

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

**Die Rolle von Spire-1 im Podozyten in der Adriamycin- induzierten  
Glomerulonephritis**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Sabrina Mathey  
aus Aschaffenburg

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 07.11.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. T. N. Meyer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Thaiss

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Nolte

*“There are things known, and there are things unknown-  
in between there are doors.”*

WILLIAM BLAKE

# Inhaltsverzeichnis

<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	1
<b>1. Einleitung</b> .....	2
1.1. Die Glomerulonephritis.....	2
1.2. Der Podozyt.....	3
1.3. Die ADR- Nephritis .....	9
1.4. Das Protein Spire-1 .....	10
<b>2. Material</b> .....	16
2.1. Mausstaffel.....	16
2.1.1. Adriamycin.....	16
2.1.2. Behandlung der Versuchstiere.....	16
2.1.3. Gewinnung von Mausurin zur Analyse.....	16
2.1.4. Organentnahme .....	16
2.2. Zellexperimente .....	17
2.2.1. Puromycin .....	17
2.2.2. Zellen .....	17
2.3. Verwendete Antikörper.....	18
2.4. Verwendete Primer.....	19
<b>3. Methoden</b> .....	20
3.1. Zellen.....	20
3.1.1. Zellkultur .....	20
3.2. Proteinbiochemie.....	21
3.2.1. Gelelektrophorese.....	21
3.2.2. Lysatherstellung.....	22
3.2.3. Protein- Konzentrationsbestimmung am NanoDrop.....	22
3.2.4. Auftrennung der Proteine .....	22
3.2.5. Western Blot.....	23
3.3. Mikrodissektion.....	24
3.3.1 Färbeprotokoll Kresylviolett für Mikrodissektion .....	25
3.4. Molekularbiologie .....	25
3.4.1. RNA- Isolation.....	25
3.4.2. cDNA-Synthese.....	26
3.4.3. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR).....	27
3.5. Enzyme- linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	27
3.6. Kreatinin- und Harnstoffbestimmung .....	28

3.7. Histologie.....	29
3.7.1. Allgemeines.....	29
3.7.1.1. Prinzip der Immunhistologie.....	29
3.7.1.2. Streptavidin-Biotin-Komplex.....	29
3.7.1.3. Neufuchsin Entwicklungslösung.....	30
3.7.2. Zellen .....	30
3.7.2.1. Aktin-, $\alpha$ -Tubulin-, Spire-1- Immunfluoreszenzfärbung.....	30
3.7.3. Nierengewebe .....	31
3.7.3.1. PAS-Färbung .....	31
3.7.3.2. WT1 Neufuchsin- Färbung.....	32
3.7.3.3. Zellzählung von WT1- positiven Zellen .....	32
3.7.3.4. Spire-1 und Nephryn- Immunfluoreszenzfärbung .....	32
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
4.1. Das Adriamycin- Modell (Mausmodell).....	34
4.1.1. Klinische Parameter .....	34
4.1.2. Ergebnisse der Proteinurie-Analyse: Urin Albumin und Kreatinin .....	35
4.1.3. Ergebnisse der Proteinexpressions-Untersuchungen: Western Blot.....	36
4.1.4. Ergebnisse der Genexpressions-Untersuchungen: qPCR .....	38
4.1.5. Ergebnisse der Histologie .....	40
4.1.5.1. PAS- Färbung .....	40
4.1.5.2. WT1- Färbung mit Bestimmung des Podozytenverlusts und der Glomeruligröße .....	42
4.1.5.3. Immunhistologie.....	44
4.2. Das Puromycin- Modell (Podozyten- Schädigungsmodell).....	48
4.2.1. Ergebnisse der Proteinexpression .....	48
4.2.2. Ergebnisse der Histologie .....	49
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>52</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>59</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>64</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>67</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>68</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>69</b>

## **Arbeitshypothese und Fragestellung**

Glomeruläre Erkrankungen sind eine häufige Ursache des intrarenalen Nierenversagens. Hauptmerkmal vieler glomerulärer Erkrankungen ist der Eiweißverlust in den Primärharn durch eine Zerstörung der physiologischen Barriere aus Endothelzelle, glomerulärer Basalmembran und glomerulärer Epithelzelle, dem Podozyt. Aus histopathologischer Sicht entsteht dieser Eiweißverlust durch die Retraktion der Fußfortsätze des Podozyten. Podozyten haben bis zu 1000 Fußfortsätze pro Zelle, die mit den Fußfortsätzen der benachbarten Podozyten interdigitieren. Ein Rückzug dieser Fortsätze entsteht als Folge von zytoskelettalen Umbauprozessen. Hierbei spielt die Interaktion von filamentösem Aktin mit kontraktile Zellstrukturen und der Zellmembran eine wichtige Rolle.

Das Aktin-interagierende Protein Spire-1 wurde von der Arbeitsgruppe Meyer in Podozyten als potentiell Antigen einer Immunkomplexnephritis der Maus identifiziert. Spire-1 initiiert die Aktin Polymerisation von monomerem zu filamentösem Aktin. Seine Funktion im Podozyten ist ungeklärt. Hypothese war es, dass Spire-1 an den pathologischen Umbauprozessen des Zytoskeletts während des Podozytenschadens beteiligt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Regulation und Rolle von Spire-1 im Podozyten genauer zu untersuchen. Hierfür wurde die Expression von Spire-1 in einem etablierten Mausmodell der selektiven Adriamycin-induzierten Glomerulonephritis und nach Puromycin-Schädigung von Podozyten in Zellkultur untersucht. Die Lokalisation von Spire-1 wurde durch Immunhistochemie bestimmt. Protein- und mRNA- Analysen sollten zeigen, ob Spire-1 bei Podozytenschädigung reguliert wird.

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Glomerulonephritis

Die Glomerulonephritis (GN) ist eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz. Sie führt bei längerem Bestehen zu einer Glomerulosklerose und letztlich zum Nierenversagen. In Australien ist die chronische GN die häufigste, in den USA nach diabetischer und hypertensiver Nephropathie die dritthäufigste Ursache einer chronischen Niereninsuffizienz [1]. GN können sowohl zum akuten, als auch –was wesentlich häufiger ist- zum chronischen Nierenversagen führen. Das akute Nierenversagen zeichnet sich im Gegensatz zum chronischen Nierenversagen durch eine rasche Abnahme der Nierenfunktion innerhalb von Stunden oder Tagen aus. Diese führt zur Retention von harnpflichtigen Substanzen, zu einer Störung des Wasserhaushaltes sowie zur Störung der Elektrolythomöostase. Da GN jedoch klinisch häufig stumm verlaufen, bleiben sie meist lange undiagnostiziert und führen letztlich zum chronischen Nierenversagen.

Bei der GN handelt es sich um eine nicht-bakterielle Entzündung der Glomeruli, die beide Nieren befällt. Die Einteilung erfolgt entweder nach der Histologie in fokal, diffus, segmental und global, oder nach der Ätiologie: primäre GN, denen keine nachweisbare systemische Grundkrankheit zugrunde liegt, und sekundäre GN, die als Folge einer systemischen Erkrankung auftreten. Ferner finden sich erbliche Formen wie z.B. das Alport- Syndrom. Einigen Formen der GN liegt nach heutigem Wissensstand eine immunologische Schädigung zugrunde. Diese kann ausgelöst werden durch Anti-Basalmembran-Antikörper, die gegen Bestandteile des Kollagen Typ-4 der Basalmembran gerichtet sind (Goodpasture-Syndrom), durch zirkulierende Immunkomplexe (Systemischer Lupus erythematodes) oder durch aktivierte Entzündungszellen (ANCA-assoziierte Vaskulitiden). Die immunologische Schädigung ist nach heutigem Verständnis bei einem Teil der Erkrankungen Antigenvermittelt. Antigene wie Bakterien, Viren, Parasiten, Medikamente, aber auch körpereigene Stoffe führen zu einer Aktivierung von Entzündungszellen oder zu einer direkten Antikörperproduktion. Die Immunkomplexe bestehend aus Immunglobulin und Antigen werden im Rahmen der Filtration des Blutes in den glomerulären Kapillaren abgelagert, wo sie über Mediatorsysteme die Filtrationseinheit schädigen. Die Antigene vieler primärer Formen der GN sind noch ungeklärt. Für eine besondere Form der Glomerulonephritis, die membranöse Glomerulonephritis, wird eine

Antikörper-Antigen-Interaktion am Podozyten-Fußfortsatz als Auslöser für eine lokale Entzündungsreaktion angesehen. Kürzlich wurde ein potentiell Antigen dieser Erkrankung identifiziert. 2009 beschrieben Beck et al. Antikörper gegen das Protein Phospholipase-A2-Rezeptor Typ M (PLA2R) im Serum von 70% der untersuchten Patienten mit idiopathischer membranöser Glomerulonephritis [2].

Dieses Rezeptorprotein wird in normalen humanen Nierenkörperchen auf der Oberfläche der Podozyten exprimiert und kann bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis auch in den Immundepots nachgewiesen werden. Allerdings ist es möglich, dass weitere Antigene auf dem Podozyten ebenfalls an der Entstehung der Glomerulonephritis beteiligt sind.

## 1.2. Der Podozyt

Der Podozyt als Bestandteil des Glomerulus ist für die Aufrechterhaltung der Filtrationsfunktion der Niere unabdingbar [3]. Er ist Teil der Filtrationsbarriere, die sich weiter aus der glomerulären Basalmembran und dem fenestrierten Endothel der Kapillaren zusammensetzt. Vom voluminösen *Zellkörper* der Podozyten sprossen sternförmig die sogenannten *Primärfortsätze* ab, die sich zu *Fußfortsätzen* aufzweigen (Abb.1). Die Fußfortsätze der Podozyten greifen fingerartig ineinander und schlingen sich wie ein Netz um die darunterliegenden Kapillaren. Zwischen den basolateralen Seiten der interdigitierenden Fußfortsätzen spannt sich die ultradünne *Schlitzmembran*. Sie stellt die eigentliche Filtrationsbarriere der Podozyten dar. Das Blut des menschlichen Körpers wird mehrmals pro Tag über diesen glomerulären Filter mit dem anschließenden Tubulussystem prozessiert. Es durchdringt von einem hohen Druckgradienten angetrieben zuerst das fenestrierte Kapillarendothel, dann die glomeruläre Basalmembran (GBM) und letztlich die Schlitzmembran, um als Ultrafiltrat (Primärhahn) im *Bowmannschen Kapselraum* aufgefangen zu werden. Bei einem Plasmavolumen von ca. 3 Litern und einer primären Filtration von 170 Liter/Tag bedeutet das, dass das gesamte Plasma des Menschen ca. 60mal pro Tag über den glomerulären Filter filtriert wird [4].



Abb.1: Elektronenmikroskopisches Bild eines Podozyten mit Zellkörper, Primärfortsätzen und Fußfortsätzen. (Quelle: Universität Rostock)

Der **Zellkörper** des Podozyten ist Zentrum der metabolischen Aktivität der Zelle. Er enthält einen prominenten Nukleus, ein hoch entwickeltes Golgi-System, glattes und raues endoplasmatisches Retikulum, Lysosome und zahlreiche Mitochondrien. Das podozytäre Zytosol ist der Produktionsort zahlreicher, wenn nicht aller Bestandteile der GBM [5]. Das Zytoskelett des Zellkörpers besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, wie z.B. Vimentin und Desmin [6]. Der Zellkörper sitzt der GBM auf, ist mit ihr jedoch nicht fest verbunden.

Die **glomeruläre Basalmembran** unterscheidet sich von der Basalmembran anderer Zellen dahingehend, dass sie auf beiden Seiten von Zellen besetzt ist: von den Endothelzellen der Kapillaren auf der einen Seite und von den Podozyten auf der anderen. Die glomeruläre Basalmembran besteht aus drei Schichten, einer elektronendichten zentralen Schicht, der sogenannten *Lamina Densa*, sowie zwei elektronenarmen äußeren Schichten [7]. Die elektronenarme Schicht, die den Kapillaren zugewandt ist, wird als *Lamina rara interna* bezeichnet, die den Podozyten zugewandte Schicht als *Lamina rara externa*. Die Lamina Densa besteht aus einem dichten Netz von 3nm dicken Filamenten, die Lamina rara interna enthält 10nm dicke Filamente [7]. Beide Laminae rarae sind von Filamenten so durchsetzt, dass Quervernetzungen zwischen den Podozyten auf der einen Seite, und den Endothelien auf der anderen Seite entstehen. Dieser Halteapparat wird über Disulfidbrücken und Kollagen IV, sowie Proteoglykane, Laminin, Entactin und andere Proteine stark quervernetzt [7]. Da die Basalmembran enormen mechanischen Kräften ausgesetzt ist, bedarf sie einer Flexibilität und einem hohen metabolischen

Turnover, um ihre Funktionalität zu erhalten. Um das zu erreichen, produzieren Podozyten zusätzlich zu den Matrixproteinen auch Matrix modifizierende Enzyme wie MMP-9 [8]. Bei Glomerulonephritiden wie in der proteinurischen Heymann Nephritis der Ratte und auch bei Podozytenschädigung *in vitro* wurde MMP-9 erhöht nachgewiesen [8].

Das Zytoskelett der **Primärfortsätze** ähnelt dem des Zellkörpers. Es besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Das Zytoskelett stellt einen axonalen vesikulären Transport bereit, wodurch die im Zellkörper synthetisierten Metabolite wie zum Beispiel Proteine aus dem Golgi-Apparat zu den Fußfortsätzen transportiert werden können [5]. Die Intermediärfilamente der Primärfortsätze sind - wie auch im Zellkörper- Vimentin und Desmin. Die Expression von Desmin ist in der Puromycin Nephropathie der Ratte signifikant induziert [9]. Podozyten exprimieren Plektin als ein Intermediärfilament-assoziiertes Protein [10], weitere assoziierte Proteine sind Gegenstand intensiver Forschung [11].

Mikrotubuli sind das essentielle Strukturelement für die Aufrechterhaltung der Primärfortsätze (Abb.2). Sie verbinden den Zellkörper mit dem in der GBM verankerten Aktin-Netzwerk der Fußfortsätze. Mikrotubuli sind Polymere aus globulären  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Untereinheiten, die zu einer 24nm dicken, festen tubulären Struktur zusammengesetzt werden [5]. Sie laufen gebündelt in paralleler Ausrichtung in der Längsachse der Primärfortsätze, sind in geringerer Menge aber auch ungeordnet neben anderen zytoskelettalen Strukturen zu finden. Die Mikrotubuli-Nukleation, also die Polymer-Herstellung aus Tubulin-Untereinheiten, beginnt im Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC), das sich im Zellkörper befindet. Sie wird höchstwahrscheinlich durch  $\gamma$ -Tubulin initiiert, das ausschließlich in den Zentrosomen der Podozyten zu finden ist [12]. Die Elongation findet sowohl an den langsamwachsenden Minus-Enden, als auch an den schnellwachsenden Plus-Enden statt. Die Plus-Enden liegen dabei überwiegend distal, die Minus-Enden, wie auch in anderen Zellen üblich, proximal in MTOC-Nähe [13]. Aber auch die umgekehrte Orientierung ist zu finden. Es besteht also eine entgegengesetzte Polarität der Mikrotubuli in Bezug auf Ihre Ausrichtung. Verantwortlich für die Elongation der Mikrotubuli im Podozyten sind Motor-Assoziierten-Proteine wie MAP3 und MAP4. Motorproteine der Kinesin Superfamilie, wie CHO1/MKLP1, führen die polare Elongation via antiparallelen Transport entlang der Plus-End-distalen

Mikrotubuli durch. Eine Unterbrechung der Mikrotubuli-Elongation mit Vinblastin führt zur massiven Schädigung der Primärfortsätze *in vivo* [14].

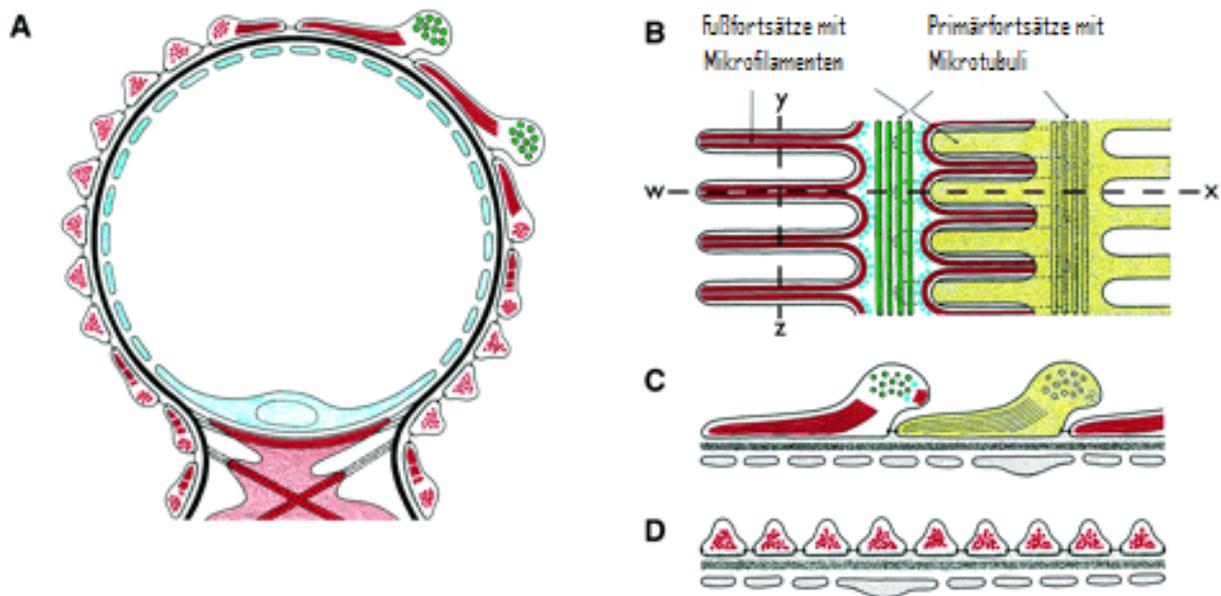


Abb.2: Schematische Darstellung des Zytoskeletts der Podozyten-Fortsätze. **A:** Querschnitt einer Kapillarschlinge. Die Fußfortsätze, die aus den Primärfortsätzen hervorgehen (2 sind im Querschnitt dargestellt) und auf der äußeren Seite der GBM sitzen, enthalten kontraktiles Aktin (rot). Die Primärfortsätze enthalten der Länge nach gebündelte Mikrotubuli (grün). Die Kapillarschlinge ist ausgekleidet mit fenestriertem Endothel (blau). **B:** zeigt die Draufsicht auf zwei Primärfortsätze (einer in weiß, einer in gelb dargestellt), jeweils mit ihren Fußfortsätzen. **C:** Schnitt durch einen Fußfortsatz parallel zur Längsachse bzw. **D:** senkrecht zur Längsachse der Fußfortsätze (C entspricht dabei der **w-x** Linie, D der **y-z** Linie). Die Aktin-Filamente der Fußfortsätze (rot) stehen in enger Verbindung mit den Mikrotubuli der Primärfortsätze. Blau dargestellt: das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau. (Quelle: Pavenstädt, *Physiol Review*, Vol.83 (2003), 253-307)

An die **Fußfortsätze** der Podozyten werden hohe statische und dynamische Ansprüche gestellt. Sie sind daher über transmembranäre Proteine mit der darunterliegenden GBM fest verankert. Diese transmembranären Proteine sind Integrine und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglykane, die mit Bestandteilen der GBM wie Kollagen IV, Fibronectin und Laminin verbunden sind [5].

Das Zytoskelett der Fußfortsätze besteht im Gegensatz zu dem relativ locker aufgebauten Tubulin-Netzwerk der Primärfortsätze aus einem dichten Netzwerk von F-Aktin Mikrofilamenten. Filamentöses Aktin ist eine polare, dynamische Struktur, die

ständig neue Verzweigungen auf- oder abbaut. Die Aktin-Filamente verlaufen gebündelt in paralleler Orientierung in der Längsachse der Fußfortsätze. Sie sind an den Abzweigungen der Primärfortsätze mit deren Mikrotubuli verankert, und sind damit in der Lage, den Podozyten an mechanischen Stress, wie zum Beispiel den pulsierenden Blutfluss der darunterliegenden Kapillaren, anzupassen. Bivalente Aktin-Cross-Linking-Moleküle aus der Calponin-Homologie-Superfamilie, wie  $\alpha$ -Aktinin und Dystrophin, vernetzen die Aktin-Filamente untereinander [5]. Weitere mögliche Aktin-Quervernetzungs-Moleküle wie Spire-1 sind in anderen Zellsystemen ebenfalls an der Fortsatzbildung beteiligt (s.u.). Die Fußfortsätze enthalten kontraktile Elemente wie Myosin [15]. Man geht davon aus, dass dieser kontraktile Apparat dazu da ist, dem Druck entgegenzuwirken, der auf die Kapillarwände wirkt, wenn diese zwischen Blutseite und Urinseite ausgedehnt werden [16]. Ein weiteres zytoskelettales Protein, Synaptopodin, kolokalisiert mit Aktin in den Fußfortsätzen [17]. Dieses ist auch bei Neuronen zu finden, was neben vielen anderen Indizien eine Verwandtschaft zwischen den ebenfalls Fortsatz-ausbildenden Neuronen und Podozyten vermuten lässt. Podocalyxin, ein Sialoglykoprotein, ist ein Hauptbestandteil der Glykokalyx der Podozyten. Die Glykokalyx umhüllt die Fußfortsätze und ist negativ geladen, wodurch es die einzelnen Fußfortsätze voneinander abstößt und somit die Filtrationsbarriere offen hält. Podocalyxin trägt wesentlich zur negativen Oberflächenladung der Podozyten bei [18].

