

# Analysen zur funktionellen Rolle des TGF- $\beta$ Signalwegs in Podozyten



## Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät III  
-Biologie und Vorklinische Medizin-  
der Universität Regensburg

Durchgeführt am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Sabrina Ullmann**  
aus Kaufbeuren

im Juni 2012



Diese Arbeit wurde angeleitet von Herrn PD Dr. Rudolf Fuchshofer

Das Promotionsgesuch wurde am 19.06.2012 eingereicht.

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst Tamm

1. Gutachter: PD Dr. Rudolf Fuchshofer

2. Gutachter: Prof. Dr. Olaf Strauß

3. Prüfer: Prof. Dr. Charlotte Wagner

---

Sabrina Ullmann

**Für Euch Mama und Papa**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 TGF-β und dessen Signaltransduktion .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Das Nephron .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Glomeruläre viszerale Epithelzellen – die Podozyten .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Bedeutung des TGF-β Signalwegs für Podozyten .....</b>	<b>19</b>
2.4.1       Rolle von TGF-β auf die Glomerulogenese und die Differenzierung der Podozyten ....	19
2.4.2       Podozytenschädigungen und die Beteiligung des TGF-β Signalwegs .....	22
<b>3 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>25</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Grundausstattung .....</b>	<b>26</b>
4.1.1       Verbrauchsmaterial .....	26
4.1.2       Geräte.....	27
<b>4.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>28</b>
4.2.1       Gewinnung genomischer DNA .....	28
4.2.2       Klassische PCR Analysen .....	28
4.2.3       Agarose-Gelelektrophorese.....	31
4.2.4       Genexpressionsanalysen .....	31
4.2.4.1   Prinzip der Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer RT-PCR und quantitativer real time RT-PCR .....	31
4.2.4.2   RNA Isolierung aus Zellen oder Gewebe .....	32
4.2.4.3   RNA-Quantifizierung.....	33
4.2.4.4   cDNA Synthese .....	34
4.2.4.5   Durchführung der semi-quantitativen RT-PCR.....	35
4.2.4.6   Durchführung der quantitativen real time RT-PCR.....	36

<b>4.3 Proteinbiochemische Arbeitstechniken .....</b>	<b>38</b>
4.3.1    Verschiedene Methoden der Protein-Isolierung .....	38
4.3.1.1    Protein Gewinnung mit Hilfe von RIPA .....	38
4.3.1.2    Protein-Gewinnung nach der peqGold TriFast™ –Methode .....	39
4.3.2    Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay .....	40
4.3.3    SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	41
4.3.4    Proteintransfer auf PVDF Membranen mittels Semidry Blotting .....	42
4.3.5    Nachweis spezifischer Proteinbanden .....	43
4.3.6    Coomassiefärbung zur Ladungskontrolle.....	45
4.3.7    Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen .....	46
<b>4.4 <i>In vitro</i> Experimente .....</b>	<b>47</b>
4.4.1    Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen.....	47
4.4.2    Allgemeine Arbeitstechniken .....	47
4.4.2.1    Passagieren von Zellen .....	48
4.4.2.2    Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	48
4.4.2.3    Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Casy-Zellzählers .....	49
4.4.3    Etablierung einer primären Podozytenkultur .....	49
4.4.4    Behandlung von Zellen .....	50
<b>4.5 <i>In vivo</i> Experimente.....</b>	<b>51</b>
4.5.1    Tierhaltung.....	51
4.5.2    Generierung der Podozyten-spezifischen Knockout Mauslinien .....	51
4.5.3    Gewebepräparation durch Perfusion über die <i>Aorta abdominalis</i> .....	53
4.5.4    Glomeruli-Isolation.....	54
4.5.5    Induktion von <i>Diabetes mellitus</i> Typ I als Podozyten-Schadensmodell .....	56
4.5.5.1    Low Dose Streptozotocin Protokoll .....	57
4.5.6    Uringewinnung von Mäusen .....	58
4.5.7    Bestimmung des Blutglucose-Spiegels.....	58
<b>4.6 Histologische Arbeitstechniken .....</b>	<b>58</b>
4.6.1    Kryo-Einbettung und Herstellung von Gefrierschnitten .....	58
4.6.2    Paraffin-Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten .....	59
4.6.3    Epon-Einbettung und Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten.....	60
4.6.4    Einbettung und Kontrastierung von Glomeruli für REM.....	61

4.6.5	Histochemische Färbungen .....	61
4.6.5.1	Färbung nach Richardson .....	61
4.6.5.2	Periodsäure Schiffs-Reagenz-Färbung (PAS) .....	61
4.6.6	Immunhistochemische Färbungen.....	63
4.6.6.1	Fluoreszenz-Färbungen von Gewebeschnitten.....	63
4.6.6.2	Fluoreszenz-Färbungen von <i>in vitro</i> -Zellen.....	65
4.6.7	Histologische Auswertungen .....	65
4.6.7.1	Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz.....	65
4.6.7.2	Vermessung der relativen Dicke der glomerulären Basalmembran.....	66
4.6.7.3	Semi-quantitative Bestimmung des Sklerose Indexes.....	66
<b>4.7</b>	<b>Mikroskop-Verfahren.....</b>	<b>67</b>
4.7.1	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie .....	67
4.7.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	67
4.7.3	Rasterelektronenmikroskop (REM).....	68
<b>4.8</b>	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Etablierung von primären <i>in vitro</i> Podozytenkulturen.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Verifizierung des Podozyten-spezifischen Knockouts .....</b>	<b>73</b>
5.2.1	Nachweis der Rekombination innerhalb der Glomeruli-DNA.....	73
5.2.1.1	Detektion der Rekombination in Glomeruli-DNA von P-S7 kn Mäusen.....	74
5.2.1.2	Detektion der Rekombination in Glomeruli-DNA von P-TR2 kn Mäusen .....	74
5.2.2	Analyse der mRNA Transkription von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$ RII .....	75
5.2.2.1	Reduktion der Smad7 mRNA Expression in P-S7 kn Mäusen .....	76
5.2.2.2	Reduktion der TGF- $\beta$ RII mRNA Expression in P-TR2 kn Mäusen.....	77
5.2.3	Analyse der Protein-Translation von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$ RII .....	78
5.2.3.1	Reduktion der Smad7 Protein-Expression in P-S7 kn Mäusen .....	78
5.2.3.2	Reduktion der TGF- $\beta$ RII Protein-Expression in P-TR2 kn Mäusen.....	81
<b>5.3</b>	<b>Phänotyp-Analysen der Podozyten-spezifischen Knockout Modelle .....</b>	<b>84</b>
5.3.1	Auswirkungen des Podozyten-spezifischen Knockouts auf die Glomerulogenese und allgemeine Nierenmorphologie .....	84
5.3.1.1	P-S7 kn Mäuse wiesen keine atypische Glomerulogenese oder Veränderungen der allgemeinen Nierenmorphologie auf .....	84

5.3.1.2	P-TR2 kn Mäuse wiesen keine atypische Glomerulogenese oder Veränderungen der allgemeinen Nierenmorphologie auf .....	87
5.3.2	Auswirkungen des Knockouts auf die Entwicklung/Differenzierung der Podozyten.....	88
5.3.2.1	Der Podozyten-spezifische Knockout von Smad7 hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung und Polarität der Podozyten .....	89
5.3.2.2	Der Podozyten-spezifische Knockout von TGF- $\beta$ RII hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung und Polarität der Podozyten .....	91
5.3.3	Funktionelle Untersuchungen des Urins .....	93
5.3.3.1	Der Podozyten-spezifische Knockout von Smad7 hatte keinen Einfluss auf das Urinvolumen und verursachte keine Proteinurie .....	94
5.3.3.2	Der Podozyten-spezifische Knockout von TGF- $\beta$ RII hatte keinen Einfluss auf das Urinvolumen und verursachte keine Proteinurie .....	94
<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen von altersprogressiven Veränderungen.....</b>	<b>95</b>
5.4.1	P-S7 kn Mäuse zeigten im Alter eine progressive Steigerung von Glomerulosklerosen und <i>Foot Process Effacement</i> .....	96
5.4.2	P-TR2 kn Mäuse zeigten im Alter vergleichbare Glomerulosklerosen und <i>Foot Process Effacement</i> Prozesse.....	99
<b>5.5</b>	<b>Untersuchungen von TGF-<math>\beta</math> induzierbaren Proteinen.....</b>	<b>103</b>
5.5.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen von TGF- $\beta$ induzierbaren Proteinen .....	103
5.5.1.1	P-S7 kn Podozyten zeigten <i>in vitro</i> eine verstärkte Induktion von PAI-1 und CTGF.....	103
5.5.1.2	P-TR2 kn Podozyten zeigten <i>in vitro</i> keine Induktion von PAI-1 und CTGF .....	106
5.5.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen von TGF- $\beta$ induzierten Proteinen.....	108
5.5.2.1	P-S7 kn Glomeruli zeigten im Alter eine verstärkte Induktion von PAI-1 und CTGF.....	108
5.5.2.2	P-TR2 kn Glomeruli zeigten im Alter keine Induktion von PAI-1 und CTGF .....	111
<b>5.6</b>	<b>Streptozotocin-induzierte DN als Podozyten-Schadensmodell.....</b>	<b>113</b>
5.6.1	Untersuchung charakteristischer klinischer Parameter nach STZ Injektion.....	113
5.6.1.1	Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten vergleichbare Symptome von DM .....	113
5.6.1.2	Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten vergleichbare Symptome von DM .....	115
5.6.2	Untersuchungen von STZ-induzierten morphologischen Veränderungen .....	117
5.6.2.1	Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten eine Verschlechterung der Glomeruli-Morphologie .....	117
5.6.2.2	Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine Verbesserung der Glomeruli-Morphologie .....	122

5.6.3	Untersuchungen von extrazellulären Matrix Proteinen nach Induktion von DN .....	126
5.6.3.1	Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten eine verstärkte Induktion von Col IV und Fibronektin.....	126
5.6.3.2	Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine Induktion von Col IV und Fibronektin.....	129
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>133</b>
6.1	<b>Generierung der Podozyten-spezifischen Knockout Mauslinien P-S7 kn und P-TR2 kn.....</b>	<b>133</b>
6.2	<b>Phänotypanalyse der P-S7 kn und P-TR2 kn Mauslinien.....</b>	<b>134</b>
6.3	<b>Altersprogressive Veränderungen in P-S7 kn und P-TR2 kn Mäusen .....</b>	<b>138</b>
6.4	<b>TGF-β induzierte Proteine .....</b>	<b>143</b>
6.5	<b>STZ-induzierte DN als Podozyten-Schadensmodell in P-S7 kn und P-TR2 kn Mäusen.....</b>	<b>146</b>
6.6	<b>Kurzzusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>153</b>
7.1	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>153</b>
7.2	<b>Allgemeines Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>167</b>
7.3	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>171</b>
7.4	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>172</b>
7.5	<b>Liste der Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien.....</b>	<b>175</b>
7.6	<b>Danksagung.....</b>	<b>178</b>

## 1 Zusammenfassung

Der multifunktionale Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) ist unter anderem an Differenzierungsprozessen und der Modulation der extrazellulären Matrix beteiligt. Die Literatur liefert Hinweise, dass TGF- $\beta$  während der Entwicklung der Niere an der Glomerulogenese und der Ausdifferenzierung von Podozyten-Vorläuferzellen zu reifen, post-mitotischen Podozyten eine entscheidende Rolle übernimmt. Des Weiteren gilt es als allgemein akzeptiert, dass TGF- $\beta$  eine Schlüsselfunktion bei der Pathogenese von diabetischer Nephropathie (DN) ausübt.

In dieser Arbeit wurden zwei Mausmodelle (P-S7 kn und P-TR2 kn) mit einem konditionellen Podozyten-spezifischen Knockout von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII generiert. An P-S7 kn Mäusen konnten erstmals in einem *in vivo* System die Folgen einer Desinhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs für den Podozyten untersucht werden, während an P-TR2 kn Tieren die Auswirkungen einer Blockade des TGF- $\beta$  Signalwegs betrachtet werden konnten. Der Einsatz der sog. Podo-Cre Maus sicherte eine exklusive Cre-Rekombinase Expression in Podozyten, die früh in der Entwicklung (*Capillary-loop Phase*) begann. Zusätzlich sollten die Auswirkungen des veränderten TGF- $\beta$  Signalwegs in Podozyten unter pathologischen Bedingungen der DN analysiert werden.

Die ersten Untersuchungen verifizierten einen erfolgreichen Podozyten-spezifischen und funktionsfähigen Knockout von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII auf allen Ebenen der Genexpression. Die Phänotyp-Analyse ergab, dass keiner der beiden Knockouts morphologische Veränderungen der allgemeinen Glomerulogenese oder der Entwicklung der Podozyten verursachte. Die Ausdifferenzierung der Podozyten erfolgte gleichermaßen in P-S7 kn und P-TR2 kn Mäusen. Ebenso wenig konnte eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion detektiert werden.

Weiterführende Analysen konnten zeigen, dass ein podozytär veränderter TGF- $\beta$  Signalweg im Alter zur Manifestation von histopathologischen Erscheinungen führte. Es konnte festgehalten werden, dass P-S7 kn Mäuse im Alter eine progressive Steigerung von Glomerulosklerosen und *Foot Process Effacement* Prozessen zeigten, während die GBM keine zusätzlichen Veränderungen aufwies. Diese Veränderungen in P-S7 kn Tieren gingen mit einer zusätzlich gesteigerten Expression von PAI-1 und CTGF sowie einer Reduktion von Synaptopodin einher und galten als molekulare Ursachen, die die Verschlechterung der Glomeruli-Morphologie vermittelten.

Im Gegensatz dazu konnten in alten P-TR2 kn Tieren normale altersbedingte Glomerulosklerosen, *Foot Process Effacement* Prozesse und Verdickungen der GBM

detektiert werden. Die Blockade des TGF- $\beta$  Signalwegs in Podozyten war tendenziell in der Lage, eine Verbesserung der Glomeruli-Morphologie hervorzurufen. Die fehlende Induktion von PAI-1 und CTGF sowie das unveränderte Expressionsprofil von Synaptopodin in Podozyten schienen folglich nicht auszureichen, um protektiv auf altersprogressive Veränderungen innerhalb der Glomeruli zu wirken.

Weiterführend wurde analysiert, wie sich die jeweiligen Knockout-Modelle während der initialen Phase einer STZ-induzierten DN verhalten. Generell konnte gezeigt werden, dass erfolgreich eine Hyperglykämie in STZ-injizierten Mäusen hervorgerufen wurde, die vergleichbare Ausmaße in P-S7 kn, P-TR2 kn und den jeweiligen Kontrollmäusen annahmen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Pathogenese der DN mit *Foot Process Effacement* begann, während eine Verdickung der GBM nach 2 Monaten noch nicht detektiert werden konnte. P-S7 kn Mäuse zeigten eine zusätzlich gesteigerte Expression von Col IV und Fibronectin, die mit dem tendenziell verstärkten Auftreten von Glomerulosklerosen und *Foot Process Effacement* Prozessen assoziiert wurden. Der alleinige Knockout des TGF- $\beta$  RII in Podozyten übte trotz fehlender Induktion von Col IV und Fibronectin kaum einen positiven Einfluss auf die Glomeruli-Morphologie aus.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der podozytäre TGF- $\beta$  Signalweg vorwiegend unter altersbedingten bzw. pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt, aber für die Entwicklung und Ausdifferenzierung der Podozyten *per se* ohne Bedeutung ist. Zusätzlich wurde deutlich, dass der Podozyt alleine fähig ist durch einen desinhibierten TGF- $\beta$  Signalweg negativ auf die gesamte Glomeruli-Struktur zu wirken, während die alleinige Blockade des TGF- $\beta$  Signalwegs in Podozyten nicht ausreichend in der Lage ist, eine Verbesserung hervorzurufen.

## 1.1 Abstract

The multifunctional growth factor Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) is involved in differentiation and the modulation of the extracellular matrix. The literature offers hints that TGF- $\beta$  has a pivotal role during kidney development in glomerulogenesis and the differentiation of podocyte-precursor cells to mature post-mitotic podocytes. Furthermore it is accepted that TGF- $\beta$  administrates a key function in the pathogenesis of diabetic nephropathy (DN).

In this study two mouse models (P-S7 kn and P-TR2 kn) with a conditional podocyte-specific knockout of Smad7 and TGF- $\beta$  RII respectively were generated. P-S7 kn mice were used to investigate consequences for podocytes of a desinhibition of the TGF- $\beta$  signaling, while P-TR2 kn mice were consulted to analyze impacts of a complete blocking of the TGF- $\beta$  pathway. The use of the so-called Podo-Cre mouse retains an exclusive expression of cre-recombinase in podocytes, which occurs early in development (capillary-loop stage). Additionally consequences of the modified TGF- $\beta$  signaling in podocytes under pathological conditions of DN should be examined. Hence, for the first time the participation of the TGF- $\beta$  signal transduction in podocyte development and podocyte functionality in DN could be investigated by an in vivo system.

First, a successful podocyte-specific and functional knockout of smad7 and TGF- $\beta$  RII respectively could be verified for all levels of gene expression. The phenotype analysis demonstrated no morphological changes of general glomerulogenesis or the development of podocytes in both Knockout mouse lines (neither P-S7 kn nor P-TR2 kn). Differentiation of podocytes occurred comparable in P-S7 kn and P-TR2 kn and no impairment of renal function could be detected.

Continuing analysis revealed mutated podocyte TGF- $\beta$  signaling became manifest in histopathological alterations in aging. Elder P-S7 kn mice exhibited a progressive increase of glomerulosclerosis and foot process effacement, while GBM indicated no further alterations. These changes were accompanied by an additional increase of PAI-1 and CTGF expression and a reduction of synaptopodin, which potentially mediated aggravations of the glomerular morphology.

In contrast P-TR2 kn mice showed normal age-related glomerulosclerosis, foot process effacement and GBM thickening. Blocking TGF- $\beta$  signaling in podocytes was just able to improve by trend the morphology of glomeruli. The missing induction of PAI-1 and CTGF only in podocytes and the unchanged expression of synaptopodin reveal to have insufficient ability to act protective.

The last aim was to investigate how both knockout models react during the initial phase of STZ-induced DN. Generally successful hyperglycemic conditions in STZ injected mice could be observed which assumed comparable properties in P-S7 kn, P-TR2 kn and control mice respectively. Furthermore pathogenesis of DN started with foot process effacement, while thickening of GBM could not be detected after 2 month of DN. The knockout of smad7 in podocytes resulted in an additional increase of Col IV and fibronectin expression, which was associated with an additional increase by tends of glomerulosclerosis and foot process effacement. The exclusive knockout of TGF- $\beta$  RII in podocytes hardly administrated a positive influence on glomerular morphology despite missing induction of Col IV and fibronectin.

Overall the results indicate TGF- $\beta$  signaling in podocytes has a predominate role under age-related and pathological conditions, but has no relevance for the development and differentiation of podocytes per se. Additionally it becomes apparent that podocytes alone are able to act negatively on the structure of glomeruli by a desinhibited TGF- $\beta$  pathway, while a blocked TGF- $\beta$  signaling exclusive to podocytes only tend to cause an improved morphology.

## 2 Einleitung

Die Funktionalität eines Organs ergibt sich aus einem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Zellen und deren molekularer Ausstattung. Zu den lebenswichtigen Organen des Menschen zählen unter anderem die Nieren, die neben der Regulation des Wasser- und Salzhaushalts auch die langfristige Kontrolle des Blutdrucks übernehmen und als Ausscheidungsorgane für harnpflichtige Stoffwechselprodukte dienen.

