

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

**Charakterisierung der Zusammensetzung der glomerulären  
Basalmembran von GLEPP1 WT und KO Mäusen im Alter von vier  
und sechs Monaten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Philip Schüppler

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Univ- Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Herr PD Dr. med. Mansur Duran

Für den Coach.

**Charakterisierung der Zusammensetzung der glomerulären  
Basalmembran von GLEPP1 WT und KO Mäusen im Alter von vier  
und sechs Monaten**

# I Zusammenfassung

GLEPP1 (engl. *glomerular epithelial protein 1*) ist eine Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase im Fußfortsatz des Podozyten. Mutationen im GLEPP1 Gen führen zu einem nephrotischen Syndrom im Kindesalter. Um die genaueren Ursachen und Hintergründe zu erforschen wurden GLEPP1 KO Mäuse auf einen 129P3/J Hintergrund untersucht. So konnte in dieser Arbeit die Zusammensetzung der GBM (glomerulären Basalmembran) auf Protein- und RNA-Ebene bei Mäusen mit einem GLEPP1 KO im Alter von vier und sechs Monaten untersucht werden. Die Mäuse entwickeln erstmals im Alter von sechs Monaten eine Proteinurie. Ebenfalls im Alter von sechs Monaten kommt es zu einer Umstrukturierung des Kollagennetzwerkes der GBM. Physiologischerweise besteht die GBM aus Kollagen IV  $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Heterotrimeren. Die KO-Mäuse bilden aber vermehrt Heterotrimere aus  $\alpha1$  und  $\alpha2$ -Kollagenketten, welche normalerweise nur während der Entwicklung im unreifen Glomerulum vorkommen. Auf Grund der unreifen Konfiguration der GBM scheint es also zu einem funktionellen Defekt der GBM zu kommen. Laminin, als zweiter wichtiger Hauptbestandteil der GBM, zeigt im Alter von vier bis sechs Monaten keine Veränderungen. Der zugrundeliegende Mechanismus für die Reexpression unreifer GBM ist bis jetzt ungeklärt. Die Untersuchung der Genexpression zeigt eine Assoziation zur WT1-Expression, da es im GLEPP1 KO herabreguliert wird. Hier lässt sich ein möglicher Mechanismus vermuten, da WT1 ein essenzieller Transskriptionsfaktor der Nierenentwicklung ist und daher weitreichenden Einfluss auf die Konzeption z.B. der GBM nehmen könnte.

GLEPP1 scheint also für die Langzeitstabilität und Integrität des glomerulären Filterapparates von essenzieller Bedeutung zu sein. Eine weitere Erforschung könnte für Patienten mit einer Proteinurie potenziell neue Therapieoptionen eröffnen.

## II Abstract

GLEPP1 (glomerular epithelial protein 1) is a receptor tyrosine phosphatase in the foot process of the podocyte. Mutations in the GLEPP1 gene lead to a nephrotic syndrome in childhood. To investigate the exact causes and background, GLEPP1 KO mice were examined on a 129P3/J background. Thus, the composition of the GBM (glomerular basement membrane) on protein and RNA level in mice with a GLEPP1 KO at the age of four and six months could be investigated in this study. The mice develop proteinuria at the age of six months. Also at the age of six months, the collagen network of the GBM is restructured. Physiologically, the GBM consists of collagen IV  $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Heterotrimers. However, the KO mice increasingly produce heterotrimers from  $\alpha1$  and  $\alpha2$  collagen chains, which normally only occur during development in the immature glomerulum. Due to the immature configuration of the GBM, a functional defect of the GBM seems to occur. Laminin, the second major component of the GBM, shows no changes at the age of four to six months. The underlying mechanism for the reexpression of an immature GBM has not yet been clarified. The study of gene expression shows an association to WT1 expression, since it is downregulated in GLEPP1 KO. Here a possible mechanism can be assumed, since WT1 is an essential transcription factor of kidney development and could therefore have a far-reaching influence on the conception of the GBM.

GLEPP1 therefore seems to be essential for the long-term stability and integrity of the glomerular filter apparatus. Further research could potentially open up new therapeutic options for patients with proteinuria.

### III Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>AS</b>	Alport-Syndrom
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetylsäure
<b>ELISA</b>	<i>Eynzem Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ESRD</b>	<i>End-stage renal disease</i>
<b>FSGS</b>	fokal segmentale Glomerulosklerose
<b>GBM</b>	glomeruläre Basalmembran
<b>GBM</b>	glomeruläre Basalmembran
<b>gDNA</b>	genomische DNA
<b>GLEPP1</b>	<i>glomerular epithelial protein 1</i>
<b>HRP</b>	<i>horse radish peroxidase</i>
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>MCG</b>	minimal change-Glomerulopathie
<b>NS</b>	nephrotisches Syndrom
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PMSF</b>	Phenylmethansulfonylfluorid

<b>Ptpro</b>	<i>proteine tyrosine phosphatase receptor type O</i>
<b>qPCR</b>	quantitative PCR
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfate
<b>SRNS</b>	steroid-resistentes NS
<b>SSNS</b>	steroid-sensibel NS
<b>Super-ECL</b>	<i>SuperSignal® ELISA Fento Maximum Sensitivity Substrate</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamid
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>WT1</b>	<i>Wilms Tumor suppressor gene 1</i>

# IV Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Nierenerkrankungen	1
1.2	Das nephrotische Syndrom	1
1.3	Der glomeruläre Filter	4
1.4	Die glomeruläre Basalmembran	6
1.4.1	Kollagen	10
1.4.2	Laminin	11
1.4.3	Agrin	11
1.4.4	Nidogen	12
1.5	GLEPP1	12
1.6	Ziele der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien/Reagenzien	17
2.1.2	Geräte	18
2.1.3	Verbrauchsmaterial	19
2.1.4	Fertigsysteme (Kits)	20
2.1.5	Gebrauchs- und Hilfsgegenstände	20
2.1.6	Primer, Marker und Antikörper	21
2.1.7	Puffer	24
2.1.8	Software	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Reverse Transkription	28
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.3	GAPDH-Kontroll-PCR	31
2.2.4	Real Time PCR (qPCR)	32
2.2.5	Mausmodell	35
2.2.6	Western- Blot	41
2.2.7	Auswertung/ Densitometrie	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1	Real Time PCR	49
3.1.1	Nidogen 1	49
3.1.2	Nidogen 2	50

3.1.3	Agrin .....	50
3.1.4	WT1 .....	51
3.2	Western Blot .....	52
3.2.1	GLEPP1-Knockout im Alter von vier Monaten .....	52
3.2.2	GLEPP1- Knockout im Alter von sechs Monaten.....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
4.1	Veränderungen der GBM beim GLEPP1 KO .....	58
4.1.1	Kollagen IV.....	58
4.1.2	Laminin.....	59
4.1.3	Agrin und Nidogen .....	60
4.2	Einordnung.....	61
4.2.1	GLEPP1 KO.....	61
4.2.2	Kollagen IV.....	61
4.2.3	Laminin.....	62
4.2.4	Alport-Syndrom.....	62
4.3	Proteinurie .....	64
4.3.1	Kollagen IV.....	64
4.3.2	Laminin.....	65
4.3.3	Nidogen und Agrin .....	65
4.4	Regulation der GBM Veränderungen.....	66
4.4.1	WT1 .....	67
4.5	Limitationen der Arbeit.....	69
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Nierenerkrankungen

Die Niere ist eines unserer lebenswichtigsten Organe, umso wichtiger ist das vollständige Verständnis und die Aufklärung der Pathogenese bei Schäden an diesem Organ. Die Funktion der Niere kann durch unterschiedliche Veränderungen gestört werden, die zu einer Niereninsuffizienz führen. Die häufigsten Ursachen einer chronischen Niereninsuffizienz sind vor allem ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus und Bluthochdruck <sup>1</sup>. Zusätzlich gibt es die Glomerulonephritiden, polyzystische Nephropathien, chronische Harnwegsinfekte, medikamenteninduzierte und systemerkrankungsbedingte Ursachen für einen chronischen Schaden der Niere <sup>2</sup>. Schreitet die Insuffizienz weiter fort kommt es zum Nierenversagen, welches Ersatzverfahren oder eine Transplantation nötig macht. Es handelt sich also um eine lebenslimitierende Erkrankung. Außerdem haben die Inzidenz und Prävalenz in den letzten Jahrzehnten sogar noch zugenommen <sup>3</sup>. Um eine angemessene Behandlung zu ermöglichen, steht auch die Ursachenforschung immer mehr im Vordergrund. Vor allem im Bereich der genetischen Dispositionen wurden hier in den vergangenen Jahren einige essenzielle neue Erkenntnisse gewonnen. Es existiert jedoch nach wie vor eine Gruppe an idiopathischen Nephropathien, dessen Ursache nicht geklärt werden kann. Die vorliegende Arbeit knüpft an eben diese Gruppe an und leistet einen Beitrag bei der Suche nach einer neuen Genmutation, die zu einem Nierendefekt führt. Durch Verständnis monogenetischer Erkrankungen können auch Rückschlüsse auf die physiologische Funktion einzelner Moleküle des glomerulären Filters erlangt werden, die auch für erworbene Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle spielen können. Im Mittelpunkt stehen dabei die proteinurischen, glomerulären Erkrankungen der Niere.

## 1.2 Das nephrotische Syndrom

Das nephrotische Syndrom (NS) ist ein wichtiges Symptom glomerulärer Erkrankungen <sup>4</sup>. Die Symptome sind:

- Große Proteinurie (>3-3,5g/d für Erwachsene ||| >1g/m<sup>2</sup> Körperoberfläche/d für Kinder)

- Hypoproteinämie (<60g/L)
- Hypalbuminämische periphere Ödeme (wenn Serumalbumin <2,5g/dl)
- Hyperlipoproteinämie

Ätiologisch unterscheidet man zwischen einem primären und einem sekundären NS. Primär bedeutet, dass die Erkrankung direkt vom Glomerulum in Form einer idiopathischen Glomerulonephritis ausgeht. Die prominentesten Vertreter der Glomerulonephritiden sind die *minimal change*-Glomerulopathie (MCG), die am häufigsten bei Kindern auftritt, die membranöse Glomerulonephritis, als häufigste beim Erwachsenen und die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) <sup>5</sup>. Sekundäre und seltenere Ursachen sind unter anderem die diabetische Nephropathie, maligne Tumore (z.B. Plasmozytom, Karzinome), Kollagenosen (z.B. Lupus erythematoses) und Amyloidose <sup>6,7</sup>. Unabhängig von der Ursache beruht die Pathogenese immer auf demselben Mechanismus einer abnormen Permeabilität des glomerulären Filters.

Das NS kann bereits im Jugendalter zu einer Terminalen Niereninsuffizienz (ESRD) führen. Die Inzidenzraten variieren dabei mit der ethnischen Herkunft. Eine aktuelle Studie mit 711 Kindern aus unterschiedlichen Regionen der Welt konnte eine Inzidenz zwischen 1,99/100.000 und 4,71/100.000 im Alter von 1-18 Jahren zeigen <sup>8</sup>. Neben der histologischen Einteilung wird das idiopathische nephrotische Syndrom auch noch anhand des Therapieansprechens als steroid-resistent (SRNS) oder steroid-sensibel (SSNS) eingestuft und entsprechend therapiert <sup>9,10</sup>. Gerade beim SRNS können die genauen Ursachen und Hintergründe nicht immer geklärt werden. Häufig sind genetische Mutationen der einzelnen Komponenten des glomerulären Filters die Grundlage. Eine Auflistung der bekannten Genmutationen, die zu einem SRNS führen sind in Abb. 1 enthalten <sup>11</sup>.

Gene	Protein	Accession number	Chromosome
<b>Autosomal recessive</b>			
ADCK4	AarF domain containing kinase 4	NM_024876.3	19
ARHGDI1A	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	NM_001185078.1	17
CD2AP	CD2-associated protein	NM_012120.2	6
CFH	Complement factor H	NM_000186.3	1
COQ2	Coenzyme Q2 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase	NM_015697.7	4
COQ6	Coenzyme Q6 mono-oxygenase	NM_182476.2	14
CRB2	Crumbs homolog 2	NM_173689.5	9
CUBN	Cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	NM_001081.3	10
DGKE	Diacylglycerol kinase, epsilon	NM_003647.2	17
EMP2	Epithelial membrane protein 2	NM_001424.4	16
FAT1	FAT tumor suppressor homolog 1	NM_005245.3	4
ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	NM_005501.2	17
ITGB4	Integrin, beta 4	NM_000213.3	17
KANK1	KN motif and ankyrin repeat domain containing protein 1	NM_001256876.1	9
KANK2	KN motif and ankyrin repeat domain containing protein 2	NM_015493.6	19
KANK4	KN motif and ankyrin repeat domain containing protein 4	NM_181712.4	1
LAMB2	Laminin, $\beta$ 2	NM_002292.3	3
MTTL1	Mitochondrially encoded tRNA leucine 1	NC_012920.1	Mito
MYO1E	Homo sapiens myosin IE (MYO1E)	NM_004998.3	15
NPHS1	Nephrin	NM_004646.3	19
NPHS2	Podocin	NM_014625.2	1
NUP93	Nucleoporin 93 kDa	NM_014669.3	16
NUP107	Nucleoporin 107 kDa	NM_020401.2	12
NUP205	Nucleoporin 205 kDa	NM_015135.2	7
PDSS2	Prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 2	NM_020381.3	6
PLCE1	Phospholipase C, epsilon 1	NM_016341.3	10
PTPRO	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	NM_030667.2	12
SCARB2	Scavenger receptor class B, member 2	NM_005506.3	4
SMARCAL1	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1	NM_014140.3	2
WDR73	WD repeat domain 73	NM_032856.2	15
XPO5	Exportin 5	NM_020750.2	6
<b>Autosomal dominant</b>			
ACTN4	Actinin, alpha 4	NM_004924.4	19
ANLN	Anillin, actin binding protein	NM_018685.2	7
ARHGAP24	Rho GTPase-activating protein 24	NM_001025616.2	4
INF2	Inverted formin, FH2 and WH2 domain containing	NM_022489.3	14
LMX1B	LIM homeobox transcription factor 1, beta	NM_00117414.1	9
MYH9	Myosin heavy chain 9	NM_002473.4	22
TRPC6	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	NM_004621.5	11
WT1	Wilms tumor 1	NM_024426.4	11

Abb. 1: rezessive und dominante Gene deren Mutation zu einem monogenetischem SRNS führen. Quelle: <sup>11</sup>

Am häufigsten sind dabei Mutationen in <sup>12</sup>:

- NPHS2 (Podocin)
- NPHS1 (Nephrin)
- WT1 (Wilms-Tumor-Gen 1)
- PLCE1 (Phospholipase C)
- LAMB2 (Laminin  $\beta$ 2 Ketten).

Podocin und Nephrin sind zwei essenzielle Proteine der glomerulären Schlitzmembran <sup>13,14</sup>. Mutationen in einem der beiden Komponenten führen zum SRNS,

da die selektive Permeabilität des glomerulären Filters gestört ist <sup>15-17</sup>. Das Wilms-Tumor-Gen 1 (WT1) fungiert als zentraler Regulations- und Transkriptionsfaktor der gonadalen Entwicklung und speziell des Podozyten <sup>18</sup>. Mutationen in WT1 konnten bei Kindern mit einem SRNS assoziiert werden <sup>19-21</sup>. Auch bei Mutationen im Gen der Phospholipase C, die die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) des intrazellulären Signalweges katalysiert, kommt es zu einem NS <sup>22</sup>. Ein Gendefekt im Gen LAMB2, welches für die Laminin  $\beta$ 2 Kette kodiert führt ebenfalls zum NS <sup>23</sup>. Ohne die  $\beta$ 2 Ketten von Laminin kommt es zu Fehlern in der Konzeption der glomerulären Basalmembran (GBM), die zum kongenitalen NS führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich unser Verständnis von einzelnen kritischen Faktoren, die eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des glomerulären Filters spielen, in den vergangenen Jahren stark weiterentwickelt hat. Kennt man die Ursache der Erkrankung, ergeben sich oft effizientere und individuelle Behandlungsmöglichkeiten. Dies betrifft jedoch in den meisten Fällen nicht die genetischen Erkrankungen, da die Ursache bis jetzt nur schwer zu beseitigen ist.

Vor kurzem wurde eine weitere Mutation als Ursache des NS im Kindesalter identifiziert. Dabei handelt es sich um eine homozygote Mutation auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12p12, welches das *glomerular epithelial protein 1* (GLEPP1) codiert <sup>24</sup>. Zum genaueren Verständnis, der daraus resultierenden Veränderungen, folgt nun ein kurzer Einstieg in die genaue Zusammensetzung des glomerulären Filterapparates, um danach genauer auf GLEPP1 einzugehen.

### **1.3 Der glomeruläre Filter**

Der glomeruläre Filterapparat besteht aus drei verschiedenen Komponenten: Dem fenestrierten, kapillären Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den viszeralen Epithelzellen, den Podozyten, und ihren charakteristischen Fußfortsätzen <sup>25-29</sup>. Das fenestrierte Endothel dient als Barriere für große und aggregierte Zellen, jedoch können die meisten gelösten Stoffe und Proteine das Endothel problemlos passieren <sup>30</sup>. Die GBM hält alle Moleküle mit einem Durchmesser über 10nm oder Proteine mit negativer Ladung und einer Masse von 70kDa zurück <sup>31</sup>.

Da die GBM für den Inhalt dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist, wird deren Zusammensetzung im nächsten Kapitel noch weiter vertieft. Auf der Harnseite bilden die Fußfortsätze der Podozyten eine filigrane Architektur. Dabei interdigitieren jeweils die Fußfortsätze zweier benachbarter Podozyten und es bildet sich zwischen den Fortsätzen eine dünne glomeruläre Schlitzmembran mit einer Porengröße von 30-40nm<sup>32,33</sup>. Der Schlitzmembran wird die größte Bedeutung in Bezug auf die Größenselektivität des Filters zugeschrieben<sup>14</sup>. Abb. 2 liefert eine zusammenfassende Übersicht über den Aufbau des Filters. Die Filterung von Proteinen findet anhand von Größe (bis zu 70kDa) und Ladung (negativ) statt, um zu verhindern, dass z.B. lebenswichtige Plasmaproteine ausgeschieden werden. Der prominenteste Vertreter der Plasmaproteine ist das Albumin. Mit seiner negativen Ladung und einer Molekülmasse von ~65kDa wird Albumin direkt im Blut zurückgehalten oder später fast vollständig tubulär resorbiert<sup>34,35</sup>.

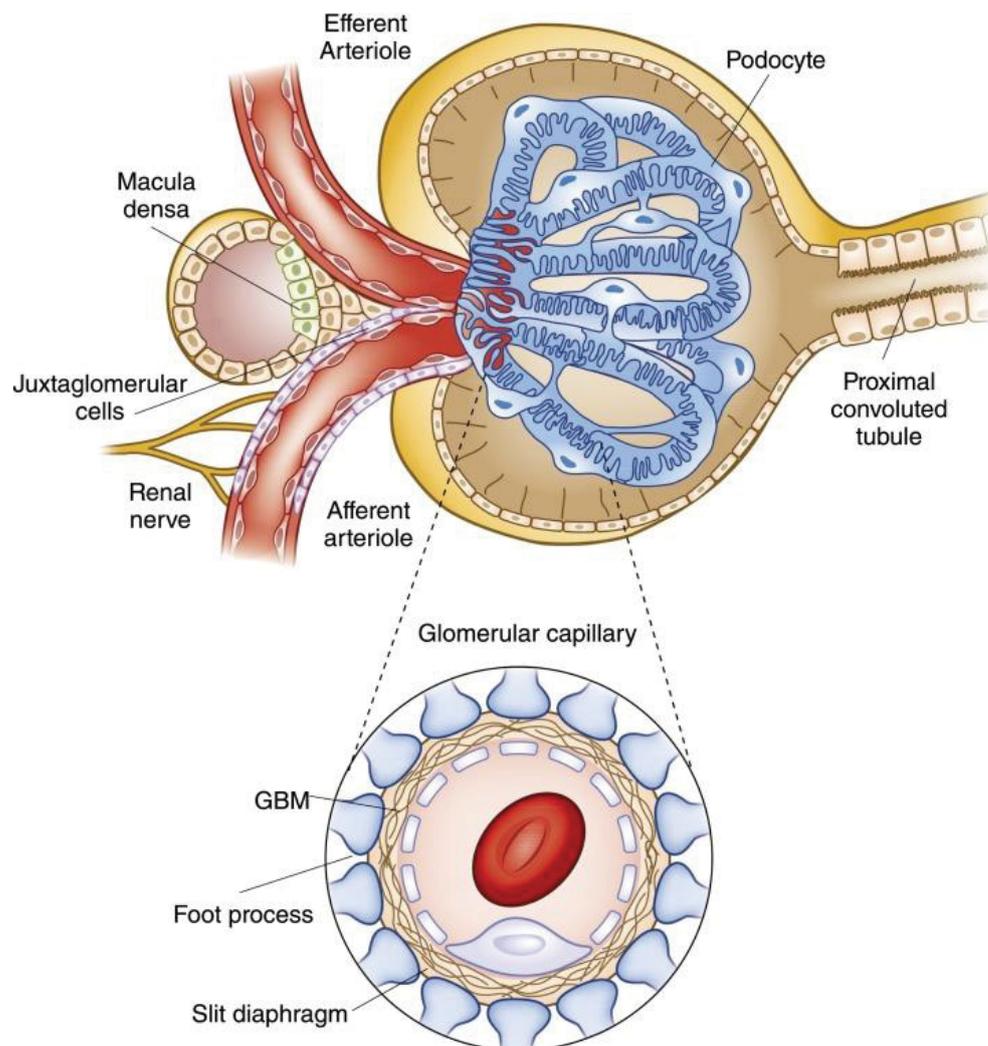


Abb. 2 Dargestellt ist der strukturelle Aufbau eines Nierenkörperchens aus einem kapillären Gefäßknäuel (Glomerulus) und der umgebenden Kapsel (Bowman-Kapsel). Außerdem zeigt der vergrößerte Ausschnitt den Aufbau des glomerulären Filters. Zu sehen ist zentral das Gefäß ausgekleidet mit fenestriertem Endothel. Darauf folgt die glomeruläre Basalmembran und die Fußfortsätze der Podozyten zwischen denen sich die Schlitzmembran befindet. Quelle:<sup>36</sup>.

## 1.4 Die glomeruläre Basalmembran

Wie alle Basalmembranen besteht die GBM hauptsächlich aus Laminin, Kollagen IV, Nidogen und Proteoglykanen, hauptsächlich Agrin<sup>37</sup>. Ungewöhnlich ist ihre Dicke mit 300-350nm. Die einzelnen Komponenten bilden ein komplexes, dichtverzahntes Netzwerk. Außerdem vollzieht sich im Laufe der Entwicklung eine Art Reifungsprozess, der die Isoformen von Kollagen IV und Laminin verändert<sup>38</sup>.

Die Kollagen IV Familie besteht aus sechs  $\alpha$ -Ketten entsprechend  $\alpha 1$  bis  $\alpha 6$ , die von den entsprechenden Genen COL4A1-6 kodiert werden<sup>39</sup>. Die Ketten lagern sich zu unterschiedlichen spezifischen Trippelhelices zusammenlagern. Die bis jetzt entdeckten funktionsfähigen Kombinationen sind  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ ,  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  und  $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ <sup>39-41</sup>. An den beiden Enden besitzt die Helix N-terminal eine 7S-Domäne und C-terminal eine Nicht-Kollagen-Domäne (NCI). Eine Übersicht dazu gibt Abb. 3. Die Domänen sind entscheidend für die Netzwerkbildung zwischen mehreren  $\alpha$ -Helices. Über die Verbindung zweier NCI-Domänen bildet sich ein Dimer und vier Dimere werden über die 7S-Domäne zu einem Tetramer<sup>42,43</sup>.

