ebenfalls stark verändert (Pfeil). Im Bereich der Zell-Zell Kontakte schienen die Zellmembranen miteinander verschmolzen zu sein. Diese Phänomene fanden bereits bei einer AP-Serum Konzentration von 50 µg/ml statt und verstärkten sich mit zunehmender Konzentration. Zusätzlich stieg die Mortalität bei Erhöhung der AP-Serumkonzentration. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml überlebten kaum Podozyten. Bei Applikation des Kon-Serums ist es zu keiner Veränderung der Podozytenmorphologie gekommen. Bei Inkubation mit 50, 75 und 100 µg/ml Kon-Serum behielten die Podozyten ihren hoch ausdifferenzierten Phänotyp. Die Fortsätze (Keil) und die Zell-Zell Kontakte (Pfeil) erschienen ebenso zahlreich und filigran wie bei unbehandelten ausdifferenzierten Podozyten.

Das Zellkulturmodell sollte sich im Rahmen einer Schädigung bewegen. Dies setzt deutlich geschädigte, aber auch lebensfähige Podozyten voraus. Für alle weiteren Versuche wurde deshalb 50 µg/ml AP-Serum verwendet.

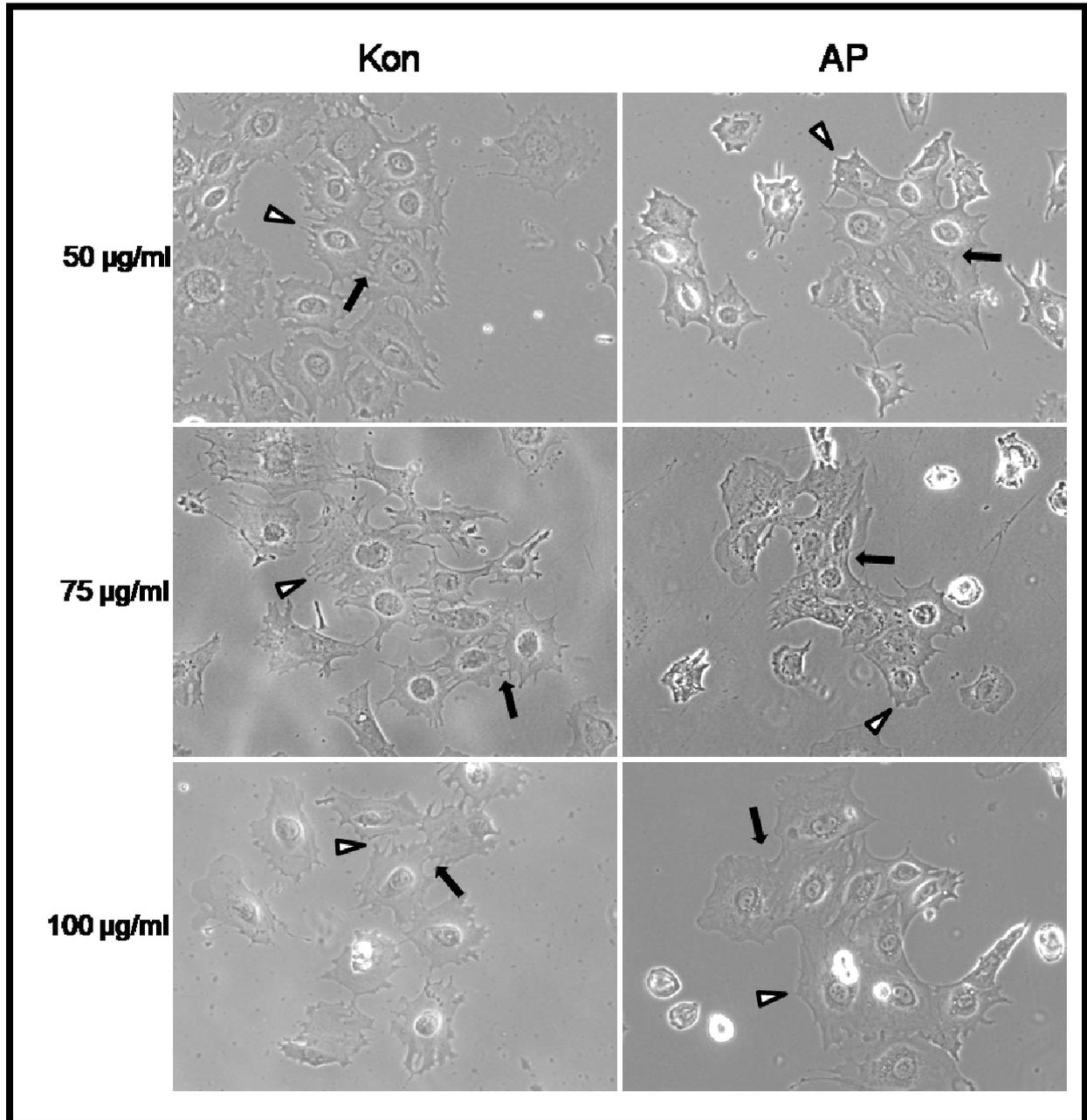


Abbildung 24: Dosis-Wirkungs-Kurve AP-Serum Konzentration.

Gezeigt sind die morphologischen Veränderungen differenzierter Podozyten bei unterschiedlichen Kon- bzw. AP-Serumkonzentrationen in 200-facher Vergrößerung ($n = 6$). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen Serum im Medium inkubiert. Die Podozyten bei denen Kon-Serum appliziert wurde sind in Bezug auf Zellfortsätzen (Keil) und Zell-Zell Kontakten (Pfeil) unauffällig. Bei AP-Serum Applikation kommt es zu deutlichen Veränderungen der Fortsätze und Zell-Zell Kontakten.

8.4.4 Antigenbindung auf differenzierten Podozyten

Zur besseren Charakterisierung der Serumbindung wurde das APN Modell bei ausdifferenzierten Podozyten induziert. Das gebundene Schaf IgG wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. In Abbildung 25 sind die morphologischen Veränderungen im Phasenkontrast und die Bindungsmuster der Seren dargestellt.

Im Phasenkontrast sind identische Veränderungen wie schon im Dosis-Wirkungs-Experiment zu sehen. Während die Kon-Zellen phänotypisch unauffällig sind, kommt es bei AP-Serum behandelten Podozyten zu den beschriebenen Fußfortsatzveränderungen (Keil) und Zell-Zell Kontakten (Pfeil). Immunhistologisch zeigt sich bei, mit Kon-Serum behandelten, Podozyten keinerlei Färbung. Im Gegensatz dazu zeigen AP-Serum behandelte Podozyten ein deutliches Fluoreszenzsignal, das homogen auf der gesamten Podozytenoberfläche verteilt ist.

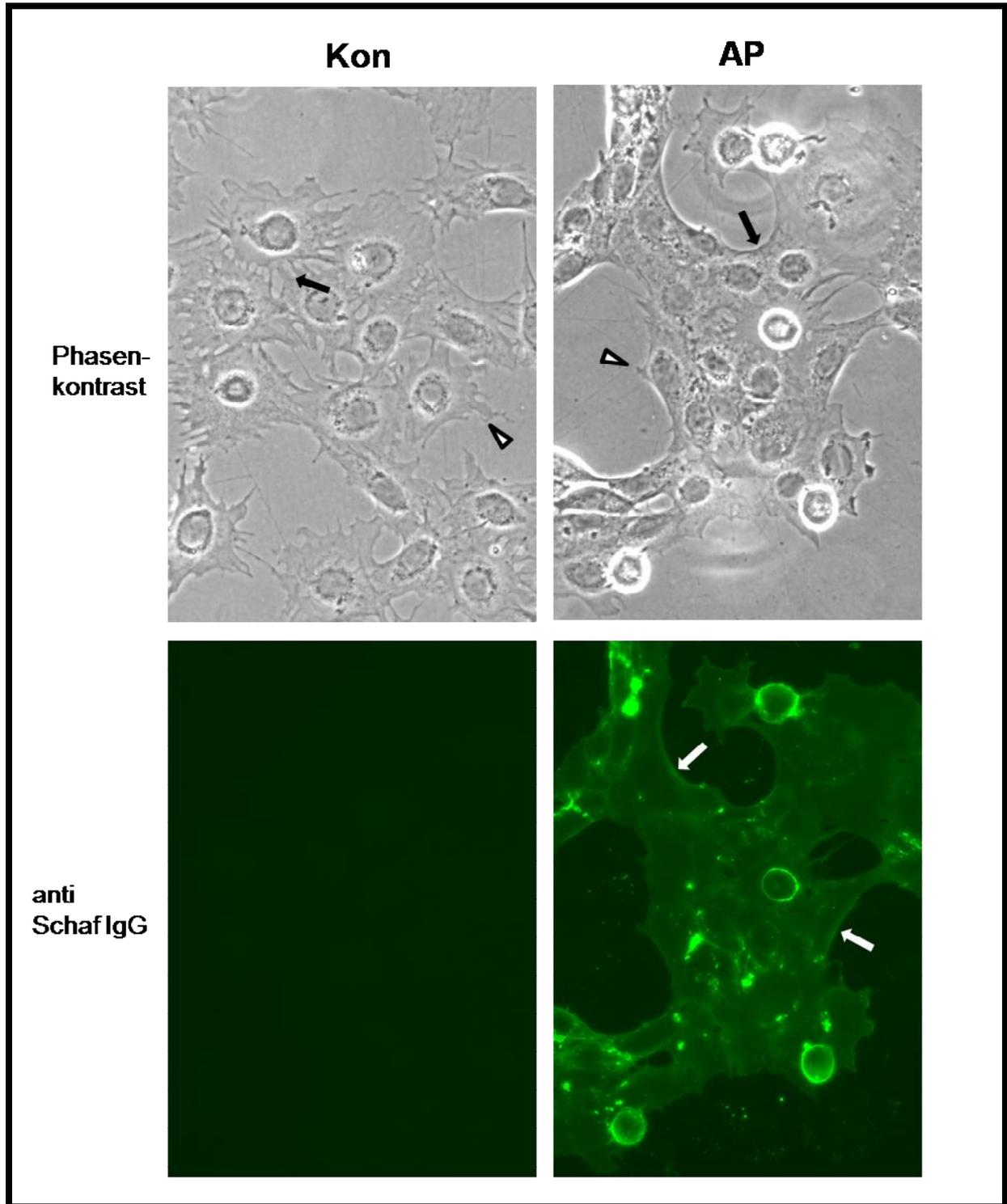


Abbildung 25: Antigenbindung der Seren auf differenzierten Podozyten.

Gezeigt ist eine immuncytochemische Fluoreszenzfärbung differenzierter Podozyten gegen Kon- bzw. AP-Serum in 200-facher Vergrößerung. Dazu wurden differenzierte Podozyten für 24 Stunden mit dem jeweiligen Serum (50µg/ml) im Medium inkubiert und anschließend mit einem cy2-gekoppelten anti-Schaf Antikörper detektiert. Im Phasenkontrast sind bei APN Gabe wiederum die Veränderung bei den Fortsätzen (Keil) und Zell-Zell Kontakten (Pfeil) zu sehen. In der Immunfluoreszenzfärbung ist bei Kon kein Signal zu detektieren. Bei APN dagegen ist eine lineare Färbung der Zelloberfläche (weißer Pfeil) zu sehen.

8.4.5 Vitalitäts-Assay

Zur Vitalitätsprüfung der verwendeten Seren wurden differenzierte Podozyten mit 50 µg/ml Kon- bzw. AP-Serum für 24 Stunden in 10% FCS haltigen RPMI-Medium behandelt (Abbildung 26). Repräsentative FACS Analysen zeigen sowohl in normalen Podozyten als auch in Kon- und AP-Serum behandelten Zellen zwei deutlich voneinander abgegrenzte Populationen (Abbildung 26 A). Bei der Population mit geringer Fluoreszenz handelt es sich um vitale Podozyten, während die Population mit der Fluoreszenzintensität $> 10^{0.7}$ stark geschädigte und tote Podozyten repräsentiert. Unter diesen Bedingungen waren sowohl $92,8\% \pm 0,6\%$ der normal kultivierten Podozyten als auch $91,4\% \pm 0,5\%$ der mit Kon-Serum inkubierten Podozyten vital (Abbildung 26 B). Die Inkubation mit AP-Serum zeigt, neben den morphologischen Veränderungen, im Vitalitäts-Assay eine leicht verminderte Vitalität von $86,7\% \pm 0,2\%$.