An der basolateralen Seite der Fußfortsätze ist die **Schlitzmembran** verankert. Sie ist für Wasser und kleinste gelöste Teilchen frei passierbar [5]. Die Schlitze haben eine Weite von 30-40nm [19] und stellen die eigentliche Filtrationsbarriere dar. Ein Funktionsverlust der intakten Schlitzmembran geht mit einer Proteinurie einher. Eines der wichtigsten Proteine der Schlitzmembran ist Nephrin, ein 180 kD großes Protein. Mutationen im Nephrin-kodierenden Gen NPHS1 führen zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom Finnischen Typ, welches mit massiver Proteinurie bereits *in utero* einhergeht und nur durch Nierentransplantation behandelt werden kann. Vermutlich wegen erhöhter Nephrin-Antikörper kann es dennoch zu erneutem Krankheitsauftreten kommen [20]. Nephrin wird in der Minimal-Change Nephropathie und in der Membranösen Nephropathie auf mRNA Ebene vermindert exprimiert und zeigt zusätzlich bei der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), nicht aber bei der IgA-Nephropathie histologisch eine granuläre Umverteilung entlang der GBM [21]. Als Interaktionspartner von Nephrin wurde das Protein NEPH1 beschrieben. Es

ist ebenfalls transmembranär lokalisiert und wird als Ligand von Nephrin diskutiert [22].

Neben Nephrin haben sich andere Schlitzmembran-assoziierte Proteine wie Podocin in Mutationsanalysen für die Intaktheit der Schlitzmembran als unverzichtbar herausgestellt. Podocin ist ein 42 kD großes Protein [5] mit einer relativ kurzen N-terminalen Domäne, einer transmembranären Domäne sowie einer längeren C-terminalen Domäne. Es verankert Nephrin mit den Fußfortsätzen. Untersuchungen von Huber et al. konnten zeigen, dass Podocin die von Nephrin ausgehende intrazelluläre Signalübertragung beeinflusst [23].

Ebenfalls in der Schlitzmembran, aber auch im Tubulussystem, befindet sich das 80 kD große CD2-assoziierte Protein CD2AP [24]. Es besteht aus einer Aktin-bindenden-Domäne, einer Prolin-reichen Region und mehreren SH3-Domänen. Es ist an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch Aktin-Remodeling und transmembranären Transport beteiligt. Es verankert ebenfalls Nephrin im Fußfortsatz. CD2AP Knockout-Mäuse (-/-) entwickeln ein kongenitales Nephrotisches Syndrom mit Fußfortsatzrückzug und sterben im Alter von 6 Wochen an Nierenversagen [25].

An der Basis der Schlitzmembran ist ein Mitglied der Cadherin Superfamilie, FAT, lokalisiert. Es hat eine zytoplasmatische Domäne, die mit ZO-1 kolokalisiert. ZO-1 ist an der parazellulären Signalübertragung beteiligt [26]. ZO-1 befindet sich an der basolateralen Seite der Fußfortsätze, dort wo das Aktin-Zytoskelett mit den Proteinen der Schlitzmembran verankert ist. Die große, extrazelluläre Domäne von FAT lässt lange interzelluläre Adhäsionsmoleküle anstelle der üblichen Adhäsionsverbindungen (adherens junctions) und Desmosomen zwischen den Schlitzmembranen als Zellverbindung vermuten [27].

Ein weiteres transmembranäres Protein ist P-Cadherin, das aus fünf extrazellulären Cadherin-Domänen und einer  $\beta$ -Catherin-bindenden zytoplasmatischen Domäne besteht. Es hat ein Molekulargewicht von 120 kD. P-Cadherin scheint für die Aufrechterhaltung der Funktion der Schlitzmembran ebenfalls essentiell zu sein [28].

### 1.3. Die ADR- Nephritis

Adriamycin (ADR), Synonym Doxorubicin, ist ein zytotoxisches Anthracyclin-Antibiotikum, das aus Stämmen von *Streptomyces peucetius* isoliert wird. Es ist ein Hydroxylderivat des Daunorubicin. Adriamycin interkaliert in DNA und wird daher als Zytostatikum in der Chemotherapie bei diversen Neoplasien wie akuten Leukämien, Wilms Tumoren, Neuroblastomen, Sarkomen, Mamma-, Ovarial-, und Bronchial-Karzinomen eingesetzt. Sein Einsatz wird durch starke Nebenwirkungen limitiert: neben Kardiotoxizität zeigt es hauptsächlich nephrotoxische unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Dies hat man sich in etablierten ADR-Mausmodellen zunutze gemacht [29]. Die nephrotoxische Wirkung besteht in der Induktion eines Nephrotischen Syndroms mit glomerulärer Proteinurie, die toxische Wirkung betrifft dabei hauptsächlich den Podozyten.

In der innerhalb der ersten drei Tage nach Applikation eintretenden Akutphase der ADR-Nephropathie zeigt sich „podozytärer Stress“, der zu einer für die ADR-Nephritis charakteristischen, rasch eintretenden, massiven Proteinurie führt. Die podozytäre Schädigung manifestiert sich in der Schlitzmembran: elektronenmikroskopisch kann man bei ADR-Schädigung ein Zusammenziehen der Fußfortsätze feststellen [30]. Des Weiteren geht die negative Ladung der Fußfortsätze verloren [31]. Dadurch kommt es zu einem massiven Verlust von Plasmaproteinen in den Primärharn, die bei einem physiologischen pH von 7,4 ebenfalls negativ geladen sind und im gesunden System von den negativen Ladungen der GBM und Fußfortsätze zurückgehalten werden (Ladungsselektivität). Auch geht die Fähigkeit der Größenselektivität verloren [31].

Es wird ebenfalls beschrieben, dass ADR die glomeruläre Glykocalyx verdünnt, eventuell durch Herunterregulation der Proteoglycan-Synthese. Dies reduziert ebenso die negative Ladung und somit die Funktionalität der Blut-Harn-Schranke. So war die Dicke der Glykocalyx nach ADR-Behandlung nur noch 20% der Dicke der Glykocalyx von unbehandelten Tieren [31].

Nephrin als Schlitzmembran-Protein wird sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene überexprimiert [31].

In der chronischen Phase der ADR-Schädigung, die sich etwa sechs Wochen nach ADR-Behandlung einstellt, kommt es zur Glomerulosklerose. Sie zeigt sich in

vermehrter mesangialer Matrix und in einer unter dem Mikroskop nachweisbar erhöhten Anzahl von sklerotischen Glomeruli; ferner in erhöhten TGF- $\beta$ 1 und CTGF-Transkripten in ADR-behandelten Mäusen [32].

Zahlreiche andere Parameter außerhalb des Podozyten wurden in ADR-Tiermodellen als Ursache der Nephrotoxizität untersucht: eine weitere nephrotoxische Wirkung besteht in der Induktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). In Ratten zeigen sich nach ADR-Behandlung höhere Angiotensin II- Spiegel als in unbehandelten Tieren [32].

Als weitere Pathogenese der Nierenschädigung des Chemotherapeutikums wird eine Hyperkoagulabilität in Ratten unter ADR-Behandlung beobachtet. Diese stellt sich in der zweiten Woche nach einmaliger ADR-Gabe ein und besteht in erhöhten Fibrinogen- und Faktor VIII- Spiegeln, sowie supprimierter fibrinolytischer Aktivität [33]. Ebenfalls mit der Nephrotoxizität im Zusammenhang steht eine beschriebene ADR-induzierte Hyperlipidämie mit signifikant erhöhten Serum-Lipid-Spiegeln und LDL/VLDL-Lipoprotein Fraktionen [34].

ADR wird im Mausmodell meist einmalig intravenös in die Schwanzvene injiziert. Es sind aber auch Versuche beschrieben, in denen die Applikation intraperitoneal erfolgte [35]. Die Dosis richtet sich nach dem Gewicht; in der vorliegenden Arbeit wurde die gängige Dosierung von 13 mg/kg gewählt. Ziel war es damit den Podozyten selektiv zu schädigen, um daraufhin das im Podozyten lokalisierte Protein Spire-1 zu untersuchen.

#### **1.4. Das Protein Spire-1**

Das Protein Spire-1 gehört zur Familie der Spir-Proteine, die wiederum zu den Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) homology region 2 (WH2) Proteinen gehören. Diese sind mit der Signaltransduktion von Rezeptoren auf der Zelloberfläche zum Aktin-Zytoskelett assoziiert. Spire-1 wurde ursprünglich in murinen Neuronen identifiziert, später konnten weitere Spire Proteine auch in der Milz nachgewiesen werden [36]. Bereits 1989 wurde von Schüpbach et al. in Studien an *Drosophila* den Proteinen Spire und Cappuccino eine formgebende Rolle bei *Drosophila* zugesprochen. Spire- und Cappuccino-Mutanten zeigten in ihrem Phänotyp eine abnormale abdominale Segmentierung, was die Autoren vermuten

ließ, dass diese Proteine maßgeblich an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind, und weniger an der intrazellulären Signaltransduktion [37].

In Säugetieren konnten zwei Spire kodierende Gene gefunden werden, *spir-1* und *spir-2* [36]. Von Spire-1 existieren zwei Isoformen, Isoform 1 mit einer DNA- Sequenz von 1932 Basenpaaren, und Isoform 2 mit einer DNA-Sequenz von 1548 Basenpaaren Länge. Isoform 1 bildet ein Protein mit 643 Aminosäuren, Isoform 2 ein Protein mit 515 Aminosäuren. Das Protein Spire-1 hat im Immunoblot eine Größe von 96 kD [36].

### Lokalisation von Spire-1

Spire-1 wurde von Kerkhoff et al. in Fibroblasten mithilfe von Immunfluoreszenz mit Rab-11 GTPase kolokalisiert [38]. Die Proteine zeigten die Kolokalisation im perinukleären Bereich sowie in einer punktuellen zytoplasmatischen Verteilung. Durch Arbeiten in unserem Labor konnte Spire-1 im Podozyten immunhistologisch sowohl perinukleär als auch vesikulär punktuell im Zytoplasma des Zellkörpers dargestellt werden. Ferner konnte Spire-1 im Primärfortsatz lokalisiert werden, nicht jedoch in den Fußfortsätzen der Podozyten.

### Struktur von Spire-1

Das Protein Spire-1 setzt sich -wie alle Proteine der Spir-Familie- aus vier Aktin-bindenden „WH2“ Domänen zusammen, einer Membran-bindenden Domäne „FYVE“, der „Spir-box“ und einem neu identifizierten Modul für potentielle Protein-Interaktionen, der „KIND“ Region [39] (Abb.3).

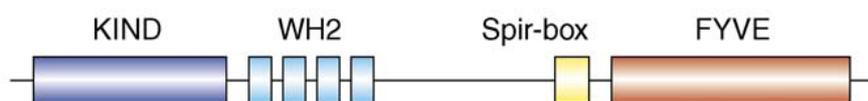


Abb.3: Struktur der Spir-Proteine. KIND: kinase noncatalytic C-lobe domain, WH2: Wiskott Aldrich Syndrome protein- homology domain 2, Spir-Box, FYVE: Membran- bindende Domäne. (Quelle: Kerkhoff, Trends in Cell Biology, Vol.16, (2006), 477-483)

Die vier **WH2-Domänen** können monomere Aktin-Moleküle binden und sind für die Fähigkeit von Spire-1 zur Aktin-Nukleation verantwortlich [40] (s.u.). Der sogenannte **Zink-Finger FYVE** enthält acht Zysteine, die zwei Zink Ionen binden und eine Loop-Struktur formen, die die Membran penetriert. Er befindet sich am N-terminalen Ende des Proteins. Der Name setzt sich zusammen aus vier Proteinen, die ebenfalls diese Struktur enthalten (**Fab1p**, **YOTB**, **Vac1p**, und **EEA1**). Da sich die Spire FYVE Domäne jedoch in ihrer Struktur von denen der anderen Proteine etwas unterscheidet, bleibt es unklar, ob FYVE in Spire dieselbe Membran-bindende Funktion hat [41]. Die **Spir-box** ist ebenfalls am N-Terminal des Proteins lokalisiert [39]. Zwischen der Spir-box und einem Protein der Zink-Finger Domäne, Rabphilin 3A, bestehen Sequenzhomologien. Die Spir-box soll zwischen Rabphilin 3A und Rab3A GTPase interagieren [38, 42]. Rab GTPasen regulieren den intrazellulären Membrantransport. Die potentielle Rab GTPase- Interaktion in Spire Proteinen, plus die Anwesenheit des potentiell Membran-bindenden Zink-Fingers, hat die Möglichkeit einer intrazellulären Membrantransport- Funktion von Spire aufgeworfen [39]. Am N-terminalen Ende des Proteins ist die „kinase noncatalytic C-lobe domain“ (**KIND**) lokalisiert [43]. Eine mögliche Funktion der KIND Region könnte eine Interaktion mit Signalproteinen sein [39].

### Aktin-Nukleation durch Spire-1

Die Polymerisation von monomerem Aktin zu filamentösem Aktin bedarf Aktin-Nukleations-Faktoren. Zu den bekannten Aktin-Nukleatoren gehören der Arp2/3 Komplex und die Formine. Spire-1 stellt ein neues Mitglied in der Reihe der F-Aktin Initiatoren dar. Die Nukleation von monomerem Aktin zu Aktinfilamenten durch Spire Proteine wurde erstmals 2005 von Quinlan et al. beschrieben [40]. Sie basiert auf den Aktin-bindenden WH2 Domänen. Vier WH2-Domänen werden durch drei Linker-Regionen miteinander verbunden [39]. Bei der Nukleation wird zuerst ein Aktin Dimer gebildet, indem die beiden C-terminalen WH2 Domänen je einen Aktin Monomer binden. Der Linker am Minus-Ende überbrückt die zur Aktin-Polymerisation notwendige Energie [40] und stabilisiert den entstandenen Dimer, den sogenannten „Pränukleus“. An diesen werden nun die Aktin Monomere der anderen beiden WH2 Domänen geheftet. Der so entstandene Tetramer ist der „Nukleus“, von dem aus die komplette Aktin-Polymerisation beginnt (Abb.4).

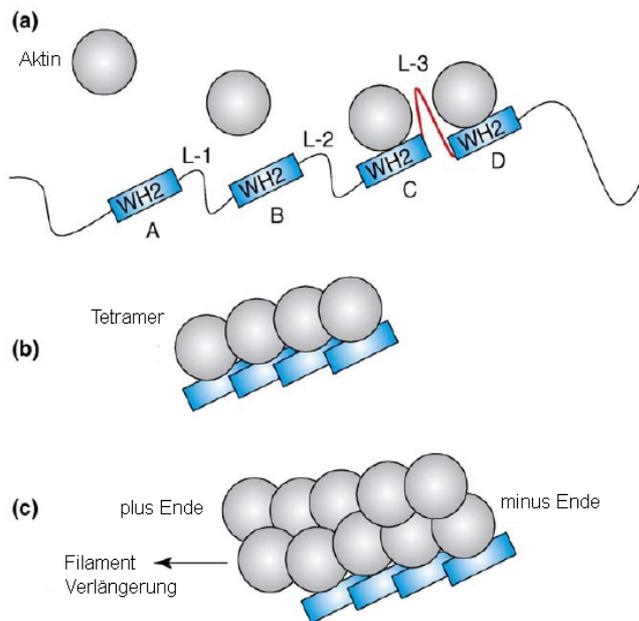


Abb. 4: Mechanismus der Aktin-Nukleation durch Spire. Aktin-Monomere (grau), WH2 Domänen (blau), Linker-3 Region (rot). a) durch Bindung von 2 Aktin Monomeren an die beiden c-terminalen WH 2 – Domänen wird ein initialer Aktin Dimer geformt (Pränukleus). Die Linker-3 Region stabilisiert dabei wahrscheinlich die Interaktion der beiden Aktin-Monomere b) weitere Aktin Monomere werden an den Prä-nukleus angefügt bis ein Tetramer –der Nukleus- entstanden ist. c) nach Formation des kompletten Nukleus beginnt die schnelle Polymerisation zu filamentösem Aktin. (Quelle: Kerkhoff, Trends in Cell Biology, Vol.16, (2006), 477-483)

### Spire als Stabilisator des Aktin-Zytoskeletts

Die Arbeitsgruppe um Rosales–Nieves erweiterte 2006 die Beschreibung von Spire Proteinen, indem es die Fähigkeit zur Aktin-Nukleation nur einer Isoform der Spire Proteine, SpireD, zusprach, für die Isoform SpireC jedoch eine neue Hypothese aufstellte. Nach ihren Ergebnissen ist SpireC ein Crosslinker zwischen F-Aktin und Mikrotubuli. Die Isoformen scheinen also verschiedene Zytoskelettfunktionen zu regulieren [44]. Weitere Autoren wie Bosch haben Spire als Aktinnetz-Stabilisator beschrieben [45]. Wang et al. führten dazu eine Untersuchung an Drosophila Oozyten durch [46]. Die Autoren gehen von folgendem Aufbau der Drosophila-Eizelle aus: am Cortex der Zelle befinden sich Aktin-Bündel, die Mikrotubuli mit ihrem Minusende dort verankern (Abb.5). Die Mikrotubuli ragen dabei in paralleler Anordnung in das Zytoplasma hinein. Beim sogenannten „Oocyte streaming“ werden die Mikrotubuli freigelassen und gleiten aus dem Cortex in das Zytoplasma hinein. Dieser Vorgang entspricht dem normalen Reifestadium 10b der Oozyte. Die von den Autoren hypothetisierte Rolle von Spire ist dabei die Mikrotubuli an den kortikalen Aktinbündeln zu verankern. Spire Mutanten besitzen diese Fähigkeit nicht, wodurch es zum verfrühten „Oocyte Streaming“ kommt [46].

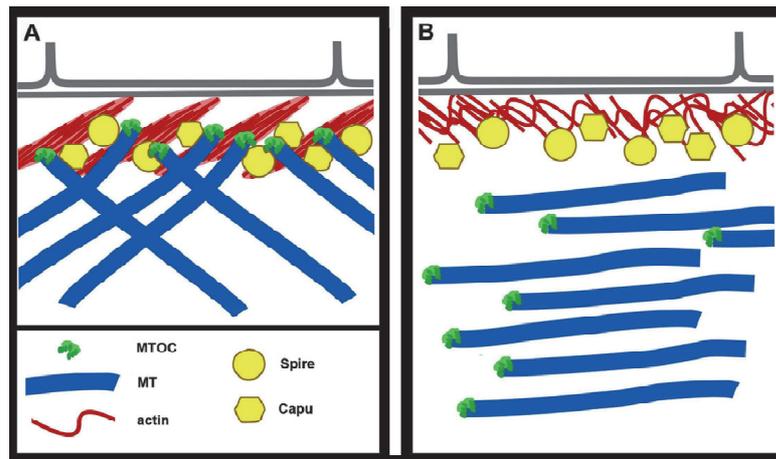


Abb.5: Interaktion des Aktin- Zytoskeletts mit Mikrotubuli (MT) in *Drosophila*- Oozyten. A) In Phase 9/10a der Reifung des *Drosophila* Oozyten ist Aktin in langen, dicken Bündeln kortikal angeordnet. Capu und Spire verankern die ins Zytoplasma hineinragenden MT mit Aktin. B) Zu einem späteren Reifestadium formt sich das kortikale Aktin um, organisierte Aktin-Bündel lösen sich auf. Durch diese Umorganisation kommt es zum „Oocyte streaming“, bei dem sich MT aus ihrer Verankerung im kortikalen Aktin lösen. (Quelle: Wang, *Mech. Dev.*, 125 (2008), 142-152)

### Spire-Beteiligung am Vesikel-Transport

Experimente von Kerkhoff et al. gaben Hinweise auf eine Rolle von Spire-1 in vesikulären Transportprozessen [38]. Die Gruppe konnte durch Immunfluoreszenz eine Kollokalisierung von Spire-Proteinen und der Rab11 GTPase nachweisen, die sich am Trans-Golgi-Netzwerk und an post-Golgi Vesikeln befindet. Die Spire-Lokalisation hing von der Integrität der Spir-Box und des FYVE Zink-Fingers ab (s.o.). Überexpression von Spire-1 in Mäusen führte dazu, dass das vesikuläre Stomatitis Virus G (VSV G) Protein nach Einschleusen in die Zelle nicht zur Plasmamembran transportiert werden konnte. Die Gruppe um Kerkhoff gab mit diesen Ergebnissen Anlass zu einem Modell von Spire, in dem es durch die Induktion der Aktin-Polymerisation eine vesikuläre Motoraktivität in Gang setzt [38].

