

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle der Proteinendozytose bei der Pathogenese der  
tubulointerstitiellen Nierenerkrankung in der  
Megalin-teildefizienten Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Timo Mika Jerichow

aus Hamburg

Gutachter:       1. Prof. Dr. S. Bachmann  
                      2. Prof. Dr. med. E. Tamm  
                      3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Oppert

Datum der Promotion: 08. April 2011

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Medizinische und gesellschaftliche Aspekte der chronischen Niereninsuffizienz in Deutschland.....	1
1.2 Mechanismen der renalen Schädigung.....	2
1.2.1 Glomeruläre Schädigung.....	2
1.2.2 Entstehung und Progression der tubulointerstitiellen Schädigung.....	3
1.2.2.1 Fehlgeleitete Filtration .....	3
1.2.2.2 Obstruktion des tubulären Lumens.....	4
1.2.2.3 Tubuläre Resorption filtrierter Proteine.....	5
1.2.2.4 Tubuläre Ischämie .....	6
1.3 Der Megalin-Rezeptor .....	7
1.3.1 Molekulare Struktur des Megalin-Rezeptors.....	7
1.3.2 Funktion des Megalin-Rezeptors .....	8
1.4 Die Megalin-defiziente Maus.....	10
1.4.1 Die Megalin <sup>-/-</sup> Maus .....	10
1.4.2 Die Megalin <sup>lox/lox</sup> apoE-Cre Maus.....	11
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	14
<b>3. Material und Methoden</b> .....	16
3.1 Versuchstiere .....	16
3.2 Versuchsdurchführung .....	16
3.2.1 Immunisierung und Induktion der Glomerulonephritis .....	16
3.2.2 Urinanalyse .....	17
3.2.3 Perfusionsfixierung und Gewebereinbettung .....	17
3.3 Morphologische Analyse .....	18
3.3.1 Gewebeaufbereitung für die Lichtmikroskopie.....	18
3.3.2 Gewebeaufbereitung für die Elektronenmikroskopie .....	19
3.3.3 Histopathologische Beurteilung.....	20
3.4 Immunhistochemie .....	23
3.4.1 Primärantikörper.....	23

3.4.2 Fluoreszenzmarkierung .....	24
3.4.3 PAP-Färbung.....	25
3.4.4 Silberverstärkte Goldmarkierung .....	26
3.5 TUNEL-Färbung.....	26
3.6 In situ-Hybridisierung .....	27
3.6.1 Transformation der cDNA.....	27
3.6.2 Präparation der cDNA .....	27
3.6.3 In vitro-Transkription.....	29
3.6.4 Hybridisierung der RNA-Sonden .....	29
3.6.5 Sonden-Detektion mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper .....	30
3.7 Statistische Auswertung.....	31
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
4.1 Verifizierung des Modells .....	32
4.1.1 Expressionsmuster von Megalin in Cre(+) Mäusen .....	32
4.1.2 Funktionelle Aspekte der Glomerulonephritis-Induktion .....	33
4.2 Urinanalyse .....	35
4.3 Histopathologische Auswertung .....	38
4.3.1 Lichtmikroskopische Auswertung .....	38
4.3.2 Elektronenmikroskopische Auswertung.....	42
4.4 Immunhistochemische Auswertung.....	46
4.4.1 Adhäsionsmoleküle .....	47
4.4.1.1 Inter Cellular Adhesion Molecule-1 .....	47
4.4.1.2 Vascular Adhesion Molecule-1 .....	49
4.4.2 Zytokine.....	50
4.4.2.1 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 und - $\beta$ 3 .....	50
4.4.2.2 Endothelin-1 .....	52
4.4.3 Zelluläre Stressproteine.....	52
4.4.3.1 Osteopontin .....	52
4.4.3.2 Hitzeschockprotein 25 .....	53
4.4.4 Apoptose .....	54
4.4.5 Proliferation .....	55
4.5 Fibrose und interstitielle Makrophagen-Immigration .....	57

<b>5. Diskussion</b> .....	60
5.1 Das Modell der RPGN in der Maus mit nierenspezifischer Megalindefizienz.....	60
5.2 Die Aufhebung der Proteinresorption in Megalin-defizienten proximalen Tubuli verhindert nicht die Ausbildung der tubulointerstitiellen Fibrose .....	63
5.3 Expression immunmodulatorischer Mediatoren in Folge der übermäßigen Proteinendozytose durch den proximalen Tubulus.....	67
5.3.1 TGF- $\beta$ .....	68
5.3.2 ICAM-1, VCAM-1 und ET-1 .....	69
5.3.3 Hitzeschockprotein 25 und Osteopontin .....	71
5.4 Einfluss der Proteinendozytose auf Apoptose und Proliferation der Zellen des proximalen Tubulus .....	72
5.5 Schlussfolgerung.....	73
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	75
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	77
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	79
<b>9. Anhang</b> .....	88
9.1 Danksagung .....	88
9.2 Ehrenwörtliche Erklärung .....	89
9.3 Publikationsverzeichnis.....	90
9.4 Curriculum Vitae.....	91

# 1. Einleitung

## 1.1 Medizinische und gesellschaftliche Aspekte der chronischen Niereninsuffizienz in Deutschland

Seit 1997 hat die Inzidenz der dialysepflichtigen Niereninsuffizienz in der Bevölkerung jährlich um ca. 5% zugenommen. Ursächlich für diesen deutlichen Anstieg sind, neben der veränderten Altersstruktur der Gesamtbevölkerung mit einem größeren Anteil älterer Menschen, die steigende Zahl von Patienten mit Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie als renale Risikofaktoren. Zum Jahreswechsel 2006/2007 wurden mehr als 66500 Patienten im chronischen Dialyseprogramm behandelt. 2006 wurden 2776 Nieren transplantiert, 2824 Patienten wurden erstmalig auf die Warteliste gesetzt. Damit blieb 2006 die Anzahl von 8.473 Patienten auf der Warteliste für eine Transplantation nahezu konstant. Die durchschnittliche Wartezeit für eine Nierentransplantation beträgt zurzeit 40 Monate und ist damit etwa vierfach so lang wie die Wartezeit für eine Herztransplantation (6-12 Monate) oder eine Lebertransplantation (10 Monate) (Frei, U., Schober-Halstenberg, H.-J.: Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere Jahresbericht 2006/2007).

Neben dem erheblichen Verlust an Lebensqualität, den die dialysepflichtige Niereninsuffizienz für die betroffenen Patienten bedeutet, stellt die chronische Dialysetherapie einen erheblichen Kostenfaktor für das Gesundheitssystem dar. Die Behandlung eines Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz kostet in Deutschland jährlich im Mittel etwa 57.000 Euro (Ray et al. 2005). Dadurch wird das Gesundheitssystem pro Jahr mit Ausgaben in Höhe von etwa 3,5 Milliarden Euro belastet. Intensive Forschung auf dem Gebiet der progredienten Niereninsuffizienz mit dem Ziel der Entwicklung neuer Therapiestrategien ist daher nicht nur für den einzelnen Patienten, sondern auch aus gesundheitsökonomischer Sicht von großer Bedeutung.

## 1.2 Mechanismen der renalen Schädigung

### 1.2.1 Glomeruläre Schädigung

Ausgangspunkt aller Glomerulonephritiden (GN) ist die Schädigung des glomerulären Filters durch zirkulierende Immunkomplexe, Antikörper oder Toxine. Glomerulär gebundene Immunglobuline bewirken die Aktivierung des Komplementsystems mit Bildung des C5b-9 Membran-Lysekomplexes. Die Schädigung der Zellmembran durch aktiviertes Komplement führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Proteasen und des Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) durch die Epithelzellen des Glomerulums (Couser 1998). Des Weiteren werden Leukozyten über Bindung an Fc-Rezeptoren gebundener Immunglobuline aktiviert und sezernieren inflammatorische und chemotaktische Zytokine (Tarzi und Cook 2003). In Folge dieser inflammatorischen Stimuli kommt es zu einer Schädigung der glomerulären Kapillaren und einer Proliferation der Mesangiumzellen. Zudem kann es durch Schädigung der Podozyten zur Ausbildung von Zellbrücken mit Anhaftung des glomerulären Kapillarknäuels an das Epithel der Bowman-Kapsel kommen. Das Resultat ist eine Sklerosierung des Glomerulums. Das entscheidende pathophysiologische Ereignis im Rahmen dieser Entzündungsreaktion scheint eine Degeneration der Podozyten mit der Folge einer erhöhten Durchlässigkeit des glomerulären Filters für hochmolekulare Proteine zu sein (Kriz und LeHir 2005).

In tierexperimentellen Studien, unter anderem an Ratten mit 5/6 Nephrektomie, konnte gezeigt werden, dass es durch die Reduktion der Anzahl funktionsfähiger Nephrone in noch intakten Glomeruli zu einer kompensatorischen Zunahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) kommt. Der erhöhte intraglomeruläre Druck mit konsekutiver Hyperfiltration begünstigt die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und führt zum Untergang weiterer Nephrone (sog. Overload- oder Brenner-Hypothese) (Hostetter et al. 1981; Kriz und LeHir 2005). Der erhöhte intraglomeruläre Druck führt zudem zu einer vermehrten Angiotensin II- Freisetzung. Angiotensin II induziert eine Vielzahl potentiell schädigender Mechanismen, unter anderem durch weitere Verstärkung der glomerulären Hyperfiltration und Induktion der Synthese von TGF- $\beta$ , Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Hierdurch kommt es zum Untergang weiterer Nephrone und zu einem Fortschreiten der Niereninsuffizienz (Klahr 1999).

## **1.2.2 Entstehung und Progression der tubulointerstitiellen Schädigung**

Heilt die glomeruläre Schädigung nicht aus, so breitet sich im weiteren Krankheitsverlauf die entzündliche Reaktion auf das Tubulointerstitium aus.

Der tubulointerstitiellen Fibrose kommt eine besondere Bedeutung für die Entstehung der chronischen Niereninsuffizienz zu, da sie die gemeinsame Endstrecke aller chronisch verlaufenden Glomerulonephritiden darstellt und zudem stärker mit der Abnahme der Nierenfunktion korreliert ist als die glomeruläre Schädigung (Nath 1992).

Welcher pathophysiologische Mechanismus das zentrale Ereignis für die Entstehung und das Fortschreiten der tubulointerstitiellen Schädigung darstellt, ist weiterhin Gegenstand kontroverser wissenschaftlicher Diskussionen. In der klinischen Praxis hat sich die Ansicht durchgesetzt, dass die Megalin-vermittelte, übermäßige Proteinendozytose im proximalen Tubulus (PT) den zentralen Pathomechanismus bei der Progression der tubulointerstitiellen Inflammation im Rahmen der GN darstellt. Dies passt zu der Beobachtung, dass die Ausprägung der Proteinurie mit dem klinischen Krankheitsverlauf korreliert (Remuzzi und Bertani 1998; Zoja et al. 2003; Eddy 2004).

Andere Autoren werten die Proteinurie hingegen eher als Surrogat-Parameter für den Schweregrad der glomerulären Schädigung ohne eigenen Krankheitswert und stellen andere Pathomechanismen in den Vordergrund (Kikuchi et al. 2000; Le Hir und Besse-Eschmann 2003; Zandi-Nejad et al. 2004; Kriz und LeHir 2005). Bislang konnte diese Fragestellung experimentell nicht abschließend beantwortet werden, da Modelle fehlten, um die Auswirkungen der Proteinurie vergleichend in vivo untersuchen zu können. Zudem waren die Ergebnisse aus in vitro- und in vivo- Studien diesbezüglich oft widersprüchlich (Christensen und Gburek 2004; Zandi-Nejad et al. 2004). Im Wesentlichen werden vier Mechanismen diskutiert, die zu einer tubulointerstitiellen Schädigung unter proteinurischen Bedingungen führen können:

### **1.2.2.1 Fehlgeleitete Filtration**

Der durch glomeruläre Autoantikörper oder Immunkomplexe verursachte immunologische Reiz führt zur Infiltration von Leukozyten und zu einer entzündlichen Reaktion im Bereich des Bowman-Kapselraumes, die die Kapillarschlingen, die

Podozyten und die Mesangialzellen mit einbezieht. Die geschädigten Podozyten entdifferenzieren, erwerben migratorische Eigenschaften und bilden Zellbrücken zwischen der glomerulären Basalmembran (GBM) und der parietalen Basalmembran (PBM) aus. Auf diesem Wege kommt es zur Anhaftung des glomerulären Kapillarknäuels an das proliferierende Epithel der Bowman-Kapsel (sog. Halbmond (crescent) -Bildung). Durch die nachfolgende Schädigung der glomerulären Basalmembran wird das proteinreiche Filtrat direkt in den Halbmond filtriert. Im weiteren Verlauf kann es zur Kontinuitätsunterbrechung der PBM und Ansammlung des glomerulären Filtrates auch im periglomerulären Interstitium kommen. (Kriz und LeHir 2005).

Halbmonde können im Sinne einer segmentalen Glomerulosklerose narbig abheilen. Persistiert die Fehlfiltration aber, so bildet sich an der Außenseite des Glomerulums ein gegen das Interstitium abgegrenzter, paraglomerulärer Raum, der sich auf das gesamte proximale Konvolut fortsetzen kann. Proteinreiches Filtrat gelangt in diesen Raum und induziert zunächst eine Verdickung der tubulären Basalmembran (TBM). In späteren Stadien führt die Separation der Epithelzellen von ihrer Basalmembran letztendlich zur Degeneration des Tubulus. In der Umgebung degenerierender Tubuli kommt es zur Inflammation und Fibrosierung des umgebenden Interstitiums im Sinne einer abgrenzenden Reaktion. Diese Prozesse sind von Kriz und Mitarbeitern am Beispiel der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen gut belegt, und spielen im Rahmen entzündlicher Glomerulonephritiden eine Rolle (Kriz et al. 1998; Kriz et al. 2001).

### **1.2.2.2 Obstruktion des tubulären Lumens**

Bei der tubulären Schädigung durch Obstruktion sind zwei Mechanismen von Bedeutung. Zum einen kann sich der wachsende glomeruläre Halbmond auf den glomerulo-tubulären Übergang ausbreiten, das initiale Segment des proximalen Tubulus mit einbeziehen und diesen so verschließen (Bertani et al. 2002; Le Hir und Besse-Eschmann 2003; Najafian et al. 2006). Zum anderen können die Tubuli infolge der Proteinurie durch proteinhaltige Präzipitate (sog. casts) ausgegossen und obstruiert werden (Bertani et al. 1986).

Mögliche Folgen der Obstruktion sind ein Kollaps der Tubuli mit Verlust ihrer physiologischen Funktion und folgender Degeneration. Die atubulären Glomeruli solcher Nephrone kollabieren oder werden -bei fortbestehender Filtration- zystisch aufgetrieben (Kriz und LeHir 2005).

### **1.2.2.3 Tubuläre Resorption filtrierter Proteine**

Den Zellen des proximalen Tubulus wird eine zentrale Rolle als Mediator für die Progression der tubulointerstitiellen Inflammation unter proteinurischen Bedingungen zugeschrieben. Die Arbeitsgruppe um Remuzzi fand bei Ratten mit altersbedingter Proteinurie und Ratten mit Adriamycin-induzierter Nephrose eine signifikante Korrelation zwischen Proteinurie und tubulointerstitiellem Schaden (Bertani et al. 1986; Bertani et al. 1989). Dabei werden folgende pathologische Vorgänge angenommen (zusammengefasst von (Kriz und LeHir 2005):

- Schädigung der proximalen Tubuluszellen durch exzessive Aufnahme und lysosomale Degeneration von Proteinen
- Direkte Schädigung der Tubuluszellen durch aufgenommene Toxine
- Sekundäre Effekte durch die reaktive Ausschüttung proinflammatorischer und profibrotischer Mediatoren durch die proximalen Tubuluszellen

Zahlreiche in vitro Studien an Zellkulturen zeigten, dass eine übermäßige Aufnahme von Albumin, Transferrin sowie IgG-Leichtketten in den proximalen Tubuluszellen zur vermehrten Expression des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ , der Zytokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Interleukin 8 (IL8), Endothelin-1 (ET-1), der Adhäsionsmoleküle Inter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und Vascular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) sowie zur Apoptose-Induktion führen. Dabei spielt für die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ET-1 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B eine entscheidende Rolle. Die zellulären Reaktionen sind dosisabhängig und in einem Großteil der Studien ab einer Albuminkonzentration von 0,01-1 g/dl im Zellmedium nachweisbar (Morigi et al. 2002; Zandi-Nejad et al. 2004; Zoja et al. 2006).

Die parakrine Sekretion der oben genannten Zytokine führt zur Infiltration des Interstitiums vornehmlich durch Makrophagen und T-Lymphozyten. Diese Zellen tragen gemeinsam mit proximalen Tubuluszellen und interstitiellen Fibroblasten zur weiteren

Sekretion inflammatorischer Chemokine bei und unterhalten so das Entzündungsgeschehen, welches letztendlich über das Interstitium auf die umliegenden Nephrone übergreift (sog. Fibrose-Hypothese) (Zoja et al. 2003). TGF- $\beta$  stimuliert interstitielle Fibroblasten zur Synthese von extrazellulären Matrixproteinen, inhibiert deren Abbau durch Metalloproteinasen und trägt so zur interstitiellen Fibrosierung bei. Zudem wirkt TGF- $\beta$  in hohen Konzentrationen Apoptose-induzierend auf Podozyten und Tubuluszellen und fördert die Epithelial-Mesenchymale Transformation (EMT) (Bottinger und Bitzer 2002). Song und Mitarbeiter zeigten, dass TGF- $\beta$  Rezeptor defiziente Mäuse nach Induktion einer Glomerulonephritis eine im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant geringer ausgeprägte renale Schädigung entwickeln (Song et al. 2007).

Ein weiterer tubulointerstitieller Schädigungsmechanismus besteht in der Aktivierung des Komplementsystems. Filtrierte Proteine (insbesondere Transferrin) induzieren in kultivierten proximalen Tubuluszellen die Biosynthese des Komplementfaktors C3 (Tang et al. 2001). Zudem akkumulieren filtriertes C3 und der Komplementkomplex C5b-9 im luminalen Zellkompartiment von proximalen Tubuluszellen der Ratte. Dies führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Rekrutierung inflammatorischer Zellen und trägt so zur interstitiellen Fibrosierung bei (Morita et al. 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich bei C3-Knockout Mäusen unter proteinurischen Bedingungen die C3-Defizienz protektiv auf die Nierenschädigung auswirkte (Abbate et al. 2008). Umstritten ist, ob vorrangig die lokale C3-Synthese durch das renale Epithel (Sheerin et al. 2008) oder aus dem Plasma filtriertes C3 (Abbate et al. 2008) zur Schädigung beiträgt. Auch für den Komplementfaktor C5 ist die durch TGF- $\beta$  vermittelte Induktion einer tubulointerstitiellen Fibrose nachgewiesen (Boor et al. 2007).

#### **1.2.2.4 Tubuläre Ischämie**

Durch erhöhte Ausschüttung von Angiotensin II in der glomerulonephritischen Niere kommt es zur Konstriktion der efferenten Arteriolen und infolgedessen zu einer verminderten peritubulären Kapillarperfusion. Zudem vermittelt Angiotensin II zusätzlichen oxidativen Stress und behindert die Sauerstoffutilisation in Tubuluszellen. Der durch die exzessive Aufnahme filtrierter Proteine gesteigerte Metabolismus und die folgende kompensatorische Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen führen

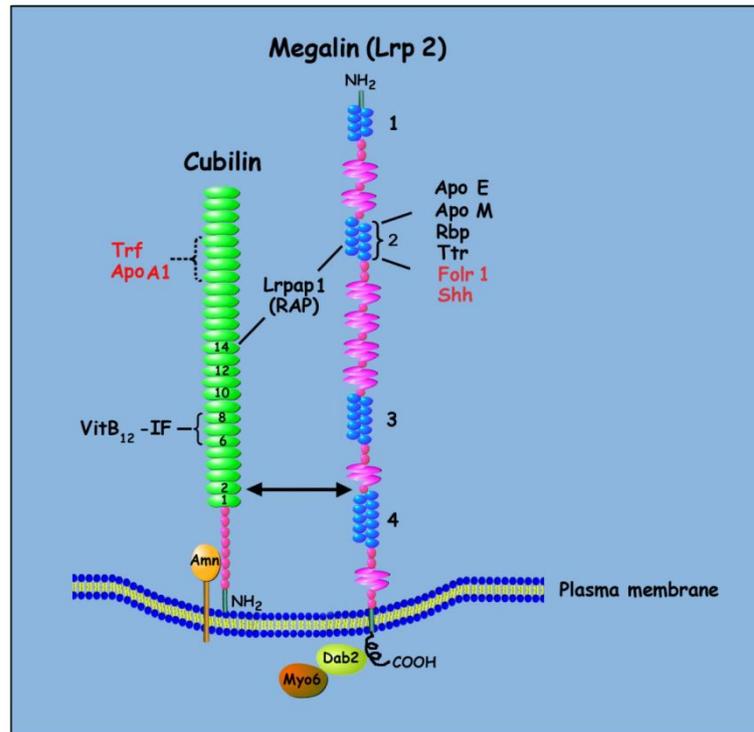
hingegen zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf. Dieses Missverhältnis wird durch die zunehmende Kapillarschädigung im Rahmen der interstitiellen Fibrosierung weiter aggraviert und kann zur fortschreitenden Tubulusschädigung beitragen (Ohashi et al. 2002; Nangaku 2006).

## **1.3 Der Megalin-Rezeptor**

### **1.3.1 Molekulare Struktur des Megalin-Rezeptors**

Erstmals beschrieben wurde Megalin 1982 von Kerjaschki und Farquhar als zentrales Autoantigen der Heymann-Nephritis im Bürstensaum von Rattennieren (Kerjaschki und Farquhar 1982). Den Namen Megalin erhielt das zunächst als gp330 bezeichnete Protein aufgrund seiner molekularen Größe. Es ist ein 600 kDa großes, aus 4660 Aminosäuren bestehendes transmembranäres Glykoprotein und gehört zur Familie der Low Density Lipoprotein (LDL) -Rezeptoren (Saito et al. 1994). Daher ist auch die Bezeichnung als Low density lipoprotein-related protein 2 (LRP2) gebräuchlich.

Die aus 4400 Aminosäuren bestehende extrazelluläre Domäne enthält vier Regionen mit negativer Ladung, die reich an der Aminosäure Cystein sind und die Liganden-Bindungsregionen darstellen. Zwischen diesen vier Regionen liegen Wachstumsfaktor (GF)-Typ-Domänen, die eine Homologie zum Vorläufer des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) aufweisen. Die GF-Typ Domänen werden wiederum durch Verbindungsregionen mit der Aminosäuresequenz Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD) voneinander getrennt. (Saito et al. 1994). Die GF-Typ Domänen sind an der pH-abhängigen Dissoziation von Rezeptor und Ligand in sauren endosomalen Kompartimenten verantwortlich (Davis et al. 1987). Die zytoplasmatische Domäne beinhaltet das karboxyterminale Ende des Rezeptors sowie zwei Kopien des Asp-Pro-Val-Tyr (NPXY)-Motives. Diese Region ist für die Ausbildung einer Clathrin-umhüllten Einstülpung der Zellmembran (sog. clathrin coated pit) verantwortlich, über die der Rezeptor internalisiert werden kann (Chen et al. 1990).



**Abbildung 1. Schematische Darstellung des Megalin-Cubilin Rezeptor Komplexes und seiner Liganden** nach Gelineau-van Waes et al. (Gelineau-van Waes et al. 2008). Blau dargestellt sind die vier extrazellulären Ligandenbindungsregionen (1-4). Rosa dargestellt sind die GF-Typ-Domänen und YWTD-Verbindungsregionen. Grün dargestellt die CUB-Domänen des Cubilin-Rezeptors. Abkürzungen: Apolipoprotein E (Apo E), Apolipoprotein M (Apo M), Apolipoprotein A1 (ApoA1), Retinol-bindendes Protein (RBP), Transthyretin (Ttr). Folat-Rezeptor (Folr1), Sonic hedgehog (Shh). Disabled-2 (Dab2), Myosin VI (Myo6), Rezeptor-assoziiertes Protein (RAP), Amnionless (AMN), Transferrin (Trf), Intrinsischer Faktor (IF).

### 1.3.2 Funktion des Megalin-Rezeptors

Megalin wird von vielen Epithelien, unter anderem des Dünndarms, der Schilddrüse, der Lunge und des Uterus exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation des Neuroepithels in der Embryogenese. Die höchste Dichte an Megalin-Rezeptoren findet sich aber im proximalen Tubulus der Niere (Christensen et al. 2009). Hier ist Megalin der quantitativ wichtigste Endozytose-Rezeptor für die Rückresorption filtrierter Proteine aus dem Harn. So werden u.a. Albumin, IgG- Leichtketten, Mikroglobuline und Apolipoproteine via Megalin in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen. Durch die Resorption von Vitamin D-bindendem Protein (DBP), Retinol-bindendem Protein (RBP)

und Transcobalamin (TC) ist Megalin entscheidend an der Homöostase der entsprechenden Vitamine beteiligt. Auch Eisen wird in Form von Transferrin und Hämoglobin durch Megalin internalisiert (Christensen und Birn 2001). Megalin ist im proximalen Tubulus funktionell eng mit Cubilin, einem peripheren Rezeptorprotein an der Außenseite der PT-Zellen, assoziiert. Cubilin weist ebenfalls Affinitäten für einen Teil der oben genannten Liganden auf. Da Cubilin nicht über eine transmembranäre Domäne verfügt, erfolgt die Internalisierung der durch Cubilin gebundenen Stoffe via Megalin (Christensen et al. 2009).

Nach Bindung eines Liganden an Megalin akkumuliert der Komplex in einer Clathrin-umhüllten Einstülpung der Zellmembran (clathrin coated pit) und wird als Clathrin-umhülltes Vesikel abgeschnürt. So erreicht der Rezeptor-Ligand Komplex die zellulären Endosomen, wo der Komplex dissoziiert. Megalin gelangt anschließend in Recycling-Endosomen des PT (dense apical tubules (DAT)) zurück zur apikalen Zellmembran (Czekay et al. 1997).

Auf die Verteilung des Megalin-Moleküls zwischen den Zellkompartimenten sowie auf die Rückführung zur apikalen Plasmamembran (Rezeptor-Recycling) haben weitere, mit Megalin assoziierte Proteine Einfluss. Dazu gehören das Rezeptor-assoziierte Protein (RAP), das Disabled-2 (Dab2) Adaptermolekül und Myosin VI (Myo6) (Birn et al. 2000; Nagai et al. 2003; Nagai et al. 2005). Die detaillierten Zusammenhänge dieser Interaktionen sind jedoch im Einzelnen noch nicht verstanden.

Zunehmend wird eine Rolle von Megalin bei der Beeinflussung der Genregulation im proximalen Tubulus über intrazelluläre Signalwege diskutiert (May et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Megalin im proximalen Tubulus der regulierten intramembranären Proteolyse (RIP) unterliegt, ein Mechanismus, der am detailliertesten für den Notch-Signalweg beschrieben ist. Hierbei kommt es zur Abspaltung eines C-terminalen Megalin-Fragmentes (MCTF). Dieser Prozess läuft sowohl konstitutiv, als auch nach Bindung eines Liganden an Megalin ab. Die Autoren postulieren die Freisetzung des C-terminalen Megalinendes und dessen Translokation zum Zellkern als einen möglichen Transkriptionsfaktor. (Zou et al. 2004; Biemesderfer 2006). Eine Bestätigung dieses Zusammenhanges würde die direkte Verbindung von Proteinresorption und Genregulation durch Megalin im proximalen Tubulus erlauben.