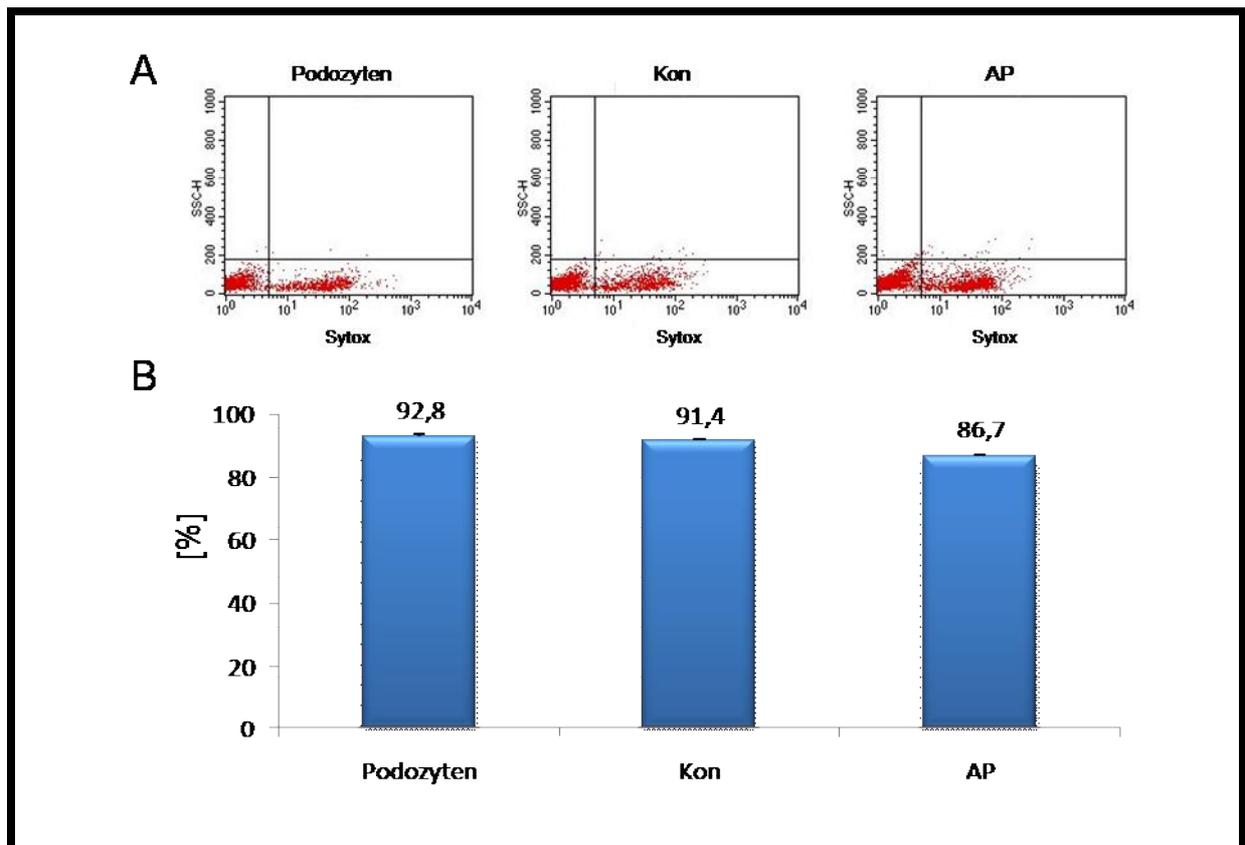


Abbildung 26: Vitalitäts-Assay nach AP-Serum Gabe in Zellkultur.

A) Dargestellt ist die Quantifizierung repräsentativer FACS Analysen eines Vitalitäts-Assays nach 24 stündiger Inkubation in normalem Medium, mit Kon-Serum (50 µg/ml) und AP-Serum (50 µg/ml) (n = 2). B) In dem Diagramm ist die Anzahl der lebenden, differenzierten Podozyten nach unter A) erwähnter Inkubation dargestellt.

8.4.6 Morphologische Veränderungen des Zytoskeletts im APN-Modell

Zur Klärung, inwiefern die phänotypischen Veränderungen des APN-Modells auf einem Umbau der zytoskelettalen Strukturen beruht, wurde bei differenzierten Podozyten eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung von β -Aktin und α -Tubulin im APN-Modell angefertigt. Die Abbildungen 27 zeigen die Färbungen von Kon- und AP-Serum behandelten Podozyten.

Die zytoskelettalen Strukturen wurden für eine noch detailliertere Darstellung zusätzlich in 400-facher Vergrößerung dokumentiert (Abbildung 28).

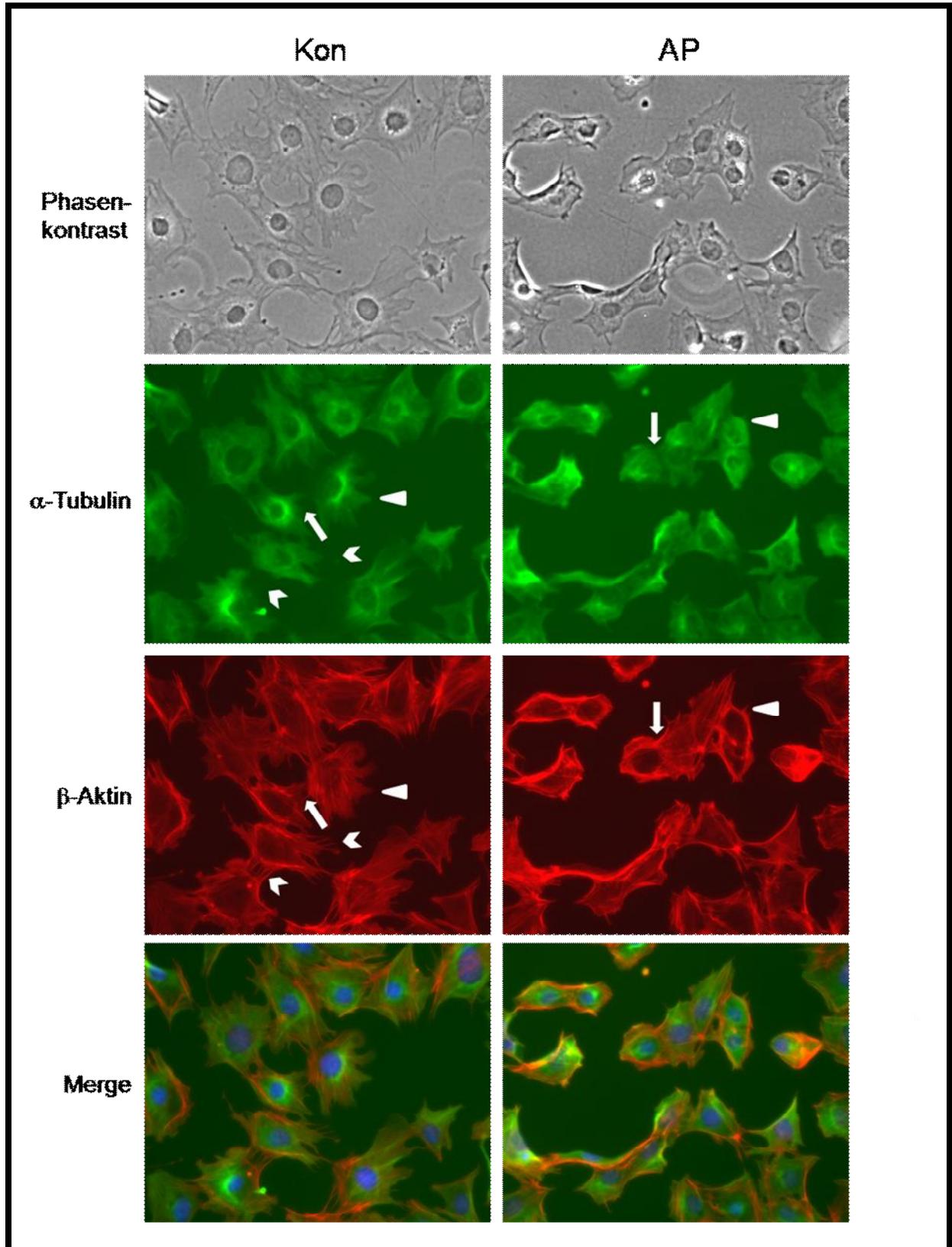
Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die Schädigung im APN-Modell. Die Kon-Serum behandelten Podozyten zeigen einen unauffälligen differenzierten Phänotyp. Die AP-Serum behandelten Podozyten weisen dagegen die zuvor beschriebenen Veränderungen auf, womit die Schädigung im APN-Modell bestätigt werden konnte.

In ungeschädigten Podozyten zeigen sich filigrane Mikrotubuli, ein wesentlicher Bestandteil des ausdifferenzierten Phänotyps (Drenckhahn D, *et al.*; 1988; Andrews PM, 1981). Die Mikrotubuli breiten sich von ihren „microtubule organizing center“, die in der Nähe des Nukleus angesiedelt sind, meist radial in Richtung Zytoplasma aus und verlaufen bis in die Fortsätze der Podozyten (Keil). Auch in den meisten Fortsätzen, die an Zell-Zell Kontakten beteiligt sind lassen sich Mikrotubuli nachweisen (Pfeil).

Das Aktin Zytoskelett weist in ungeschädigten Podozyten ein von dem der Mikrotubuli abweichendes Verteilungsmuster auf. Die Aktinfilamente der Fortsätze beginnen nicht perinukleär, sondern zweigen vom kortikalen Netz ab. Es besteht aus einem dichten Netz unterhalb der Plasmamembran, das durch Verbindungsproteine mit der Membran vernetzt ist.

Die von diesem Netzwerk abgehenden Aktinfilamente gehen ebenfalls bis in die Fortsätze und tragen dort zu deren Bildung und Stabilität bei (Pfeil). Auch bei Zell-Zell Kontakten sind sie eine der wesentlichen Strukturen (Keil).

Werden Aktin- und Tubulinfärbungen übereinandergelegt, enthalten einige sehr dünne Fortsätze in deren äußersten Enden keine Mikrotubuli, wohl aber Aktinfilamente (Pfeilspitzen).



Ergebnisse

Abbildung 27: Podozyten-Morphologie, Tubulin-, und Aktin-Filamentarchitektur im APN-Modell in Zellkultur.

Die Abbildung zeigt die morphologischen Veränderungen von differenzierten Podozyten auf der Ebene des Aktin- und Tubulin Zytoskelettes sowie im Phasenkontrast im APN-Modell in 200-facher Vergrößerung (n = 9). Die Zellen wurden mit 50 µg/ml des jeweiligen Serums für 24 Stunden inkubiert und jeweils gegen Aktin und Tubulin doppelgefärbt. Die Keile weisen auf die jeweiligen Filamente in den Fortsätzen hin, die Pfeilspitzen markieren Aktinfilamente, die in Fortsätze reichen, welche frei von Tubulin sind. Bereiche von Zell-Zell Kontakten werden durch Pfeile angezeigt.

Die Veränderungen des Podozytenphänotyps lassen sich ebenfalls auf zytoskelettaler Ebene darstellen. Auch in der Tubulinfärbung der durch AP-Serum geschädigten Zellen ist eine deutliche Abflachung der Fortsätze zu sehen (Keil). Die Struktur der Tubuli ist im Vergleich zu ungeschädigten Podozyten in diesen geschädigten Bereichen verbereitert. Die Bereiche von Zell-Zell Kontakten stellen sich meist in Form von Membranverschmelzungen dar. In vielen dieser Bereiche ist eine Retraktion von Tubulin zu beobachten (Pfeil).

Auch die Aktinfilamente zeigen Veränderungen in Form von Fortsatzretraktion. Nahezu alle Fortsätze scheinen bis zum kortikalen Netz zurückgezogen. Es sind kaum noch durch Aktinfilamente „aufgespannte“ Fortsatzformationen zu finden (Keil). Bei den Zell-Zell Kontakten scheint es zu einer Verdickung der Aktinfilamente im Bereich der Membranverschmelzungen zu kommen. Die kortikalen Netze der benachbarten Zellen scheinen direkt aneinander anzuliegen (Pfeil).

Auf Grund der massiven Retraktion der Fortsätze sind im APN-Modell keine filigranen, nur durch Aktin stabilisierte Fortsätze mehr aufzufinden.

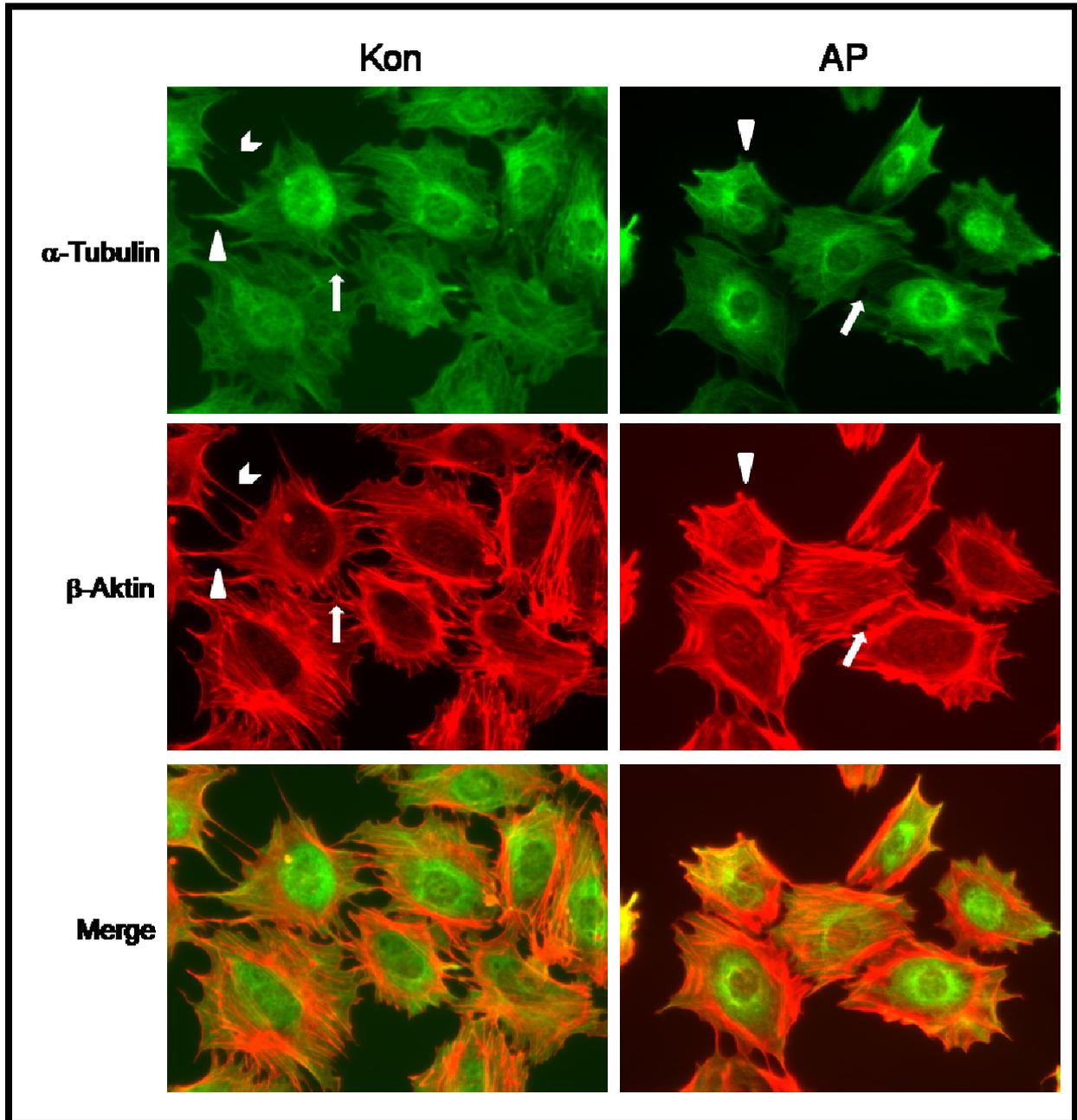


Abbildung 28: Zytoarchitektur der Aktin-, und Tubulin-Filamente im APN-Modell in Zellkultur.