Die Grundlagenforschung im Bereich der Nephrologie beschäftigt sich mit den strukturellen und physiologischen Zusammenhängen der Nierenfunktion. Die Aufklärung der verschiedenen molekularen Abläufe während der Organogenese sowie unter pathologischen Bedingungen steht dabei an zentraler Stelle.

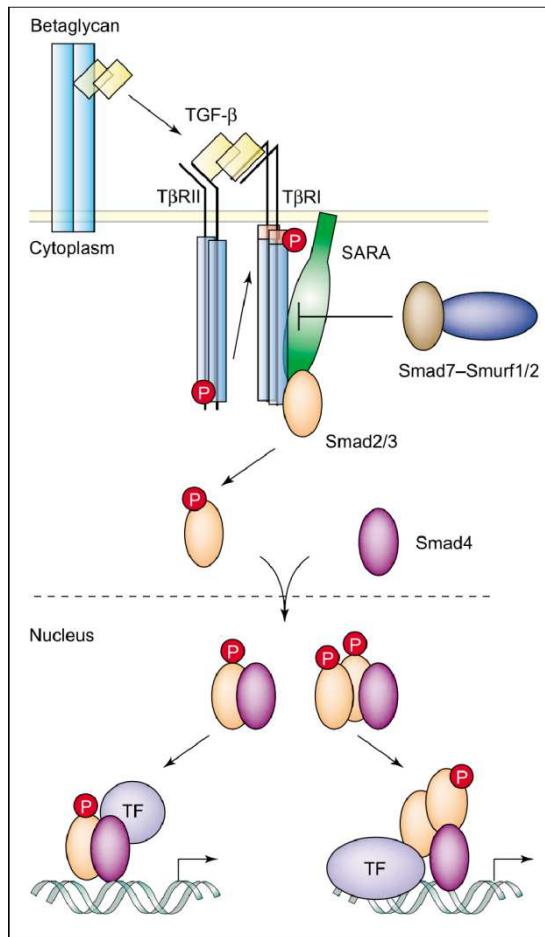
Für die Kommunikation zwischen Zellen sind diverse Wachstumsfaktoren verantwortlich. Ein multifunktionales Zytokin, das sowohl in Entwicklungsprozessen als auch in zahlreichen Pathogenesen der Niere involviert ist, stellt der Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) dar. Dessen Funktion soll in dieser Arbeit für einen Nieren-spezifischen Zelltyp, den Podozyten, näher beleuchtet werden.

### 2.1 TGF- $\beta$ und dessen Signaltransduktion

Anfang der 80er Jahre wurde der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  entdeckt und seither intensiv untersucht. TGF- $\beta$  ist ein multifunktionales Protein, das sowohl während der Entwicklung als auch für die zelluläre Homöostase im adulten Organismus eine entscheidende Rolle spielt. Je nach Zellstatus und Gewebetyp reguliert TGF- $\beta$  Prozesse der Proliferation, der Differenzierung oder der Apoptose. Zusätzlich ist dieser Faktor am Umsatz der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt und kann durch seine Wirkung auf die Zelladhäsion die migrativen Eigenschaften einer Zelle beeinflussen.

Im menschlichen Organismus können drei Isoformen (TGF- $\beta$  1-3) unterschieden werden. Diese Proteine gehören zu den Zytokinen der TGF- $\beta$  Superfamilie, zu deren Mitgliedern unter anderem auch die Bone Morphogenetic Proteine (BMPs) sowie Aktivin/Inhibin und Growth Differentiation Factors (GDFs) zählen (Shi and Massague, 2003).

Bei den TGF- $\beta$  Proteinen handelt es sich um ubiquitär exprimierte, sezernierte Proteine, die untereinander eine große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Alle Isoformen werden als lange Precursor-Proteine translatiert, aus der Zelle geschleust und erhalten erst nach proteolytischer Spaltung und anschließender Homodimerisierung ihre vollständige Aktivität (ten Dijke and Hill, 2004).



**Abb. 1: Schematische Darstellung des klassischen TGF- $\beta$  Signalwegs.**

Nach Bindung von TGF- $\beta$  an den TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II (hier T $\beta$ RII) rekrutiert und phosphoryliert dieser den TGF- $\beta$  Rezeptor Typ I (hier T $\beta$ RI). Dies führt zur Aktivierung und Phosphorylierung von Smad2/3, welche daraufhin mit Smad4 interagieren. Dieser Smad-Komplex transloziert anschließend in den Nukleus und aktiviert zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren (TF) die Transkription von spezifischen TGF- $\beta$  Zielgenen. Zusätzlich unterstützen verschiedene Proteine wie beispielsweise Betaglycan und SARA (SMAD anchor for receptor activation) die Vermittlung des TGF- $\beta$  Signals. Negativ regulieren Proteine wie Smad7 und Smurf1/2 (Smad specific E3 Ubiquitin Protein Ligasen 1 und 2) die Aktivität der Signaltransduktion (Deryck and Zhang, 2003).

Für die Vermittlung der TGF- $\beta$  Signale ist der TGF- $\beta$  Signalweg verantwortlich (Abb. 1). Die Aktivierung der klassischen TGF- $\beta$  Signaltransduktion beginnt mit der Bindung der Liganden an den TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II (TGF- $\beta$  RII). Dieser Rezeptor gehört zu den Serin/Threonin (Ser/Thr)-Kinasen, die sich aus einer Cystein-reichen extrazellulären Ligand-Bindedomäne sowie einer Transmembran- und einer Serin-Threonin-reichen intrazellulären Domäne zusammensetzen (Segarini, 1993). Im inaktivierten Zustand liegt der TGF- $\beta$  RII als Homodimer in der Zytosomen-Membran der Zelle vor (Gilboa *et al.*, 1998). Durch die Bindung des Liganden wird der TGF- $\beta$  RII aktiviert, gefolgt von einer Anlagerung des Komplexes an ein TGF- $\beta$  Rezeptor Typ I (TGF- $\beta$  RI)-Dimer. Diese Oligomerisierung bewirkt eine Phosphorylierung des TGF- $\beta$  RI an dessen intrazelluläre Ser/Thr-Domäne. Der hierdurch aktivierte Rezeptor-Komplex ist daraufhin in der Lage die sogenannten Rezeptor-

regulierten Smads (R-Smad; Smad: *small mothers against decapentaplegic*), Smad2 und Smad3, wiederum durch Phosphorylierung zu aktivieren. Im Anschluss an diese Phosphorylierung dissoziieren die R-Smads vom Rezeptor und interagieren mit dem *common* Smad 4 (co-Smad 4). Dieser Komplex aus Smad2/3 und Smad4 transloziert daraufhin in den Nukleus, wo er weitere Transkriptionsfaktoren (TF) rekrutiert und die Genexpression von TGF- $\beta$  Zielgenen aktiviert (Abb. 1) (Pohlers *et al.*, 2009).

Seine Multifunktionalität erhält der TGF- $\beta$  Signalweg durch die verschiedensten Regulationsmechanismen, die zeitlich und räumlich auf allen Ebenen der Transduktionskette eingreifen können (Schmierer and Hill, 2007). Diese Ebenen lassen sich hierbei in Ligand-Aktivierung, Rezeptor-Komplex Zusammensetzung, R-Smad Aktivierung, Translokation und die Transkription im Nukleus einteilen. Bereits die Affinität der TGF- $\beta$  Liganden zu ihren Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle. Während TGF- $\beta$ 1 und 3 direkt von TGF- $\beta$  RII gebunden werden, ist für die Bindung von TGF- $\beta$ 2 zusätzlich Betaglycan, auch als TGF- $\beta$  RIII bekannt, notwendig (Lopez-Casillas *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1995; Wrana *et al.*, 1992). Intrazellulär unterstützen Proteine wie beispielsweise SARA (SMAD anchor for receptor activation) die Weiterleitung des Signals.

Darüber hinaus wird die TGF- $\beta$  Signaltransduktion durch komplex gesteuerte negative Rückkopplungs-Mechanismen (negative feedback-loops) moduliert. Auch diese greifen auf allen Stufen der Signalvermittlung, vom Extrazellularraum bis hin zum Zellkern, ein.

Eine Komponente der negativen Regulation im Zytoplasma der Zelle ist das Smad7 Protein. Smad7 gehört (zusammen mit Smad6) zu den inhibitorischen Smads (I-Smad) und antagonisiert sowohl den TGF- $\beta$  als auch den BMP-Signalweg (Hayashi *et al.*, 1997; Souchelnytskyi *et al.*, 1998).

Strukturell weisen alle Smad Proteine eine gewisse Ähnlichkeit auf. R-Smads setzen sich aus zwei konservierten Domänen, bestehend aus N-terminal gelegener MH1- und die C-terminale MH2-Domäne, zusammen, welche durch eine Prolin-reiche Linker-Region miteinander verbunden sind (Attisano and Lee-Hoeplich, 2001). Im Unterschied zu den R-Smads und Smad4 besitzt Smad7 keine N-terminale MH1 Domäne, sondern lediglich die konservierte MH2 Domäne am C-Terminus. Die Funktionalität als Inhibitor des TGF- $\beta$  Signalwegs erhält das Smad7 Protein durch das Fehlen des Phosphorylierungsmotivs innerhalb der MH2 Domäne. Als Folge ist Smad7 zwar in der Lage, an den aktivierte TGF- $\beta$  RI zu binden, kann aber nicht phosphoryliert werden und hemmt somit kompetitiv die Aktivierung der R-Smads (ten Dijke and Hill, 2004; Yan and Chen, 2011). Außerdem enthält der N-Terminus von Smad7 verschiedene Sequenzmotive, die post-translational modifiziert werden können, wodurch die Regulationsmöglichkeiten von Smad7 zusätzlich erweitert werden.

Die Relevanz des TGF- $\beta$  Signalwegs für den gesamten Organismus wird besonders durch *in vivo* Untersuchungen an Mäusen mit “Loss-of-Function”-Mutationen einzelner Gene der TGF- $\beta$  Signaltransduktion deutlich. Dabei zeigte sich, dass der Knockout von verschiedenen Komponenten, unabhängig von der Ebene der TGF- $\beta$  Signalvermittlung, meist zu einem letalen Phänotyp führt. Die einzelnen Ursachen, der Zeitpunkt der Letalität sowie die morphologischen Ausprägungen der verschiedenen Knockouts variieren dabei deutlich (Dunker and Kriegstein, 2000; Goumans and Mummery, 2000; Weinstein *et al.*, 2000). Der Knockout von Smad2 und Smad4 führt bereits im Embryonalstadium (Smad2<sup>-/-</sup>: E8,5; Smad4<sup>-/-</sup>: E7,5) zum Tod der Mäuse (Dunker and Kriegstein, 2000; Nomura and Li, 1998; Sirard *et al.*, 1998). Gleichermaßen konnte auf Rezeptorebene beobachtet werden. TGF- $\beta$  RII<sup>-/-</sup>-defiziente Mäuse sterben bereits embryonal am Tag E10,5 und weisen deutliche Defekte der Dottersack-Hämatopoese und der Vaskulogenese auf (Oshima *et al.*, 1996). Heterozygote TGF- $\beta$ 1defiziente Mäuse sind steril, homozygote Nachkommen sterben jedoch postnatal im Alter von ca. 4 Wochen an immunologischen Fehlfunktionen (Shull *et al.*, 1992). Wie unterschiedlich die Effekte sein können, verdeutlicht auch ein Knockout von TGF- $\beta$ 2. Bei diesen Mäusen kommt es zum Tod kurz vor oder während der Geburt durch die Folgen von unterschiedlichen Fehlbildungen (Sanford *et al.*, 1997). Die Mäuse weisen dabei neben Skelett-, Herz-, und Lungen-Defekten auch verschiedene Fehlbildungen des Urogenitalsystems auf. Morphologische Untersuchungen zeigen, dass eine Defizienz von TGF- $\beta$ 2 zu einer Erweiterung des Nierenbeckens und im schwerwiegendsten Falle sogar bis hin zu einem völligen Fehlen der Niere führen kann (Sanford *et al.*, 1997).

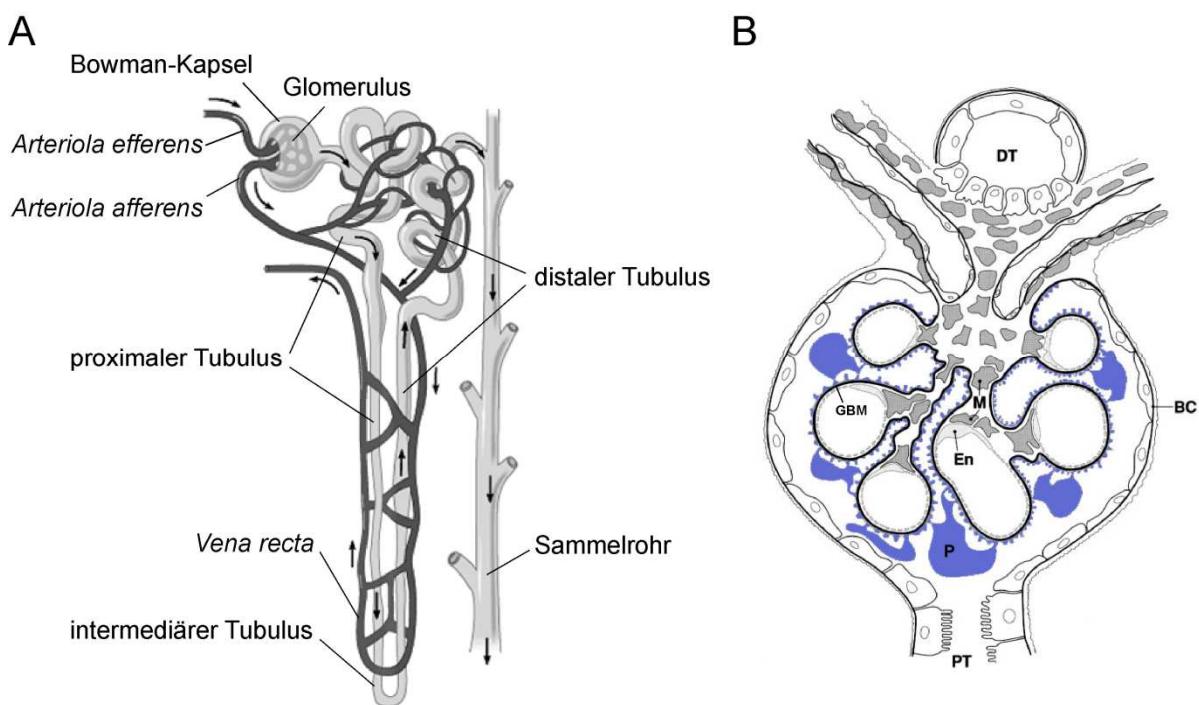
Diese Erkenntnisse verdeutlichen, wie wichtig der TGF- $\beta$  Signalweg für die Organogenese während der Entwicklung ist. Infolgedessen soll in dieser Arbeit die Wirkungsweise von TGF- $\beta$  in Bezug auf die Entwicklung der Niere und die TGF- $\beta$  vermittelten Effekte anhand eines zellspezifischen Knockouts näher beleuchtet werden.

## 2.2 Das Nephron

Die Nieren von Säugetieren übernehmen viele wichtige physiologische Funktionen. Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Kontrolle des Wasser- und Salzhaushalts, die langfristige Regulation des Blutdrucks sowie die Ausscheidung harnstoffpflichtiger Stoffwechselprodukte (Welsch, 2005).

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Hier erfolgt die Ultrafiltration des Blutes und die anschließende Generierung des Endharns (Urin). Ein Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen) und dem sich anschließenden Nierentubulus (Abb. 2A).

Das Nierenkörperchen setzt sich aus der Bowman-Kapsel, dem Glomerulus und den Mesangial-Zellen zusammen (Abb. 2B). Die Bowman-Kapsel kann in ein äußeres Blatt, bestehend aus glomerulären parietalen Epithelzellen und ein inneres Blatt, das die glomerulären viszeralen Epithelzellen (Podozyten) bilden, eingeteilt werden. Durch diesen Aufbau wird das Lumen des Harnraums definiert, in welches der Primärharn ab filtriert wird (Welsch, 2005). Im Inneren der Bowman-Kapsel liegt ein kugeliges Konvolut aus Blutkapillaren, das als Glomerulus bezeichnet wird. Die Mesangial-Zellen liegen zwischen den Blutkapillaren. Sie besitzen phagozytische Eigenschaften und tragen maßgeblich zur Struktur-Erhalterung des Glomerulus bei.



**Abb. 2: Aufbau des Nephrons und des Nierenkörperchens.**

(A) Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, das sich aus dem Nierenkörperchen, bestehend aus Glomerulus und Bowman-Kapsel, und dem Tubulus-System zusammensetzt. Letzteres lässt sich in den proximalen Tubulus und den distalen Tubulus unterteilen. Die Ableitung des Endharns erfolgt über das Sammelrohr. Die Blutversorgung (kursiv markiert) in den Glomerulus erfolgt über die *Arteriola efferens*, die Abfuhr über die *Arteriola afferens*. Venöses Blut wird über die *Vena recta* abgeleitet. Modifiziert nach (Campbell *et al.*, 2003). (B) Bestandteile des Nierenkörperchens: Fenestrierte Endothel-Zellen (En), Glomeruläre Basalmembran (GBM), Podozyten (P; in blau), Mesangial-Zellen (M), Bowman-Kapsel (BC). Am Ausgang des Nierenkörperchens schließt sich der proximale Tubulus (PT) an, während am Glomerulus Pol der distale Tubulus (DT) verläuft. Modifiziert nach (Branton and Kopp, 1999)

Der Filtrationsapparat des Glomerulus wird durch drei Komponenten aufgebaut (Quaggin and Kreidberg, 2008). Auf der Blut-zugewandten Seite findet man spezialisierte Endothel-Zellen mit charakteristischer, für die Filtration notwendiger Fenestrierung ( $\varnothing$  60 – 70 nm), die keine Diaphragmen besitzen (Fogo and Kon, 2010; Satchell and Braet, 2009). Des Weiteren werden die Endothel-Zellen von einer stark negativen geladenen Glykokalyx bedeckt, welche

die selektive Filtration durch das Zurückhalten von negativen Makromolekülen begünstigt (Singh *et al.*, 2007).

Dem Endothel liegt die sogenannte glomeruläre Basalmembran (GBM) auf. Diese hochspezialisierte Basallamina besteht aus definierten extrazellulären Matrix (EZM) – Proteinen und stellt eine weitere Hauptkomponente der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) dar (Miner, 2011b). Im Laufe der Entwicklung entsteht sie aus der Fusion der endothelialen und epithelialen Basalmembranen (Miner, 2011b). Als strukturelle Parameter konnten Deen *et al.* zeigen, dass die GBM von Ratten eine Dicke von ca. 200 nm aufweist, die Höhe der humane GBM beträgt ca. 300 – 400 nm (Deen *et al.*, 2001). Charakteristisch für die ausgereifte GBM sind Proteine wie Kollagen Typ IV (Col IV), Laminin, Fibronectin, Argin, Nidogen1 und 2 sowie die negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) (Khoshnoodi *et al.*, 2008; Miner, 2011a). Diese negative Ladung ist eine Ursache für die Funktionalität der Filtrationsbarriere. Dies beweisen Untersuchungen, die belegen, dass ein Verlust der HSPGs mit einer erhöhten Permeabilität der GBM einhergeht (Kanwar *et al.*, 1980; Raats *et al.*, 2000; Tamsma *et al.*, 1994). Aber nicht nur eine Beeinflussung der Ladung der GBM kann sich auf die Filtrationsleistung auswirken. Auch eine gestörte Homöostase der GBM-Zusammensetzung kann zu einem Funktionsverlust führen. So resultiert eine Akkumulation von EZM-Proteinen ebenfalls in einem Verlust von Proteinen mit dem Urin (Akhtar and Al Mana, 2004; Shankland, 2006). Unter pathologischen Bedingungen kommt es vor allem zu einer gesteigerten Synthese von Col IV, aber auch Laminin und Fibronectin werden vermehrt exprimiert (Miner, 2011a).