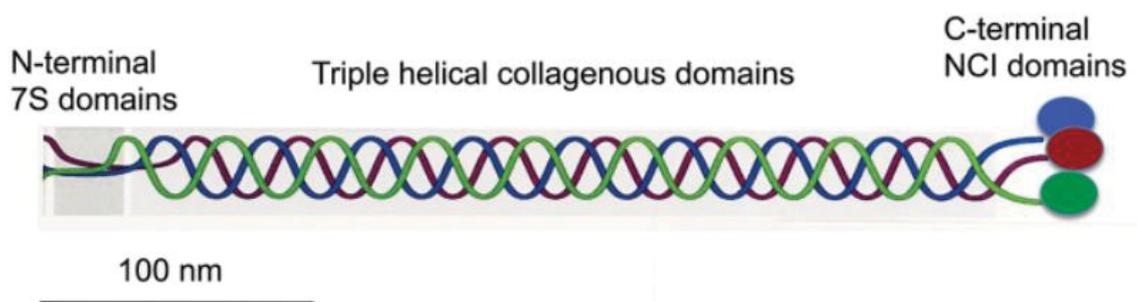


Abb. 3 Schematische Darstellung einer Kollagen IV  $\alpha$ -Trippelhelix. Am N-terminalen Ende der Helix befindet sich die 7S-Domäne und am C-terminalen Ende eine Nicht-Kollagen-Domäne (NCI). Quelle:<sup>43</sup>

In der GBM findet ein Wechsel der ursprünglichen unreifen Zusammensetzung aus  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$  hin zu einer reifen  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ -Zusammensetzung statt<sup>44</sup>. Die Kollagen IV Ketten



(engl. *capillary loop stage*) in das Nierenbläschen zeigen sich Anzeichen für das Ersetzen von Laminin  $\alpha 1$  <sup>38</sup>. Sind die Kapillarschlingen in den Glomeruli präsent, lässt sich kein Laminin  $\alpha 1$  mehr nachweisen, sondern nur noch Laminin  $\alpha 5$  <sup>38</sup>. Der Wechsel von Laminin vollzieht sich sehr abrupt und es gibt nur ein sehr kurzes Intervall, in dem sich beide Isoformen finden lassen. Für Kollagen IV findet der Wechsel erst später in der kapillären Einsprossungsphase statt. Desto mehr Kapillarschlingen sich in den Glomeruli bilden, umso mehr reifes Kollagen wird gebildet <sup>38</sup>. Der Wechsel vollzieht sich hierbei diskontinuierlich und nicht so abrupt wie bei Laminin. Allerdings zeigen sich die beiden Isoformen nie überlappend. Ein komplett gereiftes Glomerulum zeigt sich in acht Wochen alten Mäusen <sup>38</sup>. Außerdem ist die Biosynthese von Kollagen IV  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  Ketten nach fünf Wochen hochreguliert und die Synthese von  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Ketten herabreguliert <sup>38</sup>.

Beim Menschen konnte die essenzielle Bedeutung dieses entwicklungsgemäßen Wechsels im Gerüst der GBM anhand von Untersuchungen bei Patienten mit dem Alport-Syndrom herausgestellt werden <sup>44</sup>. Betroffene Patienten entwickeln eine Proteinurie. Dabei kommt es, durch einen Gendefekt der Kollagen IV Ketten  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$ , in der GBM zum Erhalt der unreifen Kollagenketten. Physiologischerweise zeigen sich die unreifen Ketten beim Menschen in der frühen Entwicklung des Nephrons (siehe Abb.5), werden dann aber in den Glomeruli ebenfalls während der Einsprossung der Kapillarschlingen (engl. *mature capillary loops*) ersetzt <sup>44</sup>.

Antibody	Newly formed nephrons	Maturing nephrons	Mature glomeruli		
			GBM	MM	BCBM
$\alpha 1$	+	+	-	+	+
$\alpha 2$	+	+	-	+	+
$\alpha 3$	-	-	+	-/+	+/-
$\alpha 4$	-	-	+	-	-
$\alpha 5$	-	-/+	+	-	-/+
$\alpha 6$	-	-	-	-	+

Abb. 5 Immunhistochemische Färbung für Kollagen IV in menschlicher fetaler Niere. Es wurden Antikörper gegen die einzelnen  $\alpha$ -Ketten von Kollagen IV zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung verwendet. Während der Entwicklung zeigen sich die unreifen Ketten. Während im reifen Glomerulum in der GBM nur noch reife Ketten zu finden sind. Zusätzlich wurde die Zusammensetzung der mesangialen Matrix (MM) und der Basalmembran der Bowman Kapsel (BCBM) untersucht. In diesen bleibt das unreife Kollagen erhalten. Im reifenden Nephron (engl. *maturing nephrons*) zeigt sich die  $\alpha 5$ -Kette erstmals leicht positiv (-/+). Modifiziert nach: <sup>44</sup>.

Da es sich bei der GBM um eine extrazelluläre Matrix handelt, ist sie bei der Synthese ihrer Bausteine auf die benachbarten Zellen angewiesen. In der frühen Entwicklung gibt es eine doppelte, verschmelzende Basalmembran zwischen dem Endothel und den Podozyten (siehe Abb.6) <sup>51</sup>. Diese unreife Konfiguration besteht, wie bereits erwähnt, aus Laminin  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  und aus Kollagen IV  $\alpha 1\alpha 2$  und wird gleichermaßen von Podozyten und Endothelzellen gebildet. Mit dem Reifungsprozess bildet sich Laminin  $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ , das nach wie vor aus Endothel und Podozyt synthetisiert wird und Kollagen IV  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ , das nur noch aus dem Podozyten gebildet wird <sup>51</sup>.

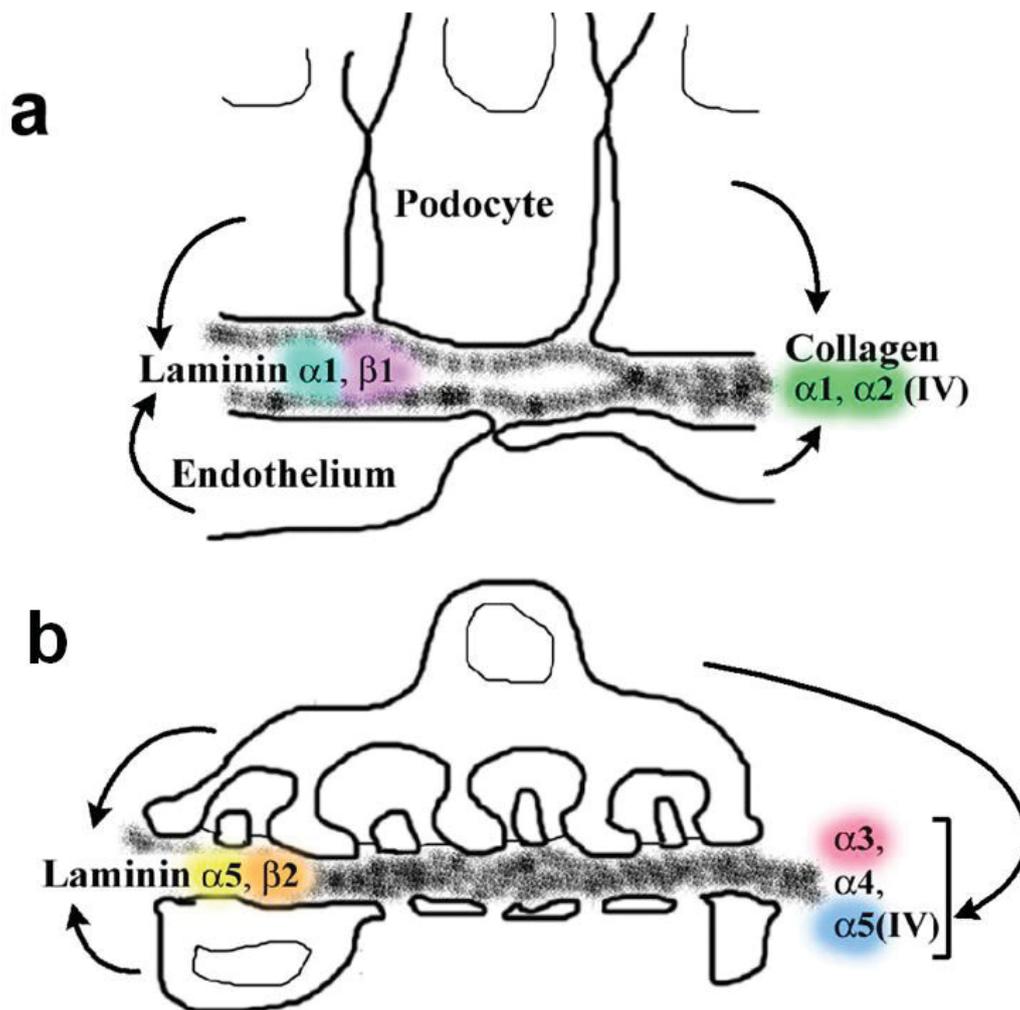


Abb. 6 Schematische Darstellung der Entwicklungsstufen der GBM.

(a) In der frühen Kapillarschlingenphase gibt es eine doppelte, verschmelzende Basalmembran zwischen dem Endothelium und dem Podozyten. Diese unreife GBM besteht aus Laminin-111 und Kollagen  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1$ (IV), die aus dem Podozyten und den Endothelzellen abgeleitet werden.

(b) Mit der glomerulären Alterung erhält die Kapillarschlinge ihre finale Konfiguration. Die GBM besteht dann nur noch aus Laminin-521, das aus dem Podozyten und den Endothelzellen gebildet wird, und Kollagen  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV), das nur aus dem Podozyten gebildet wird. Modifiziert nach:<sup>51</sup>.

Beim genaueren Verständnis der GBM und ihrer Bausteine konnten vor allem über die mit einem GBM-Defekt assoziierten Erkrankungen neue Erkenntnisse gewonnen werden. So basiert die Entdeckung der reifen Kollagenketten hauptsächlich auf der Assoziation mit bekannten Erkrankungen. Zuerst wurde die  $\alpha 3$ -Kette als Ziel beim *Goodpasture* Syndrom entdeckt<sup>52,53</sup>. Beim *Goodpasture* Syndrom handelt es sich um eine Autoimmun-Nephritis, die sich gegen die GBM richtet. Ziel der Autoantikörper sind dabei die Kollagen IV  $\alpha 3$ -Ketten<sup>54</sup>. In weiteren Versuchen zur Isolation der  $\alpha 3$ -Kette wurde eine eng verknüpfte Kette entdeckt, nämlich die  $\alpha 4$ -Kette<sup>55</sup>. Es entstand die Hypothese, dass eine der beiden Ketten beim Alport-Syndrom mutiert sein muss. Die genauere Analyse des mutierten Allels ergab jedoch die Entdeckung der  $\alpha 5$ -Kette, als Verursacher des x-chromosomalen Alport-Syndroms<sup>56-58</sup>. Das Alport-Syndrom (AS) zeigt sich neben der Proteinurie mit Symptomen bis hin zu einer Hämaturie und Bluthochdruck. Zusätzlich kommt es zu tubulointerstinaler Fibrose und sekundärer Glomerulosklerose. Mittlerweile wurde als Grundlage ein x-chromosomaler Gendefekt der  $\alpha 5$ -Kette oder eine autosomale Mutation der  $\alpha 3/\alpha 4$ -Ketten ausgemacht<sup>59</sup>. Abschließend wurde die Kollagen IV  $\alpha 6$ -Kette entdeckt, die bei manchen x-chromosomalen Alportsyndromen ohne  $\alpha 5$ -Mutation, mutiert war<sup>60,61</sup>.

Um die Bedeutung der einzelnen Bausteine der GBM genauer zu evaluieren, wurden an unterschiedlichen Mausmodellen *Knockouts* (KO) der entsprechenden Komponenten durchgeführt.

#### 1.4.1 Kollagen

In einem Mausmodell zu homozygoten COL4A1 Mutationen kam es zu fokalen Schäden an der GBM, die sich in einer Albuminurie äußerten. Neben den Nierenschäden kam es auch zu strukturellen Gehirnschäden, sowie einer hereditären Angiopathie mit Nephropathie, Aneurysmen und Muskelkrämpfen, beim Menschen HANAC-Syndrom genannt<sup>62,63</sup>. Es zeigen sich zusätzlich Hämaturie und Zysten. Eine heterozygote Mutation führt zu Schlaganfällen, Porencephalie, einer *small vessel disease* (Koronararterienkrankung) und zusätzlich zu Defekten an der GBM<sup>64-66</sup>. Die Kollagen IV  $\alpha 1$ -Ketten scheinen also von essenzieller Bedeutung bei der Entwicklung der GBM zu sein.

Bei einem KO von Kollagen IV  $\alpha 3$ - und  $\alpha 5$ -Ketten in Mäusen kommt es wie erwartet zu Symptomen des AS<sup>67</sup>. Initial zeigt sich eine unauffällige Nierenfunktion, dann kommt es jedoch im Verlauf zu einer progressive Proteinurie<sup>68,69</sup>. Außerdem kommt es zu Fehlern beim Reifungsswitch der GBM, da die unreifen Ketten Kollagen IV  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  erhalten bleiben<sup>70</sup>. Allerdings zeigen sich keine so schweren Schäden wie bei einem KO der unreifen Kollagenketten, daher scheinen die reifen Ketten weniger essenziell bei der grundsätzlichen Bildung der GBM, als vielmehr bei der Aufrechterhaltung der Filterfunktion von Bedeutung zu sein.

#### 1.4.2 Laminin

Bezüglich Laminin zeigt sich, dass eine Reduktion der reifen Isoform aus  $\alpha 5\beta 2\gamma 1$  immer zu einer Disposition der Trimere und damit zu einer gestörten Permeabilität der GBM führt. Symptomatisch kommt es zu Albuminurie und schließlich einem NS<sup>71</sup>. Bei einem vollständigen KO von Laminin  $\alpha 5$  im Mausmodell kommt es zu Neuralrohrdefekten und einem pränatalen Tod<sup>72</sup>. Liegt hingegen nur eine hypomorphe Mutation vor kann zumindest eine GBM gebildet werden, die allerdings innerhalb eines Monats proteinurisch wird und zum Nierenversagen führt<sup>73</sup>. Laminin  $\alpha 5$  ist also äußerst essenziell für die Entwicklung der Niere und des gesamten Körpers.

Mutationen in Laminin  $\beta 2$  sind beim Menschen mit dem kongenitalen nephrotischen Syndrom assoziiert und führen zusätzlich zu unterschiedlichen okulären und neurologischen Manifestationen, man spricht auch vom Pierson Syndrom<sup>74-76</sup>. Ein KO führt aber nicht wie bei Laminin  $\alpha 5$  zu einem vollständigen Zusammenbruch der GBM, sondern es kommt lediglich zur Bildung eines anderen Heterotrimers von Laminin nämlich  $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ <sup>72,76</sup>. Es erfolgt dadurch zwar eine strukturelle, aber keine funktionelle Kompensation. Laminin  $\beta 2$  ist also weniger essenziell für die Bildung der GBM, sondern ähnlich wie die reifen Kollagenketten eher bei der Aufrechterhaltung der Filterfunktion von Bedeutung.

#### 1.4.3 Agrin

Durch einen KO von Agrin kommt es zwar zu einem starken Verlust der anionischen Ladung der GBM, dieser schlägt sich jedoch nicht in einer verschlechterten

Permeabilität nieder <sup>77</sup>. Daher scheint Agrin von weniger essenzieller Bedeutung für den Filter zu sein.

#### 1.4.4 Nidogen

Für Nidogen zeigt sich die besondere Situation, dass Nidogen 1 und 2 einen KO im jeweils anderen Partner ersetzen können, da sie in ihrer Funktion redundant sind <sup>78,79</sup>. Ein KO führt daher zu keinen Veränderungen in der GBM. Bei einem KO von Nidogen 1 und 2 gleichzeitig kommt es zum perinatalen Tod, auch wenn die Basalmembranen trotzdem gebildet werden und auch die GBM ein normales Erscheinungsbild zeigt <sup>80,81</sup>. Der Mangel an Nidogen 1 und 2 führt also nicht zu einem Filterdefekt <sup>81</sup>.

Mit den bis jetzt gewonnenen Erkenntnissen widmen wir uns nun dem Kernthema dieser Arbeit, nämlich einem KO von GLEPP1 und den damit einhergehenden Veränderungen in der Zusammensetzung der GBM.

### 1.5 GLEPP1

GLEPP1 steht für *glomerular epithelial protein 1.*, das bereits 1994 durch *Thomas Wharram* und *Wiggins* identifiziert wurde <sup>82</sup>. Es handelt sich um eine Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase im Fußfortsatz des Podozyten, daher wird es auch als *proteine tyrosine phosphatase receptor type O* (Ptpro) bezeichnet <sup>83</sup>. Kodiert wird dieses Protein auf dem oberen Abschnitt des Chromosoms 12p12 <sup>83</sup>. Bei der genaueren Untersuchung der Bedeutung dieses Proteins konnte gezeigt werden, dass GLEPP1 mit einer FSGS und einer MCG assoziiert ist, da sich bei beiden Erkrankungen ein Verlust von GLEPP1 zeigt <sup>84</sup>. In der Vergangenheit wurde bereits über die Bedeutung von GLEPP1 als Marker für Betroffene eines nephrotischen Syndroms diskutiert, da Veränderungen in GLEPP1 in Form eines Verlustes des Proteins oder einer Entdifferenzierung des Podozyten mit Entfernung von GLEPP1 aus dem Fußfortsatz des Podozyten, offensichtlich im Rahmen von proteinurischen Erkrankungen auftreten <sup>85,86</sup>. Im Jahre 2011 wurde dann erstmals eine klinisch relevante GLEPP1-Mutation bei Kindern gefunden <sup>24</sup>. Es handelte sich dabei um zwei türkische Familien mit insgesamt fünf betroffenen Kindern. Bei den beiden Geschwistern aus der ersten Familie kam es im

Alter von fünf und neun Jahren zum Ausbruch eines steroid-resistenten idiopathischen nephrotischen Syndroms, das dazu führte, dass das erste Kind im Alter von 18 Jahren nierentransplantiert werden musste. Danach kam es zu keinem Rückfall<sup>24</sup>. Histologisch zeigte sich eine FSGS und in der zweiten Familie eine MCG. Bei der weiteren Spezifizierung der Veränderungen zeigten sich in beiden Familien zwei unterschiedliche Mutationen. Zum Einen zeigte sich eine homozygote c.2627 +1G > T (p.Glu854\_Trp876del) Spleiß-Mutation, die zum Auslassen des Exons 16 führte und zum Anderen eine homozygote c.2745 +1G > A (p.Asn888Lysfs\*3) Spleiß-Mutation, die zum Überspringen des Exons 19 führte<sup>24</sup>. Die erste Mutation bewirkte ein verkürztes Protein, dem 23 Aminosäuren fehlten. Das Fehlen der Aminosäuren bewirkte keine offensichtlichen funktionellen Veränderungen von GLEPP1, allerdings spielt das Exon 6 wahrscheinlich evolutionär eine Rolle, da es sich in evolutionär weitentfernten Organismen wie *Danio rerio* (Zebraquappe/Karpfenfisch) und *Fugu rubripes* (japanischer Kugelfisch) finden lässt<sup>24</sup>. Vermutet wird eine Art konservierende Funktion für das Genom im Zuge der Evolution<sup>24</sup>. Die zweite Mutation führte zu einer *Nonsense*-Mutation mit einem vorzeitigen Stop-Codon im Exon 20 und einem Verlust des Proteins<sup>24</sup>. Da beide Mutationen nur homozygot auftraten und die Eltern jeweils heterozygot waren, lässt dies auf eine rezessive Vererbung schließen. Eine GLEPP1-Mutation führt also zu einem nephrotischen Syndrom, auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht verstanden ist.

Erste Untersuchungen einer GLEPP1 KO Maus wurden im Jahre 2000 von *Wharram et al.* durchgeführt<sup>87</sup>. Die zugrundeliegende Hypothese war damals die Annahme, dass wenn GLEPP1 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Filterapparates spielt, dann muss ein KO zu einem messbaren Filterschaden führen. Daraufhin wurde mithilfe von homologer Rekombination eine gezielte Deletion des GLEPP1-Genes in Mausembryostammzellen durchgeführt. Die betroffenen Mäuse zeigten eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate und die Tendenz zum Bluthochdruck<sup>87</sup>. Außerdem kam es zu Veränderungen der Architektur der podozytären Fußfortsätze. Physiologischerweise sind diese eher oktopoid, in den KO Mäusen waren sie jedoch mehr amöboid<sup>87</sup>. Die Fußfortsätze waren dabei verkürzt und verdickt. Zusätzlich wurden mögliche Marker für eine veränderte Architektur des Podozyten untersucht. Dabei gab es keine Veränderungen in:

- $\alpha 3\beta 1$ -Integrin (*intercellular junction*)
- $\alpha$ -Aktinin (Zytoskelett)
- Cytokeratin (Zytoskelett)
- Protein-Tyrosin-Kinase 2/ Fokale-Adhäsions-Kinase (zelluläre Adhäsion)
- Tubulin (Zytoskelett)
- ZO-1 (*tight junction* Protein)

Unterschiede ergaben sich im Bezug auf die Filtrationsoberfläche. Es zeigte sich, dass die KO Mäuse 25% weniger Nephrin (Schlitzmembran) und Podocalyxin (Glykokalix der Podozyten) als die Wildtyp (WT) Mäuse hatten <sup>87</sup>. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die KO Tiere weniger Fußfortsätze pro Flächeneinheiten der GBM haben. Insgesamt entsprach die Filtrationsoberfläche der KO Mäuse nur 75% der Fläche von gesunden Mäusen. Allerdings konnte dabei keine Proteinurie, selbst nach einer 70%-igen Nephrektomie der KO-Mäuse, nachgewiesen werden. Die Mäuse wurden dabei in einem Zeitraum von vier bis sechs Wochen beobachtet <sup>87</sup>.

In eigenen Vorarbeiten von *Christian Weigel* und *Laura Lennartz* wurden GLEPP1 KO Mäuse über einen Zeitraum bis zu zehn Monaten beobachtet. Dabei zeigte sich erstmals im Alter von sechs Monaten eine beginnende Proteinurie. Der Beobachtungszeitraum scheint also eine entscheidende Rolle zu spielen.

Um der physiologischen Funktion von GLEPP1 näher zu kommen, wurde in dieser Arbeit die Zusammensetzung der GBM bei einem GLEPP1-Knockout (KO) im Alter von vier und sechs Monaten bei Mäusen auf Protein- und RNA-Ebene untersucht. Zusätzlich wurde erforscht ob es einen Zusammenhang zu WT1 gibt, das wie bereits erwähnt ein essenzieller Regulator der embryonalen Nierenentwicklung ist und ebenfalls mit einer Proteinurie assoziiert wird <sup>88</sup>. In Modellen zur Untersuchung der Genexpression vor dem Eintritt einer Proteinurie konnte gezeigt werden, dass es zu einer kombinierten Herabregulation von WT1 und GLEPP1 kommt, im Falle einer Proteinurie <sup>88</sup>. Es scheint also einen möglichen Zusammenhang zwischen GLEPP1 und WT1 beim Eintritt der Proteinurie zu geben. Außerdem konnte im Hoden bereits ein Zusammenhang zwischen WT1 und den unreifen Kollagenketten, wie sie auch in der GBM vorkommen, hergestellt werden. Ein WT1-Defizit führt dabei zu einer

Herabregulation der unreifen Ketten<sup>89</sup>. Führt man einen gezielten WT1 KO durch kommt es zum frühzeitigen Versterben in der Embryonalphase durch ein multiples Organversagen<sup>90</sup>. Die Expression von WT1 könnte also weitere Informationen bei der Aufschlüsselung der zugrundeliegenden Mechanismen liefern.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Daraus ergeben sich für den Inhalt dieser Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Wie sieht die Zusammensetzung der GBM auf Proteinebene im Alter von vier und sechs Monaten bei einem GLEPP1 KO aus? Die Ergebnisse sollen damit die gewonnenen Erkenntnisse von *Wiggins et al.*<sup>87</sup> bei vier bis sechs Wochen alten Mäusen ergänzen und auf der anderen Seite die Lücke zu den Ergebnissen von *Christian Weigel* und *Laura Lennartz* schließen.
2. Wie verändert sich die Zusammensetzung der GBM auf Proteinebene zwischen vier und sechs Monaten, sodass es zu einer Proteinurie kommt? Gesucht werden vor allem Unterschiede zur Zusammensetzung vor und nach dem beobachteten Zeitraum. Über diese Unterschiede könnte auf essenzielle Schlüsselproteine geschlossen werden, deren Veränderung bei einem GLEPP1 KO zu einer Proteinurie führt.
3. Gibt es auf RNA-Ebene ein Pendant für die einsetzende Proteinurie? Im Fokus steht dabei die Suche nach konkreten Änderungen in der RNA vor dem Einsetzen der Proteinurie. Kann man einen direkten Zusammenhang zwischen Änderungen auf der RNA-Ebene und der Proteinurie herstellen, so kann man den genauen Zeitpunkt zu dem der GLEPP1 KO zu einer Proteinurie führt ermitteln. Außerdem lässt sich dadurch möglicherweise besser verstehen wieso es im Alter von vier bis sechs Wochen bei einem GLEPP1 KO nicht zu einer Proteinurie kommt.