Die Abbildung zeigt die morphologischen Veränderungen differenzierter Maus-Podozyten auf der Ebene des Aktin- und Tubulin Zytoskelettes im APN-Modell in 400-facher Vergrößerung (n = 9). Die Podozyten wurden mit 50 µg/ml des jeweiligen Serums für 24 Stunden inkubiert und jeweils gegen Aktin und Tubulin doppelgefärbt. Die Keile weisen auf die jeweiligen Filamente in den Fortsätzen hin, die Pfeilspitzen markieren Aktinfilamente, die in Fortsätze reichen, welche frei von Tubulin sind. Bereiche von Zell-Zell Kontakten werden durch Pfeile angezeigt.

8.5 Gene-silencing von Spire-1

Aktin- und Tululinfilamente sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung und Stabilisierung der Zellform beteiligt. Aufgrund des morphologischen Umbaus im APN-Modell könnte Spire-1 als aktinnukleierendes Protein sowie Mediatorprotein zwischen Aktin und Tubulinfilamenten eine Rolle spielen. Um die Rolle von Spire-1 im APN-Modell zu analysieren, wurden stabile Spire-1 miRNA Einzelklon Zelllinien hergestellt, in denen die Expression von Spire-1 drastisch verringert sein sollte. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls Einzelklon Zelllinien generiert, die eine für Vertebraten unspezifische miRNA exprimieren.

8.5.1 EmGFP Expression der Spire-1 miRNA Einzelklon Zelllinien

Zur Charakterisierung der einzelnen Spire-1 miRNA Zelllinien wurde zunächst die Podozytenmorphologie und die Expression von Emerald Green Fluorecent Protein (EmGFP) begutachtet. Auf Grund des co-cistronischen Aufbaus der miRNA und des EmGFP Transkripts ist bei Expression des GFP-Reporters auch die Expression der betreffenden miRNA sichergestellt. Ein unauffälliger Phänotyp GFP-positiver Zellen ist dabei Grundvoraussetzung für die weitere Nutzung der entsprechenden Zelllinie. Die Abbildung 29 zeigt repräsentative Phasenkontrastaufnahmen sowie die EmGFP Expression einer Negativkontroll Zelllinie (Klon: Ko 2) und einer Spire-1 miRNA Zelllinie (Klon: 17.1.1).

Beide Zelllinien, weisen keine gravierenden Unterschiede zu normalen, undifferenzierten Podozyten auf und exprimieren in nahezu allen Zellen EmGFP. Alle Voraussetzungen zur weiteren Untersuchung der Spire-1 Genexpression sind somit in diesen Zellen erfüllt.

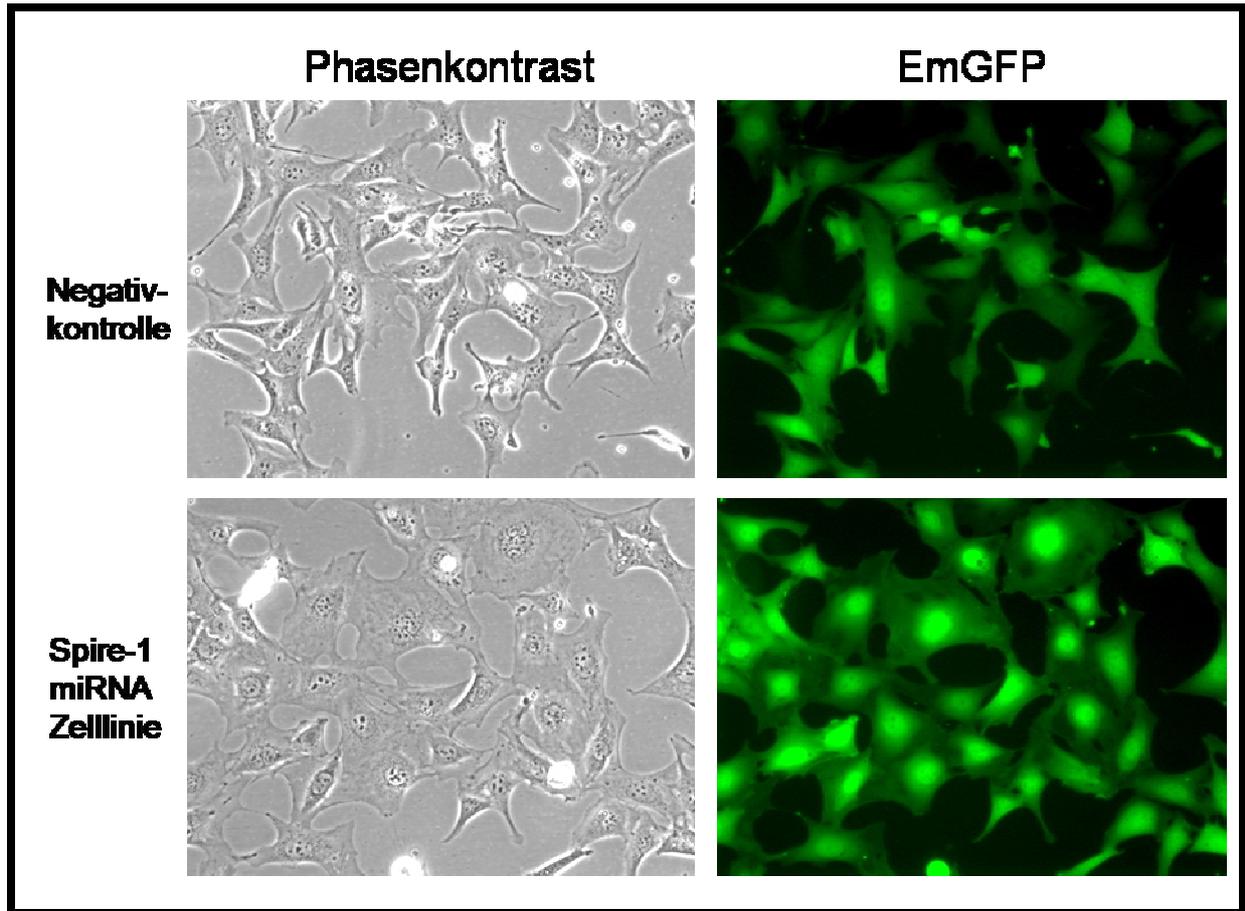


Abbildung 29: Morphologie und EmGFP-Expression der stabil transfizierten Podozyten:

In der Abbildung ist die Morphologie und EmGFP Expression der Spire-1 miRNA Zelllinie gegen die Negativkontrolle in undifferenziertem Zustand zu sehen. Gezeigt sind repräsentativ die Zelllinie 17.1.1 und Ko 2 in 200-facher Vergrößerung. Sowohl die Negativkontrollen als auch die Spire-1 miRNA Klone exprimieren in nahezu jeder Zelle EmGFP.

8.5.2 Gene-silencing

Abbildung 30 zeigt die Spire-1 mRNA Expression der Spire-1 miRNA Zelllinien 17.1.1, 17.1.2, 17.1.3, 17.1.5 und 18.2.2 im Vergleich zu drei stabilen Negativkontrollen Ko 1, Ko 2 und Ko 3. Normiert wurde auf die Negativkontrolle mit der mittleren Spire-1 Expression.

Ergebnisse

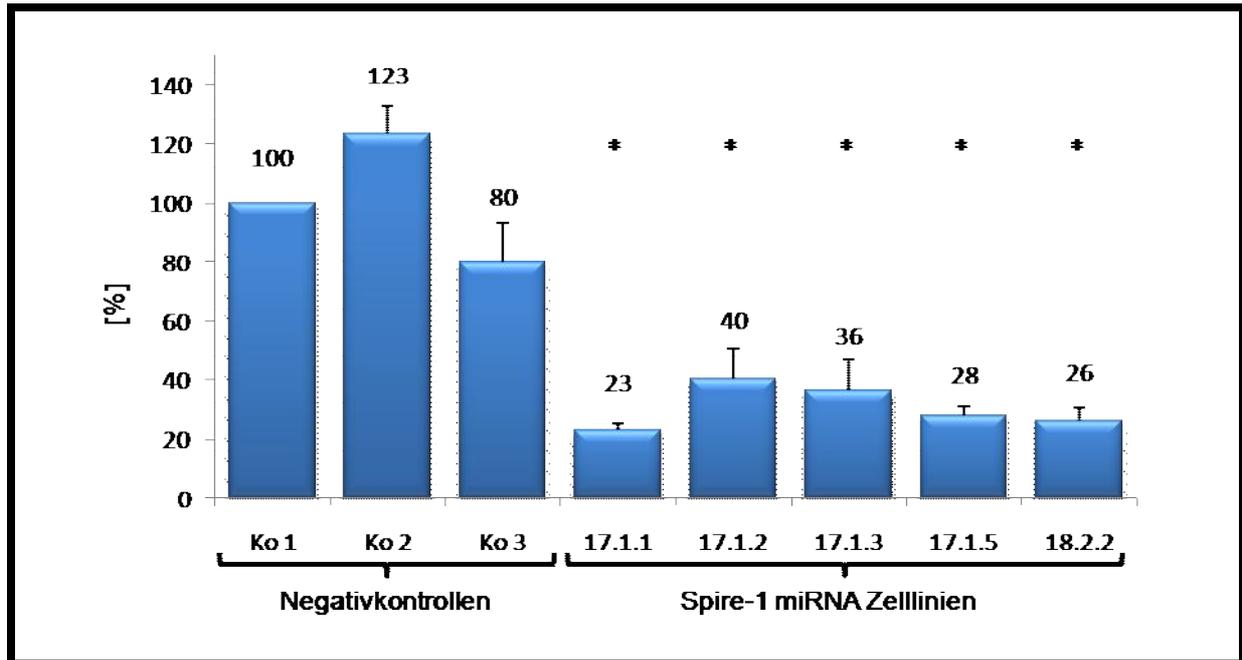


Abbildung 30: Quantitative PCR der stabilen Spire-1 miRNA Zelllinie.

Dargestellt ist die mRNA Expression von Spire-1 in miRNA Zelllinien im Vergleich zu Negativkontroll Zelllinien von Podozyten. Die quantitative PCR wurden in vier unabhängigen Versuchsdurchgängen reproduziert. Alle fünf Zelllinien zeigen eine signifikant verminderte Spire-1 mRNA Expression (*) im Vergleich zu den Negativkontrollen (n = 3 bzw.4).

Obwohl die Negativkontrollen etwas in ihrer Spire-1 Expression variieren, zeigen die Spire-1 miRNA Zelllinien im Vergleich eine signifikante Reduktion der Spire-1 mRNA Expression. Die Expression war in Zelllinie 17.1.1 auf 23 % \pm 2 % ($p < 0,01$); Zelllinie 17.1.2 auf 40 % \pm 11 % ($p < 0,01$); Zelllinie 17.1.3 auf 36 % \pm 10 % ($p < 0,01$); Zelllinie 17.1.5 auf 28 % \pm 3 % ($p < 0,01$) und Zelllinie 18.2.2 auf 26 % \pm 4 % ($p < 0,01$) reduziert.

Die Spire-1 Expression der Klone 17.1.2 und 17.1.3 wurde nicht hinreichend beeinflusst. Deshalb wurden diese Zellklone nicht weiter genutzt. Die folgenden Untersuchungen fanden demnach mit den Einzelklonen Ko 1, Ko 2, Ko 3, 17.1.1, 17.1.5 und 18.2.2 statt.

In Abbildung 31 ist der Immuno-Blots aus Zell Lysaten der Spire-1 miRNA Zelllinien und Negativkontrollen gezeigt. Die Daten stammen aus n = 2 unabhängigen Durchgängen in konsekutiven Wochen.

Der Immuno-Blot gegen Spire-1 detektiert ebenso wie bei dem qualitativen Nachweis von Spire-1 in differenzierten Podozyten, drei prominente Banden deren ungefähre Molekulargewichte bei 95 kDa, 50 kDa und 32 kDa liegen. Die Stärke der drei Banden korreliert in den einzelnen Spuren nicht. Außerdem detektiert der Antikörper wiederum

Ergebnisse

zusätzliche Banden größer 95 kDa. Worum es sich dabei handelt ist nicht geklärt. Im Gegensatz zur RNA-Expression ist bei den putativen Spire-1 Banden von 95 kDa zwischen den Negativkontrollen und den Spire-1 miRNA Zelllinien kein „Knock Down“ festzustellen. Die Banden der Beladungskontrolle sind gleichmäßig.