Nach außen wird der Glomerulus von den Podozyten abgegrenzt. Über ihre einzigartige Architektur mit ineinander verzahnten Fußfortsätzen sitzen diese der GBM auf und bilden so die äußere Grenze der Blut-Harn-Schranke. Zwischen den Fußfortsätzen der benachbarten Podozyten liegt die sogenannte Schlitzmembran (siehe Abb. 4), eine hochspezialisierte Zell-Zell-Verbindung.

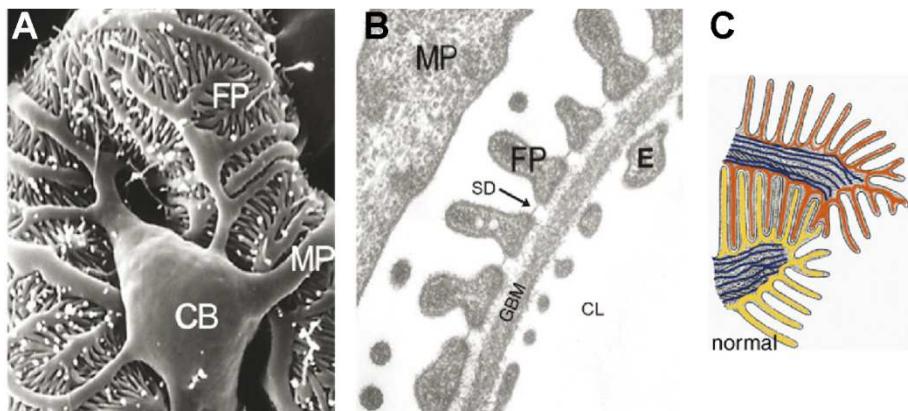
Nach der Bildung des Primärharns erfolgt die Generierung des Sekundär-Harns (Urin), für den das Röhrensystem des Tubulus verantwortlich ist. Das Tubulus-System beginnt am Harnpol des Nierenkörperchens und füllt den größten Teil der Niere aus (Abb. 2A). Es wird durch den proximalen, den intermediären und den distalen Tubulus aufgebaut und mündet anschließend in das Sammelrohr. Am proximalen Tubulus werden 70-80 % des filtrierten Wassers und Natriums sowie Glucose und Aminosäuren rückresorbiert. Im distalen Tubulus kommt es zu einer intensiven Rückresorption von Natrium und Chlorid, während Wasser kaum noch resorbiert wird. Über die genaue funktionelle Bedeutung des intermediären Tubulus ist noch wenig bekannt. Der gesamte Prozess dient jedoch letztlich der Bildung des Endharns in seiner definierten Zusammensetzung, der daraufhin in das Sammelrohr der

Niere weitergeleitet wird. Im Sammelrohr erfolgt die endgültige Aufkonzentrierung des Harns durch den sogenannten ADH (Antidiuretisches Hormon) –abhängigen Wasserentzug.

Unter physiologischen Bedingungen besteht der Urin aus 95 % Wasser, Ionen sowie aus anorganischen und organischen Stoffwechselendprodukten. Zelluläre Proteine kommen nur in sehr geringen Konzentrationen im Urin vor. Eine Schädigung der Nieren kann jedoch zu einem gesteigerten Ausscheiden von Plasmaproteinen führen. Ein solcher klinischer Befund wird als Proteinurie bezeichnet, der bei einem progressiven Verlauf zu einer sukzessiven Niereninsuffizienz, bis hin zu einem völligen Funktionsverlust der Nieren führen kann.

## 2.3 Glomeruläre viszerale Epithelzellen – die Podozyten

Podozyten, auch glomeruläre viszerale Epithelzellen genannt, sind hoch-differenzierte, post-mitotische Epithelzellen, die der GBM aufsitzen und eine der wichtigsten Komponenten der Ultrafiltration darstellen (Cheng and Harris, 2010). Charakteristisch für Podozyten ist ihre komplexe und einzigartige Architektur. Sie besitzen einen großen, apikal in den Harnraum ragenden Zellkörper, der sich zuerst in primäre Zellfortsätze (PF) verzweigt, die sich wiederum weiter in einzelne Fußfortsätze (FF) aufteilen (Abb. 3A). Diese spezialisierte Form erhalten die Podozyten durch ein streng organisiertes Zytoskelett (Abb. 3C). Während sich im Zellkörper ausschließlich ein subplasmiales (kortikales) Aktin-Zytoskelett befindet, werden die Primärfortsätze durch zusätzliche Mikrotubuli und Intermediärfilamente, wie Vimentin und Desmin, geformt (Holthofer *et al.*, 1984; Yaoita *et al.*, 1990). Innerhalb des Glomerulus herrscht ein hoher hydrostatischer Druck von ca. 60 mm Hg (Greka and Mundel, 2012). Um diesem Druck standzuhalten und zu unterstützen, besitzen die Fußfortsätze ein kontraktiles, kortikales Aktin-Zytoskelett aus  $\alpha$ -Actinin, Myosin II sowie dem podozyten-spezifischen Protein Synaptopodin (Abb. 4 – 2) (Ichimura *et al.*, 2003). Synaptopodin gehört zur Klasse der Prolin-reichen, Aktin-assoziierten Proteine, dessen Expression charakteristisch für Podozyten ist. Synaptopodin bindet direkt an  $\alpha$ -Actinin und ist gleichzeitig in der Lage, die Aktin-Dynamik des Zytoskeletts zu regulieren (Faul *et al.*, 2007; Mundel *et al.*, 1997a). Die Bedeutung von Synaptopodin für den Podozyten wird durch verschiedene Untersuchungen deutlich, die beschreiben, dass eine Verringerung der Synaptopodin Expression direkt mit dem Schweregrad einer Proteinurie einhergeht (Barisoni *et al.*, 1999; Hirakawa *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2011; Schmid *et al.*, 2003).



**Abb. 3: Spezifische Podozyten Morphologie mit ineinander verzahnten Fußfortsätze.**

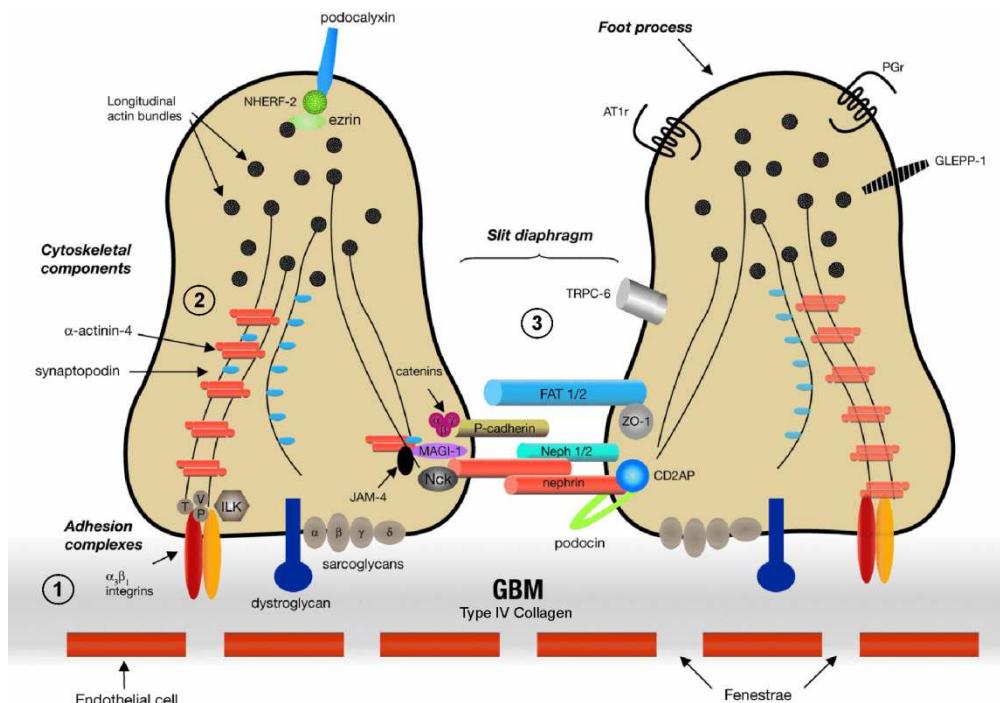
(A) Aufnahme eines Podozyten mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops. (B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einzelner Fußfortsätze. (C) Schematische Darstellung des Zytoskeletts von zwei benachbarten Podozyten. Die Primärfortsätze werden durch Mikrotubuli (blau) geformt, während die primären Fußfortsätze der Podozyten ein streng organisiertes Aktin-Zytoskelett aufweisen (rot, gelb). CB: Zellkörper; MP: Primärfortsatz; FP: Fußfortsatz; SD: Schlitzmembran; GBM: Glomeruläre Basalmembran; E: Endothel-Zelle; CL: Kapillarlumen. Modifiziert nach (Faul *et al.*, 2007)

Die einzelnen verzweigten Fußfortsätze des Podozyten umgreifen die Kapillarschlingen des Glomerulus und sind fest mit der GBM verankert (Abb. 3B). Für die Anheftung sind vorwiegend  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine und  $\alpha$ -und  $\beta$ -Dystroglycane verantwortlich (Abb. 4 – 1). Dies zeigen Untersuchungen an Mäusen, die eine Podozyten-spezifische Defizienz von Integrin  $\beta 1$  aufweisen. Diese Tiere sterben bereits eine Woche nach der Geburt und weisen eine renale Dysfunktion in Form von Proteinurie auf. Morphologisch ist ein deutliches *Foot Process Effacement* erkennbar, bei dem es zu einer Abflachung und dem Verlust der einzelnen Fußfortsätze sowie zu einem direkten Aufliegen dieser an die GBM kommt (Kanasaki *et al.*, 2008).

Im Zytoplasma der Podozyten verknüpfen Adapterproteine wie Talin, Vinculin und Paxillin die membranständigen Integrine mit den Aktinfilamenten der Fußfortsätze (Faul *et al.*, 2007). Eine Umverteilung einzelner Proteine führt auch hier zu einem Struktur- und Funktionsverlust des Podozyten und weist dadurch auf die Bedeutung einer genau definierten Zell-Matrix-Verbindung für die gesamte Integrität des Podozyten hin (Whiteside *et al.*, 1993).

Eine weitere wichtige Besonderheit der Podozyten ist die sogenannte Schlitzmembran (*slit diaphragm*; Abb. 3B; Abb. 4 – 3). Dieser Reißverschluss-artige (*zipper-like*) Proteinkomplex verbindet die ineinander verzahnten Fußfortsätze und überbrückt somit den Filtrationsschlitz zwischen den einzelnen Podozyten (Tryggvason, 1999). Der gesamte transzelluläre Proteinkomplex wird durch überlappende stäbchenförmige Untereinheiten benachbarter Fußfortsätze aufgebaut und weist eine Breite von ca. 30 – 45 nm auf (Rodewald and Karnovsky, 1974). Durch das Auftreten von ca. 5 – 15 nm großen Poren

innerhalb der Schlitzmembran wird eine hohe Permeabilität für Wasser und gelöste Stoffe erreicht, während große Proteine (> 5 kDa) zurückgehalten werden (Jefferson *et al.*, 2011).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Schlitzmembran von benachbarten Fußfortsätzen der Podozyten.**

(A) Die Anheftung der Fußfortsätze an die GBM erfolgt vorwiegend über  $\alpha_3\beta_1$  Integrine sowie  $\alpha$ -und  $\beta$ -Dystroglycane. Diese verbinden sich über die Adapterproteine Vinculin (V), Paxillin (P) und Talin (T) mit den Komponenten des Aktin-Zytoskeletts. (2) Das Aktin-Skelett der Fußfortsätze setzt sich aus longitudinalen Aktin-Bündeln zusammen, die direkt mit  $\alpha$ -Actinin4 und Synaptopodin interagieren. (3) Am Aufbau der Schlitzmembran sind charakteristische Komponenten wie Nephrin, Podocin, Neph1/2, Nck und CD2AP sowie P-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Catenine und Zonula Occludens Protein 1 (ZO-1) beteiligt. Nach (Michaud and Kennedy, 2007).

Die Schlitzmembran stellt eine besondere Art von *Adherens Junctions* (Adhärenz-Verbindungen) dar (Reiser *et al.*, 2000). Infolgedessen findet man in der Schlitzmembran typische Komponenten der epithelialen *Adherens Junctions*, wie das transmembrane P-Cadherin, die Adapterproteine  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Catenine sowie Vinculin und Talin (Faul *et al.*, 2007). Die Sonderstellung dieser Zellverbindung erhält die Schlitzmembran durch zusätzliche, Podozyten-spezifische Proteine.

Als zentrale Komponente der Schlitzmembran konnte das Transmembran-Protein Nephrin beschrieben werden. Mutationen im *NPHS1* Gen stellen die Ursache des kongenitalen Nephrotischen Syndroms des Finnischen Typs (CNSF) dar, eine seltene autosomal rezessiven Erbkrankheit, die bereits im perinatalen Stadium zu massiver Proteinurie führt (Kestila *et al.*, 1998). Ähnliche Befunde konnten auch durch *Nphs1*<sup>-/-</sup> Knockout Mäuse bestätigt werden, welche die gleiche Symptomatik von CNSF aufzeigen. Der Nephrin-Verlust führt dabei (Putala *et al.*, 2001) zu einem völligen Fehlen der Schlitzmembran, begleitet von

massiver Proteinurie und dem Tod der Tiere innerhalb von 24 Stunden (Patrakka and Tryggvason, 2010; Putala *et al.*, 2001).

Die zweite wichtige Proteinkomponente der Schlitzmembran ist Podocin, das durch das *NPHS2* Gen codiert wird. Ähnlich wie bei Nephrin, führen Mutationen dieses Gens zu Proteinurie und resultieren in dem Krankheitsbild des erblich bedingten Nephrotischen Syndroms (Khoshnoodi and Tryggvason, 2001). Podocin liegt als integrales Protein in der Zytoplasma-Membran des Podozyten vor und interagiert direkt mit Nephrin und intrazellulären Adapterproteinen (Schwarz *et al.*, 2001). Als funktionelle Aufgabe wird vermutet, dass Podocin für die Rekrutierung von Nephrin im Bereich der Schlitzmembran verantwortlich ist (Boute *et al.*, 2000).

Im Zytoplasma werden Nephrin und Podocin über die Adapterproteine CD2AP (CD2-assoziiertes Protein) und Nck1/2 (Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1) mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Des Weiteren sind die Nephrin-verwandten Proteine Neph1/2/3 sowie FAT-1 (Protocadherin) und ZO-1 (Zonula Occludens-1) im Bereich der Schlitzmembran lokalisiert. Nur durch ein komplexes Zusammenspiel all dieser Proteine kann ein funktionsfähiger Aufbau der Schlitzmembran gewährleistet werden. Selbst der Verlust einzelner Komponenten resultiert häufig in massiver und progressiver Proteinurie sowie *Foot Process Effacement*, bis hin zum völligen Verlust der gesamten Schlitzmembran. Aber nicht nur einzelne strukturgebende Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Funktionalität des Filtrationsapparats. Die Aufrechterhaltung der Integrität der Schlitzmembran und von Podozyten im Allgemeinen unterliegen zusätzlich der Regulation von verschiedenen Signalwegen (Chuang and He, 2009). Wichtig für die weitere Aufklärung von phänotypischen und pathologischen Veränderungen der Podozyten ist es daher, die spezifischen Regulationsmechanismen zu identifizieren und zu analysieren, die für diesen komplexen Zelltyp von Bedeutung sind.

## 2.4 Bedeutung des TGF- $\beta$ Signalwegs für Podozyten

### 2.4.1 Rolle von TGF- $\beta$ auf die Glomerulogenese und die Differenzierung der Podozyten

In der Embryonalentwicklung entstehen nacheinander drei Nierenanlagen. Die Niere als endgültiges Ausscheidungsorgan entsteht aus der letzten Anlage, dem *Metanephros*. Dieser besteht aus den strukturellen Anlagen der Ureterknospe und dem metanephrogenen Blastem, welche im Verlauf verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen (Moore *et al.*, 2007).

Aus der Ureterknospe entwickelt sich der Ureter, das Nierenbecken, der Nierenkelch sowie die Sammelrohre (Moore *et al.*, 2007). An jedem bogenförmigen Ende des Sammelrohrs wird die Bildung eines epithelialen Metanephros-Bläschens aus mesenchymalen Zellen des metanephrogenen Blastems induziert (Dressler, 2006). Dieses Nachnierenbläschen durchläuft anschließend weitere Entwicklungsstufen, welche mit dem sog. komma-förmigen Stadium beginnt.

Die eigentliche Glomerulogenese beginnt mit der anschließenden S-förmigen Phase, gefolgt von der Bildung des glomerulären Gefäßknäuels und der Reifung zum funktionsfähigen Glomerulus (Dressler, 2006; Quaggin and Kreidberg, 2008).

Die molekularen Mechanismen der komplexen Morphogenese der Niere sind nicht bis ins Detail geklärt. Sicher ist, dass es sich um ein genau definiertes Zusammenspiel aus morphogenen Aktivatoren und Inhibitoren handelt.

Verschiedene Studien lassen eine Beteiligung von TGF- $\beta$  und dessen Signaltransduktion in der Entwicklung des Metanephrons vermuten (Bush *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 1993). Bereits in frühen Phasen der Nephrogenese belegen *in situ* Hybridisierungen eine Expression von TGF- $\beta$ 1 – 3 im Epithel der verzweigten Ureterknospe (Lehnert and Akhurst, 1988; Pelton *et al.*, 1991). Für TGF- $\beta$ 1 konnte zusätzlich eine Expression in unterschiedlichen Stadien der Glomerulogenese, einschließlich des Metanephros-Bläschens, der Komma- sowie der S-förmigen Phase und im unreifen Glomerulus gezeigt werden (Clark *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2010). Durch Untersuchungen, die belegen, dass es während der Entwicklung auch zur Expression der beiden Rezeptortypen kommt, liegt die Vermutung nahe, dass TGF- $\beta$  auch funktional seine Rolle ausüben kann (Choi *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1995; Mariano *et al.*, 1998). Aber nicht nur TGF- $\beta$  RI und RII sind vorhanden, sondern auch die dazugehörigen Signalvermittler Smad2/3 und 4 sowie Smad7 als regulatorisches Protein werden in den einzelnen Entstehungsphasen synthetisiert (Banas *et al.*, 2007; Oxburgh and Robertson, 2002).

Die morphologischen Auswirkungen von TGF- $\beta$  während der Nephrogenese wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die exogene *in vitro* Behandlung von Metanephronen in Organkultur mit TGF- $\beta$ 1 zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtgröße der Niere durch eine Verringerung der Verzweigungen der Ureterknospen sowie zu einer Verkürzung der einzelnen Astlängen und zu einer Verdickung des Ureterstiels führt (Bush *et al.*, 2004). Diese Befunde können durch die Arbeit von Clark *et al.* bestätigt werden, legen aber eine zeitlich definierte Aktion von TGF- $\beta$ 1 für die Entwicklung der Niere nahe (Clark *et al.*, 2001).