4. Zeigen andere essenzielle Bestandteile des Filterapparates, vor allem auf Podozytenseiten (z.B. WT1), ebenfalls eine Reaktion auf einen GLEPP1 KO? Es sollen über die GBM hinaus, auch die anderen Komponenten des Filters bei einem GLEPP1 KO beobachtet werden. Dadurch könnten eventuelle Interaktionen auch im Hinblick auf den auslösenden Mechanismus der GBM-Veränderungen aufgedeckt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien/Reagenzien

Albumin bovine serum BSA	Serva, Heidelberg (D)
APS / Aluminiumperoxysulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> / Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Collagenase A	Roche, Basel (CHE)
Collagenase CLSPA	Worthington Biochemical, Lakewood (US)
complete™ Mini /Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel (CHE)
DNase I /grade II/ from bovine pancreas	Roche, Basel (CHE)
DTT / DL-Dithiothreitol-Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Dynabeads® Untouched™ Mouse T-Cells	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	AppliChem, Darmstadt (D)
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®/ 5ml	Ratiopharm, Ulm (D)
HiPerSolv Chromanorm	VWR, Darmstadt (D)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ketavet 100mg/ml	Pfizer, Berlin (D)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Potassium Dihydrogen Phosphate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
LiChrosolv® Ethanol	Merck-Millipore, Darmstadt (D)
Methanol CH <sub>3</sub> OH	AppliChem, Darmstadt (D)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / Dinatriumhydrogenphosphat	Merck-Millipore, Darmstadt (D)
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> / Natriumorthovanadat 99,98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
NaCl / Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt (D)
NaCl 0,9% / isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)
NH <sub>4</sub> Cl/ Ammonium Chloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)

NH <sub>4</sub> OH/ Ammonium hydroxide solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Orange G	Fluka, Buchs (CHE)
PMSF / Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
RNA-Later	Qiagen, Hilden (D)
RNase Away	VWR, Darmstadt (D)
RNase freies H <sub>2</sub> O	Qiagen, Hilden (D)
Rompun 2%/ 25ml	Bayer, Leverkusen (D)
Roti®garose/ NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
SDS / Natriumdodecylsulfat	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Temed 99%	Biostep, Burkhardtsdorf (D)
Tris Base 2M/ Tris Pufferan® >99,0%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Tris HCL 2M/ Trizma® hydrochloride >99,0%	Sigma, Taufkirchen (D)
Triton® X-100	Sigma, Taufkirchen (D)

Tabelle 1 Chemikalien/Reagenzien

### 2.1.2 Geräte

7300 Real Time PCR System	Life Technologies, Darmstadt (D)
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
DTX 880 – Multimode Detector	Beckman Coulter, Krefeld (D)
Electrophoresis Power Supply- EPS300	Pfizer, Berlin (D)
Heraeus Multifuge 4KR Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Imager Fluorchem® FC2	Alpha Innotech, Santa Clara (US)
KL 1500 LCD	Zeiss, Oberkochen (D)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen (D)
Mikroskop SMZ-168	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar (D)
Mikrowelle NN-E202-CB	Panasonic, Kadoma (J)
Minisee-Sawrocker SSM4	Bibby Scientific Limited, Stone (UK)
Multimage™Light Cabinet	Alpha Innotech, Kasendorf (D)
NanoDrop 2000C Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Power Pac Universal 500V/2,5A/500W	Bio Rad, München (D)

PowerPac™ HC 250V/3,0A/300W	Bio Rad, München (D)
Shaker IKA® HS 260 control	IKA®, Staufen (D)
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen (D)
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg (D)

Tabelle 2 Geräte

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

96-well PCR Plate, semi-skirted	Starlab, Hamburg (D)
Biosphere-Filter-Tips 0,5-20µl, 2-100µl, 2-200µl und 100-1000µl	Sarstedt, Nümbrecht (D)
CellStar® Tubes 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Combitips advanced® 0,5ml, 10ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Dualfilter T.I.P.S.® SealMax, PCR clean, steril, 0,1-10µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Fine Bore Polythene Tubing: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,58mm ID / 0,96mm OD</li> <li>• 0,28mm ID / 0,61mm OD</li> </ul>	Smiths medical, Grasbrunn (D)
Gel Blot Paper 9x6cm	VWR, Darmstadt (D)
Injekt®/5ml+ 10ml	B.Braun, Melsungen (D)
Microtest Plate 96-well	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Multiply® Pro Gefäße 0,5ml (PCR)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Nitrocellulose 8,5x 5,5cm/ Amersham™Protran™Supported 0.45 NC	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Omnifix®-F/ 1ml	B.Braun, Melsungen (D)
Pasteurpipetten/Glas/ca.230mm	Brand, Wertheim (D)
Pipettenspitzen 20, 200 und 1000	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Safe Lock Tubes 0,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Safe Seal Tubes 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, (D)

Sterican Kanülen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ø0,30x12mm</li> <li>• Ø0,40x12mm</li> <li>• Ø0,45x12mm</li> <li>• Ø0,60x25mm</li> <li>• Ø0,70x30mm</li> </ul>	B.Braun, Melsungen (D)
--	------------------------

Tabelle 3 Verbrauchsmaterial

#### 2.1.4 Fertigsysteme (Kits)

HotStarTaq® DNA Polymerase	Qiagen, Hilden (D)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Quantitect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden (D)
SuperSignal® ELISA Fento Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)

Tabelle 4 Fertigsysteme (Kits)

#### 2.1.5 Gebrauchs- und Hilfsgegenstände

Art® 20P	Molecular BioProducts ?
Chirurgische Pinzette klein/12-368-12	Carl Martin GmbH/Deutschland
COMB, Spineless, 10well, 0,75mm	GE Healthcare Bio-Sciences Corp./ USA
DynaMag™/ Magnetic Particle Concentrator	Life Technologies, Darmstadt (D)
Feine Pinzette/spitz	Allgaier Instrumente/Deutschland
Feine Scheren / St. BC106R/ 115 mm/ gerade	Aesculap by B.Braun Melsunger AG/Deutschland
Flügelschere/klein/gebogen	Allgaier Instrumente/ Deutschland
Glasplatten mit 0,75mm Spacer 8,3x10,1cm	Biostep, Burkhardtsdorf (D)
Klemme XC gebogen	KLS Martin, Tuttlingen (D)
Mini Proteam® Gel releaser	Bio-Rad, München (D)
Mini Proteam® Tetra Cell	Bio Rad, München (D)

Mini SubCell GT	Bio Rad, München (D)
Mini Trans Blot® Cell	Bio Rad, München (D)
Mini Trans Blot® Gel holder cassette	Bio Rad, München (D)

Tabelle 5 Gebrauchs- und Hilfsgegenstände

### 2.1.6 Primer, Marker und Antikörper

Name	Beschreibung	Konzentration	Bezogen über
Alpha 1 (IV) NC1 Rat / IgG2a H11	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 1 chain of type IV collagen	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)
Alpha 2 (IV) NC1 Rat / IgG2a H22	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 2 chain of type IV collagen	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)
Alpha 3 (IV) NC1 Rat / IgG2a H31	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 3 chain of type IV collagen	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)
Alpha 5 (IV) NC1 / IgG2a H54	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 5 chain of type IV collagen	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)
Agrin D-2 / sc-374117	Mouse monoclonal IgM specific for Agrin of rat	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)

Nidogen C-7 / sc-133175	Mouse monoclonal antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Anti-laminin alpha 1	Antibody from rabbit	1:500	Takako Sasaki  (Oita University, JPN)
ECL™ Anti-rat IgG	Linked with HRP from goat	1:7500	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Anti-rabbit IgG sc-2004	Linked with HRP from goat	1:20000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Anti-mouse IgG	Polyclonal antibody linked with HRP from goat	1:10000	Dako, Hamburg (D)

Name	Beschreibung	Konzentration	Bezogen über
ECL™ Anti-rat IgG	Linked with HRP from goat	1:7500	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Anti-rabbit IgG sc-2004	Linked with HRP from goat	1:20000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Anti-mouse IgG	Polyclonal antibody linked with HRP from goat	1:10000	Dako, Hamburg (D)

Spezi- fität	Gen	Produkt	Rich- tung	Annealing	Sequenz	Best -ellt über
Human, mouse	GAPDH	cDNA 384bp	sense	58°C	5'-GGT-CAT-CCA- TGA-CAA-CTT- TGG-TAT-CG-3'	MW G
Human, mouse	GAPDH		anti- sense	58°C	5'-GTC-GCT-GTT- GAA-GTC-AGA- GGA-GAC-3'	MW G

Spezi- fität	Gen	Rich- tung	Prod.	Annealing	Foto	Sequenz	Best ellt über
Mouse	Nid1	For	126bp	58°C	78°C	5'- GAGAGGTTCCCTCAG CATCAC-3'	MW G
Mouse	Nid1	Rev	126bp	58°C	78°C	5'- CACGGAGCACTGGT GTCTATT -3'	MW G
Mouse	Nid2	For	138bp	58°C	78°C	5'- CTCGATGGCAGTCAC ACCT -3'	MW G
Mouse	Nid2	Rev	138bp	58°C	78°C	5'- TTCCGCACATTCATC AACATC -3'	MW G
Mouse	Agrin	137bp	137bp	58°C	78°C	5'- AGCCCACAAGAATG AGTTGATG -3'	MW G

Mouse	Agrin	137bp	137bp	58°C	78°C	5'- ACACATCAGGAGGC ATAGAAGG -3'	MW G
Mouse	WT1	For	128bp	58°C	78°C	5'- GAGAGCCAGCCT ACCATCC -3'	MW G
Mouse	WT1	Rev	128bp	58°C	78°C	5'- GGGTCCTCGTGT TTGAAGGAA -3'	MW G
Mouse	18S	-	129 bp	55°C	72°C	Hersteller-spezifisch	quan ti- TEC

Tabelle 6 Primer, Marker und Antikörper

### 2.1.7 Puffer

Sammelgel (pH 6,9) 8% und 10%:

- 763mM Acrylamid
- 290mM Tris HCl
- 8mM Tris Base
- 7mM SDS
- 10mM APS
- 1,5 mM TEMED

Trenngel (pH 8,8) 8% SDS:

- 1256mM Acrylamid
- 180mM Tris HCl
- 570mM Tris Base
- 7mM SDS
- 8,6mM APS
- 2mM TEMED

Trenngel (pH 8,8) 10% SDS:

- 1570mM Acrylamid

- 180mM Tris HCl
- 570mM Tris Base
- 7mM SDS
- 8,6mM APS
- 2mM TEMED

Transferpuffer für Westernblot:

- 61,9 mM Tris Base pH 8,5
- 480 mM Glycin
- 4938 mM Methanol

Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese:

- 23,1 mM Tris Base pH 8,5
- 3,5 mM SDS
- 191,8 mM Glycin

Proteinwaschpuffer für Western Blot:

- 12,9mM Tris HCl pH 7,5
- 129mM NaCl
- 1,1mM Polysorbat 20

Extraktions- oder auch Lysispuffer für Glomeruli-Isolation:

- 17mM Triton
- 20mM Tris pH 7,5
- 50mM NaCl
- 50mM NaF
- 15mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>
- 0,1mM EDTA
- 2mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>
- 0,25mM PMSF
- 1 Tabl. Complete Mini/10ml

Alkaline Detergent Puffer für Laminin-Extraktion:

- 0,0424mM 10% Triton X-100
- 20mM NH<sub>4</sub>OH-Lsg.
- mit PBS auf 50 ml auffüllen

Desoxyribonuklease Puffer für Laminin-Extraktion:

- 10µg/ml Dnase I in PBS

2x Laemmli + DTT für Laminin-Extraktion:

- 90mM Tris HCl pH 6,8
- 126mM SDS
- 2463mM Glycerin
- 5,2mM Bromphenolblau
- 100mM DTT

4x Laemmli + DTT für Kollagen-Verdau:

- 160mM Tris HCl pH 6,8
- 224mM SDS
- 4378mM Glycerin
- 4,6mM Bromphenolblau
- 200mM DTT

### 2.1.8 Software

Alphaview	Alpha Innotech, Santa Clara (US)
Excel 2007	Microsoft, Redmont (US)
FluorChem FC2	Alpha Innotech, Santa Clara (US)
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego (US)
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific,

	Waltham (US)
Paint	Microsoft, Redmont (US)
REST08 (Relative Expression Software Tool)	TU München, München (D) und Qiagen, Hilden (D)
Word 2007	Microsoft, Redmont (US)

Tabelle 7 Software

Sofern nicht anders deklariert wurde die vom Hersteller mitgelieferte Software bei allen betroffenen Geräten verwendet.

Zur Durchführung des tierexperimentiellen Teils dieser Arbeit wurde eine Tierversuchsanzeige (Projektnummer O68/08) gestellt. Außerdem wurde ein Tierversuchskurs nach FELASA B-Richtlinien besucht und es wurde stets unter Einhaltung des § 7 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) gearbeitet. Beaufsichtigt wurden die Tierversuche von Frau Dr. Eva Königshausen.

## 2.2 Methoden

Bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Sellin wurde RNA aus Gewebeproben mit Hilfe des RNeasy-Mini Kits von Qiagen isoliert. Diese Proben wurden dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert. Die gewonnene RNA ist sehr instabil und kann leicht durch omniprésente RNAsen gespalten werden. Diese können sich an den Händen des Laboranten oder auch an Staubpartikel befinden. Deshalb ist bei allen Arbeitsschritten ein besonderes Augenmerk auf RNase freies Arbeiten gelegt worden. Zur Säuberung des Arbeitsplatzes und des Materials diente *RNase Away*. Bei allen anderen verwendeten Materialien handelte es sich um sterile Einmalprodukte.

Die instabile RNA wurde in stabile cDNA umgeschrieben, um eine Real-Time-PCR durchzuführen. Am Ende erfolgte eine statistische Auswertung anhand der Schmelzkurvenanalyse der verschiedenen Primer im Vergleich zwischen WT und KO Tieren.

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Vorarbeiten von *Christian Weigel* und *Laura Lennartz*. Sie wurden mit Hilfe des Mausprotokolls von *Potthoff et al.* gewonnen (siehe 2.2.5). Insgesamt wurden jeweils neun Proben von WT-Tieren mit neun Proben von KO-Tieren im Alter von vier, sechs und zehn Monaten miteinander verglichen. Nun folgt der konkrete Versuchsablauf.

### 2.2.1 Reverse Transkription

Zuerst wurde die RNA-Konzentration der Proben bestimmt. Dies geschah mit Hilfe eines *Nano Drop Spectrophotometers*. Die gewünschten Konzentrationen sollten zwischen 700-750ng liegen. Falls die Konzentration niedriger war und sie auch durch erneutes Isolieren der RNA nicht verbessert werden konnte, wurden alle Proben der Versuchsreihe an die Probe mit der niedrigsten Konzentration angepasst. Anschließend begann die Reverse Transkription mit dem *Quanti Tect Kit Qiagen*. Der Ansatz ergab sich wie folgt:

- x  $\mu$ l H<sub>2</sub>O RNase frei
- x  $\mu$ l RNA
- 2 $\mu$ l gDNA Wipeout Puffer
- 14 $\mu$ l Gesamtvolumen

Die gewünschte RNA-Menge wurde hierbei auf 750ng festgelegt. Bei zu niedrigen Konzentrationen wurde das Maximalvolumen von 12 $\mu$ l verwendet. Wurde nicht das Maximalvolumen an RNA-Probe verwendet, wurde der Rest mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Der beigefügte *gDNA Wipeout* Puffer diente der Auslöschung von genomischen DNA-Resten, die das Endergebnis verfälscht hätten. Der Ausschluss von gDNA wurde anschließend in einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-PCR (GAPDH) kontrolliert.

Der gesamte Ansatz kam in ein 0,5ml Eppendorf - Tube und wurde kurz anzentrifugiert (5 Sekunden bis 3000 rpm). Danach kam der Ansatz für 3 ½ Minuten bei 42°C in einen Thermocycler, sodass der *gDNA Wipeout* stattfinden konnte. Im Anschluss wurde der Ansatz sofort auf Eis in einen Kühlakku gestellt. Für die spätere Kontroll-GAPDH-PCR wurden dann 0,5 $\mu$ l aus dem Ansatz entnommen und in ein neues Tube überführt. Bis zu seiner späteren Verwendung wurde dieses auf Eis gekühlt. Später diente es dem

Ausschluss der Kontamination von genomischer DNA in den Proben. Im Folgenden wird die Umschreibung von RNA in cDNA beschrieben:

- 0,5µl H<sub>2</sub>O RNase frei
- 4µl Quantiscript RT-Puffer 5x
- 1µl RT-Primer Mix
- 1µl Quantiscript Reverse Transkriptase

Die beiden Ansätze wurden für jede Probe zusammenpipettiert. Es wurden die übrig gebliebenen 13,5µl des RNA-Ansatzes mit jeweils 6,5µl des Reverse-Transkriptase-Ansatzes vermischt und erneut kurz an zentrifugiert. Dann wurden sie in den Thermocycler gestellt. Für die Reverse Transkription wurde folgendes Programm gewählt:

- Heizdeckel-Vorlauf auf 95°C
- Vorheizen auf 42°C
- 25 Minuten. bei 42°C
- 3 ½ Minuten bei 95°C
- Runterkühlen auf 4°C

Darauf folgend wurden die Proben erneut kurz an zentrifugiert. Anschließend wurden wieder 0,5µl aus jeder Probe entnommen und jeweils in ein neues cDNA-Kontroll-PCR-Tube überführt. Hierbei handelte es sich um die „Positivkontrolle“ ob die Umschreibung der RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA auch funktioniert hatte. Als nächster Schritt erfolgte abschließend die GAPDH-Kontroll-PCR.

### **2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation der DNA *in vitro*. Ein Zyklus bestand immer aus denselben Schritten. Verwendet wurde dabei das HotStarTaq® DNA Polymerase-Kit von Qiagen mit GAPDH-Primern. Im ersten Schritt fand durch Erhitzen der DNA auf 95°C eine Denaturierung statt. Dabei spalteten sich

die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen des DNA-Doppelstranges. Außerdem wurde in dieser 15-minütigen Initialphase die HotStarTaq® DNA Polymerase aktiviert. Im zweiten Schritt fand die Anlagerung („*primer annealing*“) der gewählten Primer an die nun vorliegenden DNA-Einzelstränge statt. Die Temperatur ist Primer-abhängig und lag für die GAPDH-Primer bei 58°C. Diese Temperatur wurde für 30 Sekunden gehalten und ermöglichte es den Primern sich optimal an ihre spezifischen Basensequenzen zu binden. Im Bereich der Primer entstand dadurch lokal wieder ein Doppelstrang mit einem 3'-Ende. Im dritten Schritt, der Elongation, lagerte sich nun die gewählte Polymerase an das 3'-Ende des Primers an und komplementierte den fehlenden DNA-Strang mit freien Nukleotiden. Das Temperaturoptimum der HotStarTaq® lag dabei bei 72°C. Dieser Schritt dauerte ebenfalls 30 Sekunden. Ein Zyklus war damit abgeschlossen. Insgesamt wurde der gesamte Zyklus 40 Mal wiederholt, sodass die gewünschte Gensequenz optimal und in ausreichender Menge amplifiziert werden konnte. Die Reaktion lief vollständig automatisiert in einem Thermocycler ab.

Bei den gewählten Primern handelte es sich um Primer für das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), einem elementaren Enzym der Glykolyse. Das Gen der GAPDH bot sich besonders an, da es ubiquitär vorkommt, also auch in den Zellen der Niere. Wichtig bei der Wahl der Primer war, dass sie so gewählt wurden, dass sie die gewünschte Gensequenz für die Proteinsynthese der GBM in der anschließenden Elongation miteinschloßen. Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen:

Spezi- fität	Gen	Produkt	Rich- tung	Sequenz
Human, mouse	GAPDH	cDNA 384bp	sense	5'-GGT-CAT-CCA-TGA-CAA-CTT- TGG-TAT-CG-3'
Human, mouse	GAPDH		anti- sense	5'-GTC-GCT-GTT-GAA-GTC-AGA- GGA-GAC-3'

Tabelle 8 GAPDH Primer

### 2.2.3 GAPDH-Kontroll-PCR

Um den Erfolg der Umschreibung von RNA in cDNA zu kontrollieren, bevor die abschließende Realtime-PCR erfolgte, wurde eine Kontroll-PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt. Zuerst erfolgte eine PCR zur Vervielfältigung der erzeugten cDNA, die anschließend mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert wurde. Die verwendeten Proben wurden vorher jeweils nach dem Reinigen von gDNA (Negativkontrolle) und nach der eigentlichen Reversen Transkription (Positivkontrolle) gewonnen. So konnte gewährleistet werden, dass DNA, die amplifiziert wurde, von der umgeschriebenen RNA stammte und nicht etwa von Verunreinigungen durch gDNA herrührte. Die PCR erfolgte nach oben beschriebenem Schema.

Der konkrete Versuchsansatz der PCR ergab sich je Probe (n) wie folgt:

- 16,78µl H<sub>2</sub>O HPLC
- 2µl 10 x Puffer
- 0,4µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)
- 0,1µl Primer sense GAPDH h+m
- 0,1µl Primer antisense GAPDH h+m
- 0,12µl Hot Star Taq® Qiagen

Die Anzahl der Proben (n) ergab sich aus der Menge an während der Reversen Transkription gewonnenen Positiv- und Negativkontrollen und zusätzlich einer Wasserkontrolle sowie einer kleinen Reserve zum pipettieren von etwa 10% des Gesamtvolumens. Zu jeder Probe von 0,5µl wurde dann 19,5µl des PCR-Mixes hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben fest verschlossen, kurz anzentrifugiert und anschließend in den Thermocycler gestellt. Die Programmierung des Thermocyclers sah wie folgt aus:

- Heizdeckel Vorlauf auf 105°C
- Pause bei 95°C
- Start bei 95°C für 15 Minuten

- 95°C für 30 Sekunden
  - 58°C für 30 Sekunden
  - 72°C für 30 Sekunden
- } 40x Zyklen
- 72°C für 5 Minuten
  - Pause bei 4°C

Die Proben konnten danach bei 4°C gelagert werden oder direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden.

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurden sie in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden der gDNA lagen typischerweise bei 576bp und die gewünschten Banden der cDNA bei 382bp.

Bei dem verwendeten Gel wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid gegossen. Als Ladepuffer diente *Orange G*, wovon jeweils 2µl zu jeder Probe hinzugefügt wurden. Mit Hilfe eines 100-Basenpaar Markers konnten dann die vorliegenden PCR-Produkte sowie der Erfolg der Reversen Transkription interpretiert werden. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz unten UV-Licht mit einer Kamera aufgenommen.