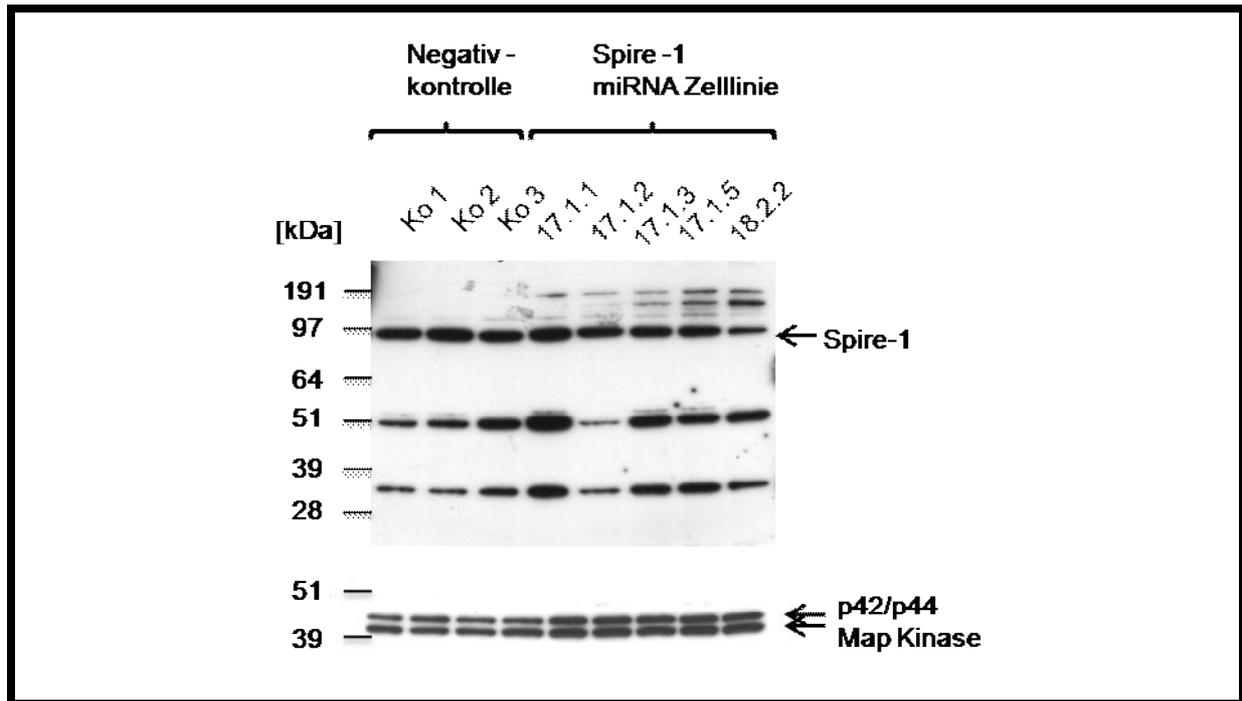


Abbildung 31: Spire-1 Proteinexpression der stabilen Spire-1 miRNA Zelllinien.

Dargestellt ist die Spire-1 Expression in stabil transfizierten Spire-1 miRNA Podozyten im Vergleich zu stabil transfizierten Negativkontrollen auf Protein-Ebene (n = 2) im Immuno-Blot. Keiner der Klone zeigt eine deutliche Abnahme der bei 95 kDa erwarteten Spire-1 Bande im Vergleich zu den Negativkontrollen. Auch in den prominenten Banden bei 50 und ca. 32 kDa ist keine eindeutige Abnahme der Bandenstärke zu sehen.

8.5.3 Morphologische Veränderungen im APN-Modell bei Spire-1 Silencing

Um den Einfluß von Spire-1 im APN-Modell zu analysieren, wurde in ausdifferenzierten Ko 1; Ko 2; Ko 3, 17.1.1; 17.1.5; 18.2.2 und untransfizierten Kontrollpodozyten das APN-Modell induziert. In Abbildung 32 sind die morphologischen Veränderungen im APN-Modell am Beispiel von Ko 2, der Spire-1 miRNA Zelllinie 17.1.1 und untransfizierter Podozyten im Phasenkontakt gezeigt.

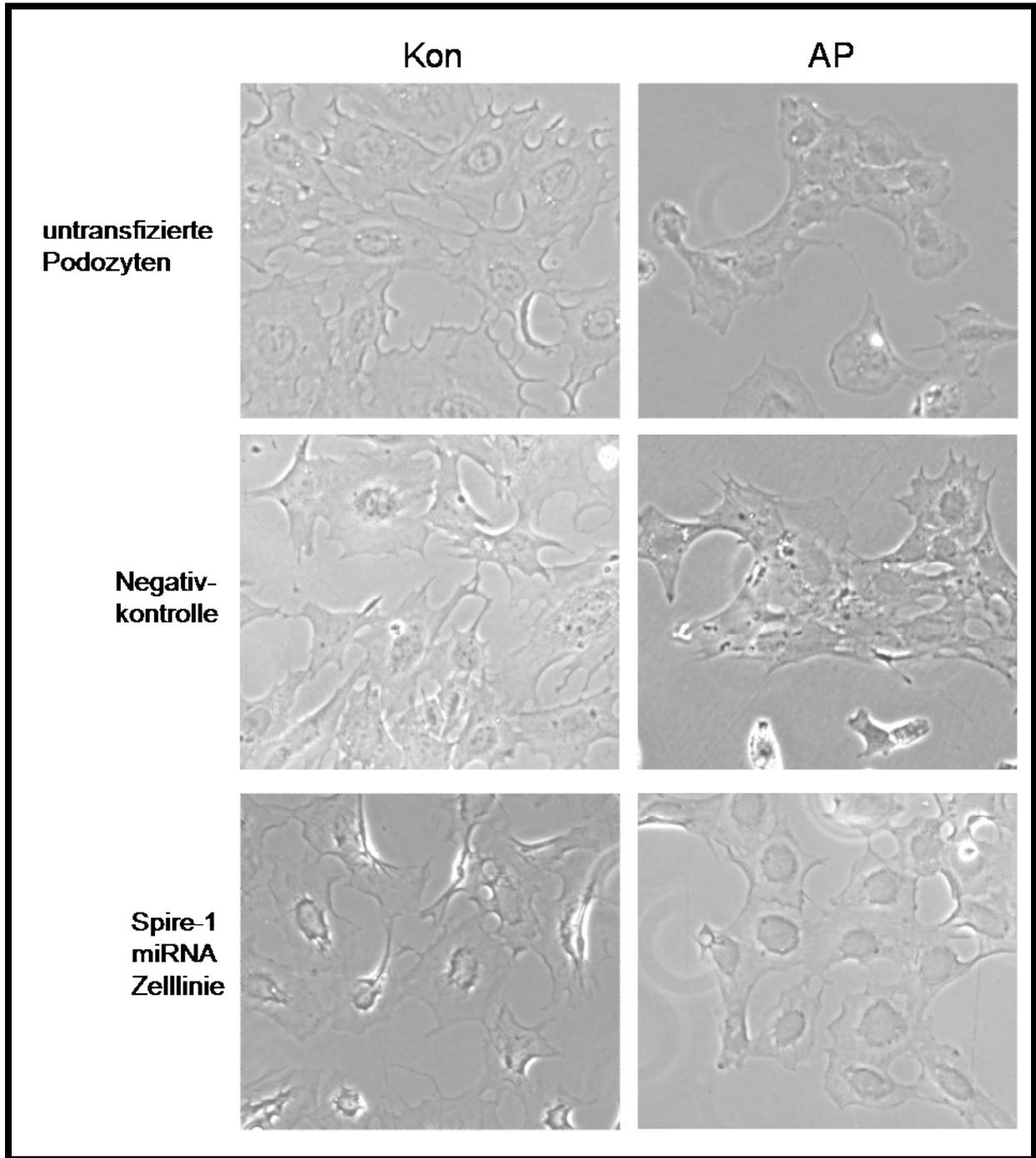


Abbildung 32: Vergleich der morphologischen Veränderungen im APN-Modell.

In der Abbildung sind untransfizierte Podozyten, Negativkontroll- und stabile Spire-1 miRNA Podozyten im APN-Modell in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Die differenzierten Zellen wurden für 24 Stunden mit je 50 µg/ml des entsprechenden Serums inkubiert. Als repräsentatives Beispiel ist die Linie Ko 2 und der Spire-1 miRNA Zelllinie 17.1.1 gezeigt (n = 3).

Untransfizierte Kontroll Podozyten zeigen bei Applikation von Kon-Serum einen für differenzierte Podozyten normalen Phänotyp. Wird AP-Serum appliziert zeigen Kontrollzellen die gewohnten Veränderungen in Form von Fortsatzretraktion und Membranverschmelzung. Weder bei der Negativkontrolle noch bei der Spire-1 miRNA Zelllinie sind Abweichungen zu erkennen. Beide Zelllinien zeigen bei Kon-Serum Gabe einen differenzierten Phänotyp ohne sichtbare Veränderungen gegenüber untransfizierten Kontrollpodozyten. Auch die Veränderungen im APN-Modell sind identisch. Es kommt bei der miRNA Zelllinie weder zur Abschwächung noch zur Verstärkung der Fußfortsatzveränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle.

8.5.4 Zytoskelettale Veränderungen APN-Modell bei Spire-1 Silencing

Der, auf zellulärer Ebene, stattfindende Einfluss des Spire-1 „Knock Downs“ ist im Phasenkontrast möglicherweise nicht zu detektieren. Da Spire-1 als Aktinnukleator und möglicherweise als Tubulin-Aktin Linkerprotein fungiert, wurde eine immunhistochemische Färbung des Aktin und Tubulin Zytoskeletts der miRNA Zelllinien sowie der Negativkontrollen im APN-Modell durchgeführt. Die in Abbildung 33 dargestellten Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen zeigen die morphologische Veränderungen des Aktin- und Tubulinzytoskeletts als Doppelfärbung am Beispiel von Ko 2 und der Spire-1 miRNA Zelllinie 17.1.1.

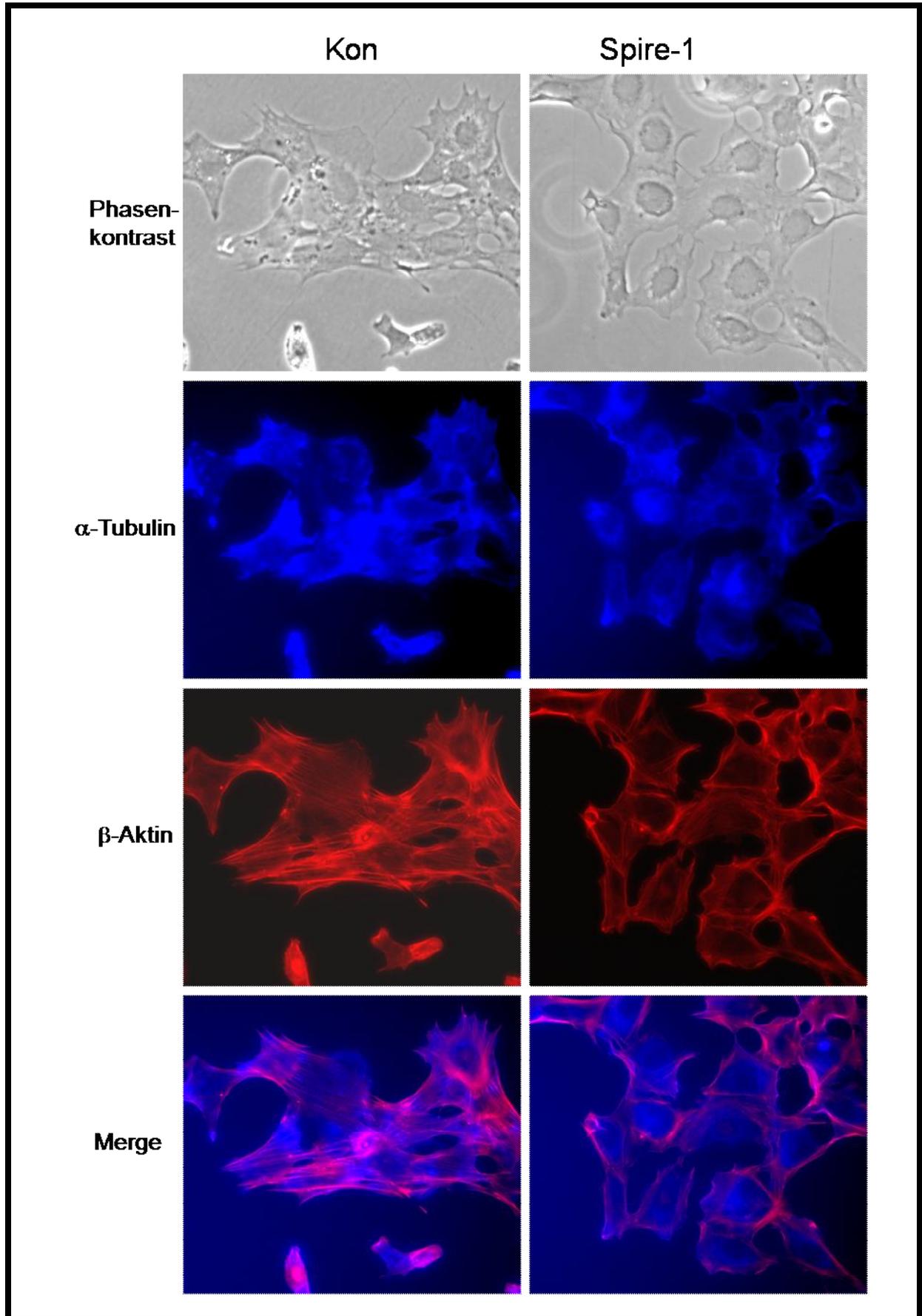


Abbildung 33: Vergleich der zytoskelettalen Veränderungen im APN-Modell.

Dargestellt ist der Vergleich der Zellmorphologie, dem Aktin- und Tubulinzytoskelett zwischen stabilen Spire-1 miRNA Zelllinien und einer Negativkontrolle nach AP-Serum Gabe in 200-facher Vergrößerung (n = 3). Die Serum Inkubation der differenzierten Podozyten erfolgte für 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen für Tubulin und Aktin doppelgefärbt. Gezeigt ist die Zelllinie Ko 2 und Spire-1 miRNA Linie 17.1.1.