Aus zahlreichen Analysen ist außerdem bekannt, dass TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle in Prozessen der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) spielt, wie sie bei fibrotischen

Erkrankungen, in Wundheilungsprozessen und der Metastasenbildung vorkommen (Kriz *et al.*, 2011; Lee, 2012; Sam *et al.*, 2006; Wendt *et al.*, 2009). In der Niere sind fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und diabetische Nephropathien (DN) Beispiele für fibrotische Erkrankungen, bei denen es in verschiedenen Zellen (tubuläre Zellen und Podozyten) zur Umwandlung in mesenchymal dedifferenzierte Zellen kommen kann (Li *et al.*, 2008; Yeh *et al.*, 2010). Während der Entwicklung der Nephrone läuft der umgekehrte Mechanismus von EMT ab. Hier durchlaufen die Zellen eine mesenchymal-epithelialie Transition (MET) (Miner, 2011b). Daher stellt sich die Frage, ob es sich bei MET während der Entwicklung um den ursprünglichen Mechanismus handelt, der letztendlich in pathologischen Veränderungen in umgekehrter Weise verändert ist. Infolgedessen könnte daraus eine Rolle von TGF- $\beta$  für die Differenzierung der epithelialen Zellen im Nephron abgeleitet werden. Über diese Annahme ist in der Literatur allerdings noch wenig bekannt.

Während der Glomerulogenese beginnt die Ausdifferenzierung der Podozyten aus Podozyten-Vorläuferzellen. In diesem Stadium exprimieren die Zellen erstmals spezifische Komponenten der Schlitzmembran, wie beispielsweise Podocin und Nephrin sowie Synaptopodin (Pavenstadt *et al.*, 2003). Neben der definierten Proteinzusammensetzung der Podozyten ist es außerdem von zentraler Bedeutung, dass die komplexe dreidimensionale Architektur des Podozyten ausgebildet wird. Infolgedessen spielen während der Differenzierung der Podozyten auch Signalwege eine wichtige Rolle, die die Polarität der Zellen regulieren. Bislang dokumentieren Studien, dass konservierte Polaritätskomplexe wie Par3 und Par6 sowie der atypische Protein Kinase C (aPKC) –Komplex für die Regulation der Podozyten-Morphologie mitverantwortlich sind (Hartleben *et al.*, 2008; Simons *et al.*, 2009). Interessanterweise konnten von Ozdamar *et al.* eine Beteiligung des TGF- $\beta$  Signalwegs an der Regulation der epithelialen Plastizität gezeigt werden. An Untersuchungen von epithelialen HEK-293 Zellen konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  RII direkt mit Par6 interagiert und diesen phosphoryliert. Ein Prozess, der für den TGF- $\beta$  abhängigen EMT Mechanismus erforderlich ist (Ozdamar *et al.*, 2005). Inwieweit dieser Mechanismus auch für die epithelialen Podozyten zutrifft, ist bislang allerdings noch nicht geklärt.

Wie bereits erwähnt, sind Podozyten post-mitotische Zellen. Diese Eigenschaft erhalten die Podozyten während der Differenzierungsphase, in der die noch mitotisch aktiven Podozyten-Vorläufer-Zellen in einen Wachstumsstopp eintreten. Der genaue Mechanismus dieser Zellzyklus-Kontrolle ist auch hier noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt. Untersuchungen von Wu *et al.* lassen jedoch vermuten, dass dieser Prozess unter Beteiligung des TGF- $\beta$  Signalwegs ablaufen könnte (Wu *et al.*, 2005). Dazu benutzte Wu konditional immortalisierte

Podozyten, die unter permissiven Inkubationsbedingungen ( $33^{\circ}\text{C}$ ) proliferieren und somit den Status von Podozyten-Vorläufer-Zellen darstellen, während sie unter nicht-permissiven Bedingungen ( $37^{\circ}\text{C}$ ) die Morphologie und den Status ausgereifter Podozyten annehmen (Mundel *et al.*, 1997b). Durch Analysen der Zellen während des nachgestellten Differenzierungsprozesses konnte Wu zeigen, dass TGF- $\beta$  autokrin auf die Podozyten wirkt und dadurch einen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Arrest über die TGF- $\beta$ /Smad3-abhängige Induktion von Cdkn2b (Cyclin dependent kinase inhibitor 2B) bewirkt (Wu *et al.*, 2005). *In vivo* Daten liegen hierzu jedoch noch nicht vor. Daher wäre es aufschlussreich, ob die Rolle des TGF- $\beta$  Signalwegs für die Entwicklung und die Differenzierung der Podozyten auf ein *in vivo* Mausmodell übertragen werden kann.

#### 2.4.2 Podozytenschädigungen und die Beteiligung des TGF- $\beta$ Signalwegs

Wie bereits erwähnt, können Schädigungen der Nieren zu einem gesteigerten Ausscheiden von Protein mit dem Urin führen. Eine anfängliche Mikroalbuminurie weist auf den beginnenden Funktionsverlust der Filtrationsleistung hin, der sich im weiteren Verlauf zu einer massiven Proteinurie weiterentwickeln kann (Mundel and Reiser, 2010). Als Folge eines solchen klinischen Befunds ist dabei die vorwiegende Schädigung der Glomeruli innerhalb der Niere zu beobachten. Dementsprechend führen glomeruläre Erkrankungen zu einer sukzessiven Niereninsuffizienz und stellen bei einem progressiven Fortlauf die Hauptursache für ein chronisches Nierenversagen, den sogenannten End-stage renal diseases (ESRD) dar, welche unweigerlich zu Nierenersatztherapien in Form von Dialyse bis hin zu Nierentransplantationen führen (Stitt-Cavanagh *et al.*, 2009).

Nach heutigem Forschungsstandpunkt nehmen die Podozyten eine entscheidende Rolle für die Entstehung von glomerulären Krankheitsbildern ein. Grund hierfür ist, dass eine Dysfunktion dieser Zellen in einem breiten Spektrum von verschiedenen Nierenkrankheiten beobachtet werden kann. Dies lässt vermuten, dass all diesen klinischen Syndromen als Konsequenz ein gemeinsamer podozyten-abhängiger Mechanismus zugrundeliegt (Wiggins, 2007). Auslöser einer Schädigung der Podozyten können je nach Krankheit sowohl genetischer und immunologischer als auch metabolischer oder toxischer Natur sein. Als Beispiele klinischer Syndrome, die mit einer podozytären Fehlfunktion assoziiert werden, sind das Alport Syndrom, CNSF, Minimal Change Diseases (MCD), FSGS, und membranöse Glomerulonephritis sowie altersbedingte Glomerulonephropathien aber auch DN zu nennen (Fuchshofer *et al.*, 2011; Kestila *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2007; Wiggins, 2007).

Charakteristisch für solche glomeruläre Krankheiten sind verschiedene histopathologische Erscheinungsmuster. Zum einen führen die krankheitsbedingten Veränderungen zu einer Störung der Filtrationseigenschaft der glomerulären Filtrationsbarriere, die mit molekularen

Umgestaltungen der Schlitzmembran und der GBM-Zusammensetzung assoziiert werden. Zum anderen ist häufig ein Verlust der Podozytenzahl durch Ablösen der Zellen von der GBM oder Apoptose zu beobachten. Zusätzlich kennzeichnen fibrotische/sklerotische Prozesse innerhalb der Glomeruli, die mit einer Vermehrung der EZM und einer daraus resultierenden Verdickung der GBM einhergehen, das Krankheitsbild von glomerulären Pathogenesen. Allen Krankheiten ist dabei die Manifestation einer Proteinurie gemeinsam (Jefferson *et al.*, 2011; Wiggins, 2007).

Ein häufig diskutierter Faktor im Zusammenhang mit Glomeruli-Veränderungen ist TGF- $\beta$ , der interessanterweise auf alle oben genannten Prozesse Einfluss nehmen kann. Es ist bekannt, dass es sowohl in FSGS, membranöse Nephropathie, dem Alport Syndrom und auch in DN zu einer stark erhöhten Expression von TGF- $\beta$  und deren Rezeptoren kommt (Hong *et al.*, 2001; Lee, 2011). Dieser Befund konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen sowohl an Patienten-Biopsien als auch an unterschiedlichen Tiermodellen bestätigt werden. Die Lokalisation der gesteigerten TGF- $\beta$  Synthese wird dabei häufig im Bereich der Podozyten beschrieben (Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1999; Sayers *et al.*, 1999; Umezono *et al.*, 2006).

Als initiale Auslöser dieser erhöhten Expression von TGF- $\beta$  kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Viele glomeruläre Erkrankungen gehen mit einer Hyperperfusion der Glomeruli, also mit einer Erhöhung des intraglomerulären Druckes einher. Infolgedessen ist mechanischer Stress in Form von zellulärer Dehnung ein möglicher Induktor. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es sich bei Podozyten tatsächlich um mechanosensitive Zellen handelt, die *in vitro* auf einen einwirkenden Scherstress mit einer gesteigerten Expression von TGF- $\beta$  sowie dessen Rezeptoren reagieren (Dessapt *et al.*, 2009; Durvasula *et al.*, 2004).

Im Fall von DN konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Glucosekonzentration ein potenter Faktor ist, der, vor allem in Mesangial-Zellen, eine gesteigerte TGF- $\beta$  Expression induziert (Riser *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1992; Ziyadeh *et al.*, 1994). Auch dieser Befund konnte bereits in *in vitro* Experimenten an Mesangial-Zellen, aber auch an humanen Podozyten, bestätigt werden (van Det *et al.*, 1997; Ziyadeh *et al.*, 1994).

Um die von TGF- $\beta$  ausgelösten Effekte und die daran assoziierten Signalwege in glomerulären Krankheiten zu untersuchen, wurden im Laufe der Jahre zahlreiche Tiermodelle entwickelt, die verschiedene Krankheitsbilder induzieren bzw. imitieren. Viele der TGF- $\beta$  vermittelten Effekte wurden dabei an experimentellen Modellen der diabetischen Nephropathie untersucht. DN kann sich als Folge einer *Diabetes mellitus* (DM) Erkrankung manifestieren und ist in den Industrieländern die häufigste Ursache für ein chronisches Nierenversagen. Betroffen sind ca. 30 – 40 % der Diabetes Typ I und ca. 20 % der Diabetes Typ II Patienten (Phillips *et al.*, 1999; Stitt-Cavanagh *et al.*, 2009). Für die Untersuchung von

molekularen Pathomechanismen, die an DN beteiligt sind, stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Neben gentechnisch veränderten Mäusen, die sowohl Typ I als auch Typ II Diabetes widerspiegeln, stehen der experimentellen Forschung auch administrative Methoden wie das Streptozotocin Modell zur Verfügung, die das typische Krankheitsbild von DN auslösen (Breyer *et al.*, 2005). Als charakteristische Veränderungen von DN sind glomeruläre Hypertrophie, ein Verlust an Podozyten, *Foot Process Effacement*, Verdickung der GBM und Glomerulosklerose zu nennen, wodurch DN typische Merkmale einer glomerulären Erkrankung aufweist. Klinisch äußert sich DN durch eine Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und die Manifestation einer Albuminurie (Brosius *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007).

Interessante Experimente im Zusammenhang mit DN und TGF- $\beta$  wurden beispielsweise von Fujimoto *et al.* publiziert. In dieser wurde durch STZ DM in Smad3<sup>-/-</sup>- sowie in Kontrollmäuse induziert, wodurch gezeigt werden konnte, dass diabetische Smad3<sup>-/-</sup> Mäuse vor einer Verdickung der GBM sowie der Ausprägung einer Albuminurie geschützt waren. Zusätzlich konnte er zeigen, dass es unter diabetischen Bedingungen innerhalb der Glomeruli von diabetischen Smad3<sup>-/-</sup>-Mäusen zu keiner gesteigerten Expression von Fibronectin und  $\alpha$ 3Col4 kam (Fujimoto *et al.*, 2003). Ähnliche Ergebnisse erzielten Kim *et al.*, welche aufzeigten, dass Mäuse mit einer verringerten Expression von TGF- $\beta$  RII, als Folge eines heterozygoten Knockouts (TGF- $\beta$  RII<sup>+/+</sup>), nach Induktion von DN eine geringere glomeruläre Hypertrophie und Akkumulation der EZM aufweisen als diabetische Kontrollmäuse (Kim *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse zeigen, dass sich eine Inhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs während einer glomerulären Schädigung positiv auf den Verlauf pathologischer Veränderungen ausübt. Verdeutlicht wird dies zusätzlich durch entsprechend gegenläufige Experimente, bei denen es zu einer Verstärkung bzw. zu einer verringerten Inhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs kommt. Ein Beispiel hierfür sind Versuche an diabetischen Smad7<sup>Exon1-/-</sup> Knockout Mäusen. Innerhalb dieser Mäuse kommt es zu einer verminderten Funktionalität des inhibitorisch wirkenden Smad7 Proteins, was prinzipiell einer Verstärkung des TGF- $\beta$  Signals nach Aktivierung entspricht. Nach Induktion von DN zeigen diabetische Smad7<sup>Exon1-/-</sup> Mäuse eine zusätzliche Verschlechterung der histopathologischen Muster im Vergleich zu Kontrolltieren. Entsprechend gegenläufige Experimente an diabetischen Ratten, bei denen Smad7 durch Gentransfer innerhalb der Niere überexprimiert wird, mildern die pathologischen Veränderungen und lassen darauf schließen, dass sich Smad7 eventuell als therapeutischer Ansatz nutzen ließe (Chen *et al.*, 2011).

All diese Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung des TGF- $\beta$  Signalwegs während renalen Pathologien hin. Für die Entwicklung von spezifischen therapeutischen Ansätzen ist es von Bedeutung, dass die genauen und zellspezifischen TGF- $\beta$  Funktionen detailliert verstanden werden, wodurch der Grundlagenforschung weitere Fragen offen bleiben.

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass der multifunktionale Faktor TGF- $\beta$  eine Rolle bei der Entstehung der Podozyten einnehmen könnte. Diese Hypothese wurde bislang allerdings noch nicht in einem *in vivo* Modell untersucht. Durch die Generierung zweier Mauslinien mit einem konditionellen Podozyten-spezifischen Knockout sollte hierfür erstmals eine Möglichkeit gegeben werden. Anhand eines Podozyten-spezifischen Knockouts von Smad7 konnten die Auswirkungen eines desinhibierten TGF- $\beta$  Signalwegs analysiert werden, während durch das Entfernen des TGF- $\beta$  RII die Effekte einer völligen Blockade dieses Signalwegs untersucht werden konnten. Die Verwendung der sog. Podo-Cre Maus stellte eine exklusive Expression der Cre-Rekombinase in Podozyten sicher, die bereits in der *Capillary-loop* Phase, also dem Zeitpunkt der Podozyten-Differenzierung begann, wodurch analysiert werden konnte, ob sich Podozyten mit einem veränderten TGF- $\beta$  Signalweg fehlerhaft entwickeln.

Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle an pathologischen Prozessen, die mit einer Podozytenschädigung einhergehen, spielt. Infolgedessen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, welche Funktionen die jeweiligen Veränderungen des TGF- $\beta$  Signalwegs unter pathologischen Bedingungen ausüben und welche Rolle dieser Signalweg unter pathologischen Bedingungen *per se* für Podozyten spielt. Als Podozyten-Schadensmodell wurde das häufig verwendete Modell der Streptozotocin-induzierten diabetischen Nephropathie (DN) gewählt.

Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

- (1) Verifizierung der konditionellen Podozyten-spezifischen Knockouts
- (2) Untersuchung möglicher Effekte auf die allgemeine Glomerulogenese und die Differenzierung der Podozyten
- (3) Untersuchung möglicher Effekte auf altersprogressive Veränderungen
- (4) Untersuchung von morphologischen Veränderungen unter pathologischen Bedingungen einer STZ-induzierten DN

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Grundausstattung

#### 4.1.1 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Reagenzien und deren Bezugsquellen sind dem Anhang zu entnehmen (Punkt 7.5).

Bezeichnung	Bezugsquelle
3MM Blotting („Whatman“) – Papiere	Neolab, Heidelberg
96-Well Platten, flacher Boden	Nunc, Roskilde, DEN
Adhesiv PCR Film	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
CellScraper (Zellschaber)	Sarstedt, Nümbrecht
Cell Strainer (Zellsiebe) 40 µm; 70 µm	Fisher Scientific, Schwerte
Deckgläschen (Cover slip) Ø 15 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Deckgläschen, 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
EasyFlasks Nunclon™ Δ T25, T75	Nunc, Roskilde, DEN
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Injektionskanülen	VWR International GmbH, Darmstadt
Multidishes Nunclon™ Δ 6-well, 12 Well, 24 Well	Nunc, Roskilde, DEN
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Nitril Einmalhandschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96 well iCycler IQ	Biorad, München
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rotiprotect-Latex Handschuhe	Roth, Karlsruhe
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Rotilabo 0,22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Superfrost-Objekträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 1: Liste der Verbrauchsmaterialien

#### 4.1.2 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aida Advanced Image Data Analyzer 4.06	Raytest, Straubenhardt
Axio Imager.Z1 mit Apotome	Zeiss, Göttingen
Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Casy® TT	Innovatis, Reutlingen
Einbettautomat HMP110 (Paraffin)	Microm, Waldorf
Hamilton-Spritze, 25 µl	Roth, Karlsruhe
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
inverses Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Göttingen
Inova 4200 Laborschüttler	New Brunswick, Eddison, New Jersey, USA
IQ5 Multicolor Real time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Minichiller	Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
Model 45-101-I Class II Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
PowerShot G5 Digitalkamera	Canon, Krefeld
Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Semidry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Serva-E 25 Pumpe	Serva, Heidelberg
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, AUS
Supercut 2050 (Paraffin)	Reichert-Jung, Kirchseeon
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tab. 2: Liste der verwendeten Geräte

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Gewinnung genomischer DNA

Genomische DNA kann aus allen kernhaltigen Zellen nach Zelllyse extrahiert und für molekularbiologische Analysen aufgereinigt werden. In dieser Arbeit wurde zum einen genomische DNA aus Mausschwänzen und DNA aus isolierten Glomeruli verwendet.

Proteinase K Lysepuffer	
KCl	50 mM
Tris HCl (pH 8,3)	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Gelatine	0,1 mg/ml
Nonidet P- 40	0,45 % (v/v)
Tween 20	0,45 % (v/v)
Kurz vor Gebrauch auf 1 ml Puffer: 50 µl Proteinase K (20 mg/ml)	

Tab. 3: Pufferzusammensetzung

Zur Gewinnung der Mausschwanz-DNA wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und die Spitze des Mausschwanzes (max. 0,5 cm) mit einer sterilen Präparationsschere abgetrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Verfahren zur Isolation von Glomeruli wird unter Punkt 4.5.4 beschrieben.

Um die Zellen zu lysieren, wurden sie mit 200 µl Proteinase K Lysepuffer versetzt und über Nacht (ü.N.) im Schüttler bei 750 Upm und 55 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch anschließendes Erhitzen auf 95 °C für 15 min. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 16000 ×g für 10 min sedimentiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die genomische DNA diente anschließend als Template für PCR Analysen.