## 1.4 Die Megalin-defiziente Maus

Die in der vorliegende Arbeit verwendete Megalin-Knockout-Maus mit nierenspezifischer Megalindefizienz (Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre), wurde am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin von Prof. Willnow und Mitarbeitern mit Hilfe der Cre/lox Technologie generiert. Ebenfalls von Prof. Willnow wurde die „erste Generation“ der Megalin-Knockout-Maus (Megalin<sup>-/-</sup>), mit einer den ganzen Organismus betreffender Disruption des Megalin-Gens geschaffen. Beide Mausstämme und die Methodik der genetischen Manipulation sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

### 1.4.1 Die Megalin<sup>-/-</sup> Maus

Als genetischer Knockout wird die gezielte Ausschaltung eines Gens bezeichnet. 1982 gelang es erstmals, durch homologe Rekombination eine zuvor isolierte und klonierte Gensequenz in das Genom von Säugerzellen einzubringen und so bestimmte Genloki gezielt auszuschalten (Folger et al. 1982). Diese Technik diente auch als Grundlage für die Generierung der ersten Megalin-Knockout-Maus (Megalin<sup>-/-</sup>) durch Prof. Willnow und Mitarbeiter (Willnow et al. 1996).

Zur Erzeugung der Megalin<sup>-/-</sup> Maus wurde ein Zielvektor kloniert, der neben Exon- und Intron-Abschnitten des Megalin-Gens eine Neomycin-Resistenz-Kassette und zwei Kopien des Herpes Simplex Virus (HSV)-Thymidin-Kinase Genes enthielt. Nach Elektroporation wurde der Vektor in murine embryonale Stammzellen (ES) eingebracht. Die ES, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurden durch Ihre Neomycinresistenz positiv selektiert. Als negativer Selektionsfaktor für Zellen, in welchen die Transfektion nicht über den Mechanismus der homologen Rekombination erfolgte, stand zudem die HSV-Thymidin Kinase zur Verfügung. Die selektierten ES wurden in frühe murine Embryonalstadien (Blastozysten) injiziert. Durch Einwanderung der pluripotenten embryonalen Stammzellen in die polare Zellmasse der Blastozyte und Ausdifferenzierung zu Keimzellen entstanden chimäre Tiere, welche die eingebrachten genetischen Manipulationen an die nachfolgenden Generationen weitergeben (Bradley et al. 1984).

Nur etwa 2 Prozent der so erzeugten homozygoten Megalin<sup>-/-</sup> Mäuse erreichen das Erwachsenenalter. Der Großteil stirbt innerhalb von Stunden postnatal aufgrund einer

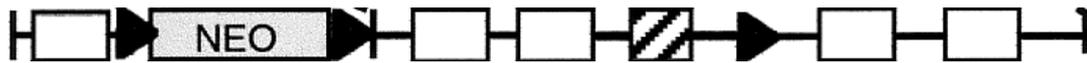
respiratorischen Insuffizienz infolge einer mangelnden Entfaltung und/oder Emphysembildung der Lunge. Zudem weisen alle Megalin-/- Mäuse eine Holoprosenzephalie auf. Diese Befunde verdeutlichen die entscheidende Rolle von Megalin für die Ausdifferenzierung und Funktion der Lunge und des zentralen Nervensystems (Willnow et al. 1996). Die Nieren sind hingegen normal entwickelt. Allerdings zeigte sich eine, auch in der vorliegenden Arbeit festgestellte, geringere Entwicklung des endozytotischen Apparates im proximalen Tubulus (siehe Kapitel 4.3.2). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung der Megalin-vermittelten Endozytose eine niedermolekulare Proteinurie mit dem Verlust lipophiler Vitamine zur Folge hat. Durch die erhöhte Ausscheidung von 25-OH Vitamin D<sub>3</sub> ist der Vitamin D-Spiegel im Serum der Tiere erniedrigt. Dies führt konsekutiv zur Entwicklung einer Hypocalzämie und Osteomalazie, analog zu den Befunden bei Patienten mit erworbenem Fanconi-Syndrom (Leheste et al. 1999; Nykjaer et al. 1999).

#### **1.4.2 Die Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre Maus**

Aufgrund der hohen Mortalitätsrate der Megalin-/- Mäuse und der damit verbundenen Einschränkung der Studienmöglichkeiten wurden weitere Anstrengungen unternommen, durch Einsatz der Cre/lox Technologie eine transgene Maus mit nierenspezifischer Megalin-Defizienz zu generieren.

Die Grundlagen der Cre/lox-Technologie wurden erstmals 1981 beschrieben. Sternberg und Hamilton beobachteten, dass die von dem Bakteriophagen P1 exprimierte cyclization recombination (Cre)- Rekombinase in der Lage war, DNS spezifisch im Bereich von „loci of crossing“ (lox)-Erkennungssequenzen zu schneiden. Diese Eigenschaft kann dazu genutzt werden, einen vorher mittels lox-sites „markierten“ Genabschnitt aus der DNS einer Zelle auszuschneiden (Sternberg et al. 1981).

Zunächst wurden drei Fragmente des murinen Megalin-Gens in einen pFlox-Vektor inkloniert, der eine Neomycin-Resistenz-Kassette und drei „loci of crossing over P1“ (loxP)-Erkennungssequenzen enthielt.



**Abbildung 2. Klonierungskarte des pFlox-Zielvektors.** Dargestellt sind Introns (Linie), sowie mehrere Exons (Kästen) des murinen Megalin-Gens. Der gestreifte Kasten stellt das für den Megalin-Membran-Anker kodierende Exon dar. Zudem enthält der Vektor eine Neomycin-Resistenz-Kassette (NEO) und drei loxP-Stellen (Pfeilkästen) (nach Leheste, Melsen et al.2003).

Die Transfektion des Zielvektors in das Mausgenom geschah auch hier nach dem Prinzip der homologen Rekombination. Nach Einschleusung des Zielvektors in embryonale Stammzellen wurden diese positiv selektiert und in murine Blastozysten injiziert. Durch Kreuzung der so entstandenen chimären Tiere mit Wildtyp-Tieren traten in der F<sub>1</sub>-Generation heterozygote Nachkommen auf (Megalin<sup>lox/-</sup>). Durch Paarung der F<sub>1</sub>-Tiere entstanden schließlich Mäuse, die für den veränderten Genlocus homozygot sind (Megalin<sup>lox/lox</sup>). Da keine Manipulation an kodierenden Sequenzen vorgenommen wurde, sind diese Tiere vom Phänotyp her unauffällig und fertil.

Parallel dazu wurde ein transgener Mausstamm geschaffen, der die Cre-Rekombinase - abhängig von einem Fragment des humanen Apolipoprotein (apo) E-Promoter- nur in der Niere exprimiert (apoE-Cre-Maus). Paart man die Megalin<sup>lox/lox</sup> Mäuse mit dem apoECre-Mausstamm, so wird das Megalin-Gen bei den Nachkommen selektiv in der Niere disrubiert (Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre Maus) (Leheste et al. 2003).

Die Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre Mäuse entwickeln sich normal und sind fertil, insbesondere die Lunge und das Gehirn sind nicht pathologisch verändert. Die Nieren sind makroskopisch unauffällig und von Gewicht und Größe gleich denen von Wildtyptieren. Allerdings weisen die Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre Tiere nur eine renale Megalin-Teildefizienz auf, von der etwa 70-90% der proximalen Tubuli betroffen sind. Die Ursache liegt wahrscheinlich in einer unzureichenden Aktivität der Cre-Rekombinase in einem Teil der proximalen Tubuluszellen. Die Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre Maus entwickelt, wie die Megalin<sup>-/-</sup> Maus, eine niedermolekulare Proteinurie. Aufgrund der geringen Megalin-Restexpression sind die den Vitamin D-Stoffwechsel betreffenden Auswirkungen im Vergleich zu den Megalin<sup>-/-</sup> Tieren weniger gravierend. Allerdings zeigt auch die Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre Maus Zeichen der erhöhten Knochenresorption und unter Vitamin D-armen Diät auch ein signifikantes Absinken des Vitamin D-Plasmaspiegels im

Vergleich zu Kontrolltieren. Unter kontinuierlicher Vitamin D Substitution sind die Tiere aber in der Lage, den renalen Verlust vollständig auszugleichen.

Die Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre Maus eignet sich daher gut für eine Arbeit wie die vorliegende, da die funktionelle Rolle von Megalin in der Niere untersucht werden soll, ohne dass ein gravierender Phänotyp (wie im Falle der Megalin<sup>-/-</sup> Maus) Einfluss auf die Ergebnisse nehmen kann.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Megalin-vermittelten Proteinresorption in den PT auf die Entstehung und das Fortschreiten der tubulointerstitiellen Fibrose zu untersuchen. Es sollte der kontrovers diskutierte Frage nachgegangen werden, ob die Proteinurie nur als Surrogat-Parameter oder als eigenständiger pathophysiologischer Faktor für das Fortschreiten der Glomerulonephritis angesehen werden muss. Dazu stand in der vorliegenden Arbeit mit der Megalin-teildefizienten Maus erstmals ein Tiermodell zur Verfügung, mithilfe dessen, durch gezielte Ausschaltung des Megalin-Transportmoleküls, die funktionelle Bedeutung dieses möglicherweise zentralen Mechanismus für den Krankheitsverlauf untersucht werden konnte.

Nach Induktion einer rasch progredienten Glomerulonephritis (RPGN) sollten die morphologischen Schäden auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene exakt erfasst und mit denen einer Kontrollgruppe von Geschwistertieren mit normaler Megalinexpression verglichen werden. Neben der quantitativen Ausprägung der Gewebsschädigung sollten insbesondere auch eventuelle Unterschiede in der Art der entstandenen glomerulären- sowie interstitiellen Schädigung in Abhängigkeit von der Fähigkeit der PT zur Proteinresorption analysiert und somit der Einfluss der Proteinurie auf die Qualität und Quantität der morphologischen Veränderungen erfasst werden.

Als weiterer, zentraler Aspekt sollte der direkte Effekt der Proteinresorption auf die Zellen des Proximalen Tubulus untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Expression von immunologischen, profibrotischen sowie von Zellstress- assoziierten Parametern durch den Proximalen Tubulus evaluiert. Im Fokus standen hierbei insbesondere mögliche Unterschiede zwischen Megalin-positiven und Megalin-defizienten PT. Darüber hinaus sollte evaluiert werden, ob die Proteinendozytose einen Einfluss auf den Zellzyklus im Sinne eines Apoptose- oder Proliferationsstimulus hat. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die ausbleibende Proteinresorption protektiv auf die Megalin-defizienten Zellen wirkt.

Zudem sollte untersucht werden, inwiefern ein Zusammenhang zwischen der Expression der oben genannten Parameter und einer entzündlichen und/oder fibrotischen interstitiellen Reaktion in der direkten Umgebung degenerierender Tubuli bestand. Um die interstitielle Reaktion weiter zu spezifizieren, sollte sowohl das Ausmaß der interstitiellen Makrophageninvasion, als auch die Synthese von Kollagen I im Bereich der Tubuli analysiert werden.

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit weiblichen, 12 bis 15 Wochen alten und 25g bis 30g schweren Knockout Mäusen mit nierenspezifischer Megalin-Teildefizienz (Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre; n=12), folgend als Cre(+) bezeichnet, und einer entsprechenden Kontrollgruppe mit nicht Megalin-defizienten Mäusen (Megalin<sup>lox/lox</sup>; n=12), folgend als Cre(-) bezeichnet, durchgeführt. Die verwendeten Mäuse wurden im Rahmen einer Forschungs Kooperation von Prof. Willnow, Max-Delbrueck-Centrum für Molekulare Medizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

Der Grad der Megalin Restexpression im proximalen Tubulusepithel der Knockout Mäuse wurde anhand der Höhe der Ausscheidung des Vitamin D-bindenden Proteins (DBP) im Urin bestimmt (Lehste et al. 2003; Bachmann et al. 2004) und durch lichtmikroskopische Auszählung von zwei Gewebsschnitten pro Tier nach Anti-Megalin Färbung verifiziert.

Die Haltung erfolgte bei einer Raumtemperatur (RT) von 20°-23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50% und einem 12h/12h Hell-Dunkel Rhythmus. Während der Behandlung bekamen die Tiere Standardfutter und Wasser ad libitum. Die Genehmigung der Tierschutzkommission zur Durchführung der Versuche lag vor (Reg G 0178/03).

## 3.2 Versuchsdurchführung

### 3.2.1 Immunisierung und Induktion der Glomerulonephritis

Alle Tiere wurden zunächst durch subkutane Injektion von 0,2mg Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Baltimore, USA) in 0,2ml Freund's Complete Adjuvant (Sigma, St. Louis, USA) primär immunologisch stimuliert.

Sechs Tage später wurde bei 4 Cre(+) und 4 Cre(-) Mäusen 0,25ml Kaninchen anti-Maus glomeruläre Basalmembran (GBM)-Serum (freundlichst überlassen von Herrn PD Le Hir) in die Schwanzvene appliziert und so eine RPGN induziert (Le Hir et al. 1998). Diese Tiere werden folgend als Cre(+)/GN bzw. Cre(-)/GN bezeichnet. Vier weitere Tiere jeder Gruppe erhielten eine Vehikel-Injektion ohne entsprechenden Antikörper (Tag 0). Nach weiteren 18 Tagen wurden alle Tiere im Rahmen der Perfusionsfixierung getötet.

### **3.2.2 Urinanalyse**

Zur standardisierten Uringewinnung wurden die Tiere zwischen dem 1 und dem 6 Tag nach immunologischer Stimulation (aber vor Gabe des anti-GBM-Serums) sowie am 18. Tag nach Induktion der RPGN für 24 Stunden in einen metabolischen Einzelkäfig gebracht. Die Tiere hatten in dieser Zeit freien Zugang zu Wasser und Standardfutter. Aus dem über 24 Stunden im metabolischen Käfig gesammelten Urin wurde anschließend die Proteinkonzentration durch Biuret-Reaktion (Roche Diagnostics, Mannheim) sowie die Kreatininkonzentration nach der kinetischen Methode nach Jaffé (Roche Diagnostics) bestimmt.

Zur qualitativen Analyse der einzelnen Proteinfractionen wurde eine SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) durchgeführt. Diese spezielle Form der Gelelektrophorese dient der Auftrennung eines Proteingemisches in Abhängigkeit von der Proteingröße. Die quantitative Proteinbestimmung im Urin wurde standardisiert durch das Zentrallabor der Charité Berlin vorgenommen.

### **3.2.3 Perfusionsfixierung und Gewebereinbettung**

Zur Einleitung der Narkose wurde Isofluran verwendet. Anschließend wurde den Tieren Natrium-Pentobarbital (Sanofi-CEVA, Bad Segeberg) intraperitoneal injiziert.

Nach Eröffnung des Bauchraumes und Freipräparation der Aorta abdominalis wurde diese über einen Polyethylenschlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Zum Druckausgleich wurde bei Perfusionsbeginn die untere Vena cava eröffnet und die Nieren retrograd zuerst mit PBS (21°C, pH 7,35) vorgespült und anschließend mit 3%

Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) in PBS (21°C, pH 7,35) initial mit 220mmHg für 90 Sekunden, dann mit 60mmHg für 3,5 Minuten perfusionsfixiert.

Zur Vermeidung von Gefrierartefakten beim Schneiden des Gewebes im Cryostat wurde dieses bei 4°C über Nacht in einer Sucrose/PBS-Lösung (800 mosmol/kg, pH 7,35, 21°C) nachfixiert und dann schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Das zur Paraffineinbettung vorgesehene Gewebe wurde über Nacht bei 4°C in 3% Paraformaldehyd nachfixiert. Die Einbettung in Paraffin erfolgte automatisiert durch das Institut für Pathologie der Charité Berlin.

Zur Aufbereitung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie wurde dieses bei 4°C über Nacht in einer Lösung aus 1,5% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4), 0,05% Pikrinsäure und 1,5% Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt) nachfixiert. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 15 Minuten in 50%, 70%, 90%, 96% und 3x 20 Minuten in 100% Ethanol) und anschließend die Inkubation in einer Propylenoxid/ Epon Lösung (Fluka, Buchs, Schweiz) über Nacht. Nach Überführung des Gewebes in BEEM-Kapseln (Roth, Karlsruhe) wurde es mit Epon (Serva, Heidelberg) ausgegossen oder in LR-White (Science-Service, München) eingebettet. Zuletzt wurde das Gewebe über 3 Tage bei 60°C ausgehärtet.

## **3.3 Morphologische Analyse**

### **3.3.1 Gewebeaufbereitung für die Lichtmikroskopie**

An einem Rotationsmikrotom (Leica, Heidelberg) wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die in einer absteigenden Ethanolreihe (2x10 Minuten Xylol, jeweils 5 Minuten 2x100%, 2x96%, 80%, 70% Ethanol) entparaffiniert und in PBS überführt wurden. Für die PAS-Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in 0,5% Perjodsäure behandelt. Nach Spülung mit Wasser für 10 Minuten wurde sie für 20 Minuten in Schiffssches Reagenz gegeben. Es folgte die Inkubation für 3x2 Minuten in Sulfitwasser und erneute Spülung unter fließendem Wasser. Nun wurden die Schnitte für 3 Minuten mit Hämatoxylin nach Mayer (Verdünnung 1:6) inkubiert und wieder fließend gewässert. Dann wurden die Schnitte unter Verwendung von PBS/Glycerin eingedeckt.

Die Semidünnschnitte (1µm) wurden aus dem in LR-White eingebetteten Gewebe mit einem Ultramikrotom (LKB, Ultratom 8800) angefertigt und auf alkoholgereinigte Objektträger aufgebracht. Um die Differenzierung zwischen Megalin-positiven und Megalin-negativen proximalen Tubuli zu ermöglichen, wurde zunächst eine silberverstärkte Goldmarkierung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.4). Die morphologische Gegenfärbung erfolgte mit Methylenblau-Azur (nach Richardson), dann wurden die Schnitte mit Eukitt (Riedel-de-Haän, Seelze) eingedeckt.

Die Schnitte wurden an einem Lichtmikroskop der Firma Leica (Leica DMRB) beurteilt. Die Fotos wurden mittels einer am Mikroskop montierten Digitalkamera (RTke Diagnostic Instruments inc., USA) aufgenommen und anschließend mit der Software Metaview 6.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) verarbeitet. Analog dazu erfolgte auch die Auswertung der unter Abschnitt 3.4.2 bis 3.6 beschriebenen Färbungen.

### **3.3.2 Gewebeaufbereitung für die Elektronenmikroskopie**

Um die für die elektronenmikroskopische Beurteilung relevanten Strukturen zu identifizieren, wurden zunächst von den in Epon eingebetteten Gewebelöckchen Semidünnschnitte hergestellt. Anschließend wurden Ultradünnschnitte (60nm) mit einem Ultracut-Mikrotom (Reichert-Jung/Leica) angefertigt und auf Formvarbeschichtete Schlitznetze (Plano, Marburg) aufgebracht. Es folgte die Inkubation in 5% Uranylacetat für 15 Minuten und die Nachkontrastierung mit Bleicitrat (Merck) für 2 Minuten. Zur Analyse und Beurteilung wurde ein Zeiss-Elektronenmikroskop (EM 900) verwendet.

### 3.3.3 Histopathologische Beurteilung

Zur morphologischen und histopathologischen Beurteilung der Nieren wurden die PAS-gefärbten Paraffinschnitte, die Semidünnschnitte sowie die Ultradünnschnitte im Elektronenmikroskop ausgewertet.

Zur Bestimmung des Stadiums und Ausmaßes der glomerulären Schädigung erfolgte die Auswertung der PAS-gefärbten Paraffinschnitte bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop.

Als morphologische Schädigungskriterien galten: Sklerosierung der Glomeruluschlingen (teils mit, teils ohne hyaline Ablagerungen) bis hin zum vollständigen Verschluss, Anheftung des Kapillarknäuels an die Bowman-Kapsel, Bildung sog. Halbmonde (crescents) durch Proliferation des Kapselepitheles, podozytäre Degeneration und Ablösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran (GBM) sowie Verdichtung der mesangialen Matrix.

Der Schweregrad der Sklerose wurde für jedes einzelne Glomerulum unter Verwendung einer semiquantitativen Schädigungseinteilung von 0 bis 4 bestimmt (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1. Schweregrad der glomerulären Schädigung**

0	Keine Schädigung
1	Sklerose betrifft weniger als 25% des Glomerulus
2	Sklerose betrifft 25% bis 50% des Glomerulus
3	Sklerose betrifft 50% bis 75% des Glomerulus
4	Sklerose betrifft mehr als 75% des Glomerulus

Dieses Auswertungsverfahren ist bereits etabliert (Aldigier et al. 2005). Durchschnittlich wurden pro Tier 100-150 Glomeruli ausgewertet. Durch Bildung des Mittelwertes wurde der Schädigungsgrad der Niere ermittelt und als Skleroseindex beschrieben.

Der Grad der tubulointerstitiellen Schädigung wurde ebenfalls unter Verwendung einer bereits etablierten, semiquantitativen Schädigungseinteilung von 0 bis 4 ermittelt (Nangaku et al. 2002).

**Tabelle 2. Schweregrad der tubulointerstitiellen Schädigung**

0	Keine Schädigung
1	Tubulointerstitielle Schädigung in weniger als 25% des Gesichtsfeldes
2	Tubulointerstitielle Schädigung in 25% bis 50% des Gesichtsfeldes
3	Tubulointerstitielle Schädigung in 50% bis 75% des Gesichtsfeldes
4	Tubulointerstitielle Schädigung in mehr als 75% des Gesichtsfeldes

Hier erfolgte die Auswertung der PAS-gefärbten Paraffinschnitte bei 20-facher Vergrößerung. Als morphologische Kriterien tubulointerstitieller Schädigung wurden Kollaps der Tubuli, Ausguss (cast)-Bildung in Verbindung mit tubulärer Dilatation oder Atrophie, Loslösung der Tubuluszellen von der Basalmembran, Hypertrophie der tubulären Basalmembran sowie die Zahl der interstitiellen Zellen und interstitielle Fibrose gewertet. Pro Schnitt wurden 30 Gesichtsfelder beurteilt. Es wurde für jedes Tier ein Mittelwert gebildet und als tubulointerstitieller Skleroseindex beschrieben.

Die Auswertung der Semidünnschnitte in der silberverstärkten Goldmarkierung/ Methyleneblau-Azur Gegenfärbung erlaubte eine zusätzliche, detaillierte Beurteilung der Schädigung unter Berücksichtigung der Megalinexpression des einzelnen PT. Beurteilt wurden die Zellzahl pro PT-Querschnitt und die jeweilige Perfusionssituation. Zur genauen Einteilung wurden drei Kategorien beschrieben (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3. Schweregrad der tubulären Schädigung**

1	Normale Zellmorphologie; Tubuluslumen unauffällig
2	Erhöhte Anzahl von Zellkernen; Tubuluslumen unauffällig
3	Erhöhte Anzahl von Zellkernen; Tubuluslumen eingeengt oder kollabiert, hydroptisches Epithel

Die ultrastrukturelle Analyse erfolgte an ca. 100 elektronenmikroskopischen Bildern pro Niere der Cre(+) Gruppe (n=8) (Vergrößerung 5000-fach bis 9000-fach). Beurteilt wurden die Höhe des Epithels, die Dicke der Basalmembran, das Gesamtvolumen der Mitochondrien sowie das Volumen von primären als auch von frühen und späten sekundären Lysosomen. All dies sind etablierte Parameter, die Hinweise auf eine Zellschädigung geben können. Um die Auswertung tangential angeschnittener Epithelien zu vermeiden, wurde auf die parallele Anordnung der Bürstensaum-Mikrovilli geachtet.

Megalin-positive Zellen wurden anhand der Anwesenheit von Recycling-Endosomen (DAT) im apikalen Zytoplasmasaum identifiziert. DATs sind pathognomonisch für Megalin-positive Zellen und finden sich nicht in Megalin-defizienten Zellen (Lehste et al. 1999; Lehste et al. 2003; Bachmann et al. 2004).

Die epitheliale Höhe, die Länge des Bürstensaumes und die Dicke der Basalmembran wurden durch Berechnung der Mittelwerte mehrerer randomisierter Messungen eines vorher bestimmten Zellareals ermittelt. Das Gesamtvolumen der Mitochondrien und der Lysosomen wurde im Verhältnis zur Größe des entsprechenden Zellareals bestimmt und in Volumenprozent (Vol%) angegeben.

Alle Parameter wurden mit Hilfe der Metaview-Analysesoftware (Metaview 6.1, Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) elektronisch analysiert. Unter Zuhilfenahme eines elektronischen Zeichenbrettes (VisTablet, VisTablet Systems, San Jose, USA) wurden zur Bestimmung der Epithelhöhe und Basalmembranbreite mehrere Messpunkte gesetzt. Die Kontur der Mitochondrien und Lysosomen wurden elektronisch umfahren und deren prozentuale Volumina im Verhältnis zum analysierten Zellkompartiment durch die Analysesoftware berechnet.

## 3.4 Immunhistochemie

### 3.4.1 Primärantikörper

Folgende, bereits zuvor charakterisierte Primärantikörper fanden Verwendung:

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Spezifität	Spezies	Firma	Verdünnung
Anti-Maus Megalin, polyklonal	Schaf	P. Verroust, Paris, Frankreich	1:10000
Anti-Maus ICAM-1, monoklonal; clone KAT-1	Ratte	ImmunoContact, Abingdon, UK	1:4000
Anti-Maus VCAM-1, monoklonal	Ratte	BD Transduction, Heidelberg, Deutschland	1:200
Anti-PCNA, polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA	1:50
Anti-Ki-67, monoklonal	Ratte	Dako, Hamburg, Deutschland	1:200
Anti-Maus Kollagen I, polyklonal	Kaninchen	RD Inc., Frankfurt, Deutschland	1:100
Anti-Maus HSP25 monoklonal	Kaninchen	Calbiochem Schwalbach, Deutschland	1:200
Anti-Maus CD68 monoklonal; clone ED1	Ratte	Serotec Düsseldorf, Deutschland	1:50

### 3.4.2 Fluoreszenzmarkierung

Zur histochemischen Analyse wurden sowohl Cryostat- als auch Paraffinschnitte von 3-5µm Dicke verwendet. Die Gefrierschnitte wurden auf Chromgelantine-beschichtete Objektträger (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel de Haen) aufgebracht, 20 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend in PBS äquilibriert. Die für die Inkubation mit den Antikörpern gegen ICAM-1 und VCAM-1 vorgesehenen Schnitte wurden nun für 15 Minuten mit 0,5% Triton X-Lösung (Boehringer, Mannheim) in PBS verdünnt inkubiert und dann für 2x 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungen wurden als nächster Schritt alle Objektträger für 60 Minuten in 5% Milchpulver (Becton Dickinson Difco Magermilch) in PBS verbracht. Es folgte die Inkubation der Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper in der in Tabelle 4 angegebenen Verdünnung in PBS. Nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht im Kühlschrank gelagert. Es folgten drei zehnminütige Waschschrte in PBS.

Anschließend wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Es handelte sich, abhängig vom Primärantikörper, um mit Cy2 oder Cy3 gekoppelte IgG-Sekundärantikörper. Verwendet wurden ein Cy3 Anti-Schaf-IgG- (Dako, Glostrup, Dänemark, 1:250 in PBS), Cy2 Anti-Ratte-IgG- (Dako, 1:100 in PBS) und ein Cy2 Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Baltimore, USA, 1:100 in PBS).