Auch in diesen Fluoreszenzaufnahmen ist deutlich zu sehen, dass das AP-Serum zu einer gravierenden Schädigung der Podozyten geführt hat. Die Veränderung ist wiederum vergleichbar mit AP-Serum behandelten normalen differenzierten Podozyten.

Im Falle des tubulären Zytoskeletts sind weder in der Negativkontrolle noch in der Spire-1 miRNA Zelllinie Unterschiede zu den, im Vorfeld beschriebenen, Veränderungen im APN-Modell zu erkennen. Beide Zelllinien reagieren auf das AP-Serum mit Fortsatzretraktion und Membranverschmelzung. Die Verteilung der Mikrotubuli ist dabei gegenüber den untransfizierten Podozyten nicht erkennbar verändert. Insgesamt stellt sich die Färbung der Mikrotubuli nicht so filigran und fein aufgelöst wie in den vorherigen Färbungen dar. Dies liegt nicht an der Struktur der Tubuli selbst, sondern an dem für diese Färbung genutzten Fluorochrom. Da die miRNA Zelllinien zur optischen Visualisierung der Expression co-cistronisch EmGFP auf der miRNA codieren, zeigen diese Zellen per se eine starke grüne Fluoreszenz. Aus diesem Grund musste für diese Färbung auf den blau fluoreszierenden AMCA Farbstoff (7-Amino-4methylcoumarin) zurückgegriffen werden. Dieser neigt zu einer erheblichen Hintergrundfluoreszenz und zeigt eine geringere Auflösung als Fluorescein. Zur Kontrolle wurde die Doppelfärbung ebenfalls an untransfizierten differenzierten Podozyten mit und ohne Schädigung durch AP-Serum sowie den beiden Zelllinien unter Kon-Serum Applikation durchgeführt. Dessen Färbungsergebnisse waren kongruent zu den hier abgebildeten und unterschieden sich nicht von den vorher beschriebenen Phänotypen und Pathologien (Daten nicht gezeigt).

Wie das Tubulussystem zeigt auch das Aktin Zytoskelett im APN-Modell keine sichtbaren Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und der Spire-1 miRNA Zelllinie. Die Veränderungen sind ebenfalls mit gleichbehandelten untransfizierten Podozyten zu vergleichen.

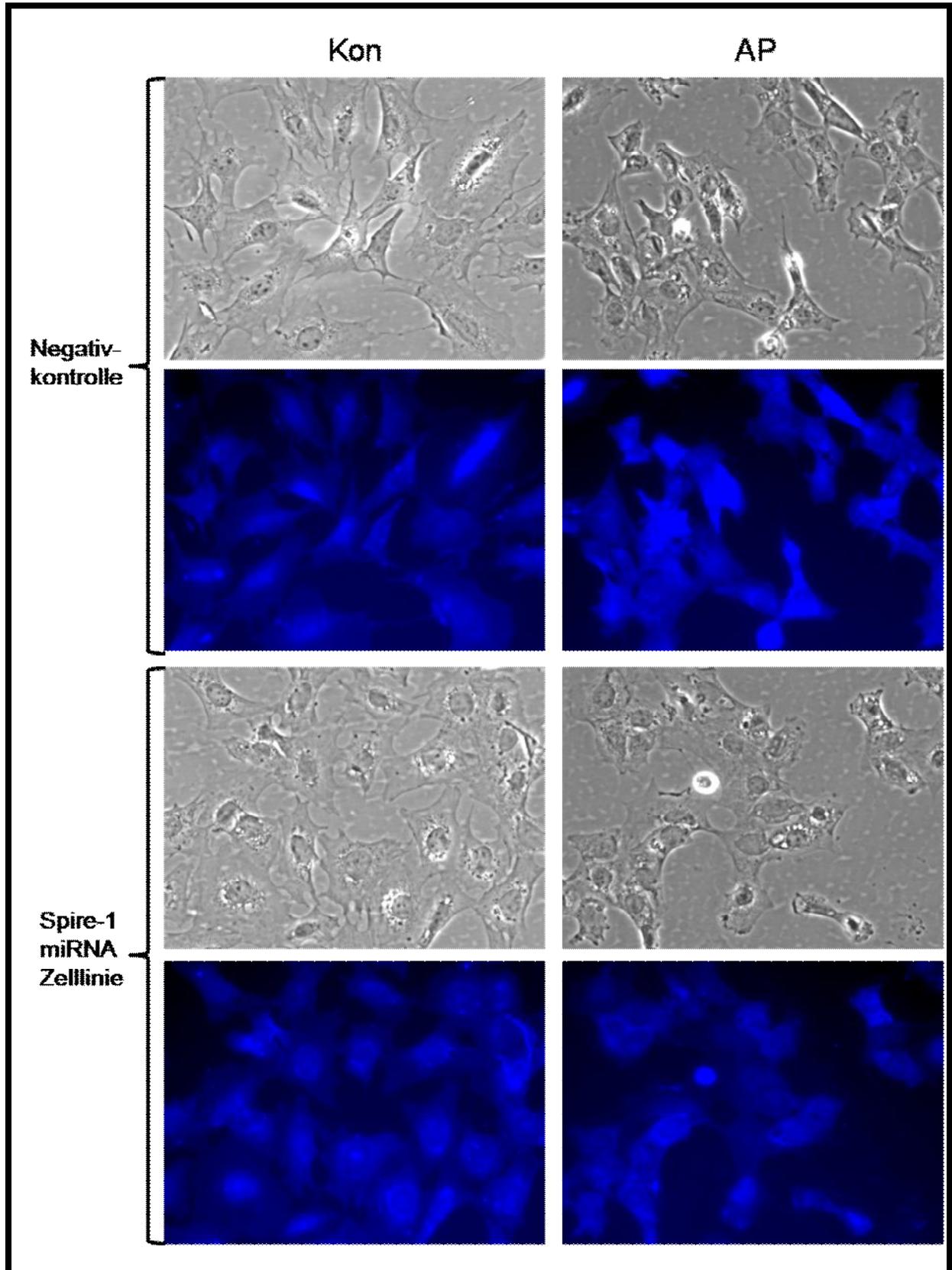
8.5.5 Spire-1 im APN-Modell

Auf Grund der nicht konvergierenden Ergebnisse der quantitativen PCR und der Immunoblots wurde die Spire-1 Expression in den Spire-1 miRNA Zelllinien mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Weiterhin sollte mit dieser Färbung die Verteilung von Spire-1 und dessen mögliche Lokalisationsänderung bei Schädigung im APN-Modell untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde in den-Spire-1 miRNA Zelllinien 17.1.1, 17.1.5 und 18.2.2 sowie den Negativkontrollen Ko 1, Ko 2 und Ko 3 das APN-Modell induziert. Zur Überprüfung des Modells wurde die Zellmorphologie im Phasenkontrast untersucht und die Spire-1 Fluoreszenzfärbung des selben Bildausschnitts dokumentiert. In Abbildung 34 ist repräsentativ Ko 2 und die Spire-1 miRNA Zelllinie 17.1.1 gezeigt.

Die Phasenkontrastbilder zeigen die bereits bekannten, AP-Serum bedingten, morphologischen Veränderungen. Spire-1 weist in der Negativkontrolle sowie der Spire-1 miRNA Zelllinie unter nicht geschädigten Bedingungen eine vesikuläre Verteilung auf, die über das gesamte Zytosoma inklusive der Fortsätze verteilt ist. Der größte Teil des Spire-1 Signals ist deutlich perinukleär lokalisiert. Es sind weder in der Lokalisation noch in der Intensität Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und der Spire-1 Zelllinie unter nicht geschädigten Bedingungen zu erkennen.

Ein identisches Bild zeigt sich im APN-Modell beider Zelllinien mit massiven Schädigungen. Die Verteilung von Spire-1 ist im Vergleich zur Negativkontrolle unverändert. Auch die Intensität der Spire-1 Färbung ist weitgehend unverändert



Ergebnisse

Abbildung 34: Immunohistochemische Färbung von Spire-1 im APN-Modell.

Die Abbildung zeigt den Vergleich der Spire-1 Lokalisation in 200-facher Vergrößerung (n = 2). Verglichen wird die Negativkontrolle mit einer Spire-1 miRNA Zelllinie bei Kon- und AP-Serum Gabe. Zusätzlich sind die morphologischen Veränderungen im Phasenkontrast gezeigt. Die differenzierten Zellen wurden mit 50 µl/ml des jeweiligen Serums für 24 Stunden inkubiert. Die Färbung erfolgte mit einem primären Antikörper gegen Spire-1. Als repräsentatives Beispiel ist die Zelllinie Ko 2 und Spire-1 miRNA Linie 17.1.1 gezeigt.

9 Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der podozytären Schädigung im APN-Modell der Maus. In diesem Modell sollte durch einen neuen, im Schaf generierten, Antiserum eine Glomerulonephritis durch selektive Schädigung der Podozyten induziert werden. Das Funktionsprinzip konnte bereits durch einen in Kaninchen hergestellten Antiserum gezeigt werden (Meyer TN, *et al.*, 2007). Analog zu diesem Modell wurde ein, gegen Proteinlysat aus differenzierten kultivierten Podozyten gerichtetes, polyklonales Antiserum im Schaf erzeugt. Bei Injektion dieses Antiserums in Mäuse sollten die gegen podozytäre Antigene gerichteten Antikörper *in vivo* binden und eine Schädigung der Podozyten hervorrufen. Diese Schädigung sollte im Folgenden zu einer Beeinträchtigung der Filtrationsbarriere und somit einer Proteinurie führen.

Ein Vergleich des AP-Serums mit Kon-Serum zeigte in der Silbernitratfärbung weder qualitative noch quantitative Unterschiede in ihrer Proteinzusammensetzung, wobei es sich bei den ca. 50 und 22 kDa großen Banden um die schwere und leichte Immunglobulin G Kette handelt. Daraus kann geschlußfolgert werden, dass in beiden Seren vergleichbare Mengen Antikörper vorhanden sind, die sich lediglich in ihrer Spezifität unterscheiden. Die Aufkonzentration scheint keinen negativen Einfluß auf beide Seren gehabt zu haben. Für die Induktion der APN wurde daher das, für Mäuse mengenmäßig verträglichere, zweifach aufkonzentrierte Serum genutzt. In allen Zellkulturexperimenten wurde aufgrund der besseren Vergleichbarkeit ebenfalls das aufkonzentrierte Serum benutzt.

Die Spezifität des AP- und Kon-Serums wurde durch einen Immuno-Blot von Protein-Lysat aus differenzierten Podozyten nachgewiesen. Das polyklonale AP-Serum detektierte Antigene verschiedenster Größe und Intensität, während das Kon-Serum bei demselben Proteinlysat auf keinerlei Antigene reagiert. Das AP-Serum enthält folglich eine Vielzahl podozytenspezifischer, bisher nicht näher charakterisierter, Antikörper, die auf Grund der Antigenquelle auch gegen zytosolische und nukleäre Bestandteile gerichtet sind.

Die Präsenz oberflächenspezifischer Antikörper konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung im APN-Modell in Zellkultur nachgewiesen werden. Dabei waren die Podozyten zum Zeitpunkt der Antiserumbindung intakt. Die homogene Färbung der gesamten Zelloberfläche beweist

Diskussion

die Präsenz oberflächenspezifischer Antikörper in diesem Serum. Im Kon-Serum hingegen ist keine Antikörperbindung an podozytäre Oberflächenproteine nachweisbar.

Um die initiale Bindung des AP-Serums in der heterologen Phase *in vivo* darzustellen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen Schaf IgG durchgeführt. Das resultierende Färbemuster schließt eine vaskuläre und mesangiale Ablagerung des AP-Serums weitgehend aus. Es spricht eher für eine spezifische Bindung entlang der glomerulären Filtrationsbarriere, bei der eine podozytäre Bindung, hauptsächlich an subepithelialen Bereichen wahrscheinlich ist. Inwieweit eine Antiserumreaktion gegen Endothelzellen oder gegen die GBM stattfand, kann lichtmikroskopisch nicht aufgelöst werden. Im Vergleich zum AP-Serum ist glomerulär kaum Kon-Serum sichtbar. Dabei handelt es sich um, während des Filtrationsprozesses, unspezifisch glomerulär zirkulierendes Schaf IgG, das nicht mit einer spezifischen Antigenbindung gleichzusetzen ist. Die Abnahme der diffusen Färbung deutet auf ein schnelles Auswaschen der nichtgebundenen unspezifischen Antikörper hin.

Für die genauere Eingrenzung der AP-Serumbindung wurden Immunogoldfärbungen herangezogen. Hauptsächlich werden hier subepitheliale Bereiche und Fußfortsätze von Podozyten gefärbt. Zusätzlich bindet eine große Anzahl von Antikörpern innerhalb der GBM. Ein Großteil der GBM Bestandteile werden von Podozyten gebildet und waren somit auch Bestandteil der, zur Immunisierung, benutzten Antigenquelle. Die Immunogoldfärbung der Kon-Tiere weist analog zur immunhistochemischen Schaf IgG Färbung eine geringe diffuse glomeruläre Verteilung auf. Zusammengefasst sprechen die immunhistochemischen Untersuchungen für ein hochspezifisches AP-Antiserum mit Podozyten als primäres Ziel.