Die AG Meyer konnte Spire-1 in Ratten als potentielles Antigen in der Schaf-Anti-Podozyten Nephritis identifizieren [47]. Hierbei wurden Mäuse mit anti-Podozyten-Antikörpern aus Schafseren immunisiert. Die Arbeitsgruppe stellte dadurch die Hypothese einer Beteiligung von Spire-1 an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts im Podozyten auf. Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung dieser These. Spire-1

wurde zu diesem Zweck in der Maus und in Zellkultur auf Protein- und RNA-Ebene, sowie in der Histologie untersucht.

## **2. Material**

### **2.1. Mausstaffel**

#### **2.1.1. Adriamycin**

Das in dieser Arbeit verwendete Chemotherapeutikum ist Adriamycin (ADR), Synonym Doxorubicin. In dieser Arbeit wurde das Generikum der Firma Hexal (50mg Durchstechflasche) verwendet. Die Injektionslösung wurde unverdünnt einer Durchstechflasche entnommen und den Mäusen in einer dem Körpergewicht angepassten Dosis appliziert.

#### **2.1.2. Behandlung der Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche Mäuse des Stamms Balb/c, die drei Monate alt waren und ein Gewicht von 23-28 g hatten. Den Mäusen wurde 13 mg/kg Doxorubicin (Fa. Hexal) intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Kontrolltiere erhielten dasselbe Volumen isotone Natriumchloridlösung (NaCl) 0,9% auf die gleiche Weise appliziert. In beschriebenen ADR-Nephritis Mausmodellen wurden Dosierungen zwischen 9,5 und 18 mg/kg Körpergewicht Adriamycin injiziert [29, 48, 49]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine im Mittelfeld dieser bereits erprobten Dosierungen liegende Dosis gewählt.

#### **2.1.3. Gewinnung von Mausurin zur Analyse**

Die Mäuse wurden zur Gewinnung von Urin für sechs Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt. Der Boden der Käfige bestand aus einer 96-Loch Platte (Fa. Falcon). Zur Steigerung der Urinmenge wurde den Mäusen zu Beginn 2 ml 0,9% NaCl-Lösung intraperitoneal gespritzt. Nach Abpipettieren des Urins aus den Löchern der 96-Loch Platte wurde dieser in vorbereitete 1,5 ml Probengefäße überführt und bei -20°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

#### **2.1.4. Organentnahme**

Die Organentnahme erfolgte bei der ersten Gruppe (akutes Modell) an Tag 6 bzw. bei der zweiten Gruppe an Tag 20 nach der Applikation von Doxorubicin durch Frau

Dr. Meyer-Schwesinger bzw. durch Herrn Dr. Philipp Klug. Dazu wurden die Tiere nacheinander in eine Äthernarkose (Fa. Riedel de Haen) versetzt und gewogen. Zur Probengewinnung von Urin wurde die Blase punktiert. Der so gewonnene Urin wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Nach Entnahme der ersten Niere wurde diese von der Kapsel und dem Hilus getrennt, geviertelt, in vorbereitete 2 ml Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Proben dienten später der Gewinnung von Protein und wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Nun wurde die zweite Niere entnommen, von Kapsel und Hilus befreit, in zwei Teile geteilt und in ein mit 4% Formalin gefüllten 15 ml Falcon Probengefäßen gelagert, bzw. in Tissue Tek (Fa. Sakura Finetek Europe) gebettet in eine kleine Petrischale (Fa. Sarstedt) gelegt und auf Trockeneis gefroren. Diese Proben wurden für die Histologie und die Mikrodisektion verwendet. Die Proben für die Histologie wurden nach einem Tag in Formalin bei 4°C in PBS (Fa. Gibco) gelagert, die Proben für die Mikrodisektion wurden sofort bei -80°C gelagert.

## **2.2. Zellexperimente**

### **2.2.1. Puromycin**

Für Zellexperimente wird traditionell Puromycin (Puromycin Aminonukleosid, PAN, Fa. Calbiochem) anstelle von Adriamycin verwendet. Puromycin wirkt in der Maus schlechter als Adriamycin und wird daher in Mäusen selten angewandt. Puromycin ist ein Aminonukleosid-Antibiotikum, das durch Bindung an Ribosomen in die Translation eingreift. Es ist ausschließlich zu Forschungszwecken zugelassen [50]. Die Wirkung auf Podozyten ist identisch zu der Wirkung von Adriamycin. Das in Pulverform gelieferte Puromycin wurde als Lösung in einer Konzentration von 10 mg/ml in destilliertem Wasser angesetzt und bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert.

### **2.2.2. Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Podozyten gearbeitet, die wir als Geschenk von Prof. Endlich (Universität Greifswald) erhielten. Diese waren ein Subklon der Podozyten von Prof. Mundel (Mount Sinai Medical School New York). Diese Podozyten sind immortalisiert worden, indem sie eine thermosensible Variante des

SV-40 T-Antigens (TsA58) erhalten hatten. Das Prinzip der Kultivierung liegt im Ein- und Ausschalten des SV-40 T-Antigens [17]. Das SV-40 T-Antigen ist unter der Kontrolle des H-2K<sub>b</sub>-Promotors, dessen Aktivität von  $\gamma$ -Interferon kontrolliert wird. Bei 33°C und in Anwesenheit von  $\gamma$ -Interferon wird T-Antigen in der Wildtyp-Konformation exprimiert, was zur Folge hat, dass die Podozyten sich vermehren und einen niedrigen Differenzierungsgrad zeigen. Bei 37°C und in Abwesenheit von  $\gamma$ -Interferon ist der H-2K<sub>b</sub>-Promotor abgeschaltet, das T-Antigen liegt in der mutanten Konformation vor [17], die Podozyten vermehren sich weniger und differenzieren sich.

### 2.3. Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Firma
		a) Western Blot b) Immunfluoreszenz c) Immunhistochemie	
anti- $\beta$ -Aktin	Maus monoklonal	a) 1:3000	Sigma
anti- $\alpha$ -Aktinin-4	Hase	a) 1:1000	Immunoglobine
anti-Ezrin	Maus monoklonal	a) 1:2000	Sigma
anti-Nephrin	Meerschweinchen polyklonal	a) 1:2000	Progen
anti-PGP9.5	Hase	a) 1:2000	Chemicon
anti-Spire-1	Hase	a) 1:350 c) 1:10	Kerkhoff Produktion/ Uni Regensburg
anti-Synaptopodin	Maus	a) 1:1000	Progen
anti-Tubulin	Maus	c) 1:100	Sigma
anti-WT-1	Maus polyklonal	b) 1:800	Santa Cruz

<b>Sekundäre Antikörper</b>			<b>Firma</b>
Esel anti Maus		1:40000	Jackson
Esel anti Hase		1:10000	Jackson
Esel anti Meerschweinchen		1:20000	Jackson
Biotinylierter anti-Hase IgG		1:200	Vektor Labs

#### 2.4. Verwendete Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Amplicon</b>	<b>GenBank</b>
<b>Nephrin forward</b>	TTG GTT CAG ACC ACA CCA AC	110 bp	AF 191090
<b>Nephrin reverse</b>	TTC CAC TCC AGT CCT ACCG	gDNA >3100	
<b>PGP9.5 forward</b>	AGC TGG AAT TTG AGG ATG GA	111 bp	gi 25058056
<b>PGP9.5 reverse</b>	GGC CTC GTT CTT CTC GAA A	keine gDNA	
<b>Spire-1 forward</b>	CTG GAG GAC CTG AAA AAT GC	116 bp	NM_ 194355
<b>Spire-1 reverse</b>	ATG GGC AGA GGG TTG TAC TG	keine gDNA	
<b>Synaptopodin forward</b>	GAA GAG GCC GAT TGA CAG AG	94 bp	AK 158933
<b>Synaptopodin reverse</b>	TCG TTT TCG GTG AAG CTT TGT	gDNA > 5500 bp	

## 3. Methoden

### 3.1. Zellen

#### 3.1.1. Zellkultur

Mit der Differenzierung geht die typische Morphogenese einer Zelle einher, je differenzierter die Zelle desto typischer die Morphologie. Molekularbiologisch äußert sich die Differenzierung einer Zelle in der Expression von für die Zellart benötigten Genen. Die Differenzierung kann durch das im Medium hinzugefügte  $\gamma$ -Interferon unterbunden werden.

Die in der Arbeit verwendeten Podozyten wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Fa. Sarstedt) gezüchtet. Sie wurden mit 15 ml Nährmedium bedeckt, das aus RPMI 1640 und 10% fötalem Kälberserum (FCS), 15 mmol/L HEPES und 1 mmol/L Natriumpyruvat bestand (alles Fa. Gibco).

#### Undifferenzierte Podozyten:

Das Medium für die Zellkultivierung der undifferenzierten Zellen enthielt 10 U/ml  $\gamma$ -Interferon. Die Zellen wurden im Zellinkubator (Fa. Heraeus) bei einer Temperatur von 32°C und einem Luft-CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% inkubiert. Nach einer drei- bis viertägigen Wachstums- und Vermehrungsphase im Zellinkubator wurden die Zellen ausgedünnt. In einer sterilen Zellkulturwerkbank wurde dazu das alte Medium durch Absaugen (Pumpe Laboport, Fa. KNF) entfernt, die Zellen einmal kurz mit PBS gespült und für 1 min mit 3 ml Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) bei RT angedaut. Zum Stoppen der Proteolyse wurden 7 ml Nährmedium dazugegeben und die suspendierten Zellen nach der gewünschten Konzentration in eine neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Meist wurden dabei 1:5 Verdünnungen hergestellt. Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage zur Erneuerung des  $\gamma$ -Interferons.

#### Differenzierte Podozyten:

Die Zellen wurden in Abwesenheit von  $\gamma$ -Interferon bei einer Temperatur von 37°C und einem Luft-CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% für mindestens 14 Tage ausdifferenziert. Die Ausdünnung zur Weiterkultivierung erfolge wie bei den undifferenzierten Zellen (s.o.).

## 3.2. Proteinbiochemie

### 3.2.1. Gelelektrophorese

Bei der Proteinelektrophorese kommt es zu Ionenwanderungen innerhalb eines von einem Polyacrylamidgel getragenen elektrischen Feldes. Je nach Anzahl der sauren und basischen Aminosäuren haben die Proteine eine unterschiedliche Gesamtladung und einen unterschiedlichen pK-Wert. Wird ein geladenes Molekül in ein elektrisches Feld gebracht, so ist die elektrophoretische Beweglichkeit des Moleküls proportional zur elektrischen Feldstärke und seiner Ionenladung, und umgekehrt proportional zu seiner Größe. Weiter hängt die Beweglichkeit des Proteins von seiner Gestalt, dem pH-Wert, der Temperatur, der Ionenstärke des Puffers und der Porengröße des Gels ab. Das Gel variiert in seinem Verlauf im Vernetzungsgrad, wodurch ein Siebeffekt entsteht, der die Moleküle sowohl nach ihrer Ladung als auch nach ihrer Größe trennt.

Durch Vorbehandlung der Protein- Proben mit SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat), einem anionischen Detergens, werden Proteine negativ geladen, wobei die Anzahl der negativen Ladungen proportional zur Proteingröße ist. Dadurch wird in der Gelelektrophorese eine Auftrennung ihrer Größe nach möglich: je kleiner ein Protein, desto schneller wandert es von der Kathode zur Anode. Der Siebeffekt des Gels, dessen Poren zur Anode hin durch höhere Agarosekonzentration enger werden, ermöglicht eine Auftrennung der Proteine der Größe nach.

Um die Laufweite eines Proteins ablesen zu können, lässt man sogenannte Marker im elektrischen Feld mitlaufen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Marker SeeBlue (Fa. Invitrogen) verwendet. Diese Marker-Proteine sind mit einem blauen Farbstoff gekoppelt. Die Molekulargewichte der Marker-Proteine sind bekannt, wodurch man die Molekulargewichte der zu detektierenden Proteine ablesen kann.

#### Molekulargewichte der Markerproteine:

Myosin, 191 kD

Phosphorylase, 97 kD

BSA, 64 kD

Glutamat Dehydrogenase, 51 kD

Alkohol Dehydrogenase, 39 kD

Carbonanhydrase, 28 kD

Myoglobin Rot, 19 kD

Lysozym, 14 kD

### 3.2.2. Lysatherstellung

Kultivierte Podozyten und Nierenzellen wurden mit T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Fa. Pierce) und Complete Proteasehemmstoff (Fa. Roche) lysiert. Dazu wurde ein Zellpellet suspensierter Zellen pro mg Pellet mit 10 µl T-PER Lysepuffer versetzt und die Zellen in Lösung gebracht. Gewebe wurde mit 1 ml Lysepuffer pro 0,1 g Gewebe versetzt und mit einem Pistill mechanisch zerkleinert. Nach 15-minütiger Einwirkzeit auf Eis wurde die Suspension 20 min bei 16100x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, vorgekühltes Probengefäß überführt. Reste des Überstandes, die nicht gleich zur Elektrophorese verwendet wurden, wurden bei -80°C gelagert.

### 3.2.3. Protein- Konzentrationsbestimmung am NanoDrop

Zur Konzentrationsbestimmung des in den Lysaten enthaltenen Gesamtproteins wurde ein NanoDrop der Firma PeqLab verwendet. Dies ist ein Spektrophotometer zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, Proteinen, Fluoreszenzfarbstoffen u.a. Das Prinzip beruht auf einer photometrischen Messung. Dazu wird 1 µl der zu untersuchenden Probe auf einen Träger pipettiert, das Gerät geschlossen, die Absorption/Extinktion vom Gerät gemessen und ins Verhältnis zu Wasser gesetzt. Dadurch lässt sich die Proteinkonzentration in der Probe berechnen.

Nach der Konzentrationsmessung am NanoDrop wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate mit T-PER aneinander angeglichen.

### 3.2.4. Auftrennung der Proteine

Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge 4x LDS (NuPage Ladungspuffer + 0,4 M DTT) versetzt und zur vollständigen Denaturierung 10 min bei 72°C erhitzt. Für das Auftrennen von Proteinen wurden vorgefertigte, reduzierende 4-12% NuPage Bis-Tris Gradientengele (Fa. Invitrogen) benutzt. Das Gel wurde kurz mit Wasser gespült, um Reste des zur Konservierung verwendeten Butylalkohols zu entfernen. Danach wurden die Taschen der Gele mit 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) Laufpuffer gespült (bestehend aus 50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA). Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (Fa. Invitrogen) eingespannt und diese vollständig mit Laufpuffer aufgefüllt.

Nach Beladen der Taschen wurde über ein Netzgerät (Fa. Biorad) eine Stromstärke von 60 mA pro Gel angelegt. Diese Stromstärke wurde beibehalten, bis die ersten Proteine das untere Ende des Gels erreicht hatten.

### **3.2.5. Western Blot**

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

Zum Proteintransfer wurde eine X Cell II Blot Module (Fa. Invitrogen) verwendet. Der Blot erfolgte im Sandwichverfahren zwischen drei Filterpapieren (Whatman, Fa. Schleicher und Schnell). Dazu wurde die vor Gebrauch ca. 2 min mit Methanol aktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Gel gebracht, zwischen je drei Whatman Papiere gelegt und mit je drei Schwämmen in der Blotting-Apparatur fixiert. Die Fixierung erfolgte so, dass das Gel der Kathodenseite, die Membran der Anodenseite zugewandt war. Die negativ geladenen Proteine wandern so aus dem zur Kathodenseite gewandten Gel auf die zur Anodenseite gewandte Membran. Die Novex Mini Cell wurde dann mit Blotpuffer (25 mM Tris Base, 0,192 M Glycin, 20% Methanol in Aqua dest.) aufgefüllt. Der Transfer fand bei einer Spannung von konstant 30 Volt und einer Temperatur von 4°C über 60 min statt.

Beim Immunoblot werden durch Gelelektrophorese getrennte und auf eine Membran transferierte Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Antikörper binden hierbei nicht-kovalent an ihr Antigen. Die PVDF-Membran wurde nach der Entnahme aus der Transfereinheit kurz mit TBST gespült und dann mit in TBST gelöstem 5% bzw. 3% Magermilchpulver für 45 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach kurzem Waschen mit TBST wurde die Membran mit einem Antikörper (gelöst in Superblock, Fa. Pierce) bei 4°C über Nacht auf einem Taumler (Fa. Biometra) inkubiert. Nach Entfernen des primären Antikörpers wurde die Membran in reichlich TBST unter viermaligem Wechsel über 40 min gewaschen. Danach wurde der sekundäre, Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Der Antikörper wurde in 20 ml 5% bzw. 3% Magermilchpulver

in TBST gelöst auf die Membran gegeben. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers waren weitere Waschschriffe mit TBST über 40 min und mehrmaligem Pufferwechsel nötig. Auch die Waschschriffe erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Taumler.

Der Immunkomplex aus Antigen, Primär- und Sekundärantikörper wird mit Hilfe eines Enzymkonjugates sichtbar gemacht. Um den Effekt zu verstärken, erfolgt die Detektion indirekt über markierte „Zweitantikörper“, die gegen den am Antigen gebundenen „Erstantikörper“ gerichtet sind. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der Detektion. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Detektion mit ECL SuperSignal (Fa. Pierce). Es funktioniert nach dem Prinzip der hochsensitiven Chemilumineszenz. Diese basiert darauf, dass die an die Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase in Anwesenheit von  $H_2O_2$  Luminol oxidiert. Dabei wird Licht freigesetzt, das nach entsprechender Belichtungszeit in einer Filmkassette einen Röntgenfilm (Fa. Fuji, Fa. GE) belichtet. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm in einem Entwicklungsautomaten (Fa. Agfa).

Die Sensitivität des Western Blots liegt mit diesem Detektionssystem in einem Bereich von 10 bis 100 femtoMol. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 50 kD ca. 0,5 bis 5 ng Protein.

### **3.3. Mikrodissektion**

Zur Mikrodissektion wurde das Lasermikroskop P.A.L.M. Micro Beam der Firma Zeiss verwendet. Der Nutzen der Mikrodissektion liegt in der selektiven Kollektion von Gewebe. Die gewünschte Gewebestruktur wird dabei auf einem Bildschirm mit Hilfe des Programms ABI Prism markiert. Entlang dieser Markierung schneidet in einem nächsten Schritt das Lasermikroskop das markierte Gewebe aus und katapultiert es mit Licht in ein über dem Objektträger angebrachtes 0,5 ml Eppendorfgefäß. So ist es möglich, eine reine Glomeruliprobe zu erhalten, die ohne tubuläre „Verunreinigung“ ist. Es wurden zunächst Gefrierschnitte von Mausnieren mit einer Dicke von 9  $\mu m$  an einem Kryostat der Firma Microm angefertigt. Dafür wurden beschichtete Objektträger der Firma Zeiss verwendet, die zuvor mit einem UV-Crosslinker für 10 s zwecks besserer Aufnahmefähigkeit für das Gewebe vorbehandelt wurden. Die Färbung der Gefrierschnitte erfolgte durch eine Kresylviolett-Färbung nach einem Protokoll für Gefrierschnitte von Zeiss (s.u.). Nach 15 min

Trockenzeit wurde sofort im Anschluss mit der Lasermikrodissektion begonnen. Bei der vorliegenden Arbeit wurden 350 Glomeruli pro Tier gesammelt. Sie wurden dabei in ein RNA-freies 0,5 ml Eppendorfgefäß katapultiert, das direkt über dem Objektträger befestigt war und in dessen Kappe zuvor 40 µl RLT Puffer der Firma Qiagen pipettiert wurden. Der Puffer war pro 1 ml mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt, welches zuvor unter einem Abzug dazupipettiert wurde. Nach Beenden der Mikrodissektion wurde das Eppendorfgefäß vorsichtig aus seiner Halterung genommen, 310 µl Puffer hinzugefügt, und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### **3.3.1 Färbeprotokoll Kresylviolett für Mikrodissektion**

Aus den in Tissue Tek eingebetteten und auf -80°C gefrorenen Nierenstücken wurden in einem Kryostat der Firma Microm Gefrierschnitte bei einer Temperatur von -24°C angefertigt. Diese wurden umgehend nach einem Protokoll der Firma Zeiss angefärbt. Hierfür wurde zuerst der fertige Gefrierschnitt zur Fixation für 3 min in kaltes 100%-iges Ethanol gegeben. Danach wurde der Schnitt für 60 s in 1%-ige Kresylviolett-Acetat-Lösung gegeben. Die überschüssige Farbe wurde entfernt, danach wurde der gefärbte Schnitt in 70%-igem Ethanol bzw. 100%-igem Ethanol für je 30 s gegeben. Das Trocknen der Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur. Die gefärbten Schnitte wurden nach 15 min Trockenzeit mikrodisseziert.