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter Lichtabschluss. Die Sekundärantikörper-Inkubation erfolgte wiederum über 60 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte 3x 10 Minuten gewaschen und mit 50% Glycerin (Merk) eingedeckt. Zur Kontrolle wurde jeweils statt des verdünnten Primärantikörpers PBS aufgetragen. Auf diesen Kontrollschnitten ließ sich nach Sekundärantikörper-Inkubation kein spezifisches Antikörpersignal nachweisen.

Der Nachweis der Proteinaufnahme in die proximalen Tubuli erfolgte durch Darstellung des mauseigenen IgG durch direktes Aufbringen eines Cy2-gekoppelten Anti-Maus IgG Antikörpers (Dako, 1:100 in PBS) ohne Verwendung eines Primärantikörpers.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in PBS überführt. Anschließend wurde, beginnend mit dem Blocken der unspezifischen Proteinbindungen, dasselbe Protokoll wie für die Cryostatschnitte verwendet.

Bei der Durchführung von Doppelmarkierungen wurden die Primärantikörper mit den entsprechenden Sekundärantikörpern nacheinander aufgetragen. Um Interaktionen zwischen den Antikörpern auszuschließen und deren Spezifität sicherzustellen, wurden als Kontrolle parallel zu den Doppelmarkierungen die Antikörper einzeln auf Serienschritte aufgetragen. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte mit einem Leica DMRB Lichtmikroskop mit HBO Fluoreszenzlampe.

### **3.4.3 PAP-Färbung**

Zur Darstellung des Kollagen I Primärantikörpers und des Megalin Primärantikörpers wurde die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode eingesetzt. Verwendung fanden sowohl Paraffin- als auch Cryostatschnitte von 3-5µm Dicke.

Wie in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben wurden die Schnitte zunächst mit 5% Milch/PBS (Becton Dickinson Difco Magermilch) geblockt und anschließend in PBS-Puffer gewaschen. Um endogene Peroxidasen zu blocken wurden die Schnitte für 10 Minuten bei RT mit 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) in 100% Methanol (J.T. Baker, Griesheim) behandelt. Es folgten zwei Waschriffe für 5 Minuten in PBS, bevor die Primärantikörper in den unter 3.4.1 angegebenen Verdünnungen aufgetragen, für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert und über Nacht bei 4° C belassen wurden.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte für 3x 10 Minuten in PBS gewaschen und ein Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelter Schwein Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dako, 1:80 in PBS) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei RT auf dem Schüttler, bevor nach drei Waschriffen (3x 10 Minuten in PBS) die Farbreaktion durch aufbringen von 0,1% Diaminobenzidin (Sigma) und 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS entwickelt wurde. Bei ausreichender Entwicklung des spezifischen Signals nach 25-30 Minuten wurde die Reaktion durch waschen der Schnitte in PBS abgestoppt und selbige mit 50% Glycerin (Merck) eingedeckelt.

Als Kontrolle wurde anstatt der Primärantikörper PBS aufgetragen. In diesem Fall kam es nicht zur Entwicklung eines spezifischen Signals.

Zum Nachweis der, den Tieren zuvor injizierten Kaninchen Anti-Maus GBM-Antikörper (siehe Abschnitt 3.2.1), wurden die Schnitte nach oben beschriebenem Protokoll mit einem HRP-gekoppelten Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1:100 in PBS) ohne vorheriges Aufbringen eines Primärantikörpers inkubiert.

Die Auswertung erfolgte unter Durchlicht an einem Leica DMRB-Mikroskop.

#### **3.4.4 Silberverstärkte Goldmarkierung**

Die Technik der Silberverstärkten Goldmarkierung wurde im Rahmen der morphologischen Analyse der Semidünnschnitte in der Methylenblau-Azur Färbung zur Darstellung von Megalin eingesetzt (siehe Abschnitt 3.3.1).

Dazu wurden die Semidünnschnitte zunächst für 30 Minuten mit 5% Milchpulver/PBS zum Blocken unspezifischer Proteinbindungen beschichtet, bevor sie für eine Stunde mit dem Anti-Megalin-AK in einer feuchten Kammer inkubiert und über Nacht bei 4°C gelagert wurden. Kontrollschnitte wurden mit PBS anstatt des Primärantikörpers überschichtet.

Nach einem Waschschrift für 3x 10 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit einem im Kaninchen generierten, an 12nm große Goldpartikel gekoppelten Anti-Schaf-IgG-AK (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, 1:200 in 5% Milch/PBS) überschichtet und für 90 Minuten inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift (2x 5 Minuten in PBS), dann wurden die Schnitte mit 2% Glutaraldehyd (Merck) in PBS für 15 Minuten nachfixiert. Anschließend wurde die Silberverstärkungslösung (Amersham, Freiburg) aufgebracht und die Reaktion nach 20 Minuten durch 3x 5 minütiges Waschen in PBS gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend mit Eukitt eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte an einem Leica DMRB Lichtmikroskop mit und ohne Verwendung von Interferenzkontrast.

### **3.5 TUNEL-Färbung**

Die TUNEL- (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d UTP nick- end labeling) Färbung wurde auf 4µm dicken Paraffinschnitten unter Verwendung des In Situ Cell Death Detection® Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurden die vorher entparaffinierten Schnitte für 15 Minuten mit 0,002 %iger Proteinase K-Lösung inkubiert, für 5 Minuten in PBS gewaschen und dann für eine Stunde bei 37°C mit terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase und Fluorescein-markiertem Deoxyuridin-

Triphosphat (dUTP) inkubiert. Nach Spülung für 3x 5 Minuten in PBS erfolgte die Doppelmarkierung mit dem Anti-Megalin-AK wie in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben. Anschließend wurden die Objektträger mit 50% Glycerin eingedeckelt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte mit einem Leica DMRB Lichtmikroskop mit HBO Fluoreszenzlampe.

## **3.6 In situ-Hybridisierung**

Die mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, ET-1 und Osteopontin (OP) wurde durch In situ-Hybridisierung untersucht.

### **3.6.1 Transformation der cDNA**

Um eine ausreichende Menge des TGF- $\beta$ 1-cDNA-Vektors zu erhalten, wurde das Plasmid zunächst auf einen Calcium-Chlorid kompetenten E-Coli Stamm (DH 5 $\alpha$ ) übertragen.

Dazu wurde der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Flüssigmedium/ 50% Glycerin gelagerte Stamm aufgetaut und 1 $\mu\text{l}$  des TGF- $\beta$ 1-Plasmids hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde der Ansatz für 30 Sekunden bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert (Hitzeschockinkubation) und mit 500 $\mu\text{l}$  SOC-Medium (Roche) aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 40 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (10 Sekunden bei 12g), wurde der Überstand in 3ml flüssiges LB/Amp-Medium (Roche, 100  $\mu\text{g}$  Ampicillin/ml LB-Medium) angeimpft und für 12 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler belassen. Am nächsten Tag wurden die angeimpften Flüssigmedien für eine Minute bei 11.000 rpm zentrifugiert und mit dem Miniprep- Kit (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Das aufgereinigte Plasmid wurde bis zu seiner Verwendung bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.6.2 Präparation der cDNA**

Bei der Präparation der cDNA kamen zwei Methoden zum Einsatz: Zum einen die Technik der Linearisierung, bei der die cDNA innerhalb des Plasmids transkribiert wird,

zum anderen die PCR, bei der unter Verwendung von Primern ein PCR-Produkt erstellt wird, welches den einklonierten cDNA-Abschnitt und die plasmideigenen Transkriptionspromotoren umfasste.

Sämtliche im Folgenden erwähnte Transkriptionspolymerasen und Restriktions-Endonukleasen stammen von der Firma Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland.

Die Plasmide mit den cDNAs für TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 wurden dem Labor freundlicherweise von E. Vuorio (Turku, Finnland) überlassen.

Die TGF- $\beta$ 1 cDNA bestand aus einem 407 Basenpaare langen Maus-TGF- $\beta$ 1-Fragment, welches durch die Promotorstellen der Transkriptionspolymerasen T3 und T7 flankiert und subkloniert in die EcoRV site des pBlueskript KS Vektors (Stratagene, La Jolla, USA) vorlag.

Zur Herstellung der Antisenseprobe wurde das Plasmid mit Hilfe von EcoR1 linearisiert. Die Transkription erfolgte mit Hilfe der T3 Polymerase. Die Senseprobe wurde unter Zuhilfenahme von HindIII linearisiert und mit der T7 Polymerase transkribiert.

Die cDNA für TGF- $\beta$ 3 lag als 323 Basenpaare langes Fragment des murinen TGF- $\beta$ 3-Rezeptors in den pGEM-T Vektor (Promega, Madison, USA) subkloniert vor. Flankiert wurde die TGF- $\beta$ 3-cDNA durch die Promotorstellen der Polymerasen Sp6 und T7. Die Erstellung der Antisenseprobe erfolgte nach Linearisierung mit ApaI und Transkription mit der Sp6 Polymerase, die der Senseprobe unter Verwendung von SacI zur Linearisierung und T7 als Transkriptionspolymerase.

Zur Detektion von Osteopontin wurde ein 984 Basenpaare langes Stück des 2ar-Gens, subkloniert in die Hind III site des pBluescript KS (-) Vektors (Nomura et al. 1988) verwendet. Flankiert wurde die cDNA von den Promotorstellen der Transkriptionspolymerasen T3 und T7.

Mit Hilfe von vektorspezifischen Primern wurde aus dem Plasmid ein PCR-Produkt erzeugt. Aus diesem wurde die Transkription unter Verwendung von T3 für die Antisenseprobe und T7 für die Senseprobe durchgeführt.

Die ET-1 cDNA war 317 Basenpaare lang und in die EcoRV site des pBlueskript KS Vektors einkloniert. Wie für Osteopontin beschrieben wurde ein PCR-Produkt erzeugt. Bei der Transkription diente T7 zur Erstellung der Antisenseprobe und Sp6 zur Erstellung der Senseprobe.

Zur Aufreinigung der cDNA-Proben wurden diese vor der Transkription mit Natriumacetat und 100% Ethanol (J.T. Baker) gefällt. Zur Kontrolle der Qualität wurde

eine Agarosegel-Elektrophorese (Seakem-ME Agarose, FCM, USA) durchgeführt und die DNA photometrisch quantitativ bestimmt (GenQuantII, Pharmacia Biotech, Freiburg).

### **3.6.3 In vitro-Transkription**

Für alle Versuche wurden jeweils eine Antisense-Sonde und eine Sense-Sonde generiert. Die Antisense-Sonde bildet das komplementäre Stück zur zellulären mRNA und dient dem Nachweis der selbigen in situ. Die Sense-Sonde fungiert hingegen als Negativkontrolle.

Die für die Transkription verwendeten Transkriptionspolymerasen wurden bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

Der Ansatz für die Transkription bestand aus 1µg Restriktionsfragment oder 0,2µg PCR-Produkt der entsprechenden cDNA, 2µl Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim), 2µl eines Nukleotidgemisches mit Digoxigenin-markiertem Uridintriphosphat (Boehringer, Mannheim), 1µl der entsprechenden RNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und wurde mit Diethyl-Pyrocbonat (DEPC, Sigma, St. Louis, USA) behandeltem Wasser auf 20µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde für 135 Minuten bei 37°C inkubiert. Die so erzeugten Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurden wie oben beschrieben mit Natriumacetat in 100% Ethanol gefällt, mit 80% Ethanol gereinigt und in 100µl DEPC-Wasser gegeben. Die Menge der erzeugten RNA wurde wiederum durch photometrische Messung bestimmt, die Qualität der Sonden durch eine Agarosegel-Elektrophorese verifiziert.

### **3.6.4 Hybridisierung der RNA-Sonden**

Um eine Verunreinigung der Ansätze mit fremd-RNA und RNAsen auszuschließen, wurde zur Herstellung der Lösungen ausschließlich autoklaviertes Milli Q Wasser verwendet bzw. die gesamte Lösung autoklaviert. Alle verwendeten Glasgefäße wurden vor Gebrauch mindestens zwei Stunden bei 180°C gebacken. Für die In Situ-Hybridisierung wurden 5µm dicke Paraffinschnitte verwendet. Die Paraffinschnitte wurden zunächst wie unter 3.3.1 beschrieben in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte fanden auf Eis (4°C)

statt, beginnend mit der Nachfixierung für 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd (pH 7,4). Es folgte ein Waschschrift (2x 5 Minuten) in PBS, bevor die Schnitte zur Aufspaltung von Proteinbindungen in 0,2 M HCL (40ml 1M HCL in 200ml Milli-Q Wasser) inkubiert wurden, um das Eindringen der RNA-Sonde zu erleichtern. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS (2x 5 Minuten) wurden die Schnitte bei 37°C für 30 Minuten mit Proteinase K (Roche, 100µl Proteinase K / 200ml PBS) inkubiert. Dann wurden die Schnitte in 4°C kaltem 4% Paraformaldehyd für 5 Minuten nachfixiert und noch einmal in PBS gewaschen, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, jeweils für 5 Minuten bei 4°C) entwässert wurden. Nach 20 minütigem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Gewebsschnitte mit jeweils 80µl Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid (Sigma), 50% DEPC-Wasser mit 2,5x Denhardt's (Sigma), 0,5M EDTA (Roth) pH 8, 1M Tris-HCL (Trometamol (Merck)/HCL (J.T. Baker), pH 7,4), 0,5 mg/ml tRNA (Boehringer) und 20mM NaCl (Merck)) beschichtet und in einer Kammer für 2 Stunden bei 40°C inkubiert. Nach Absaugen der Gewebsschnitte wurde der Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 40% DEPC-Wasser mit 10x Denhardt's, 1mMEDTA (pH 8), 200mM Tris-HCL (pH 7,4), 5mg/ml tRNA, 330mM NaCl, 1mg/ml Heringssperma-DNA (Boehringer), 0,2M Dithiothreitol (Biomol, Hamburg), 10% Dextransulfat (Sigma), und 4-10pg Digoxigenin-markierter Riboprobe) aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für 16-22 Stunden bei 40°C in einer feuchten Kammer. Parallel zum Aufbringen der Antisense-RNA-Sonde erfolgte als Kontrolle die Inkubation mit der Sense-Probe. Hierbei zeigte sich in keinem Experiment ein Signal.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Objektträger für 30 Minuten bei 40°C in einer 50%Formamid in 2x SSC-Lösung (2x Standard Sodium Citrat: 15% Natriumcitrat (Merck) und 18% Natriumchlorid in Milli Q Wasser) gewaschen. Es folgten drei weitere Waschschriffe (30 Minuten bei 40°C in 2x SSC, 2x 15 Minuten bei RT in 2x SSC, 2x 15 Minuten bei RT in 1x SSC), um nicht gebundene Sonden zu entfernen.

### **3.6.5 Sonden-Detektion mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper**

Zunächst wurden die Gewebsschnitte für 10 Minuten bei RT in Puffer 1 (100mM Tris-HCl (pH 7,4), 150mM NaCl in Milli Q Wasser) inkubiert. Es folgte die Beschichtung der Objektträger mit jeweils 80µl modifiziertem Blockingmedium (1% Blocking Reagenz (Roche) und 0,5% bovines Serumalbumin in Puffer 1) und Inkubation für 30 Minuten

bei RT. Die Objektträger wurden anschließend abgesaugt, ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Digoxigenin-Antikörper aufgebracht (1:100 in modifiziertem Blockingmedium) und der Ansatz für 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer auf dem Schüttler belassen. Nach zwei 15 minütigen Waschsritten in Puffer 1 wurden die Schnitte für 2 Minuten in Puffer 3 (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> in Milli Q Wasser, pH 9,5) äquilibriert, abgesaugt, und mit 80µl Entwicklungspuffer (45µl NBT (Roche Diagnostics), 35µl X-Phosphat (Roche Diagnostics), 10mg Levamisol (Sigma) in 10ml Puffer 3) beschichtet. Je nach Intensität der Signalentwicklung erfolgte das Abstoppen der Entwicklungsreaktion nach 1-4 Stunden in Puffer 4 (100mM Tris-HCl, 1mM EDTA in Milli Q Wasser, pH 8) für 2x 15 Minuten. Die ausgewerteten Gewebsschnitte wurden jeweils simultan abgestoppt. Die Doppelmarkierung mit dem Anti-Maus-Megalin Antikörper und dem Cy3 Anti-Schaf-IgG Antikörper erfolgte im Anschluss an die In situ-Hybridisierung, nach dem in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Protokoll. Abschließend wurden die Schnitte mit 50% Glycerin in PBS eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Leica DMRB Lichtmikroskop mit Interferenzkontrast.

### **3.7 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde das Statistikprogramm SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Für die quantitativen Daten wurden jeweils der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler bestimmt. Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurde der Mann-Whitney Rangsummentest verwendet. Dieser eignet sich zur Ermittlung des Unterschiedes zwischen zwei unabhängigen Stichproben hinsichtlich ordinal skalierten Variablen auch bei kleinen Stichprobengrößen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 angenommen.

# 4. Ergebnisse

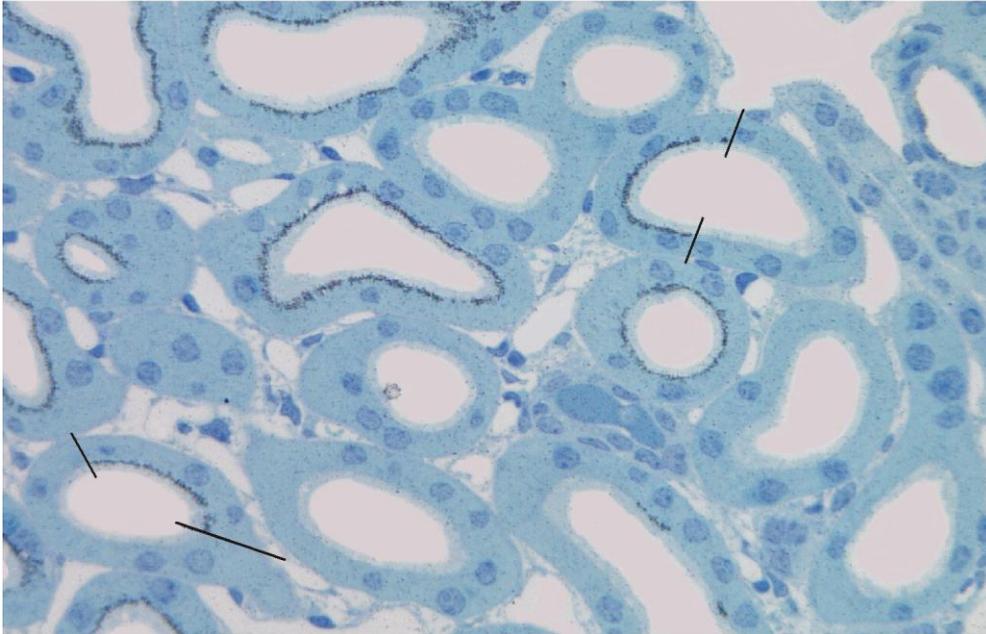
## 4.1 Verifizierung des Modells

### 4.1.1 Expressionsmuster von Megalin in Cre(+) Mäusen

Bei den von Prof. Willnow zur Verfügung gestellten Megalin-teildefizienten Cre(+) Mäusen wurde bereits im Vorfeld der Grad der Megalin-Restexpression näherungsweise anhand der DBP-Ausscheidung im Urin bestimmt. (siehe auch Abschnitt 3.1). Zur exakten Ermittlung des Restexpressionsgrades wurden pro Tier zwei Gewebsschnitte nach Anti-Megalin Färbung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Im Mittel wiesen  $69.75\% \pm 5.47\%$  der PT-Querschnitte eine Megalindefizienz auf. Die Cre(+) Tiere zeigten ein mosaikartiges Megalin-Expressionsmuster. Neben PT-Querschnitten ohne Megalinexpression (Megalin(-)) gab es PT, in denen Megalin-positive (Megalin(+)) und Megalin(-) Zellen direkt nebeneinander lagen (Abb. 1c), aber auch PT ohne Megalindefizienz.

Durch dieses mosaikartige Expressionsmuster war, neben dem Vergleich zwischen Cre(+) und Cre(-) Tieren, auch der direkte Vergleich von Megalin(+) und Megalin(-) Zellen innerhalb des Cortex der Cre(+) Tiere hinsichtlich der in vivo Reaktion auf die Proteinurie möglich.



**Abbildung 3. Übersichtsbild des Cortex einer Cre(+)** Niere. Nachweis von Megalin durch Silberverstärkte Goldmarkierung in der Methylenblau-Azur Färbung. Die schwarz erscheinenden Silberablagerungen an der Basis der Mikrovilli identifizieren Zellen mit Megalin-Expression. Die schwarzen Balken markieren die Grenze zwischen Megalin(+) und Megalin(-) Zellen.

#### **4.1.2 Funktionelle Aspekte der Glomerulonephritis-Induktion**

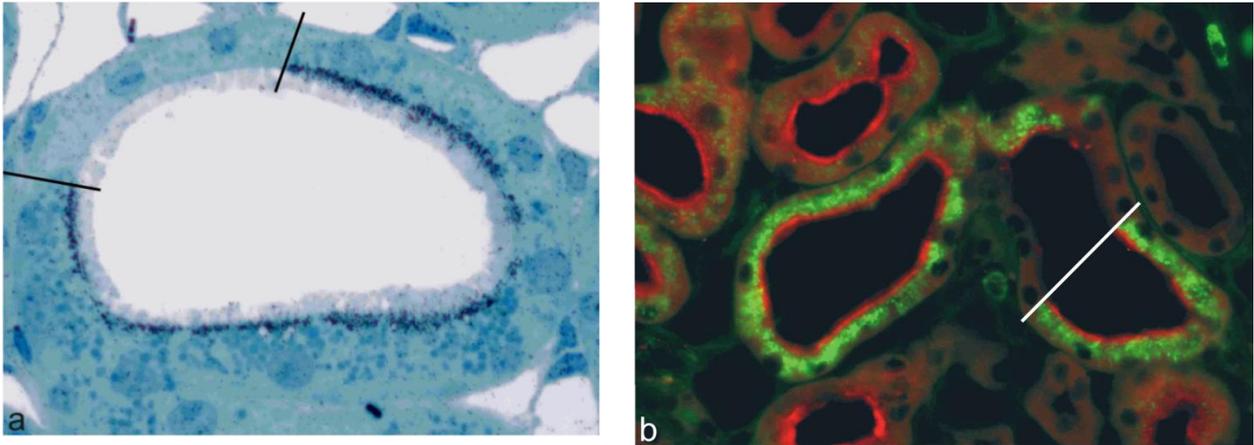
Der Effekt der Behandlung mit dem Anti-GBM-Serum zur Induktion der Glomerulonephritis wurde unter Verwendung eines Anti-Kaninchen Antikörpers bestätigt, welcher die an die GBM gebundenen Antikörper erkannte. Es zeigte sich ein typisches, lineares Ablagerungsmuster entlang der GBM im Sinne einer Antibasalmembran-Antikörper GN (extrakapilläre GN), welches bei den nur mit Freund's Complete Adjuvant behandelten Tieren fehlte.



**Abbildung 4. Immunhistochemischer Nachweis der Anti-GBM-Antikörper.** Nach Inkubation mit einem HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG-AK zeigt sich die für die extrakapilläre GN typische lineare Ablagerung der Antikörper entlang der glomerulären Basalmembran.

Die wichtigste funktionelle Annahme dieses Modells, wonach die induzierte GN eine signifikante Proteinurie hervorruft und die Aufnahme der ausgeschiedenen Proteine nur durch Megalin positive PT-Zellen erfolgt, wurde durch Doppelmarkierung mit einem Anti-Maus-IgG-Antikörper/Anti-Megalin-Antikörper sowie durch eine kombinierte Richardson's blue Färbung/Silberverstärkte Goldmarkierung verifiziert.

79.1%  $\pm$  13.2% der Megalin(+) Zellen zeigten eine signifikante IgG- und Proteinaufnahme, wobei bei den Megalin(-) PT-Zellen in keinem Fall eine Proteinaufnahme nachweisbar war ( $p < 0.05$ ). Zur Resorption von Proteinen aus dem Harn waren somit nur Megalin positive Zellen fähig.

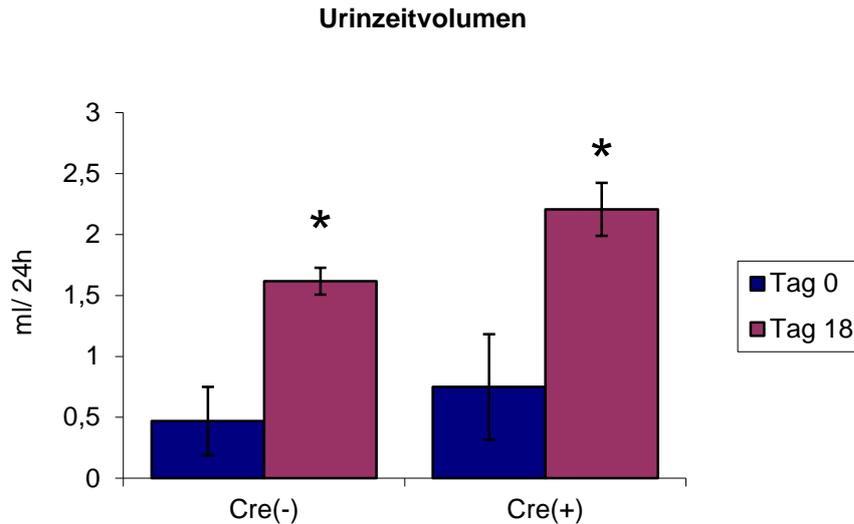


**Abbildung 5. Intrazelluläre Proteinaufnahme in den Cre(+)/GN-Nieren nur durch Megalin(+) Zellen.**  
**(a)** Nachweis von Megalin durch Silberverstärkte Goldmarkierung in der Methylenblau-Azur Färbung als schwarz erscheinende Punkte an der Basis der Mikrovilli. Die intrazellulären blauen Punkte zeigen die Aufnahme filtrierter Proteine, welche nur in Megalin(+) Zellen nachweisbar ist. **(b)** Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Maus-IgG (grün) und Megalin (rot). Die IgG-Resorption in den PT ist strikt mit der Megalin-Expression kolokalisiert. Die Balken markieren die Grenze zwischen Megalin(+) und Megalin(-) Zellen.

## 4.2 Urinanalyse

Die in der Urinanalyse ermittelten Parameter lassen direkten Rückschluss auf die Nierenfunktion zu und wurden vor Induktion der Glomerulonephritis (Tag 0) sowie vor Entnahme der Nieren (Tag 18) jeweils in allen Gruppen bestimmt. Beide Behandlungsgruppen zeigten einen signifikanten Anstieg des Urinzeitvolumens, der mit dem Urin ausgeschiedenen Proteinmenge und des Protein/Kreatinin Verhältnisses, wobei die Veränderung der Parameter in der Cre(+)/GN Gruppe deutlich ausgeprägter war.

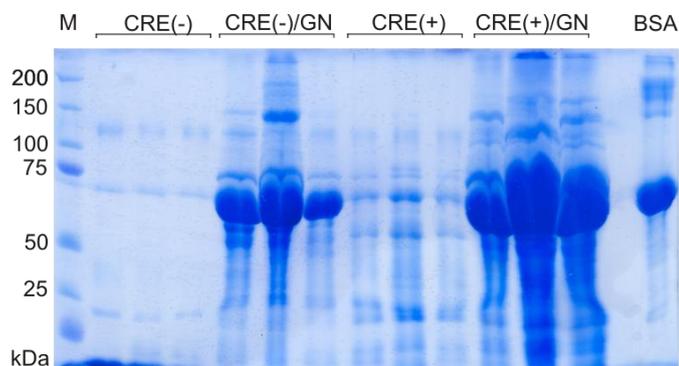
Bei den unbehandelten Mäusen zeigte sich ein moderat höheres Urinzeitvolumen in der Cre(+) Gruppe ( $0,75\text{ml} \pm 0,43\text{ml/Tag}$ ) im Vergleich zu der Cre(-) Gruppe ( $0,47\text{ml} \pm 0,11\text{ml/Tag}$ ). Die Induktion der Glomerulonephritis führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Zunahme des Urinzeitvolumens ( $1,61\text{ml} \pm 0,43\text{ml/Tag}$  in der Cre(-)/GN Gruppe im Vergleich zu  $2,21\text{ml} \pm 0,22\text{ml/Tag}$  in der Cre(+)/GN Gruppe).