In vergleichbaren Modellen, z.B. der Heymann Nephritis, dauert die heterologe Phase der Erkrankung etwa 4 - 5 Tage (Salant DJ, *et al.*, 1980). Danach sind die zirkulierenden heterologen Antikörper verschwunden. Glomeruläre Ablagerungen von Schaf IgG deuten auf den Beginn der autologen Phase in diesem Modell hin. Die autologe Phase basiert auf einer Immunantwort der Maus gegen den glomerulär fixierten Schafantikörper (Salant DJ und Cybulski AV, 1988; Christiansen R, *et al.*, 2008). Eine vergleichbare Immunantwort im APN-Modell in Form einer glomerulären Maus-IgG Bindung (Tag 9) war deshalb zu erwarten. Das im Vergleich zur Schaf IgG breitere Ablagerungsmuster könnte ein Hinweis auf eine Verbreiterung der GBM sein wie sie ebenfalls in der Heymann Nephritis der Ratte und der experimentellen, membranösen Nephropathie der Maus beobachtet werden kann (Couser WG, 2005; Wu CC, *et al.*,

Diskussion

2008). Areale in denen das Maus IgG diffus abgelagert wird, deuten auf eine bereits fortgeschrittene Zerstörung der Filtrationsbarriere in diesen Bereichen hin. Bei Kon-Tieren hingegen war keine Immunantwort auf das diffus zirkulierende Schaf IgG nachzuweisen. Dieser Befund unterstreicht die vorher diskutierte unspezifische Zirkulation des Kon-Serums, auf die offensichtlich keine autologe Immunreaktion erfolgt.

Je geschädigter die glomeruläre Filtrationsbarriere ist, desto mehr Proteine gelangen in den Primäharn. Somit dient die Proteinurie als Maß der renalen Schädigung (Remuzzi G, *et al.*, 1993). In AP-Tieren war die Nierenfunktion stark beeinträchtigt. Die meisten AP-Tiere entwickelten ab Tag 5 nach Injektion eine schwere Proteinurie mit progressivem Verlauf. Bei dieser Proteinurie handelt es sich um eine Albuminurie. Eine Ausscheidung höhermolekularer Proteine wie z.B. IgG konnte im Goomassie gefärbten Gel nicht nachgewiesen werden. Insgesamt ist die starke Erhöhung der Proteinurie nicht signifikant. Dies resultiert aus der großen Heterogenität des APN-Modells innerhalb der Tiere. Zehn der ausgewerteten AP-Tiere entwickelten bis zum ausgewerteten Zeitpunkt (Tag7/8) keinerlei Proteinurie. Sechs von diesen Tieren zeigten außerhalb des betrachteten Zeitraumes nach Tag zehn im Multistix ebenfalls eine starke Proteinurie. Eine hohe Heterogenität ist ein Problem vieler experimentellen Nephropathien. In Zukunft sollte daher versucht werden diese Heterogenität durch Optimieren der Induktionprotokolle zu reduzieren. Denkbar wäre eine Reduzierung der Antiserummenge mit einer Verlängerung der Krankheitsdauer. Ein weiterer vielversprechender Ansatz könnte eine zweifache Injektion an konsekutiven Tagen mit verminderter Serummenge sein.

Die Schädigung der Glomeruli wurde mittels PAS-Färbung dargestellt. Im Vergleich zu den Kon-Tieren wurde bei AP-Tieren an Tag 9 eine starke Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere in Form starker Einlagerungen PAS positiven Materials beobachtet. Über die genaue Zusammensetzung dieser Einlagerungen kann hier nur spekuliert werden. Möglich ist neben einer Verbreiterung der PAS positiven mesangialen Matrix möglicherweise eine Einlagerung von Trümmern lysierter Zellen im Glomerulum. In verschiedenen humanen Glomerulonephritiden sind auch Ablagerungen aus IgG und IgM nachgewiesen. Diese könnten sich als PAS positive Immunkomplexe im glomerulären Gewebe darstellen (Wahlefeld J, 2006). Weiterhin konnte in stark geschädigten Glomeruli ein Verlust von Zellen innerhalb des Glomerulus verzeichnet werden. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um

Diskussion

geschädigte Podozyten, welche sich von der GBM abgelöst haben und über den Urin ausgeschieden wurden. Dieses sogenannte Detachment von Podozyten wurde bereits in der Heymann Nephritis, aber auch der idiopathischen fokalen Glomerulosklerose und dem Minimal Change Nephrotischen Syndrom beim Menschen beschrieben (Petermann AT, et al., 2003; Schneeberger EE, et al., 1974; Nakamura T, et al., 2000). Auch im Kaninchen-APN-Modell konnte ein Podozytenverlust nachgewiesen werden (Wahlefeld J, 2006; Meyer TN, et al., 2007). Im Gegensatz zur Focal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und membranproliferative GN erschienen die glomerulären Veränderungen fokal aber weniger segmental und es wurde im APN-Modell keine Bildung von Halbmonden beobachtet.

Bei einsetzender Proteinurie an Tag 7 zeigt die AP-Antikörperbindung in der Immunogold-Färbung das gleiche Ablagerungsmuster wie an Tag 1. Es stellt sich hauptsächlich membranös und an podozytären Fußfortsätzen dar. Bei den AP-Tieren passt die einsetzende Proteinurie zu den beginnenden morphologischen Veränderungen, die durch Fußfortsatzabflachungen und Verschmelzungen gekennzeichnet sind. Bis Tag 13/14 nimmt das Ausmaß dieser morphologischen Veränderungen bis hin zu völligen Verschmelzungen und der Zerstörung der Schlitzmembran kontinuierlich zu. Weiterhin zeigen sich subepitheliale elektronendichte Depots. Die Zusammensetzung dieser Depots wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Immunkomplexe wie sie für das Stadium I einer membranösen Glomerulonephritis charakteristisch sind (Nangaku M, et al., 2005; Couser WG, 2005; Couser WG, 1998; Salant DJ, Darby C und Couser WG; 1980; Couser WG und Salant DJ, 1980; Salant DJ und Cybulski AV, 1988; Kerjaschki D, et al., 1987; Thomas C, 1998). Eine Ausbildung von, für diese Nephropathie typischen, membranösen Ausziehungen der GBM (Spikes) waren allerdings weder in der PAS-Färbung noch in den EM Aufnahmen zu finden.

Neben podozytären Schädigungen finden Veränderungen in weiteren glomerulären Kompartimenten statt. Es ist zu fokalen Verdickungen der GBM gekommen. GBM Veränderungen in dieser Form können ebenfalls in späteren Stadien der membranösen Glomerulonephritis beobachtet werden. Auch das Mesangium ist im späten Krankheitsstadium betroffen. Es erscheint stark sklerosiert. Der Einfluß einer hochwahrscheinlichen Entzündungsreaktion auf den Verlauf der Erkrankung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bewertet, da der Schwerpunkt auf dem mechanischen Umbau

Diskussion

der Podozyten lag. Wahrscheinliche Chemokinexpression mit folgender Entzündungszellinfiltration sind Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse lässt sich jedoch postulieren, dass die initiale glomeruläre Schädigung primär am Podozyten erfolgt. Über welche intrazellulären Mechanismen dieser podozytäre Umbau reguliert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Aufgrund des polyklonalen Serums können viele Epitope von Oberflächenproteinen bei der Induktion der Schädigung eine Rolle spielen. Die podozytäre Schädigung in diesem Modell ist so gravierend, dass es im Verlauf der Erkrankung zu einer Vielzahl an sekundären Effekten kommt. So waren nahezu alle APN Tiere um Tag 13 massiv erkrankt. Deshalb wurde sich in dieser Arbeit ausschließlich auf das frühe Induktionsstadium der Erkrankung fokussiert, wo die Proteinurie primär auf die Verschmelzung der Fußfortsätze zurückzuführen ist. Zur Untersuchung späterer Krankheitsstadien muß zukünftig das bestehende Krankheitsmodell weiter verfeinert werden, um unerwünschte Sekundäreffekte zu minimieren.

Die Architektur der Podozyten wird hauptsächlich durch Aktin- und Tubulinfilamente getragen (Drenckhahn D und Franke RP, 1988; Pavenstädt H, *et al.*, 2003; Kobayashi N, *et al.*, 1998; Andrews PM, 1977; Kobayashi N, *et al.*, 2001; Kobayashi N und Mundel P, 1997). Diese müssen bei Fußfortsatzverschmelzung im Verlauf der APN massiv umgebaut werden.

Spire-1 ist bei der Nukleation von Aktin (Quinlan ME, *et al.*, 2005; Kerkhoff E, 2006; Qualmann B und Kessels MM, 2009; Bosch M, *et al.*, 2007; Rebowski G *et al.*, 2008) und der Verbindung von Aktin- und Tubulinfilamenten involviert (Wang Y und Riechmann V, 2008; Rosales-Nieves AE, *et al.*, 2006; Dahlgaard K, *et al.*, 2007; Qualmann B und Kessels MM, 2009). Weiterhin konnte in Mäusen eine Spire-1 Expression in neuronalen Zellen nachgewiesen werden (Schuhmacher N, *et al.*, 2004). Diese Zellen weisen eine vergleichbar komplexe Zytoarchitektur wie Podozyten auf (Kobayashi N und Mundel P, 1997). Obwohl bisher in der Niere keine Spire-1 Expression postuliert wurde (Schuhmacher N, *et al.*, 2003), war eine Expression von Spire-1 in Podozyten aufgrund seiner Funktionen hoch wahrscheinlich. Tatsächlich konnte die Expression von Spire-1 mRNA erstmalig in Gesamtniere, isolierten Glomeruli und differenzierten kultivierten Podozyten nachgewiesen werden. Ob weitere renale Zellen und in welchem Umfang Spire-1 in anderen Nierenkompartimenten exprimiert wird, wurde hier nicht weiter untersucht und kann daher nicht näher spezifiziert werden. Differenzierte Podozyten in Kultur zeigten eine deutlich geringere Spire-1 RNA Expression. Da es sich dabei jedoch um immortalisierte Podozyten

Diskussion

handelt, kann daraus nicht direkt auf die podozytäre Spire-1 Expression *in vivo* geschlossen werden.

Die mögliche Beteiligung von Spire-1 in der APN wurde durch immunhistochemische Färbung auf Nierenschnitten untersucht. Verwendet wurde dabei derselbe Antikörper wie im Western Blot. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen innerhalb der Glomeruli sowohl in den Kon-Tieren als auch in den AP-Tieren eine überwiegend podozytäre Spire-1 Färbung, wobei Spire-1 in der APN deutlich erhöht exprimiert wird. Eine Beteiligung von Spire-1 im Laufe einer APN und der damit einhergehenden zytoskelettalen Veränderungen im Podozyten ist somit denkbar.

Für genauere Untersuchungen der Spire-1 Funktion ist das APN-Modell in der Maus sehr limitiert. Einerseits ist der genaue Krankheitsverlauf des Modells nicht vollständig etabliert und das Modell selbst sehr heterogen. Andererseits ist ein Verlust von Podozyten während der Erkrankung hoch wahrscheinlich und limitiert dadurch nähere Untersuchungen an geschädigten Podozyten. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein podozytäres Zellkultur AP-Modell etabliert, um daran krankheitsbedingte zytoskelettale Frühveränderungen und die Rolle von Spire-1 an diesen Prozessen funktionell zu untersuchen. Dazu wurden immortalisierte Podozyten verwendet, die unter permissiven Bedingungen propagiert werden können und unter nicht permissiven Bedingungen ausdifferenzieren. Diese Zellen sind sehr gut beschrieben und exprimieren eine Vielzahl podozytärer Markerproteine. Weiterhin weisen sie im ausdifferenzierten Zustand einen arborisierten Phänotyp mit multiplen Fortsätzen aus (Krttil J, *et al.*, 2007; Shankland *et al.*, 2007; Mundel P, *et al.*, 1997; Schiwiek D, *et al.*, 2004; Wahlefeld J, 2007).

In Gegenwart von AP-Serum kam es, dosisabhängig, zu einer veränderten Podozytenmorphologie, die lichtmikroskopisch sehr gut zu erkennen war. Die Zellfortsätze waren in Länge und Anzahl massiv reduziert und in den meisten Bereichen waren die filigranen Zell-Zell Kontakte zerstört, sodass die Zellmembranen dort direkt aneinander lagen. Das verwendete Kon-Serum zeigte wie *in vivo* keinen Effekt.

Die AP-Serum bedingte Retraktion der Fortsätze ist auf zytoskelettaler Ebene nachzuvollziehen. Dabei wurden die Aktinfilamente bis zum kortikalen Netzwerk zurückgezogen. Auffällige Veränderungen sind weiterhin in Bereichen der Zell-Zell Kontakte zu finden. In vielen dieser Areale kommt es zu einer Retraktion der Mikrotubuli, wogegen die

Diskussion

Aktinfilamente verstärkt erscheinen. Das in differenzierten Podozyten kortikale Netzwerk benachbarter Zellen liegt an Zell-Zell Kontakten unmittelbar aneinander. Fortsätze in denen ausschließlich Aktinfilamente die stabilisierende Struktur bilden sind nach AP-Serum Applikation nicht mehr zu finden. Über die zugrunde liegenden Mechanismen kann bisher nur spekuliert werden. Es scheint allerdings starke Unterschiede zu bereits untersuchten Modellen zu geben.

Im LPS (Lipopolysaccharid) Modell kommt es zu einer, über den Toll Like Rezeptor 4 (TLR4) vermittelten, Rho Kinase abhängigen Stressfaserinduktion. In Swiss 3T3 Zellen konnte gezeigt werden, dass Stressfasern häufig an einer aktinreichen Region beginnen und von dieser radial über das gesamte Zellsoma verlaufen (Amao M, *et al.*, 1997). Vergleichbare über das gesamte Zellsoma verlaufende Stressfasern konnten auch in den hier verwendetet Podozyten durch LPS Gabe induziert werden (Daten nicht gezeigt). Eine ähnliche Rho Kinase abhängige Stressfaserbildung konnte bei immortalisierten Podozyten ebenfalls durch mechanischen Stress ausgelöst werden (Endlich N, *et al.*, 2001). AP-Serum behandelte Podozyten zeigen allerdings keine solche Stressfaserbildung. Sie sind vielmehr ebenso wie die Kon-Podozyten, weitgehend frei von im Zellkörper lokalisierten Stressfasern. Die Veränderungen des Aktinzytoskeletts sind vielmehr auf die Fortsätze beschränkt. Inwieweit Rho Kinasen beim Umbau der Aktinfilamente in den Fortsätzen involviert sind und es zur lokalen Stressfaserbildung in Fortsätzen kommt bleibt zu untersuchen.