## **3.4. Molekularbiologie**

### **3.4.1. RNA- Isolation**

Für die Extraktion von RNA aus Mausnieren wurde ein RNeasy Micro Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Dabei werden die selektiven Bindungseigenschaften einer auf Silika-Gel basierenden Membran genutzt. In den speziellen Säulen wurde die Gesamt-RNA an das Gel gebunden und Proteine und DNA in drei aufeinander folgenden Waschschritten abgetrennt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und 8000x g. Die durch Mikrodissektion gewonnenen Glomeruli in 350 µl RLT-Puffer wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 30 s gevortext und mit 80% Ethanol auf ein Volumen von 700 µl aufgefüllt. Das Ethanol diente dazu in der Säule gute Bindungskonditionen zu schaffen. Der RLT-Puffer lysierte und homogenisierte

das Gewebe. Ein wichtiger Bestandteil des Puffers war das stark denaturierend wirkende Guanidinisothiocyanat, das ebenfalls vorhandene RNAsen sofort inhibiert. Nach Mischen der Proben durch zehnmaliges auf- und abpipettieren wurden diese auf die RNeasy- Säulen gegeben und 15 s zentrifugiert. Die enthaltene RNA band in dieser Zeit an die Säule, das Eluat wurde verworfen. Nach Zugabe von 350 µl Waschpuffer RW1 auf die Membran in der Säule wurde wieder 15 s zentrifugiert und das Eluat verworfen. In einem gesonderten Eppendorfgefäß wurden nun 10 µl DNase mit 70 µl RDD-Puffer ordentlich gemischt, mittig auf die Säule gegeben und zum DNA-Verdau 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen, 15 s zentrifugiert, und das Eluat verworfen. Nach Transferieren in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß wurde die Säule zur Entfernung möglicher Kontaminationsreste mit 500 µl RPE- Puffer versetzt und anschließend für 15 s zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, 500 µl Ethanol auf die Säule gegeben und erneut 2 min zentrifugiert. Nach Überführen in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß wurde 5 min bei 16100x g zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Zur Elution der gebundenen RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt, 30 µl RNase- freies Wasser dazu pipettiert, 2 min inkubiert und 1 min zentrifugiert. Die nun in dem Eppendorfgefäß befindliche isolierte RNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **3.4.2. cDNA-Synthese**

Die aus Glomeruli extrahierte Gesamt-RNA wurde revers in cDNA transkribiert, die als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden qPCR-Reaktionen diente. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus dem Moloney-Murine Leukemia-Virus (=MMLV-RT, Fa. Invitrogen), die die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aufweist. Eventuell vorhandene RNAsen wurden durch Zusatz eines RNase-Hemmstoffes inaktiviert. Zur reversen Transkription wurden 20 µl RNA in Wasser mit 2 µl Random Hexamer Primer (Fa. Invitrogen) und 2 µl dNTPs (Fa. Invitrogen) versetzt. Dieser Ansatz wurde 5 min auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, und anschließend für 5 min auf Eis herunter gekühlt. Dies verhinderte die Neubildung der RNA-Sekundärstruktur und ermöglichte die Hybridisierung der Primer. Der Ansatz wurde mit 8 µl First Strand Puffer (Fa. Invitrogen), 4 µl 0,1M DTT (Fa. Invitrogen), 2 µl MMLV-Reverse

Transkriptase (Fa. Invitrogen) und 2 µl des RNase-Inhibitors RNaseOUT (Fa. Invitrogen) versetzt. Die Reverse Transkriptase arbeitete 50 min bei 37°C und wurde anschließend für 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert (Thermocycler Firma Biometra). Die hergestellte cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

### **3.4.3. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)**

Die real time quantitative PCR, kurz RTq-PCR oder einfach qPCR, ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, bei der zusätzlich eine Quantifizierung der hergestellten DNA durch Fluoreszenzmessungen während der Amplifikation möglich ist; daher der Name „real time“. Sie basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR.

Bei der herkömmlichen PCR (Polymerase Chain Reaction) wiederholt sich ein Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension, wobei ein definierter Abschnitt eines DNA-Moleküls logarithmisch amplifiziert wird. Sie dient in erster Linie der Vervielfältigung und dem Nachweis eines bestimmten Genabschnitts in einer Probe.

Die qPCR erlaubt eine Aussage über die Menge eines bestimmten DNA-Fragmentes innerhalb einer Probe. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Diese interkalieren in die DNA. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzstoff SYBR-Green (Fa. ABS) verwendet. Für die qPCR wurde ein PCR-Gerät der Firma ABS verwendet. Es wurden zu 1,5 µl cDNA je 1,25 µl Forward und Reverse Primer 900 nM, 0,25 µl Standard Dye und 6,25 µl SYBR-Green Mix pipettiert. Als Referenz wurde 18S verwendet, dessen cDNA 1:500 verdünnt wurde. Der Zweck der Anwendung der qPCR in dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob im pathologischen Zustand in den Podozyten der Glomeruli das Protein Spire-1 eventuell mehr oder weniger exprimiert wird.

### **3.5. Enzyme- linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der ELISA dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen, Viren, Hormonen und anderen Stoffen aus Proben, wie z.B. Blut oder Urin. Der Test basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Dazu wird ein spezifischer monoklonaler Antikörper an eine 96-Loch- Mikrotiterplatte gebunden. Danach wird die Probe hinzugegeben. Dabei

binden die evtl. in der Probe vorhandenen Inhaltsstoffe (Antigene) an den Antikörper in der Mikrotiterplatte. Nach Ablauf der Inkubationszeit und mehreren Waschschritten sind die ungebundenen Bestandteile entfernt, und es bleibt nur das am Antikörper gebundene Antigen in der Platte zurück. Danach wird ein Meerrettichperoxidasegekoppelter Zweitantikörper hinzugegeben, der nun ebenfalls an das Antigen bindet. Durch Zugabe eines Peroxidasesubstrats kommt es zur Farbentwicklung. Die Intensität der Farbentwicklung ist dabei proportional zur Menge des Antigens. Der Farbumschlag wird fotometrisch erfasst und mittels Standard in eine Konzentrationsangabe umgerechnet.

In dieser Arbeit wurde ein ELISA-Kit (Fa. Bethyl) verwendet. Alle verwendeten Materialien und Reagenzien wurden dem Kit entnommen. Die verwendeten 96-Loch-Flachboden-Platten wurden mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette (Fa. Labsystems) mit dem Erstantikörper versetzt. Dazu wurde der Antikörper (anti-Mausalbumin aus Ziege, Verdünnung 1:100) mit dem Bindungspuffer (0,05 M Carbonat-Bikarbonat pH 9,6) vermischt und auf der Mikrotiterplatte bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Abwaschen der nicht gebundenen Reste mit Waschlösung (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0) wurden alle nicht besetzten Bindungsstellen mit Blocklösung (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, pH 8,0) behandelt. Das enthaltene BSA besetzte in der 30-minütigen Inkubationszeit die noch freien Bindungsstellen. Wieder folgte ein Waschschriff. Die zu untersuchenden Urinproben wurden nach einem ungefähren Anhaltspunkt durch U-Stix verdünnt, hinzugegeben, und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschriff, um nicht gebundenes Albumin zu entfernen. Zu dem so gebundenen Albumin wurde der mit einem Enzym gekoppelte Zweitantikörper (anti-Mausalbumin aus Ziege, Meerrettichperoxidase gekoppelt 1:20000) hinzugegeben und ebenfalls 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschriff. Um die gekoppelten Antikörper sichtbar zu machen, wurde das mitgelieferte Enzymsubstratgemisch hinzugegeben und 5 bis max. 10 min, je nach Farbumschlag, inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl 2 M Schwefelsäure wurde diese Reaktion gestoppt. Zur Auswertung wurde ein ELISA Lesegerät (Microplate Reader, MRX) verwendet.

#### **3.6. Kreatinin- und Harnstoffbestimmung**

Die Urinproben wurden zur Kreatinin- und Harnstoffbestimmung in das Zentrallabor der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gegeben.

### **3.7. Histologie**

#### **3.7.1. Allgemeines**

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung von Gewebeschnitten der Versuchs- und Kontrolltiere histologische und immunhistologische Färbungen angefertigt. Die Einbettung der Gewebeproben und Anfertigung der Schnitte wurden von Frau Mariola Reszka durchgeführt. Im Allgemeinen fertigte sie je nach Fragestellung Schnitte von 1-3 µm Dicke an.

##### **3.7.1.1. Prinzip der Immunhistologie**

Grundlegendes Ziel der Immunhistologie ist es, mittels Antigen-Antikörperreaktion definierte Epitope auf oder in Zellen zu identifizieren. Das Epitop wird durch einen spezifischen Erstantikörper gebunden. Nach entsprechender Bindungszeit wird das Fc-Fragment des Erstantikörpers mit Hilfe eines Zweitantikörpers detektiert. Die Auswahl des sekundären Antikörpers richtete sich nach der Herkunftsspezies des verwendeten primären Antikörpers. Der Zweitantikörper ist entweder mit einem Enzym, mit dem Vitamin Biotin oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Der so gebildete Antikörper-Antikörper Komplex wird entweder durch enzymatische Farbreaktion oder durch Fluoreszenz sichtbar gemacht.

##### **3.7.1.2. Streptavidin-Biotin-Komplex**

Die Darstellung der Antigene erfolgte teilweise mit der indirekten Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode. Sie beruht auf der Affinität von Streptavidin - einem Protein aus *Streptomyces avidinii*- zum Vitamin Biotin. Der an das Antigen gebundene spezifische Erstantikörper wird mit einem Biotin gekoppelten sekundären, gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichteten Epitop gebunden. Der Nachweis des Sekundärantikörpers geschieht dann durch das mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Biotin. Der verwendete Streptavidin-Komplex hat vier Bindungsstellen für Biotin. Zur Vorbereitung wurde Substanz A (Streptavidin-Komplex) mit Substanz B (Biotin gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) 20 min vor der Anwendung gemischt. In dieser Zeit besetzte im Idealfall Biotin drei der vier freien Bindungsstellen des Avidin-Komplexes. Bei der nachfolgenden Inkubation mit den Proben war die letzte Stelle des AB-Komplexes frei für die Bindung des Biotins am sekundären Antikörper.

### 3.7.1.3. Neufuchsin Entwicklungslösung

Die mit dem AB-Komplex gefärbten Schnitte wurden in einem Bad mit Neufuchsinlösung im Dunkeln farentwickelt. Dazu wurden 300 mg Natriumnitrit in 7,5 ml Aqua dest. gelöst und mit Neufuchsin Stammlösung (2,5 g Neufuchsin, Fa. Serva und 50 ml 2 N Salzsäure, Fa. Merck) gemischt. Dann wurden 150 ml TNT Puffer (6,35 g Tris, 9 g NaCl, 25 ml 1 M HCL alles Fa. Merck, 1 g Tween 20, Fa. Sigma, in 1025 ml Aqua dest.) hinzugegeben. Diesem Gemisch wurden 750 µl einer Naphtol-Lösung (20 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat, Fa. Fluka und 9375 mg NN-Dimethylformamid, Fa. Sigma) zugefügt und vermengt. Die an das Biotin gekoppelte alkalische Phosphatase spaltete Phosphat vom Naphtol-AS-Bi-Phosphat ab, das dann mit dem Neufuchsin einen unlöslichen Farbkomplex bildete. Zellen, die spezifische Färbungen aufwiesen, stellten sich nach dieser Entwicklung rot dar.

### 3.7.2. Zellen

#### 3.7.2.1. Aktin-, $\alpha$ -Tubulin-, Spire-1- Immunfluoreszenzfärbung

##### Vorbereitung:

Differenzierte und undifferenzierte Podozyten wurden in 12-Loch-Platten (Fa. Corning) auf Deckgläsern ausgesät. Dazu wurde je ein steriles Deckglas (Fa. VWR, Durchmesser 12 mm) pro Loch mit Kollagen Typ I Lösung (Fa. Sigma) versetzt und eine Stunde bei 37°C bzw. bei 32°C mit  $\gamma$ -Interferon inkubiert. Nach Abnehmen der Kollagenlösung, Trocknen der Deckgläser und Vorlage von 10%igem Nährmedium wurden 50 bis 300 µl einer Podozytensuspension zugegeben und bei 37°C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 1%-iges Nährmedium ausgetauscht. Das Ziel war dabei den eventuellen Einfluss von BSA im Nährmedium auf die Morphologie der Podozyten so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurde Puromycin in einer Konzentration von 100 µg/ml auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zur Fixierung mit 200 µl Fixierlösung (16% PFA, 40% Sucrose in PBS) versetzt. Nach 8 min bei Raumtemperatur wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen dreimal für jeweils 10 min mit PBS gewaschen, bis sie schließlich luftdicht in PBS bei 4°C gelagert wurden.

### Färbung:

Diese Färbung diente dem Nachweis der zytoskelettalen Proteine Aktin und  $\alpha$ -Tubulin und der Untersuchung der Lokalisation und Verteilung von Spire-1 mit und ohne Puromycin-Behandlung in differenzierten und undifferenzierten Podozyten. Die Zellen wurden 30 min mit Blockpuffer (Triton-X 0,05% und 5% PBS Fa. Sigma) versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem Erstantikörper in Blockpuffer in einer Konzentration von 1:10 für Spire-1, 1:100 für  $\alpha$ -Tubulin und 1:200 für Aktin. Nach dreimaligem Waschen der Zellen für 5 min mit PBS wurde der Zweitantikörper für  $\alpha$ -Tubulin CY5 anti-Maus und biotinylierter anti-Hase in Blockpuffer gemischt und in einer Konzentration von 1:100 zugegeben. Die Inkubation erfolgte 30 min im Dunkeln. Es folgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift für 5 min mit PBS. Danach wurde Phalloidin, ein das filamentöse Aktin des Zytoskeletts rot anfärbender Farbstoff, in einer Konzentration von 1:200 mit Avidin FITC, einem das Protein Spire-1 grün anfärbenden Farbstoff, in einer Konzentration von 1:100 versetzt. Es folgte eine Inkubation von 30 min im Dunkeln. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS für 10 min wurden die Zellen auf den Deckplättchen in Fluoromount eingedeckt.

### **3.7.3. Nierengewebe**

#### **3.7.3.1. PAS-Färbung**

Die PAS-Färbung wurde zur allgemeinen Beurteilung der Morphologie der Glomeruli, insbesondere der Podozyten, angefertigt. In der PAS-Färbung kommt es durch Perjodsäure zur Oxydation von Glykolgruppen zu Aldehydgruppen, diese reagieren mit dem Schiff'schen Reagenz, wodurch es zu dem charakteristischen magenta-roten Farbumschlag kommt.

Die Gewebeschnitte wurden 15 min in Perjodsäure 1% (Fa. Merck) gegeben. Nach Abwaschen der Reste für 3 min unter fließendem Leitungswasser und Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte für 40 min in Schiff'sches Reagenz (Fa. Sigma) gegeben. Nach Waschen unter fließendem Leitungswasser und in Aqua dest. wurden die Schnitte für 10 min in Hämatoxylin nach Böhmer gefärbt. Nach Abwaschen der Rückstände wurden die Schnitte mit Deckgläsern (Fa. Menzel) eingedeckt.

### **3.7.3.2. WT1 Neufuchsin- Färbung**

Ziel der Färbung ist die spezifische Darstellung der Podozyten zur Identifizierung, Zählung und morphologischen Beurteilung. Hierzu wurden die in Paraffin gebetteten Schnitte vorerst deparaffiniert. Danach wurden sie in Zitratpuffer (pH 6,1) 35 min in der Mikrowelle gekocht und danach zur Kühlung für 15 min in Eiswasser gestellt. Es folgten drei Waschschriffe über 15 min mit Wasser. Nun wurden die unspezifischen Bindungsepitope für 30 min in 5%-igem Ziegenserum bei Raumtemperatur geblockt. Es folgte die Inkubation des Primärantikörpers mit einem Hase- Anti- WT1-Antikörper (1:800) der Firma Santa Cruz in 5% Ziegenserum bei 4°C über Nacht. Nach erneutem Waschen über 15 min mit PBS folgte die Inkubation mit biotinyliertem Ziegen Anti-Hasen IgG (Fa. Vector) 1:200 in 5% Ziegenserum für 30 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde erneut über 15 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Streptavidin AP 1:100 für 30 min bei Raumtemperatur, mit einem anschließenden Waschschriff mit PBS. Schließlich wurde die Neufuchsin Färbung durchgeführt und bis zur gewünschten Farbintensität entwickelt. Die Schnitte wurden in einer Lösung aus Gummi arabicum eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

### **3.7.3.3. Zellzählung von WT1- positiven Zellen**

Die Zellzählung der WT1-positiven Zellen erfolgte an einem Mikroskop der Firma Zeiss, die Dokumentation mit einer angeschlossenen Kamera. Es wurden je 50 Glomeruli ausgezählt und ihre Fläche und Durchmesser bestimmt. Anschließend wurden die Ergebnisse zur Prüfung der statistischen Signifikanz einem t-Test für unverbundene Proben unterzogen.

### **3.7.3.4. Spire-1 und Nephtrin- Immunfluoreszenzfärbung**

Spire-1 wurde mit dem Farbstoff Cy3 dargestellt, Nephtrin mit FITC. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte zuerst deparaffiniert. Danach wurden die Schnitte für 30 min bei 98°C mit 0,05% Citraconsäureanhydrid behandelt, danach für weitere 15 min bei Raumtemperatur. Es folgte ein dreimaliger Waschschriff mit PBS für je 5 min. Daraufhin wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5% Pferdeserum für 30 min bei RT geblockt und

Avidin D 1:25 hinzugegeben. Ungebundenes Pferdeserum und Avidin D wurden in 2 Waschschritten für je 2 min entfernt. Es folgte erneut ein dreimaliger Waschschriff mit PBS für je 5 min. Nun wurde der Primärantikörper gegen Spire-1 in einer Verdünnung von 1:100 sowie der Primärantikörper gegen Neph rin in einer Verdünnung von 1:50 über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde Biotin in einer Verdünnung von 1:25 hinzugegeben. Es folgte wieder ein dreimaliger Waschschriff mit PBS für je 5 min. Nun wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Meerschweinchen) 1:200 zusammen mit dem Chromogen Cy3 anti-Hase in einer Verdünnung von 1:100 hinzugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Es folgte erneut ein Block mit 5% Pferdeserum. Danach wurde wieder dreimalig mit PBS für je 5 min gewaschen. Zur Darstellung von Neph rin wurde anschließend das Chromogen FITC in einer Verdünnung von 1:100 für 30 min bei RT inkubiert. Zum Schutz der Fluoreszenz wurden die gefärbten Schnitte abschließend mit Fluoromount eingedeckt. Diese Färbung wurde von Frau Dr. Meyer-Schwesinger durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Das Adriamycin- Modell (Mausmodell)

Zur Untersuchung von Spire-1 im lebenden System wurde ein Mausexperiment mit zwei Gruppen durchgeführt. In jeder Gruppe gab es je sieben Tiere, davon drei Kontrolltiere und vier mit Adriamycin behandelte Tiere. Adriamycin wurde dem Körpergewicht angepasst intravenös in die Schwanzvene appliziert, die Kontrolltiere erhielten isotone Natriumchlorid-Lösung in die Schwanzvene. Zur Unterscheidung einer möglichen Sofortwirkung und einer Spätwirkung von Adriamycin auf die Expression von Spire-1 wurde bei der ersten Gruppe eine kurze Experimentdauer von 6 Tagen gewählt (Gruppe Tag 6, Kurzzeitgruppe), bei der zweiten Gruppe eine Dauer von 20 Tagen (Gruppe Tag 20, Langzeitgruppe). Die Organentnahme erfolgte dementsprechend an Tag 6 bzw. an Tag 20 nach Adriamycin-Gabe.

#### 4.1.1. Klinische Parameter

Zur allgemeinen Beurteilung des Krankheitsgrades der Tiere wurde als klinischer Parameter der Gewichtsverlust der Tiere im Verlauf des Experiments herangezogen. Hierfür wurden die Mäuse vor Beginn des Experiments und am Tag der Organentnahme gewogen. Es zeigte sich ein deutlicher Gewichtsverlust bei allen Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren am Ende des Experiments, der jedoch nicht signifikant war (Abb.6). Die Kontrolltiere hingegen zeigten eine signifikante Gewichtszunahme ( $p=0,03$ ).

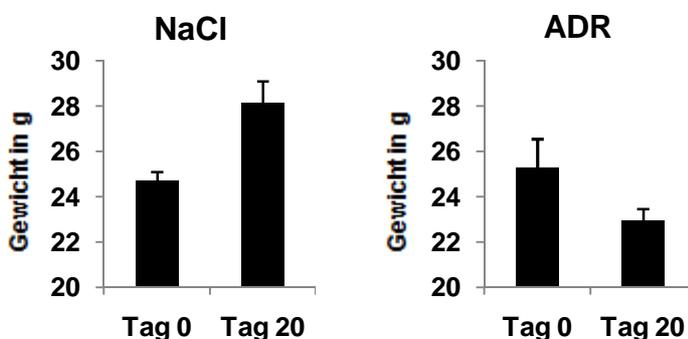


Abb.6: Körpergewicht der mit Adriamycin (ADR) behandelten Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl). Es zeigte sich wie erwartet ein Gewichtsverlust bei den ADR-behandelten Tieren (nicht signifikant). Es sind die Versuchstiere der Langzeitgruppe (Tag 20) dargestellt.