### 4.2.2 Klassische PCR Analysen

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA Sequenzen, die im Jahre 1983 von K. Mullis entwickelt wurde (Mullis et al., 1986). Durch den Einsatz von spezifisch gewählten Oligonukleotiden, den sog. Primern, die komplementär zu bestimmten DNA Abschnitten sind, können diese Sequenzen gezielt amplifiziert werden. Generell besteht eine PCR aus mehreren Zyklen, welche sich jeweils aus 3 Schritten zusammensetzen:

1. Denaturierung der Template DNA
2. Primer Annealing (Hybridisierung komplementärer Sequenzen)
3. Elongation (Amplifikation)

In dieser Arbeit wurde die klassische PCR zum einen, zur Genotypisierung der verwendeten transgenen Mäuse, und zum anderen für den Nachweis der stattgefundenen Deletion innerhalb der DNA dieser Mäuse angewendet.

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
<b>Genotypisierung</b>			
Podo-Cre	<i>Mus musculus</i>	fw	cctggaaaatgcttctgtccg
		rev	cagggtgtataagcaatccc
TGFβ-RII <sup>flox/flox</sup>	<i>Mus musculus</i>	fw	gcaggcatcaggacacctgatcc
		rev	agagtgaagccgtggtaggtgagcttg
Smad7 <sup>flox/flox</sup>	<i>Mus musculus</i>	fw	gtcagggtggatcaccatgcc
		rev	gactgcctggagaagtgtgtc
<b>Deletionsnachweis</b>			
TGFβ-RII <sub>Exon2</sub> Deletion	<i>Mus musculus</i>	fw	taaacaagggtccggagccca
		rev	agagtgaagccgtggtaggtgagcttg
Smad7 <sub>Exon1</sub> Deletion	<i>Mus musculus</i>	fw	ttggatcaccatgccaacta
		rev	tgcagacccggaaattagac

**Tab. 4:** Liste der verwendeten PCR-Oligonukleotidprimer

Die Genotypisierungs-PCRs wurden mit den spezifischen Primerpaar (Tab. 4) nach dem unten stehenden Protokoll durchgeführt:

<b>PCR-Reaktionsansatz (15 µl)</b>	
Genomische DNA (~ 500 ng; 1:20)	1 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,3 µl
dNTPs (10mM)	0,3 µl
Primer fw (10 µM)	0,3 µl
Primer rev (10 µM)	0,3 µl
Taq DNA Polymerase	0,3 µl
5 x Glycerol	3 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl

**Tab. 5:** Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR

Jede PCR wurde anhand der Komponenten, wie etwa Primer-Zusammensetzung und Amplikonlänge, speziell angepasst und optimiert. Die nächste Tabelle (Tab. 6) zeigt die verwendeten PCR-Cyclerprogramme für die einzelnen Genotypisierungsreaktionen.

<b>Genotypisierungs-PCR Cyclerprogramme</b>						
<b>Produkt</b>	<b>Podo-Cre</b>		<b>TGFβ-RII</b>		<b>Smad7</b>	
	<b>440 bp</b>		<b>WT 556 bp</b>	<b>flox/flox 711 bp</b>	<b>WT 413 bp</b>	<b>flox/flox 568 bp</b>
	<b>°C</b>	<b>Dauer</b>	<b>°C</b>	<b>Dauer</b>	<b>°C</b>	<b>Dauer</b>
1. Schritt	94 °C	3 min	95 °C	3 min	95 °C	3 min
2. Schritt	94 °C	30 s	95 °C	30 s	95 °C	45 s
3. Schritt	60 °C	1 min	61 °C	45 s	63 °C	30 s
4. Schritt	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	45 s
5. Schritt	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min
6. Schritt	4°C	∞	8 °C	∞	8 °C	∞
Zyklen (2-5)	35 x		40 x		35 x	

**Tab. 6:** Cyclerprogramme der verschiedenen Genotypisierungs-PCRs

Für den Nachweis einer stattgefundenen Rekombination innerhalb der DNA der verwendeten Mäuse wurde ebenfalls die PCR Technik angewendet (in dieser Arbeit als Deletions-PCR bezeichnet). Die entsprechenden Programme hierfür sind der nächsten Tabelle (Tab. 7) zu entnehmen.

<b>Deletions-PCR Cyclerprogramme</b>				
<b>Produkt</b>	<b>TGFβ-RII<sub>Exon2</sub> Deletion</b>		<b>Smad7<sub>Exon1</sub> Deletion</b>	
	<b>610 bp</b>		<b>289 bp</b>	
	<b>°C</b>	<b>Dauer</b>	<b>°C</b>	<b>Dauer</b>
1. Schritt	94 °C	3 min	95 °C	3 min
2. Schritt	94 °C	20 s	95 °C	15 s
3. Schritt	60,5 °C	20 s	63 °C	45 s
4. Schritt	72 °C	1 min	72 °C	30 s
5. Schritt	72 °C	5 min	72 °C	5 min
6. Schritt	8°C	∞	8 °C	∞
Zyklen (2-5)	35 x		40 x	

**Tab. 7:** Cyclerprogramme der beiden Deletions-PCRs

Die anschließende Analyse der amplifizierten DNA Fragmente erfolgt durch das Auftragen auf ein Ethidiumbromid-Agarosegel (Punkt 4.2.3). Die Größen der zu erwarteten Amplikons sind in den oben stehenden Tabellen (Tab. 6, Tab. 7) beschrieben.

#### 4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Linearisierte DNA Fragmente können hinsichtlich ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Im Gel enthaltenes Ethidiumbromid (roter Phenanthridin-Farbstoff, EtBr) interkaliert dabei mit doppelsträngiger DNA, wodurch diese anschließend mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Für die Auftrennung der PCR Produkte wurde ein 1 %iges (w/v) Agarosegel verwendet. Hierfür wurden 0,8 mg Agarose in 80 ml 1x TBE-Puffer eingewogen, unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit 4 µl Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50 ng/ml versetzt. Anschließend wurden jeweils ca. 15 µl PCR-Produkt und 2 µl Standard-DNA-Marker (100 bp-DNA Standard; NEB) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte anschließend bei einer konstanten Spannung von 110 V für ca. 45 min. Die DNA Fragmente wurden daraufhin mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms bei einer Wellenlänge von 302 nm detektiert.

TBE, 10x	
Tris	108 g
Borat	55 g
EDTA ( 0,5 M ), pH 8	40 ml
in H <sub>2</sub> O dest. Lösen, ad 1 l	

#### 4.2.4 Genexpressionsanalysen

##### 4.2.4.1 Prinzip der Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer RT-PCR und quantitativer real time RT-PCR

Die von Mullis entwickelte Methode der klassischen PCR wurde im Laufe der Jahre weiterentwickelt und auf verschiedene Fragestellungen angepasst. Die Modifikation dieser Technik ermöglicht beispielsweise die Quantifizierung der DNA-Amplifikation während der einzelnen Zyklen der PCR, wodurch Veränderungen der Genexpression gemessen werden können.

Zur quantitativen Analyse der relativen Expression ausgewählter Gene wurde bei den *in vitro* und *in vivo* Versuchen die semi-quantitative RT-PCR sowie die quantitative real time

RT-PCR (Gibson *et al.*, 1996) genutzt. Bei beiden Methoden wird *complementary DNA* (cDNA), die durch das Enzym Reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert wurde, als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet.

Mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR kann man so die Transkription bestimmter Gene in Geweben oder Zellen nachweisen. Hierzu wird mit spezifischen Primern ein zu untersuchendes Transkript mittels eines einfachen PCR-Programms amplifiziert. Die dabei entstehenden DNA Fragmente, die etwa 300 – 1000 bp groß sind, wurden anschließend zur Analyse mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Bei der quantitativen real time RT-PCR (q RT-PCR) wird die exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes kontinuierlich, Fluoreszenz-basiert gemessen (Higuchi *et al.*, 1993). Eine Möglichkeit stellt beispielsweise die Verwendung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green I dar. Hierbei wird fluoreszierendes SYBR-Green I in den PCR-Produkten durch einen Laser angeregt und die Intensität der emittierten Fluoreszenz über einen Detektor ermittelt. Da sich SYBR-Green I ausschließlich in doppelsträngige DNA einlagert und ungebunden nur schwach fluoresziert, ist die Fluoreszenz dabei proportional zur vorhandenen DNA-Menge. Das entstehende Produkt kann daher bereits während der PCR, also in Echtzeit, sichtbar gemacht werden.

Der „cycle-threshold“ ( $C_T$ )-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz den Hintergrundwert übersteigt. Ab diesem Zyklus kann die exponentielle Zunahme des PCR Produkts beobachtet werden. Der  $C_T$ -Wert ist abhängig von der eingesetzten cDNA-Konzentration des zu untersuchenden Gens. Daher kann mit Hilfe des  $C_T$ -Wertes eine quantitative Aussage über die ursprünglich eingesetzte mRNA-Menge gemacht werden. Um eventuell entstandene Primerdimere oder unspezifische Amplikons von dem gesuchten Produkt zu unterscheiden, wird nach dem PCR-Lauf eine Schmelzkurve der entstandenen Produkte erstellt.

Zur relativen Quantifizierung wird das untersuchte Gen in seiner Expression zu einem Referenzgen ins Verhältnis gesetzt. Als Referenzgen eignen sich sog. „Housekeeping“-Gene, die sich in ihrem Expressionsniveau kaum verändern.

#### 4.2.4.2 RNA Isolierung aus Zellen oder Gewebe

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen wurde RNA aus Zellen und/oder Gewebe isoliert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte hierbei nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Zum Aufschluss der Zellen und dem Lösen der Zellkomponenten wurde das peqGOLD TriFast™-Reagenz verwendet. Das TriFast™-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinethiocyanat, welche Zellen in einem Schritt lysiert, RN sowieasen inaktiviert und RNA stabilisiert. Mit Hilfe von Chloroform wird das Homogenat nach Zentrifugation in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA kann anschließend mit Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt und mit Ethanol nachgewaschen werden.

#### Kurzprotokoll zur RNA-Isolation mit dem TriFast™-Reagenz

- 300 µl bzw. 500 µl TriFast™-Reagenz auf Zellen/Gewebe geben
- Zellen mit Zellschaber ablösen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen. Gewebe mit einem Mikrohomogenisator zerkleinern
- 200 µl Chloroform pro ml TriFast™ zugeben, kräftig schütteln
- 5 min auf Eis inkubieren
- 20 min bei 4 °C und 12000 ×g zentrifugieren
- Obere wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen (Inter – und Phenol – Chloroform Phase für Protein Isolierung (Punkt 4.3.1.2) bei – 20 °C lagern)
- Wässrige Phase 1:1 mit Isopropanol mischen, mehrmals schütteln
- Über Nacht bei -20 °C RNA ausfällen
- 20 min bei 4 °C und 12000 ×g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 500 µl 70 % Ethanol aufnehmen, kräftig schütteln
- Für 5 min bei 4°C und 7600 ×g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet je nach Größe in 10 – 30 µl Rnase-freiem Wasser lösen

Bis zur weiteren Verwendung wurde die gelöste RNA bei -80 °C gelagert.

#### **4.2.4.3 RNA-Quantifizierung**

Um die, für die cDNA Herstellung benötigte RNA Menge zu ermitteln, wurde die RNA Konzentration mit Hilfe des NanoDrop-1000 Spektralphotometers bestimmt. Hierbei wurde die optische Dichte bei  $\lambda=260$  nm ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA, RNA), und bei  $\lambda=280$  nm ( $OD_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen gegenüber dem Lösungsmittel ( $H_2O$ ) gemessen. Die RNA-Konzentration wurde daraufhin durch die Multiplikation der Extinktion mit dem Methodenfaktor RNA (40 µg/ml) nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Konzentration [µg/ml]} = OD_{260} \times 40 \text{ µg/ml}$$

Zusätzlich wurde die Reinheit der extrahierten RNA durch die Bildung des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt. Bei einem Wert des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  zwischen 1,6 und 2 wurde die RNA als rein betrachtet.

Zur Feststellung eventueller Degradation wurden jeweils 1 µl der RNA zusammen mit 4 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O und 1 µl Auftragspuffer für DNA/RNA auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel geladen und bei 125 V für 45 min aufgetrennt. Die RNA galt als degradationsfrei bzw. geeignet für die weitere Verwendung, wenn die 18S- und 28S-rRNA Svedberg-Banden klar zu erkennen waren und kein RNA-Schmier, als Zeichen fragmentierter RNA, auf dem Gel sichtbar wurde.

#### 4.2.4.4 cDNA Synthese

Mittels reverser Transkription ist es möglich, RNA in cDNA (*complementary DNA*) umzuwandeln. In dieser Form sind die Informationen, die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren, stabiler konserviert und lassen sich mit PCR-Techniken analysieren. Durch die Verwendung von Random- und oligo-dT-Primern sollte sichergestellt werden, dass hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz in cDNA transkribiert wird. Für die Durchführung der cDNA-Synthese wurde das „*iScript cDNA Synthesis Kit*“ (BioRad) verwendet. Dabei kam eine reverse Transkriptase ohne Rnase-Aktivität zum Einsatz.

Um DNA-Verunreinigungen der RNA abschätzen zu können, wurden pro RNA-Probe zwei Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase (+RT) und einmal ohne reverse Transkriptase (-RT), hergestellt (Tab. 8).

Reaktionsansatz (10 µl)	+RT	-RT
0,5 µg RNA		
H <sub>2</sub> O	7,5 µl	8 µl
5x iScript™ Reaction Mix	2 µl	2 µl
iScript™ Reverse Transcriptase	0,5 µl	/

**Tab. 8:** Reaktionsansatz für cDNA Synthese

Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	25 °C	5 min
2. Schritt	42 °C	30 min
3. Schritt	85 °C	5 min
4. Schritt	10 °C	∞

**Tab. 9:** PCR-Programm für cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte im 2. Schritt bei 42 °C. Durch das Erhitzen auf 85 °C in Schritt 3 wurde die Reverse Transkriptase nach der Reaktion inaktiviert. Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.2.4.5 Durchführung der semi-quantitativen RT-PCR

Für die Charakterisierung der P-S7 kn Mauslinie wurde die Expression von Smad7 in den primären Podozyten der verschiedenen Genotypen miteinander verglichen. Die verwendeten Primer sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
<b>Semi-quantitative RT-PCR</b>			
Smad7	Mus musculus	fw	cagtccgagggtccaaaggt
		rev	accccacacgcctcatccacttc
β-Actin	Mus musculus	fw	tgttaccaactgggacgaca
		rev	ggagagcatagccctcgtag

**Tab. 10:** Liste der verwendeten Primer der semi-quantitativen RT-PCRs

Hierfür wurde jeweils eine „+RT“- bzw. „-RT“- Probe pro Ansatz eingesetzt. B-Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die Proben wurden nach folgendem Schema zusammenpipettiert.

<b>Reaktionsansatz 1 x (25µl)</b>	
cDNA Template (+RT/-RT/H <sub>2</sub> O)	2 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer fw (10 µM)	0,5 µl
Primer rev (10 µM)	0,5 µl
Taq DNA Polymerase	0,2 µl
5 x Glycerin	3,0 µl
H <sub>2</sub> O	15,8 µl

**Tab. 11:** Reaktionsansatz der semi-quantitativen RT-PCR

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Produkt	Smad7		$\beta$ -Actin	
	802 bp		524 bp	
	°C	Dauer	°C	Dauer
1. Schritt	95 °C	2 min	95 °C	2 min
2. Schritt	95 °C	15 s	95 °C	15 s
3. Schritt	61,2 °C	30 s	61,2 °C	30 s
4. Schritt	72 °C	40 s	72 °C	40 s
5. Schritt	72 °C	5 min	72 °C	5 min
6. Schritt	10°C	$\infty$	10 °C	$\infty$
Zyklen (2-5)	32 x		26 x	

**Tab. 12:** Cyclerprogramme der semi-quantitativen RT-PCRs

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über ein 1 %iges Agarosegel. Mit Hilfe von UV-Licht wurden die zu erwarteten Banden detektiert. Die Größen der jeweiligen DNA Amplikons sind der oben stehenden Tabelle (Tab. 12) zu entnehmen.

#### 4.2.4.6 Durchführung der quantitativen real time RT-PCR

Die relative Genexpression der *in vitro* und *in vivo* Versuche wurde auf mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen real time RT-PCR (q RT-PCR) analysiert und erfolgte in einem *iQ5 Multicolor Real time-PCR Detection System* mit *iCycler* im 96-Well-Format. Zur Detektion der vom jeweiligen Transkript abgeleiteten dsDNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I verwendet.

Genspezifische Primer wurden mit Hilfe der Universal ProbeLibrary der Seite [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com) erstellt und von der Firma Invitrogen bezogen. Bei der Auswahl der Primer wurden Sequenzen bevorzugt, welche ein Amplikon über Exon-Intron-Grenzen einschließen (Tab. 13).

Für jedes Kandidatengen wurden pro Lauf und zu untersuchender cDNA-Probe (+RT) drei Replikate der Reaktion durchgeführt. Dazu kam eine entsprechende Reaktion des zugehörigen –RT-Ansatzes, um mögliche DNA-Kontaminationen auszuschließen. Außerdem wurde für jedes Primerpaar eine Wasser/Negativkontrolle pipettiert.

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
<b>Quantitative real time RT-PCR</b>			
GAPDH	Mus musculus	fw	tgtccgtcgatggatctgac
		rev	cctgcaccacccatcttg
Smad7	Mus musculus	fw	cccaatggattttctcaaacc
		rev	gggccagataattcgltcc
Synaptopodin	Mus musculus	fw	cagggcgtggtctcctcgag
		rev	ggacgtggcaggctcgg
TGF-β RII	Mus musculus	fw	ggctctggactctggaaa
		rev	aatgggggctcgtaatcct
WT-1	Mus musculus	fw	agctgtcccacttacagatgc
		rev	ccttgaagtcacactggatgg

**Tab. 13:** Liste der verwendeten Primer der quantitativen real time RT-PCRs

Zunächst wurde jede cDNA-Probe (+RT) und zugehöriger –RT-Ansatz mit einer speziellen Master-Mix-Lösung versetzt. Für das Ansetzen des Master-Mix wurde das HotStart Taq Kit (Qiagen) verwendet. Die so entstandenen +RT- und –RT-Ansätze wurden nach einem speziell vorgelegten Schema zu je 10 µl in die 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluss wurden je 5 µl eines Primer-Mix, der die spezifischen Primer des zu untersuchenden Gens enthielt, zugegeben.