Bei vielen Nephropathien wird eine Dedifferenzierung der Podozyten vermutet (Shankland SJ, 2006). Naive Podozyten sind terminal differenziert und ruhen in der G₀-Phase des Zellzykluses. Hinweise deuten darauf hin, dass geschädigte Podozyten in der Lage sind in den Zellzyklus wieder einzutreten (Marshall CB und Shankland SJ, 2007), wodurch es beispielsweise bei der HIV induzierten Nephropathie (Barisoni L, *et al.*, 1999) sowie der zellulären Variante der Focal Segmentalen Glomerulosklerose (D'Agati V, 1994) zur Podozytenproliferation kommt. Bei der klassischen Focal Segmentalen Glomerulosklerose hingegen kommt es zur Podozytenhypertrophie (Shankland SJ, 2006) und bei der PA Nephritis (Marshall CB, *et al.*, 2006; Marshall CB und Shankland SJ, 2007, Shankland 2006)) zu apoptotischen und nekrotischen Veränderungen der Podozyten. Welche möglichen Veränderungen im APN-Modell bedeutsam sind, bleibt zu untersuchen.

Diskussion

Vitalitätsuntersuchungen am AP-Modell bei kultivierten differenzierten Podozyten zeigen gegenüber Kon-Serum behandelten und unbehandelten differenzierten Podozyten eine nur unwesentlich verminderte Vitalität „AP-kranker“ Podozyten. Dieser Befund unterstreicht die Tauglichkeit des hier etablierten *in vitro* Modells. Es wird tatsächlich Morbidität und nicht Mortalität untersucht.

Somit konnte ein, auf kultivierten Podozyten basierendes, Krankheitsmodell etabliert werden, das die frühen podozytären Veränderungen in der AP-Nephritis erstaunlich präzise abbildet. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Gernerierung eines neuen immunvermittelten Krankheitsmodells mit Analogien einer membranösen Nephropathie in der Maus und einem korrespondierenden Zellkulturmodell. Dadurch wird es in Zukunft möglich sein podozytäre Schädigungen parallel an zwei vergleichbaren Modellen zu untersuchen. Weiterhin lassen sich am AP-Modell *in vitro* funktionelle Untersuchungen durchführen, die an einem komplexen *in vivo* Modell methodisch nur sehr schwer oder nicht durchzuführen sind.

Eine wichtige funktionelle Untersuchung am AP-Modell *in vitro* ist die mögliche Beteiligung des Aktinnukleators Spire-1 bei den beobachteten zytoskelettalen Umbauprozessen im Podozyten während der AP-Nephritis. Mit Hilfe der miRNA Technologie wurden dazu stabile miRNA Einzelzelllinien generiert, die eine um etwa 75 % verringerte Spire-1 RNA-Expression gegenüber den verwendeten Kontroll Zelllinien aufwiesen. Die Herunterregulation der Spire-1 mRNA konnte dabei in vier konsekutiven Wochen mit hoher Reproduzierbarkeit bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte auf Proteinebene kein nennenswerter Spire-1 Knock Down nachgewiesen werden. Der zur Zeit einzig verfügbare Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Eugen Kerkhoff, Universität Regensburg) ist gegen das 16 Aminosäuren lange Peptid des murinen Spire-1 C-Terminus der Sequenz: AGPSEYCPSSERTINEI gerichtet. Dieser Antikörper detektiert im Immunoblot mehrere Proteine, deren Molekulargewichte etwa 95 kDa, 50 kDa und 32 kDa entsprechen. *Schuhmacher* (2003) und *Hilgert* (2007) beschreiben die 95 kDa Bande als spezifisch, die Banden bei 50 kDa und 32 kDa hingegen als unspezifisch. In der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ist für Spire-1 eine Proteingröße von 643 Aminosäuren veröffentlicht, was in etwa einem Molekulargewicht von ca. 74 kDa entsprechen würde. Somit wäre die

Diskussion

Differenz zwischen der veröffentlichten spezifischer Spire-1 Größe und putativem Aminosäuregewicht von etwa 21 kDa auf posttranslationelle Modifikation zurückzuführen. Typische Modifikationen intrazellulärer Proteine wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen oder Prenylierungen können den großen Unterschied im Molekulargewicht ebenso wie Mono- oder Polyubiquitinierung kaum erklären. In der Literatur wird die Größendiskrepanz durch eine unvollständig bekannte Spire-1 Sequenz erklärt, von der bisher der N-Terminus nicht vollständig bekannt ist (Hilgert S, 2007). Dagegen spricht die nicht nachweisbare Herunterregulation der vermeintlich spezifischen Signale im Immunoblot und Immunfluoreszenz bei stabilen Spire-1 miRNA Einzelzelllinien. Die Erzeugung stabiler miRNA Einzelzellklone beansprucht einige Wochen. Aus diesem Grund ist ein unbeeinflusster Spire-1 Proteinspiegel bei gleichzeitig eindeutig reduzierter mRNA Expression kaum vorstellbar. Die hier präsentierten Daten belegen demnach, dass der hier benutzte Spire-1 Antikörper nicht geeignet ist murines Spire-1 zweifelsfrei in den hier angewandten experimentellen Ansätzen darzustellen. Alle durch Immunoblot oder Immunfluoreszenz durchgeführten Proteinanalysen zu Spire-1 sind deshalb mit äußerster Vorsicht zu bewerten. Klarheit könnte die Untersuchung einer konstitutiven Spire-1 Knock Out Maus bringen. Eine solche Maus wird derzeit generiert und voraussichtlich in absehbarer Zukunft verfügbar sein.

Im Vergleich zu Kontroll-Zelllinien zeigte keine der Spire-1 miRNA Einzelzelllinien phänotypische Unterschiede. Wird bei diesen Zelllinien das AP-Modell induziert, waren ebenfalls keine Veränderungen sichtbar. Die Verteilung und Organisation beider Filamentsysteme bleibt durch die Reduktion der Spire-1 Genexpression unbeeinflusst. Der Aktinnukleator Spire1 spielt somit bei den hier beobachteten zytoskelettalen Umbauprozessen im AP-Modell keine wesentliche Rolle. Inwieweit andere Aktinnukleatoren wie beispielsweise Formine und ARP2/3 bei den beobachteten Umbauprozessen von Bedeutung sein könnten ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Nierenkörperchens.	13
Abbildung 2: Integrales Zytoskelett der Podozytenfortsätze.	18
Abbildung 3: Struktur von Spire-Proteinen.....	19
Abbildung 5: Mechanismus der Aktinnukleation durch Spire Proteine.....	20
Abbildung 4: Podozytäre Fußfortsatzarchitektur mit und ohne Schädigung.	22
Abbildung 5: Herstellung des Serums für die APN.	40
Abbildung 6: Multiple Cloning Site und Recombination Region des pcDNA™6.2-GW/± EmGFP- miR Vektors.....	61
Abbildung 7: Karte und Funktionen der miRNA Expressionsvektoren und des Negativkontrollvektors.....	64
Abbildung 8: Vergleich der Schafseren.....	67
Abbildung 9: Bindungsmuster beider Schafseren auf Podozyten-Lysat.	68
Abbildung 10: Bindung von Schaf-IgG in Glomeruli zu verschiedenen Zeitpunkten.....	70
Abbildung 11: Immunogold-Färbung von Schaf IgG im Glomerulum an Tag 1.....	72
Abbildung 12: Bindung von Maus-IgG.....	73
Abbildung 13: Nierenfunktion.	74
Abbildung 14: Proteinurieverlauf im APN Modell.	75
Abbildung 15: Schädigung des Glomerulus in der APN.....	76
Abbildung 16: Quantifizierung glomerulärer Schäden in der APN.....	78
Abbildung 17: Immunogold-Färbung von Schaf IgG im Glomerulum an Tag 7.....	79
Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Glomeruli Tag 13 und 15.....	81
Abbildung 19: mRNA-Nachweis von Spire-1 in der Mausniere.	82
Abbildung 20: Protein-Nachweis von Spire-1 in der Mausniere.	83
Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von Spire-1 in der Mausniere im APN- Modell.....	84
Abbildung 22: Morphologie von kultivierten Maus-Podozyten.	86
Abbildung 23: Dosis-Wirkungs-Kurve FCS Konzentration.	88
Abbildung 24: Dosis-Wirkungs-Kurve AP-Serum Konzentration.	90
Abbildung 25: Antigenbindung der Seren auf differenzierten Podozyten.	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Vitalitäts-Assay nach AP-Serum Gabe in Zellkultur.....	93
Abbildung 27: Podozyten-Morphologie, Tubulin-, und Aktin-Filamentarchitektur im APN- Modell in Zellkultur.....	96
Abbildung 28: Zytoarchitektur der Aktin-, und Tubulin-Filamente im APN-Modell in Zellkultur.....	97
Abbildung 29: Morphologie und EmGFP-Expression der stabil transfizierten Podozyten:	99
Abbildung 30: Quantitative PCR der stabilen Spire-1 miRNA Zelllinie.....	100
Abbildung 31: Spire-1 Proteinexpression der stabilen Spire-1 miRNA Zelllinien.....	101
Abbildung 32: Vergleich der morphologischen Veränderungen im APN-Modell.....	102
Abbildung 33: Vergleich der zytoskelettalen Veränderungen im APN-Modell.	105
Abbildung 34: Immunohistochemische Färbung von Spire-1 im APN-Modell.	108

11 Literaturverzeichnis

- Adler S**, Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors, *Am J Pathol* (1992) 141(3): p. 571-8.
- Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K**, Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase, *Science* (1997) 275(5304):1308-11
- Anders HJ, and Schlöndorf D**, Murin Models of Renal Disease Possibilities and Problems in Studies using Mutant Mice, *Exp Nephrol* (2008) 8:181-193
- Andrews PM**, Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus, *Kidney Int* (1981) 20:549–562
- Andrews PM**, Scanning electron microscopy of the nephrotic kidney, *Virchows Arch B Cell Pathol* (1975) 17:195–211
- Andrews PM**, The effect of vinblastine-induced microtubule loss on kidney podocyte Morphology, *Am J Anat* (1977) 150:53–61.
- Asanuma K and Mundel P**, The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* (2003) 7(4): p. 255-9
- Assmann KJ, Tangelder MM, Lange WP, Schrijver G, Koene RA**, Anti-GBM nephritis in the mouse: Severe proteinuria in the heterologous phase, *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* (1985) 406:285-299
- Barisoni L, Kriz W, Mundel P and D'Agati V**, The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy, *J Am Soc Nephrol* (1999) 10:51-61
- Bosch M, et al.**, Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profiling, *Mol Cell* (2007) 28:555–568
- Christiansen R, et al.**, Glomerular charge barrier and development of proteinuria in passive Heymann nephritis, *Kidney Blood Press Res* (2008) 31:203-209
- Ciccarelli F D, Bork P and Kerkhoff E**, The KIND module: a putative signalling domain evolved from the C lobe of the protein kinase fold, *Trends Biochem Sci* (2003) 28:349-52

- Cleveland DW and Sullivan KF**, Molecular biology and genetics of tubulin, *Annu Rev Biochem* (1985) 54:331-65
- Couser WG**, Glomerulonephritis, *The Lancet* (1999) 353:1509-1515,
- Couser WG**, Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis, *Nephrol Dial Transplant* (1998) 13:10-15
- Couser WG**, Membranous nephropathy: a long road but well traveled, *J Am Soc Nephrol* (2005) 16:1184-1187
- Couser WG and Salant DJ**, In situ immune complex formation and glomerular injury, *Kidney Int* (1980) 17:1-13
- D'Agati V**, The many masks of focal segmental glomerulosclerosis, *Kidney Int* (1994) 46:1223-1241
- Dahlgaard K, et al.**, Capu and Spire assemble a cytoplasmic actin mesh that maintains microtubule organization in the Drosophila oocyte, *Dev. Cell* (2007) 13:539-553
- Drenckhahn D and Franke RP**, Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat and man, *Lab Invest* (1988) 59:673-682
- Edgington TS, Glasscock RJ and Dixon FJ**, 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
- Endlich N, et al.**, Podocytes Respond to Mechanical Stress in Vitro, *J Am Soc Nephrol* , (2001) 12:413-422
- Endlich K, Kriz W and Witzgall R**, Update in podocyte biology, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2001) 10(3):p.331-40.
- Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K and Mundel P**, Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton, *TRENDS in Cell Biology* (2007) 17 No.9:428-437
- Farquhar MG, Vernier RL, and Good RA**, An electron microscopic study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis and lupus erythematosus, *J Exp Med* (1957) 106:649-660
- Fervenza FC, et al.**, Idiopathic Membranous Nephropathy: Diagnosis and Treatment, *Clin J Am Soc Nephrol* (2008) 3:905-919