#### 4.1.2. Ergebnisse der Proteinurie-Analyse: Urin Albumin und Kreatinin

Das Leitsymptom der glomerulären Schädigung ist die Proteinurie. Albumin ist das im Urin hauptsächlich erscheinende Protein während einer Podozytenschädigung. Albumin im Urin wurde daher als Marker für den durch Adriamycin verursachten Schaden verwendet. Um diesen Schaden quantifizieren zu können, wurden Albumin-ELISA Untersuchungen durchgeführt. Zusätzlich wurde Kreatinin in den gewonnenen Urinproben durch das Zentrallabor der Uniklinik Eppendorf bestimmt. Es wurde dann ein Albumin-Kreatinin Quotient gebildet, um Unterschiede in der Urin-Ausscheidungs-Menge zu korrigieren.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche Albuminurie der Versuchstiere gegenüber den Kontrolltieren mit einem Anstieg um ca. eine Zehnerpotenz ab Tag 3 mit ansteigender Tendenz. Die maximale Proteinurie wurde am Tag 20 ermittelt, und zwar mit einem Anstieg um ca. 3 Zehnerpotenzen.

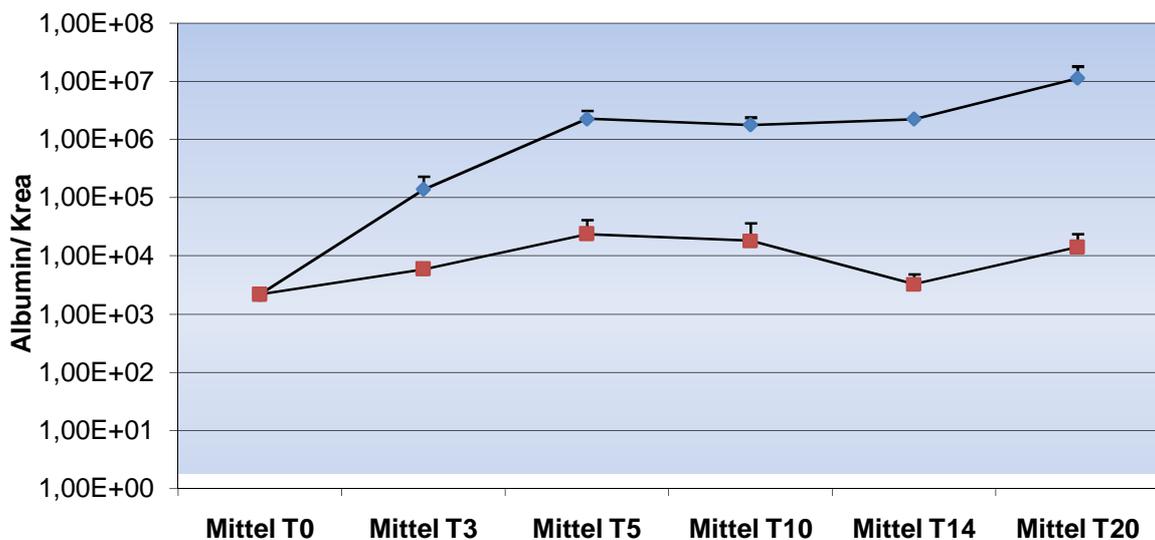


Abb.7: Graphische Darstellung der durch Albumin-ELISA ermittelten Proteinurie von Versuchstieren gegenüber Kontrolltieren. Die Skalierung ist logarithmisch, die Werte für Versuchs- und Kontrolltiere zum jeweiligen Zeitpunkt sind gemittelt (n=6-7). Die Kontrolltiere werden durch die roten Quadrate dargestellt, die Versuchstiere durch die blauen Rauten. Die beiden Versuchsgruppen (Tag 6 und Tag 20) wurden an den frühen Zeitpunkten zusammengeschlossen.

#### 4.1.3. Ergebnisse der Proteinexpressions-Untersuchungen: Western Blot

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden Western Blots aus Lysaten der Mausnieren erstellt. Untersucht wurden das Protein Spire-1 sowie das Schlitzmembranprotein Nephrin und das Nephrin-verankernde Protein  $\alpha$ -Aktinin-4. Die Gesamtprotein-Konzentrationen wurden am Nano-Drop bestimmt und in den Proben angeglichen. Um sicherzustellen, dass vergleichbare Mengen Protein in jeder Probe enthalten waren, wurde  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein gewählt, und die Banden der zu untersuchenden Proteine im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin quantitativ bewertet.

Das Protein Spire-1 zeigte in einigen Tieren der beiden behandelten Gruppen (Tötungstag 6 und 20) eine verringerte Expression unter Adriamycinbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.8a).

Die Expression des Schlitzmembranproteins Nephrin zeigte in der Kurzzeitgruppe eine Abnahme, in der Langzeitgruppe jedoch einen Anstieg in den Versuchstieren im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Abb.8b).

$\alpha$ -Aktinin-4 zeigte in der Kurzzeitgruppe eine Zunahme unter Adriamycinbehandlung. Dies konnte jedoch nur in der Kurzzeitgruppe gezeigt werden, die Langzeitgruppe zeigte diese Veränderung nicht (Abb.8c).

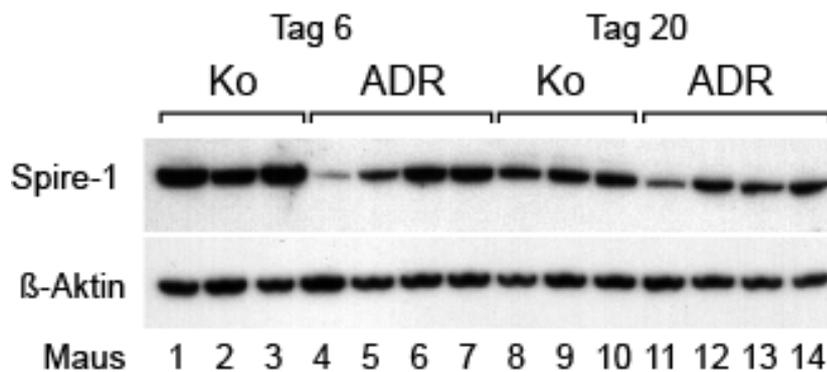


Abb.8a: Western Blot gegen Spire-1 aus Gesamtnierenlysat der Kontrolltiere (Ko) und der mit ADR behandelten Tiere an Tag 6 und Tag 20. Es zeigte sich bei einigen Tieren eine Abnahme der Spire-1 Konzentration in den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren an beiden Tagen.

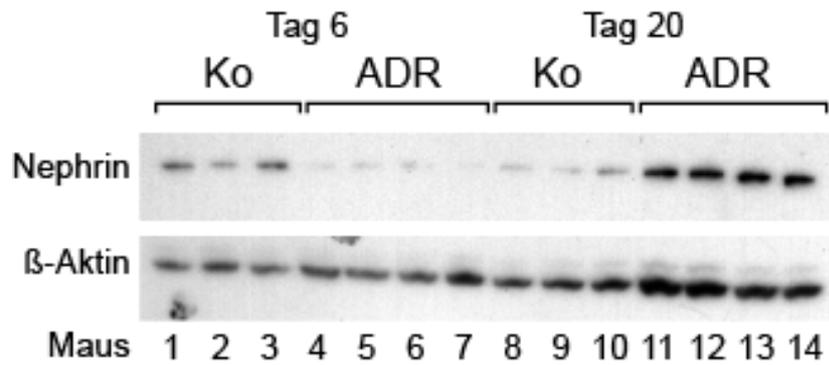


Abb.8b: Western Blot gegen Nephrin aus Gesamtnierenlysat der Kontrolltiere (Ko) und der mit ADR behandelten Tiere aus beiden Gruppen: Nephrin wird an Tag 6 durch ADR herunterreguliert und ist an Tag 20 verstärkt nachweisbar im Vergleich zu den Kontrolltieren.

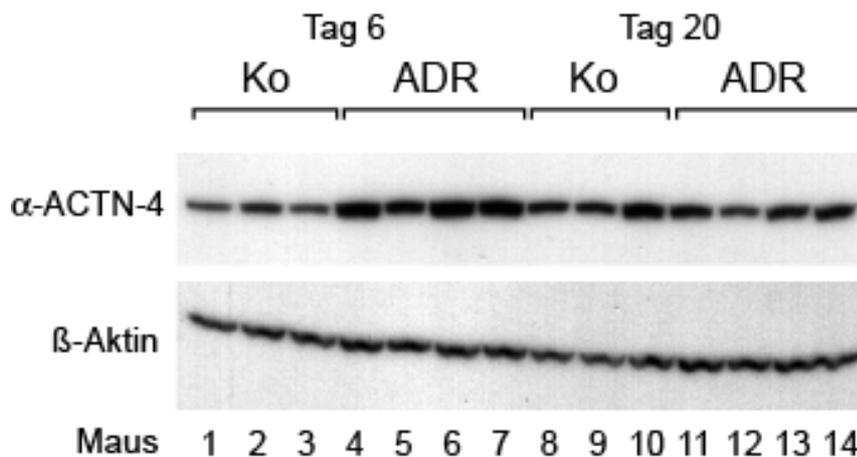


Abb.8c: Western Blot gegen  $\alpha$ -Actinin-4 aus Gesamtnierenlysat der Kontrolltiere (Ko) und der mit ADR behandelten Tiere aus beiden Gruppen:  $\alpha$ -Actinin-4 wird durch ADR am Tag 6 heraufreguliert. Tag 20 nach ADR Gabe ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.

#### 4.1.4. Ergebnisse der Genexpressions-Untersuchungen: qPCR

Zur Untersuchung der Genexpression von Spire-1 wurde Spire-1 mRNA durch quantitative PCR gemessen. Zur Materialgewinnung wurden Glomeruli mittels Mikrodissektion gesammelt. Diese Technik ermöglicht die isolierte Gewinnung einer bestimmten Struktur innerhalb eines Gewebeschnittes. Aus Gefrierschnitten wird hierbei mittels mikroskopisch gesteuerter Laserdissektion die gewünschte Struktur ausgeschnitten. Somit war es möglich reine Glomeruliprobe ohne tubuläre „Verunreinigung“ zu erhalten. Nach mehreren Probedurchgängen stellte sich heraus, dass es nötig war, 350 Glomeruli pro Maus zu sammeln, um die Nachweisgrenze von Spire-1 zu erreichen. Ferner wurde die Expression des Fußfortsatzproteins Synaptopodin, der Ubiquitinligase PGP9.5 und des Schlitzmembran-Proteins Nephtrin untersucht. Synaptopodin und Nephtrin dienten hierbei als Vertreter der Fußfortsatz- bzw. Schlitzmembran- Proteine. PGP9.5 ist ein zytosolisches Protein, das die Ubiquitinierung und somit die Proteinolyse aktiviert. Als Referenz diente ribosomale 18S RNA. Beide Versuchsgruppen wurden getrennt voneinander analysiert.

Ergebnisse der Kurzzeitgruppe: Die Genexpression von Spire-1 war in den mit Adriamycin behandelten Mäusen niedriger als in den Kontrolltieren (Abb.9a). Diese Verminderung war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz hierzu erhöhte sich die Expression der Ubiquitinligase PGP9.5, sie wurde unter Adriamycinbehandlung signifikant verstärkt exprimiert ( $p=0,04$ ; Abb.9a). Stark vermindert war die Expression von Synaptopodin. Diese war in der Kurzzeitgruppe aufgrund des hohen Standardfehlers der Kontrollgruppe jedoch noch nicht signifikant (Abb.9a), was sich in der Langzeitgruppe anders zeigte (s.u.). Nephtrin als Schlitzmembran- Protein fiel signifikant in der Expression ( $p=0,03$ ; Abb.9a).

Ergebnisse der Langzeitgruppe: Die Ergebnisse für Spire-1, PGP9.5, Synaptopodin und Nephtrin der Langzeitgruppe zeigten die gleichen Tendenzen wie die der Kurzzeitgruppe. Spire-1 wurde unter ADR- Behandlung ebenfalls vermindert exprimiert, jedoch auch hier nicht signifikant (Abb. 9b). PGP9.5 zeigte sich -wie in der Kurzzeitgruppe auch- signifikant erhöht exprimiert ( $p=0,01$ ; Abb.9b). Synaptopodin fiel signifikant in der Expression ( $p=0,005$ ; Abb.9b), was in der Kurzzeitgruppe wegen des hohen Standardfehlers nicht der Fall gewesen war. Nephtrin fiel wie in der Kurzzeitgruppe signifikant ( $p=0,006$ ; Abb.9b).

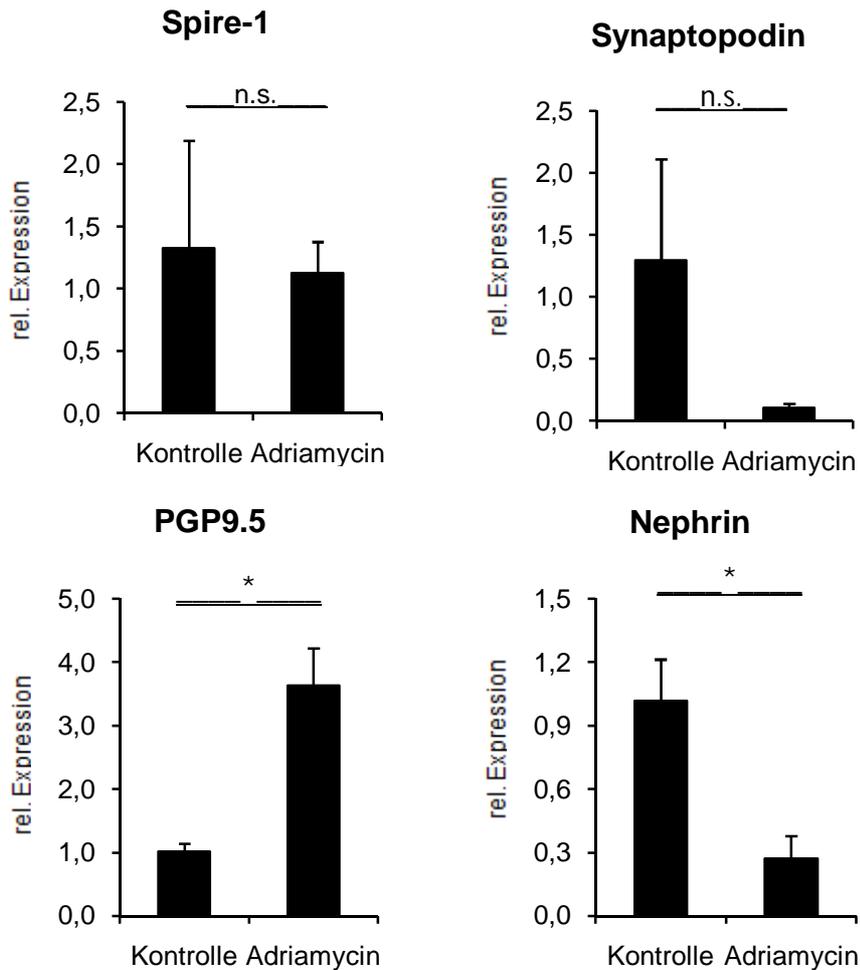


Abb.9a: Relative Expression der Proteine Spire-1, PGP9.5, Synaptopodin und Nephrin in den mit Adriamycin behandelten Tieren der Kurzzeitgruppe (Tag 6) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine nicht signifikante Verminderung der Expression von Spire-1. Die Expression von PGP9.5 war signifikant erhöht ( $p=0,04$ ). Synaptopodin fiel in der Expression, jedoch aufgrund des hohen Standardfehlers in der Kontrollgruppe nicht signifikant. Die Expression von Nephrin stellte sich als signifikant vermindert dar ( $p=0,03$ ).

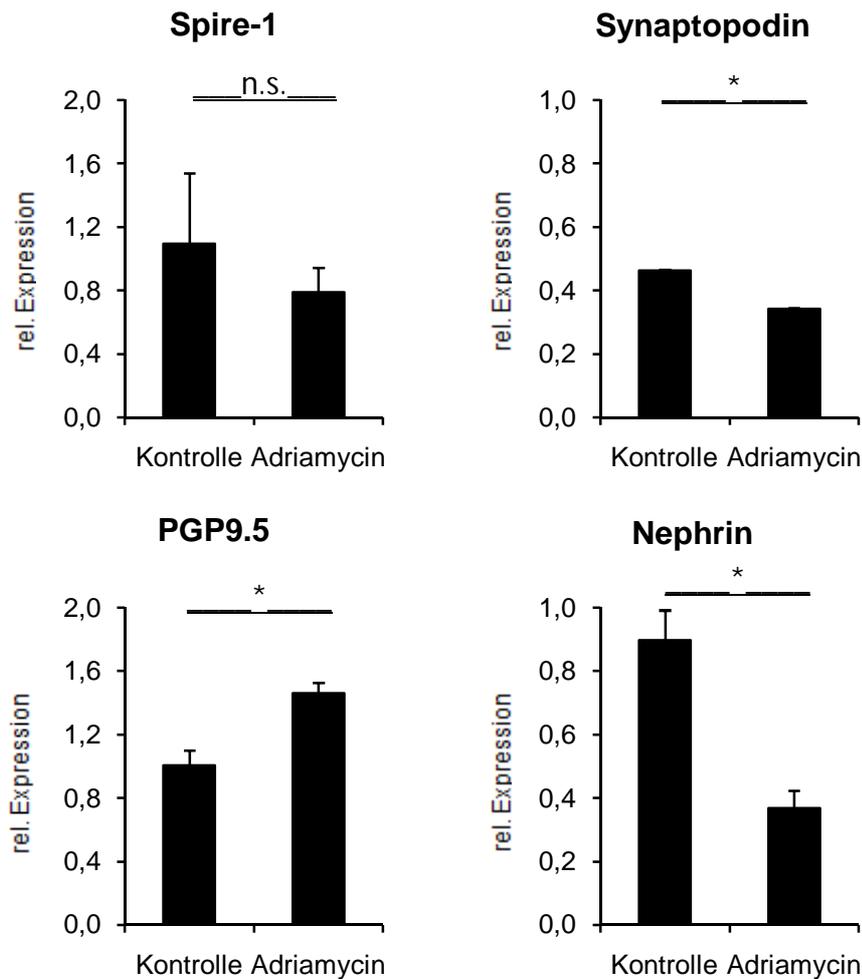


Abb.9b: Relative Expression der Proteine Spire-1, PGP9.5, Synaptopodin und Nephrin in den mit Adriamycin behandelten Tieren der Langzeitgruppe (Tag 20) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch hier eine nicht-signifikant verminderte Expression von Spire-1. PGP9.5 stieg erneut in der Expression ( $p=0,01$ ). Synaptopodin fiel in der Langzeitgruppe signifikant in der Expression ( $p=0,005$ ), ebenso Nephrin ( $p=0,006$ ).

#### 4.1.5. Ergebnisse der Histologie

##### 4.1.5.1. PAS- Färbung

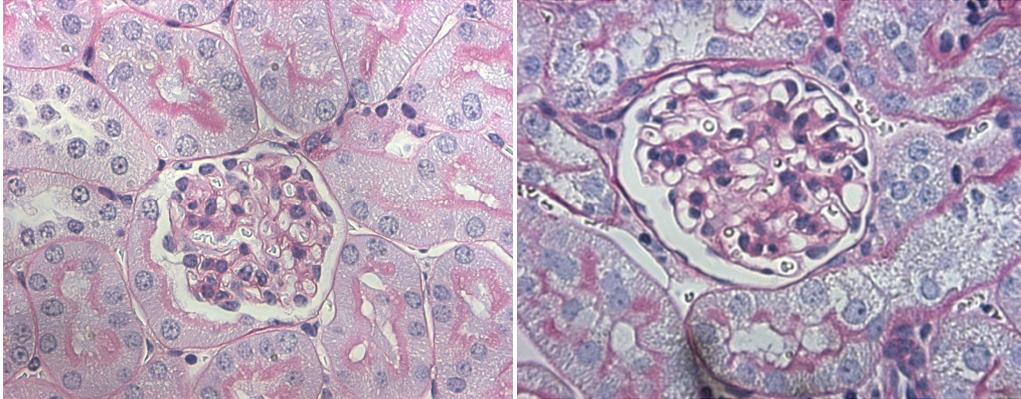
Zur histologischen Beurteilung der Glomeruli wurden PAS- Färbungen angefertigt. Die ADR- behandelten Tiere zeigten eine deutliche Veränderung in der Histologie. Die Kapillarschlingen der Glomeruli erschienen verbacken, das Mesangium verbreitert (Abb.10a). In vielen Glomeruli waren geschwollenen Podozyten zu erkennen (Abb.10b). Die Tubuli waren mit Protein gefüllt als Zeichen der Proteinurie

(Abb.10a). Die histologischen Veränderungen waren sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitgruppe zu beobachten.