Bei erfolgreichem Nachweis von cDNA ohne Verunreinigung durch RNA-Reste oder gDNA konnte mit der Real-Time-PCR begonnen werden.

#### 2.2.4 Real Time PCR (qPCR)

Die Real-Time oder auch quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) ist eine Weiterentwicklung der normalen PCR. Neben der Amplifikation der DNA, steht dabei die Messung der Expressionsstärke bestimmter DNA-Fragmente im Vordergrund.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Power Sybr. Green PCR Master Mix gearbeitet. Sybr. Green ist ähnlich wie Ethidiumbromid ein Farbstoff der Molekularbiologie um doppelsträngige DNA zu markieren. Zwischen die Basenpaare eingelagert, emittiert es grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521nm.

Zu Beginn des Versuches wurde der Computer programmiert. Die Schritte folgten dem Schema der PCR. Im Unterschied zur PCR gab es einen zusätzlichen Schritt, in dem die Fluoreszenz gemessen wurde. Die genaue Konfiguration dieses Foto-Schrittes erfolgte anhand vorangegangener Schmelzkurvenanalyse und unterschied sich zwischen den Primern, da der Denaturierungspunkt der doppelsträngigen DNA durch die Anzahl an Guanin- und Cytosin-Basenpaarbindungen definiert wurde.

Für die Programmierung ergab sich daher:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	95°C Denaturierung	15.00 Minuten
40 x PCR	95°C Denaturierung 58°C Annealing 72°C Elongation 77°C Foto	0:15 Minuten 0:30 Minuten 0:30 Minuten 0:34 Minuten
1 x Schmelzkurvenanalyse	95°C 60°C 95°C	0:15 Minuten 1:00 Minuten 0:15 Minuten

Tabelle 9 Programmierung qPCR

Zuerst wurde die Anzahl der Proben (n) berechnet. Pipettiert wurden Doppelwerte aller Proben inklusive einer Wasserkontrolle und einer 10%igen Reserve. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:2 mit RNase freiem H<sub>2</sub>O verdünnt.

Quanti Tect Primer		Eigene Primer
7µl	H <sub>2</sub> O-RNase frei	8,5µl
10µl	Sybr. Green	10µl
2µl	Primer	0,15 µl forward Primer 0,15 µl reverse Primer

Tabelle 10 qPCR Ansatz

Zum Versuchsaufbau wurde außerdem eine 96-well PCR-Platte inklusive passendem Ständer und unterliegendem Kühlblock benötigt. Der *Mastermix* wurde dann mit jeweils 19µl vorgelegt. Anschließend wurde 1µl der verdünnten Probe eingespült.

Jede Probe wurde mit fünf verschiedenen Primern getestet:

Spezi- fität	Gen	Rich- tung	Prod.	Annealing	Foto	Sequenz
Mouse	Nid1	For	126bp	58°C	77°C	5'- GAGAGGTTCCCTCAGCATC AC-3'
Mouse	Nid1	Rev	126bp	58°C	77°C	5'- CACGGAGCACTGGTGTCTA TT -3'
Mouse	Nid2	For	138bp	58°C	77°C	5'- CTCGATGGCAGTCACACCT -3'
Mouse	Nid2	Rev	138bp	58°C	77°C	5'- TTCCGCACATTCATCAACA TC -3'
Mouse	Agrin	137bp	137bp	58°C	77°C	5'- AGCCCACAAGAATGAGTTG ATG -3'
Mouse	Agrin	137bp	137bp	58°C	77°C	5'- ACACATCAGGAGGCATAG AAGG -3'
Mouse	WT1	For	128bp	58°C	77°C	5'- GAGAGCCAGCCT ACCATCC -3'
Mouse	WT1	Rev	128bp	58°C	77°C	5'- GGGTCCTCGTGT TTGAAGGAA -3'
Mouse	18S	-	129 bp	55°C	77°C	Hersteller-spezifisch

Tabelle 11 qPCR Primer

Zur Auswertung der Daten aus der qPCR wurde zuerst der Amplifikationsplot vom Computer ausgegeben. Danach wurde der CT-Wert berechnet und die einzelnen Schmelzkurven gesichtet. Um die Daten zu Quantifizieren wurde 18S als Haushaltsgen (engl.: *housekeeping gene*) verwendet. Das *Housekeeping gene* diente dabei als Referenzwert und Bezugsgröße für die zu erwartende Stärke der ausgesendeten Signale. Die gesammelten Daten wurden dann in Excel ausgewertet. Die  $\Delta\Delta C_t$ -Werte bezogen auf 18S wurde jeweils auf die Kontrolle normiert.

### **2.2.5 Mausmodell**

Zur genaueren Untersuchung der GLEPP1-spezifischen Veränderungen in der glomerulären Basalmembran war das Mausmodell unumgänglich, da zur genaueren Untersuchung der Basalmembran die Niere entnommen werden musste. Darüber hinaus stand zum Zeitpunkt der Arbeiten kein Alternativmodell zur Verfügung.

Um die altersspezifischen Veränderungen in der glomerulären Basalmembran genauer zu untersuchen, wurde auf das ubiquitäre GLEPP1-Knockout-Mausmodell nach *Bryan Wharram et al.*<sup>87</sup> zurückgegriffen. Diese Mäuse wurden zusätzlich auf eine 129P3/J Hintergrund gekreuzt. Bei dem verwendeten Protokoll handelte es sich um eine Modifikation des Protokolls wie es von *Potthoff et al.* verwendet wurde. Es wurde bereits in Vorarbeiten von *Christian Weigel* und *Laura Lennartz* etabliert.

#### **2.2.5.1 Organentnahme**

Die Mäuse wurden vor Versuchsbeginn durch zervikale Dislokation mit Durchtrennung des Rückenmarks getötet. Kam es währenddessen zum Abgang von Spontanurin wurde dieser gewonnen und zur späteren Analyse aufbewahrt. Kam es zu keinem Spontanurin wurde während der Operation eine Blasenpunktion durchgeführt. Die Blutabnahme erfolgte mit einer Pasteurpipette mit Heparin aus dem retrobulbären Venenplexus. Der Hautschnitt erfolgte 0,5cm oberhalb des Genitals direkt auf der Linea alba mit einer spitzen Schere. Mit der Schere erfolgte dann eine stumpfe Präparation bis auf Höhe des Sternums. Der Hautschnitt wurde daraufhin bis auf Sternumhöhe erweitert. Mit zwei kleinen chirurgischen Pinzetten wurden Bauchfell und Muskeln voneinander getrennt. Dazu wurden beide Anteile fest umschlossen und in einer kontrollierten Scherbewegung voneinander getrennt. Anschließend wurde der Hautschnitt zu einem Vier-Felder-

Schnitt bis nach fast paravertebral erweitert. War die oberflächliche Präparation erfolgt, begann die Eröffnung des Peritoneums. Ähnlich wie beim Hautschnitt erfolgte die Eröffnung 0,5cm kranial des Genitals durch die Linea alba, von wo aus ein Vier-Felder-Schnitt bis zum Sternum und horizontal bis fast paravertebral erfolgte. Die beiden kranialen Anteile des Bauchmuskels wurden über dem Rippenkorb mit zwei gebogenen Klemmen gegriffen und in kranio-lateraler Richtung aufgespannt, sodass der Blick unter den Rippenkorb frei wurde. Die Klemmen werden mit einem Tupfer stabilisiert. Mit Hilfe eines Tupfers wurden die Organe beiseite gewischt, sodass der Blick auf Niere, Mesenterialgefäße und nach kranial aufs Diaphragma möglich wurden. Zu diesem Zeitpunkt bot sich ebenfalls die Möglichkeit einer Blasenpunktion, falls im Vorfeld noch kein Urin gewonnen werden konnte.

Die erste Ligatur umschlang die Mesenterial-Gefäße. Dazu wurden die Mesenterial-Gefäße mit einer kleinen spitzen Pinzette von kaudal nach kranio-lateral unterfahren. Mit einer zweiten Pinzette wurde die Ligatur angereicht und in die erste Pinzette übergeben. Durch Zurückziehen der Pinzette und verknoten wurde die Ligatur geschlossen. Danach wurde das Retroperitoneum präpariert bis der Blick auf Vena Cava und Aorta-Bifurkation frei waren. Eine detaillierte saubere Präparation der Gefäßsituation war für den weiteren Verlauf der Operation maßgebend. Die zweite Ligatur unterband die kaudalen Abschnitte der Vena Cava und der Aorta. Dabei wurde der Musculus iliopsoas mit einer spitzen Pinzette möglichst tief durchstoßen, um das Gefäßkonvolut zu unterfahren. Diese Ligatur wurde nicht sofort zugezogen. Auf dem Weg zur dritten und letzten Ligatur diente das Fettpolster kranial der linken Niere, welches die Nebenniere enthält, als wichtige Landmarke. Mit der Pinzette wurde auf Höhe der Nebenniere die Aorta blind unterfahren und medial durch den Muskel ausgestochen. Die letzte Ligatur wurde direkt zugezogen.

Der Gefäßstrang aus Vena Cava und Aorta wurde kaudal der Ligatur mit einer Klemme umschlossen und dadurch betont. Der Perfusor-Katheter wurde unter der kaudalen Ligatur durchgeführt. Das Peritoneum wurde kurz angeflutet bevor die Aorta oberhalb der Ligatur mit einer Flügelschere angeschnitten wurde. Daraufhin wurde das Peritoneum vollständig geflutet bis die Sicht auf die Aorta wieder frei wurde. Der Katheter wurde in die Aorta unter Sichtkontrolle vorgeschoben bis er dicht abschloss. Nach Perfusionskontrolle wurde die Ligatur geschlossen und die Perfusion gestartet. Unmittelbar mit dem Beginn der Perfusion wurde die Nierenvene möglichst hilusnah

angeschnitten, um die Niere optimal zu spülen und eine Abflussmöglichkeit zu gewährleisten. Gespült wurde mit 10ml PBS und einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,8ml pro Minute. Nach Abschluss der PBS-Perfusion wurde die Perfusion auf 6ml *Dynabeads*®-Lösung umgestellt. Die Lösung wurde im Verhältnis (34,29µl PBS: 1µl *Dynabeads*) mit 1 ml PBS auf 408µl *Dynabeads*® *Untouched*<sup>TM</sup> (Invitrogen) angesetzt. Nach Abschluss der Perfusion wurden die beiden Nieren entnommen. Zuerst wurde die dünne Kapsel entfernt. Anschließend wurde die Niere am Hilus gegriffen und abgeschnitten, sodass zuletzt die Urethra abgeschnitten werden konnte. Die Nieren wurden gewogen und kamen in einer Petrischale mit ausreichend PBS, um sie feucht zu halten, auf Eis. Der Katheter wurde entfernt und der Leichnam so wie alle kontaminierten Materialien gemäß der Entsorgungsordnung für genetisch veränderte Organismen sachgerecht entsorgt.

#### **2.2.5.2 Isolation und Aufreinigung der Dynabeads®**

Zur Isolation der Glomeruli wurden die Nieren zerkleinert, püriert und in Lösung gebracht. Der gesamte Prozess fand auf Eis bei 4°C statt. Mit einer sauberen Rasierklinge wurden beide Nieren eines Tieres püriert bis keine Zerkleinerung mehr möglich war. Der entstandene Gewebstrebrei wurde in 1ml PBS gelöst. Zur weiteren mechanischen Zerkleinerung wurden 1000µl Pipettenspitzen auf drei unterschiedliche Größen zugeschnitten, sodass die Öffnung der Spitze immer kleiner wurde. Der Gewebstrebrei wurde mit jeder der drei Größen auf und ab pipettiert bis ein sauberes Aufziehen und Entleeren der Pipette möglich war. War dies der Fall wurde die Pipette auf ein 100µm Zellsieb in ein 50ml Falcon entleert. Auf dem Zellsieb wurde die Probe mit Hilfe einer umgedrehten Pipettenspitze weiter zerkleinert. Im Verlauf der Zerkleinerung wurde das Zellsieb insgesamt drei Mal mit jeweils 10ml PBS gespült. Waren im Zellsieb nur noch farblose kleine Gewebstrebrei enthalten, wurde es entsorgt und das Falcon auf 50ml mit PBS aufgefüllt. Die Falcons wurden bei 1100 rpm auf 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. So bildete sich am Boden der Falcons ein festes Pellet. Der Überstand wurde abgesaugt ohne das Pellet zu beschädigen. Anschließend wurde das Pellet in 1,5ml PBS resuspendiert und in ein neues 2 ml Eppendorf-Tube überführt. Das Tube wurde dann in den *Magnetcatcher*, der sich während des gesamten Versuches in Eis befand, gestellt. Durch den Magneten wurden die *Dynabeads*® in den Glomeruli an die Gefäßwand gezogen und konnten so isoliert werden.

Die Proben enthielten allerdings noch viele Verunreinigungen durch Reste anderer Zellen, die durch die Zerkleinerung entstanden waren. Um den Reinheitsgrad der Proben zu erhöhen wurden die Proben bis zu einer Reinheit der Glomeruli von 95% gewaschen. Der Waschvorgang bestand aus mehreren Schritten. In aufsteigender Menge wurden aus dem *Magnetcatcher* am äußeren Gefäßrand 1-1,5ml PBS entnommen. Begonnen wurde mit 1ml im ersten Waschschrift bis schließlich im letzten Waschschrift der gesamte Überstand entnommen wurde. Danach wurde wieder 1ml PBS hinzugefügt und das Tube aus dem *Magnetcatcher* entnommen, um das Pellet zu lösen. Zum Lösen des Pellets wurde die gesamte Lösung auf und ab pipettiert, sowie auf einen Vortexer gestellt bis keine Partikel mehr zu sehen waren. Nach den ersten drei Waschschriften erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Reinheit. Dazu wurde jeweils ein 2µl Tropfen jeder Probe auf eine Petrischale aufgetragen und dann unter dem Mikroskop das Verhältnis von Glomeruli zu sonstigen Zellbestandteilen beurteilt. Ziel war es zu 95% nur noch Glomeruli vorliegen zu haben. War die Verunreinigung noch zu groß wurde das Waschen wiederholt. Von 1ml pro Probe wurden je 100µl zur Proteinbestimmung verwendet und die restlichen 900µl zu gleichen Teilen auf den Kollagenverdau und die Lamininextraktion verteilt.

### **2.2.5.3 Proteinbestimmung mit Pierce BCA Protein Assay Kit**

Um eine Aussage über die Proteinkonzentration der Proben machen zu können und sie später äquivalent im Western-Blot laden zu können, wurde eine Proteinbestimmung mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits erstellt. Die abgenommenen 100µl der Probe wurden wieder in den *Magnetcatcher* gestellt und der Überstand wurde ohne Pellet abgenommen. Der vorbereitete Lysis-Puffer wurde in ein 10ml Falcon gefüllt und mit 0,25mM PMSF versetzt. Das Pellet wurde anschließend in 100µl Triton1% Lysispuffer gelöst und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand erneut aus dem *Magnetcatcher* abgenommen, dieses Mal diente er jedoch zur Proteinbestimmung und dürfte nicht verworfen werden. Je nach Reinheitsgrad und daraus resultierender Glomerulikonkonzentration wurde die Probe unterschiedlich stark mit H<sub>2</sub>O double dest. verdünnt.

Im Kit enthalten waren bereits 2mg/ml BSA-Stocklösung sowie BCA-Reagenz A und B. Zum Pipettieren wurde eine Microtest Plate 96-well von Sarstedt verwendet. Vorgelegt wurde ein Verdünnungsstandard der BSA-Lösung nach folgendem Schema:

STD's	Aqua dest. [µl]	BSA-Stocklösung [µl]	Konzentration [µg/ml]
STD 8	62,5	187,5	1500
STD 7	162,5	162,5	1000
STD 6	87,5	87,5 ( von STD 8)	750
STD 5	162,5	162,5 (von STD 7)	500
STD 4	162,5	162,5 (von STD 5)	250
STD 3	162,5	162,5 (von STD 4)	125
STD 2	200	50 (von STD 3)	25
STD 1	10	0	0

Tabelle 12 Verdünnungsstandard für Proteinbestimmung

Die beiden BCA-Reagenzien wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Für eine vollständige 96-well Platte wurde daher 20ml Reagenz A mit 0,4ml Reagenz B angesetzt und bis zu seiner Verwendung dunkel gelagert. Der Standard wurde mit Doppelwerten zu jeweils 10µl pro Well vorgelegt, beginnend mit Standard 1. Dieser entsprach dabei einer Wasserkontrolle. Alle unbekanntes Proben und ihre Verdünnungen wurden ebenfalls mit 10µl als Doppelwerte aufgetragen. Waren alle Proben pipettiert wurde das fertige Arbeitsreagenz mit jeweils 200µl in jedes *Well* dazugegeben. Die Platte wurde mit einem Deckel versehen und für 30 Sekunden auf dem Tisch gerüttelt. Danach wurde die Platte für 30 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte anschließend mit dem Plattenreader DTX880.

#### 2.2.5.4 Laminin-Extraktion

Aus der Isolation und Aufreinigung der *Dynabeads*® wurden 450µl für die Extraktion der GBM übernommen. Die Glomeruli wurden im *Magnetcatcher* isoliert, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Lag nur noch das Pellet vor, wurde dieses in 500µl Lysispuffer (Triton 1%) gelöst und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 14000 rpm für 10 Minuten bei 4°C. Der entstandene Überstand wurde auf einem Magneten abgenommen und entsprach der Fraktion 1 (Zellysat). Das Pellet wurde wieder gelöst dieses Mal in 500µl Alkaline Detergent Puffer und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte erneut eine Zentrifugation mit 14000 rpm für 10 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde wieder auf einem

Magneten entnommen und entsprach der Fraktion 2 (aufgereinigtes Zelllysat). Das Pellet wurde anschließend in 500µl Desoxyribonuklease Puffer gelöst und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend folgte eine letzte Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C, dieses Mal für 30 Minuten. Der Überstand wurde auf einem Magneten abgenommen und entsprach der Fraktion 3 (Zelllysat mit zerkleinerten DNA-Stücken). Zuletzt wurde das Pellet in 50µl 2xLaemmli + DTT gelöst und entsprach danach der ECM Fraktion. Diese wurde abschließend für 20 Minuten bei 70°C gekocht und danach auf -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 2.2.5.5 Kollagen-Verdau

Übrig blieben 450µl aus der *Dynabeads*®-Isolation. Diese wurden in den *Magnetcatcher* gestellt und der Überstand wurde verworfen. Alle weiteren Schritte fanden unter einer Sterilbank statt. Zur Durchführung des Kollagen-Verdau wurde zuerst ein Mastermix aus folgenden Bestandteilen angesetzt:

n x 63,2µl	PBS
n x 0,8µl	CaCl 500mM Lösung
n x 16µl	Worthington Kollagenase (5mg/ml)

Tabelle 13 Kollagen-Verdau Ansatz

Das gewonnene Pellet wurde anschließend in 80µl des *Mastermixes* gelöst und über Nacht bei 37°C für 12-14 Stunden verdaut. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 14000 rpm für 15 Minuten bei 4°C. Währenddessen wurde der Thermomixer auf 95°C vorgeheizt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand auf einem Magneten abgenommen und in ein neues Tube überführt. Dabei wurde das Volumen des Überstands bestimmt. Mit Hilfe einer Pipette wurde das Volumen solange variiert bis der gesamte Überstand aufgenommen werden konnte. Erfahrungsgemäß lag dieser Wert zwischen 70µl und 100µl. War das Volumen bestimmt wurde der Überstand zu jeweils 1/3 des Volumens mit 4x Laemmli + DTT vermischt und bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Abschließend wurden alle Proben auf -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 2.2.5.6 Blut und Urin

Während der Organentnahme wurden Blut (Heparinplasma) und Urin zur späteren Analyse gesammelt. Die Blutproben wurden zweimal bei 1500rpm für 5 Minuten auf 4°C zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand in Form von Blutplasma abgenommen. Der Urin wurde nur einmal mit derselben Konfiguration zentrifugiert, um für den Fall einer fehlerhaften postmortalen Blasenpunktion Verunreinigungen zu entfernen. Auch beim Urin wurde der Überstand anschließend abgenommen und zusammen mit dem Blut auf -80°C gelagert.

### 2.2.6 Western- Blot

Die Methode des Western-Blots ist ein immunologisches Verfahren, mit dem nach einer Gelelektrophorese verschiedene Proteine differenziert werden können. Hierzu wurde ein Gel auf eine Membran übertragen, die dann mit unterschiedlichen Antikörpern eingefärbt wurde. Zur genaueren Untersuchung der Differenzen zwischen GLEPP1 WT- und KO-Mäusen, wurden die aus dem *Dynabeads*®-Protokoll gewonnenen Proben für Laminin und Kollagen IV jeweils für eine Altersklasse auf einem Gel mit verschiedenen Antikörpern verglichen. Abschließend erfolgte eine densitometrische und statistische Auswertung der Ergebnisse am Computer.

#### 2.2.6.1 Die Gelelektrophorese

Als erster Schritt wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für Kollagen wurde ein 10%-iges und für Laminin ein 8%-iges SDS Gel verwendet.

Zur Herstellung aller Gele wurden Glasplatten mit einem Abstand von 0,75 mm verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ergab sich wie folgt:

<b>Für 2 Trenngele: Kollagen (10%)</b>	<b>Für 2 Trenngele: Laminin (8%)</b>
– 3ml Rotiphorese	– 2,4ml Rotiphorese
– 1,5ml Aqua double dest.	– 2,1ml Aqua double dest.
– 4,5ml Puffer A	– 4,5ml Puffer A

<p>Kurz vor dem Gießen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– 90µl 10% Ammoniumpersulfat APS</li> <li>– 15µl Temed</li> </ul>	<p>Kurz vor dem Gießen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– 90µl 10% Ammoniumpersulfat APS</li> <li>– 15µl Temed</li> </ul>
--	--

Tabelle 14 Ansatz SDS Gele

Das Trenngel entsprach dem eigentlichen „Sieb“, durch das die Proteine hindurch wanderten, wenn ein elektrisches Feld angelegt wurde. Es wurde zuerst zwischen die Platten gegossen und anschließend sofort mit 100%igem Isopropanol übergossen. Das Ammoniumpersulfat sowie das Temed dienten als Initiator und Katalysator der Polymerisation des Gels und wurden daher erst kurz vor dem Gießen der Gele hinzugegeben.

War die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen, wurde das reine Isopropanol abgegossen, der Zwischenraum mit destilliertem Wasser ausgespült und die Reste wurden mit Filterpapier zwischen den Platten herausgesogen. Anschließend wurde das Sammelgel zwischen die Platten gegossen. Hierbei gab es keine Unterscheidung zwischen Laminin und Kollagen:

<b>Für 2 Sammelgele:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– 0,535ml Rotiphorese</li> <li>– 1,135ml Aqua double dest.</li> <li>– 1,665ml Puffer B</li> </ul> <p>Kurz vor dem Gießen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– 40µl 10% Ammoniumpersulfat APS</li> <li>– 5µl Temed</li> </ul>

Tabelle 15 Ansatz Sammelgele

Das Sammelgel diente dem Beladen der Proben und wurde daher bis zur Oberkante der Glasplatten eingefüllt und sofort mit einem 0,75 mm 10-well Probenkamm versehen. War die Gelherstellung abgeschlossen konnten die Proben vorbereitet werden. Geladen

wurden jeweils für Laminin die ECM-Fraktionen aus dem letzten Schritt der Laminin-Extraktion (2.2.5.4) und für Kollagen die Proben aus dem Kollagen-Verdau (2.2.5.5).