**Abbildung 6. Urinzeitvolumen vor und nach GN-Induktion.** Die Behandlung führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der Urinausscheidung. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; n= 4; \* = Signifikante Unterschiede zum Tag 0 ( $p < 0,05$ ).

Die qualitative Analyse der im Urin ausgeschiedenen Proteine mittels SDS-PAGE zeigte eine physiologische Albuminurie in der Cre(-) Gruppe. Wie erwartet wies die Cre(+) Gruppe zusätzlich die für diese Mäuse charakteristische kleinemolekulare Proteinurie auf (Leheste et al. 1999).

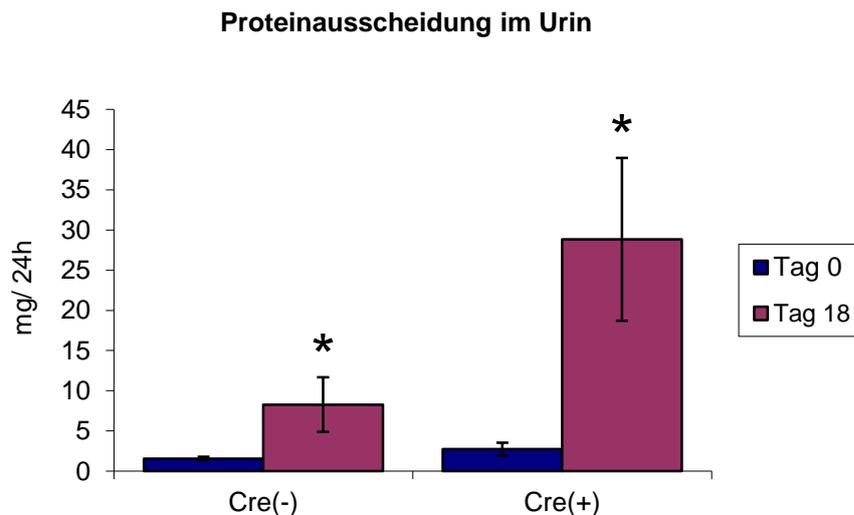
Im Vergleich der glomerulonephritischen Tiere waren die Albuminurie und die großmolekulare Proteinurie in der Cre(+)/GN Gruppe deutlich ausgeprägter als in der Cre(-)/GN Gruppe.



**Abbildung 7. Coomassie-Färbung der Proteinfractionen in der Urin-Elektrophorese.** Im Vergleich zu Cre(-) Mäusen zeigen Cre(+) Mäuse eine niedermolekulare Proteinurie. Nach Induktion der Glomerulonephritis zeigen beide Gruppen eine aggravierte Proteinurie mit der größten Fraktion im Bereich von 65 kDa. Abkürzungen: M= Marker der Proteingröße, Bovines Serum Albumin (BSA) fungiert als Positivkontrolle.

Die quantitative Proteinausscheidung mit dem Urin über 24 Stunden war in der Cre(-) Kontrollgruppe mit 1,57mg/Tag um 59% niedriger als in der Cre+ Kontrollgruppe (2,73mg/Tag).

Sowohl die Cre(-)/GN, als auch die Cre(+)/GN Tiere zeigten einen signifikanten, wenn auch unproportionalen Anstieg der Proteinurie (8,28mg/Tag in der Cre(-)/GN im Vergleich zu 28,84mg/Tag in der Cre(+)/GN Gruppe).

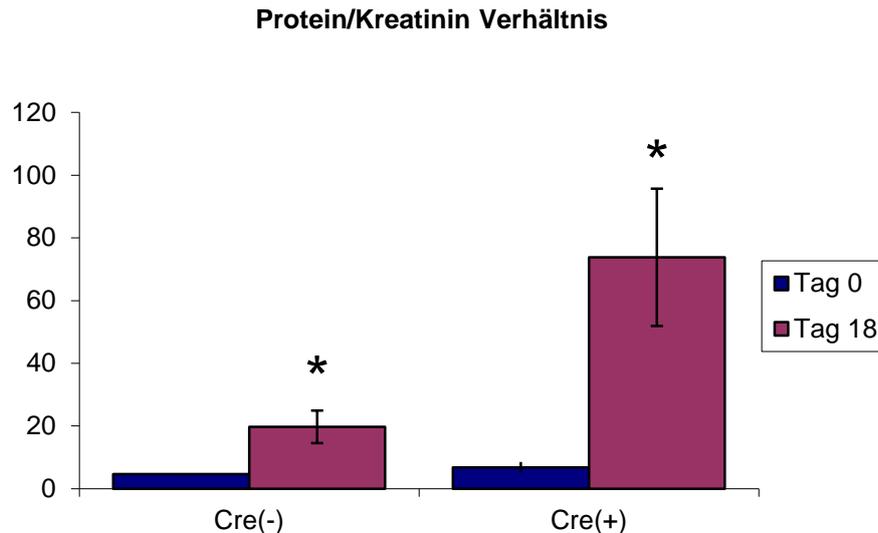


**Abbildung 8. Proteinurie vor und nach GN-Induktion.** Unproportional stärkere Zunahme der Proteinurie in der Cre(+) Gruppe am 18. Tag nach GN-Induktion. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; n= 4; \* = Signifikante Unterschiede zum Tag 0 ( $p < 0,05$ ).

Als weiterer Marker für eine Nierenschädigung wurde die Proteinkonzentration im Verhältnis zur Kreatininkonzentration im Urin bestimmt (Protein/Kreatinin-Ratio). Dieser Wert dient zum einen der Abschätzung der Proteinausscheidung über 24 Stunden (hier also als Kontrollwert). Zudem ist ein Anstieg des Wertes mit einer Abnahme der GFR und dem Fortschreiten der Nierenschädigung korreliert.

Die unbehandelte Cre(-) Gruppe zeigte mit einem Protein/Kreatinin Verhältnis von 4,64 keinen signifikanten Unterschied zu der Cre+ Gruppe mit einem Wert von 6,84.

Nach Induktion der Glomerulonephritis betrug am 18. Tag das Protein/Kreatinin Verhältnis in der Cre(-) Gruppe 19,78 und war damit signifikant unterschiedlich von dem Wert der Cre(+) Gruppe mit einem Verhältniswert von 73,80.



**Abbildung 9. Protein/Kreatinin-Ratio vor und nach GN-Induktion.** Vor Induktion der GN besteht kein Unterschied des Protein/Kreatinin-Verhältnisses im Vergleich der Gruppen. Am 18. Tag der GN zeigte sich ein signifikant größerer Anstieg des Verhältniswertes in der Cre(+) Gruppe. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; n= 4; \* = Signifikante Unterschiede zum Tag 0 ( $p < 0,05$ ).

## 4.3 Histopathologische Auswertung

### 4.3.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Ergebnisse stammen von Tieren, die am 18. Tag nach Induktion der GN getötet wurden. Dieser Zeitpunkt wurde aus folgenden Gründen gewählt: In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass nach 18 Tagen alle Krankheitsstadien, von lichtmikroskopisch unauffälligen Nephronen bis hin zu vollständig degenerierten Nephronen, zu finden sind. Zudem war der klinische Zustand der Tiere der Cre(+) Gruppe aufgrund Ihrer höheren Vulnerabilität gegenüber der Behandlung so schlecht, dass ein weiteres Abwarten mit einem hohen Sterberisiko verbunden gewesen wäre.

Signifikante morphologische Veränderungen waren bei allen Tieren, bei denen eine Glomerulonephritis induziert wurde, sichtbar. Die Kontrollgruppen, die nur Freund's Adjuvant, jedoch kein Anti-GBM Serum erhalten hatten, zeigten keine morphologischen Veränderungen.

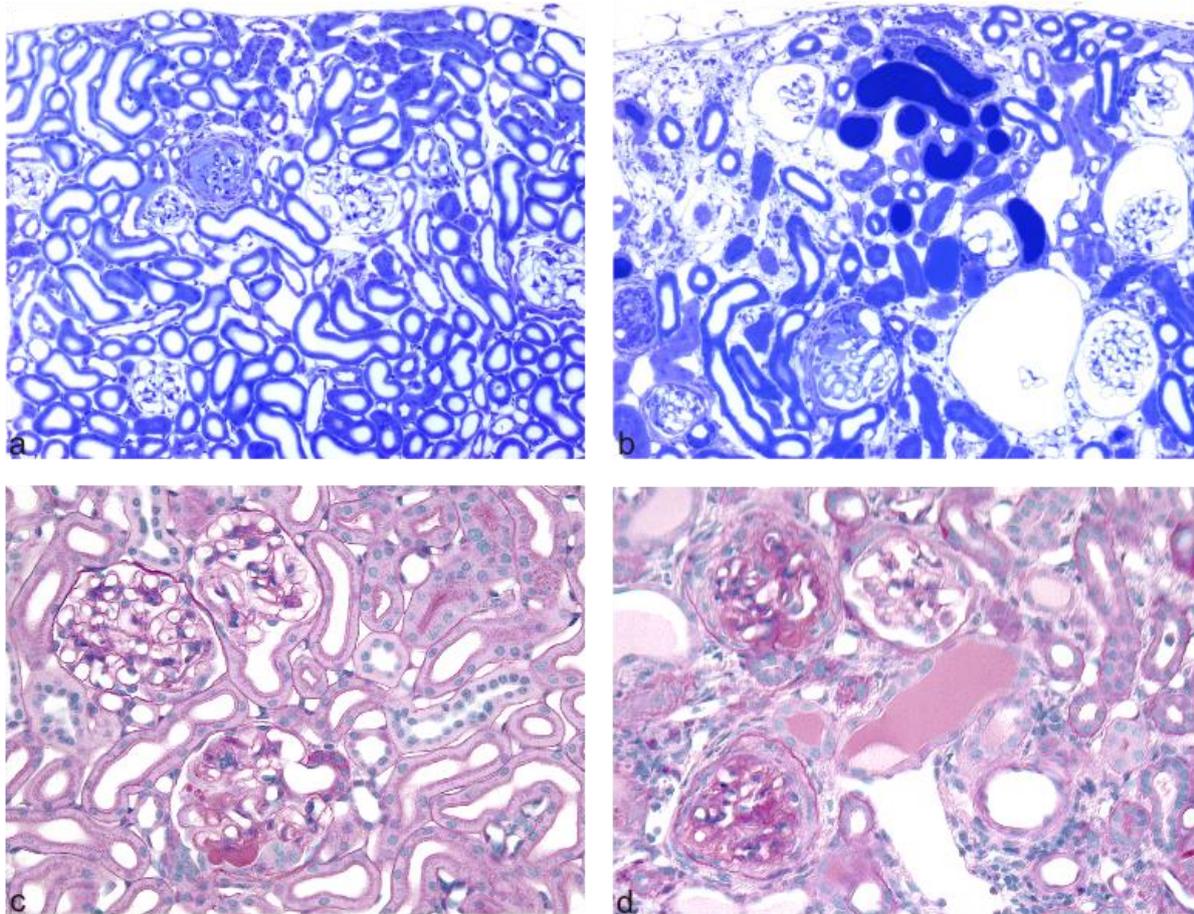
Beide Behandlungsgruppen zeigten das typische Bild einer extrakapillären GN (syn. rasch progrediente GN (RPGN)). Es fanden sich sklerosierte, kollabierte Glomerulumkapillaren mit hyalinen Ablagerungen und Anheftung des Kapillarknäuels an die Bowman-Kapsel, zum Teil auch dilatierte Kapillarschlingen. In vielen Fällen war eine Proliferation des Bowman-Kapselepitheles mit Halbmond- (crescent) Bildung, sowie eine deutliche Zunahme der mesangialen Matrix nachweisbar. In einem Teil der Glomeruli war eine Ausbreitung des glomerulären Halbmondes auf den glomerulo-tubulären Übergang mit Obstruktion desselbigen nachweisbar.

Bei der Auswertung der tubulointerstitiellen Veränderungen fielen zwei tubuläre Schädigungsmuster auf: Zum einem Tubuli mit stark hypertrophen Epithelzellen und eingengtem oder kollabiertem Lumen, zum anderen Tubuli mit dilatiertem Lumen und atrophischem, „ausgefranst“ wirkenden Epithel. In letzteren fanden sich zudem häufig luminale Ausgussbildungen (casts).

Des Weiteren zeigten die Tiere beider Gruppen Zeichen einer fibrotischen Umwandlung in Form einer zahlenmäßigen Zunahme interstitieller Zellen, ausgeprägter in der Cre(+) als in der Cre(-) Gruppe. Die interstitielle Fibrose fand sich vornehmlich als Umgebungsreaktion im Bereich degenerierter Nephrone, ohne dass ein Übergreifen auf umliegende, intakte Nephrone zu beobachten war. So war ein zum Teil sehr heterogenes Bild zu beobachten, mit morphologisch unauffälligen Nephronen, welche von einem Areal mit degenerierten Nephronen und ausgeprägter Fibrose umgeben waren, ohne dass diese auf das intakte Nephron übergriff.

Anders als erwartet war der Grad der Destruktion sowohl der Glomeruli, als auch des Tubulointerstitiums bei den Megalin-teildefizienten Cre(+) Tieren signifikant stärker als bei den Cre(-) Tieren. Die Art der morphologischen Veränderungen bzw. das Schädigungsbild waren hingegen in beiden Gruppen gleich. Obwohl die Cre(+) Tiere schwerer geschädigt waren, war das Schadensmuster lichtmikroskopisch nicht von dem der Cre(-) Tiere zu unterscheiden.

Auch im direkten Vergleich von Megalin-positiven PT mit Megalin-defizienten PT im Nierencortex der Cre(+) Tiere zeigte die Analyse keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Schädigungsmuster. Sowohl die PT, als auch das umgebende Interstitium waren unabhängig von der Megalinexpression der PT morphologisch gleichartig geschädigt.



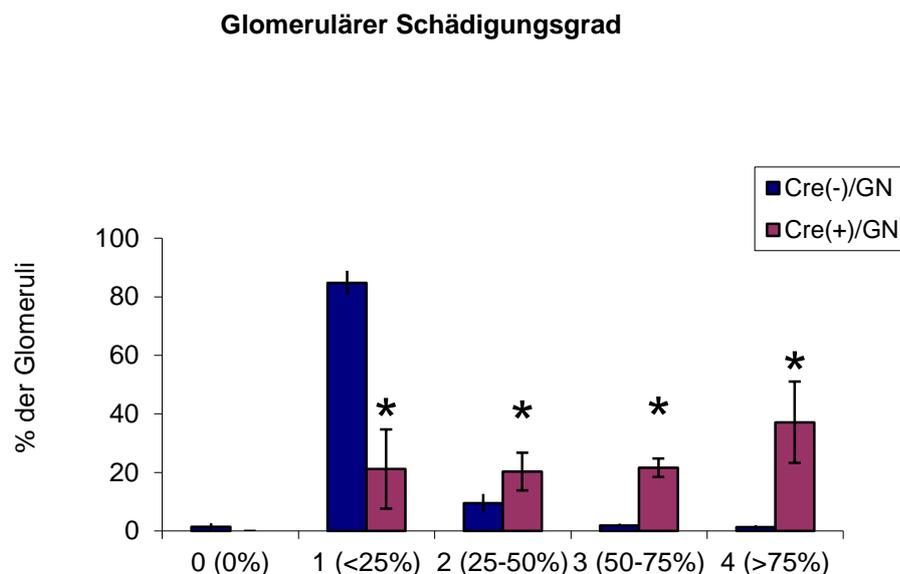
**Abbildung 10. Vergleich der Morphologie nach GN-Induktion.** Übersicht (Semidünnschnitte, Methylenblau-Azur Färbung, Vergrößerung: x80) und Detailaufnahme (Paraffinschnitte, PAS-Färbung, Vergrößerung: x100) des Nierenkortex einer Cre(-)/GN (**a** und **c**) im Vergleich zu einer Cre(+)/GN (**b** und **d**). Glomerulosklerose, tubuläre Obstruktion- und Dilatation sowie tubulointerstitielle Fibrose sind im gesamten Cortex der Cre(-)/GN Niere nachweisbar, im Cre(+)/GN Cortex aber deutlich stärker ausgeprägt. Hier zeigen sich zystisch aufgetriebene, vollständig degenerierte Glomeruli, Tubuli mit luminaler Ausgussbildung und eine vorangeschrittene Fibrosierung des Tubulointerstitiums.

Dieser morphologische Eindruck wird auch durch die Ergebnisse der Kollagen I-Immunhistochemie unterstützt (siehe Abschnitt 4.5).

Die Ausprägung der morphologischen Veränderungen wurde unter Verwendung einer semiquantitativen Schädigungseinteilung von 1-4 erfasst. Für jedes Tier wurden ein glomerulärer sowie ein tubulointerstitieller Skleroseindex (als Mittelwert der ausgewerteten Glomeruli, respektive Gesichtsfelder) gebildet.

Der Mittelwert der glomerulären Skleroseindices bei den Cre(+)/GN Mäusen lag mit 2,8 mehr als doppelt so hoch wie in der Cre(-)/GN Gruppe mit einem Mittelwert von 1,2 ( $p < 0.05$ ).

Bei den Cre(+)/GN Mäusen wies die prozentual größte Gruppe der Glomeruli (37%) den Schädigungsgrad 4 auf, während die Schädigungskategorien 1-3 etwa gleich häufig vertreten waren. Bei den Cre(-)/GN Tieren wiesen 84% der Glomeruli den Schädigungsgrad 1 auf. Die Glomeruli der Cre(-)/GN Gruppe waren somit homogener geschädigt als die der Cre(+)/GN Gruppe mit einer größeren Schädigungsvarianz.



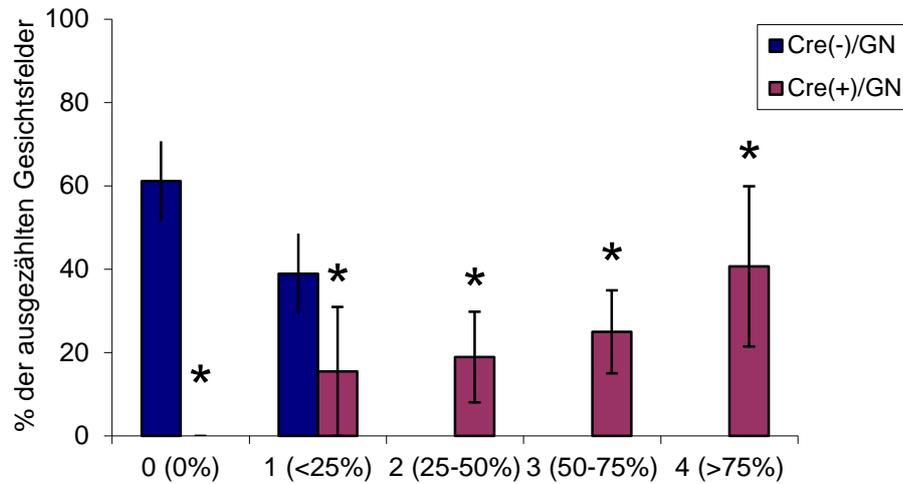
**Abbildung 11. Prozentuale Verteilung der Glomeruli auf die Schädigungskategorien 0 bis 4.** Die Prozentzahlen in Klammern geben den Sklerosegrad der Glomeruli in der jeweiligen Schädigungskategorie wider. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; n= 4; \* = Signifikante Unterschiede zur Cre(-)/GN Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Der Mittelwert der tubulointerstitiellen Schädigungsindices lag bei den Cre(+)/GN Mäusen bei 2,9 und damit mehr als 7-fach höher als bei den Cre(-)/GN Mäusen mit einem Wert von 0.4 ( $p < 0,05$ ).

Die Cre(-)/GN Tiere entwickelten nur tubulointerstitielle Schäden der Kategorie 0-1 (entsprechend einer maximalen Schädigung von unter 25% eines Gesichtsfeldes). Die Schäden der Cre(+)/GN Gruppe reichten von Grad 1 bis zu Grad 4.

Auch in Bezug auf das Tubulointerstitium waren die morphologischen Schäden in beiden Gruppen qualitativ gleichartig. Die unbehandelten Cre(+) und Cre(-) Mäuse zeigten keine Zeichen tubulointerstitieller Schädigung.

### Tubulointerstitieller Schädigungsgrad



**Abbildung 12. Prozentuale Verteilung der ausgezählten Gesichtsfelder auf die Schädigungskategorien 0 bis 4.** Die Prozentzahlen in Klammern geben die Schädigung pro Gesichtsfeld in der jeweiligen Schädigungskategorie wider. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; n= 4; \* = signifikante Unterschiede zur Cre- Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2 Elektronenmikroskopische Auswertung

Zur Analyse der ultrastrukturellen Effekte der Proteinüberladung wurden Veränderungen der Megalin-positiven (Megalin(+)) und Megalin-defizienten (Megalin(-)) Tubuluszellen der Cre(+)/GN Tiere im Vergleich zu den PT-Zellen unbehalteter Cre(+) Tiere untersucht. In der Cre(+)/GN Gruppe wurden Nephrone mit mittelstarker morphologischer Schädigung ausgewertet, welche Zeichen der glomerulären Schädigung mit Halbmondbildung und endokapillärer Inflammation, aber keine Obstruktion des glomerulo-tubulären Überganges zeigten. So war sichergestellt, dass die dazugehörigen PT-Zellen einer Proteinüberladung ausgesetzt waren. Einen Überblick über die untersuchten feinstrukturellen Parameter gibt Tabelle 5.

**Tabelle 5. Numerische Auswertung der strukturellen Parameter**

Parameter	Megalin(-) ohne GN	Megalin(+) ohne GN	Megalin(-) mit GN	Megalin(+) mit GN
Epithelhöhe in $\mu\text{m}$	5.50 $\pm$ 0.81	5.73 $\pm$ 0.35	5.03 $\pm$ 0.25	7.64 $\pm$ 0.56*
Basalmembran- Dicke in $\mu\text{m}$	0.09 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.05*	0.16 $\pm$ 0.04*
Mitochondrien in vol%	46.44 $\pm$ 8.41	42.04 $\pm$ 5.53	30.67 $\pm$ 4.06*	22.89 $\pm$ 3.12*
Primäre Lysosomen in vol%	0.79 $\pm$ 0.22†	1.77 $\pm$ 0.31	1.18 $\pm$ 0.49	11.08 $\pm$ 2.19*
Sekundäre Lysosomen in vol%	1.36 $\pm$ 0.53†	3.64 $\pm$ 1.79	2.17 $\pm$ 0.66*	9.51 $\pm$ 2.67*

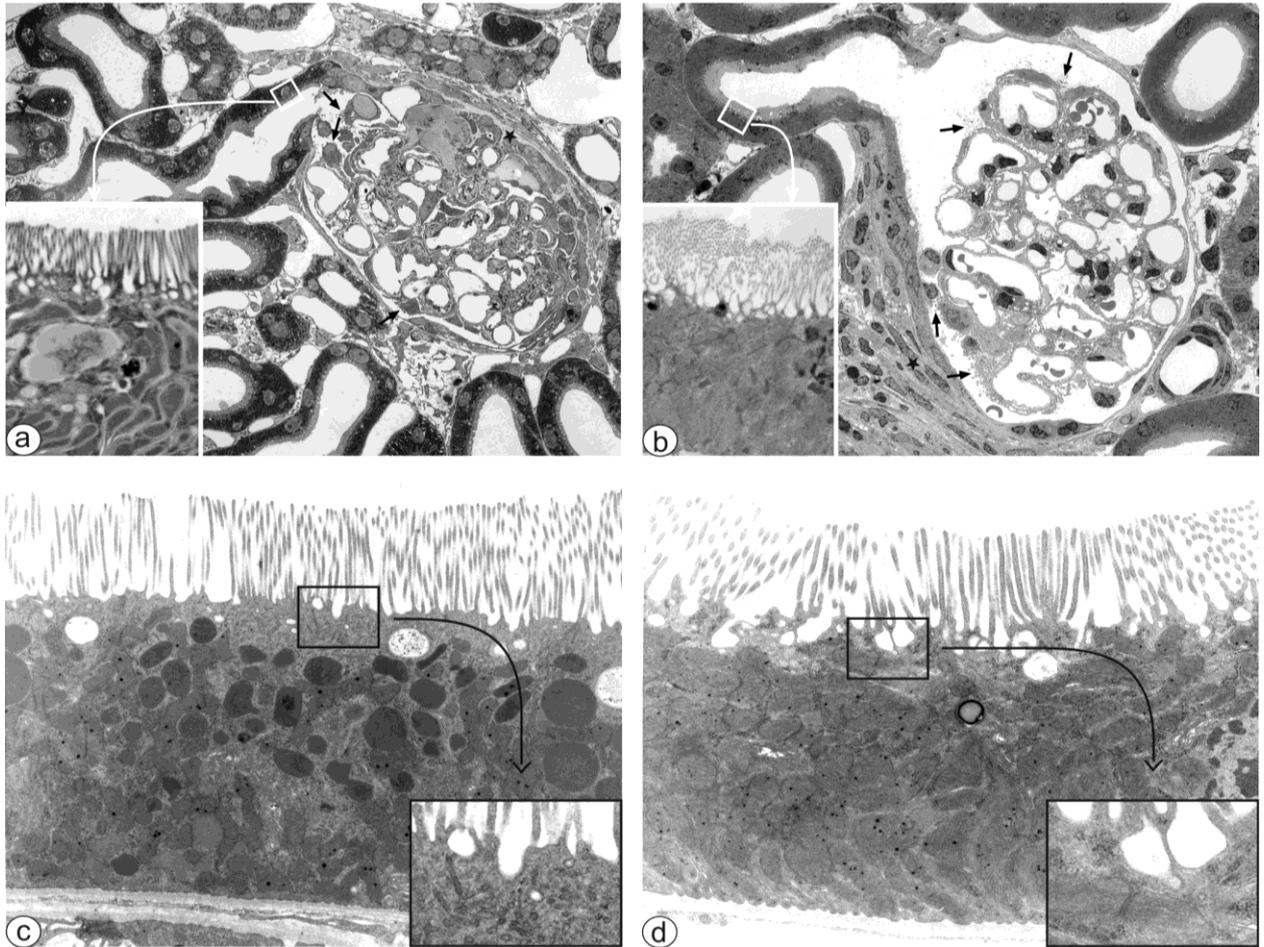
Numerische Auswertung der strukturellen Parameter von proximalen Tubuluszellen in Cre(+) Mäusen ohne versus mit Glomerulonephritis. Megalin(-) Zellen haben einen im Vergleich geringer entwickelten lysosomalen Apparat. Die Zellhöhe, die Basalmembran-Dicke sowie das mitochondriale Volumen unterscheiden sich nicht signifikant. Nach GN-Induktion kommt es in Megalin(+) Zellen zu einer deutlichen Zunahme der primären und sekundären Lysosomen und der Höhe des Epithels. In beiden Zellvarianten kommt es im Rahmen der GN zu einer Verbreiterung der Basalmembran und einer Abnahme des mitochondrialen Volumens. n= 4; Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Vol%= Prozentualer Anteil am Zellvolumen; †= Signifikante Unterschiede Megalin(+) versus Megalin(-) Zellen ( $p < 0,05$ ).; \* = Signifikante Unterschiede zur entsprechenden Gruppe ohne GN (Kontrollgruppe versus Behandlungsgruppe) ( $p < 0,05$ ).