### NaCl

Tag 6

Tag 20



### ADR

Tag 6

Tag 20

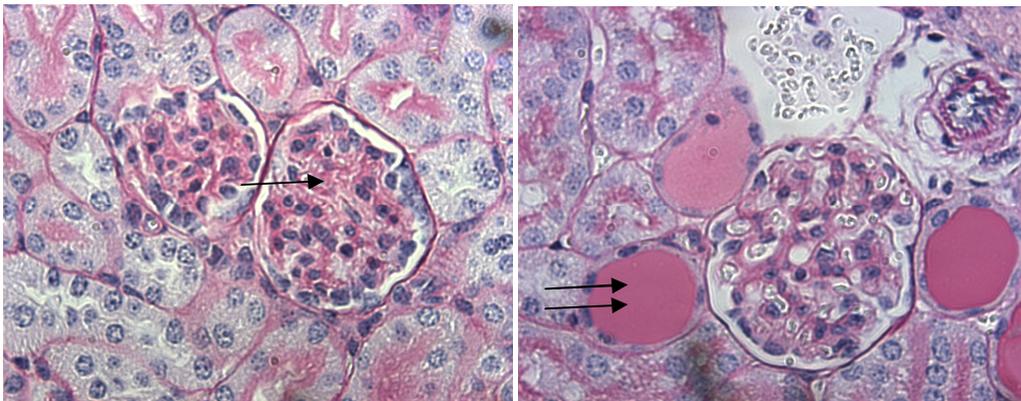


Abb.10a: PAS- Färbung der Kontrolltiere (NaCl) und der mit Adriamycin (ADR) behandelten Tiere, jeweils Tag 6 und Tag 20. Vergrößerung x400. Man erkennt eine Verdickung des Mesangiums (Pfeil), sowie mit Protein gefüllte Tubuli nach ADR- Schädigung (Doppelpfeil).

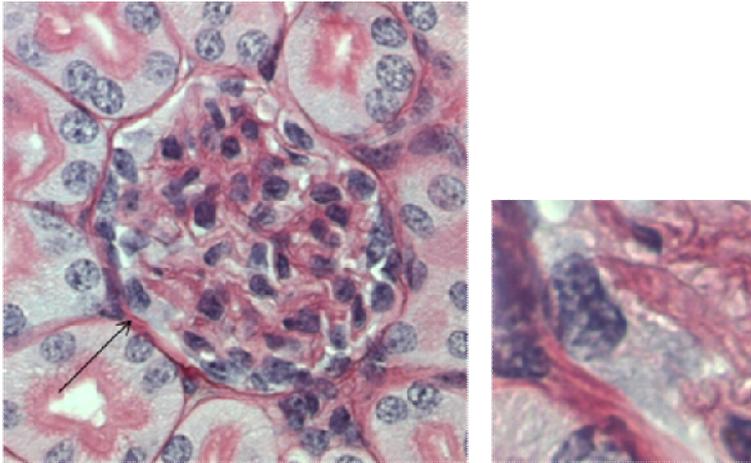


Abb.10b: Geschwollener Podozyt eines mit Adriamycin behandelten Tieres (Pfeil), vergrößerte Darstellung des Podozyten im rechten Bild. PAS-Färbung, Vergrößerung x400 bzw. x1000.

#### 4.1.5.2. WT1- Färbung mit Bestimmung des Podozytenverlusts und der Glomeruligröße

Da sowohl im Western Blot als auch in der qPCR eine verminderte Expression von Spire-1 Protein bzw. mRNA zu verzeichnen war, stellte sich die Frage, ob dies auf eine tatsächliche Herunterregulation von Spire-1 zurückzuführen war, oder auf einen Podozytenverlust unter ADR-Behandlung. Um die Podozytenzahl zu quantifizieren wurde eine podozytenspezifische Färbung mit WT1 angefertigt (Abb.11). WT1 ist ein Gen, das ausschließlich in Podozyten exprimiert wird und für die Induktion des renalen Wilms- Tumor verantwortlich ist. Die Auszählung der WT1- positiven Podozyten von 50 Glomeruli pro Maus am Mikroskop erfolgte verblindet. Es stellte sich heraus, dass sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitgruppe ein signifikanter Podozytenverlust unter ADR- Behandlung vorlag ( $p=0,02$  bzw.  $p=0,01$ ) (Abb.12a). Ferner wurde die Größe von 50 Glomeruli pro Tier ausgemessen und die Mittelwerte der Kontrollgruppen den Mittelwerten der Versuchsgruppen gegenübergestellt. Es zeigte sich ein frühes signifikantes Anschwellen der Glomeruli in der Kurzzeitgruppe ( $p=0,03$ ). Nach 20 Tagen war der Durchmesser wieder auf die Ausgangsgröße zurückgekehrt (Abb.12b).

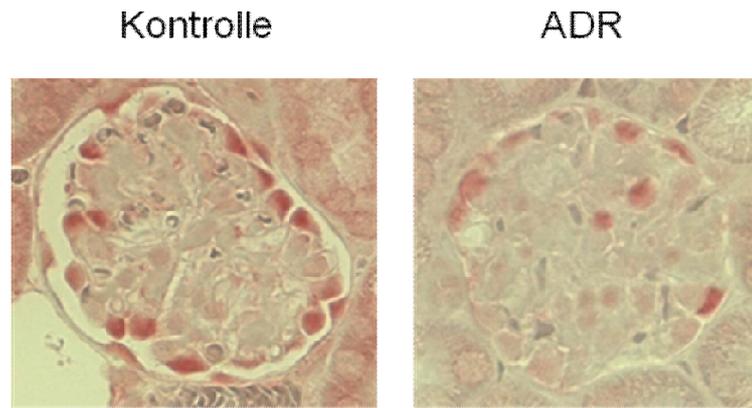


Abb.11: WT1- Färbung zur spezifischen Darstellung der Podozyten in mit NaCl behandelten Mäusen (Kontrolle) und Adriamycin-behandelten Mäusen (ADR). Vergrößerung 400x. Man kann einen Podozytenverlust unter ADR-Behandlung annehmen, der quantitativ erfasst und bestätigt wurde (siehe Abb.12a).

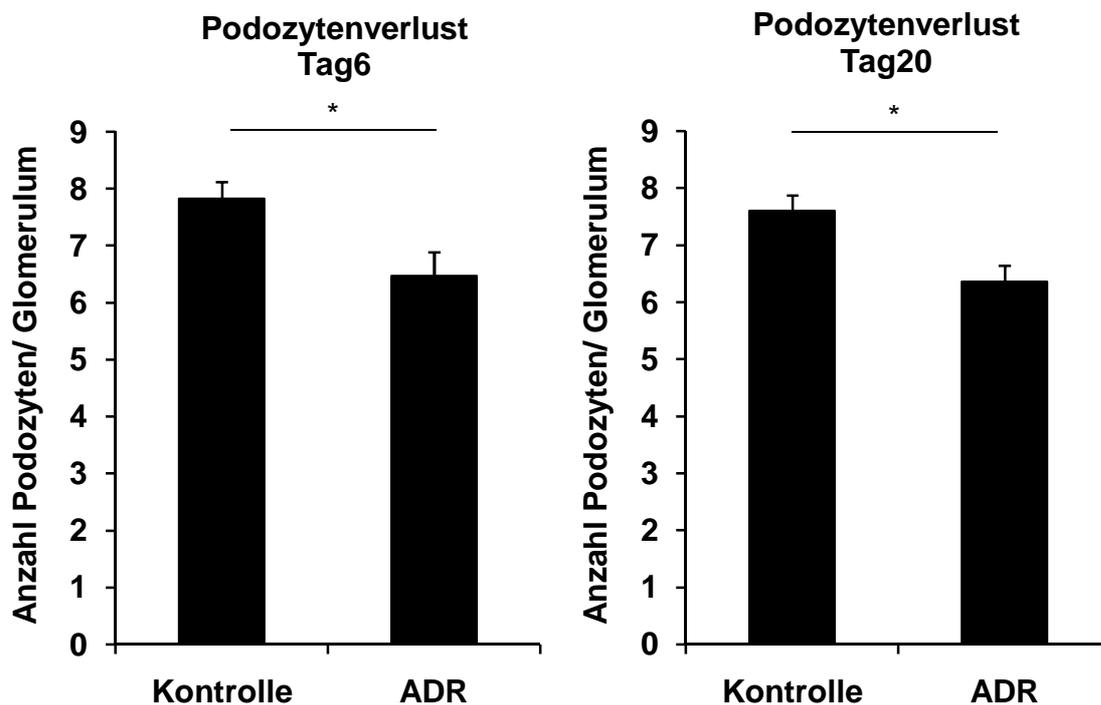


Abb.12a: Podozytenverlust unter Adriamycin- (ADR) Behandlung ermittelt durch verblindete Auszählung am Mikroskop nach Podozyten-spezifischer WT1- Färbung. Kurzzeitgruppe (Tag 6) und Langzeitgruppe (Tag 20) zeigen beide einen signifikanten Podozytenverlust unter ADR-Behandlung ( $p=0,02$  und  $p=0,01$ ).

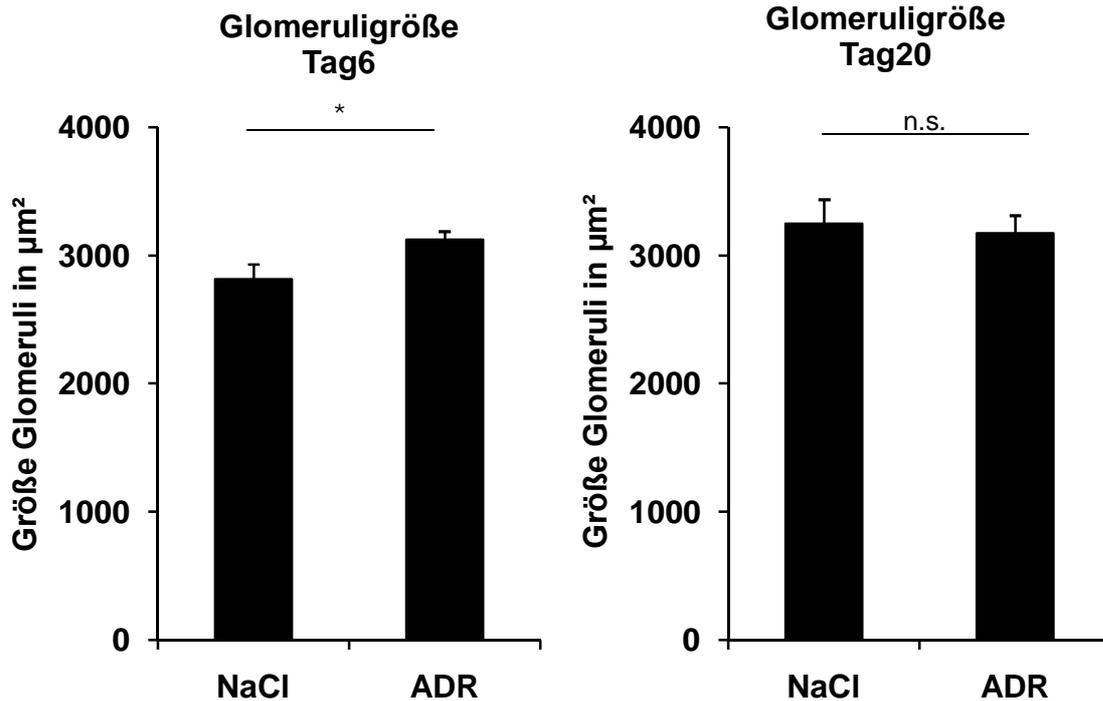


Abb.12b: Veränderung der Glomeruligröße mit und ohne Adriamycin- (ADR) Behandlung in der Kurz- (Tag 6) und Langzeitgruppe (Tag 20), ermittelt durch Ausmessen der Glomeruli am Mikroskop. Es zeigte sich ein signifikantes Anschwellen der Glomeruli in der Akutphase (Tag 6,  $p=0,03$ ). Diese Veränderung war in der Langzeitgruppe nicht mehr zu beobachten.

#### 4.1.5.3. Immunhistologie

Um das Verteilungsmuster von Spire-1 im gesunden und im pathologischen Zustand beurteilen zu können, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Gewebeschnitten der mit Adriamycin behandelten Tiere sowie der Kontrollgruppen angefertigt. Man konnte das Färbemuster von Spire-1 unter Betrachtung mehrerer Glomeruli als folgendermaßen verändert beschreiben: vor der Adriamycinbehandlung zeigte sich Spire-1 vor allem in den primären Fortsätzen der Podozyten. Adriamycin führte zu einer Umverteilung hin zu einem perinukleären Muster. In den primären Fortsätzen war Spire-1 inhomogen verteilt (Abb.13a). Neben Spire-1 wurde Nephtrin angefärbt. Nephtrin war in den Kontrolltieren perlschnurartig entlang der Basalmembran zu sehen. In den Versuchstieren war diese bandartige Färbung jedoch aufgelöst und Nephtrin erschien eher fleckig verwaschen entlang der GBM (Tag 6, Abb.13a und 13b).

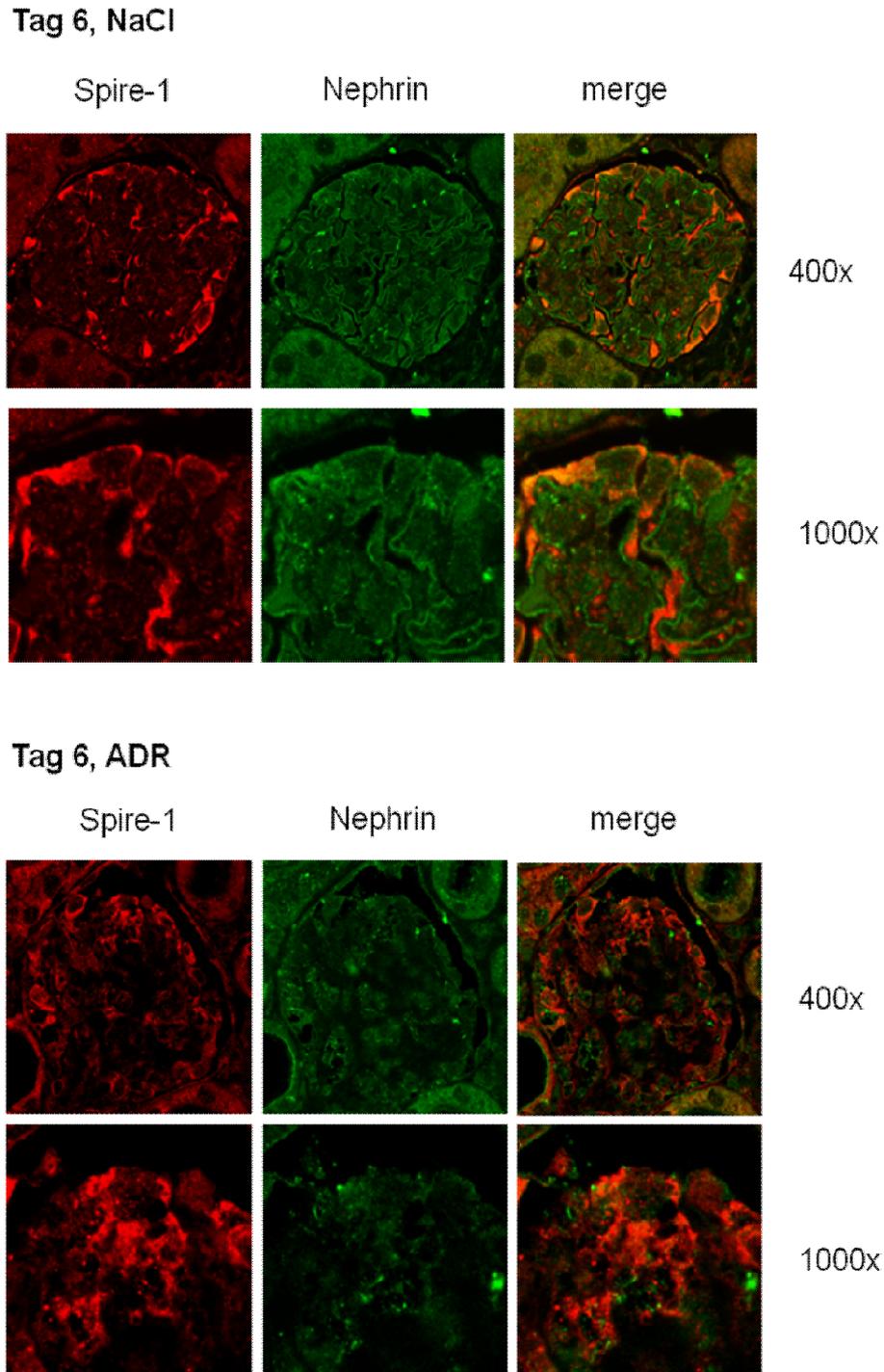


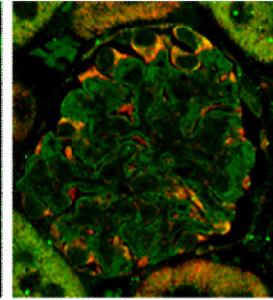
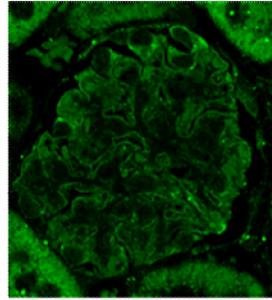
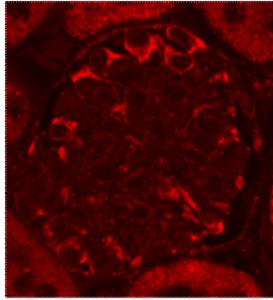
Abb.13a: Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten der Kontrolltiere und ADR-behandelten Tiere der Kurzzeitgruppe (Tag 6) in 400-facher bzw. 1000-facher Vergrößerung. Spire-1 zeigt eine perinukleäre Umverteilung bei insgesamt unverminderter Färbung. Nephrin verliert unter ADR-Behandlung seine typische perlschnurartige Anordnung entlang der GBM.

## Tag 20, NaCl

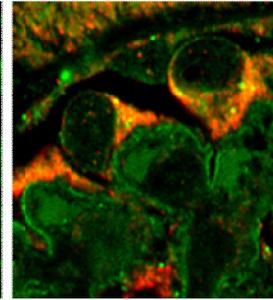
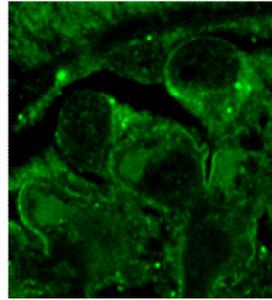
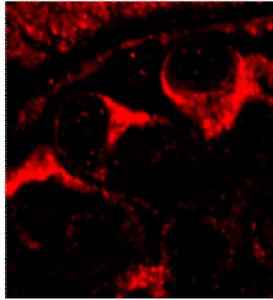
Spire-1

Nephrin

merge



400x



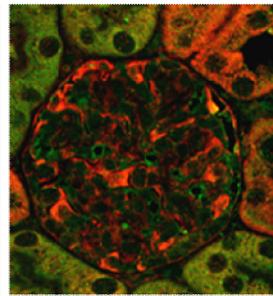
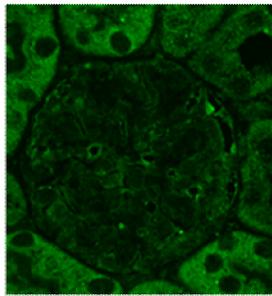
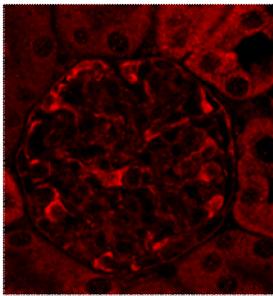
1000x

## Tag 20, ADR

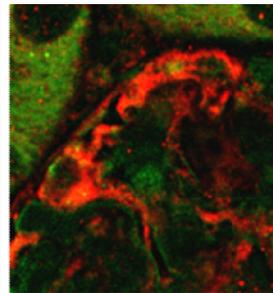
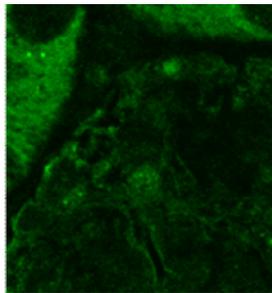
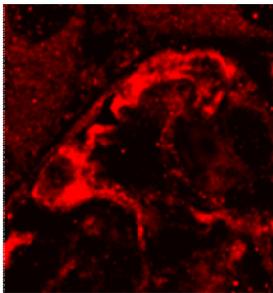
Spire-1

Nephrin

merge



400x



1000x

Abb.13b: Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten der Kontrolltiere und ADR-behandelten Tiere der Langzeitgruppe (Tag 20) in 400-facher bzw. 1000-facher Vergrößerung. Spire-1 zeigt auch hier eine Auflösung der gleichmäßig zytoplasmatischen Verteilung bei gleichbleibender Immunfluoreszenz. Nephrin verliert wie in der Kurzzeitgruppe unter ADR-Behandlung seine typische perlschnurartige Anordnung.

Die Menge von Spire-1 war immunhistochemisch in den verbliebenen Podozyten sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitgruppe nicht vermindert im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb.13a und 13b).

## 4.2. Das Puromycin- Modell (Podozyten- Schädigungsmodell)

### 4.2.1. Ergebnisse der Proteinexpression

Zur Untersuchung der Proteinexpression von Spire-1 wurden Western Blots aus Lysaten von differenzierten Podozyten erstellt. Die Podozyten wurden dazu mit verschiedenen Konzentrationen Puromycin (PAN) inkubiert und danach zu definierten Zeitpunkten geerntet. Wir erwarteten eine mögliche Änderung der Expression von Spire-1 unter PAN- Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe bestand entweder aus nur mit Medium behandelten Podozyten oder aus mit Dexamethason behandelten Zellen.