<b>Reaktionsansatz 1x (15 µl)</b>	
cDNA	0,15 µl
10 x PCR-Puffer	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,6 µl
dNTPs (25mM)	0,12 µl
Sybr-Green I	0,19 µl
Fluorescein	0,015 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,06 µl
H <sub>2</sub> O	7,37 µl
Primermix	5 µl
<b>Primer-Mix</b>	
H <sub>2</sub> O	60,5 µl
Primer forward (1 µM)	1 µl
Primer reverse (1 µM)	1 µl

**Tab. 14:** Reaktionsansätze der q RT-PCR

Die Mikrotiterplatte wurde mit Hilfe einer Klebefolie nach oben hin abgedichtet und in das Gerät eingesetzt. Nach Eingabe des Platten-Pipettierschemas und der PCR-Parameter wurde das PCR-Programm gestartet:

<b>Programm real time RT-PCR</b>		
<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
1. Schritt (1x)	95 °C	15 min
2. Schritt (40x)	95 °C 60 °C	10 s 40 s
3. Schritt (1x)	95 °C	1 min
4. Schritt (1x)	55 °C	1 min
5. Schritt (81x)	55 °C + 0,5 °C je Zyklus (Schmelzkurve)	2 s

**Tab. 15:** Cyclerprogramm der q RT-PCRs

Die Amplifikations- bzw. Schmelzdaten wurden mit der *iCycler iQ Optical System Software Vers. 3.0a* erhoben und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* ausgewertet. Die relative Expression der Transkripte wurde nach der  $\Delta\Delta C_T$  –Methode berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

Hierfür wurden die relativen cDNA Spiegel X des Zielgens auf die  $C_T$  –Werte des Referenzgens normalisiert und auf die Menge der Standardbedingung bezogen. Die Formeln für die Berechnung lauten:

$$\Delta C_T = C_T \text{ (Referenzgen)} - C_T \text{ (Zielgen)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ (Standardbedingung)} - \Delta C_T \text{ (Konditionierte Bedingung)}$$

$$X = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

## 4.3 Proteinbiochemische Arbeitstechniken

### 4.3.1 Verschiedene Methoden der Protein-Isolierung

#### 4.3.1.1 Protein Gewinnung mit Hilfe von RIPA

Gesamtprotein von Zellen oder aus Geweben kann relativ schnell durch die Lyse der Zellen gewonnen werden. Ein weit verbreiteter Lysepuffer hierfür stellt der RIPA (Radioimmuno-precipitation assay) – Puffer dar. RIPA führt zur effektiven Lyse der Zellen und löst dabei deren Gesamtproteine ohne diese zu Degradieren. Zusätzlich kann durch die Zugabe von

Proteinase – und/oder Phosphatase – Inhibitoren ein Abbau oder der Verlust von Phosphatgruppen, beispielsweise als Zeichen einer Aktivierung von Proteinen, minimiert werden.

Für die Proteingewinnung wurden je nach vorhandener Zellmenge 150 µl bis 500 µl RIPA – Puffer + 1:1000 Protease – Inhibitor Mix M (Serva) ± 1:100 Phosphatase – Inhibitor Cocktail 2 (Sigma) auf das geerntete Zellpellet gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Gewebe wurde zusätzlich mit einem Mikrohomogenisator aufgeschlossen. Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Anschließend wurden ungelöste Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 10000 ×g für 5 min bei 4 °C sedimentiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C bzw. -80 °C für Western Blot Analysen aufbewahrt.

<b>RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay)-Puffer</b>	
NaCl	150 mM
Tergitol	1 % (v/v)
Deoxycholsäure	0,5 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Tris (pH 8)	50 mM

#### **4.3.1.2 Protein-Gewinnung nach der peqGold TriFast™ –Methode**

Eine weitere Technik Proteine zu extrahieren, besteht in der Möglichkeit, diese aus der verbleibenden Inter – und Phenol–Chloroform–Phase, im Anschluss an eine RNA Isolierung (siehe 4.2.4.2), zu lösen (Chomczynski, 1993).

##### Kurzprotokoll zur Protein-Isolation mit dem TriFast™-Reagenz

- 750 µl Isopropanol pro 500 µl TriFast™-Reagenz auf verbleibende Phenol–Chloroform–Phase geben
- 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 4 °C und 12000 ×g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Protein Pellet 3x mit 1 ml Waschpuffer für jeweils 20 min bei RT spülen
- Jeweils 5 min bei 4 °C und 7600 ×g zentrifugieren
- Protein Pellet mit 1 ml 95 %igem EtOH 20 min bei RT waschen
- 5 min bei 4 °C und 7600 ×g zentrifugieren
- Überstand vollständig abnehmen und Protein-Pellet trocknen lassen

- Pellet je nach Größe in 150 – 200 µl 1 % SDS-Lsg. + Protease- (1:1000) + Phosphatase-Inhibitor (1:100) aufnehmen
- Protein-Pellet über Nacht bei 50 °C im Schüttler lösen

Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die Proben nochmals für 10 min bei 4 °C und 10000 ×g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Die auf diese Methode gewonnenen Proteine wurden in den Western Blot Analysen eingesetzt.

#### Waschpuffer

Guanidin HCl	0,3 M
In 95 %Ethanol lösen	

#### 4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben wurde der sog. BCA (Bicinchoninic Acid) Assay verwendet (Smith *et al.*, 1985).

Der BCA-Assay basiert auf der Bildung von Cu<sup>2+</sup>-Komplexen mit den vorhandenen Proteinen unter alkalischen Bedingungen, welche eine Reduktion des Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> zur Folge haben. Die Menge des reduzierten Kupfers ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen Proteins. Mit Hilfe der Bicinchoninsäure (BCA), die unter alkalischen Bedingungen violette Komplexe mit Kupfer (I) bildet und die bei einer Messung der optischen Dichte bei 560 nm nachgewiesen werden kann, wird indirekt das vorhandene Protein sichtbar gemacht.

Als Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Eine BSA-Stocklösung (2 mg/ml) wurde hierfür mit dem jeweiligen Puffer der Proteinproben (z.B. RIPA) auf folgende Standardkonzentrationen verdünnt: 1500, 1000, 800, 600, 400, 200, 100 und 50 µg/ml.

Jeweils 10 µl der Proteinproben (unverdünnt und 1:2 verdünnt) und der Standardkonzentrationen wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl BCA-Lösung (Reagenz A : Reagenz B = 50:1) versetzt. Jeder Ansatz wurde dabei als Duplikat aufgetragen. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Proteinbestimmung in einem ELISA-Reader durchgeführt. Dabei wurde die Extinktion bei 560 nm photometrisch gemessen und mit der Eichgeraden verglichen, um so die Proteinkonzentration abschätzen zu können. Die endgültige Proteinkonzentration ergab sich aus dem Mittelwert der Einzelmessungen.

### 4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Technik der Biochemie, die sich die Eigenschaft zunutze macht, dass sich geladene Proteine entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld auftrennen lassen.

Die Gelelektrophorese sowie die Herstellung der Polyacrylamidgele wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970).

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
SDS-Lösung, 10 % (w/v)	10 g SDS in H <sub>2</sub> O dest. Lösen ad 100 ml
SDS-Laemmlipuffer, 4x	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 10 % β-Mercaptoethanol
10 x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O dest. Lösen ad 1 l
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8	121,14 g Tris in H <sub>2</sub> O dest. Lösen pH einstellen ad 1 l
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	181,71 g Tris in H <sub>2</sub> O dest. Lösen pH einstellen ad 1 l

Tab. 16: Puffer für die SDS-PAGE

Zum Gießen der Gele wurde eine horizontale Gelapparatur der Firma PeqLab Biotechnology GmbH nach Anleitung aufgebaut. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurde entschieden, welches Trenngel verwendet wurde (siehe Tab. 17).

Proteingrößen		130 – 220 kDa	80 – 130 kDa	50 – 80 kDa	25 – 50 kDa
Gele für SDS-PAGE	Sammelgel	Trenngel 6 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
	(1 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)
H <sub>2</sub> O dest.	0,68 ml	2,6 ml	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml
Rotiphores® Gel 30	0,17 ml	1,0 ml	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml
Tris/HCl, 1 M, pH 6,8	0,13 ml			-	
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10 % SDS	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10 % APS	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,004 ml	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml

Tab. 17: Rezepte für die Herstellung verschieden dichter Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE

Nachdem das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert wurde, wurde es mit ca. 100 µl Isopropanol überschichtet, um einen gleichmäßigen Abschluss des Gels zu gewährleisten.

Nach der Polymerisation wurde der flüssige Überstand abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Außerdem wurde ein Plastikkamm in das flüssige Sammelgel gesteckt, um nach der Polymerisation Taschen für die Auftragung der Proteinproben zu erhalten.

In dem so entstandenen Zwei-Phasen-Gel werden im Sammelgel, auf Grund der zum Trenngel unterschiedlichen Porengröße, des pH-Werts und der elektrophoretischen Beweglichkeit seiner Ionen, die Proteine aufkonzentriert. Im Trenngel findet hingegen eine Auftrennung entsprechend der Proteingröße statt. Das in den Gelen enthaltene SDS stellt dabei denaturierende Bedingungen während der Elektrophorese sicher. Außerdem werden die Proteine durch SDS entsprechend ihrem Gewicht negativ geladen, was die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach der Größe ermöglicht. Das fertige Gel wurde nach Anleitung in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank mit 1x Elektrodenpuffer aufgefüllt.

Gleiche Mengen an Proteinextrakten (in der Regel 5 µg – 20 µg) wurden mit reduzierendem 4 x SDS-Laemmli puffer versetzt, 5 min in kochendem Wasser denaturiert und in die Geltaschen geladen. Anschließend wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel für 1 bis 1,5 h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen.

3 µl Proteinmolekulargewichtsstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas) diente als Referenz für die Laufgeschwindigkeit verschieden großer Proteine.

#### **4.3.4 Proteintransfer auf PVDF Membranen mittels Semidry Blotting**

Für den Transfer (Blotten) von Proteinen auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran musste diese zunächst entsprechend vorbereitet werden. Hierfür wurde die Membran auf die entsprechende Größe zugeschnitten und für einige Sekunden mit Methanol vorbehandelt, anschließend 1 min in H<sub>2</sub>O dest. Gewaschen und schließlich 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Zusätzlich wurden fünf entsprechend zugeschnittene Whatman-Filterpapiere benötigt und ebenfalls in Transferpuffer eingelegt.

<b>10x Transferpuffer</b>	
Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
Methanol	200 ml
SDS	3,7 ml 10 % (w/v)
in H <sub>2</sub> O dest. Lösen, ad 1 l	

Im Anschluss wurde der Blot folgendermaßen zusammengebaut:

<b>Kathode (-)</b>
3 Lagen Whatman-Papier
Trenngel mit Proteinen
PVDF-Membran
2 Lagen Whatman-Papier
<b>Anode (+)</b>

**Tab. 18:** Aufbau des Semidry Blots

Beim Zusammenbau des Semidry Blots wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden, die den Proteintransfer behindern könnten. Geblottet wurde für 1,5 h bei 25 V.

#### 4.3.5 Nachweis spezifischer Proteinbanden

Der Nachweis spezifischer Proteinbanden erfolgte durch Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper gegen das gesuchte Protein. Dieser Antikörper reagierte mit dem entsprechenden Antigen und bildet einen spezifischen Antikörper-Antigen-Komplex. Dieser Komplex kann anschließend von einem zweiten, gegen den Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörper gebunden werden. Durch die Koppelung des Sekundärantikörpers mit speziellen Enzymen, welche in der Lage sind eine Chemilumineszenzreaktion zu katalysieren, können so spezifische Banden detektiert werden. In diesem Fall waren die sekundären Antikörper entweder mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt. Bei beiden Enzymen verläuft der Nachweis durch Katalyse eines entsprechenden Substrates (Luminol → HRP bzw. CDP Star → AP) in ein lumineszierendes Produkt.

Protein	Blockierung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Col IV (Rockland)	5 % BSA/TBST	polyclonal rabbit anti-Col IV, 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST	chicken anti-rabbit IgG, HRP konjugiert, 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
GAPDH (Abcam)	(A) % MM/TBST	monoclonal mouse anti- GAPDH HRP-konjugiert, 1:10000 in 0,5 % BSA/TBST	/
Smad7 (B8; Santa Cruz)	5 % BSA/TBST	polyclonal rabbit anti-Smad7, 1:200 in 0,5 % BSA/TBST	chicken anti-rabbit IgG, AP konjugiert, 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST
TGF-β RII (C16; Santa Cruz)	5 % BSA/TBST	polyclonal rabbit anti-TGF- β RII, 1:200 in 0,5 % BSA/TBST	chicken anti-rabbit IgG, AP konjugiert, 1:2000 in 0,5 % BSA/TBST

**Tab. 19:** Liste der verwendeten Antikörper für die Western Blot Analysen

Konkret wurden die Membranen nach dem Semidry-Blot zunächst für 1 h bei RT mit 5 % BSA oder 5 % Magermilch (MM) in TBST blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x für 5 – 10 min mit TBST gewaschen, woraufhin die Zugabe des entsprechenden Sekundärantikörpers folgte und die Membran für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert wurde. Auch nach diesem Schritt wurde der Blot erneut 3x für 5 – 10 min mit TBST gewaschen.

**TBS, 10x, pH 7,4**

Tris/HCl	30 g
NaCl	80 g
KCl	2 g

mit H<sub>2</sub>O dest. Ad 1 l**TBST, 1x**

10x TBS	100 ml
Tween 20	0,05 % (v/v)

mit H<sub>2</sub>O dest. Ad 1 l

Zur Detektion spezifischer Banden über die Alkalische Phosphatase wurden die Membranen nach dem letzten Waschschritt für 5 min in Detektionspuffer geschwenkt. Anschließend wurden 800 µl Detektionspuffer mit 8 µl CDP-Star vermischt, auf der Membran verteilt und der Blot weitere 5 min bei RT inkubiert.

Im Fall der Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper wurden die Membranen nach dem letzten Waschschritt mit 1 ml HRP Substrate Luminol Reagent und HRP Peroxidase Solution (1:1) beträufelt und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert.

Das Chemilumineszenzsignal wurde mit der LAS 3000 digital aufgenommen und entsprechend in Graustufen umgesetzt. Die Analyse und Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale erfolgte mit der Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06*.

#### **Detektionspuffer pH 9**

Tris/HCl	15,76 g
NaCl	5,84 g
in H <sub>2</sub> O dest. Lösen, ad 1 l	

#### **4.3.6 Coomassiefärbung zur Ladungskontrolle**

Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue R 250 lagert sich an basische Seitenketten der Aminosäuren und färbt so Proteine unspezifisch an. Dadurch kann das aufgetragene Gesamtprotein auf PVDF-Membranen nachgewiesen werden und als Ladungskontrolle dienen.

Zum Färben wurde die Membran mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung eingelegt. Nachdem die Membran im Anschluss über Nacht in Entfärber geschwenkt wurde, konnte sie getrocknet und im LAS 3000 digital aufgenommen werden. Zur Bestimmung der geladenen Proteinmenge wurde die Intensität der Färbung densitometrisch mit der Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06* bestimmt.

#### **Coomassie-Färbelösung**

Methanol	40 ml
Essigsäure (Eisessig)	2 ml
Coomassie-Brilliant Blue R250I	0,2 g
mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 100 ml	

#### **Coomassie-Entfärbelösung**

Methanol	500 ml
Essigsäure (Eisessig)	1 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 1 l	

#### Densitometrische Auswertung von Immunblot Analysen und der Coomassie Ladungskontrolle

Um mögliche Änderungen im Proteingehalt spezifischer Proteine nachzuweisen wurden die Signalintensitäten der Immunblot-Analysen und der Coomassie gefärbten PVDF-

Membranen mit der LAS 3000 Kamera digital aufgenommen und mit Hilfe der Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06* densitometrisch vermessen.

Hierzu wurden gleich große Messfelder über die einzelnen Banden gelegt. Die Hintergrundfärbung wurde von dem Integral der einzelnen Farbflächen und Farbintensitäten abgezogen.

#### 4.3.7 Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen

Die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen wurde nach der Methode von Heukeshoven und Dernick durchgeführt (Heukeshoven and Dernick, 1988). Dabei handelt es sich um ein sensitivs Verfahren zum unspezifischen Anfärben von Proteinen. Durch die Inkubation der Gele mit einer Silbernitrat-haltigen Färbelösung kommt es zu einer Anlagerung von Silberionen an Proteine. Anschließend werden die Ionen zu elementarem Silber reduziert und als brauner Niederschlag sichtbar. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Eine abschließende Behandlung mit Konservierungslösung ermöglicht die langfristige Archivierung der Gele.

Für die Silberfärbung wurden jeweils 5 µl Urin mit 8 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl SDS-Laemmlipuffer auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt und anschließend gefärbt.

Silberfärbung Puffer	Zusammensetzung
Fixierlösung I	400 ml Ethanol 100 ml Eisessig mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 1 l
Fixierlösung II	300 ml Ethanol 68 g Natriumacetat, Anhydrid 2 g Natriumthiosulphat Pentahydrat mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 1 l 500 µl 25 % Glutaraldehyd pro 100 ml *
Silberlösung	2,5 g Silbernitrat mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 1 l 40 µl Formaldehyd pro 100 ml *
Entwicklerlösung	25 g Natriumcarbonat, Anhydrid mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 1 l 20 µl Formaldehyd pro 100 ml *
Stopp-Lösung	15 g Natrium-EDTA mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 1 l
Aufbewahrungslösung	300 ml Ethanol 40 ml Glycerol mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 1 l

\*kurz vor Gebrauch zugeben

Tab. 20: Puffer für die Silberfärbung

### Kurzprotokoll Silberfärbung:

Alle Schritte des Protokolls erfolgten auf einem Schüttler

- 30 min Fixierlösung I
- 3x 5 min mit H<sub>2</sub>O dest. Waschen
- 20 min Silberlösung
- 2x 1 min mit H<sub>2</sub>O dest. Waschen
- 5 – 20 min Entwicklerlösung
- 10 min Stopp-Lösung
- Das Gel kann bis zu 6 Monate in Aufbewahrungslösung konserviert werden

## 4.4 *In vitro* Experimente

### 4.4.1 Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden primäre murine Podozyten für verschiedene Analysen verwendet, deren Etablierung in Punkt 4.4.3 beschrieben wird. Dabei wurden zum einen primäre P-S7 kn Podozyten und die dazugehörigen Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollzellen sowie primäre P-TR2 kn Podozyten und entsprechende TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollpodozyten isoliert.

Linie	Medium	Temperatur/CO <sub>2</sub>
Murine primäre Podozyten (primPodo)	DMEM Ham F12 + 10 % (v/v) FKS + 1 % (v/v) ITS Supplement, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin	37 °C / 7 %

**Tab. 21:** Verwendete Zelllinien, die dazu gehörigen Medien und deren Kultivierungsbedingungen

### 4.4.2 Allgemeine Arbeitstechniken

Sowohl die Kultivierung als auch die Behandlung der verwendeten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Kunststoffmaterialien waren steril verpackt. Die genutzten Glaswaren wurden vor Gebrauch autoklaviert und die verwendeten Lösungen und Puffer wurden steril filtriert. Die Herstellung steriler Lösungen und Medien sowie der Wechsel des Mediums und die Behandlung der Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in speziellen Brutschränken bei konstanter Temperatur und CO<sub>2</sub>-Konzentration in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre.

Das Zellkulturmedium wurde, je nach Versuch und Zelllinie, alle 2 – 3 Tage erneuert.

#### **4.4.2.1 Passagieren von Zellen**

Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens (Monolayer) wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst und zur weiteren Kultivierung in einer neuen Kulturflasche verdünnt ausgesät. Für die einzelnen *in vitro* Experimente wurden jeweils definierte Zellzahlen in entsprechende Kulturgefäße überführt.

Hierzu wurde das Medium der Zellkulturflasche von den adhärenten Zellen abgenommen und die Zellen anschließend 2 x mit 8 ml steriles PBS gewaschen, um Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden mit 2 ml vorgewärmtem Trypsin/EDTA überschichtet und ca. 5 min bei RT inkubiert. Gegen Ende der Inkubationszeit rundeten sich die Zellen ab und wurden durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 5 ml serum-haltigem Medium abgestoppt und die entstandene Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei RT und 300 xg für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Für eine kontinuierliche Kultivierung wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20 in eine frische Zellkulturflasche überführt. Für die Verwendung spezieller Experimente wurde mit Hilfe des Casys die Zellzahl bestimmt (Punkt 4.4.2.3), und definierte Zellkonzentrationen auf entsprechende Kulturgefäße ausgesät.