Wie erwartet war der endozytotische Apparat in den Megalin(-) Zellen geringer entwickelt als bei den Megalin(+) Zellen. Zudem fehlten in den Megalin-defizienten Zellen die dense apical tubules (DAT) im subapicalen Zellkompartiment (siehe Kapitel

3.3.3). Ansonsten waren die unbehandelten Megalin(-) Zellen im Vergleich morphologisch unauffällig; hinsichtlich der evaluierten Parameter Epithelhöhe, Beschaffenheit des Bürstensaumes, Basalmembran-Dicke und mitochondriales Volumen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Proteinaufnahme durch die Megalin(+) Zellen nach Induktion der GN führt zu einer starken Aktivierung des Endozytoseapparates und einer deutlichen Zunahme von primären und sekundären Lysosomen im gesamten Zytosol. Ebenfalls kam es zu einer signifikanten Zunahme der Epithelhöhe im Sinne einer zellulären Hypertrophie. Das prozentuale mitochondriale Volumen nahm hingegen signifikant ab. Die Mikrovilli des Bürstensaumes zeigten in Bezug auf die Höhe und Dichte keine signifikanten Veränderungen (Daten nicht dargestellt). Trotz der ausgeprägten Aktivierung des lysosomalen Apparates im Rahmen der Proteinüberladung in den Megalin(+) Zellen waren keine hiermit assoziierten, destruktiven Veränderungen im Sinne einer Autophagie, Entdifferenzierung oder Atrophie der Zellen zu erkennen. Die Induktion der GN führte überraschenderweise bei beiden Zelltypen zu einer signifikanten Verbreiterung der Basalmembran.

Die Megalin-defizienten Zellen zeigten nach Induktion der GN keine signifikante Veränderung der Zellhöhe oder des Volumens der primären Lysosomen. Allerdings war eine signifikante Reduktion des mitochondrialen Volumens sowie eine signifikante Zunahme sekundärer Lysosomen zu beobachten, wenngleich der absolute Anteil der sekundären Lysosomen am Zytosol immer noch unter dem Wert der Megalin(+) Zellen der unbehandelten Mäusen lag ( $2.17 \pm 0.66$  versus  $3.64 \pm 1.79$  Volumen%).

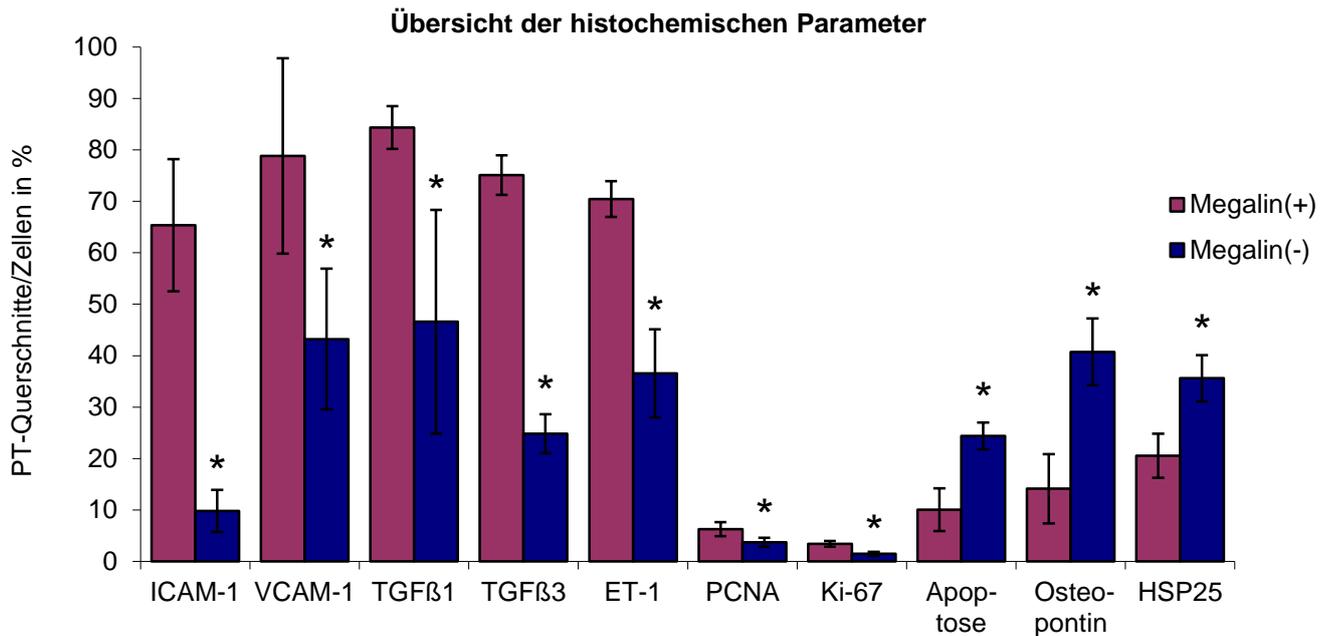


**Abbildung 13. Elektronenmikroskopische Morphologie.** Glomeruli von Cre(-)/GN (a) und Cre(+)/GN (b) Nieren. Beide Glomeruli zeigen inflammatorische Veränderungen wie Mikrovilli-Transformation (Pfeile) und Halbmond (crescent)-Ausbildung (Stern). Bei beiden Glomeruli ist das initiale Tubulussegment intakt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt einen normal ausgebildeten endozytotischen Apparat in der Cre(-) Zelle in (a). Hingegen fehlt dieser in der Cre(+) Zelle in (b). In (c) eine Cre(-)/GN Zelle des S1-Segmentes eines PT. Im vergrößerte Ausschnitt der endozytotische Apparat mit den pathognomonischen Recycling-Endosomen des PT (DAT), in denen Megalin zurück zur apikalen Zellmembran gelangt. In dem vergrößerten Ausschnitt der Megalin(-) Zelle des S1-Segmentes in (d) fehlen die entsprechenden Zellorganellen. Zahlreiche primäre und sekundäre Lysosomen befinden sich im Zytoplasma in (c), nicht aber in (d). Zeichen der Autophagie, Entdifferenzierung oder Atrophie zeigt keine der Zellen. Vergrößerung: x450 in a und b; x4600 in c und d.

## 4.4 Immunhistochemische Auswertung

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Parameter lag der Fokus auf dem Vergleich zwischen Megalin-positiven (Megalin(+)) und Megalin-defizienten (Megalin(-)) PT-Querschnitten bzw. PT-Zellen. Die Auswertung erfolgte daher bei den glomerulonephritischen, Megalin-teildefizienten Cre(+)/GN Tieren (n=4), da hier der direkte Vergleich zwischen beiden Zelltypen möglich war. Die Cre(+) und Cre(-) Mäuse der Kontrollgruppen sowie die Cre(-)/GN Mäuse dienten hier nur dem qualitativen Vergleich. Es wurden pro Tier jeweils zwei Schnitte des gesamten Nierenkortex ausgewertet.

Untersucht wurden Marker, denen immunologische, inflammatorische und profibrotische Eigenschaften zugesprochen werden oder die als Stressproteine fungieren (siehe auch Abschnitt 1.2.2.3): Die Analyse der Expression von Inter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1 und -3), Endothelin-1 (ET-1), Osteopontin (OP) und Hitzeschockprotein 25 (HSP25) erfolgte jeweils in Doppelmarkierung mit einem Megalin-Antikörper. Gezählt wurden Megalin(+) und Megalin(-) PT-Querschnitte hinsichtlich des simultanen Nachweises der o.g. Proteine. Ähnlich erfolgte die Auswertung von Vascular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), des Ki-67 Antigen (Ki-67) und des Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) sowie der TUNEL-Färbung, nur dass die Auszählung hier auf Zellebene erfolgte. Nach Doppelmarkierung mit Megalin wurde jede einzelne PT-Zelle hinsichtlich der Expression von Megalin und der gleichzeitigen Expression einer der beiden Parameter ausgezählt. Um eine Kreuzreaktion der Antikörper auszuschließen, wurden parallel zu den Doppelmarkierungen die Antikörper einzeln auf Serienschnitte aufgetragen und diese mit den doppelmarkierten Gewebsschnitten verglichen. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede im Expressionsmuster. Eine Übersicht über die Expression der untersuchten Parameter durch Megalin(+) und Megalin(-) PT-Zellen gibt Abbildung 14.



**Abbildung 14. Quantitative Übersicht der histochemischen Parameter in Abhängigkeit von der Megalin-Expression.** Für ICAM-1, TGF- $\beta$ 1/3, ET-1, Osteopontin und HSP25 ist der prozentuale Anteil der exprimierenden PT-Querschnitte dargestellt. Für Apoptose, Ki-67, PCNA und VCAM-1 ist der prozentuale Anteil exprimierender PT-Zellen angegeben. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; n= 4; \* = signifikante Unterschiede zu Megalin(+) PT-Querschnitten/Zellen ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.1 Adhäsionsmoleküle

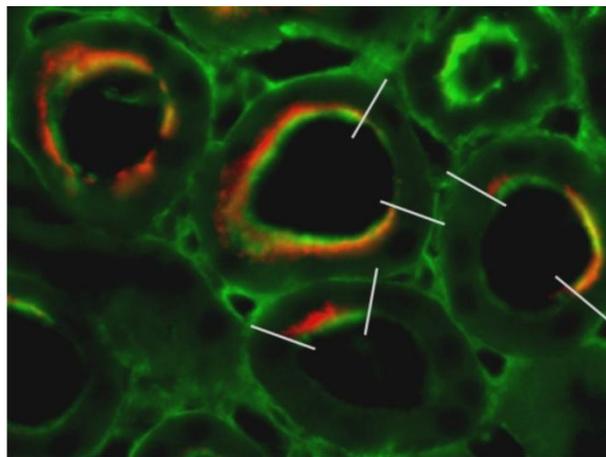
##### 4.4.1.1 Inter Cellular Adhesion Molecule-1

ICAM-1 wurde bei den Tieren beider Kontrollgruppen nur von vereinzelt PT-Zellen im Bereich der Bürstensaummembran, sowie von kapillären Endothelzellen exprimiert. Die Induktion der GN führte zu einer starken Zunahme des Signals in der Bürstensaummembran der PT-Zellen und in den Kapillarendothelien. ICAM-1 erschien als ein zeitlich „früher“ Marker tubulärer Schädigung, da es auch von morphologisch nur mäßig geschädigten PT gebildet wurde. Die ICAM-1 Expression war unabhängig vom tubulären Schädigungsmuster (siehe 4.3.1), sowohl in hypertrophierten Tubuli mit kollabiertem Lumen, als auch in atrophischen Tubuli zu finden.

ICAM-1 wurde zunächst in Korrelation mit der Megalinexpression durch die PT-Querschnitte untersucht. Dazu wurden Doppelmarkierungen mit beiden Antikörpern angefertigt.

Bei allen Tieren der Cre(+)/GN Gruppe zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen ICAM-1 und Megalin-Färbeverhalten.

Von den Megalin(+) Tubuli waren  $65,4\% \pm 22,2\%$  ICAM-1 positiv, während nur  $9,8\% \pm 7,1\%$  der Megalin(-) Tubuli ICAM-1 positiv waren ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 15. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von ICAM-1 und Megalin in Cre(+)/GN.** ICAM-1 (grün) und Megalin (rot) sind im Bürstensaum zum Großteil kolokalisiert. Im Bereich direkter Fusion erscheint das Signal gelb. Die Balken markieren die Grenze zwischen Megalin(+) und Megalin(-) Zellen. Vergrößerung: x200.

Um zu untersuchen, ob diese Korrelation auf die Proteinaufnahme durch die Megalin-positiven Zellen zurückzuführen ist, wurde zusätzlich eine Doppelmarkierung mit ICAM-1 und intrazellulärem IgG durchgeführt.

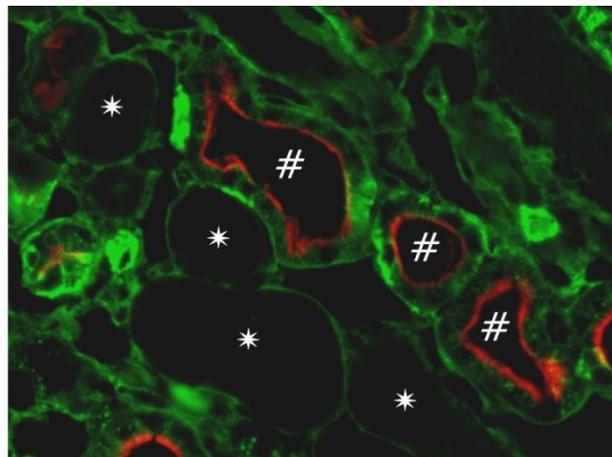
Dabei konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Resorption von IgG und der Bildung von ICAM-1 belegt werden.

$80,6\% \pm 8,2\%$  der PT-Zellen mit deutlicher Proteinakkumulation im Zytoplasma waren ICAM-1 positiv gegenüber  $40,4\% \pm 16,0\%$  der PT-Zellen ohne Proteinresorption ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.1.2 Vascular Adhesion Molecule-1

In den Nieren der Kontrolltiere wurde VCAM-1 nur als schwaches Signal von Gefäßendothelien exprimiert. Die glomerulonephritischen Tiere zeigten ein deutliches VCAM-1 Signal im basolateralen Kompartiment geschädigter PT-Zellen und im Endothel kleinerer und größerer Gefäße. Zudem wurde ein VCAM-1 Signal in Bereichen mit Halbmond (crescent-) Bildung durch das glomeruläre Kapselepithel gefunden. Zeitlich war VCAM-1 als „später“ Schädigungsmarker einzuordnen, da es überwiegend von morphologisch deutlich veränderten PT- Zellen vorgefunden wurde. Anders als ICAM-1 wurde VCAM-1 daher vielfach nicht homogen innerhalb eines gesamten PT-Querschnittes, sondern nur von den am stärksten geschädigten PT-Zellen gebildet. Die Auswertung erfolgte daher für jede PT-Zelle innerhalb des PT-Querschnittes einzeln. Die in der Cre+/GN Gruppe durchgeführte immunhistochemische Doppelmarkierung mit VCAM-1 und Megalin zeigte eine signifikante Korrelation.

78,8% ± 25,1% der Megalin(+) Zellen synthetisierten VCAM-1, wohingegen nur 43,2% ± 13,7% der Megalin(-) Zellen VCAM-1 positiv waren ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 16. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von VCAM-1 und Megalin in Cre(+)/GN.** Eine basolaterale VCAM-1 Expression (grün) findet sich vornehmlich in Megalin(+)-PT Querschnitten (#, luminales rotes Signal). In den Megalin(-) PT-Querschnitten (\*) ist kein VCAM-1 Signal nachweisbar. Vergrößerung: x150.

## 4.4.2 Zytokine

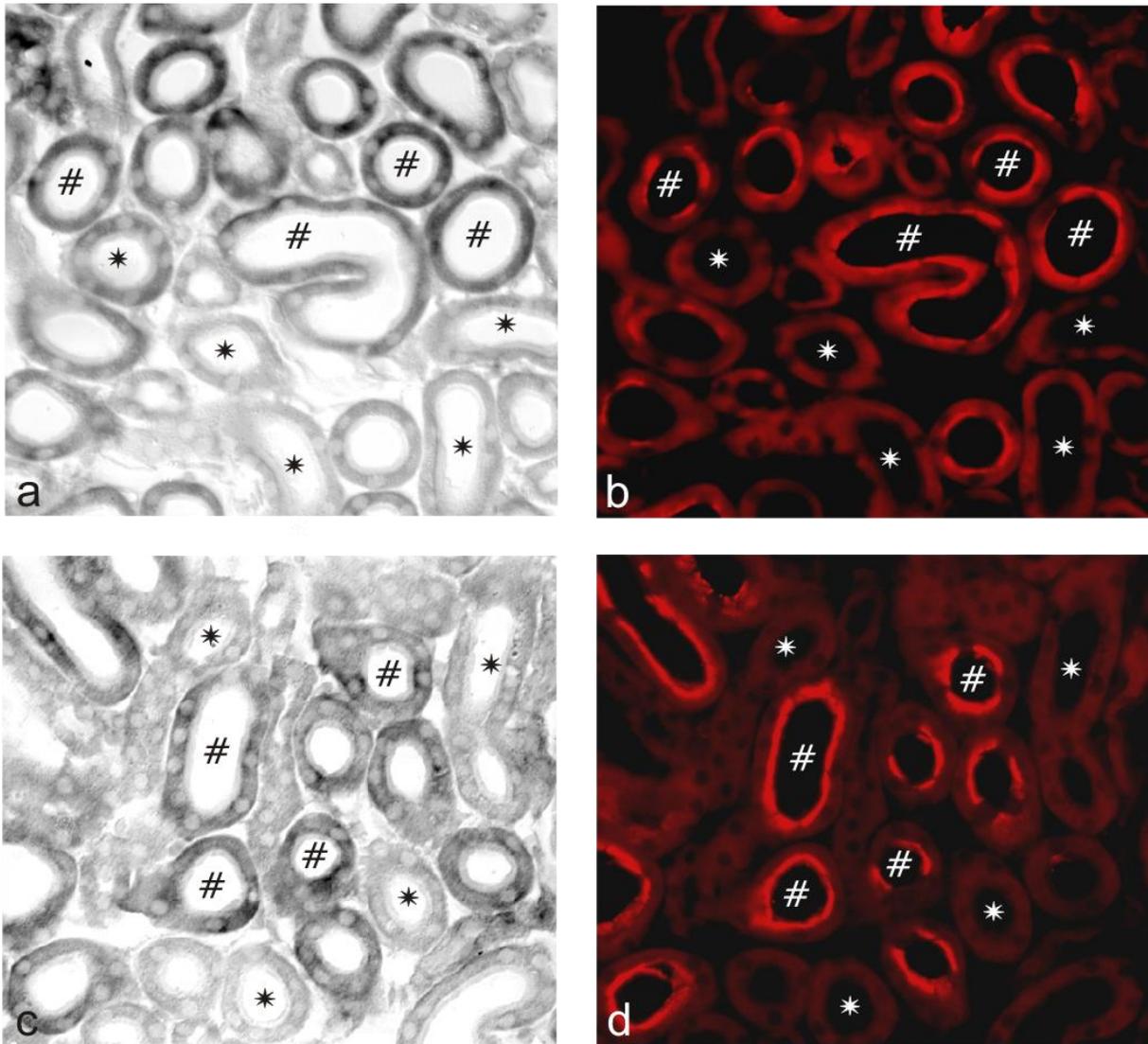
### 4.4.2.1 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 und - $\beta$ 3

Als profibrotische Parameter wurden TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 untersucht. Mittels In-situ Hybridisierung wurde die mRNA-Expression beider Parameter sichtbar gemacht. In beiden Kontrollgruppen war nur im distalen Tubulus und im Sammelrohr ein Signal nachzuweisen. Bei den Tieren der Glomerulonephritis-Gruppen wurden beide Parameter in den Glomeruli und von den proximalen sowie distalen Tubuli gebildet. Es bestand kein Unterschied hinsichtlich der Signalintensität zwischen dem S1/2 und dem S3 Segment der proximalen Tubuli.

Quantitativ ausgewertet wurden die Nieren der Cre(+)/GN Tiere, wiederum im Vergleich von Megalin(+) und Megalin(-) Tubulus-Querschnitten.

Bei  $84,4\% \pm 7,21\%$  der Megalin(+) Tubuli war TGF- $\beta$ 1-mRNA im Zytoplasma nachweisbar, gegenüber  $46,6\% \pm 37,7\%$  der Megalin(-) Tubuli ( $p < 0,05$ ). TGF- $\beta$ 3 wurde von  $75,1\% \pm 6,7\%$  der Megalin(+) Tubuli gebildet, aber nur von  $24,8\% \pm 6,6\%$  der Megalin(-) Tubuli ( $p < 0,05$ ). Die Synthese von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3- mRNA korrelierte somit signifikant mit der Expression von Megalin.

Die hohe Standardabweichung bei den Megalin(-)/TGF- $\beta$ 1 positiven PT-Querschnitten erklärt sich durch die unterschiedliche Ausprägung der morphologischen Schäden bei den Tieren der Cre(+)/GN Gruppe. Während bei den schwächer geschädigten Nieren kaum Megalin(-) Tubuli TGF- $\beta$ 1 exprimierten, so war bei den morphologisch stärker veränderten Tieren der Prozentsatz TGF- $\beta$ 1 exprimierender Megalin(-) PT deutlich höher. Der Anteil der TGF- $\beta$ 1 exprimierenden Megalin(+) PT zeigte hingegen, unabhängig vom Schädigungsgrad der Nieren, nur eine geringe Varianz.



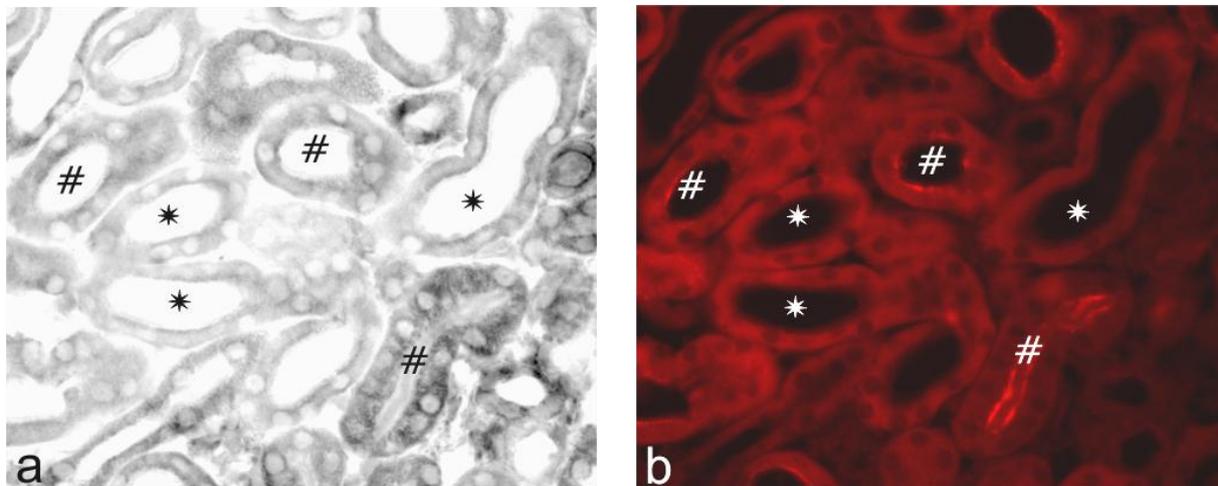
**Abbildung 17. Doppelfärbung von TGF- $\beta$  und Megalin in Cre(+)/GN.** TGF- $\beta$ 1 mRNA (a, In-situ Hybridisierung) und TGF- $\beta$ 3 mRNA (c, In-situ Hybridisierung) finden sich vornehmlich in Megalin(+) PT-Querschnitten (b und d, #, luminal rotes Signal) und nur vereinzelt in Megalin(-) PT (b und d, \*). Vergrößerung: x200.

Analog zu ICAM-1 sollte auch hier die Korrelation zwischen der Ausschüttung von TGF- $\beta$  und der proximal-tubulären Proteinresorption direkt untersucht werden. In der Doppelmarkierung von TGF- $\beta$ 3 und intrazellulärem IgG exprimierten 91,2%  $\pm$  4,9% der IgG positiven PT TGF- $\beta$ 3, während nur 43,4%  $\pm$  6,7% der PT ohne nachweisbare IgG Aufnahme TGF- $\beta$ 3- positiv waren ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2.2 Endothelin-1

Als weiterer profibrotischer Marker wurde ET-1 mittels In-situ Hybridisierung untersucht. In den Nieren der Kontrolltiere wurde ET-1-mRNA nur schwach exprimiert. Das stärkste Signal fand sich hier in den distalen Tubuli. Die Induktion der Glomerulonephritis führte zu einer Zunahme des Signals in den Glomeruli, dem Interstitium, sowie den distalen und proximalen Tubulusquerschnitten.

Auch ET-1 zeigt eine signifikante Korrelation Megalin. In den glomerulonephritischen Cre(+)/GN Mäusen bildeten 70,5% ± 6,0% der Megalin(+) Tubuli ET-1, 36,5% ± 14,8% der Megalin(-) Tubuli waren ET-1- positiv ( $p < 0,05$ ).



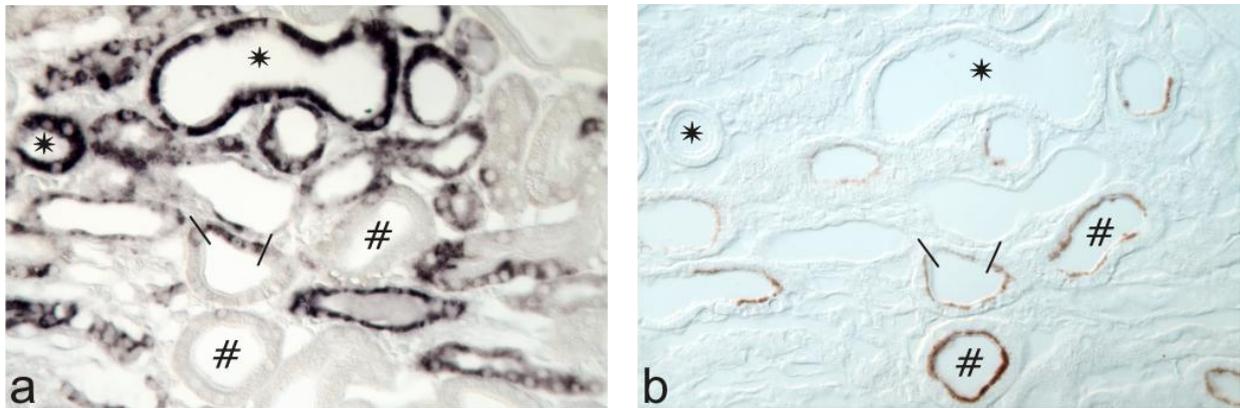
**Abbildung 18. Doppelfärbung von ET-1 und Megalin in Cre(+)/GN.** ET-1 mRNA (a, In-situ Hybridisierung) wird überwiegend in Megalin(+) PT-Querschnitten (b, #, luminal rotes Signal), seltener in Megalin(-) PT (b, \*) exprimiert. Vergrößerung: x150.

#### 4.4.3 Zelluläre Stressproteine

##### 4.4.3.1 Osteopontin

OP wurde in den Nieren der Kontrolltiere im medullären Sammelrohr synthetisiert. Nach Induktion der Glomerulonephritis fanden sich zusätzlich ein glomeruläres Signal und ein deutliches Signal in den proximalen- und distalen Tubuli. Im Unterschied zu den bisher besprochenen Markern, wurde OP in den Cre(+)/GN Tieren mit 40,7% ± 0,5%

signifikant häufiger von den Megalin(-) PT exprimiert als von den Megalin(+) PT mit  $14,1\% \pm 11,5\%$  ( $p < 0,05$ ).