Um sicher zu stellen, dass die Proben gleiche Mengen Protein enthielten, verwendeten wir  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle. Wir gingen davon aus, dass  $\beta$ -Aktin auch im pathologischen Zustand quantitativ konstant bleibt und somit das zu untersuchende Protein im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin quantitativ erfasst werden kann.

Das Protein Spire-1 zeigte in den Western Blots aus Zellkultur eine Abnahme in der Expression unter PAN- Behandlung im Vergleich zur mit Medium inkubierten Kontrollgruppe (Abb.14a). Dies war bei Dosen von 12,5  $\mu$ g bis 50  $\mu$ g PAN der Fall.

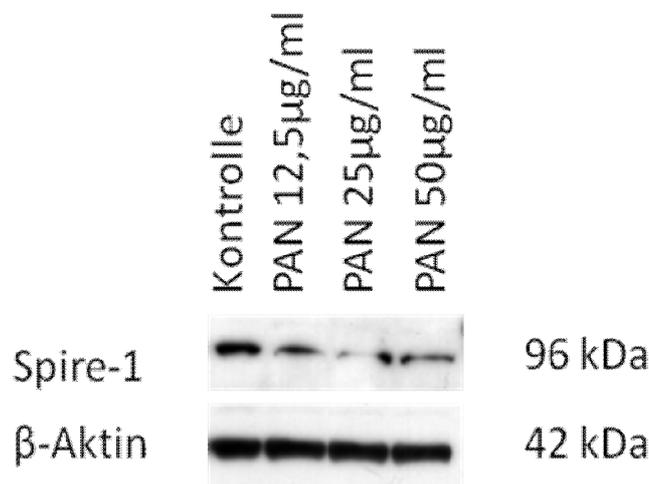


Abb.14a: Western Blot aus differenzierten Podozyten unter Behandlung mit Medium (Kontrolle) und PAN. Inkubationszeit 24h. Konzentration 12,5  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml.

Ebenso zeigte sich eine Abnahme der Expression unter PAN bzw. PAN + Dexamethason- Behandlung im Vergleich zu der nur mit Dexamethason behandelten

Kontrollgruppe (Abb. 14b). In diesem Versuch wurden Konzentrationen von 10  $\mu\text{g}$  und 30  $\mu\text{g}$  PAN gewählt (Inkubationszeit 48 h). Da die Menge an  $\beta$ -Aktin in der Kontrolle konstant blieb, gingen wir davon aus, dass es sich um eine tatsächliche Herunterregulation von Spire-1 handelt, nicht um einen Zellverlust unter PAN-Behandlung. Dexamethason konnte die Herunterregulation von Spire-1 nicht vermindern.

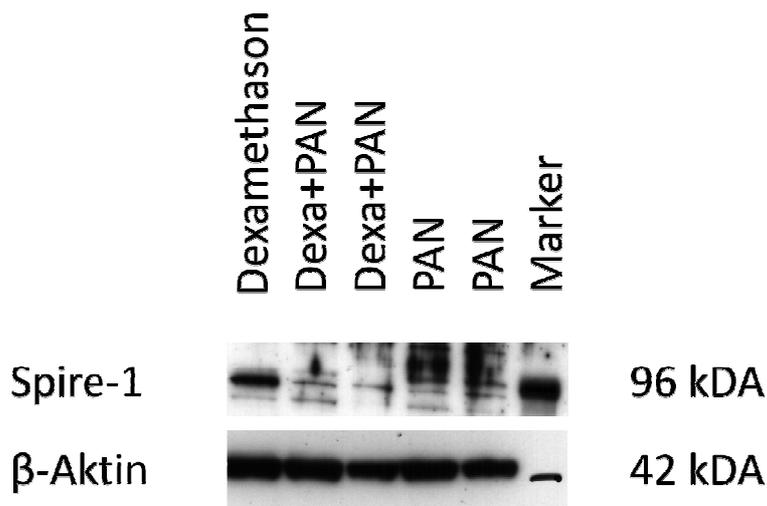


Abb.14b: Western Blot aus differenzierten Podozyten unter Dexamethason- Behandlung (Kontrolle) bzw. PAN- Behandlung. Inkubationszeit 48h. Konzentrationen: 10 bzw. 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PAN, Dexamethason 1  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.2. Ergebnisse der Histologie

Für die Beurteilung der Lokalisation von Spire-1 und der podozytären zytoskelettalen Bestandteile  $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -Tubulin wurden Immunfluoreszenzfärbungen von differenzierten und undifferenzierten Podozyten angefertigt. Um mögliche Lokalisationsänderungen im pathologischen Zustand festzustellen, wurden jeweils eine Gruppe differenzierte und eine Gruppe undifferenzierte Podozyten mit Puromycin behandelt. Die Puromycin- Konzentration betrug 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , die Inkubationszeit 24 h.

In den undifferenzierten Podozyten zeigte sich  $\alpha$ -Tubulin erwartungsgemäß in Bündeln arrangiert, faserförmig, parallel verlaufend im Zellkörper und in den Primärfortsätzen. Dies war sowohl ohne als auch mit Puromycin- Behandlung der Fall (Abb.15).  $\beta$ -Aktin stellte sich ebenfalls definiert faserförmig in Zellkörper und

Primärfortsatz dar, sowohl ohne als auch mit Puromycin- Behandlung. Beide Strukturproteine haben sich also unter der Puromycin-Behandlung quantitativ und strukturell nicht verändert (Abb.15). Spire-1 konnte unter Kontrollbedingungen punktförmig im Zellkörper und Primärfortsatz dargestellt werden. Die punktförmige Verteilung weist am ehesten auf eine vesikuläre Verteilung hin. Diese war unter Puromycin-Behandlung stärker perinukleär akzentuiert als ohne Puromycin-Behandlung (Abb.15). In differenzierten Podozyten zeigte sich ein ähnliches Bild (nicht abgebildet).

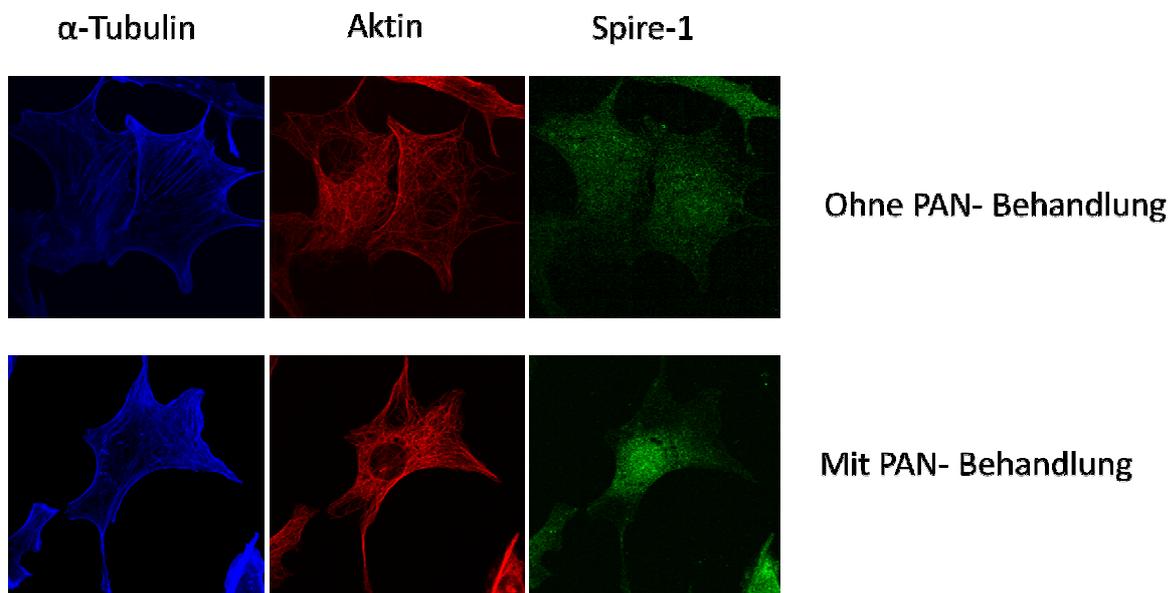
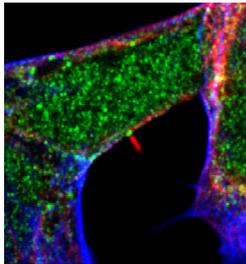


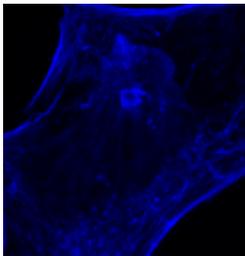
Abb.15: Immunfluoreszenz-Färbung undifferenzierter Podozyten mit und ohne PAN- Behandlung in 100-facher Vergrößerung. Inkubationszeit: 24 h. PAN- Konzentration: 100  $\mu$ g/ml. blau:  $\alpha$ -Tubulin, rot: Aktin, grün: Spire-1.

Bei den Immunfluoreszenzbildern fiel eine verstärkte Färbung von Spire-1 als Ansatzpunkt einer „Fähnchen“- artigen Struktur auf der Oberfläche der Podozyten auf (Abb.16). Diese Struktur wurde nach weiteren immunhistologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe als Zentrosom identifiziert. Das Zentrosom verankert den mitotischen Spindelapparat und wandert zwischen den Mitosen zur Zellmembran, wo ein primäres Zilium gebildet wird. Spire-1 befindet sich hierbei am ehesten in oder an den perizentrosomalen Vesikeln. Eine solche Lokalisation von Spire-1 ist in dieser Region in der Literatur im Zusammenhang mit Rab 11-positiven perizentrosomalen Vesikeln in Fibroblasten beschrieben [38]. Die Aufgabe von Spire-1 am Zentrosom

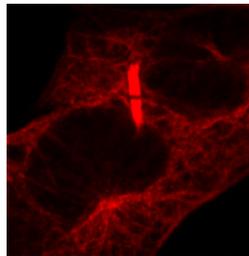
bleibt Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen (Abb.16). Zilien wurden auf ausdifferenzierten Podozyten *in vivo* bisher nicht beschrieben. Allerdings berichtete kürzlich M. Saleem (Bristol) von Zilien auf manchen Podozyten auch *in vivo* (unpubliziert).



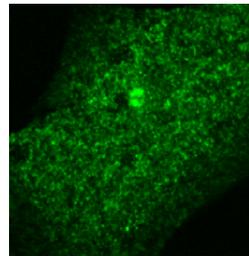
„Fähnchen“-artige  
Struktur



$\alpha$ -Tubulin



Aktin



Spire-1

Abb. 16: Immunfluoreszenz undifferenzierter Podozyten. Blau:  $\alpha$ -Tubulin, rot: Aktin, grün: Spire-1. Spire-1 ist in der Region des Zentrosoms nachweisbar.

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Protein Spire-1 als möglichen Akteur in der Pathogenese des Fußfortsatzrückzugs der Podozyten beim glomerulären Nierenversagen zu untersuchen. Das Protein Spire-1 wurde von der Arbeitsgruppe Meyer im Rahmen der Etablierung eines immunologisch-vermittelten Modells der Glomerulonephritis in der Maus als mögliches Antigen in Podozyten identifiziert. Bei diesem Modell wurden Schafe mit murinen Zellkultur-Podozyten immunisiert, und deren Seren Mäusen intravenös appliziert. Die Anti-Podozyten-Antikörper der Schafseren banden selektiv an Podozyten der Mäuse und lösten eine Glomerulonephritis aus. Nach säulenchromatographischen Untersuchungen möglicher Antigene dieser Antigen-Antikörper-Bindung konnte massenspektrometrisch unter anderem das ca. 95kD große Protein Spire-1 identifiziert werden. Die genauere Untersuchung dieses Proteins schien daher vielversprechend.

Zur Umsetzung des Vorhabens wurde ein Mausmodell gewählt, das bereits etabliert und in der Literatur vielfach beschrieben ist. Ziel war es, den Podozyten dabei selektiv zu schädigen, und daraufhin in proteinbiochemischen, histologischen und Gen-Expressions- Experimenten Spire-1 genauer zu untersuchen. Bei diesem etablierten Modell handelt es sich um die ADR-Nephritis. So wurde beispielsweise die ADR Nephritis von Guo et al. angewendet, um die Rolle von RAGE, einem Rezeptor in der Niere für *advanced glycation end products*, zu untersuchen [29]. Dieser ist im pathologischen, durch Adriamycin vermittelten Zustand heraufreguliert. In aktuellen Arbeiten wurde die ADR Nephritis u.a. verwendet, um die Rolle von Matrix-Metalloproteasen wie MMP-9 und MMP-13 in der Pathogenese glomerulärer Erkrankungen genauer zu untersuchen. Es stellte sich hierbei beispielsweise heraus, dass die Abwesenheit von MMP-9 (Gelatinase) und MMP-13 (Kollagenase) eine Adriamycin-induzierte Albuminurie und Glomerulosklerose abmildert [29].

Um die glomeruläre Schädigung zu überprüfen, wurden Urinalysen durchgeführt. Glomeruläre Schäden zeigen sich in einer Proteinurie, vor allem von Albumin. Die durchgeführten ELISA-Untersuchungen zeigten eine signifikante Albuminurie ab Tag 3 in allen ADR-behandelten Versuchstieren. Aber auch andere Untersuchungen zeigten das Gelingen des Modells. So konnten histologisch geschwollene Podozyten und eine Verbreiterung des Schlingenkonvoluts in der PAS-Färbung dargestellt werden. Dies ist als Zeichen einer podozytären Pathologie zu werten. Der Nachweis

von Proteinzyklindern in vielen Tubuli zeigte ebenfalls den Verlust der Filterfunktion der Podozyten an. Die Podozytenzahl in Glomeruli von ADR-behandelten Mäusen war signifikant vermindert (s.u.). Von dem Vorliegen einer vor allem podozytären Schädigung konnte somit ausgegangen werden. Zusammengefasst hat das ADR Modell in den Mäusen wie in der Literatur beschrieben funktioniert und eine vor allem podozytäre Schädigung hervorgerufen. Nun konnte Spire-1 auf Expression und Regulation im geschädigten Podozyten der ADR-Nephritis in der Maus untersucht werden.

Die Western Blots zur Beurteilung von Spire-1 auf Protein-Ebene zeigten in der Kurzzeit- und der Langzeitgruppe in einigen Tieren eine verringerte Expression. Eine verminderte Expression von Spire-1 hatte sich auch in Vorversuchen mit Rattenglomeruli, die durch Dynabeads, eine bestimmte Technik zur Selektion von Glomeruli aus Nierengewebe, gewonnen worden waren, und die aus Ratten mit passiver Heymann Nephritis stammten, gezeigt. Bei der Heymann Nephritis entwickeln die Ratten eine experimentelle membranöse Glomerulonephritis mit Podozytenverlust und Proteinurie. Somit scheint Spire-1 bei Podozytenschaden und Proteinurie vermindert exprimiert zu werden.

Eine von Wang et al. und anderen Arbeitsgruppen postulierte Hypothese zur Funktion von Spire Proteinen ist die Funktion als Aktin Stabilisatoren, indem sie Aktin mit Mikrotubuli vernetzen (s.o.). Der im Falle einer Niereninsuffizienz auftretende Fußfortsatzrückzug könnte auf einen Funktionsverlust von Spire zurückzuführen sein: bei einem funktionalen Ausfall von Spire würde der von den Arbeitsgruppen beschriebene Halterungsmechanismus verloren gehen, und das aus Aktin bestehende Zytoskelett der Fußfortsätze destabilisiert werden. Der quantitative Abfall von Spire-1, den die Western Blots beschreiben, spricht für diese Hypothese. Spire würde durch Adriamycin seine Funktion als Stabilisator des Aktin-Zytoskeletts durch die Verankerung von Aktin an Tubulin in den primären Fußfortsätzen verlieren. Eine mögliche Konsequenz wäre der Zusammenbruch des Zytoskeletts mit Fußfortsatzrückzug.

Die im Western Blot gesehene Verminderung war jedoch immunhistochemisch nicht nachweisbar (s.u.) und in der qPCR ebenfalls nicht eindeutig zu verifizieren (s.u.), was uns darauf lenkte, dass ein Podozytenverlust unter dem Chemotherapeutikum Adriamycin eventuell für die verminderte Expression ursächlich sein könnte.

Um die Frage des Podozytenverlusts zu quantifizieren, wurde die Podozytenzahl anhand von WT1-Färbungen ermittelt. WT1 ist ein Gen, welches in die Induktion des renalen Wilms-Tumor bei Kindern involviert ist. Bei der WT1-Färbung handelt es sich um eine Podozyten-spezifische Färbung, die den Podozyten rot anfärbt und es somit ermöglicht, die Podozytenzahl innerhalb eines Glomerulums durch Auszählen zu ermitteln. Nach Auszählung von 50 Glomeruli pro Versuchstier erhielten wir folgendes Ergebnis: sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitgruppe gab es einen signifikanten Podozytenverlust unter ADR- Behandlung ( $p=0,02$  bzw.  $p=0,01$ ). Dieses Ergebnis bestätigte den Verdacht, dass es sich in der in den Western Blots gezeigten Abnahme von Spire-1 nicht um eine Herunterregulation, sondern um einen Gewebsverlust handeln könnte.

Von Kerkhoff et al. wurde Spire-1 eine mögliche Funktion im Vesikel-Transport im Podozyten der Niere zugesprochen. Die Arbeitsgruppe entdeckte, dass Spire mit der GTP-ase Rab11 kolokalisiert, die sich wiederum am Trans-Golgi-Apparat sowie an post-Golgi Vesikeln befindet. Die Gruppe konnte ferner feststellen, dass in mutierten Mäusen, in denen Spire-1 überexprimiert wurde, der Transport des sogenannten vesikulären Stomatitis Virus G (VSV G) zur Zellmembran gestört war. Sie stellte daraufhin die Hypothese einer Beteiligung von Spire am Vesikel-Transport auf (s.o.). Dieser Transport könnte vom Trans-Golgi-Apparat zur Zellmembran, aber auch entlang der Mikrotubuli der Primärfortsätze zu den Fußfortsätzen in Podozyten gerichtet sein. Im Golgi- Netzwerk synthetisierte Proteine würden dann quasi wie an einer „Seilbahn“ entlang der Mikrotubuli zu ihrem Zielort den Fußfortsätzen transportiert, und Spire-1 könnte bei diesem Transportmechanismus eine Rolle spielen. Der durch die Zellzählung festgestellte Podozytenverlust erhärtet die Hypothese, dass Spire-1 unter Berücksichtigung dieses Zellverlusts dennoch hochreguliert werden könnte.

In geschädigten Podozyten findet sich eine Anhäufung von Vesikeln. Dies ist zum Beispiel in dem Modell der Anti-Podozyten Nephritis der Fall [47]. Diese Vesikel zeigen sich vor allem im perinukleären Zytoplasma. Wenn man von einer Beteiligung von Spire beim Vesikeltransport ausgeht, wäre bei den Proteinanalysen im Western Blot eine Hochregulation zu erwarten gewesen, zum Beispiel um mehr Vesikel mit degradierten Proteinen auszuschleusen, oder um zur Reparatur benötigte synthetisierte Proteine zu den Fußfortsätzen transportieren zu können. Die

Verminderung der Proteinmenge in einigen Tieren im Western Blot und die tendenziell verminderte Expression in der quantitativen PCR (s.u.) kann diese Hypothese nicht bestätigen. Allerdings ist fraglich, ob die Podozyten unter der toxischen Behandlung mit Adriamycin zu einer Hochregulation von solchen strukturerhaltenden Proteinen in der Lage sind, oder ob nicht die Toxizität gerade in der Fehlregulation solcher Proteine ihren Ausdruck findet. Außerdem könnte ein Podozytenverlust zu einer quantitativen Verminderung von Protein und mRNA führen, obwohl das Protein in den verbleibenden Zellen noch ausreichend exprimiert wird.

Die Frage der Ursächlichkeit einer verminderten Expression kann im Rahmen dieser Arbeit leider nicht geklärt werden. Möglich wäre eine passive Herunterregulation im Rahmen der Podozytenschädigung oder eine primäre Änderung der Spire-1 Expression mit der Folge einer Veränderung des podozytären Zytoskeletts und folglich einer Proteinurie. Interessanterweise spricht die im Vergleich zu Spire-1 unterschiedliche Proteinexpression des Schlitzmembranproteins Nephrin für eine primäre Regulation von Spire-1: die Nephrin-Expression nahm in der Kurzzeitgruppe ab, was auch in der Literatur für die ADR-Nephritis als charakteristisch beschrieben ist [51]. Erstaunlich war jedoch, dass es in der Langzeitgruppe zu einem Wiederanstieg kam, da Nephrin nun wieder vermehrt im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Die Proteinurie-Analysen zeigten, dass diese Nephrin-Expression keine funktionelle Verminderung der Proteinurie zur Folge hatte. Die differenzierte Regulation von Nephrin lässt auch eine gerichtete Regulation von Spire-1, eher als einen bloßen Zellverlust, annehmen. Ferner wurde das Nephrin-verankernde Protein  $\alpha$ -Aktinin 4 untersucht. Es zeigte in mehreren Blots eine eindeutige Zunahme in den Versuchstieren unter ADR- Behandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Veränderung ist konform mit der in der Literatur beschriebenen Regulation von  $\alpha$ -Aktinin 4 mRNA in humanen proteinurischen Glomerulopathien [52].