#### **4.4.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Überzählige Zellen wurden bis zur nächsten Verwendung eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie oben beschrieben vom Gefäßboden abtrypsiniert. Nach der Zentrifugation wurde das Medium nahezu vollständig abgesaugt, und die Zellen in 2 ml DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden in ein, mit Isopropanol gefülltes Einfiergefäß gegeben und ü. N. bei - 80 °C langsam eingefroren (-1 °C/Minute). Zur endgültigen Lagerung wurden die Zellen nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

<b>Einfriermedium</b>	
DMSO	5 ml
100 %-iges FBS	10 ml
DMEM 4500	35 ml

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unter leichtem Schütteln schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension in 5 ml Medium aufgenommen und bei 300 ×g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Nach leichtem Schwenken und mikroskopischer Kontrolle der homogenen Aussaat, wurden die Zellen in einem Inkubator kultiviert.

#### **4.4.2.3 Zellzahlbestimmung mit Hilfe des Casy-Zellzählers**

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit Hilfe des Casy-Zellzählers. Hierzu wurden nach Abzentrifugation und Wiederaufnehmen der Zellen im Medium jeweils 50 µl der Suspension in 10 ml steril filtrierten isotonischen Puffer (Casyton) gegeben und mit Hilfe des Casy-Zellzählers vermessen. Dieses verfügt über einen Messbereich von 0,7 – 120 µm und bestimmt die Zellzahl sowie die Größenverteilung einer Probe durch Messung des Widerstandes der angesaugten Zellsuspension mittels elektronischer Pulsfächenanalyse. Der Widerstand am Messpunkt ist vom Volumen und dem physiologischen Zustand der Zellen abhängig. Der Messbereich wurde so gewählt, dass Verfälschungen durch Fremdpartikel weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

#### **4.4.3 Etablierung einer primären Podozytenkultur**

Primärzellkulturen stellen derzeit die Brücke zwischen den artifiziellen Permanentkulturen und den *in vivo* Tierversuchen dar. Solche *ex vivo* Zellen sind am wenigsten verändert oder beeinflusst und kommen so den Bedingungen im lebenden Organismus am Nächsten.

Podozyten bilden die äußere Schicht des glomerulären Filtrationsapparats und sind somit nach Isolation der einzelnen Glomeruli relativ leicht zugänglich.

Im folgenden Abschnitt werden die jeweiligen Schritte erklärt, die zur Herstellung einer primären murinen Podozytenzellkultur notwendig waren.

Nach der Präparation der Mausnieren und deren Kollagenase-Verdau wurden alle weiteren Schritte der Glomeruli Isolation unter der Sterilbank sowie auf Eis durchgeführt (Punkt 4.5.4).

Nach dem letzten Waschschritt wurden die isolierten glomerulären Einheiten in 2,5 ml DMEM Ham F12 Medium aufgenommen und in einer 6-Well Platte ausgesät und bei 37 °C im

Brutschrank kultiviert. Bereits nach ca. 3 – 5 Tagen setzen sich die Glomeruli am Boden der Zellkulturplatte ab und die ersten Podozyten begannen auszuwachsen. Nach max. 7 Tagen wurden die Zellen durch abtrypsinieren in Suspension gebracht und mit sterilem PBS gespült. Um den vorwiegend Mesangialzellen enthaltenden Kern der Glomeruli zu entfernen, wurde die Podozytensuspension durch ein steriles 40 µm Zellsieb gespült und anschließend auf eine frische Zellkulturplatte ausgesät. Insgesamt wurden die primären Podozyten max. 3 x gesplittet und nicht länger als 4 Wochen kultiviert. Je nach Versuchsvorhaben wurden die primären Zellen entweder auf Well-Platten kultiviert und für die Gewinnung von RNA und Proteinen benutzt, oder sie wurden für Fluoreszenz-Zellfärbungen auf Coverslips ausgesät.

#### Charakterisierung der primären Podozytenkultur:

Die Charakterisierung von primären Zellen ist wichtig, um sicher zu stellen, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um die gewünschte Zellpopulation handelt.

Generell erfolgte nach Gewinnung der primären Podozyten stets eine lichtmikroskopische Überprüfung der Zellmorphologie. Dabei sollten die Podozyten ihre charakteristisch längliche und verzweigte Zellform aufweisen und sich deutlich von beispielsweise Tubuluszellen unterscheiden, die ein eher epitheliales, unverzweigtes Erscheinungsbild zeigten.

Als zusätzliche Kontrolle dienten außerdem sog. Marker-Gene/-Proteine, deren Expression spezifisch für den jeweiligen Zelltyp ist. Im Fall der primären Podozyten wurde die Spezifität durch das Vorhandensein der Podozyten-Marker Wilms-Tumor-Protein (WT-1) und Synaptopodin bewiesen. Hierzu wurde die Expression der beiden Marker sowohl auf mRNA-Ebene mittels q RT-PCR als auch auf Protein-Ebene mit Hilfe von Western Blot Analysen und immunzytochemischen Färbungen bestätigt. Um Kontaminationen mit Fremdzellen, im Fall der Podozytenkultur vorwiegend Mesangial- und Endothelzellen, zu untersuchen, wurde zusätzlich die Expression von Cluster of differentiation 31 – (CD31; als Endothelmarker) mRNA anhand von q RT-PCR Analysen ermittelt. Eine Verunreinigung mit Mesangialzellen wurde mittels immunzytochemischen Färbungen des Mesangial-Markers Smooth muscle alpha actin – ( $\alpha$ -SMA) überprüft.

Eine 100 %ige Reinheit einer Primärkultur ist nahezu unmöglich, infolgedessen zeigten die hier verwendeten primären Podozyten immer eine gewisse Heterogenität. *In vitro* Experimente an primären Podozyten wurden allerdings stets mit Zellen durchgeführt, die mind. Einen Reinheitsgrad von > 80 % aufwiesen.

#### **4.4.4 Behandlung von Zellen**

Um die Beeinflussung von Signalwegen zu analysieren, wurden die Zellen mit kommerziell erwerblichen rekombinanten Proteinen behandelt. Hierfür wurden ausschließlich Zellen verwendet, welche 24 h in serumfreien Medium kultiviert wurden. Dies war nötig, um den Stoffwechsel der Zellen zu minimieren und alle Zellen in den gleichen Grundzustand zu versetzen. Außerdem enthält das Serum, das dem "normalen" Vollmedium zugegeben wird, eine undefinierte Mischung verschiedener Wachstumsfaktoren, wodurch erhaltene Ergebnisse nicht eindeutig auf die Zugabe des zu untersuchenden Stoffes zurückzuführen wären.

In dieser Arbeit wurden die Zellen für 24 h mit 2 ng/ml rekombinantem TGF- $\beta$ 1 behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die lediglich in serumfreien Medium inkubiert wurden. Je nach Versuchsvorhaben wurden die Podozyten für immunzytochemische Färbungen für 5 min mit 4 %iger PFA-Lösung fixiert, oder es wurde im Anschluss RNA und/oder Protein aus den Zellen extrahiert.

## 4.5 *In vivo* Experimente

### 4.5.1 Tierhaltung

Alle Tiere wurden aus der eigenen Zucht von Herrn Prof. Tamm (Institut für humane Anatomie und Embryologie) bereitgestellt und im Tierlabor der Universität Regensburg unter Standardbedingungen (Temperatur  $23 \pm 2$  °C, relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5$  %, Futter und Wasser *ad libitum*) mit 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

### 4.5.2 Generierung der Podozyten-spezifischen Knockout Mauslinien

Zur Generierung eines Podozyten-spezifischen Knockouts des TGF- $\beta$  Rezeptors Typ II sowie von Smad 7 wurde das Cre/loxP-System verwendet.

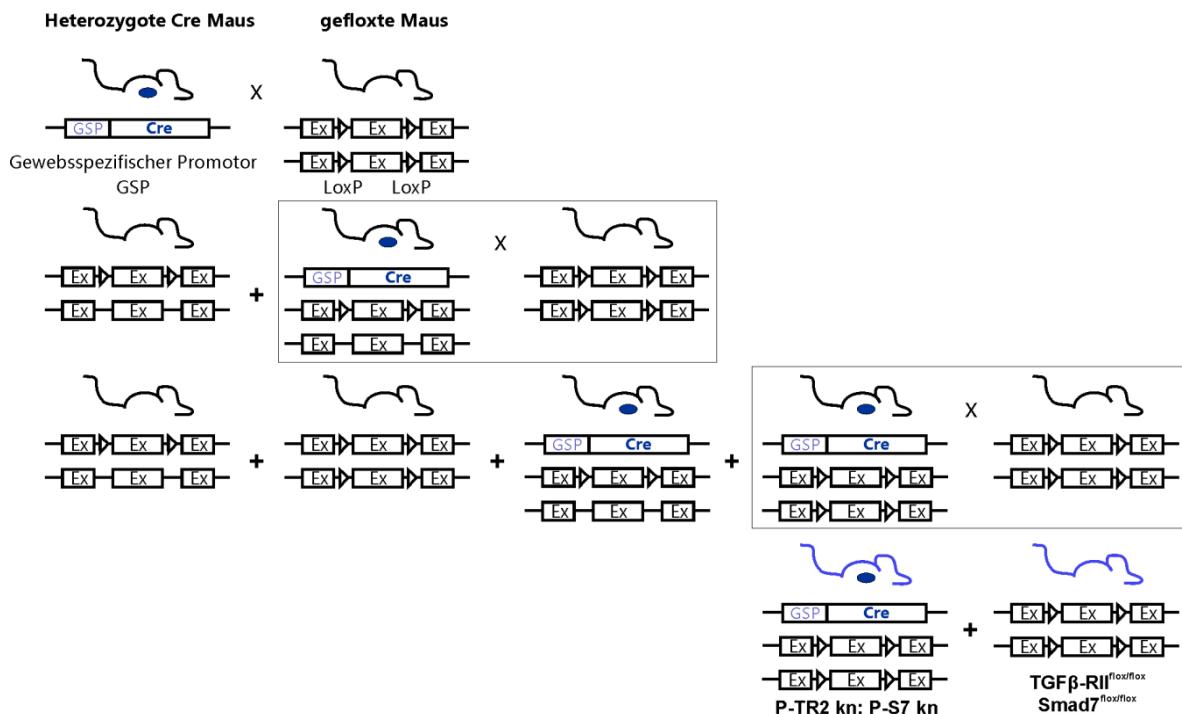
Dieses System wird als genetisches Werkzeug benutzt, um gezielt bestimmte Sequenzen innerhalb des Genoms eines lebenden Organismus zu entfernen. Diese Sequenzspezifische Rekombination wird hierbei durch das Enzym Cre (cyclization recombination; ein Enzym der Klasse der Rekombinasen) vollzogen. Die spezifischen Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase werden als sog. loxP-Sites bezeichnet.

Soll aus einem DNA-Strang eine bestimmte DNA-Sequenz (z.B. Exons und/oder Promotoren) entfernt werden, setzt man gezielt vor und hinter diesen DNA-Abschnitt eine loxP-Stelle, was als *floxed* bezeichnet wird (*floxed* = flanked by loxP). Das Cre-Enzym erkennt und bindet die jeweiligen loxP-Stellen. Wenn beide loxP-Sequenzen in gleicher

Richtung orientiert sind, kommt es zur Exzision/Deletion, also dem Herausschneiden dieses Sequenzabschnitts.

Die Herstellung von gewebsspezifischen Knockout-Modellen ist eine Weiterentwicklung des Systems. Hierbei kommt es durch den Einsatz von gewebsspezifischen Promotoren zu einer kontrollierten Expression der Cre-Rekombinase in definierten Zellpopulationen.

Für den Podozyten-spezifischen Knockout in dieser Arbeit wurde eine transgene Maus verwendet, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Podocin Promotors exprimiert (in dieser Arbeit als Podo-Cre Maus bezeichnet). Diese Maus enthält ein Konstrukt aus einer Teilsequenz des humanen NPHS2 Promotors (Podocin Promotor) und dem Cre-Rekombinase-Gen. Dass ein Fragment des humanen Podocin Promotors verwendet wurde, liegt daran, dass nur so eine exklusive Expression der Cre-Rekombinase innerhalb der Podozyten sichergestellt werden konnte, ohne dabei die Expression podozytärer Proteine zu beeinflussen (Moeller *et al.*, 2002, 2003). Die humane Nphs2 Promotor-gesteuerte Expression der Cre-Rekombinase in diesen Mäusen beginnt bereits während der Glomerulogenese. Eine Translation der Cre-Rekombinase findet während der *Capillary-loop* Phase der Glomeruli-Entwicklung statt, wodurch sichergestellt werden kann, dass es bereits während der Entstehungs- und Differenzierungsphase der Podozyten zu einer Expression des Enzyms kommt.



**Abb. 5: Verpaarungsschema**

Die blau markierten Mäuse (P-S7 kn, P-TR2 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>- und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>- Kontrollmäuse) wurden für die jeweiligen Experimente herangezogen. Bild modifiziert nach (Ayadi *et al.*, 2011)

Um den TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II (TGF- $\beta$  RII) auszuschalten, wurden Mäuse verwendet, bei denen das zweite Exon des TGF- $\beta$  RII-Gens mit loxP-sites versehen wurde (TGF $\beta$ -RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse) (Chytil *et al.*, 2002). Nach Rekombination durch die Cre-Rekombinase kommt es zur Null Mutation, also zu einem vollständigen Knockout des Rezeptors (Baffi *et al.*, 2004).

Als gegenläufiges System wurde zusätzlich eine Smad7 gefloxt Maus (Smad7<sup>flox/flox</sup>-Maus) verwendet. Diese Maus trägt loxP-sites, die den Smad7 Promotor bis zum Exon1 des Smad7-Gens umgeben, wodurch auch hier nach Rekombination eine Null Mutation entsteht (Kleiter *et al.*, 2010).

Analysiert wurden zum einen Tiere, die homozygot gefloxt für TGF- $\beta$  RII und gleichzeitig heterozygot transgen für das Cre-Rekombinase-Gen waren (als **P-TR2 kn** bezeichnet), und zum anderen Mäuse, die homozygot gefloxt für Smad7 und gleichzeitig heterozygot transgen für das Cre-Rekombinase-Gen waren (als **P-S7 kn** bezeichnet). Als Kontrolltiere dienten die jeweils entsprechend homozygot geflochtenen Tiere (TGF $\beta$ -RII<sup>flox/flox</sup> bzw. Smad7<sup>flox/flox</sup>).

#### 4.5.3 Gewebepräparation durch Perfusion über die *Aorta abdominalis*

Um die Nieren-Morphologie zu beurteilen, wurden histologische Nierenpräparate angefertigt. Hierfür wurden die Nieren durch Perfusion über die *Aorta abdominalis* fixiert (Bauchaorta-Perfusion). Die Anleitung dieser Präparationsmethode erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Björn Neubauer (Universität Regensburg, Lehrstuhl für Physiologie).

Präparationsbesteck	Artikelnummer
Präparationsschere_Iris Scissors-Delicate	No. 14060-09
Präparationspinzette_Graefe Forceps – 0.8mm-1mm Tip	No. 11050-10 No. 11651-10
Feinpinzette Inox 5_Dumont #5 Forceps – Assorted Styles	No. 11251-20
Federschere_Vannas Spring Scissors – 2.5mm Blades	No. 15000-08
Federschere_Spring Scissors – Curved Up	No. 15017-10
Gefäßdilatator_S&T Vessel Dilating Forceps – 11cm	No. 00125-11
Klemmen-Aplikator_Micro-Serrefine Clip Applying Forceps	No. 18057-14
Mini-Klemme_Mini Bulldog Serrefine	No. 18053-28
Mikro-Klemmen_Micro Serrefine	No. 18055-01 No. 18055-04

Perfusionskanüle\_stumpfe Butterfly Nadel\_ECOFLO®

**Tab. 22:** Präparationsbesteck (bezogen von FST GmbH, Heidelberg)

In einem ersten Schritt wurden adulte Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Xylazin (6 – 8 mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (90 – 120 mg/kg Körpergewicht) in tiefe Narkose versetzt. Nach Fixierung der betäubten Maus in Rückenlage erfolgte die Freilegung des Bauchsitus durch Eröffnung der Bauchdecke und des Peritoneums durch einen Medianschnitt, an dessen kranialen und kaudalen Ende jeweils ein lateraler Entlastungsschnitt gesetzt wurde. Anschließend wurde das Darmkonvolut mit Hilfe eines Wattestäbchens auf die rechte Seite verlagert und vorsichtig die *Aorta abdominalis* unterhalb der Abzweigungen von *Arteria renalis sinister* und *Arteria renalis dexter* freipräpariert. Zum Einführen der Perfusionskanüle wurde die *Aorta abdominalis* unmittelbar kaudal der Abgänge der beiden Nierenarterien mit Hilfe einer Mikro-Klemme vorübergehend abgeklemmt und durch einen Schnitt mit Hilfe einer Federschere möglichst kaudal, aber kranial der *Arteria iliaca communis* eröffnet. Unter Zuhilfenahme eines Gefäßdilatators wurde die Perfusionskanüle in die Aorta eingeführt und mit einer Gefäßklemme befestigt. Im Anschluss daran wurde die Klemme, welche den Blutstrom der *Aorta abdominalis* unterband, entfernt. Durch einen Einfluss von Blut in die Perfusionskanüle konnte daraufhin die richtige Positionierung der Kanüle überprüft werden. Als letzter Präparationsschritt erfolgte die Eröffnung der *Vena cava caudalis*, um eine Abflussmöglichkeit für die Perfusionslösungen zu schaffen, und im Anschluss wurde die flussgesteuerte Perfusion (13 ml/min) eingeleitet. Begonnen wurde die Perfusion mit dem Durchspülen der Niere mit einer Heparin-haltigen Kochsalzlösung, um alle Blutbestandteile aus der Niere zu entfernen, bevor die eigentliche Fixierung des Gewebes durch Perfusion mit ca. 10 ml 4 %iger PFA-Fixierlösung erfolgte. Anschließend wurden die fixierten Nieren entnommen, gewogen und je nach Versuchsvorhaben für unterschiedliche histologische Analysen weiterverarbeitet.