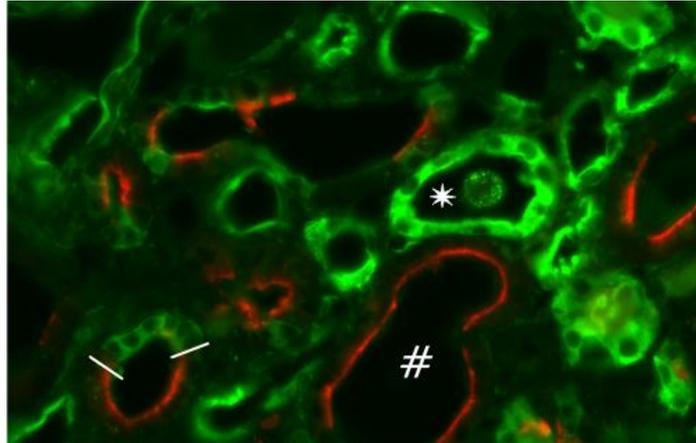


**Abbildung 19. Färbung von Osteopontin und Megalin in Cre(+)/GN.** Serienschnitte mit Nachweis von OP-mRNA (a, In-situ Hybridisierung) nur in Megalin(-) PT-Querschnitten (b, \*), während Megalin(+) PT (b, #, braune Immunoperoxidase-Färbung) keine OP-mRNA bilden. Die Balken markieren die Grenze zwischen Megalin(+) und Megalin(-) Zellen. Vergrößerung: x150.

#### 4.4.3.2 Hitzeschockprotein 25

Die Cre(-) und Cre(+) Kontrolltiere exprimierten HSP25 im Sammelrohr, in interstitiellen Zellen des Cortex und des Markes, sowie im Endothel kleiner Gefäße. In den glomerulonephritischen Nieren kam es zu einer starken Zunahme des Signals in den Glomeruli und den proximalen Tubuli. Eine ebenfalls deutliche, aber im Vergleich geringere Zunahme der Signalintensität war in den distalen Tubuli zu beobachten.

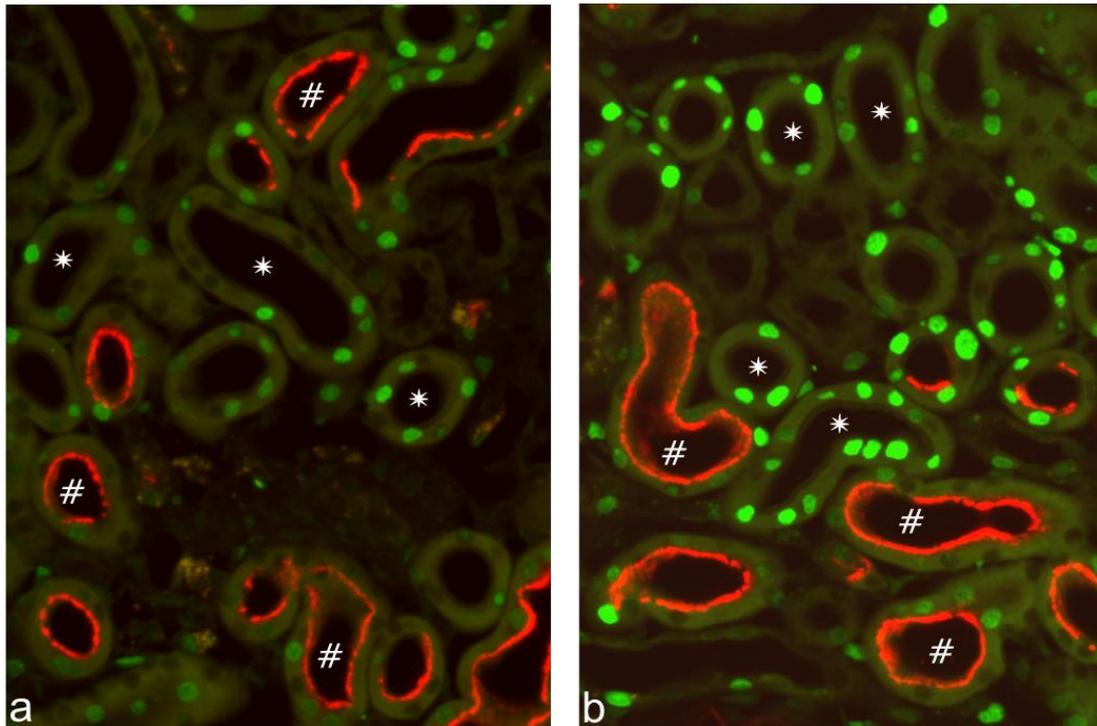
Wie Osteopontin wurde auch HSP25 in den Cre(+)/GN Mäusen signifikant häufiger von Megalin(-) Tubuli exprimiert.  $35,6\% \pm 4,5\%$  der Megalin(-) PT zeigten ein starkes HSP25 Signal gegenüber  $20,5\% \pm 4,3\%$  der Megalin(+) PT ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 20. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Hitzeschockprotein 25 und Megalin in Cre(+)/GN.** HSP25 (grün) wird häufiger von Megalin(-) PT-Querschnitten (\*) als von Megalin(+) PT (#, luminal rotes Signal) gebildet. Die Balken markieren die Grenze zwischen Megalin(+) und Megalin(-) Zellen. Vergrößerung: x150.

#### 4.4.4 Apoptose

Apoptotische Zellen wurden mit der TUNEL-Methode gefärbt. Es waren in den Cre(+) Kontrolltieren 0,061% aller Nucleoli des Megalin(+) PT apoptotisch gegenüber 0,150% in den Megalin(-) PT ( $p < 0,05$ ). Nach Induktion der RPGN kam es in den Cre(+) Tieren bei beiden Zelltypen zu einer Zunahme der Apoptoserate, welche mit  $22,4\% \pm 4,2\%$  bei den Megalin(-) Zellen signifikant größer war als bei den Megalin(+) Zellen mit  $9,6\% \pm 2,6\%$ . ( $p < 0,05$ , siehe auch Tabelle 6).



**Abbildung 21. Doppelfärbung von apoptotischen PT-Zellen und Megalin.** In der Cre(+) Kontrollgruppe (a) zeigt sich eine höhere Apoptosefraktion (TUNEL-Färbung, grünes Signal) in den Megalin(-) (\*) als in den Megalin(+) (#) PT-Querschnitten. (b) Nach Induktion der GN kommt es zu einer Zunahme apoptotischer Zellen vornehmlich in Megalin(-) PT. Vergrößerung: x150.

#### 4.4.5 Proliferation

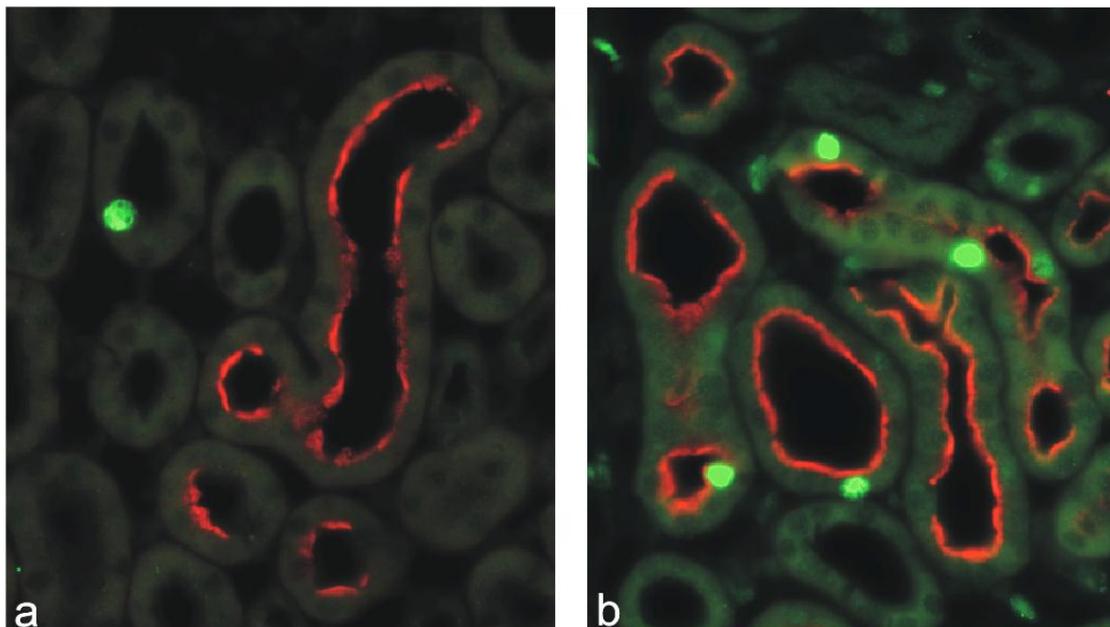
Als Proliferationsmarker wurden die Antigene Ki-67 und PCNA mittels Antikörper detektiert. In den Megalin(-) Zellen der unbehandelten Cre(+) Tiere wurden Ki-67 und PCNA im Vergleich zu den Megalin(+) Zellen vermehrt exprimiert. Nach Induktion der GN kam es in beiden Zelltypen zu einer vermehrten Expression beider Marker, wobei die Wachstumsfraktion in den Megalin(+) Zellen signifikant höher war, so dass für diese Zellen ein stärkerer Proliferationsstimulus postuliert werden muss ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6. Übersicht über die Zellzyklus-Parameter**

	Cre(+)/Kontrolle Megalin(+) Zellen	Cre(+)/Kontrolle Megalin(-) Zellen <sup>b</sup>	Cre(+)/GN Megalin(+) Zellen <sup>c</sup>	Cre(+)/GN Megalin(-) Zellen <sup>b,c</sup>
Ki-67	$6.9 \times 10^{-5}$	$3.9 \times 10^{-4}$	$3.4 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-2}$
PCNA	$1.0 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-4}$	$6.3 \times 10^{-2}$	$3.7 \times 10^{-2}$
Apoptose	$6.1 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-3}$	$9.6 \times 10^{-2}$	$2.4 \times 10^{-1}$

Verglichen werden Megalin(+) und Megalin(-) Zellen des PT der Cre(+) Gruppen. Angegeben ist die Anzahl der positiven Zellkerne bezogen auf die Gesamtzahl der Zellkerne des PT.

Signifikanz: <sup>b</sup> =  $p < 0,05$  für Megalin(+) versus Megalin(-) Zellen; <sup>c</sup> =  $p < 0,05$  für Cre(+)/Kontrolle versus Cre(+)/GN.

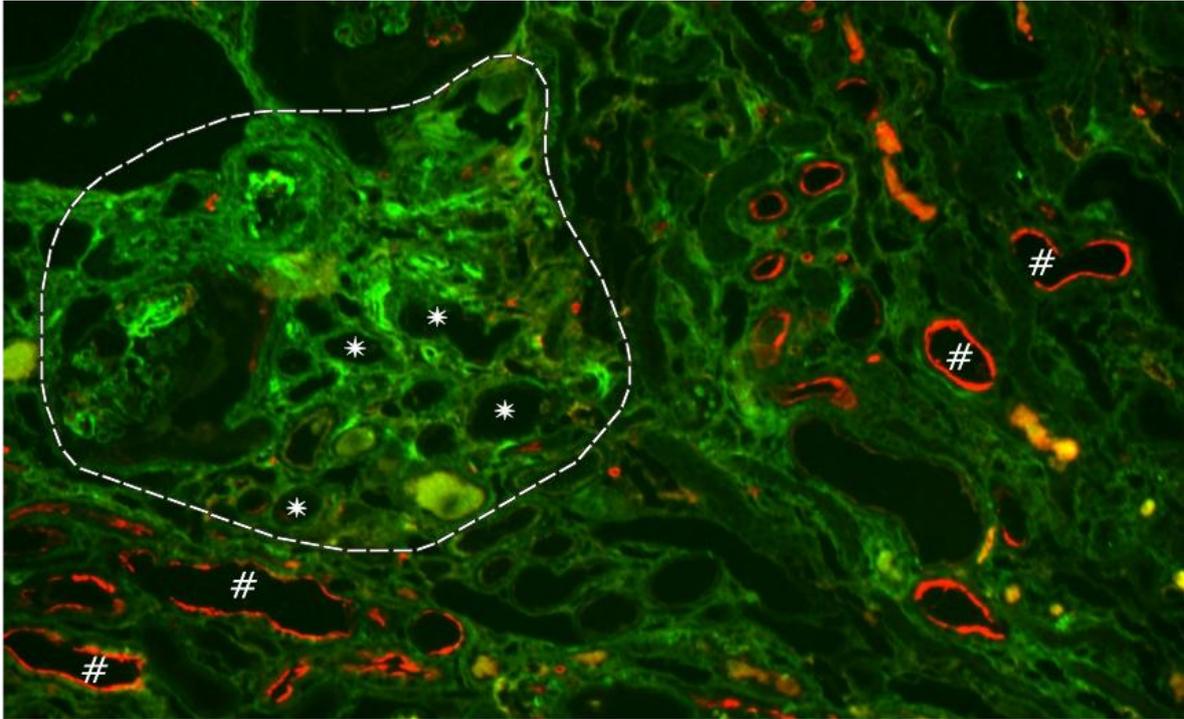


**Abbildung 22. Doppelfärbung von Ki-67 und Megalin in Cre(+)/GN.** (a) Expression von Ki-67 (grün) in einer Megalin(-) PT-Zelle der Cre(+) Kontrollgruppe. (b) Nach Glomerulonephritis-Induktion kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Ki-67 Expression in Megalin(+) PT-Zellen (luminal rotes Signal). Vergrößerung: x150.

## 4.5 Fibrose und interstitielle Makrophagen-Immigration

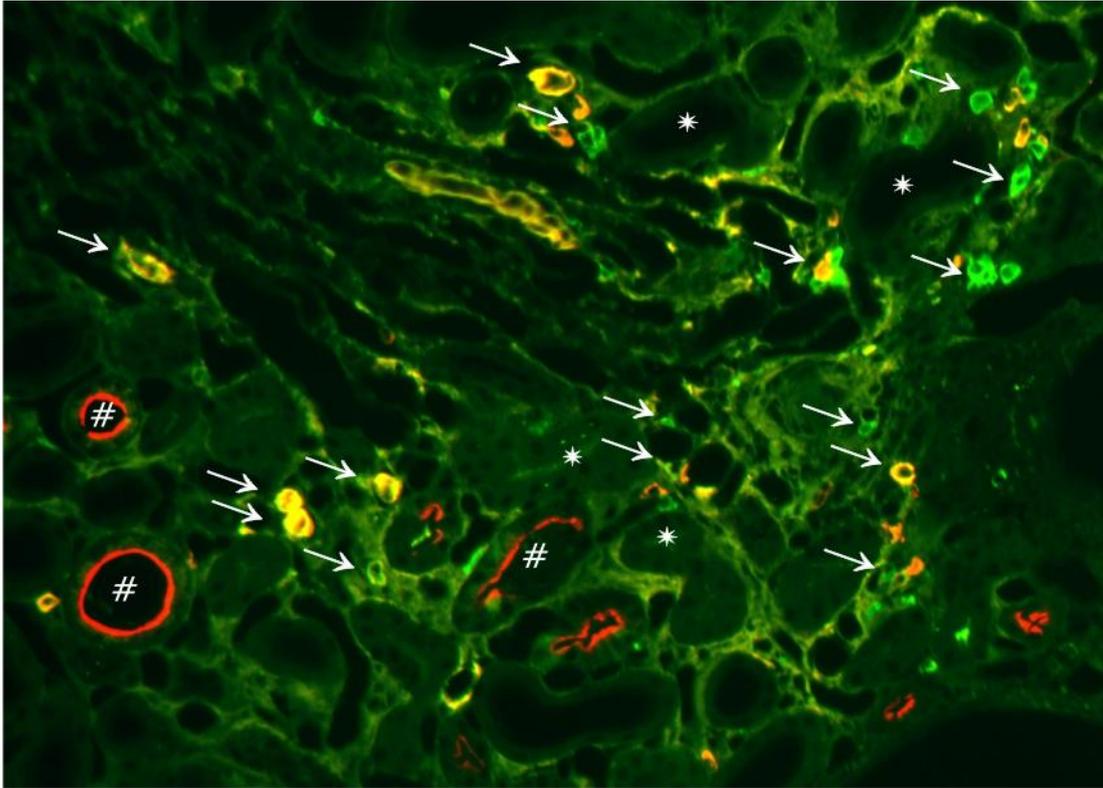
Die ausgewerteten inflammatorischen, chemotaktischen und profibrotischen Marker sollten in Ihrer funktionellen Bedeutung in diesem Modell weiter untersucht werden. Dazu wurden als Indikator für die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose die Bildung von Kollagen I mittels Immunhistochemie evaluiert. Um einen Effekt der exprimierten Parameter auf die Makrophagen-Chemotaxis zu bestimmen, wurden zudem Färbungen mit einem CD68-Antikörper durchgeführt, welcher die Makrophagen markiert. Im Fokus der Auswertung stand eine mögliche topographische Korrelation zu der Expression von Megalin.

Die Bildung von Kollagen I war in den Cre(+)/GN Mäusen im Vergleich zu den nicht behandelten Cre(+) Mäusen deutlich erhöht. Eine Zunahme der Kollagen I Synthese war besonders in der Umgebung morphologisch stark veränderter Nephrone festzustellen. Diese fibrotische Umgebungsreaktion hatte vom morphologischen Aspekt einen abgrenzenden Charakter, ohne dass ein Übergreifen auf benachbarte, morphologisch unauffällige Nephrone zu beobachten war. Um einen Zusammenhang zwischen der gesteigerten Kollagensynthese und dem Vorhandensein von Megalin zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Doppelmarkierung mit Megalin und Kollagen I durchgeführt. Eine topographische Korrelation zwischen Megalin-positiven oder Megalin-defizienten PT und fibrotischen Arealen war dabei nicht herzustellen.



**Abbildung 23. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Kollagen I und Megalin in Cre(+)/GN.** Kollagen (grün) wird vornehmlich in Bereichen glomerulärer und tubulointerstitieller Degeneration exprimiert, hier im Bereich eines Nephrons (gestrichelte Linie) mit vornehmlich Megalin(-) PT (\*). In den angrenzenden Megalin(+) PT (#) zeigt sich kein verstärktes Kollagen I Signal. Vergrößerung: x90.

Die Expression der Makrophagenmarkers CD68 war ebenfalls in den Cre(+)/GN Mäusen deutlich gesteigert, vornehmlich in stark fibrosierten Arealen. In den unbehandelten Cre(+) Mäusen waren nur einzelne CD68-positive Zellen vorhanden. Auch mit CD68 wurde eine Doppelfärbung mit Megalin durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang festzustellen. Auch hier konnte keine Korrelation gezeigt werden. Die CD68-positiven Zellen waren in fibrotischen Arealen diffus im Interstitium verteilt, ohne das eine Häufung im Bereich Megalin(+) oder Megalin(-) proximaler Tubuli bestand.



**Abbildung 24. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von CD68 und Megalin in Cre(+)/GN.** CD68-positive Makrophagen (grün/gelbe Fluoreszenz, Pfeile weisen auf Zellanhäufungen sowie einzelne Zellen) befinden sich diffus verteilt in Arealen mit tubulointerstitieller Fibrose, zeigen aber keine topographische Assoziation zu Megalin(+) (#) oder Megalin(-) (\*) PT-Querschnitten. Vergrößerung: x100.

# 5. Diskussion

## 5.1 Das Modell der RPGN in der Maus mit nierenspezifischer Megalindeizienz

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der durch die nierenspezifische Megalindeizienz aufgehobenen, proximal-tubulären Proteinendozytose auf den Krankheitsverlauf in dem Modell einer anti-GBM-Antikörper Nephritis untersucht.

Die in dieser Arbeit verwendete Megalin-Knockout Maus mit nierenspezifischer Megalindeizienz (Megalin<sup>lox/lox</sup>apoE-Cre) wurde hinsichtlich Ihres Phänotyps und insbesondere der Nierenfunktion bereits umfassend charakterisiert (Leheste et al. 2003; Bachmann et al. 2004). Die Mäuse entwickelten sich normal und zeigten unter Standardernährung keine Einschränkung der Nierenfunktion im Sinne einer Niereninsuffizienz. Damit war die Voraussetzung zur Verwendung dieses Mausstammes gegeben, da eine a priori eingeschränkte Nierenfunktion die funktionelle Aussage des Tiermodells beeinträchtigt hätte.

Die in Folge der Immunisierung mit einem anti-GBM-Antikörper ablaufenden pathophysiologischen Prozesse sind im Mausmodell gut untersucht und mit denen in der humanen Niere vergleichbar, wobei der klinische Verlauf dem einer rasch progredienten Glomerulonephritis beim Menschen entspricht. (Borza und Hudson 2002; Le Hir 2004).

Es wurde ein Krankheitsbild erzeugt, das durch ein nephrotisches Syndrom mit ausgeprägter Albuminurie und großmolekularer Proteinurie charakterisiert war.

Die Protein/Kreatinin-Ratio stieg in beiden Behandlungsgruppen signifikant an. Ein Anstieg des Wertes ist mit einer Abnahme der GFR und dem Fortschreiten der Nierenschädigung korreliert (Ruggenti et al. 1998) Eine Protein/Kreatinin-Ratio >4 entspricht prognostisch einer durchschnittliche Zeit von weniger als einem Jahr bis zur Dialysepflichtigkeit beim Menschen (Remuzzi und Bertani 1998).

Das in dieser Arbeit angewandte Protokoll sah eine Entnahme der Nieren am 18. Tag der Behandlung vor. Dieser Zeitpunkt wurde zum einen gewählt, weil Vorversuche gezeigt hatten, dass nach diesem Zeitraum alle Krankheitsstadien -von lichtmikroskopisch unauffälligen bis hin zu vollständig degenerierten Nephronen- zu finden sind. Zum anderen konnte so sichergestellt werden, dass im Vergleich zu anderen Protokollen, die eine Perfusionsfixation bereits am 10. oder 14. Tag nach Induktion der GN vorsehen, auch pathophysiologische Mechanismen in die Auswertung eingingen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt der Krankheitsentwicklung zum Tragen kommen. Ein längeres Zuwarten über den 18. Tag hinaus hätte hingegen insbesondere in der Gruppe der Cre(+) Tiere aufgrund Ihrer höheren Vulnerabilität gegenüber der Behandlung eine zu hohe Letalität zur Folge gehabt.

Vor dem Hintergrund des raschen klinischen Verlaufs in diesem Modell muss berücksichtigt werden, dass in der Gruppe der chronisch verlaufenden Glomerulonephritiden, wie der diabetischen Nephropathie oder der hypertensiven Nephropathie, im Verlauf andere pathophysiologische Mechanismen eine Rolle spielen können bzw. die unterschiedlichen, parallel ablaufenden pathologischen Vorgänge in anderer Gewichtung zum Untergang des funktionellen Nierenparenchyms beitragen (Bohle et al. 1990; Nath 1992).

Dennoch scheint eine partielle Übertragung der Ergebnisse auch auf die chronisch verlaufenden GN vertretbar, da letztendlich alle Glomerulonephritiden in einer gemeinsamen Endstrecke, der tubulointerstitiellen Fibrose, münden (Bohle et al. 1990; Nath 1992).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer anti-GBM Glomerulonephritis in den transgenen Cre(+) und Cre(-) Stämmen zu den typischen morphologischen Veränderungen führt, wie sie für andere Mausstämme und Rattenstämme beschrieben sind (Reynolds et al. 2003; Le Hir 2004).

Beide Gruppen zeigten das charakteristische Bild einer extrakapillären GN, wobei in den Nieren der Cre(+)/GN Tiere 79% der Glomeruli versus 13% der Glomeruli in den Nieren der Cre(-)/GN Tiere einen Sklerosegrad über 25% aufwiesen. In den geschädigten Glomeruli fanden sich hyaline Ablagerungen in den sklerosierten und kollabierten Glomerulumkapillaren, z.T. mit Anheftung des Kapillarknäuels an die Bowman-Kapsel. In vielen Glomeruli kam es zu einer Halbmond Bildung. Zudem war eine Zunahme der mesangialen Matrix nachweisbar.

Bei der Auswertung der tubulointerstitiellen Schädigung zeigten sich zum einen Tubuli mit stark hypertrophen Epithelzellen und eingeeignetem oder kollabiertem Lumen, zum anderen Tubuli mit dilatiertem Lumen und atrophischem Epithel. In diesen fanden sich zudem häufig luminale Ausgussbildungen.

Des Weiteren bestanden bei den Tieren beider Gruppen Zeichen einer fibrotischen Umwandlung in Form einer zahlenmäßigen Zunahme interstitieller Zellen, ausgeprägter in der Cre(+)/GN als in der Cre(-)/GN Gruppe. Die interstitielle Fibrose fand sich vornehmlich als Umgebungsreaktion im Bereich degenerierter Nephrone, ohne dass ein Übergreifen auf umliegende, intakte Nephrone zu beobachten war. So war ein zum Teil sehr heterogenes Schädigungsbild mit morphologisch unauffälligen Nephronen zu beobachten, welche von einem Areal degenerierter Nephrone und ausgeprägter Fibrose umgeben waren. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen anderer histopathologischer Studien (Kriz et al. 1998). Auch Le Hir und Mitarbeiter beschrieben in einem anti-GBM Glomerulonephritis Mausmodell eine peritubuläre Infiltration von Entzündungszellen nur in Assoziation zu bereits stark degenerierter Tubuli, die durch Obstruktion des glomerulo-tubulären Übergangs von dem zugehörigen Glomerulum abgetrennt waren. Ein Übergreifen der interstitiellen Inflammation auf intakte Nephrone wurde hingegen nicht beobachtet und diese daher eher als Folge, denn als Ursache der tubulären Degeneration angesehen (Le Hir und Besse-Eschmann 2003). Die Art der morphologischen Schäden war in der vorliegenden Arbeit im Vergleich der Cre(+)/GN Gruppe mit der Cre(-)/GN Gruppe qualitativ gleich.

Anders als erwartet, zeigten sich sowohl glomerulär als auch tubulointerstitiell in der quantitativen Analyse trotz des identischen Behandlungsprotokolls deutlich höhere Schädigungsscores in der Cre(+)/GN Gruppe. Die Ursache für die erhöhte Vulnerabilität der Megalin-teildefizienten Tiere gegenüber der Glomerulonephritis-Induktion ist unklar. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Motoyoshi, die ebenfalls in der Megalin-teildefizienten Maus ein nephrotisches Syndrom induzierten, hochinteressant (Motoyoshi et al. 2008). In dieser Studie wurde durch Kreuzung der Cre(+) Maus mit der transgenen NEP25-Maus die Megalin-KO/NEP25 Maus erschaffen. Bei der Megalin-KO/NEP25 Maus wurde durch Injektion des Immunotoxins LMB2, welches selektiv an ein transgenes Produkt in den Podozyten dieser Mäuse bindet, ein nephrotisches Syndrom ausgelöst. Die morphologischen Schäden im Bereich der Glomeruli und des Tubulointerstitiums waren in diesem Modell nur gering bis mäßig ausgeprägt (glomerulärer Schädigungsindex von 1.04), da die Nieren bereits

am 10. Tag in einem frühen Krankheitsstadium entnommen wurden. Im Gegensatz zu der hier untersuchten RPGN zeigten sich dabei keine Unterschiede in der Schwere der morphologischen Schäden im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Somit scheint die Vulnerabilität der Megalin-teildefizienten Maus in einem frühen Krankheitsstadium des nephrotischen Syndroms vergleichbar mit dem der Wildtypiere. Möglicher Weise kommt erst in späteren Krankheitsstadien zum Tragen, dass Megalin über die Funktion als Endozytoseprotein hinaus Einfluss auf die Zellhomöostase hat. So könnte eine Rolle spielen, dass Megalin im Rahmen der Proteinresorption gespalten wird, nach Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt und dort adaptive Prozesse steuert (Zou et al. 2004; Biemesderfer 2006). Das Megalin-Protein beinhaltet zudem mehrere Src-Homologie-Domänen und PDZ-Domänen, die eine Rolle in der zellulären Signaltransduktion vermuten lassen (Christensen und Birn 2001). Weiterhin wurde beschrieben, dass Megalin in der Plasmamembran von PT-Zellen die Proteinkinase B (PKB) in Abhängigkeit von der Albuminaufnahme bindet und aktiviert. Niedrige Albuminkonzentrationen führen via Megalin zu einer Aktivierung der PKB, während hohe Albuminkonzentrationen die Megalinexpression und somit auch die PKB-Aktivierung vermindern. Die aktivierte PKB hat in PT-Zellen eine anti-apoptotische und zellprotektive Funktion. Auch dieser Zusammenhang könnte die erhöhte Vulnerabilität des Cre(+) Mausstammes mitbedingen (Caruso-Neves et al. 2006). Bezüglich dieser Erkenntnisse sind weitere Studien abzuwarten, um eine mögliche Bedeutung der beschriebenen Mechanismen detailliert zu verstehen.