Nun wurde die Spire-1 mRNA-Expression untersucht. Das Besondere in der vorliegenden Arbeit war, dass Glomeruli durch Mikrodissektion gesammelt wurden. Hierbei wurden Gefrierschnitte von den Mausnieren angefertigt, diese angefärbt, und Glomeruli -insgesamt 350 pro Tier- unter einem Lasermikroskop ausgeschnitten. Somit handelt es sich bei den Daten der quantitativen PCR um rein glomeruläres Gewebe ohne tubuläre „Verunreinigung“. Die Ergebnisse der quantitativen PCR

zeigten in der Kurzzeitgruppe eine leichte Herunterregulation von Spire-1 in den Versuchstieren, die jedoch nicht signifikant war. Das gleiche Ergebnis erhielten wir in der Langzeitgruppe. Diese Ergebnisse gingen mit den Ergebnissen des Western Blots konform, jedoch nicht mit der Immunhistochemie (s.u.).

Wir stellten Vergleiche mit anderen podozytären Proteinen bzgl. Ihrer Gen-Expression an. Das im Zytosol befindliche PGP9.5 ist eine Ubiquitinligase, die die Ubiquitinierung von Proteinen aktiviert, und somit deren Abbau. PGP9.5 zeigte sich in den quantitativen PCR- Analysen unter ADR- Behandlung in der Kurzzeitgruppe als um mehr als das 3-fache exprimiert. Diese vermehrte Expression spricht für einen gesteigerten Proteinabbau in der Zelle durch die Ubiquitinligase PGP9.5 unter pathologischen Bedingungen.

Ferner untersuchten wir das Schlitzmembranprotein Nephrin. Nephrin wurde unter Adriamycin- Behandlung in der Kurzzeitgruppe 3-fach weniger exprimiert ( $p=0,03$ ). In der Langzeitgruppe bestätigte sich dieser Abfall ( $p=0,006$ ). Diese Ergebnisse stimmen mit den immunhistologischen Ergebnissen überein, in denen der Verlust der perlschnurartigen Verteilung entlang der GBM zu kennzeichnen war.

Die Expression des ebenfalls in den Fußfortsätzen befindlichen Proteins Synaptopodin fiel noch stärker unter Adriamycin-Behandlung, nämlich um mehr als das 10-fache (Kurzzeitgruppe). Rechnet man den Verlust von Spire-1 gegen den von Synaptopodin, so kommt man auf einen relativen Anstieg der Expression von Spire-1 auf ca. das 8-fache (Diagramm nicht dargestellt). Geht man davon aus, somit den Zellverlust „herausgerechnet“ zu haben, würde das bedeuten, dass Spire-1 im pathologischen Zustand im Vergleich zum physiologischen Zustand möglicherweise überexprimiert wird. Dies würde die Hypothese von Spire-1 als Regulator von vesikulären Transportmechanismen unterstützen (s.o.).

In der Immunfluoreszenz stellte sich Spire-1 in den Kontrolltieren über das ganze Zytoskelett des Podozyten verteilt dar. Dieses Färbemuster war in ADR-behandelten Mäusen verändert. Spire-1 war nun vor allem perinukleär lokalisiert, zeigte aber in den verbliebenen Podozyten eine vergleichbar starke Färbung. Eine Veränderung des Schlitzmembranproteins Nephrin war ebenfalls deutlich nachzuweisen: die lineare, perlschnurartige Anordnung entlang der GBM in den Kontrolltieren, die für Nephrin charakteristisch ist, war in den Versuchstieren nahezu aufgehoben. Dieses

pathologisch veränderte Färbemuster von Nephrin ist ein Zeichen der Retraktion der Fußfortsätze und zeigt erneut die gelungene Anwendung des ADR-Modells in der vorliegenden Arbeit. Die zunehmend perinukleäre Lokalisation von Spire-1 deutet auf eine Rolle des Proteins zur Aufrechterhaltung der Funktion der Zelle hin.

Die Zellkulturexperimente wurden mit Puromycin durchgeführt, das dieselben pathologischen Veränderungen bewirkt wie Adriamycin. In der Zellkultur verhielt sich Spire-1 in den Western Blot- Analysen so wie in den Mausexperimenten: es war quantitativ verringert. Es stellt sich somit *in vitro* dieselbe Frage wie *in vivo*: handelt es sich um einen tatsächlich ermittelten Proteinverlust oder um einen Zellverlust unter Puromycin? Da sich Zellen nach Puromycin-Gabe vermehrt von der Petrischale ablösten, war auch *in vitro* keine spezifische Aussage möglich. Zusammenfassend muss aber zunächst von einer tatsächlichen Herunterregulation von Spire-1 unter pathophysiologischen Bedingungen ausgegangen werden.

In der Immunfluoreszenz der undifferenzierten Podozyten in Zellkultur wurden neben Spire-1 die zytoskelettalen Proteine  $\alpha$ -Tubulin und Aktin angefärbt. Sie änderten sich in ihrer Lokalisation und Morphologie unter Puromycin-Behandlung kaum.  $\alpha$ -Tubulin konnte im Zellkörper und in den Primärfortsätzen bündelförmig dargestellt werden. Auch Aktin zeigte ein typisches Färbeverhalten, das sich unter Puromycin-Behandlung nicht wesentlich änderte. Spire-1 änderte seine Lokalisation bzw. Intensität: ohne Puromycin war es vereinzelt im Zellkörper punktförmig zu lokalisieren. Nach Behandlung mit Puromycin für 24 h zeigte es sich perinukleär betont. Die punktförmige Anordnung von Spire-1 innerhalb des Zellkörpers spricht für eine vesikuläre Verteilung des Proteins. Unter pathologischen Verhältnissen intensiviert sich dieses Verteilungsmuster, was die Theorie der Beteiligung von Spire-1 an vesikulären Transportmechanismen bestätigt.

Die in der Immunfluoreszenz gefundene Struktur, an der Spire-1 verstärkt nachgewiesen wurde, konnte immunhistochemisch als Zentrosom definiert werden. Direkt neben dem Zentrosom ist das pericentrosomale Endosom lokalisiert, welches als Versorgungsstruktur für die Proteine des Zentrosoms angesehen wird. Das perizentrosomale Endosom ist Rab11-positiv und daher deckt sich diese Beobachtung mit der Beschreibung von Kerkhoff et al. [38]. Die Funktion von Spire-1 am perizentrosomalen Endosom ist unklar. Möglicherweise wird Spire-1, wie auch an anderen Endosomen, für den Transport von Vesikeln zu zellulären Organellen

benötigt. Alternativ könnte Spire-1 für die Verankerung des Zentrosoms an der Zellmembran verantwortlich sein.

Insgesamt konnte mit der vorliegenden Arbeit die Hypothese einer Beteiligung von Spire-1 an vesikulären Transportmechanismen aufgrund des punktförmigen, zytoplasmatischen Verteilungsmusters unterstützt werden. Inwieweit Spire-1 bei an dem Pathomechanismus des Fußfortsatz-Rückzugs beim glomerulären Nierenversagen eine Rolle spielt, sollte in zukünftigen Untersuchungen an Spire-1-defizienten Mäusen genauer untersucht werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Glomerulonephritis ist eine häufige Ursache der Niereninsuffizienz. Der genaue Pathomechanismus der verschiedenen Formen der Glomerulonephritis ist bis heute weitgehend unbekannt. Um kausale Therapien des glomerulären Nierenversagens entwickeln zu können, bedarf es genauerer Kenntnisse dieser Vorgänge. In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die Expression eines neu im Glomerulum entdeckten Proteins, Spire-1, zu untersuchen. Hierzu wurden in einem etablierten Mausmodell der podozytären Schädigung sowie in Zellkultur Podozyten mit Adriamycin bzw. Puromycin selektiv geschädigt. Es wurde unter den Mäusen eine Kurzzeit- und eine Langzeitgruppe definiert, die 6 bzw. 20 Tage experimentiert wurden. Die entnommenen Nieren wurden molekularbiologisch, proteinbiochemisch und histologisch untersucht.

Es konnte bei allen Versuchstieren eine Albuminurie nachgewiesen werden, die ab dem dritten Tag auftrat und progredient verlief. Spire-1 zeigte in den proteinbiochemischen Untersuchungen eine quantitative Abnahme nach 6 und 20 Tagen. In den Zellkulturexperimenten nahm Spire-1 ebenfalls in der Proteinexpression unter Puromycin-Behandlung ab. Die Genexpression von Spire-1 im Mausmodell war in der qPCR sowohl in der Kurzzeitgruppe als auch in der Langzeitgruppe vermindert, jedoch nicht signifikant. Um den Podozytenverlust unter Adriamycin-Behandlung definieren zu können, wurde eine Zellzählung nach podozytenspezifischer Färbung durchgeführt, und ein signifikanter Verlust von knapp 20% festgestellt, was möglicherweise für den reduzierten Nachweis von Spire-1 Protein ursächlich war. Immunhistologisch zeigte Spire-1 im Mausmodell in den Glomeruli und in der Zellkultur eine vermehrt perinukleäre Färbung nach toxischer Schädigung. Möglicherweise ist die beschriebene Funktion von Spire-1 im vesikulären Transport von Proteinen entlang der Mikrotubuli hin zu den Fußfortsätzen gestört. Inwieweit diese Veränderungen Ausdruck oder Ursache der podozytären Schädigung waren, soll in weiteren Experimenten geklärt werden.

---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ulrich Kuhlmann DW, Joachim Böhler, Friedrich Luft (ed). *Nephrologie: Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren*. Thieme, Stuttgart. 720pp.
2. Laurence H. Beck, David J. Salant. M- Type Phospholipase A2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *New England Journal of Medicine*, 2009 Vol. 361 No.1.
3. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 3005-3015.
4. Guyton (ed). *Medical Physiology*. 2006, S.315.
5. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.
6. Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, *et al*. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology* 2006; 218: 164-171.
7. Margit Pavelka JR (ed). *Funktionelle Ultrastruktur, Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben*. Springer Verlag. 334pp.
8. Martin J, Davies M. Differential regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human glomerular epithelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Sep; 9(9): 1629-37.
9. Floege J, Couser WG, Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo. *Lab Invest* 1992 Oct; 67(4): 486-97.
10. Yaoita E, Wiche G, Yamamoto T, Kawasaki K, *et al*. Perinuclear distribution of plectin characterizes visceral epithelial cells of rat glomeruli. *Am J Pathol* 1996; 149: 319-327.
11. Kurihara, H., Shike T. Monoclonal Antibody P-31 recognizes a novel intermediate filament-associated protein (p 250) in rat podocytes. *Am J Physiol* 1998 May; 274: F986-97.
12. PW Baas, HC Joshi.  $\gamma$ - Tubulin distribution in the Neuron: Implications for the origins of Neuritic Microtubules. *J Cell Biol* 1992 Oct; 119(1): 171-8.
13. Baas PW, Black MM, and Banker GA. Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 1989. 109: 3085-3094.
14. Andrews PM, The effect of vinblastine- induced microtubule loss on kidney podocyte morphology. *Am J Anat* 1977 Sep; 150(1): 53-61.

15. Drenckhahn D, und Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* 1988; 59: 637-682.
16. Kriz W, Mundel P, und Elger M. The contractile apparatus of podocytes is arranged to counteract GBM expansion. *Contrib Nephrol* 1994; 107: 1-9.
17. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, *et al.* Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997; 236: 248-258.
18. Kerjaschki D, Sharkley DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin- the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; 98(4): p.1591-6.
19. Rodewald R, Karnovsky RJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974 Feb; 60(2): 423-33.
20. Wang SX, Ahola H, Palmén T, Solin M-L, Luimula P, Holthöfer H. Recurrence of Nephrotic Syndrome after Transplantation in CNF Is due to Autoantibodies to Nephritin. *Exp Nephrol* 2001; 9(5): 327-331.
21. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, und Pringle JH. Glomerular expression of Nephritin is decreased in acquired human nephritic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1234- 1237.
22. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, *et al.* Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4829-4836.
23. Huber T, *et al.* Molecular basis of the functional podocin-nephritin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt Nephritin targeting to lipid raft microdomains. *Human Molecular Genetics* 2003; Vol. 12 No. 24: 3397- 3405.
24. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, and Miner JH. Cd2ap is expressed with Nephritin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F785- F792.
25. Wolf G, Stahl RA. CD2- associated protein and glomerular disease. *Lancet* 2003 Nov 22; 362(9397):1746-8.
26. Meyer TN, Schwesinger C, Denker BM. Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 24855-24858.
27. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, Ohshiro K, Kawachi H, Okada K, Suzuki H, Kihara I, and Yamamoto T. Fat is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001; 59: 1003-1012.

28. Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, *et al.* Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* 1997; 139: 1025-1032.
29. Sakamaki Y, Sasamura H, Hayashi K, Ishiguru K, Takaishi H, Okada Y, D'Armiento JM, Saruta T, Itoh H. Absence of gelatinase (MMP-9) or collagenase (MMP-13) attenuates adriamycin-induced albuminuria and glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol* 2010; 115(2): e22.32.
30. He L, Rong X, Jiang JM, Liu PQ, *et al.* Amelioration of anti-cancer agent adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats by Wulingsan (Gorei-San), a blended traditional Chinese herbal medicine. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1452-1460.
31. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 114-122.
32. Guo J, *et al.* RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis. 2008 May; 19(5): 961-72.
33. Poggi A, Kornbliht L, Delaini F, Colombo T, *et al.* Delayed hypercoagulability after a single dose of adriamycin to normal rats. *Thromb Res* 1979; 16: 639-650.
34. Malarkodi K.P *et al.* The influence of lipoic acid on adriamycin induced nephrotoxicity in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; 247: 15–22.
35. Bevanda M, Orsolich N, Basic I, Vukojevic K, Benkovic V, Horvat Knezevic A, Lisicic D, Dikic D, Kujundzic M. Prevention of peritoneal carcinomatosis in mice with combination hyperthermal intraperitoneal chemotherapy and IL-2. *Int J of Hyperthermia* 2009 Mar; 25(2): 132-40.
36. Schumacher N, Borawski JM, Leberfinger CB, Gessler M, *et al.* 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: 249-255.
37. Manseau LJ, Schüpbach T. Cappuccino and Spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1989 Sept; 3(9): 1437-1452.
38. Kerkhoff E, Simpson JC, Leberfinger CB, Otto IM, Doerks T, Bork P, Raabe T, Pepperkok R. The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol* 2001 Dec 11; 11(24): 1963-8.
39. Kerkhoff E. Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 477-483.
40. Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 2005; 433: 382-388.

41. Otto IM, Raabe T, Rennefahrt UE, Bork P, *et al.* The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol* 2000; 10: 345-348.
42. Ostermeier C, Brunger AT. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* 1999 Feb 5; 96(3): 363-374.
43. Ciccarelli FD, Bork P, Kerkhoff E. The KIND module: a putative signalling domain evolved from the C lobe of the prozeine kinase fold. *Trends Biochem Sci* 2003 Jul; 28(7), 349-352.
44. Rosales-Nieves AE, Johndrow JE, Keller LC, Magie CR, *et al.* Coordination of microtubule and microfilament dynamics by Drosophila Rho1, Spire and Cappuccino. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 367-376.
45. Bosch M, Le KH, Bugyi B, Correia JJ, *et al.* Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Mol Cell* 2007; 28: 555-568.
46. Wang Y, Riechmann V. Microtubule anchoring by cortical actin bundles prevents streaming of the oocyte cytoplasm. *Mech Dev* 2008; 125: 142-152.
47. Meyer TN, Schwesinger C, Wahlefeld J, Dehde S, Kerjaschki D, Becker JU, Stahl RA, Thaiss F. A new mouse model of immune-mediated podocyte injury. *Kidney Int* 2007 Oct; 72(7): 841-52.
48. Qin XH, Lee VWS, Wang YP, Zheng GP, Wang Y, Alexander SI, Harris DCH. A protective role for programmed death 1 in progression of murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int* Oct 2006; 70(7): 1244-50.
49. Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Nagae T, Yokoi H, Kaeachi H, Shimizu F, Sugawara A, Nakao K. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005 Sept; 16(9): 2690-701.
50. Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the in-vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; Vol 94: 12297- 12302.
51. Pereira RL, Câmara NO, *et al.* Bradykinin receptor 1 activation exacerbates experimental focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2011 March 16 [Epub ahead of print].
52. Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Gröne HJ, Schlöndorff D, Kretzler M. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003 Nov; 14(11): 2958-66.

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADR	Adriamycin
AG	Arbeitsgruppe
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel
°C	Grad Celsius
c	centi ( $\times 10^{-2}$ )
D, kD	Dalton, Kilo- Dalton
cDNA	kodierende DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylen- diamin- tetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceineisothiocyanat
FSGS	Fokal- sklerosierende Glomerulosklerose
g	Gramm
<i>g</i>	gravity / Schwerkraft
GBM	glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde(n)
HEPES	4 (2- Hydroxyethyl) - 1 – piperazinethansulfonsäure
If	Interferon

---

IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgG	Immunglobulin der Klasse G
k	kilo ( $\times 10^3$ )
LDL	low density lipoprotein
LDS	Lithium Dodecylsulfat
L	Liter
M	Molarität
MMLV	moloney murien leukemia virus; Moloney Mäuse Leukämie Virus
MOPS	Morpholinopropan Sulfonsäure
MTOC	Microtubule- Organisation- Center
NaCl	Natriumchloridlösung
m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
PAN	Puromycin Aminonukleosid
PAS	Periodic acid- Schiff
pK	negativ dekad. Logarithmus der Dissoziationskonstanten eines Elektrolyten
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QPCR	Quantitative PCR
RAAS	Renin- Angiotensin- Aldosteron- System
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Sodium- dodecyl- sulfat

TBST	Tris gepufferte Salzlösung + Tween 20
Tris	Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan
TGF	Transforming growth factor
T-PER	Tissue Protein Extraction Reagent
UV	ultraviolett
μ	mikro ( $\times 10^{-6}$ )
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WH2	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein homology region
WT1	Wilms- Tumorsuppressorgen
VLDL	very low density lipoprotein

## Lebenslauf

Name: Sabrina Margarete Mathey

Geburtsdatum: 21.01.1983 in Aschaffenburg, Bayern

Wohnort: Wendloher Weg 19, Hamburg

Schulbildung: 1989- 1993 Grundschule Klein-Welzheim  
1993- 2002 Einhard- Gymnasium Seligenstadt  
07/ 2002 Abitur

Studium: 09/ 2004- 06/ 2006 Studium der Humanmedizin in  
englischer Sprache im internationalen Programm der  
Universität Szeged, Ungarn  
06/ 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/ 2006- 11/ 2010 Studium der Humanmedizin an der  
Universität Hamburg  
04/ 2008 Beginn der Promotion in der nephrologischen  
Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf  
unter der Leitung von PD Dr. med. T. Meyer  
11/ 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/ 2010 Approbation als Ärztin

Famulaturen und  
Praktisches Jahr: 08-10/ 2003 Pflegepraktikum Charité Berlin  
10-12/ 2006 Intensivstation Universitätsklinikum Szeged  
09/ 2007 Radiologie UKE Hamburg  
09/ 2008 Dialysepraxis Schlankreye Hamburg  
08-10/ 2009 Viszeralchirurgie Hôtel-Dieu Paris  
10-12/ 2009 Pädiatrische Viszeralchirurgie Necker-Enfants  
Malades Paris  
12/ 2009 – 03/ 2010 Innere Medizin Asklepios Klinik  
Altona Hamburg  
03-07/ 2010 Gynäkologie und Geburtshilfe Ev. Amalie  
Sieveking Krankenhaus Hamburg

## **Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Dr. Tobias Meyer, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit unter seiner Leitung in seinem Labor anzufertigen. Mit seiner optimistischen Art hat er das Fortschreiten und Gelingen der Experimente stets vorangetrieben und es mir ermöglicht, einen breiten Einblick in die Grundlagenforschung zu erlangen.

Ferner danke ich Frau Dr. Catherine Meyer-Schwesinger für ihre überaus kompetente und stets freundliche Hilfe bei Fragestellungen praktischer sowie theoretischer Art.

Herrn Dr. Philip Klug gilt mein Dank für die Einarbeitung in den Großteil der in der Arbeit verwendeten Methoden.

Bei Frau Marlies Sachs bedanke ich mich für die Schaffung einer außerordentlich warmen Arbeitsatmosphäre im Labor und dafür, dass sie mir mit Ihrem reichen Erfahrungsschatz stets zur Seite stand.

Herrn Stefan Gatzemeier danke ich für die starke Unterstützung in der Auswertung und Darstellung der Daten.

Darüber hinaus danke ich allen nicht namentlich genannten Institutsmitgliedern, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern danken, die mich nicht nur immer uneingeschränkt unterstützt haben, sondern die mir auch das Medizinstudium, und somit die Erstellung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

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

Sabrina Mathey