Die vorbereiteten Gele wurden mit einem Einspanngestell in eine *Mini Trans Blot*® Kammer gestellt. In jedes Einspanngestell mussten zwei Gele oder ein *Mini Cell Buffer Dam* eingespannt werden. Die Gele mussten während des gesamten Versuches feucht gehalten werden, daher wurde im nächsten Schritt die Dichtigkeit des Einspanngestells überprüft, sodass die Gele permanent Kontakt mit dem Puffer hatten und dieser nicht aus dem Gestell heraussickern konnte. War die kleine Kammer, zwischen den beiden Gelen, dicht verschlossen, konnte die umliegende große Kammer ebenfalls mit Puffer gefüllt werden. Hierfür wurde in beiden Fällen Laufpuffer verwendet. Als Markerkontrolle für den anschließenden Western-Blot wurde der *Prestained Protein Marker* gewählt. Der Marker wurde mit jeweils 7µl in die erste Tasche und als Trennung zwischen die Proben der WT- und KO-Tiere geladen. Die Ladungsgröße der Proben wurde jeweils individuell anhand der Proteinbestimmung errechnet, sodass alle Proben möglichst äquivalent geladen wurden (siehe Kapitel 2.2.6.2 Ladungsgröße). Geladen wurden immer alle Proben eines *Dynabeads*®-Protokoll-Tages auf ein Gel, sodass drei WT-Proben mit drei KO-Proben verglichen werden konnten. Die Gele liefen in der Sammelgelphase mit 70V für 30 Minuten und in der Trenngelphase mit jeweils 20mA pro Gel für 1 ½ Stunden.

#### **2.2.6.2 Ladungsgröße**

Die Ladungsgröße der einzelnen Proben wurde vor dem Beladen des Gels anhand der Proteinbestimmung vom Operationstag der Mäuse bestimmt. Die Berechnung war notwendig um ein äquivalentes Ladungsverhältnis der einzelnen Proben zueinander herzustellen. Wurde zum Beispiel von einer Probe von vorneherein eine viel größere Menge an Protein geladen, so erzeugte die Probe fälschlicherweise ein stärkeres Signal als eine andere Probe nur auf Grund eines höheren Ausgangsvolumens. Um die Proben zu normieren wurden alle anderen Proben auf die Konzentration der Probe mit der geringsten Konzentration runtergerechnet. Die Ausgangsgröße war hierbei für Kollagen 20µl, die von der Probe mit der kleinsten Konzentration geladen wurden. Für Laminin wurde die individuelle Ladungsmenge bei einem Ausgangsvolumen von 25µl Ladungsgröße der Probe mit der geringsten Konzentration berechnet.

### 2.2.6.3 Blotting

War das Gel durchgelaufen konnte es gestoppt und auseinandergebaut werden. Mit Hilfe eines Spatels konnten die beiden Glasplatten voneinander getrennt werden und das Gel freigelegt werden. Mit dem Spatel wurde dann das Sammelgel möglichst sauber abgetrennt und verworfen. Beim anschließenden Zusammenbau der Blot- Kasette musste stets darauf geachtet werden, dass möglichst feucht und ohne Lufteinschlüsse gearbeitet wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu eine Unterlegschale verwendet, die als Reservoir für überfließenden Transferpuffer diente und so die Kasette feucht gehalten werden konnte. Die Kasette wurde folgendermaßen zusammengesetzt:

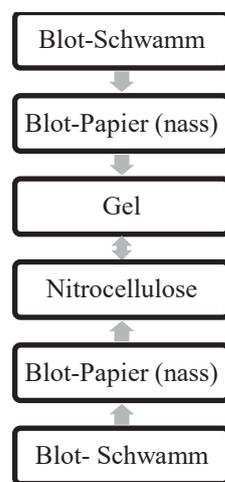


Abb.7 Schematischer Aufbau einer Blot-Kasette

Bei der verwendeten Membran, auf die das Gel *geblottet* wurde, handelte es sich um *Nitrocellulose Amersham™Protran™*, die vor Verwendung in Transferpuffer eingelegt wurde. Vor dem Auflegen der Nitrocellulose auf das Gel, wurde das Gel mit Transferpuffer geflutet, sodass keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Entstanden dennoch Luftblasen wurden diese durch vorsichtiges Ausstreichen beseitigt.

War die Kasette zusammengesetzt wurde sie mit einem Eisblock zusammen in die Blot-Kammer gestellt und die Kammer mit Transferpuffer gefüllt. Der Laminin-Blot lief insgesamt 2h bei 200mA und der Kollagen-Blot insgesamt nur 1:30h bei 200mA.

Nach Abschluss der Übertragung der Gelbanden auf die Membran wurde die Blot - Kasette auseinandergebaut und die Membran war bereit zur immunologischen Nachbearbeitung. Zuerst wurde die Nitrocellulosemembran in 5% BSA (*Bovines Serum Albumin*) für eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C geblockt. Anschließend erfolgte die immunologische Aufbereitung mit Hilfe von speziellen Antikörpern, die an

oberflächlichen Antigenen der Proteine binden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Antikörper zum Einsatz:

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Bezogen über</b>
Alpha 1 (IV) NC1 Rat / IgG2a H11	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 1 chain of type IV collagen	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)
Alpha 2 (IV) NC1 Rat / IgG2a H22	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 2 chain of type IV collagen	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)
Alpha 3 (IV) NC1 Rat / IgG2a H31	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 3 chain of type IV collagen	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)
Alpha 5 (IV) NC1 / IgG2a H54	Rat monoclonal antibody against human non-collagenous domain 1 (NC1) of alpha 5 chain of type IV	1:200	Producer: Yoshikazu Sado, Ph. D. / Shigei Medical Research Institute (JPN)

	collagen		
Agrin D-2 / sc-374117	Mouse monoclonal IgM specific for Agrin of rat	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Nidogen C-7 / sc-133175	Mouse monoclonal antibody	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Anti-laminin alpha 1	Antibody from rabbit	1:500	Takako Sasaki (Oita University, JPN)
ECL <sup>TM</sup> Anti-rat IgG	Linked with HRP from goat	1:7500	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg (D)
Anti-rabbit IgG sc-2004	Linked with HRP from goat	1:20000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D)
Anti-mouse IgG	Polyclonal antibody linked with HRP from goat	1:10000	Dako, Hamburg (D)

Tabelle 16 Blot- Antikörper

Für Kollagen wurden die Antikörper von Herrn *Ph. D. Yoshikazu Sado* gewählt, die an die einzelnen  $\alpha$ -Ketten des Kollagens IV binden konnten. Für Laminin wurde der Anti-Laminin-Antikörper von Takako Sasaki (Oita University, JPN) verwendet. Die Membranen wurden jeweils über Nacht bei 4°C auf einem *Shaker* inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Primärantikörper entfernt und alle überschüssigen nicht gebundenen Antikörperreste mit Waschpuffer abgewaschen. Dieser Vorgang dauerte 3 x 5 Minuten, wobei nach jeweils 5 Minuten der Waschpuffer gewechselt wurde. Im nächsten Schritt wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der an den Primärantikörper binden konnte und zusätzlich mit einem Marker-Enzym verbunden war. Das verwendete Marker-Enzym war die Meerrettichperoxidase (engl.: *horse radish*

*peroxidase*, HRP). Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in den Sekundärantikörper gelegt. Danach wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Membran erneut gewaschen.

Um eine Chemilumineszenzreaktion zu erzeugen, die die Proteine mit Antikörpern sichtbar macht, wurde *SuperSignal® ELISA Fento Maximum Sensitivity Substrate* (Super-ECL) verwendet. Das Kit enthielt zwei Reagenzien die im Verhältnis 1:1 gemischt und auf den *Blot* tropfenweise aufgetragen wurden bis die gesamte Membran benetzt war. Die beiden Reagenzien waren Luminol und Peroxid-Puffer. War das Super-ECL aufgetragen wurde die Membran für 30 Sekunden dunkel abgedeckt, ohne das Super-ECL zu verwischen. Anschließend wurde die Chemilumineszenz unter einer Kamera im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Insgesamt wurden fünf Bilder gemacht nach 10, 20 und 30 Sekunden sowie nach einer und zwei Minuten.

Die Membran wurde daraufhin kurz mit Waschpuffer abgewaschen und kam zur Nachfärbung in einen zweiten Primärantikörper. Für Kollagen wurde Agrin als Nachfärbung gewählt und für Laminin entsprechend Nidogen als zweiter Primärantikörper. Die Nachfärbung diente als Ladungskontrolle um zu überprüfen ob wirklich äquivalent, also mit derselben Proteinmenge bei allen Proben, geladen wurde. Die Zuordnung der jeweiligen Sekundärantikörper zum jeweiligen Primärantikörper erfolgte nach einem festen Schema. Die Antikörper H11, H22, H31, H54 von Herrn *Ph. D. Yoshikazu Sado* wurden mit dem anti-Ratte-Antikörper markiert. Die Kollagen-Nachfärbung mit Agrin, ebenso wie die Laminin-Nachfärbung mit Nidogen, wurde mit dem anti-Maus-Antikörper nachbehandelt. Als Sekundärantikörper für den anti-Laminin-Antikörper wurde der anti-Kaninchen-Antikörper verwendet.

### **2.2.7 Auswertung/ Densitometrie**

Pro Maus-Operationstag wurden sechs Tiere operiert, die dann auch in ein gemeinsames Gel geladen wurden, um eine optimale Vergleichbarkeit herzustellen. Dabei wurden jeweils drei WT-Tiere mit drei KO-Tieren verglichen. Nach dem Western-Blot wurde die Stärke der einzelnen spezifischen Banden für Laminin und Kollagen IV auf der Membran mit einander verglichen und statistisch untersucht. Dazu wurde mit dem Programm Alphaview jeweils eine nicht übersättigte der fünf Aufnahmen jedes Gels ausgewählt. Die Kollagen- oder Lamininbanden bzw. in der Nachfärbung die Agrin-

oder Nidogenbanden wurden manuell markiert und mit dem Hintergrundrauschen verlinkt. Dadurch wurde das Hintergrundrauschen aus der Bandenstärke herausgerechnet und es konnte die eigentliche Farbdichtemessung (Densitometrie) erfolgen. Es wurde ein Quotient der Zielbande zur Ladungskontrolle gebildet. Bezogen wurden alle errechneten Quotienten auf den Mittelwert der GLEPP1 WT Quotienten.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Real Time PCR

Die Ergebnisse der Real Time PCR (qPCR) wurden mit der REST08 Software ausgewertet und anschließend in GraphPad Prism dargestellt. Es folgt die Darstellung der Ergebnisse für jeden einzelnen Primer im Altersverlauf.

#### 3.1.1 Nidogen 1

Für Nidogen 1 ergab sich initial in der Gruppe der viermonatigen Mäuse eine signifikant erhöhte Expression in der KO-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Dieser Unterschied verschwand im Altersverlauf. Für sechsmonatige Mäuse lag die Expression tendenziell in der KO-Gruppe unterhalb der WT-Gruppe, wenn auch nicht signifikant. Nach zehn Monaten zeigte sich kein Unterschied mehr zwischen WT- und KO-Tieren.

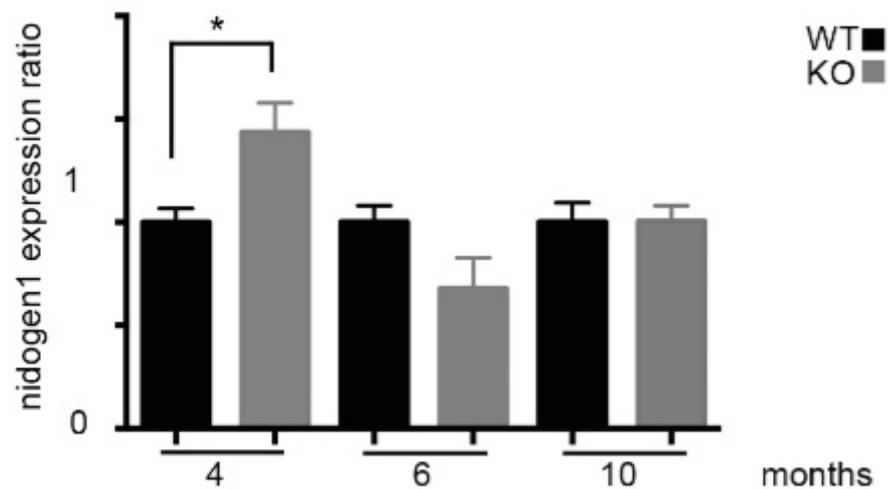


Abb. 8 Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der Real Time PCR für den Primer Nidogen 1 im Vergleich von WT- und KO-Mäusen im Altersverlauf von vier, sechs und zehn Monaten. Es wurden jeweils neun WT- mit neun KO-Tieren verglichen ( $n=9$ ). Die Expression der Kontrollgruppe der WT-Tiere wird mit 1.0 gekennzeichnet. Für viermonatige Mäuse zeigt sich eine signifikant höhere Expression von Nidogen 1 in den KO-Mäusen,  $*p < 0,05$ . Dieser Unterschied verschwindet bei sechs Monate alten Mäusen. Hier liegen die gemessenen Werte für Nidogen 1 in der KO-Gruppe unterhalb der Expression der WT-Gruppe. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. In der zehn-Monats-Gruppe zeigt sich kein Unterschied zwischen den WT- und KO-Mäusen.

### 3.1.2 Nidogen 2

Bei Nidogen 2 zeigte sich im Altersverlauf eine Herabregulation von einer deutlich höheren Expression bei vier Monaten in der KO-Gruppe bis hin zu einer fast gleichen Expression im Alter von zehn Monaten im Vergleich mit der WT-Kontrollgruppe. Jedoch war lediglich der Unterschied der viermonatigen Mäuse signifikant ( $p < 0,05$ ). Im Alter von sechs Monaten zeigte sich immer noch eine tendenziell erhöhte Expression in der KO-Gruppe, allerdings nicht mehr signifikant. Dieser Unterschied zeigte sich ebenfalls noch nach zehn Monaten jedoch ebenfalls nicht signifikant. In der Gegenüberstellung der einzelnen Altersklassen zeigte sich so eine konstante tendenzielle Abnahme des Expressionslevels für Nidogen 2 mit steigendem Alter der KO-Mäuse.

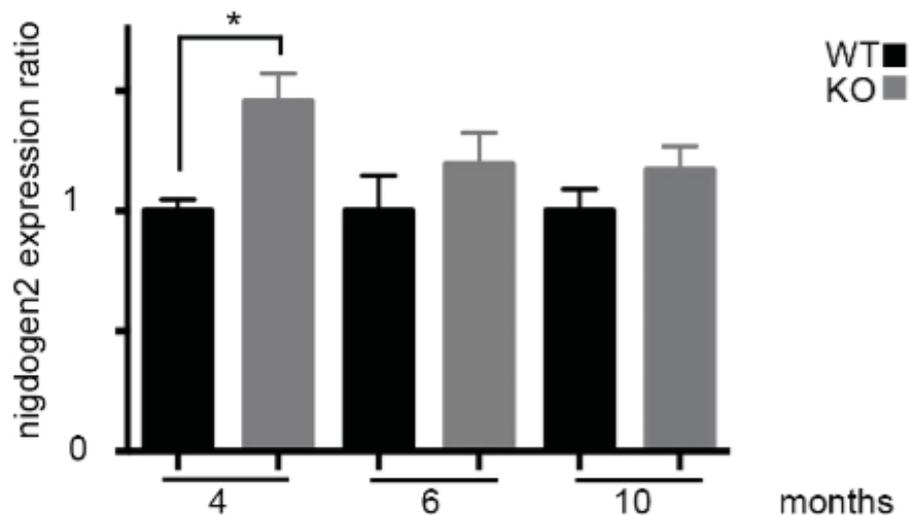


Abb. 9 Zu sehen sind die Ergebnisse der Real Time PCR für den Primer Nidogen 2 im Alter von vier, sechs und zehn Monaten im Vergleich von WT- und KO-Tieren. Als Bezugsgröße dient die WT-Kontrollgruppe, gekennzeichnet durch die 1.0. Es wurden jeweils neun Tiere miteinander verglichen ( $n=9$ ). Für viermonatige Mäuse zeigt sich eine signifikante Heraufregulation in den KO-Tieren gegenüber der WT-Gruppe,  $*p < 0,05$ . In sechsmonatigen Mäusen liegt die Expression von Nidogen 2 immer noch über der Kontrollgruppe, allerdings weniger deutlich und nicht signifikant. In den zehnmonatigen Mäusen wird der Unterschied nochmal kleiner als in den sechsmonatigen Tieren.

### 3.1.3 Agrin

Bei der Untersuchung der Expression von Agrin fielen in der KO-Gruppe tendenziell niedrigere Expressionslevel als in der WT-Gruppe auf. Dieser Unterschied setzte sich durch alle Altersgruppen fort und nahm mit dem Alter zu. Für vier- und sechsmonatige

Mäuse konnte allerdings keine Signifikanz gezeigt werden. Lediglich in der Gruppe der zehnmonatigen Mäuse zeigte sich eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

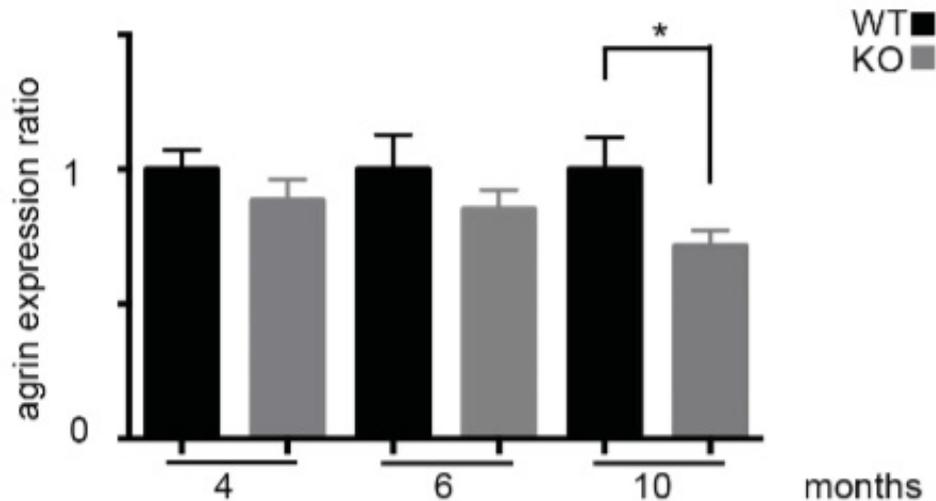


Abb. 10 Gezeigt ist die grafische Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR für den Primer Agrin im Vergleich von WT- und KO-Gruppe. Die WT-Gruppe wurde auf einen Wert von 1.0 normiert. Es wurden jeweils neun Tiere miteinander verglichen ( $n=9$ ). Im Alter von vier und sechs Monaten zeigt sich eine herabgesetzte Expression von Agrin in der KO-Gruppe, die allerdings nicht signifikant ist. Die niedrigere Expression von Agrin in den KO-Tieren zeigt sich bei zehnmonatigen Mäusen signifikant,  $*p < 0,05$ .

### 3.1.4 WT1

Für den Primer WT 1 zeigte sich bei viermonatigen KO-Tieren eine signifikante Herabregulation gegenüber der Kontrollgruppe von WT-Tieren ( $p < 0,05$ ). Diese Tendenz setzt sich im Alter von sechs Monaten fort, allerdings nicht mehr signifikant. Auch im Alter von zehn Monaten setzt sich der Trend fort und es zeigt sich signifikant ein noch geringeres Expressionslevel als schon zuvor ( $p < 0,005$ ). Betrachtet man also die einzelnen Altersstadien im Überblick zeigt sich eine deutliche Abnahme der Expression von WT 1, die mit dem Alter der Mäuse zunimmt.

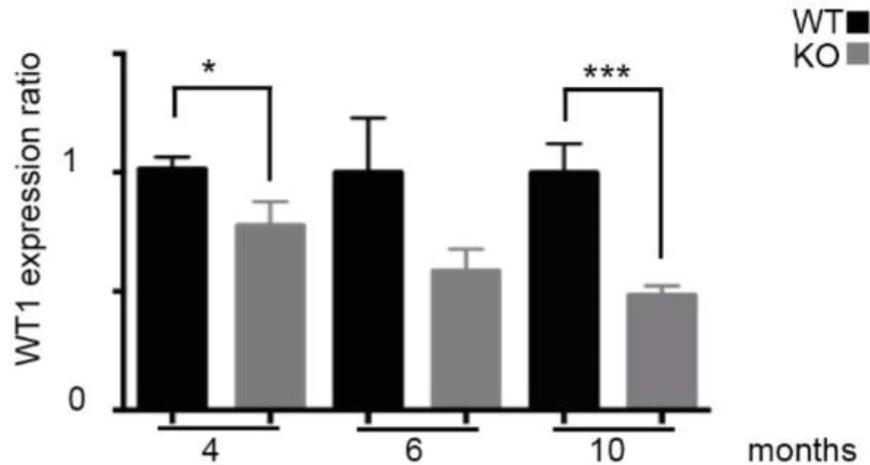


Abb. 11 Gezeigt ist die grafische Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR für den Primer WT 1 im Vergleich von WT- und KO-Gruppe. Die WT-Gruppe wurde auf einen Wert von 1.0 normiert. Es wurden jeweils neun Tiere miteinander verglichen (n=9). Im Alter von vier Monaten zeigt sich eine signifikante Herabregulation für WT 1 in den KO-Tieren (\* $p < 0,05$ ). Die geringere Expression zeigt sich nicht signifikant in sechsmonatigen KO-Mäusen. Dabei nimmt die Expression mit dem Alter noch weiter ab. Im Alter von zehn Monaten ist die Expression von WT 1 am niedrigsten und die Signifikanz ist am deutlichsten, \*\*\* $p < 0,005$ . Im Überblick aller Altersklassen zeigt sich wie das Expressionsniveau von WT 1 in der KO-Gruppe mit steigendem Alter abnimmt.

## 3.2 Western Blot

Mit Hilfe von Westernblots wurde die molekulare Zusammensetzung der GBM auf Proteinebenen genauer untersucht. Der Fokus lag dabei auf den einzelnen  $\alpha$ -Kollagenketten und auf Laminin  $\alpha 1$  im Vergleich zwischen WT- und KO-Tieren im Alter von vier und sechs Monaten. Da die Proteine vorher verdaut und extrahiert wurden ergaben sich spezifische Banden. Zum einen handelte es sich dabei um eine Bande bei 58kDa für die Kollagen IV Dimere, zum anderen um eine 30kDa Bande, die den Kollagen IV Monomeren entsprach. Die Bande für Laminin  $\alpha 1$  lag bei 200kDa. Als Ladungskontrollen dienten Agrin für Kollagen und Nidogen für Laminin.

### 3.2.1 GLEPP1-Knockout im Alter von vier Monaten

Bei einem GLEPP1-KO zeigten sich im Alter von vier Monaten Veränderungen in der spezifischen Zusammensetzung von Kollagen IV, anhand der einzelnen  $\alpha$ -Ketten. Verglichen wurden jeweils sechs WT mit sechs KO Tieren.

In den KO-Mäusen zeigten sich signifikant weniger  $\alpha$ 1-Ketten als in der WT-Kontrollgruppe (\*  $p < 0.05$ ). Auf den Westernblots zeigten sich die spezifischen Bänder auffallend schwächer in der KO-Gruppe. Unter Einbezug der Ladungskontrolle mit Agrin und der densitometrischen Auswertung zeigte sich eine signifikante Herabregulation der Kollagen  $\alpha$ 1-Ketten in GLEPP1-KO-Mäusen.