## **5.2 Die Aufhebung der Proteinresorption in Megalin-defizienten proximalen Tubuli verhindert nicht die Ausbildung der tubulointerstitiellen Fibrose**

Die klinische Beobachtung, dass der Grad der Proteinurie mit der Progressionsgeschwindigkeit des chronischen Nierenversagens positiv korreliert ist (Peterson et al. 1995; Burton und Harris 1996), wird in der Literatur kontrovers interpretiert. Einige Autoren sehen dies als Beleg für eine eigenständige pathophysiologische Rolle der Proteinurie (Remuzzi und Bertani 1998; Eddy 2004).

Andere Autoren werten den Grad der Proteinurie nur als indirekten Ausdruck der Schwere der glomerulären Schädigung ohne eigenständigen Krankheitswert (Kriz und LeHir 2005). Christensen und Zandi-Nejad fassen in Ihren Übersichtsarbeiten zusammen, dass diese Frage bislang nicht abschließend beantwortet werden konnte, da experimentelle Modelle fehlten, um die Effekte der Proteinurie ohne interferierende Einflussfaktoren und im direkten Vergleich in vivo untersuchen zu können. Zudem waren die Ergebnisse aus in vitro- und in vivo-Studien diesbezüglich oft widersprüchlich (Christensen und Gburek 2004; Zandi-Nejad et al. 2004; Christensen und Verroust 2008).

In der vorliegenden Arbeit stand nun ein murines Knockout-Modell zur Verfügung, in welchem der Einfluss der Proteinresorption in vivo untersucht werden konnte. Der Hypothese folgend, dass die Proteinurie eine zentrale Rolle in der Entstehung der tubulointerstitiellen Schädigung spielt, wäre ein protektiver Effekt der Megalin-Teildefizienz in der Cre(+)/GN Gruppe und eine stärkere Schädigung in der nicht Megalin-defizienten Cre(-)/GN Gruppe zu erwarten gewesen. Tatsächlich zeigte sich aber ein qualitativ gleichartiges tubulointerstitielles Schädigungsmuster in der Cre(+)/GN und der Cre(-)/GN Gruppe, bei insgesamt deutlich schwächer ausgeprägter Schädigung in der Cre(-)/GN Gruppe. Dies spricht gegen einen zentralen Einfluss der proximaltubulären Proteinresorption auf den Verlauf der tubulointerstitiellen Schädigung.

Im Vergleich zu anderen Tiermodellen erscheint die Aussagekraft des in dieser Arbeit verwendeten, transgenen Modells gerade bezüglich der pathophysiologischen Rolle der Proteinurie besonders hoch, da die Aussage nicht nur auf die Expression verschiedener Mediatoren und Zytokine und deren angenommene Wirkung gestützt werden kann, sondern zudem eine direkte topographische Korrelation zwischen Proteinendozytose, Zytokinexpression und den morphologischen Schäden als fassbares Endresultat der abgelaufenen pathologischen Prozesse möglich war.

Die lichtmikroskopische Analyse nach GN-Induktion ergab keine histopathologischen Unterschiede zwischen Nephronen mit zur Proteinendozytose befähigtem PT und Nephronen mit keiner oder nur geringgradiger Megalinexpression respektive Proteinresorption. Die fibrotische Umwandlung des Interstitiums der Cre(+)/GN Tiere zeigte sich vornehmlich als Umgebungsreaktion im Bereich degenerierender Nephrone mit aglomerulären, kollabierten Tubuli, korrelierte aber nicht mit dem Megalin-Expressionsmuster der PT. In Annahme einer zentrale Rolle der Proteinurie bei der

Entstehung der tubulointerstitiellen Inflammation, hätte sich die fehlende Proteinresorption in 70% der PT in diesem Modell aber entscheidend auf die Entwicklung und das Verteilungsmuster der tubulointerstitiellen Schädigung auswirken müssen. Somit ließ sich morphologisch kein Zusammenhang zwischen Proteinresorption und tubulointerstitieller Schädigung nachweisen. In Übereinstimmung hiermit hatte auch bei der Megalin-KO/NEP25 Maus (siehe Abschnitt 5.1) die Megalin-Teildefizienz keinen protektiven Effekt hinsichtlich der tubulointerstitiellen Schäden im Vergleich zu den Wildtyptieren mit nephrotischem Syndrom (Motoyoshi et al. 2008).

Unterstützt werden die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung von der elektronenmikroskopischen Analyse.

Megalin(+) Zellen zeigten als Reaktion auf die Proteinurie eine starke Aktivierung des endozytotischen Apparates und eine reaktive Zunahme der Epithelhöhe sowohl im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren als auch im Vergleich zu Megalin(-) Zellen nach GN-Induktion. Die Proteinaufnahme führte hingegen nicht zu destruktiven Prozessen im Sinne einer Autophagie, Entdifferenzierung oder Atrophie der Zellen. Hinsichtlich der Abnahme des mitochondrialen Volumens, welche als Hinweis auf eine zelluläre Maladaptation gewertet wird (Nielsen und Christensen 1983; Moller et al. 1984), ergab sich auch unter proteinurischen Bedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen Megalin(+) und Megalin(-) Zellen.

Den Ergebnissen dieser Arbeit folgend muss somit die Bedeutung der proximaltubulären Proteinresorption als pathophysiologischer Mechanismus in dem hier untersuchten Modell relativiert und den vom Glomerulum ausgehenden Prozessen, wie der fehlgeleiteten Filtration, der glomerulären crescent-Bildung und konsekutiven tubulären Obstruktion, eine zentralere Rolle in der Pathogenese zugeschrieben werden. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den Thesen der Arbeitsgruppen um Kriz und Le Hir überein, die in Ihren Studien die Schädigung des Glomerulums und das Überwachsen des glomerulo-tubulären Überganges als das zentrale pathophysiologische Ereignis bei der Schädigung des Nephrons beschreiben. (Le Hir und Besse-Eschmann 2003; Kriz und LeHir 2005).

In einer Studie an Ratten, bei der die Auswirkungen der Proteinurie nach Induktion einer anti-GBM Antikörper Nephritis über einen Zeitraum von 6 Monaten untersucht wurde, konnte ebenfalls keine fortschreitende tubulointerstitielle Fibrose in Folge der Proteinurie gezeigt werden (Kikuchi et al. 2000).

Diese Beobachtungen passen zu den Befunden bei Patienten mit einem kongenitalen nephrotischen Syndrom vom Finnischen Typ. In den Nieren dieser Patienten treten die interstitielle Fibrose und Akkumulation inflammatorischer Zellen vornehmlich im Bereich der Glomeruli auf. Die Tubuluszellen zeigen hingegen trotz der schweren Proteinurie auch nach längerem Krankheitsverlauf keine phänotypischen Veränderungen (Kuusniemi et al. 2005).

In Kontrast hierzu beschrieben Bertani und Mitarbeiter in dem Modell einer Adriamycin-Glomerulonephritis Proteinurie-induzierte Brüche in der tubulären BM mit Extravasation des tubulären Inhaltes in das Interstitium und folgender Inflammation als wichtigsten Mechanismus der renalen Schädigung. Die histopathologischen Schäden im Bereich der Glomeruli waren in diesem Modell nur gering ausgeprägt und wurden für das Fortschreiten der Nierenschädigung als nachrangig eingeschätzt (Bertani et al. 1986). Ein Austreten des tubulären Filtrates durch Brüche in der TBM konnte hingegen in der vorliegenden Arbeit weder auf lichtmikroskopischer, noch auf elektronenmikroskopischer Ebene verifiziert werden.

Weiterhin fand die Arbeitsgruppe um Remuzzi und Zoja in einem Rattenmodell nach Induktion einer passiven Heymann Nephritis sowie bei Ratten nach 5/6 Nephrektomie eine Infiltration von MHC-II Rezeptor-positiven Zellen in der Umgebung von IgG- und Albumin-überladenen PT und postulierte eine schädigende Wirkung auf das Tubulointerstitium (Abbate et al. 1998). Als limitierend bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Studie erscheint aber, dass keine detaillierte morphologische Analyse durchgeführt wurde und eine topographische Korrelation tatsächlich entstandener morphologischer Schäden im Bereich der interstitiellen, MHC-II -positiven Zellinfiltrate nicht beschrieben wurde.

Wie bereits diskutiert ist einschränkend zu berücksichtigen, dass im Rahmen dieser Publikationen zum Teil andere Schädigungsmodelle mit einem chronischen Krankheitsverlauf Verwendung fanden und somit ein Vergleich der Ergebnisse nur bedingt möglich ist, bzw. diese nicht zwangsweise im Widerspruch stehen müssen.

### **5.3 Expression immunmodulatorischer Mediatoren in Folge der übermäßigen Proteinendozytose durch den proximalen Tubulus**

Der Proteinurie-induzierten Expression immunmodulatorischer und profibrotischer Mediatoren durch die Zellen des PT wurde in einer Reihe bisheriger Studien eine zentrale Rolle in der Pathogenese der tubulointerstitiellen Fibrose zugeschrieben (Remuzzi und Bertani 1998; Klahr 1999; Zoja et al. 2006).

In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass es in Zellen des PT nach Gabe hoher Konzentrationen von Albumin, IgG und/oder Transferrin zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB kommt. NFκB induziert unter anderem die Ausschüttung der Chemokine ICAM-1, VCAM-1 und ET-1, denen eine Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung der tubulointerstitiellen Inflammation zugesprochen wird. Zudem führte eine Albumin-Exposition in der Zellkultur zu einer vermehrten Freisetzung von TGF-β (Zoja et al. 2003; Wolf et al. 2004).

Es ist zu berücksichtigen, dass diese in vitro-Zellstudien den methodenbedingten Limitationen unterliegen. Zandy-Nejad et al. merken in diesem Zusammenhang an, dass in bisherigen in-vitro Studien die PT-Zellen zum Teil Proteinkonzentrationen ausgesetzt waren, welche die in vivo gemessenen Konzentrationen bei weitem übersteigen und diese Zellen zudem in Zellkultur-Medien mit per se hoher Proteinkonzentration gezüchtet werden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese hohen Konzentrationen den Zellphänotyp und die Zellfunktion in unphysiologischer Weise beeinflusst haben (Zandi-Nejad et al. 2004).

Das methodische Problem der eingeschränkten Übertragbarkeit einer in vitro- Studie auf die in vivo- Situation konnte in dieser Arbeit durch die Verwendung eines Tiermodells umgangen werden. Die Megalin-teildefiziente Maus erlaubte einen direkten in vivo Vergleich zwischen zur Proteinresorption befähigten PT und PT, die keine filtrierte Proteine aufnehmen können, ansonsten aber den gleichen Einflüssen ausgesetzt waren.

Übereinstimmend mit bisherigen Ergebnissen konnte auch in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen der tubulären Proteinendozytose und der Expression von Chemokinen gezeigt werden. Die zur Proteinresorption befähigten Megalin(+) PT

zeigten im Vergleich zu den Megalin(-) PT eine signifikant vermehrte Expression von ICAM-1, VCAM-1, ET-1 sowie TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3.

Die zellulären Stressproteine Osteopontin und HSP25 wurden hingegen vornehmlich in Megalin(-) PT nachgewiesen.

Auch Motoyoshi et al. beschreiben in dem Modell der Megalin-KO/NEP25 Maus infolge der Proteinurie eine signifikant höhere Expression des inflammatorischen Chemokines Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und eines Markers von oxidativem Zellstress (Heme-Oxygenase-1) von Megalin(+) PT im Vergleich zu Megalin(-) PT. Die Autoren interpretieren dies als Ausdruck einer frühen Schädigung des proximalen Tubulus (Motoyoshi et al. 2008).

In Kontrast zu den Schlussfolgerungen der oben zitierten Studien hatte die Expression dieser Faktoren in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf das Ausmaß und die Art der tubulointerstitiellen Inflammation und Fibrose in der vergleichenden morphologischen Analyse. Zudem fand sich keine topographische Assoziation in Bezug auf eine vermehrte interstitielle Kollagen I Synthese (im Sinne einer fibrotischen Reaktion) oder die Immigration immunkompetenter, CD68-positiver Zellen in das Interstitium. Hingegen zeigten sich in Zusammenhang mit der Proteinaufnahme eine verstärkte Zellproliferation und eine verminderte Zellapoptose.

Zur Interpretation dieser Ergebnisse ist eine detaillierte Betrachtung der zum Teil divergenten –und in der Literatur kontrovers diskutierten- Effekte der untersuchten Mediatoren notwendig:

### **5.3.1 TGF- $\beta$**

Die Folgen einer erhöhten TGF- $\beta$  Synthese müssen differenziert betrachtet werden. Einige Autoren gehen der Fibrose-Hypothese (siehe Abschnitt 1.2.2.3) folgend davon aus, dass eine vermehrte TGF- $\beta$  Expression per se durch eine Vermehrung der extrazellulären Matrix zur interstitiellen Fibrose und konsekutivem Funktionsverlust des Nierenparenchyms führt (Border et al. 1990; Remuzzi und Bertani 1998). Andere Autoren geben zu bedenken, dass es keine direkten experimentellen Hinweise gibt, dass die alleinige Zunahme und/oder Veränderung der extrazellulären Matrix zum

Untergang differenzierter renaler Zellen und letztendlich zum Verlust der Organfunktion führt (Bottinger und Bitzer 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  dosisabhängig unterschiedlichen Einfluss auf die Zellfunktion nehmen kann. So führten hohe TGF- $\beta$  Konzentrationen bei kultivierten Podozyten zur Apoptose, während niedrigere Dosen ein Zellwachstum und eine Zelldifferenzierung bewirkten (Wu et al. 2005). Dieser Zusammenhang ließ sich auch in Ganglien zeigen, in denen TGF- $\beta$  in niedrigerer Dosierung die Neurogenese stimuliert, in höheren Konzentrationen aber Apoptosemechanismen induziert (Hagedorn et al. 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Proteinurie-induzierte TGF- $\beta$ -Synthese in dem untersuchten Modell keinen primär destruktiven Charakter hat, sondern vielmehr Ausdruck eines adaptiven Prozesses ist. Für diese Annahme spricht zum einen der fehlende Einfluss der TGF- $\beta$  Synthese auf die Art der morphologischen Schädigung, zum anderen der fehlende Nachweis einer fibrotischen Reaktion im Sinne einer vermehrten Kollagen I Synthese in der direkten Umgebung der TGF- $\beta$  exprimierenden Megalin(+) Tubuli. Gezeigt werden konnte hingegen eine vermehrte Expression der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA als möglicher Ausdruck eines proliferativen bzw. adaptiven Stimulus von TGF- $\beta$  auf die PT-Zellen.

Ein weiterer Effekt von TGF- $\beta$  ist die von Gekle et al. in kultivierten PT-Zellen beschriebene Hemmung der Megalin-vermittelten Proteinendozytose. (Gekle et al. 2003). Dies lässt eine Rolle von TGF- $\beta$  als Effektor eines negativen Regelkreislaufes der PT-Proteinaufnahme vermuten. Die tatsächliche Bedeutung dieses Mechanismus in vivo ist allerdings noch nicht verstanden und bedarf weiterer Studien.

### **5.3.2 ICAM-1, VCAM-1 und ET-1**

ICAM-1 und VCAM-1 sind transmembranäre, zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende Moleküle, welche die Adhäsion und Diapedese von Leukozyten und Lymphozyten an Epithelzellen bewirken (Roy-Chaudhury et al. 1996; Kriegsman et al. 2000). Sie werden im Rahmen einer renalen Schädigung vermehrt exprimiert (Kriegsman et al. 2000; Shappell et al. 2000).

ET-1 ist ein potentes endogenes Vasopeptid, welches ebenfalls in einer Vielzahl renaler Erkrankungen tubulär vermehrt exprimiert wird (Richter 2006).

Übereinstimmend mit Ergebnissen anderer Autoren (Ogawa et al. 1996; Hauser et al. 1997) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Proteinüberladung in den Megalin(+) PT die basal nur geringe Bildung von ICAM-1, VCAM-1 und ET-1 signifikant steigert. Dies geschieht im PT hauptsächlich über einen NFκB-abhängigen Signalweg. ICAM-1, VCAM-1 und ET-1 weisen in der Promotorregion ihrer Gene viele potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NFκB auf (Iademarco et al. 1992; Roebuck und Finnegan 1999).

Unter proteinurischen Bedingungen wird so über die Aktivierung von NFκB die Genexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ET-1 induziert (Zoja et al. 2003; Zoja et al. 2009).

Dieser Vorgang wird in der Literatur vielfach als maladaptiver, pathologischer Prozess angesehen (Zoja et al. 2004). Allerdings gibt es ebenso Hinweise darauf, dass es sich bei dem NFκB-abhängigen Signalweg um eine adaptive Stressreaktion der Zellen handeln könnte. So zeigten Yang et al., dass über NFκB Zell-protective, anti-apoptotische Mechanismen vermittelt werden (Yang et al. 2000).

Auch die Bedeutung von ET-1 muss differenziert betrachtet werden. Die funktionellen Effekte von ET-1 werden über zwei Sub-Rezeptortypen vermittelt: Zum einen werden über den ET<sub>A</sub>-Rezeptor pathophysiologische Mechanismen wie glomeruläre Hypertension, oxidativer Stress und Inflammation induziert, aufgrund derer die vermehrte Ausschüttung von ET-1 von einigen Autoren als Prädiktor für das Fortschreiten der renalen Schädigung angesehen wird (Zoja et al. 2003; Dhaun et al. 2006).

Andere Studien zeigen hingegen, dass ET-1 über den (auf Endothelien exprimierten) ET<sub>B</sub>-Rezeptor Subtyp durch die Freisetzung von NO und Prostaglandinen vasodilatative Effekte und darüber hinausgehend eine renoprotektive, antiinflammatorische Wirkung aufweist (Schneider et al. 2007; Ohkita et al. 2009). So entwickeln transgene, ET<sub>B</sub>-Rezeptor-defiziente Ratten nach 5/6 Nephrektomie im Vergleich zu Wildtieren deutlich schwerere glomeruläre und tubulointerstitielle Schäden (Tazawa et al. 2004). Auch eine pharmakologische Blockade des ET<sub>B</sub>-Rezeptors wirkt sich negativ auf das Fortschreiten der renalen Schädigung nach 5/6 Nephrektomie aus (Shimizu et al. 1999).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene, Proteinurie-induzierte ET-1 Expression ist somit möglicherweise als ein adaptiver, in Teilen renoprotektiver Mechanismus zu interpretieren und nicht per se als Surrogat-Parameter einer renalen Schädigung anzusehen.

### 5.3.3 Hitzeschockprotein 25 und Osteopontin

Das HSP25 gehört zur Gruppe der Stressproteine und wird vermehrt von Zellen exprimiert, die oxidativem Stress ausgesetzt sind (Joannidis et al. 1995; Samali et al. 2001; Kelly 2002; Erkan et al. 2005). HSP25 vermittelt zellprotektive Effekte, indem es mit den Zytofilamenten interagiert und Einfluss auf die korrekte Faltung und Renaturierung von Zellproteinen nimmt. Zudem ist der Einfluss auf den Zellzyklus (Apoptose-Induktion) gut belegt (Aufricht et al. 1998; Benjamin und McMillan 1998).

Auch Osteopontin ist ein Protein, welches im Rahmen der zellulären Stressreaktion in der Niere vermehrt ausgeschüttet wird. OP ist an der Einwanderung von Makrophagen in das Niereninterstitium beteiligt. Zudem wirkt OP anti-apoptotisch und vermittelt potentiell protektive Effekte (Ophascharoensuk et al. 1999; Yoo et al. 2006). Die funktionelle Bedeutung von Osteopontin in vivo wird in der Literatur kontrovers bewertet. Einige Arbeiten beschreiben eine direkte Korrelation zwischen Osteopontin und tubulointerstitieller Schädigung, in anderen werden Osteopontin anti-inflammatorische Effekte zugeschrieben (Denhardt et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein direkter Zusammenhang zwischen der Proteinendozytose im PT und der Expression von HSP25 und OP. Im Gegenteil wurden beide Stressproteine signifikant häufiger von Megalin (-) PT synthetisiert. Somit scheint die Expression beider Proteine in diesem Modell nicht direkt durch die Proteinurie induziert, sondern Ausdruck einer unspezifischen zellulären Kompensationsreaktion auf inflammatorische und oxidative Stimuli im Rahmen der GN, ohne kausal für den Krankheitsverlauf zu sein. Übereinstimmend hiermit zeigten sich in dem Modell einer RPGN bei OP-Knockout Mäusen in der histomorphologischen Analyse sowie hinsichtlich der Infiltration des Tubulointerstitiums mit mononukleären Zellen im Krankheitsverlauf keine Unterschiede zu den Wildtyp Tieren (Bonvini et al. 2000). In nicht-immunologischen Modellen scheint OP hingegen eine andere Rolle zuzukommen. So zeigten OP-Knockout Mäuse nach urethraler Obstruktion im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verminderte interstitielle Kollagen-Synthese und geringere Makrophagenimmigration (Ophascharoensuk, Giachelli et al. 1999).

## 5.4 Einfluss der Proteinendozytose auf Apoptose und Proliferation der Zellen des proximalen Tubulus

Ergänzend zur morphologischen Analyse und der Auswertung immunmodulatorischer Mediatoren wurde der Einfluss der Proteinendozytose auf den Zellzyklus mittels der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA sowie anhand des TUNEL-Assays untersucht.

Ki-67 und PCNA werden von Zellen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase des Zellzyklus, nicht aber in der G0-Phase exprimiert. Mittels Detektion dieser Antigene kann die Wachstumsfraktion eines Gewebes bestimmt werden (Hall et al. 1990; Duchrow et al. 1995). Die TUNEL-Färbung dient zur Darstellung apoptotischer Zellen und beruht auf der Anfärbung von bei der Zellapoptose entstehenden, charakteristischen DNA-Fragmenten (Gavrieli et al. 1992).

Nach Induktion einer RPGN wurde in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Wachstumsrate in den Megalin(+) Zellen, sowohl im Vergleich zu den Kontrolltieren, als auch im Vergleich zu den Megalin(-) Zellen gezeigt. Es ist daher anzunehmen, dass die Proteinurie einen proliferativen Stimulus auf die PT Zellen hat. Wie bereits in Abschnitt 5.3.1 diskutiert, könnte dies den Einfluss von TGF- $\beta$  auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung widerspiegeln (Wu et al. 2005). Für die signifikant geringere Apoptoserate in den Megalin(+) Zellen im Verhältnis zu den Megalin(-) Zellen der GN-Tiere kommen drei, bereits zuvor diskutierte Mechanismen in Frage: Zum einen könnte dies Ausdruck der Aktivierung eines NF $\kappa$ B-abhängigen Signalweges (mit konsekutiver Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ET-1) sein, für den Yang und Mitarbeiter einen zellprotektiven, anti-apoptotischen Effekt beschrieben (Yang et al. 2000). Zum anderen spielt hier möglicherweise eine Rolle, dass Megalin in der Plasmamembran von PT-Zellen die Proteinkinase B aktiviert, und so eine anti-apoptotische und zellprotektive Funktion vermittelt (Caruso-Neves et al. 2006). Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass durch das Fehlen der Megalin-vermittelten Proteinendozytose die Zelle vitale Moleküle nicht aufnehmen kann und dies zu einer erhöhten Apoptoserate führt. Ein Hinweis hierauf könnte sein, dass auch in den Kontrolltieren ohne GN die Apoptoserate in den Megalin(-) Zellen im Vergleich zu den Megalin(+) Zellen erhöht ist. Im Kontrast hierzu weisen in der Megalin-KO/NEP25 Maus die Megalin(+) Zellen unter proteinurischen Bedingungen eine höhere Apoptoserate als die Megalin(-) Zellen auf (Motoyoshi et al. 2008).

Eine relevante Anzahl an Publikationen, welche die funktionelle Bedeutung der Apoptose bzw. Zellproliferation für den Krankheitsverlauf und die Prognose untersuchen, existieren momentan nur für die Lupus erythematodes assoziierte Nephritis und die Membranoproliferative Nephritis. Da es sich hierbei um Krankheitsbilder anderer Entität handelt, scheint ein Vergleich dieser Ergebnisse mit dem hier für die RPGN vorliegenden nicht zulässig. Es bedarf somit weiterer Arbeiten, um die funktionelle Bedeutung von Apoptose und Proliferation in der Pathogenese der RPGN einordnen zu können.

## 5.5 Schlussfolgerung

Das Modell der Megalin-defizienten Maus eignet sich durch das mosaikartige, renale Megalin-Expressionsmuster und die Tatsache, dass eine Proteinresorption im PT ausschließlich über Megalin(+) Zellen erfolgt, in idealer Weise, um die Auswirkungen der Proteinurie in vivo zu untersuchen.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Rolle der Proteinendozytose durch den PT bei der RPGN möglicherweise neu bewertet werden muss. Sie hat in diesem Model keinen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf respektive die Qualität der morphologischen Schäden. Es scheinen andere, primär am Glomerulum ablaufende Prozesse die zentrale Rolle in der Pathophysiologie der RPGN zu spielen. Einschränkend ist zu berücksichtigen, dass der Grund für die stärkere Schädigung der Nieren der Megalin-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren unklar ist und aktuell nur hypothetisch erklärt werden kann. Hier sind weitere Erkenntnisse über die Rolle von Megalin für die zelluläre Homöostase über seine Funktion als Transportprotein hinaus abzuwarten, um ein tieferes Verständnis der ablaufenden Prozesse zu erlangen.

Die zweite, entscheidende Erkenntnis betrifft die Rolle der immunmodulatorischer Mediatoren, welche in Folge der Proteinurie vermehrt durch den PT exprimiert werden. Die in der Literatur oftmals vorgenommene Einordnung der hier untersuchten Faktoren als Marker der renalen Schädigung erscheint zu einfach, und der Komplexität der ablaufenden immunologischen Prozesse nicht gerecht werdend. Vielmehr müssen die -zum Teil dosisabhängigen- Effekte differenziert betrachtet werden. In der vorliegenden

Arbeit scheint die Ausschüttung der Mediatoren in Folge der Proteinendozytose eher einer adaptiven als einer destruktiven Reaktion zu entsprechen. Diese These wird durch die den Zellzyklus betreffenden Erkenntnisse unterstützt. Die Proteinendozytose stellte für die PT-Zellen einen Proliferationsreiz dar, führt aber nicht zu einer erhöhten Apoptoserate. Im Gegenteil war diese in den nicht zur Endozytose befähigten Zellen höher und steht somit nicht in Zusammenhang mit der Proteinurie.

Ziel der weiteren Anstrengungen muss es sein, durch ein differenzierteres Verständnis der Kausalität der Ereignisse im Rahmen der tubulointerstitiellen Inflammation für die Zukunft spezifischere Therapieansätze zu entwickeln, um die Erkrankung effektiver behandeln zu können und den Übergang in eine chronische Niereninsuffizienz zu verhindern.