- Glassock RJ**, Diagnosis and natural course of membranous nephropathy, *Semin Nephrol* (2003) 23:324-332
- Haimo LT**, Dynein decoration of microtubules: determination of polarity, *Methods Cell Biol* (1982) 24:189-205
- Hamano Y, et al.**, Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus, *J Biol Chem* (2002) 277:31154-31162,
- Heidemann SR**, Microtubule polarity determination based on formation of protofilament hooks, *Methods Enzymol* (1991) 196:469-477
- Heymann W, et al.**, Production of the nephritic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions, *Proc Soc Exp Biol Med* (1959) 100:660-64
- Hilgert S**, Dissertationsarbeit, Interaktion zweier mechanistisch unterschiedlicher Aktinnukleatoren – Spir und Cappuccino, Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, (2007)
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W and Kabsch W**, Atomic model of the actin filament. *Nature* (1990) 347:21-2
- Huang TW and Langlois JC**, Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium, *J Exp Med* (1985) 162:245-267
- Huber TB, Molekulare Pathogenese der Proteinurie**, *Dtsch Med Wochenschr* (2008) 133:954- 958
- Huxley HE**, Muscular contraction and cell motility, *Nature* (1973) 243:445-9
- Ichimura K, Kurihara H and Sakai T**, Actin filament organization of foot processes in rat podocytes, *J Histochem Cytochem* (2003) 51:1589-1600,
- Ishizaki M, Masuda Y, Fukuda Y, Sugisaki Y, Yamanaka N and Masugi Y**, Experimental mesangioproliferative glomerulonephritis in rats induced by intravenous administration of anti-thymocyte serum, *Acta Pathol Jpn* (1986) 36(8):1191-203
- Jat S, et al.**, Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an *H-2K^b-tsA58* transgenic mouse, *Proc Natl Acad Sci* (1991) 88:5096-5100
- Joshi HC and Cleveland DW**, Diversity among tubulin subunits: toward what functional end? *Cell Motil Cytoskeleton* (1990) 16:159-63
- Kerkhoff E, et al.**, The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes *Curr Biol* (2001) 11:1963-8

- Kerkhoff E**, Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors, *Trends in Cell Biology* (2006) Vol.16 No.9:477-483
- Kerjaschki D, Sharkey DJ and Farquhar MG**, Identification and characterization of podocalyxin- the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell, *Journal of cell biology* (1984) 98:1591-1596
- Kerjaschki D, Miettinen A and Farquhar MG**, Initial events in the formation of immune deposits in passive Heymann nephritis: Gp 330- antigen 330 immune complexes form in epithelial coated pits and rapidly become attached to the GBM, *J Exp Med* (1987) 166:109-128
- Kerjaschki D**, Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin B, *Lab Invest* (1978) 39:430-440
- Kobayashi N and Mundel P**, A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non-neuronal cells, *Cell Tissue Res*, (1997) 291:163-174
- Kobayashi N, Reiser J, Kriz W, Kuriyama R and Mundel P**, Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes, *J Cell Biol* (1998) 143:1961-1970
- Kobayashi N, Reiser J, Schwarz K, Sakai T, Kriz W and Mundel P**, Process formation of podocytes: Morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A, *Histochem Cell Biol* (2001) 115:255-266
- Kriz W, et al.**, Structure- stabilizing forces in the glomerular tuft, *J Am Soc Nephrol* (1995) 5:1731-1739
- Krtil J, Platenik J, Kazderova, Tesar V and Zima T**, Culture Methods of Glomerula Podocytes, *Kidney Blood Press Res*, (2007) 30:162-174
- Lee G and Rook SL**, Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization, *J Cell Sci* (1992) 101:227-237
- Manseau LJ and Schupbach T**, Cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the Drosophila embryo, *Genes Dev.* (1989) 3:1437-1452
- Marshall CB and Shankland SJ**, Cell cycle regulatory proteins in podocyte health and disease, *Nephron Exp Nephrol* (2007) 106:51-59

- Marshall CB, Pippin JW, Krofft RD and Shankland SJ**, Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo, *Kidney Int* (2006) 70:1962-1973
- Meyer TN, Schwesinger C, Wahlefeld J, Dehde S, Kerjaschki D, Becker JU, Stahl RAK and Thaiss F**, A new mouse model of immune-mediated podocyte injury, *Kid Int* (2007) 72:841-852
- Morigi M, et al.**, In response to proteinload podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin- 1 gene, *Am J Pathol* (2005) 166:1309-1320
- Mundel P, Reiser J, Borja AZ, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W and Zeller R**, Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines, *Exp Cell Res* (1997) 236:248-258
- Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I and Koide H**, The urinary podocyte as a marker for the differential diagnosis of idiopathic focal glomerulosclerosis and minimal-change nephrotic syndrome, *Am J Nephrol* (2000) 20:175-179
- Nangaku M, Shankland SJ, and Couser WG**, Cellular Response to Injury in Membranous Nephropathy, *J Am Soc Nephrol* (2005) 16:1195-1204
- Natori Y et al.**, Production and polarized secretion of basement membrane components by glomerular epithelial cells, *Am J Physiol* (1992) 262: 131- 137
- Pavenstädt H, et al.**, Cell biologie of the glomerular podocyte, *Physio. Rev* (2003) 83:253-307.
- Petermann AT, Krofft R, Blonski M, Hiramura K, Vaughn M, Pichler R, Griffin S, Wada T, Pippin J, Durvasula R and Shankland SJ**, Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable, *Kidney Int* (2003) 64:1222-1231
- Qualmann B and Kessels MM**, New players in actin polymerization–WH2-domain-containing actin nucleators, *Trends in Cell Biology* (2009) 19(6):276-285
- Quinlan M.E. et al.**, Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino, *J Cell Biol* (2007) 179:117-128
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E and Mullins RD**, Drosophila Spire is an actin-nucleation factor, *Nature* (2005) 433:382-388,

- Raats CJ, 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.
- Rebowski G, et al.**, X-ray scattering study of actin polymerization nuclei assembled by tandem W domains, *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:10785-10790
- Regele HM, 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.
- Remuzzi G, Zoja C and Bertani T**, Glomerulonephritis, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (1993) 2(3):p.465-74
- Rodewald R and Karnovsky MJ**, Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse, *J Cell Biol* (1974) 60:423-433
- Ronco P and Debiec H**, Molecular dissection of target antigens and nephritogenic antibodies in membranous nephropathy: towards epitope-driven therapies, *J Am Soc Nephrol* (2006) 17:1772-1774
- Ronco P and Debiec H**, Podocyte antigens and glomerular disease, *Nephron Exp Nephrol* (2007) 107:41-46
- Rosales-Nieves AE, Johndrow JE, Keller LC, Magie CR, Pinto-Santini DM and Parkhurst SM**, Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino, *Nat Cell Biol* (2006) 8:367-376
- Ryan GB and Karnovsky MJ**, An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis, *Kidney Int* (1975) 8:219-232
- Salant DJ, Darby C and Couser WG**, Experimental membranous glomerulonephritis in rats. Quantitative studies of glomerular immune deposit formation in isolated glomeruli and whole animals, *J Clin Invest* (1980) 66:71-81
- Salant DJ and Cybulski AV**, Experimental Glomerulonephritis, *Methods in Enzymology* (1988) 162:421-461
- Sanden S, Elger M, Mundel P and Kriz W**, The architecture of podocyte cytoskeleton suggests a role in glomerular filtration dynamics, *Ann Anat* (1995) 177:44-45
- Sawada H, Stukenbrok H, Kerjaschki D, and Farquhar MG**, Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium, *Am J Pathol* (1986) 125:309-318

- Schiwek D, et al.**, Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines, *Kidney Int* (2004) 66(1):91-101
- Schneeberger EE, Leber PD, Karnovsky MJ and McCluskey RT**, Altered functional properties of the renal glomerulus in autologous immune complex nephritis: An ultrastructural tracer study, *J Exp Med* (1974) 139:1283-1302
- Schrijver G, Bogman MJ, Assmann KJ, de Waal RM, Robben HJ, van Gasteren H and Koene RA**, Anti-GBM nephritis in the mouse: Role of granulocytes in the heterologous phase, *Kidney Int* (1990) 38:86-95
- Schumacher N, Borawski JM, Leberfinger C B, Gessler M and Kerkhoff E**, Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain, *Gene Expr Patterns* (2004) 4:249-55
- Seiler MW, Venkatachalam MA, and Cotran RS**, Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations, *Science* (1975) 189:390-393
- Shankland SJ**, The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis, *Kidney international* (2006) 69:2131-2147
- Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J and Mundel P**, Podocytes in culture: past, present and future, *Kidney International* (2007) 72,26-36
- Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, and Kriz W**, Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis, *Am J Pathol* (1996) 148:1283-1296
- Small JV and Resch GP**, The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility, *Curr Opin Cell Biol* (2005) 17:517-23
- Somlo S and Mundel P**, Getting a foothold in nephrotic syndrome, *Nat Genet* (2000) 24(4):333-5.
- Smoyer WE and Mundel P**, Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome, *J Mol Med* (1998) 76:172-183
- Svitkina TM, Verkhovsky AB, McQuade KM and Borisy GG**, Analysis of the actinmyosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation, *J Cell Biol* (1997) 139:397-415

- Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y and Betsholtz C, A** New Method for Large Scale Isolation of Kidney Glomeruli from Mice, *Am J Pathol* (2002) 161(3):799-805
- Thomas C**, Histopathologie, *Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie Schattauer* (1998) ISBN 3-7945-1870-5,
- Topham PS, Haydar SA, Kuphal R, Ligtfoot JD and Salant DJ**, Complement-mediated injury reversibly disrupts glomerular epithelial cell actin microfilaments and focal adhesions, *Kidney Int* (1999) 55:1763-1775
- Tryggvason K. and Wartiovaara J**, Molecular basis of glomerular permselectivity, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2001) 10(4):543-9.
- Tyson GE**, Scanning electron microscopic study of the effect of vinblastine on podocytes of rat kidney, *Virchows Arch B Cell Pathol* (1977) 25:105-115
- Voet D, Voet JG**, Biochemie (1992) ISBN 3-527-29249-7
- Wahlefeld J**, Dissertationsarbeit: Die anti-Podozyten-Nephritis: Ein neues immunologisch-vermitteltes Mausmodell Fachbereich Medizin der Universität Hamburg (2006)
- Wang Y and Riechmann V**, Microtubule anchoring by cortical actin bundles prevents streaming of the oocyte cytoplasm, *Mech of Develop* (2008) 125:142-152
- Wasserstein AG**, Membranous glomerulonephritis, *J Am Soc Nephrol* (1997) 8:664-667
- Wegner A**, Head to tail polymerization of actin, *J Mol Biol* (1976) 108:139-50
- Wellington A, et al.**, Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5, *Development* (1999) 126:5267-74
- Whiteside CI, Cameron R, Munk S, and Levy J**, Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis, *Am J Pathol* (1993) 142:1641-1653,
- Wu CC, Chen JS, Lin SH, Chen A, Sytwu HK and Lin YF**, Experimental model of membranous nephropathy in mice: sequence of histological and biochemical events, *Laboratory Animals* (2008) 42:350-359

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rolf Stahl danke ich für die Bereitstellung des sehr guten Arbeitsplatzes in der III. Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf.

Ich möchte mich ebenfalls sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Friedrich Thaiss für seine freundliche und hilfsbereite Art sowie die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Konrad Wiese für das große Interesse an meiner Arbeit und die Möglichkeit im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg promoviert zu werden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gunther Zahner für seine stets freundliche, offene und unkomplizierte Art während der Begleitung dieser Arbeit. Ohne seine in jeder Hinsicht kompetente Betreuung im Labor sowie konstruktive Kritik wäre die Durchführung dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Tobias Meyer für das Überlassen eines so interessanten Dissertationsthemas.

Bei Dr. Jan U. Becker möchte ich mich herzlich für die Durchführung der Immunogoldfärbungen und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Frau Silke Dehde und Frau Dr. Catherine Meyer-Schwesinger bin ich für die Einführungen in die Arbeitstechniken dankbar.

Bei den Mitarbeitern des nephrologischen Labors, Marlies Sachs, Melanie Schaper, Saskia Schröder, Mariola Rezska, Anett Peters, Stefan Gatzemeier, Dr. Hajo Paust und Dr. Ulf Panzer möchte ich mich für die Hilfe bei den alltäglichen Laborproblemen und für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Danksagung

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders für die langjährige Unterstützung danken, die sie mir immer wieder haben zukommen lassen. Ohne ihre konsequente Förderung in finanzieller und moralischer Hinsicht wäre ich jetzt nicht da, wo ich bin.

Bei meiner Partnerin Kamila Szlachta möchte ich mich für ihre Geduld und moralische Unterstützung bedanken. Durch ihr Verständnis und ihren Zuspruch war es mir möglich auch an Tagen von Rückschlägen nicht den Mut zu verlieren.

13 Lebenslauf

Wissenschaftlicher Werdegang

- WS 1997 bis SS 05 **Ruhr-Universität Bochum**
Studium der Biochemie, Fakultät für Chemie
Diplomarbeit "Untersuchungen zum *u26* Gen aus *Drosophila melanogaster*", Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biochemie II, AG Molekulare Zellbiochemie, Prof. Dr. Bernhard Hovemann
- 2005 **Abschluss des Studiums als Diplom-Biochemiker (Diplom)**
- 09-2006 – 12-2006 **Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH),**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für neurale Signaltransduktion, Prof. Dr. Olaf Pongs
- 12-2006 – heute **Universitätsklinik Hamburg Eppendorf (UKE),**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Zentrum für Innere Medizin, III. Med. Klinik, Abt. Experimentelle Nephrologie,
Direktor: Prof. Dr. Rolf A. K. Stahl

Berufliche Weiterbildung

- WS 2007 – WS 2009 **Universität Hamburg,** Molekularbiologisches Aufbaustudium am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)
Abschluss: Zertifikat

14 Publikationen

Publikationen

Meyer-Schwesinger C, Meyer TN, Münster S, Klug P, Saleem M, Helmchen U, Stahl RA; **A new role for the neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) in podocyte process formation and podocyte injury in human glomerulopathies**; J Pathol. 2009 Feb;217(3):452-64.

Meyer-Schwesinger C, Dehde S, von Ruffer C, Gatzemeier S, Klug P, Wenzel UO, Stahl RA, Thaiss F, Meyer TN; **Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF-kappaB p65 signaling**; Am J Physiol Renal Physiol. 2009 May;296(5):F1088-99. Epub 2009 Feb 18.