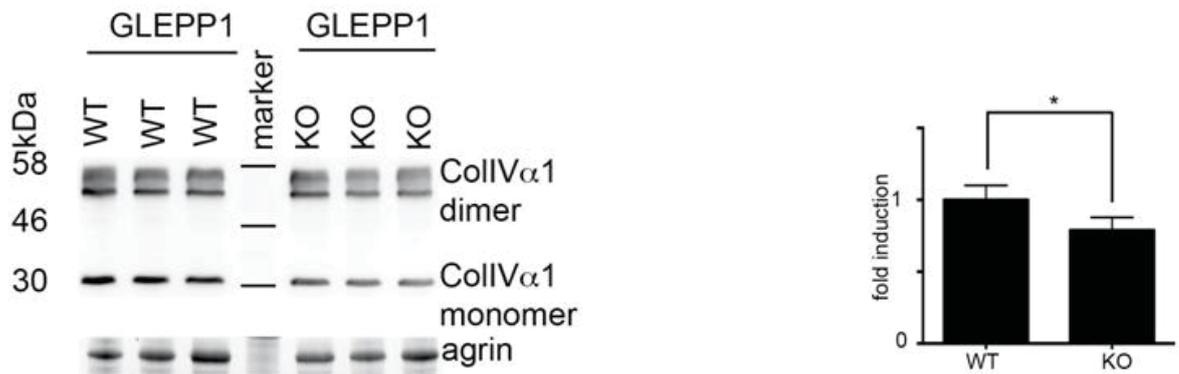


Abb. 12 Westernblots und Densitometrie für viermonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha$ 1 (n=6), \* $p < 0,05$ .

Für die Kollagen  $\alpha$ 2-Ketten der GBM konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es in GLEPP1-KO-Mäusen zu einem signifikant herabgesetzten Vorkommen der Ketten kommt (\*  $p < 0.05$ ).

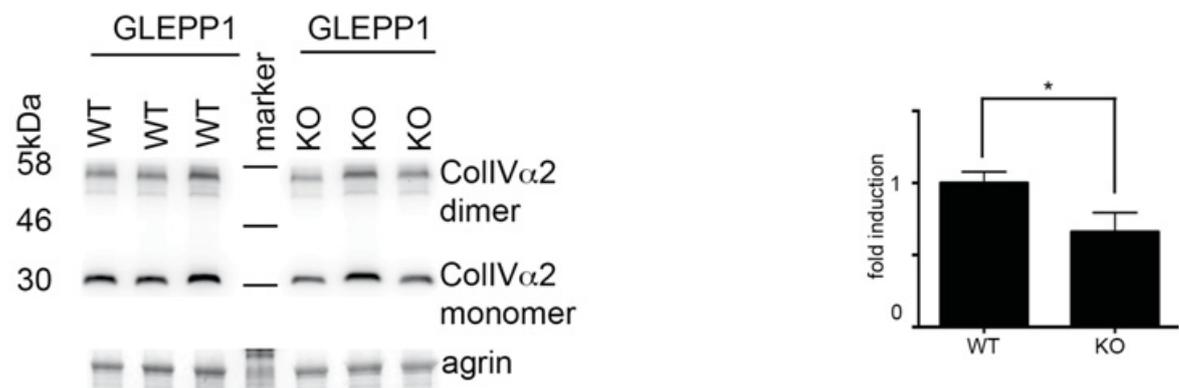


Abb. 13 Westernblots und Densitometrie für viermonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha$ 2 (n=6), \* $p < 0,05$ .

Bei der Betrachtung der  $\alpha$ 3-Ketten zeigte sich eine tendenzielle nicht signifikante Herabregulation in der KO-Gruppe.

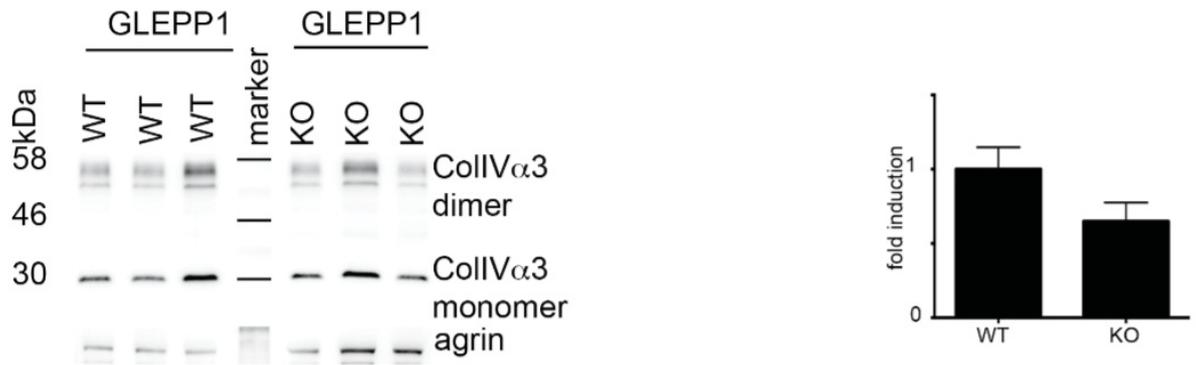


Abb. 14 Westernblots und Densitometrie für viermonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha 3$  (n=6).

Für die Kollagen  $\alpha 5$ -Ketten zeigte sich erneut eine signifikante Herabregulation in den KO-Mäusen (\*  $p < 0.05$ ).

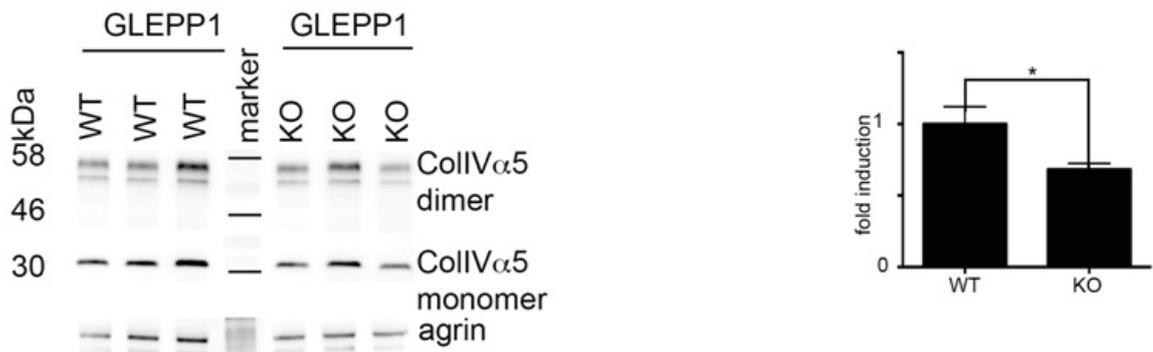


Abb. 15 Westernblots und Densitometrie für viermonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha 5$  (n=6), \* $p < 0.05$ .

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es im Alter von vier Monaten in den GLEPP1-KO-Mäusen zu einer Herabregulation reifer sowie unreifer Kollagenketten kommt.

Die Analyse der Westernblots für Laminin  $\alpha 1$  ergab keine signifikanten Unterschiede im Alter von vier Monaten. Dennoch ergab sich eine tendenziell niedrigere Konzentration für Laminin  $\alpha 1$  in den KO-Mäusen im Alter von vier Monaten, als in der Vergleichsgruppe von WT-Mäusen.

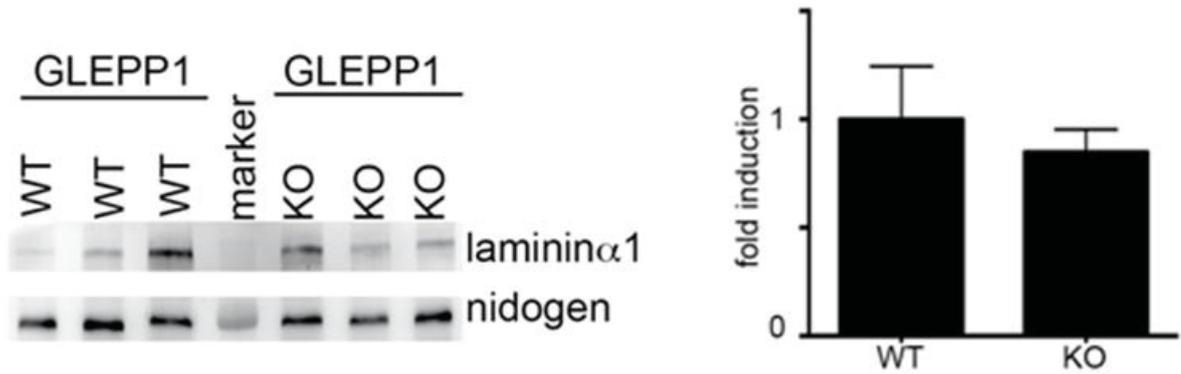


Abb. 16 Westernblots und Densitometrie für viermonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Laminin  $\alpha$ 1 (n=6).

### 3.2.2 GLEPP1- Knockout im Alter von sechs Monaten

Im Alter von sechs Monaten wurden jeweils neun WT- mit sechs KO-Tieren für die Kollagenketten miteinander verglichen. Für Laminin wurden zwölf WT- mit acht KO-Mäusen verglichen. Ansonsten fand die Auswertung genauso wie für die viermonatige Gruppe statt.

Bei sechs Monaten zeigten sich in den Westernblots für die Kollagen  $\alpha$ 1-Ketten keine signifikanten Unterschiede in der GLEPP1-KO-Gruppe.

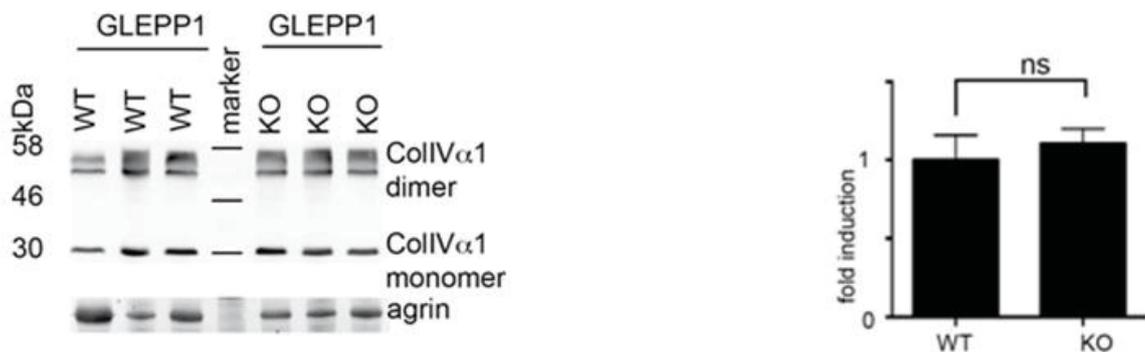


Abb. 17 Westernblots und Densitometrie für sechsmonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha$ 1 (n= 9WT/6KO).

Für die  $\alpha$ 2-Ketten ergab sich bei KO-Mäusen eine signifikante Heraufregulation gegenüber der WT-Tiere (\* p<0.05).

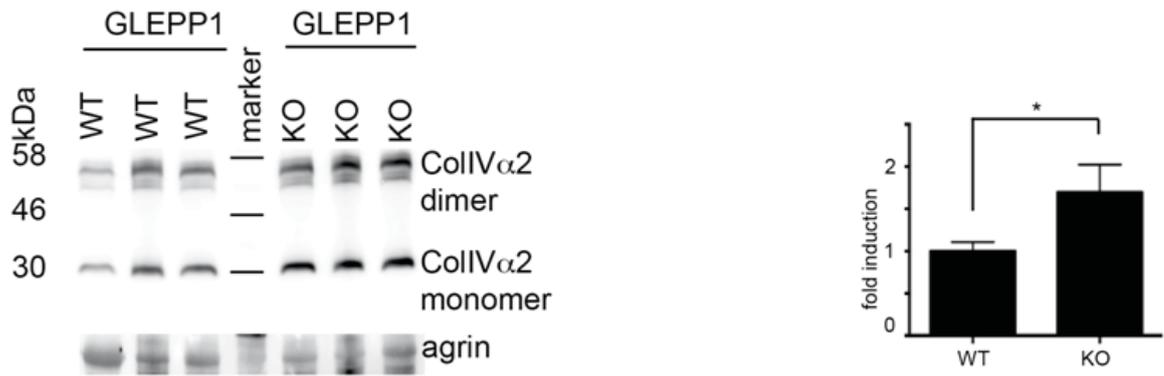


Abb. 18 Westernblots und Densitometrie für sechsmonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha 2$  (n= 9WT/6KO), \*p<0,05.

Bei sechsmonatigen KO-Mäusen unterschied sich die Expression von  $\alpha 3$ -Ketten nur tendenziell von der WT-Gruppe.

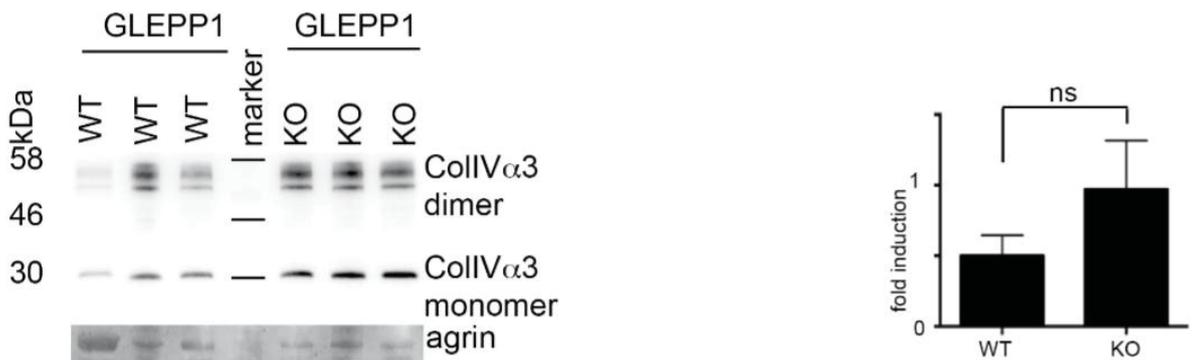


Abb. 19 Westernblots und Densitometrie für sechsmonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha 3$  (n= 9WT/6KO).

Im Bezug auf die  $\alpha 5$ -Ketten von Kollagen IV in der glomerulären Basalmembran zeigte sich eine Herabregulation in der KO-Gruppe.

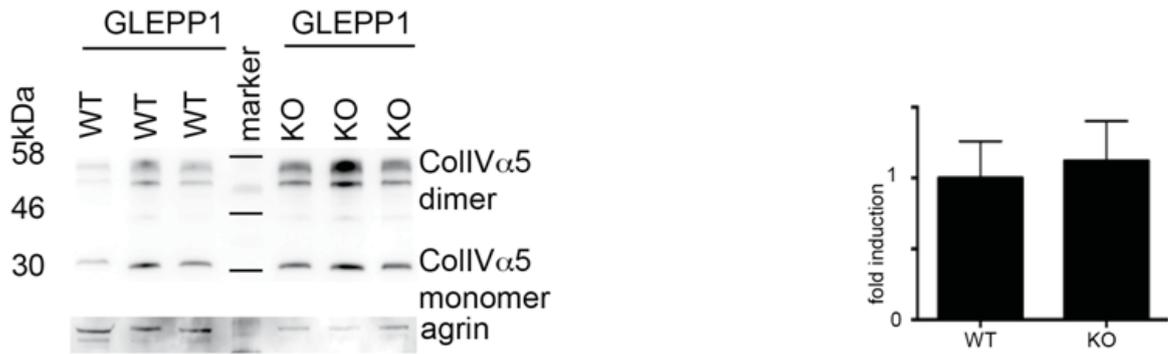


Abb. 20 Westernblots und Densitometrie für sechsmonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Kollagen IV  $\alpha$ 5 (n= 9WT/6KO).

Bezüglich Laminin  $\alpha$ 1 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

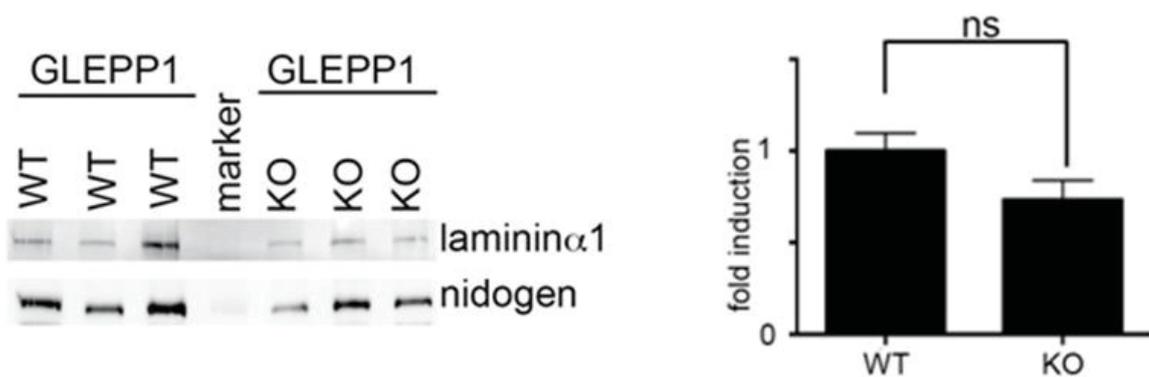


Abb. 21 Westernblots und Densitometrie für viermonatige GLEPP1 WT- und KO-Mäuse für Laminin  $\alpha$ 1 (n=12WT/8KO).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kollagenkette  $\alpha$ 2, als Stellvertreter des unreifen Kollagens, in der KO-Gruppe im Alter von sechs Monaten deutlich überexprimiert war im Vergleich zur WT-Gruppe.

(Anmerkung: Die nicht immer gerade Anzahl an Versuchstieren in beiden Gruppen ergibt sich daraus, dass in Einzelfällen technisch keine ausreichende Perfusion der jeweiligen Nieren stattfinden konnte. In Folge dessen konnten die Proben dieser Tiere auch nicht *geblottet* und ausgewertet werden.)

## 4 Diskussion

Mutationen im GLEPP1 Gen sind mit einem steroidresistenten nephrotischen Syndrom im Kindesalter assoziiert<sup>24</sup>. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wiesen GLEPP1 defiziente Mäuse eine Proteinurie mit zunehmendem Alter auf (Doktorarbeit von *Laura Lennartz*). Histomorphologisch fielen Veränderungen in Form von lokalisierten Verdickungen der GBM und ein Verlust der podozytären Fußfortsätze auf (Doktorarbeiten von *Laura Lennartz* und *Christian Weigel*).

In der vorgelegten Arbeit konnte nun die molekulare Zusammensetzung der GBM von GLEPP1 defizienten Tieren im Alter von vier und sechs Monaten auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden. In GLEPP1 defizienten Mäusen im Alter von vier Monaten findet eine Herabregulation der reifen und unreifen Kollagen IV Ketten statt. Desweiteren waren bei sechs Monate alten GLEPP1 defizienten Mäusen die unreifen Kollagen IV Ketten vermehrt exprimiert. Hiermit assoziiert ist eine verminderte Expression vom Wilms-Tumor-1 (WT-1) Gen.

### 4.1 Veränderungen der GBM beim GLEPP1 KO

Die GBM ist eine spezialisierte Basalmembran in der Niere die aus Kollagen IV, Laminin, Nidogen und Proteoglykanen hauptsächlich Agrin besteht<sup>37,39</sup>. Die GBM entwickelt sich durch Verschmelzung zweier Basalmembranen, die zwischen den Endothelzellen und den Podozyten liegen<sup>51</sup>. Ursprünglich besteht sie aus Kollagen IV  $\alpha1\alpha2$  und Laminin  $\alpha1\beta1\gamma1$ . Diese beiden Komponenten werden von Podozyten- und Endothelseite ausgebildet. Mit dem Voranschreiten der Reifung werden Kollagen IV und Laminin durch die jeweiligen reifen Isoformen ersetzt<sup>51,91</sup>. Außerdem wird Kollagen IV nur noch vom Podozyten synthetisiert.

#### 4.1.1 Kollagen IV

Bei einem GLEPP1 KO kommt es zu einer gestörten Proteinbiosynthese von Kollagen IV, die zur Retention der unreifen  $\alpha2$ -Ketten führt. Bereits der Nachweis einer unterschiedlichen  $\alpha$ -Kette reicht aus, um davon auszugehen, dass das gesamte

Heterotrimer in einer veränderten Konfiguration vorliegt<sup>68,70</sup>. In diesem Fall läge das Kollagen IV also in seiner unreifen  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ -Konfiguration vor. Auffällig bei einem GLEPP1 KO ist aber, dass es initial zu einer verminderten Expression aller Kollagenketten kommt. Denkbar wäre, dass es durch den *Knockout* zu einem Podozytenschaden kommt, wodurch der Podozyt weniger reife und unreife Ketten produzieren kann. Der Podozytenschaden zeigt sich zusätzlich an der veränderten Konfiguration der podozytären Fußfortsätze. Normalerweise haben sie eine oktopoide Struktur, verändern sich bei einem GLEPP1 KO im Mausmodell aber zu einer mehr amöboiden Struktur<sup>87</sup>. Auch ist die Filtrationsoberfläche vermindert, was auf eine geringere Anzahl an Podozyten hindeuten könnte<sup>87</sup>.

Verfolgt man diese Theorie weiter könnte der Podozytenschaden irgendwann soweit fortgeschritten sein, dass der Podozyt seine Syntheseleistung weiter reduziert bis er keine Kollagenketten mehr produziert. Dafür gibt es bis jetzt allerdings keine histologischen Hinweise.

Die im Altersverlauf neugebildeten unreifen Kollagenketten könnten daher nur noch vom Endothel synthetisiert werden. Fraglich ist dabei ob das Endothel überhaupt die Möglichkeit besitzt die Syntheseleistung vollständig zu übernehmen.

#### **4.1.2 Laminin**

Laminin  $\alpha 1$  zeigt im beobachteten Zeitraum keine Veränderungen. In der Entwicklung wird es vom Podozyten und Endothel gleichermaßen gebildet<sup>47,51</sup>. Anders als bei Kollagen IV wird also reifes sowie unreifes Laminin stets vom Endothel und Podozyten synthetisiert. Der Wechsel der reifen und unreifen Isoformen vollzieht sich abrupt, sodass es nur eine sehr kurze Phase gibt, in der sich beide Typen in der Entwicklung finden lassen<sup>38</sup>. Hierbei gilt ähnlich wie beim Kollagen, dass bereits das Fehlen einer einzelnen Kette zum Verlust des gesamten Heterotrimers führt<sup>71,72</sup>.

Wie auch schon in der frühen embryonalen Entwicklung scheint sich die Rückbildung von unreifem Laminin auch bei GLEPP1 KO Mäusen plötzlich zu vollziehen, da sich im Alter von sechs Monaten noch keine Anzeichen auf Proteinebene für einen Wechsel erkennen lassen. Auf RNA-Ebene hingegen kündigt sich die Veränderung bereits bei sechs Monaten an, da hier alle anderen Lamininketten herabreguliert werden, außer  $\alpha 1$

(*Christian Weigel*). Laminin  $\alpha 1$  wird allerdings auch im Mesangium exprimiert, sodass die mesangiale Expression eventuell die glomeruläre Lamininexpression auf der RNA-Ebene überstrahlt. Anders als in der Entwicklung wird also bei einem GLEPP1 KO zuerst Kollagen und dann Laminin ersetzt <sup>38,45,51,91,92</sup>.

### 4.1.3 Agrin und Nidogen

Die Ergebnisse auf RNA-Ebene geben Anhaltspunkte für weitere Hypothesen. Nidogen 1 und 2 sind in ihrer Funktion redundant und werden daher im Folgenden nur noch als Nidogen bezeichnet <sup>80</sup>. Nidogen interagiert mit Kollagen IV und Laminin, daher ist es von besonderer Bedeutung für die Formatierung der GBM <sup>50</sup>. Hochregulationen von Nidogen sind im Auge mit einem Reparaturprozess assoziiert <sup>93,94</sup>. In der Niere von GLEPP1 KO Mäusen könnte die initial erhöhte Expression von Nidogen ebenfalls auf den Versuch hindeuten die vorhandenen Veränderungen der GBM, in Form einer verminderten Expression der Kollagen IV Ketten, zu reparieren.