## 6. Zusammenfassung

Die tubulointerstitielle Inflammation und Fibrose stellt die gemeinsame Endstrecke aller chronisch verlaufenden Glomerulonephritiden dar. Die Mechanismen, die zum Übergreifen des Krankheitsprozesses vom Glomerulum auf das Tubulointerstitium führen, sind weiterhin Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Der in Folge der Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere auftretenden Proteinurie wird hierbei eine zentrale Rolle zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand des Tiermodells einer Maus mit nierenspezifischer Megalin-Teildefizienz erstmals der Einfluss der aufgehobenen Proteinendozytose im proximalen Tubulus auf den Krankheitsverlauf in vivo untersucht werden. Hierzu wurde bei Knockout Mäusen mit nierenspezifischer Megalin-Teildefizienz und einer entsprechenden Kontrollgruppe nach einem etablierten Protokoll durch Injektion eines anti-Maus GBM-Serums eine extrakapilläre Glomerulonephritis induziert. Die Gesamtdauer des Experiments betrug 18 Tage. Die Nieren wurden anschließend histomorphologisch mittels Licht- und Elektronenmikroskop, sowie immunhistochemisch und durch In situ-Hybridisierung analysiert.

Beide Behandlungsgruppen zeigten das typische Bild einer rasch progredienten Glomerulonephritis (RPGN). Unerwarteterweise waren sowohl die Glomeruli, als auch das Tubulointerstitium bei den Megalin-teildefizienten Tieren quantitativ stärker geschädigt als bei den Wildtyp-Mäusen. Das Schädigungsmuster war hingegen sowohl auf licht- als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene in beiden Gruppen qualitativ gleich. Auch im direkten Vergleich von Megalin-positiven und Megalin-negativen proximalen Tubuli der teildefizienten Mäuse ergaben sich diesbezüglich keine Unterschiede.

Megalin-positive proximale Tubuli reagierten auf die Proteinüberladung mit einer signifikant erhöhten Expression von ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, und ET-1 im Vergleich zu den nicht zur Proteinendozytose befähigten, Megalin-negativen proximalen Tubuli. Es konnte somit ein Zusammenhang zwischen der tubulären Proteinendozytose und der Expression der genannten Zytokine gezeigt werden. Hingegen bestand keine

topographische Korrelation zu der Ausprägung der morphologischen Schädigung des umgebenden Tubulointerstitiums. Auch ließ sich keine Zunahme der interstitiellen Kollagensynthese im Sinne einer fibrotischen Reaktion, oder eine vermehrte Immigration CD68-positiver Zellen im Bereich Megalin-positiver proximaler Tubuli als Folge der Zytokinausschüttung nachweisen.

Ein Zusammenhang zwischen der Proteinendozytose und der Expression der Proteine HSP25 und Osteopontin konnte nicht gezeigt werden. Im Gegenteil wurden beide Stressproteine signifikant häufiger von Megalin-negativen proximalen Tubuli synthetisiert.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Proteinendozytose auf den Zellzyklus mittels der Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA und des TUNEL-Assays untersucht. Hier zeigten sich in Folge der Proteinaufnahme eine verstärkte Zellproliferation und eine geringere Zellapoptoserate des proximalen Tubulus.

Durch die vorliegende Arbeit wurden somit neue Erkenntnisse gewonnen, die zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der RPGN beitragen, und so für die Zukunft zu einer Optimierung der Therapiestrategien beitragen können.

Im Zentrum dieser Erkenntnisse steht, dass sich die Ausschaltung der Megalin-vermittelten Proteinendozytose in dem Modell einer RPGN nicht protektiv auswirkte und keinen Einfluss auf die Qualität der morphologischen Schäden hatte. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinendozytose die Ausschüttung von Zytokinen durch den proximalen Tubulus induziert, dies aber nicht kausal zu einer Schädigung des Tubulointerstitiums führt. Vielmehr kann die vermehrte Bildung der genannten Zytokine in diesem Modell eher als adaptive Reaktion auf die Proteinüberladung, denn als Ausdruck eines destruktiven, auf das Interstitium übergreifenden Prozesses verstanden werden. Die Proteinresorption stellte in diesem Modell einen proliferativen Stimulus für die Zellen des proximalen Tubulus dar, resultierte aber nicht in einer interstitiellen Fibrose.

Sowohl der Einfluss der Megalindefizienz auf den Zellzyklus, als auch die erhöhte Vulnerabilität der Knockout Mäuse lassen vermuten, dass Megalin über die Funktion als Transportmolekül hinaus Einfluss auf die Zellfunktion des proximalen Tubulus hat.

# 7. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
Cre	Cyclization recombination (-Rekombinase)
Cre(+)	Megalin <sup>lox/lox</sup> apoE-Cre Maus
Cre(-)	Megalin <sup>lox/lox</sup> Maus
Cre(+)/GN	Megalin <sup>lox/lox</sup> apoE-Cre Maus nach Glomerulonephritis-Induktion
Cre(-)/GN	Megalin <sup>lox/lox</sup> Maus nach Glomerulonephritis-Induktion
Dab2	Disabled-2
DAT	Dense Apical Tubules (Recycling-Endosomen des PT)
DBP	Vitamin D-bindendes Protein
dUTP	Deoxyuridin-Triphosphat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transformation
ES	Embryonale Stammzellen
ET-1	Endothelin-1
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GF	Wachstumsfaktor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSP25	Hitzeschockprotein 25
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM-1	Inter Cellular Adhesion Molecule-1
IL8	Interleukin 8
kDA	Kilodalton
Ki-67	Kiel-67 Antigen
LDL	Low Density Lipoprotein
LRP2	Low Density Lipoprotein-Related Protein 2

MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
Megalin(+)	Megalin-exprimierend (bezogen auf eine Zelle oder Querschnitt des Proximalen Tubulus)
Megalin(-)	Keine Megalin-Expression (bezogen auf eine Zelle oder Querschnitt des Proximalen Tubulus)
Megalin-/-	Knockout -Maus mit generalisierter Disruption des Megalin-Gens („Erste Generation“)
Megalin <sup>lox/lox</sup>	Mausstamm mit homozygotem Genlocus für die lox-Erkennungssequenz im Bereich des Megalin-Gens
Megalin <sup>lox/lox</sup> apoE-Cre	Knockout Maus mit nierenspezifischer Megalindefizienz
Megalin-KO/NEP25	Kreuzung der Megalin <sup>lox/lox</sup> apoE-Cre Maus mit dem NEP25 Mausstamm
Myo6	Myosin VI
NFκB	Nuclear Factor κB
OP	Osteopontin
PBM	Parietale Basalmembran
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
lox	locus of crossing
loxP	locus of crossing over P1
PBS	Phosphate buffered saline
PKB	Proteinkinase B
PT	Proximaler Tubulus
RAP	Rezeptor-assoziiertes Protein
RBP	Retinol-bindendes Protein
RIP	Regulierte intramembranäre Proteolyse
RPGN	Rasch progrediente Glomerulonephritis (engl. syn. rapid progressive Glomerulonephritis)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
TBM	Tubuläre Basalmembran
TC	Transcobalamin
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1

## 8. Literaturverzeichnis

- Abbate, M., C. Zoja, D. Corna, et al. (1998). "In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation." *J Am Soc Nephrol* 9(7): 1213-1224.
- Abbate, M., C. Zoja, D. Corna, et al. (2008). "Complement-mediated dysfunction of glomerular filtration barrier accelerates progressive renal injury." *J Am Soc Nephrol* 19(6): 1158-1167.
- Aldigier, J. C., T. Kanjanbuch, L. J. Ma, et al. (2005). "Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone." *J Am Soc Nephrol* 16(11): 3306-3314.
- Aufricht, C., T. Ardito, G. Thulin, et al. (1998). "Heat-shock protein 25 induction and redistribution during actin reorganization after renal ischemia." *Am J Physiol* 274(1 Pt 2): F215-222.
- Bachmann, S., U. Schlichting, B. Geist, et al. (2004). "Kidney-specific inactivation of the megalin gene impairs trafficking of renal inorganic sodium phosphate cotransporter (NaPi-IIa)." *J Am Soc Nephrol* 15(4): 892-900.
- Benjamin, I. J. und D. R. McMillan (1998). "Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease." *Circ Res* 83(2): 117-132.
- Bertani, T., F. Cutillo, C. Zoja, et al. (1986). "Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy." *Kidney Int* 30(4): 488-496.
- Bertani, T., G. Mazzucco und G. Monga (2002). "How glomerular extracapillary proliferation might lead to loss of renal function: light microscopic and immunohistochemical investigation." *Nephron* 91(1): 74-78.
- Bertani, T., C. Zoja, M. Abbate, et al. (1989). "Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content." *Lab Invest* 60(2): 196-204.
- Biemesderfer, D. (2006). "Regulated intramembrane proteolysis of megalin: linking urinary protein and gene regulation in proximal tubule?" *Kidney Int* 69(10): 1717-1721.

- Birn, H., H. Vorum, P. J. Verroust, et al. (2000). "Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules." *J Am Soc Nephrol* 11(2): 191-202.
- Bohle, A., S. Mackensen-Haen, H. von Gise, et al. (1990). "The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis." *Pathol Res Pract* 186(1): 135-144.
- Bonvini, J. M., U. Schatzmann, B. Beck-Schimmer, et al. (2000). "Lack of in vivo function of osteopontin in experimental anti-GBM nephritis." *J Am Soc Nephrol* 11(9): 1647-1655.
- Boor, P., A. Konieczny, L. Villa, et al. (2007). "Complement c5 mediates experimental tubulointerstitial fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 18(5): 1508-1515.
- Border, W. A., S. Okuda, L. R. Languino, et al. (1990). "Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1." *Nature* 346(6282): 371-374.
- Borza, D. B. und B. G. Hudson (2002). "Of mice and men: murine models of anti-GBM antibody nephritis." *Kidney Int* 61(5): 1905-1906.
- Bottinger, E. P. und M. Bitzer (2002). "TGF-beta signaling in renal disease." *J Am Soc Nephrol* 13(10): 2600-2610.
- Bradley, A., M. Evans, M. H. Kaufman, et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." *Nature* 309(5965): 255-256.
- Burton, C. und K. P. Harris (1996). "The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure." *Am J Kidney Dis* 27(6): 765-775.
- Caruso-Neves, C., A. A. Pinheiro, H. Cai, et al. (2006). "PKB and megalin determine the survival or death of renal proximal tubule cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49): 18810-18815.
- Chen, W. J., J. L. Goldstein und M. S. Brown (1990). "NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor." *J Biol Chem* 265(6): 3116-3123.
- Christensen, E. I. und H. Birn (2001). "Megalyn and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule." *Am J Physiol Renal Physiol* 280(4): F562-573.
- Christensen, E. I. und J. Gburek (2004). "Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology." *Pediatr Nephrol* 19(7): 714-721.

- Christensen, E. I. und P. J. Verroust (2008). "Interstitial fibrosis: tubular hypothesis versus glomerular hypothesis." *Kidney Int* 74(10): 1233-1236.
- Christensen, E. I., P. J. Verroust und R. Nielsen (2009). "Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule." *Pflugers Arch* 458(6): 1039-1048.
- Couser, W. G. (1998). "Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis." *Nephrol Dial Transplant* 13 Suppl 1: 10-15.
- Czekay, R. P., R. A. Orlando, L. Woodward, et al. (1997). "Endocytic trafficking of megalin/RAP complexes: dissociation of the complexes in late endosomes." *Mol Biol Cell* 8(3): 517-532.
- Davis, C. G., J. L. Goldstein, T. C. Sudhof, et al. (1987). "Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region." *Nature* 326(6115): 760-765.
- Denhardt, D. T., M. Noda, A. W. O'Regan, et al. (2001). "Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival." *J Clin Invest* 107(9): 1055-1061.
- Dhaun, N., J. Goddard und D. J. Webb (2006). "The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* 17(4): 943-955.
- Duchrow, M., C. Schluter, G. Key, et al. (1995). "Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 43(2): 117-121.
- Eddy, A. A. (2004). "Proteinuria and interstitial injury." *Nephrol Dial Transplant* 19(2): 277-281.
- Erkan, E., P. Devarajan und G. J. Schwartz (2005). "Apoptotic response to albumin overload: proximal vs. distal/collecting tubule cells." *Am J Nephrol* 25(2): 121-131.
- Folger, K. R., E. A. Wong, G. Wahl, et al. (1982). "Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules." *Mol Cell Biol* 2(11): 1372-1387.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman und S. A. Ben-Sasson (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *J Cell Biol* 119(3): 493-501.

- Gekle, M., P. Knaus, R. Nielsen, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta1 reduces megalin- and cubilin-mediated endocytosis of albumin in proximal-tubule-derived opossum kidney cells." *J Physiol* 552(Pt 2): 471-481.
- Gelineau-van Waes, J., J. R. Maddox, L. M. Smith, et al. (2008). "Microarray analysis of E9.5 reduced folate carrier (RFC1; Slc19a1) knockout embryos reveals altered expression of genes in the cubilin-megalín multiligand endocytic receptor complex." *BMC Genomics* 9: 156.
- Hagedorn, L., J. Floris, U. Suter, et al. (2000). "Autonomic neurogenesis and apoptosis are alternative fates of progenitor cell communities induced by TGFbeta." *Dev Biol* 228(1): 57-72.
- Hall, P. A., D. A. Levison, A. L. Woods, et al. (1990). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms." *J Pathol* 162(4): 285-294.
- Hauser, I. A., R. Riess, B. Hausknecht, et al. (1997). "Expression of cell adhesion molecules in primary renal disease and renal allograft rejection." *Nephrol Dial Transplant* 12(6): 1122-1131.
- Hostetter, T. H., J. L. Olson, H. G. Rennke, et al. (1981). "Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation." *Am J Physiol* 241(1): F85-93.
- Iademarco, M. F., J. J. McQuillan, G. D. Rosen, et al. (1992). "Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)." *J Biol Chem* 267(23): 16323-16329.
- Joannidis, M., L. G. Cantley, K. Spokes, et al. (1995). "Induction of heat-shock proteins does not prevent renal tubular injury following ischemia." *Kidney Int* 47(6): 1752-1759.
- Kelly, K. J. (2002). "Stress response proteins and renal ischemia." *Minerva Urol Nefrol* 54(2): 81-91.
- Kerjaschki, D. und M. G. Farquhar (1982). "The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(18): 5557-5561.
- Kikuchi, H., H. Kawachi, Y. Ito, et al. (2000). "Severe proteinuria, sustained for 6 months, induces tubular epithelial cell injury and cell infiltration in rats but not progressive interstitial fibrosis." *Nephrol Dial Transplant* 15(6): 799-810.

- Klahr, S. (1999). "Mechanisms of progression of chronic renal damage." *J Nephrol* 12 Suppl 2: S53-62.
- Kriegsman, J., H. Muller, M. Sommer, et al. (2000). "Expression of LFA-1 (CD11a/CD18) and ICAM-1 (CD54) in an animal model of renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction." *Exp Toxicol Pathol* 52(3): 185-191.
- Kriz, W., I. Hartmann, H. Hosser, et al. (2001). "Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis." *J Am Soc Nephrol* 12(3): 496-506.
- Kriz, W., H. Hosser, B. Hahnel, et al. (1998). "From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies." *Nephrol Dial Transplant* 13(11): 2781-2798.
- Kriz, W. und M. LeHir (2005). "Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models." *Kidney Int* 67(2): 404-419.
- Kuusniemi, A. M., R. Lapatto, C. Holmberg, et al. (2005). "Kidneys with heavy proteinuria show fibrosis, inflammation, and oxidative stress, but no tubular phenotypic change." *Kidney Int* 68(1): 121-132.
- Le Hir, M. (2004). "Histopathology of humorally mediated anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in mice." *Nephrol Dial Transplant* 19(7): 1875-1880.
- Le Hir, M. und V. Besse-Eschmann (2003). "A novel mechanism of nephron loss in a murine model of crescentic glomerulonephritis." *Kidney Int* 63(2): 591-599.
- Le Hir, M., C. Haas, M. Marino, et al. (1998). "Prevention of crescentic glomerulonephritis induced by anti-glomerular membrane antibody in tumor necrosis factor-deficient mice." *Lab Invest* 78(12): 1625-1631.
- Leheste, J. R., F. Melsen, M. Wellner, et al. (2003). "Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect." *Faseb J* 17(2): 247-249.
- Leheste, J. R., B. Rolinski, H. Vorum, et al. (1999). "Megalín knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria." *Am J Pathol* 155(4): 1361-1370.
- May, P., H. H. Bock und J. Herz (2003). "Integration of endocytosis and signal transduction by lipoprotein receptors." *Sci STKE* 2003(176): PE12.

- Moller, J. C., E. Skriver, S. Olsen, et al. (1984). "Ultrastructural analysis of human proximal tubules and cortical interstitium in chronic renal disease (hydronephrosis)." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 402(3): 209-237.
- Morigi, M., D. Macconi, C. Zoja, et al. (2002). "Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through a PKC-dependent pathway." *J Am Soc Nephrol* 13(5): 1179-1189.
- Morita, Y., A. Nomura, Y. Yuzawa, et al. (1997). "The role of complement in the pathogenesis of tubulointerstitial lesions in rat mesangial proliferative glomerulonephritis." *J Am Soc Nephrol* 8(9): 1363-1372.
- Motoyoshi, Y., T. Matsusaka, A. Saito, et al. (2008). "Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria." *Kidney Int* 74(10): 1262-1269.
- Nagai, J., E. I. Christensen, S. M. Morris, et al. (2005). "Mutually dependent localization of megalin and Dab2 in the renal proximal tubule." *Am J Physiol Renal Physiol* 289(3): F569-576.
- Nagai, M., T. Meerloo, T. Takeda, et al. (2003). "The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes." *Mol Biol Cell* 14(12): 4984-4996.
- Najafian, B., J. T. Crosson, Y. Kim, et al. (2006). "Glomerulotubular junction abnormalities are associated with proteinuria in type 1 diabetes." *J Am Soc Nephrol* 17(4 Suppl 2): S53-60.
- Nangaku, M. (2006). "Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure." *J Am Soc Nephrol* 17(1): 17-25.
- Nangaku, M., J. Pippin und W. G. Couser (2002). "C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in rats with remnant kidneys." *J Am Soc Nephrol* 13(4): 928-936.
- Nath, K. A. (1992). "Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage." *Am J Kidney Dis* 20(1): 1-17.
- Nielsen, J. T. und E. I. Christensen (1983). "Ultrastructure of isolated perfused proximal tubules from rabbit kidney. A comparison with proximal tubules fixed by perfusion in vivo." *Lab Invest* 49(4): 400-411.
- Nomura, S., A. J. Wills, D. R. Edwards, et al. (1988). "Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization." *J Cell Biol* 106(2): 441-450.

- Nykjaer, A., D. Dragun, D. Walther, et al. (1999). "An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3." *Cell* 96(4): 507-515.
- Ogawa, T., N. Yorioka, T. Ito, et al. (1996). "Ultrastructural localization of vascular cell adhesion molecule-1 in proliferative and crescentic glomerulonephritis." *Virchows Arch* 429(4-5): 283-291.
- Ohashi, R., A. Shimizu, Y. Masuda, et al. (2002). "Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy." *J Am Soc Nephrol* 13(7): 1795-1805.
- Ohkita, M., M. Takaoka und Y. Matsumura (2009). "Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): the endothelin ET B receptor/nitric oxide system functions as a protective factor in CKD." *J Pharmacol Sci* 109(1): 7-13.
- Ophascharoensuk, V., C. M. Giachelli, K. Gordon, et al. (1999). "Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis." *Kidney Int* 56(2): 571-580.
- Peterson, J. C., S. Adler, J. M. Burkart, et al. (1995). "Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study." *Ann Intern Med* 123(10): 754-762.
- Ray, J. A., W. J. Valentine, K. Secnik, et al. (2005). "Review of the cost of diabetes complications in Australia, Canada, France, Germany, Italy and Spain." *Curr Med Res Opin* 21(10): 1617-1629.
- Remuzzi, G. und T. Bertani (1998). "Pathophysiology of progressive nephropathies." *N Engl J Med* 339(20): 1448-1456.
- Reynolds, J., J. Moss, M. A. Duda, et al. (2003). "The evolution of crescentic nephritis and alveolar haemorrhage following induction of autoimmunity to glomerular basement membrane in an experimental model of Goodpasture's disease." *J Pathol* 200(1): 118-129.
- Richter, C. M. (2006). "Role of endothelin in chronic renal failure--developments in renal involvement." *Rheumatology (Oxford)* 45 Suppl 3: iii36-38.
- Roebuck, K. A. und A. Finnegan (1999). "Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression." *J Leukoc Biol* 66(6): 876-888.
- Roy-Chaudhury, P., B. Wu, G. King, et al. (1996). "Adhesion molecule interactions in human glomerulonephritis: importance of the tubulointerstitium." *Kidney Int* 49(1): 127-134.

- Ruggenenti, P., F. Gaspari, A. Perna, et al. (1998). "Cross sectional longitudinal study of spot morning urine protein:creatinine ratio, 24 hour urine protein excretion rate, glomerular filtration rate, and end stage renal failure in chronic renal disease in patients without diabetes." *Bmj* 316(7130): 504-509.
- Saito, A., S. Pietromonaco, A. K. Loo, et al. (1994). "Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21): 9725-9729.
- Samali, A., J. D. Robertson, E. Peterson, et al. (2001). "Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli." *Cell Stress Chaperones* 6(1): 49-58.
- Schneider, M. P., E. I. Boesen und D. M. Pollock (2007). "Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 731-759.
- Shappell, S. B., L. H. Mendoza, T. Gurpinar, et al. (2000). "Expression of adhesion molecules in kidney with experimental chronic obstructive uropathy: the pathogenic role of ICAM-1 and VCAM-1." *Nephron* 85(2): 156-166.
- Sheerin, N. S., P. Risley, K. Abe, et al. (2008). "Synthesis of complement protein C3 in the kidney is an important mediator of local tissue injury." *FASEB J* 22(4): 1065-1072.
- Shimizu, T., S. Hata, T. Kuroda, et al. (1999). "Different roles of two types of endothelin receptors in partial ablation-induced chronic renal failure in rats." *Eur J Pharmacol* 381(1): 39-49.
- Song, C. Y., B. C. Kim, H. K. Hong, et al. (2007). "TGF-beta type II receptor deficiency prevents renal injury via decrease in ERK activity in crescentic glomerulonephritis." *Kidney Int.*
- Sternberg, N., D. Hamilton und R. Hoess (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome." *J Mol Biol* 150(4): 487-507.
- Tang, S., K. N. Lai, T. M. Chan, et al. (2001). "Transferrin but not albumin mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells." *Am J Kidney Dis* 37(1): 94-103.
- Tarzi, R. M. und H. T. Cook (2003). "Role of Fc gamma receptors in glomerulonephritis." *Nephron Exp Nephrol* 95(1): e7-12.

- Tazawa, N., Y. Okada, M. Nakata, et al. (2004). "Exaggerated vascular and renal pathology in endothelin-B-receptor-deficient rats with subtotal nephrectomy." *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1: S467-470.
- Willnow, T. E., J. Hilpert, S. A. Armstrong, et al. (1996). "Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8460-8464.
- Wolf, G., R. Schroeder, F. N. Ziyadeh, et al. (2004). "Albumin up-regulates the type II transforming growth factor-beta receptor in cultured proximal tubular cells." *Kidney Int* 66(5): 1849-1858.
- Wu, D. T., M. Bitzer, W. Ju, et al. (2005). "TGF-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes." *J Am Soc Nephrol* 16(11): 3211-3221.
- Yang, C. H., A. Murti, S. R. Pfeffer, et al. (2000). "IFNalpha/beta promotes cell survival by activating NF-kappa B." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13631-13636.
- Yoo, K. H., B. A. Thornhill, M. S. Forbes, et al. (2006). "Osteopontin regulates renal apoptosis and interstitial fibrosis in neonatal chronic unilateral ureteral obstruction." *Kidney Int* 70(10): 1735-1741.
- Zandi-Nejad, K., A. A. Eddy, R. J. Glassock, et al. (2004). "Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease?" *Kidney Int Suppl*(92): S76-89.
- Zoja, C., M. Abbate und G. Remuzzi (2006). "Progression of chronic kidney disease: insights from animal models." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15(3): 250-257.
- Zoja, C., A. Benigni und G. Remuzzi (2004). "Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13(1): 31-37.
- Zoja, C., P. B. Garcia und G. Remuzzi (2009). "The role of chemokines in progressive renal disease." *Front Biosci* 14: 1815-1822.
- Zoja, C., M. Morigi und G. Remuzzi (2003). "Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells." *J Am Soc Nephrol* 14 Suppl 1: S36-41.
- Zou, Z., B. Chung, T. Nguyen, et al. (2004). "Linking receptor-mediated endocytosis and cell signaling: evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule." *J Biol Chem* 279(33): 34302-34310.

# 9. Anhang

## 9.1 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Sebastian Bachmann für die Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seinem Institut und die wertvollen inhaltlichen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Franziska Theilig, die mich in allen Phasen der Dissertation intensiv betreut und unterstützt hat, von der ich das praktische „Handwerkszeug“ im Labor gelernt habe und die wirklich immer ein offenes Ohr und einen guten Rat bei Problemen parat hatte.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung während des gesamten Studiums und beim Verfassen dieser Arbeit bedanken. Ihr Rückhalt und Vertrauen haben mir ermöglicht, meinen Weg zu gehen. Meinem Vater danke ich zudem für die semantischen und orthographischen Anregungen.

Meiner Freundin Joanna danke ich für ihre Liebe, ihren Ansporn und Optimismus, die mich in den schwierigen Phasen bei der Arbeit an dieser Dissertation getragen haben. Danke auch für das Verständnis für die langen Tage und Abende am Schreibtisch.

Gedankt sei zudem meinen guten Freunden Sarah Heinze, Katja Brendel, Paulina Senf, Thomas Rogosch und Robert Krüger, die in den letzten Jahren immer für mich da waren.

## **9.2 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich, Timo Mika Jerichow, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle der Proteinendozytose bei der Pathogenese der tubulointerstitiellen Nierenerkrankung in der Megalin-teildefizienten Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 20. Juli 2010

Timo Mika Jerichow

## 9.3 Publikationsverzeichnis

Teile der Ergebnisse dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

Theilig F, Kritz W, Jerichow T, Schrade P, Hähnel B, Willnow T, Le Hir M, Bachmann, S (2007). „Abrogation of Protein Uptake through Megalin-Deficient Proximal Tubules Does Not Safeguard against Tubulointerstitial Injury“ J. Am. Soc. Nephrol. Vol. 18:1824-34

Kongressbeiträge:

1. Jerichow T, Theilig F, Kriz W, Schrade P, Hähnel B, Willnow T, Le Hir M, Bachmann, S (2006): „Verhinderung der proximaltubulären Protein-Endozytose schützt nicht vor tubulointerstitieller Schädigung.“ Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Essen.

2. Jerichow T, Vogt B, Mans D, [...] Möckel M, et al. (2010): “Extracorporeal CRP-Apheresis After Myocardial Infarction decreases Infarction Size and preserves Left Ventricular Ejection Fraction in Pigs.” J. Am. Coll. Cardiol. 2010;55:A122.E1146 doi:10.1016/S0735-1097(10)61147-3.

3. Jerichow T, Vogt B, Mans D, [...] Möckel M, et al. (2010): “Extrakorporale CRP-Apherese nach akutem Myokardinfarkt reduziert die Infarktgröße und erhält die linksventrikuläre Ejektionsfraktion beim Schwein.” 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim

## **9.4 Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.