Agrin hingegen dient als Modulatorprotein und wird vor allem in Bezug auf seine Bedeutung für die Aufrechterhaltung der negativen Ladung und damit der Funktion des glomerulären Filters diskutiert <sup>77,95</sup>. Eine Studie zum Alport-Syndrom mit einem Kollagen IV  $\alpha 3$  KO Mausmodell konnte bereits zeigen, dass es im Falle einer Retention von unreifen Kollagenketten auch zu einer Veränderung von Agrin kommt. Damals wurde vermutet, dass ein intaktes Netzwerk aus reifen Kollagenketten auch wichtig für die korrekte Bildung und Funktion von Agrin ist <sup>47</sup>. Außerdem dient Agrin als Regulator für die lokale Aktivität des Komplementsystems und eine Herabregulation könnte daher ein weiteres Anzeichen für das Voranschreiten der Erkrankung und der damit einhergehenden Entzündungsreaktion sein <sup>31</sup>. Das Komplementsystem steht außerdem unter dem Verdacht durch eine Aktivierung gegen den Podozyten ebenfalls zu Proteinurie zu führen <sup>96</sup>. Momentan geht man eher von der Vermutung aus, dass ein Verlust von Agrin, aber keinen so prägnanten Einfluss auf die Funktion des Filters hat wie bisher angenommen <sup>77</sup>. So kommt es sogar bei der Entfernung der beiden häufigsten Heparansulfate Agrin und Perlecan noch nicht zu einer veränderten Filterfunktion <sup>97</sup>. Dadurch verdeutlicht sich, dass der Filterdefekt von GLEPP1 KO Mäusen im Alter von zehn Monaten nicht der verminderten Expression von Agrin

zugeschrieben werden kann, sondern vor allem die strukturellen Veränderungen von Kollagen IV und Laminin im Mittelpunkt stehen.

## 4.2 Einordnung

### 4.2.1 GLEPP1 KO

Vergleicht man die zuvor genannten Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Studien ergeben sich einige interessante Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Als Beispiel eine Wiederholung der GLEPP1 KO Maus von *Wiggins et al.*, als direkter Vergleich<sup>87</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem GLEPP1 KO eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate und die Tendenz zu Bluthochdruck haben<sup>87</sup>. Allerdings konnte dabei keine Proteinurie, selbst nach einer 70%-igen Nephrektomie der KO-Mäuse, nachgewiesen werden. Anders als in der vorliegenden Arbeit wurden aber nur Mäuse im Alter von vier bis sechs Wochen untersucht. Außerdem veränderte sich die Konfiguration der podozytären Fußfortsätze von einer normalerweise oktopoiden, hin zu einer mehr amöboiden Struktur. Die Fußfortsätze waren dabei verkürzt und verdickt. Die KO-Mäuse hatten weniger Fußfortsätze pro GBM-Abschnitt und daher auch eine verminderte Filtrationsoberfläche<sup>87</sup>. Eine andere Studie konnte zeigen, dass Antikörper gegen den GLEPP1-Rezeptor zu einem Anstieg der Albuminpermeabilität in isolierten Mäuse- und Ratten-Glomeruli führt<sup>98</sup>. Dabei wurde vermutet, dass ein GLEPP1 KO *in vivo* nicht zu einer Proteinurie führt, da es tubuläre Reabsorptionsmechanismen gibt, die die Proteine zurückgewinnen können. Mittlerweile konnten wir in eigenen Arbeiten zeigen, dass sich die Proteinurie erst im Altersverlauf frühestens ab sechs Monaten in einem Mausmodell auf dem 129P3/J Hintergrund bildet (*Laura Lennartz, Christian Weigel*). Der Maushintergrund ist insofern von Bedeutung, da die unterschiedlichen Mausstämme unterschiedlich empfindlich für Proteinurie sind<sup>99</sup>.

### 4.2.2 Kollagen IV

Mutationen an einzelnen Kollagenketten wurden in verschiedenen Studien untersucht. So zeigen Mäuse mit einem Knockout der Kollagen IV  $\alpha 3$ -Kette, wie bereits erwähnt, ähnliche Symptome in Form einer protrahierten Proteinurie im Altersverlauf und strukturellen Veränderungen der GBM. Diese GBM-Veränderungen sind assoziiert mit

einem Verlust der reifen und einem Erhalt der unreifen Kollagen IV Ketten ohne eine Beeinflussung von Laminin<sup>67</sup>. Kommt es hingegen zu einer Mutation einer der unreifen Ketten führt dies zu schweren entwicklungsbedingten Schäden<sup>67</sup>.

Da GLEPP1 unter anderem auch im Gehirn vorkommt und unter Verdacht steht einen Einfluss auf das Axonwachstum zu haben, lassen sich bei einem GLEPP1 KO ebenfalls schwere entwicklungsbedingte Schäden nicht ausschließen<sup>100,101</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings nur die Proteinurie als Hauptsymptom untersucht.

### 4.2.3 Laminin

Bezüglich Laminin ist bekannt, dass ein vermindertes Vorkommen von reifem Laminin zu einer Disposition der Heterotrimere und damit zu einer gestörten Permeabilität der GBM führt, die in einer Albuminurie und einem nephrotischen Syndrom endet<sup>71</sup>. Bei einem GLEPP1 KO tritt die Proteinurie nach sechs Monaten auf, obwohl erst nach zehn Monaten vermehrt unreifes Laminin  $\alpha 1$  nachgewiesen werden kann. Diese Diskrepanz ließe sich möglicherweise damit erklären, dass zuerst im Alter von sechs Monaten Kollagen IV ersetzt wird und dieser Wechsel bereits zur Proteinurie führt. Erst danach wird auch das unreife Laminin gebildet.

Einzelne Mutationen in z.B. der Laminin  $\alpha 5$ -Kette führen zum Verlust der GBM und Fehlern in der glomerulären Vaskularisierung<sup>72</sup>. Solche Veränderungen zeigen sich jedoch bei einem GLEPP1 KO-induzierten Wechsel zu unreifem Laminin nicht. Auch kann initial ein funktionsfähiges reifes Laminin-Heterotrimer gebildet werden, welches jedoch ersetzt wird durch bisher unbekannte Mechanismen.

### 4.2.4 Alport-Syndrom

Alle diese Veränderungen, wie z.B. die Retention der unreifen Kollagenketten, erinnern stark an das Erkrankungsmuster beim Alport-Syndrom (AS). Das AS entsteht meistens durch eine X-chromosomale Mutation, wodurch das COL4A5-Gen mutiert ist. Es sind aber auch autosomale Mutationen bekannt, die das COL4A3-Gen betreffen<sup>59</sup>. Diese Mutationen führen dazu, dass die unreifen Kollagenketten  $\alpha 1 / \alpha 2$  bestehen bleiben und nicht wie üblich durch die reifen Ketten ersetzt werden<sup>70</sup>. Dabei ist das AS die zweithäufigste monogenetische Ursache für ein Nierenversagen<sup>59</sup>. Symptomatisch zeigt

sich eine Proteinurie bis hin zu einer Hämaturie und Bluthochdruck. Es entwickelt sich eine tubulointerstinale Fibrose und eine sekundäre Glomerulosklerose. Die Pathogenese läuft dabei so ab, dass durch die Schäden an den reifen Kollagenketten, es zu einem Erhalt der unreifen Kollagenketten kommt. Diese sind aber nicht geeignet um die Langzeitstabilität des Filters zu gewährleisten<sup>44,68</sup>. Der Podozyt detektiert über seine Integrin-Rezeptoren das veränderte Kollagen bzw. die veränderte Struktur der GBM und produziert daraufhin Cytokine und Wachstumsfaktoren, um den Schäden der GBM zu reparieren. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Inflammation und schließlich einer Fibrose, also noch zu einer Verschlimmerung des Schadens. Beim AS gibt es bei Männern, da diese nur ein X-Chromosom haben und daher stärker von einer gonosomalen Mutation betroffen sind, ein *early onset*, bei dem das Nierenversagen vor dem 30. Lebensjahr eintritt und ein *late onset*, wo dieser Fall erst nach dem 30. Lebensjahr eintritt. Frauen sind meistens weniger stark betroffen<sup>59</sup>. In einer Studie zur Protein-Architektur zeigte sich außerdem bei einem Kollagen IV  $\alpha3$ -KO Mausmodell, dass sich im Falle einer solchen Mutation auch die Lage der unreifen Kollagenketten innerhalb der GBM verändert, da diese normalerweise auf der Endothelseite zu finden sind, in diesem Fall aber über die ganze GBM verteilt waren<sup>47</sup>. Dabei wurde vermutet, dass, wie auch schon für Agrin, die Bildung eines reifen Kollagenetzwerkes Einfluss auf die Organisation der unreifen Ketten sowie anderer GBM-Komponenten hat<sup>47</sup>. Offensichtlich bildet das reife Kollagenkettennetzwerk also eine Art Grundgerüst der GBM. Wichtig ist außerdem die Erkenntnis, dass ein  $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Netzwerk stabiler gegenüber Proteasen ist und stärker kreuzvernetzt wird, als ein  $\alpha1\alpha1\alpha2$ -Kollagenetzwerk<sup>39</sup>. Ein unreifes Kollagenetzwerk kann daher einen Verlust der reifen Kollagenketten zwar strukturell, aber auf Dauer nur bedingt funktionell ersetzen.

Gemeinsam mit einem GLEPP1 KO hat das AS also den Effekt, dass es durch eine veränderte, unreifere Struktur der GBM zu einer Verschlechterung der Filterfunktion kommt. Dieser Schaden ist progredient und führt schließlich zum Nierenversagen. Neuartig und unterschiedlich zum AS ist allerdings, dass beim GLEPP1 KO initial durchaus eine reife GBM gebildet werden kann und diese dann im Laufe des Lebens zurückgebildet und zum Teil wieder durch eine unreife Architektur ersetzt wird.

### 4.3 Proteinurie

Es gibt zahlreiche Ursachen für einen Defekt des glomerulären Filterapparates, die zu einer Proteinurie führen. Im Fokus stand dabei lange Zeit der Podozyt. So führen z.B. Mutationen in Nephrin, Podocin und  $\alpha$ -Aktinin-4 zu einer Proteinurie<sup>25</sup>. Erst mit der weiteren Erforschung der genauen Zusammenhänge rückt nun mehr und mehr auch die GBM in den Vordergrund bei der Suche nach der zugrunde liegenden Pathologie einer Proteinurie<sup>72</sup>. Interessant ist dabei welche Mutationen tatsächlich einen Filterdefekt nach sich ziehen und welche Mutationen keinen Einfluss auf die Leistung des Filters haben. So lässt sich herausstellen welche Bausteine besonders essenziell für die Funktion der GBM sind.

#### 4.3.1 Kollagen IV

Mutationen der  $\alpha$ -Ketten von Kollagen IV sind in der GBM fast immer mit einem Filterdefekt assoziiert. Eine COL4A1-Mutation führt neben einer Reihe schwerer extrarenaler Manifestationen auch zu einem Defekt der GBM und einer Hämaturie<sup>62-66</sup>. Zusätzlich wurden Studien durchgeführt an Mäusen mit einem Doppelknockout der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Kette. Diese Tiere konnten initial eine normale Basalmembran bilden, verstarben aber dann ungefähr bei der Hälfte der Schwangerschaft<sup>102</sup>. Eine Mutation an den unreifen Kollagen IV Ketten führt also in jedem Fall zu einem schweren entwicklungsbedingten Defizit. Auffällig ist, dass sich die schweren Folgen eines Kollagendefekts erst im späteren Verlauf der Entwicklung zeigen. Das legt die Vermutung nahe, dass Laminin zwar am Anfang der Entwicklung für die Organisation der Basalmembran essenziell ist, aber dann im Verlauf Kollagen eine wichtige Rolle für die Integrität, Stabilität und Funktion der Membran spielt<sup>102</sup>. Modelle zu Mutationen an den reifen Kollagenketten haben gemeinsam, dass es immer zu dem Versuch kommt den Defekt mit Hilfe der unreifen Ketten zu überbrücken. So zeigen COL4A3 KO Mäuse neben dem zusätzlichen Verlust an Kollagen IV  $\alpha$ 4- und  $\alpha$ 5-Ketten, eine Retention von Kollagen IV  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Ketten<sup>69</sup>. Symptomatisch zeigt sich eine Urämie zusammen mit einer Proteinurie und histologisch eine Glomerulonephritis. Die Tiere haben dabei für zwei Monate eine normale Nierenfunktion, die dann jedoch rapide abfällt, sodass nach vier Monaten nur 5% der Mäuse überleben<sup>67,68</sup>. Veränderungen an der Kollagen IV  $\alpha$ 5-Kette sind vom x-chromosomalen Alport-Syndrom bekannt. Es kommt zuerst zu einer Hämaturie und dann progradient zu einer Proteinurie. Ebenfalls

wird versucht den Mangel an reifen Kollagennetzwerken durch die unreifen Netzwerke zu substituieren<sup>70</sup>. Es scheint also ein gängiger Mechanismus der Kompensation zu sein auf die unreifen Kollagenketten zurückzugreifen.

#### 4.3.2 Laminin

Bei Laminin sind vor allem Defekte an den reifen Ketten untersucht worden, da Schäden an den unreifen Ketten  $\alpha1\beta1\gamma1$  zu einem frühen pränatalen Tod führen. Dies unterstreicht erneut die Bedeutung von Laminin in der frühen Entwicklung, sodass überhaupt eine Grundstruktur gebildet werden kann. Mutationen an Laminin  $\alpha5$  führen zu einem Neuralrohrdefekt und einem pränatalen Tod<sup>72</sup>. Handelt es sich nur um eine hypomorphe Mutation, die zu einem reduzierten Level von Laminin  $\alpha5$  führt, kann eine GBM gebildet werden und es kommt zu einer progressiven Proteinurie und Hämaturie, die nach einem Monat im Nierenversagen enden<sup>73,103</sup>.

Eine weitere schwere Erkrankung ist das Pierson Syndrom, das assoziiert wird mit einem kongenitalen nephrotischen Syndrom in Folge einer Laminin  $\beta2$  Mutation<sup>23</sup>. Zusätzlich zeigen sich unterschiedliche okuläre und neurologische Manifestationen<sup>75,76</sup>. Anders als bei Laminin  $\alpha5$  kommt es hierbei also nicht zu einem kompletten Zusammenbruch der GBM. Es wird vermutete, dass der Mangel an Laminin  $\beta2$  durch Laminin  $\beta1$  kompensiert wird, da es eine Zwischenstufe in der Reifung von Laminin gibt, die sich aus Laminin  $\alpha5\beta1\gamma1$  zusammensetzt. Die Kompensation reicht zwar strukturell aber nicht funktionell aus, um den Defekt zu beheben<sup>76</sup>. Auch für Laminin scheint es also Mechanismen zu geben, die versuchen einen Defekt durch die Reaktivierung oder Erhaltung von unreifen Isoformen zu überbrücken.

#### 4.3.3 Nidogen und Agrin

Da Nidogen 1 und 2 in ihrer Funktion den jeweils anderen Partner ersetzen können, macht sich ein Einzel-KO nicht bemerkbar<sup>78,79</sup>. Erst bei einem Doppel-KO von Nidogen 1 und 2 zusammen kommt es zu Veränderungen in Form eines perinatalen Todes. Die Basalmembranen werden trotzdem gebildet und auch die GBM hat ein normales Erscheinungsbild<sup>80,81</sup>. Der Mangel an Nidogen 1 und 2 führt also nicht zu einem Filterdefekt<sup>81</sup>. Die Bedeutung einer Heraufregulation von Nidogen im Alter von vier Monaten lässt sich daraus nicht erklären, jedoch ist sie bis jetzt nicht mit einer

Proteinurie assoziiert worden. Denkbar wäre, dass da bereits im Alter von vier Monaten die Kollagenketten vermindert gebildet werden, kompensatorisch Nidogen hochreguliert wird, um durch mehr Quervernetzungen die Stabilität der GBM zu gewährleisten.

Entgegen der ursprünglichen Erwartungshaltung führt ein *Knockout* von Agrin zwar zu einem starken Verlust der anionischen Ladung, aber nicht zu einer Albumin- oder Proteinurie <sup>77</sup>. Die Heparansulfate scheinen also keine essenzielle Bedeutung für die Entstehung einer Proteinurie zu haben, sondern eher durch den GLEPP1 KO selbst und nicht als Reaktion auf die Proteinurie herabreguliert zu werden.

#### **4.4 Regulation der GBM Veränderungen**

Die Reifung der Kollagenketten ist ein essenzieller Schritt für die Langzeitstabilität der GBM <sup>68</sup>. Die Lamininketten hingegen bilden das Grundgerüst in einer früheren Phase der Entwicklung. Zu diesem Zeitpunkt gibt es normalerweise noch keine podozytären Fußfortsätze <sup>104</sup>. Daher ist ihre Reifung offensichtlich entscheidend für die Bildung funktioneller Fußfortsätze. Es gibt Hypothesen darüber, dass physiologischerweise in der Entwicklung erst durch den Lamininswitch der Podozyt zur Differenzierung und zum Kollagenswitch gebracht wird, die beiden Systeme also eng zusammenhängen <sup>38</sup>. Andererseits gibt es auch Ergebnisse die vermuten lassen, dass die Regulation der beiden Bausteine unabhängig voneinander ist <sup>76</sup>. Eindeutig ist in jedem Fall, dass die einzelnen Komponenten der GBM in einem engen Netzwerk arbeiten und Rückkopplungsmechanismen bestehen, die noch nicht vollständig verstanden sind. Bei einem GLEPP1 KO kommt es außerdem zuerst zu Veränderungen in Kollagen und später erst in Laminin.

Um eine Idee vom zugrundeliegenden Mechanismus der Veränderung der GBM zu bekommen, können ähnliche entwicklungsbedingte Reifungsprozesse von anderen Proteinen für Klarheit sorgen. Solche Wechsel vollziehen sich ebenfalls beim Myosin im Muskel und beim Hämoglobin. Beim Myosin findet ein Wechsel von einer embryonalen/neonatalen hin zu einer reifen/erwachsenen Form statt. Dieser Wechsel wird von extrinsischen neuronalen und hormonellen Faktoren beeinflusst <sup>105-107</sup>. Im Falle von Hämoglobin findet ein Wechsel von fetalem zu adultem Hämoglobin statt. Der Wechsel wird dabei durch Veränderungen an der Genaktivität kontrolliert <sup>108,109</sup>.

Die beiden bedeutendsten Mechanismen dabei sind die kompetitive Genaktivität und das autonome *Silencing*<sup>110</sup>. Eine kompetitive Genaktivität bedeutet, dass zwei Gene über eine *locus control region* (LCR) miteinander verknüpft werden und es so immer nur zu Aktivierung einer der beiden Gene kommen kann<sup>109,111</sup>. Unter dem autonomen *Silencing* versteht man das Ausschalten eines Genes ohne die Fremdeinwirkung anderer Gene, d.h. alle nötigen Faktoren sind in dem Gen selbst oder in den angrenzenden Gensequenzen enthalten<sup>112-114</sup>. Ähnliche Mechanismen könnten dem entwicklungsbedingten Reifungsswitch der GBM zugrunde liegen. Vor allem für Laminin scheint der Mechanismus der kompetitiven Genaktivität wahrscheinlich, da sich die Reifung sehr abrupt vollzieht<sup>38</sup>. Zum genaueren Verständnis sind weitere genomische Studien nötig, sodass sich erklären lässt wie sich der Wechsel umkehren lässt und es zur Rückbildung der unreifen Konfiguration der GBM kommt.

Alle genannten Proteinreifungsprozesse haben nämlich gemeinsam, dass es im Fall eines Schadens an den reifen Formen zu einer Reexpression der unreifen Formen kommen kann. Regenerierende Muskelfasern bilden während der Reparatur unreifes Myosin, um den Schaden zu beheben<sup>115,116</sup>. Fetales Hämoglobin kann ebenfalls im Rahmen von Erkrankungen mit Hilfe unterschiedlicher Stimulantien reexprimiert werden<sup>117-119</sup>. Genauso wie in diesen beiden Beispielen zeigt die GBM eine Reaktivierung von unreifen Kollagen- und Lamininketten im Falle einer Beschädigung des Filters.

Auf der Suche nach einem ähnlichen Mechanismus, der an dieser Reaktivierung beteiligt sein könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit das WT1-Gen genauer untersucht.

#### 4.4.1 WT1

Beim Wilms' Tumor *suppressor gene* (WT1) handelt es sich um den essenziellen Regulator der embryonalen Nierenentwicklung<sup>120,121</sup>. Zellen, in denen WT1 über die Embryonalentwicklung hinaus erhalten bleibt, wie zum Beispiel dem Podozyten, können potenziell zwischen einem mesenchymalen und einem epithelialen Zellstatus wechseln<sup>122,123</sup>. Ein WT1-Knockout bei Mäusen führt zu einem frühzeitigen Versterben in der Embryonalphase an multiplem Organversagen<sup>90</sup>. Außerdem gibt es eine Vielzahl an Mutationen, die entweder mit einer gestörten Entwicklung oder mit der Entstehung von Tumoren assoziiert sind<sup>124,125</sup>. Bei einem GLEPP1 KO zeigt sich eine niedrigere

Expression von WT1. Dabei zeigen sich keine offensichtlichen entwicklungsinduzierten oder tumorösen Veränderungen wie bei einer WT1-Mutation. Die Herabregulation scheint also erst postnatal und nicht bereits während der Entwicklung zum Tragen zu kommen. In Modellen zur Untersuchung der Genexpression vor dem Eintritt einer Proteinurie konnte bereits gezeigt werden, dass es zu einer kombinierten Herabregulation von WT1 und GLEPP1 kommt, im Falle einer Proteinurie <sup>88</sup>. Ein weiterer wichtiger Schlüsselfaktor, um die Beziehung zwischen den beiden Komponenten genauer zu verstehen, könnte der Zusammenhang zwischen WT1 und Kollagen IV  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  sein. In Sertolizellen im Hoden von Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine WT1-Defizienz zu einer Herabregulation der unreifen Kollagen IV-Ketten führt <sup>89</sup>. Die Expression aller anderen Kollagenketten war nicht beeinflusst. Im Hoden spielt WT1 vor allem eine wichtige Rolle beim Erhalt der Integrität des zellulären Gerüsts. Unter der Annahme, dass sich diese Ergebnisse aus der testikulären Basallamina auch auf die GBM der Niere übertragen lassen, ergeben sich einige Hypothesen:

1. Im Alter von vier Monaten macht sich der GLEPP1 KO bemerkbar. Der Podozyt ändert sein Expressionsverhalten und es kommt zu einer Herabregulation von WT1, die eine Herabregulation der unreifen Kollagenketten mit sich bringt. Zusätzlich muss es einen Mechanismus geben, der anders als im Hoden zu einer Herabregulation der reifen Kollagenketten führt, z.B. auf Grund eines Podozytenschadens.
2. Im Altersverlauf werden nun immer mehr unreife Kollagenketten gebildet, obwohl das Expressionslevel von WT1 immer weiter abfällt. Möglicherweise versucht der Podozyt also das erhöhte Vorkommen der unreifen Ketten durch eine weitere Verminderung von WT1 zu verändern.
3. Weiterführend muss es entweder zu einer Entkopplung von WT1 und den Kollagenketten IV  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  kommen, da im Alter von zehn Monaten eine Herabregulation von WT1 nicht mehr mit einer Herabregulation der unreifen Kollagenketten einhergeht, oder die unreifen Ketten werden aus einer anderen Quelle z.B. dem Endothel synthetisiert und sind daher nicht mehr von WT1-abhängig.

All diese Hypothesen haben gemeinsam, dass die Bedeutung einer GLEPP1-Mutation vor allem im Verlauf der Entwicklung, also offensichtlich bei der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere, zum Tragen kommt. Ebenfalls dafür spricht, dass mit der Zeit die Größe des Podozytenschadens immer weiter zunimmt. Ob nun WT1 eine ähnlich zentrale Rolle wie z.B. die LCR beim Hämoglobin-*Switch* einnimmt, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sagen. Fest steht jedoch, dass es eine Assoziation zwischen GLEPP1 und WT1 gibt, die an der Rückbildung der unreifen Kollagenketten beteiligt sein könnte.

#### **4.5 Limitationen der Arbeit**

Wieso es endgültig zum *Switch* von einer reifen zu einer unreifen GBM kommt, lässt sich mit den bis jetzt gewonnenen Informationen nicht klären.

Methodisch lässt sich an dieser Arbeit kritisieren, dass die Versuche mit einem höheren n-Wert reproduziert werden müssten, um eventuelle Ausreißer zu berücksichtigen. Durch die unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten während der Mausoperationen könnte es daher auch bei striktem Befolgen des Protokolls, abhängig vom Verlauf der Operation, zu kleineren Abweichungen kommen. Ein weiteres Problem könnte der Bezug von Laminin auf Nidogen, als Ladungskontrolle im Westernblot, im Alter von vier Monaten sein, da Nidogen in den KO-Mäusen auf RNA-Ebene verstärkt exprimiert war. Diese Aussagekraft ist allerdings beschränkt solange die RNA-Ergebnisse nicht auf Proteinebene bestätigt werden.

Um dem Schlüsselmechanismus hinter dem *Switch* weiter näher zu kommen, bedarf es weiterer auch zellbasierter Versuchsreihen. Interessant wäre außerdem eine Untersuchung von Tieren nach den zehn Monaten z.B. nach zwölf Monaten oder auch vor dem beobachteten Zeitraum während der Embryonalphase, um den genauen Zeitpunkt, an dem die GLEPP1-Mutation zum Tragen kommt, zu bestimmen. Im Rahmen von Zellversuchen wäre es von Bedeutung zu untersuchen wie sich die Syntheseleistung des Podozyten ohne GLEPP1 verhält. Ein weiterer Aspekt wäre die Untersuchung des bis jetzt außer Acht gelassenen Endothels, da dieses auch einen Anteil an der Synthese der unreifen Ketten hat. Möglicherweise kann das Endothel auch einen Impuls zum *Switch* liefern. Bereits im Fokus dieser Arbeit liegt die Expression von WT1 und auch hierzu könnten weitere Zellversuche durchgeführt werden, um ein

genaueres Verständnis vom Zusammenhang zwischen GLEPP1 und WT1 zu bekommen.

Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen wäre es von Interesse, ob die gefundenen Veränderungen von der Genexpression oder den Proteinen abhängig sind. Dazu könnte man untersuchen wie sich die Niere entwickelt, sollte man eine GLEPP1 KO Niere in eine gesunde Maus transplantieren. Ähnliches wurde bereits für einen Laminin  $\alpha 5$  KO untersucht, mit dem Ergebnis, dass sich ein *Hybrid* Glomerulum bildet, das sich aus gesunden Endothelzellen und mutierten Podozyten zusammensetzt<sup>126</sup>. Auch auf Grund der Tatsache, dass eine Transplantation bei einer GLEPP1 Mutation offensichtlich zu keinem Rückfall mehr führt<sup>24</sup>, wäre es von Bedeutung zu untersuchen ob sich dabei auch ein *Hybrid* Glomerulum bildet und welcher der beiden Produzenten der GBM davon betroffen ist.

## 5 Schlussfolgerung

Ein GLEPP1 KO führt zu einer Proteinurie bei alternden Mäusen. Als Korrelat dieser Proteinurie kommt es zu anatomischen und funktionellen Veränderungen in der Architektur der GBM. Diese Änderungen resultieren in einer Reexpression von unreifer GBM, die zwar bedingt strukturell, aber nicht funktionell die physiologische GBM ersetzen kann. Dabei wird zuerst im Alter von sechs Monaten unreifes Kollagen IV gebildet und erst im Alter von zehn Monaten dann auch unreifes Laminin. Der genaue Mechanismus konnte bis jetzt nicht geklärt werden, allerdings scheint es eine Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor WT1 zu geben.

An die Aufschlüsselung des Mechanismus könnte für betroffene Patienten eine frühzeitige kausale Therapie geknüpft werden. Möglicherweise ist die Reexpression von unreifer GBM bei der Maus ein protektiver Mechanismus, der beim Menschen bisher nur beim AS bei Fehlen einer der reifen Kollagen IV Ketten beobachtet worden ist. Bei Patienten mit idiopathischen nephrotischen Syndrom sollte auf homozygote Mutationen im GLEPP1 Gen untersucht werden.

Als langfristiges Ziel gilt also die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen. Bis jetzt scheint die Transplantation, die einzige Behandlungsoption zu sein.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Collins, A. J. *et al.* Who Should Be Targeted for CKD Screening? Impact of Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease. *Am. J. Kidney Dis.* 53, S71–S77 (2009).
2. Jahresberichte - Bundesverband Niere e.V. - QuaSi-Niere-Bericht\_2006-2007.pdf, Seite 40 Abbildung 32. Verfügbar unter: [http://www.bundesverband-niere.de/fileadmin/user\\_upload/QuaSi-Niere-Bericht\\_2006-2007.pdf](http://www.bundesverband-niere.de/fileadmin/user_upload/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf). bezogen am 6. Dezember 2016
3. Jahresberichte - Bundesverband Niere e.V. - QuaSi-Niere-Bericht\_2006-2007.pdf, Seite 33 Tabelle 22. Verfügbar unter: [http://www.bundesverband-niere.de/fileadmin/user\\_upload/QuaSi-Niere-Bericht\\_2006-2007.pdf](http://www.bundesverband-niere.de/fileadmin/user_upload/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf). bezogen am 6. Dezember 2016
4. Sampson, M. G., Hodgin, J. B. & Kretzler, M. Defining nephrotic syndrome from an integrative genomics perspective. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 30, 51–63 (2015).
5. Trautmann, A. *et al.* Spectrum of Steroid-Resistant and Congenital Nephrotic Syndrome in Children: The PodoNet Registry Cohort. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 10, 592–600 (2015).
6. Ranganathan, S. Pathology of Podocytopathies Causing Nephrotic Syndrome in Children. *Front. Pediatr.* 4, (2016).
7. Orth, S. R. & Ritz, E. The Nephrotic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 338, 1202–1211 (1998).

8. Banh, T. H. M. *et al.* Ethnic Differences in Incidence and Outcomes of Childhood Nephrotic Syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* (2016). doi:10.2215/CJN.00380116
9. Nephrologie, A. für P. SHORT VERSUS STANDARD PREDNISONE THERAPY FOR INITIAL TREATMENT OF IDIOPATHIC NEPHROTIC SYNDROME IN CHILDREN. *The Lancet* 331, 380–383 (1988).
10. Primary nephrotic syndrome in children: clinical significance of histopathologic variants of minimal change and of diffuse mesangial hypercellularity. A Report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int.* 20, 765–771 (1981).
11. Lovric, S., Ashraf, S., Tan, W. & Hildebrandt, F. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 31, 1802–1813 (2016).
12. Sadowski, C. E. *et al.* A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26, 1279–1289 (2015).
13. Tryggvason, K., Patrakka, J. & Wartiovaara, J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N. Engl. J. Med.* 354, 1387–1401 (2006).
14. Tryggvason, K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10, 2440–2445 (1999).
15. Tryggvason, K. & Wartiovaara, J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10, 543–549 (2001).
16. Tsukaguchi, H. *et al.* NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J. Clin. Invest.* 110, 1659–1666 (2002).

17. Kestilä, M. *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin-  
-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1, 575–582 (1998).
18. Niaudet, P. & Gubler, M.-C. WT1 and glomerular diseases. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 21, 1653–1660 (2006).
19. Ruf, R. G. *et al.* Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with  
steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 66, 564–570  
(2004).
20. Denamur, E. *et al.* WT1 splice-site mutations are rarely associated with primary  
steroid-resistant focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 57, 1868–  
1872 (2000).
21. Aucella, F. *et al.* WT1 mutations in nephrotic syndrome revisited. High prevalence  
in young girls, associations and renal phenotypes. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 21,  
1393–1398 (2006).
22. Hinkes, B. *et al.* Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a  
nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat. Genet.* 38, 1397–1405  
(2006).
23. Zenker, M. *et al.* Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis  
with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 13,  
2625–2632 (2004).
24. Ozaltin, F. *et al.* Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic  
syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 139–147 (2011).
25. Hamano, Y. *et al.* Determinants of Vascular Permeability in the Kidney  
Glomerulus. *J. Biol. Chem.* 277, 31154–31162 (2002).
26. Kerjaschki, D. Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial  
cell (podocytes) in glomerular diseases. *Kidney Int.* 45, 300–313 (1994).

27. White, K. E. Research into the structure of the kidney glomerulus – making it count. *Micron* 43, 1001–1009 (2012).
28. Kerjaschki, D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest.* 108, 1583–1587 (2001).
29. Kojima, K. *et al.* Podocyte flattening and disorder of glomerular basement membrane are associated with splitting of dystroglycan-matrix interaction. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15, 2079–2089 (2004).
30. Dane, M. J. C. *et al.* Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *Am. J. Pathol.* 182, 1532–1540 (2013).
31. Borza, D.-B. Glomerular basement membrane heparan sulfate in health and disease: A regulator of local complement activation. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* (2016). doi:10.1016/j.matbio.2016.09.002
32. Pullman, J. M. *et al.* Visualization of podocyte substructure with structured illumination microscopy (SIM): a new approach to nephrotic disease. *Biomed. Opt. Express* 7, 302–311 (2016).
33. Huber, T. B. & Benzing, T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 211–216 (2005).
34. Birn, H. & Christensen, E. I. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int.* 69, 440–449 (2006).
35. Carter, D. C. *et al.* Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 244, 1195–1198 (1989).
36. Pollak, M. R., Quaggin, S. E., Hoenig, M. P. & Dworkin, L. D. The Glomerulus: The Sphere of Influence. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1461–1469 (2014).
37. Timpl, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 180, 487–502 (1989).

38. Abrahamson, D. R., St. John, P. L., Stroganova, L., Zelenchuk, A. & Steenhard, B. M. Laminin and Type IV Collagen Isoform Substitutions Occur in Temporally and Spatially Distinct Patterns in Developing Kidney Glomerular Basement Membranes. *J. Histochem. Cytochem.* 61, 706–718 (2013).
39. Miner, J. H. The glomerular basement membrane. *Exp. Cell Res.* 318, 973–978 (2012).
40. Hudson, B. G. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15, 2514–2527 (2004).
41. Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. & Kühn, K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.* 120, 203–211 (1981).
42. Yurchenco, P. D. & Ruben, G. C. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J. Cell Biol.* 105, 2559–2568 (1987).
43. Mak, K. M. & Mei, R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anat. Rec.* 300, 1371–1390 (2017).
44. Kalluri, R., Shield, C. F., Todd, P., Hudson, B. G. & Neilson, E. G. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J. Clin. Invest.* 99, 2470–2478 (1997).
45. Miner, J. H. *et al.* The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J. Cell Biol.* 137, 685–701 (1997).

46. Chen, Y. M. & Miner, J. H. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 160, 291–297 (2012).
47. Suleiman, H. *et al.* Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *eLife* 2, (2013).
48. Reeves, W. H., Kanwar, Y. S. & Farquhar, M. G. Assembly of the glomerular filtration surface. Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat kidney. *J. Cell Biol.* 85, 735–753 (1980).
49. Groffen, A. J. *et al.* Agrin Is a Major Heparan Sulfate Proteoglycan in the Human Glomerular Basement Membrane. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 19–27 (1998).
50. Fox, J. W. *et al.* Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* 10, 3137–3146 (1991).
51. Abrahamson, D. R., Hudson, B. G., Stroganova, L., Borza, D.-B. & St John, P. L. Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 1471–1479 (2009).
52. Saus, J., Wieslander, J., Langeveld, J. P., Quinones, S. & Hudson, B. G. Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J. Biol. Chem.* 263, 13374–13380 (1988).
53. Butkowski, R. J., Langeveld, J. P., Wieslander, J., Hamilton, J. & Hudson, B. G. Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* 262, 7874–7877 (1987).
54. Kluth, D. C. & Rees, A. J. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2446–2453 (1999).
55. Gunwar, S., Saus, J., Noelken, M. E. & Hudson, B. G. Glomerular basement membrane. Identification of a fourth chain, alpha 4, of type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 265, 5466–5469 (1990).

56. Hostikka, S. L. *et al.* Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1606–1610 (1990).
57. Barker, D. F. *et al.* Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 248, 1224–1227 (1990).
58. Hudson, B. G., Reeders, S. T. & Tryggvason, K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Biol. Chem.* 268, 26033–26036 (1993).
59. Savige, J. Alport syndrome: its effects on the glomerular filtration barrier and implications for future treatment. *J. Physiol.* 592, 4013–4023 (2014).
60. Zhou, J., Ding, M., Zhao, Z. & Reeders, S. T. Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *J. Biol. Chem.* 269, 13193–13199 (1994).
61. Oohashi, T., Ueki, Y., Sugimoto, M. & Ninomiya, Y. Isolation and structure of the COL4A6 gene encoding the human alpha 6(IV) collagen chain and comparison with other type IV collagen genes. *J. Biol. Chem.* 270, 26863–26867 (1995).
62. Plaisier, E. *et al.* Novel COL4A1 mutations associated with HANAC syndrome: a role for the triple helical CB3[IV] domain. *Am. J. Med. Genet. A.* 152A, 2550–2555 (2010).
63. Plaisier, E. *et al.* COL4A1 mutations and hereditary angiopathy, nephropathy, aneurysms, and muscle cramps. *N. Engl. J. Med.* 357, 2687–2695 (2007).

64. Gould, D. B. *et al.* Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science* 308, 1167–1171 (2005).
65. Gould, D. B. *et al.* Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N. Engl. J. Med.* 354, 1489–1496 (2006).
66. Van Agtmael, T. *et al.* Dominant mutations of Col4a1 result in basement membrane defects which lead to anterior segment dysgenesis and glomerulopathy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3161–3168 (2005).
67. Miner, J. H. & Sanes, J. R. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J. Cell Biol.* 135, 1403–1413 (1996).
68. Harvey, S. J. *et al.* Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int.* 54, 1857–1866 (1998).
69. Cosgrove, D. *et al.* Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev.* 10, 2981–2992 (1996).
70. Kashtan, C. E. & Kim, Y. Distribution of the alpha 1 and alpha 2 chains of collagen IV and of collagens V and VI in Alport syndrome. *Kidney Int.* 42, 115–126 (1992).
71. Jarad, G., Cunningham, J., Shaw, A. S. & Miner, J. H. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*<sup>-/-</sup> mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J. Clin. Invest.* 116, 2272–2279 (2006).
72. Miner, J. H. & Li, C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev. Biol.* 217, 278–289 (2000).

73. Shannon, M. B., Patton, B. L., Harvey, S. J. & Miner, J. H. A hypomorphic mutation in the mouse laminin alpha5 gene causes polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17, 1913–1922 (2006).
74. Pierson, M., Cordier, J., Hervouuet, F. & Rauber, G. [AN UNUSUAL CONGENITAL AND FAMILIAL CONGENITAL MALFORMATIVE COMBINATION INVOLVING THE EYE AND KIDNEY]. *J. Genet. Hum.* 12, 184–213 (1963).
75. Matejas, V. *et al.* Mutations in the Human Laminin  $\beta$ 2 (LAMB2) Gene and the Associated Phenotypic Spectrum. *ResearchGate* 31, 992–1002 (2010).
76. Noakes, P. G. *et al.* The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin  $\beta$ 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin  $\beta$ 1. *Nat. Genet.* 10, 400–406 (1995).
77. Harvey, S. J. *et al.* Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *Am. J. Pathol.* 171, 139–152 (2007).
78. Murshed, M. *et al.* The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7007–7012 (2000).
79. Schymeinsky, J. *et al.* Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6820–6830 (2002).
80. Miosge, N., Sasaki, T. & Timpl, R. Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 21, 611–621 (2002).

81. Bader, B. L. *et al.* Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6846–6856 (2005).
82. Thomas, P. E. *et al.* GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J. Biol. Chem.* 269, 19953–19962 (1994).
83. Wiggins, R. C., Wiggins, J. E., Goyal, M., Wharram, B. L. & Thomas, P. E. Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13. *Genomics* 27, 174–181 (1995).
84. Sharif, K., Goyal, M., Kershaw, D., Kunkel, R. & Wiggins, R. Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of GLEPP1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CNF, and FSGS. A dedifferentiation hypothesis for the nephrotic syndrome. *Exp. Nephrol.* 6, 234–244 (1998).
85. Tian, J., Wang, H. P., Mao, Y. Y., Jin, J. & Chen, J. H. Reduced glomerular epithelial protein 1 expression and podocyte injury in immunoglobulin A nephropathy. *J. Int. Med. Res.* 35, 338–345 (2007).
86. Kim, Y. H. *et al.* GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptpro) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. *Nephron* 90, 471–476 (2002).
87. Wharram, B. L. *et al.* Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J. Clin. Invest.* 106, 1281–1290 (2000).

88. Clement, L. C. *et al.* Early changes in gene expression that influence the course of primary glomerular disease. *Kidney Int.* 72, 337–347 (2007).
89. Chen, S.-R. *et al.* The Wilms tumor gene, Wt1, maintains testicular cord integrity by regulating the expression of Col4a1 and Col4a2. *Biol. Reprod.* 88, 56 (2013).
90. Kreidberg, J. A. *et al.* WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679–691 (1993).
91. Miner, J. H. & Sanes, J. R. Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J. Cell Biol.* 127, 879–891 (1994).
92. Miner, J. H. Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7, 13–19 (1998).
93. Torricelli, A. A. M. *et al.* Epithelial basement membrane proteins perlecan and nidogen-2 are up-regulated in stromal cells after epithelial injury in human corneas. *Exp. Eye Res.* 134, 33–38 (2015).
94. Lee, N. E. *et al.* Gene expression changes in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Korean J. Ophthalmol. KJO* 25, 42–47 (2011).
95. Kanwar, Y. S., Danesh, F. R. & Chugh, S. S. Contribution of proteoglycans towards the integrated functions of renal glomerular capillaries: a historical perspective. *Am. J. Pathol.* 171, 9–13 (2007).
96. Couser, W. G. & Nangaku, M. Cellular and molecular biology of membranous nephropathy. *J. Nephrol.* 19, 699–705 (2006).
97. Goldberg, S., Harvey, S. J., Cunningham, J., Tryggvason, K. & Miner, J. H. Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 24, 2044–2051 (2009).

98. Charba, D. S. *et al.* Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb)). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297, F138-144 (2009).
99. Ishola, D. A. *et al.* In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 21, 591–597 (2006).
100. Chen, B. & Bixby, J. L. A Novel Substrate of Receptor Tyrosine Phosphatase PTPRO Is Required for Nerve Growth Factor-Induced Process Outgrowth. *J. Neurosci.* 25, 880–888 (2005).
101. Beltran, P. J., Bixby, J. L. & Masters, B. A. Expression of PTPRO during mouse development suggests involvement in axonogenesis and differentiation of NT-3 and NGF-dependent neurons. *J. Comp. Neurol.* 456, 384–395 (2003).
102. Pöschl, E. *et al.* Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1619–1628 (2004).
103. Goldberg, S., Adair-Kirk, T. L., Senior, R. M. & Miner, J. H. Maintenance of glomerular filtration barrier integrity requires laminin alpha5. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21, 579–586 (2010).
104. St John, P. L. & Abrahamson, D. R. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int.* 60, 1037–1046 (2001).
105. Butler-Browne, G. S., Herlicoviez, D. & Whalen, R. G. Effects of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle. *FEBS Lett.* 166, 71–75 (1984).

106. Gambke, B., Lyons, G. E., Haselgrove, J., Kelly, A. M. & Rubinstein, N. A. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.* 156, 335–339 (1983).
107. Russell, S. D., Cambon, N., Nadal-Ginard, B. & Whalen, R. G. Thyroid hormone induces a nerve-independent precocious expression of fast myosin heavy chain mRNA in rat hindlimb skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 263, 6370–6374 (1988).
108. Jane, S. M. & Cunningham, J. M. Molecular mechanisms of hemoglobin switching. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 1197–1209 (1996).
109. Orkin, S. H. Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur. J. Biochem.* 231, 271–281 (1995).
110. Stamatoyannopoulos, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 33, 259 (2005).
111. Enver, T. *et al.* Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature* 344, 309–313 (1990).
112. Raich, N. *et al.* Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. *Science* 250, 1147–1149 (1990).
113. Shih, D. M., Wall, R. J. & Shapiro, S. G. Developmentally regulated and erythroid-specific expression of the human embryonic beta-globin gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 18, 5465–5472 (1990).
114. Dillon, N. & Grosveld, F. Human gamma-globin genes silenced independently of other genes in the beta-globin locus. *Nature* 350, 252–254 (1991).
115. Sartore, S., Gorza, L. & Schiaffino, S. Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle. *Nature* 298, 294–296 (1982).

116. Esser, K., Gunning, P. & Hardeman, E. Nerve-dependent and -independent patterns of mRNA expression in regenerating skeletal muscle. *Dev. Biol.* 159, 173–183 (1993).
117. DeSimone, J., Heller, P., Hall, L. & Zwiers, D. 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 4428–4431 (1982).
118. Ley, T. J. *et al.* 5-azacytidine selectively increases gamma-globin synthesis in a patient with beta<sup>+</sup> thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 307, 1469–1475 (1982).
119. Perrine, S. P. *et al.* Sodium butyrate enhances fetal globin gene expression in erythroid progenitors of patients with Hb SS and beta thalassemia. *Blood* 74, 454–459 (1989).
120. Mrowka, C. & Schedl, A. Wilms' Tumor Suppressor Gene WT1 From Structure to Renal Pathophysiologic Features. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, S106–S115 (2000).
121. Pritchard-Jones, K. *et al.* The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346, 194–197 (1990).
122. Grubb, G. R., Yun, K., Williams, B. R., Eccles, M. R. & Reeve, A. E. Expression of WT1 protein in fetal kidneys and Wilms tumors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 71, 472–479 (1994).
123. Rauscher, F. J. The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J.* 7, 896–903 (1993).
124. Iijima, K. *et al.* Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele. *Pediatrics* 129, e1621-1625 (2012).

125. Guo, J.-K. *et al.* WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 11, 651–659 (2002).
126. Abrahamson, D. R., St John, P. L., Isom, K., Robert, B. & Miner, J. H. Partial rescue of glomerular laminin alpha5 mutations by wild-type endothelia produce hybrid glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 2285–2293 (2007).

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Freunden, Mitarbeitern und Unterstützern bedanken, die mir überhaupt erst ermöglicht haben diese Arbeit anzufertigen. Herr Prof. Sellin möchte ich für die Bereitstellung des Themas danken. Ein besonders großer Dank geht an Eva Königshausen, ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können. Du hast mich jederzeit mit Wort und Tat unterstützt und mich auch nach meinen ersten Western-Blots nicht aufgegeben. Außerdem möchte ich natürlich dem gesamten Laborteam der Nephrologie danken, allen voran Nicola, Christina und Blanca. Es war jeden Tag eine große Freude mit euch zusammenarbeiten zu dürfen. Danke dafür, dass ihr mich so herzlich in euer Labor aufgenommen habt.

Von meinen Freunden möchte ich mich vorallem bei Christian Weigel bedanken. Ich kann nicht in Worte fassen wie dankbar ich für deine Freundschaft, Unterstützung und Nachsicht mit mir bin. Ohne dich würde es diese Arbeit hier nicht geben. Julius und Moritz danke ich für die zahlreichen Whirlpoolabende nach dem ein oder anderen Labortag, um mich wieder runterzuholen.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Biologielehrerin Frau Shirin Merchak, durch die ich überhaupt erst diesen Weg eingeschlagen habe.

Entschuldigen möchte ich mich zusätzlich bei allen Mäusen, die im Rahmen dieser Arbeit leider verstorben sind. Euer Tod ist nicht umsonst gewesen.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mich immer beim Erreichen aller meiner Ziele unterstützen und mir dieses Studium erst ermöglicht haben. Ich liebe euch.