#### Heparin-Lösung

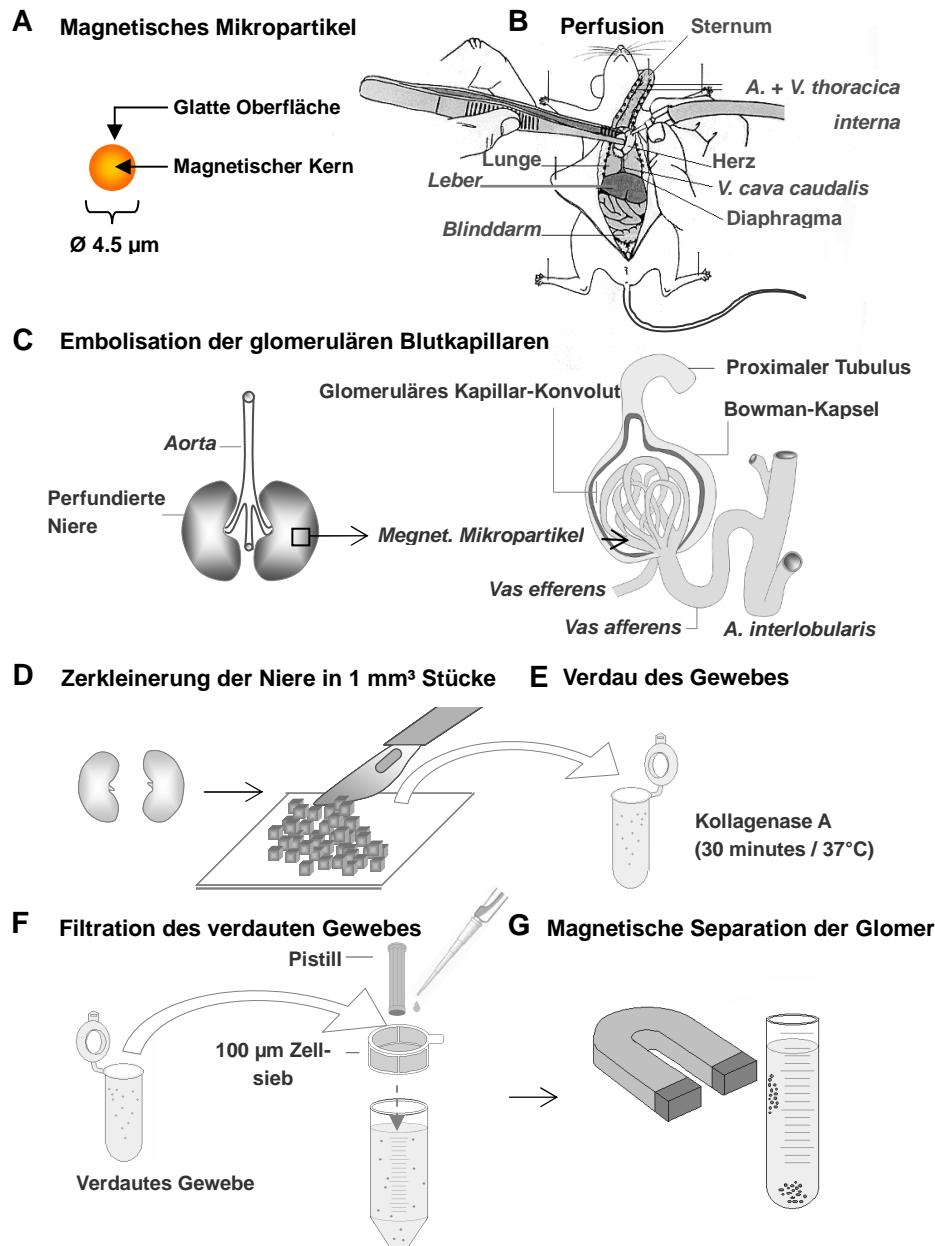
NaCl	4,5 g
Heparin-Natrium 250000 IE	500 µl
mit H <sub>2</sub> O dest. Ad 500 ml	

#### 4.5.4 Glomeruli-Isolation

Um den Podozyten-spezifischen Knockout zu verifizieren sowie molekulare Veränderungen innerhalb der Glomeruli zu analysieren, wurden die einzelnen Glomeruli der Mausniere isoliert.

Die Durchführung der Isolation der Glomeruli erfolgte durch Perfusion der Mausnieren mit magnetischen Micropartikeln. Dabei handelt es sich um eine Modifikation der von Takemoto beschriebenen Methode (Takemoto *et al.*, 2002).

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass es durch die Perfusion zu einer Ansammlung von magnetischen Mikropartikeln einer definierten Größe von  $4,5 \mu\text{m}$  innerhalb des Kapillarknäuels der Glomeruli kommt, wodurch diese nach zeitlich begrenztem Verdau der Nieren, magnetisch vom restlichen Nierengewebe separiert werden können.



**Abb. 6: Prinzip der Glomeruli-Isolierung mit Hilfe von magnetischen Micropartikeln**

(A) Beschaffenheit der magnetischen Micropartikel. (B) Perfusionstechnik, welche in dieser Arbeit durch die Perfusion über die *Aorta abdominalis* ersetzt wurde. (C) Embolisation der glomerulären Blutkapillaren. (D) Zerkleinerung der Nieren. (E) Verdau des Gewebes. (F) Filtration des verdauten Gewebes. (G) Magnetische Separation der Glomeruli. Mit freundlicher Genehmigung von A. Blutke aus (Blutke, 2008).

Die Präparation der Tiere ähnelte der Vorgehensweise der Gewebepräparation. Nach Eröffnung des Bauchraums wurde hier allerdings die *Aorta abdominalis* ober- und unterhalb der Abgänge von *Arteria renalis sinister* und *Arteria renalis dexter* sowie die *A. mesenterica superior* freipräpariert. Letztere wurde mittels eines chirurgischen Fadens ligiert, um eine Perfusion des Hauptteils des Gastrointestinaltrakts, der durch dieses Gefäß versorgt wird, zu verhindern. Das Einführen der Perfusionskanüle erfolgte wie oben beschrieben. Eine weitere Modifikation bestand in dem Abklemmen der *Aorta abdominalis* zwischen *Truncus coeliacus* und *A. mesenterica superior*, wodurch gewährleistet werden sollte, dass nicht der gesamte Thorax, sondern in erster Linie die Nieren perfundiert wurden. Anschließend wurden 10 ml steriles PBS + 50 µl *Magnetic Microparticles* durch die Nieren gespült. Im nächsten Schritt wurden die Nieren entnommen, die *Capsula fibrosa renalis* (Nierenkapsel) und das *Pelvis renalis* (Nierenbecken) entfernt und das verbleibende Gewebe mit einer Rasierklinge zerkleinert.

Durch die Behandlung der Nierenstücke mit 1 mg Kollagenase/ml HBSS bei 37 °C für 30 min wurde das Gewebe verdaut. Während der Inkubation wurde die Lösung alle 5 min leicht geschwenkt, um einen gleichmäßigen Verdau der Niere zu gewährleisten.

Die darauffolgende Glomeruli-Isolierung wurde durch die Separation über einen Magneten bewerkstelligt. Hierfür wurde das verdaute Gewebe zunächst mit 8 ml eiskalten sterilen PBS durch ein frisches 100 µm Zellsieb gespült und mit einem Spritzenstempel vorsichtig durchgesiebt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 12 ml Rundboden Falcon überführt und an einen Magneten gehalten. Dort erfolgte dann für ca. 10 min die Separation der Glomeruli, welche im Inneren die *Magnetic Microparticles* enthalten, von den restlichen, in der Lösung befindlichen Zellen (vorwiegend Tubulusfragmente). Durch die magnetische Anziehungskraft werden die Glomeruli am Rand des 15 ml Falcons gehalten, wodurch der Überstand vorsichtig und langsam abgenommen werden kann. Um eine möglichst hohe Reinheit der Glomeruli zu erzielen, wurden die Glomeruli erneut in eiskaltem PBS aufgenommen und am Magneten separiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis sich der Überstand unter dem Lichtmikroskop frei von Tubulusfragmente erwies (in der Regel wurde ca. 8x gewaschen).

Die isolierten glomerulären Einheiten wurden anschließend je nach Versuchsvorhaben für RNA-/Protein-Isolationen oder für die Primärkultur weiter verarbeitet.

#### 4.5.5 Induktion von *Diabetes mellitus* Typ I als Podozyten-Schadensmodell

Die Funktion der Niere basiert auf einer intakten glomerulären Filtrationseinheit, an deren Aufrechterhaltung den Podozyten eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird. Podozyten-Schädigungen führen zu einem Verlust der Filtrationsschlüsse, zu einem Ablösen der

Podozyten von der GBM und zur Ausscheidung von hochmolekularen Proteinen im Urin (Proteinurie). Solche pathologischen Veränderungen werden unter anderem auch bei Patienten mit langjähriger *Diabetes mellitus* (DM) Erkrankung sichtbar. Bei etwa 30 – 40 % der Patienten mit DM Typ I und bei ca. 8 – 10 % der Erkrankten mit DM Typ II kommt es zur Ausbildung einer sog. diabetischen Nephropathie (DN) (Reddy *et al.*, 2008).

In der experimentellen Forschung kann durch den Einsatz von Streptozotocin (STZ) eine DM Erkrankung in Versuchstieren induziert und infolgedessen analysiert werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Induktion einer DN als Modell für die Schädigung von Podozyten eingesetzt.

Streptozotocin gehört zu den Substanzklassen der Glucosamine und Nitrosoharnstoffe. Es wurde ursprünglich als antibiotisch wirkende Substanz des Bodenbakteriums *Streptomyces achromogenes* gefunden.

Streptozotocin weist eine spezifische Toxizität für die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas auf. Die selektive Wirkung auf diese Zellen beruht darauf, dass Streptozotocin aufgrund der Glucosestruktur durch den Glucosetransporter GLUT2, der in hoher Dichte in der Membran von  $\beta$ -Zellen vorkommt, ins Zellinnere transportiert wird. In der Zelle erfolgt daraufhin eine Spaltung zwischen dem Glucoseanteil und dem Methylnitrosoharnstoff. Diese Verbindung wirkt alkylierend, wodurch es zum Einbau von Alkylgruppen in die DNA kommt. Diese Schädigung der DNA ist letztlich der Grund für die toxische Wirkung von Streptozotocin. Durch den völligen Verlust der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas kommt es zu einem kompletten Insulinmangel und somit zu DM Typ I.

Das Auslösen einer DM Erkrankung bei Mäusen durch Streptozotocin wurde dabei nach einem standardisierten Protokoll des *Animal Models of Diabetic Complications Consortium* (AMDCC) durchgeführt.

#### 4.5.5.1 Low Dose Streptozotocin Protokoll

Für dieses Experiment wurden männliche P-TR2 kn und P-S7 kn sowie die entsprechenden Kontrolltiere (ca. 2 Monate alt) in jeweils vier Gruppen eingeteilt:

Gruppe I:	TGF $\beta$ -RII <sup>flox/flox</sup> / Smad7 <sup>flox/flox</sup>	Vehikel behandelt
Gruppe II:	TGF $\beta$ -RII <sup>flox/flox</sup> / Smad7 <sup>flox/flox</sup>	<b>STZ</b> behandelt
Gruppe III:	P-TR2 kn / P-S7 kn	Vehikel behandelt
Gruppe IV:	P-TR2 kn / P-S7 kn	<b>STZ</b> behandelt

Zur Induktion von DM wurden den Versuchsmäusen für 4 – 6 h das Futter entzogen. Bei dem verwendeten ‘Low Dose STZ’ Protokoll erhielten die Tiere an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht Streptozotocin (gelöst in Citratpuffer). Durch die Instabilität von STZ in Lösung, wurde darauf geachtet, dass eine Injektion innerhalb von 15 min erfolgte. Kontrolltiere erhielten jeweils Injektionen von Citratpuffer (Vehikel). Die behandelten Tiere sollten nach einer Induktionsdauer von vier Wochen entsprechend hohe Werte des Blutglucose-Gehalts aufweisen.

#### **4.5.6 Uringewinnung von Mäusen**

Zur Analyse des Mausurins wurde dieser mit Hilfe von metabolischen Käfigen (freundlicherweise von Herrn Prof. W. H. Castrop zur Verfügung gestellt) aufgefangen.

Hierfür wurden die Mäuse jeweils einzeln für 24 h in metabolische Käfige gesetzt, die mit Trinkflasche und Urinauffangbehälter versehen waren. Die Versorgung mit Futter konnte über diesen Zeitraum nicht gewährleistet werden, da es aufgrund des Aufbaus der Käfige zur Vermengung von Urin und Futter gekommen wäre.

Eine weitere Methode war das Auffangen von sog. Spot-Urin. Hierbei wurden die Mäuse auf einen leeren, gesäuberten Käfig gesetzt und durch das Fixieren der Mäuse per Hand kam es meist zum Entlassen des Urins, welcher sogleich aufgefangen wurde. Der gesammelte Urin wurde anschließend bei -20 °C für spätere Analysen gelagert.

#### **4.5.7 Bestimmung des Blutglucose-Spiegels**

Zur Bestimmung des Blutglucose-Gehalts wurde Blut durch Anritzen des Mausschwanzes aus der *Vena caudalis mediana* gewonnen und mit dem kommerziell erhältlichen Blutzucker-Messgeräts Ascensia Elite (Bayer) und den dazugehörigen Messsensoren vermessen. Die Konzentrationsbestimmung wurde jeweils nachmittags zwischen 13 – 14 Uhr durchgeführt. Dabei wurden nur Mäuse verwendet, die sich in keinem hungernden Zustand befanden.

### **4.6 Histologische Arbeitstechniken**

#### **4.6.1 Kryo-Einbettung und Herstellung von Gefrierschnitten**

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Nieren nach der Perfusion entnommen, vorsichtig mit einer Rasierklinge halbiert und für eine weitere Stunde in 4 % PFA Fixierlösung nachfixiert. Anschließend wurden die Nieren mehrmals mit Phosphatlösung gespült.

Zur Stabilisierung des Gewebes wurden die Nieren jeweils für 4 h bei RT bzw. ü.N. bei 4 °C mit aufsteigenden Konzentrationen einer Sucrose-Lösung (10 %ige; 20 %ige und 30 %ige Sucrose-Lösung; Sucrose wurde (w/v) in Phosphatpuffer gelöst) behandelt. Anschließend wurden die Nieren in Tissue-Tek® eingebettet und schnell mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren.

<b>Phosphatpuffer (Php)</b>	
P1: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	35,6 g auf 2 l
P2: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O	13,8 g auf 1 l
P1:P2 = 5:1; pH 7,4	
<b>4 % PFA-Fixierlösung</b>	
Formaldehyd	4 g
Phosphatpuffer	100 ml
unter Rühren und Erwärmen lösen; pH 7,4	

Mit Hilfe des Microm HM 500 OM Kryostats wurden 12 µm dicke Transversalschnitte der Niere angefertigt, auf Super-Frost®Plus-Objektträger aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung für immunhistochemische Färbungen bei – 20 °C gelagert.

#### 4.6.2 Paraffin-Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Auch für die Einbettung in Paraffin wurden die Nieren halbiert, für 1 h nachfixiert und mit Phosphatpuffer gespült. Anschließend erfolgte die Paraffin-Einbettung mit Hilfe des Einbettautomaten HMP110 über eine Isopropanol-Reihe.

##### Kurzprotokoll:

- 70 % Isopropanol 1 h
- 80 % Isopropanol 1 h
- 96 % Isopropanol 1 h
- 96 % Isopropanol 2 h
- 100 % Isopropanol 1 h
- 100 % Isopropanol 1 h
- 100 % Isopropanol 2 h
- 100 % Xylol 1,5 h
- 100 % Xylol 2 h
- Paraffin 4 h
- Paraffin 8 h

Transversalschnitte der Nieren von ca. 6 µm Dicke wurden hier mit Hilfe des Supercut 2050-Microtoms angefertigt.

#### 4.6.3 Epon-Einbettung und Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Zur Einbettung in Epon wurde die perfundierte Niere ü.N. bei 4 °C mit EM-Fixans fixiert. Am nächsten Tag wurde mehrmals über mehrere Stunden mit Cacodylatpuffer gespült.

<b>EM-Fixans</b>	
Formaldehyd	2,5 %
Glutaraldehyd	2,5 %
in Cacodylatpuffer	
<b>Cacodylatpuffer</b>	
Cacodylsäure	20,14 g
in 0,5 l H <sub>2</sub> O dest.; pH 7,24	

Entwässerung und Einbettung wurde nach der Methode von Luft durchgeführt (Luft, 1961). Zunächst erfolgte eine Kontrastierung der Präparate mit 1 %iger Osmiumtetroxid-Lsg. Das Osmium wurde mit Cacodylatpuffer ausgewaschen und die Nieren durch eine aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70, 80, 90, 100 %) entwässert. Die Einbettung erfolgte im Einbettautomaten über Aceton nach Standardmethode: Ethanol/Aceton 1:1; 100 % Aceton; Epon/Aceton 1:2; Epon/Aceton 2:1; 100 % Epon; Aushärten im Brutschrank 24 h bei 60 °C und 48 h bei 90 °C. Für die Einbettung wurden Stammlösung A und Stammlösung B im Verhältnis 1:1 mit 2 % Beschleuniger DMP-30 verwendet.

<b>Stammlösung A</b>	
Glycidether 100	62 ml
DDSA	100 ml
<b>Stammlösung B</b>	
Glycidether 100	62 ml
MNA	89 ml

Von den Nieren wurden zunächst Semidünnschnitte (1 µm) angefertigt und lichtmikroskopisch betrachtet. Von ausgewählten Regionen wurden Ultradünnschnitte (60 nm) mit Hilfe des „Ultracut E“-Ultramikrotoms und Diamantmesser angefertigt. Diese wurden auf Kupfergrids bzw. mit Pioloform überzogene Slotgrids aufgefangen, mit Uranylacetat (10 %, 10 min) und Bleicitrat (5 %, 10 min) unter Lichtabschluss kontrastiert und anschließend mit Hilfe des Elektronenmikroskops betrachtet.

#### 4.6.4 Einbettung und Kontrastierung von Glomeruli für REM

Um die Oberflächenstruktur der Glomeruli zu beurteilen, wurden diese mit dem Rasterelektronen (REM)- Mikroskop betrachtet.

Hierfür wurden die isolierten Glomeruli in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ü.N. mit EM-Fixans fixiert. Anschließend wurde über magnetische Separation mehrfach mit Cacodylatpuffer gewaschen.

Für die weitere Probenvorbereitung wurden die Glomeruli auf ein Poly-D-Lysin-beschichtetes Cover slip überführt und für 5 min mit EM-Fixans behandelt. Für die Herstellung der beschichteten Glasdeckgläschen wurden die Cover slips für 30 – 60 min mit einer 5 mg Poly-D-Lysin / ml PBS inkubiert. Auch hier erfolgte eine Osmierung mit 1 %iger OsO<sub>4</sub>-Lsg sowie die Entwässerung der Präparate über eine aufsteigende EtOH-Reihe (50; 70; 80; 90 und 100 %). Nach Überführung in 100 % EtOH/Aceton (1:1) für 30 – 60 min wurden die Präparate in reinem Aceton gelagert. Daraufhin erfolgte die sog. Critical Point Trocknung durch CO<sub>2</sub>-Substitution mit Hilfe des CP Dryers E3000 (Polaron), eine Technik, die 1951 von Anderson beschrieben wurde (Anderson, 1951). Anschließend wurden die Präparate auf einen Aluminiumprobenteller aufgeklebt. Nach Bedampfung mit Platin wurden die einzelnen Glomeruli mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops aufgenommen.

#### 4.6.5 Histochemische Färbungen

##### 4.6.5.1 Färbung nach Richardson

Semidünnschnitte von Nieren wurden nach Richardson blau gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte 15 – 30 Sekunden bei 60 °C mit der Gebrauchslösung überschichtet. Die Gebrauchslösung wurde wieder gut mit H<sub>2</sub>O dest. Abgespült.

##### Färbelösung nach Richardson

Stammlösung I	1 % Azur II: 5 g in 500 ml H <sub>2</sub> O dest.
Stammlösung II	1 % Methylenblau: 5 g Methylenblau in 500 ml 1 % Borax
Gebrauchslösung	1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile H <sub>2</sub> O dest.

##### 4.6.5.2 Periodsäure Schiffs-Reagenz-Färbung (PAS)

Bei der PAS-Färbung handelt es sich um eine histochemische Methode zum Nachweis von Kohlenhydraten, wie Mucopolysacchariden, Glykoproteinen, Muzinen sowie Glykolipiden.

Dabei werden alle 1,2-Glykol-Gruppen mit wässriger Perjodsäure ( $\text{HIO}_4$ ) oxidiert und unter Spaltung der C-C-Bindung zu Aldehyden umgewandelt. Letztere reagieren dann mit fuchsinschweifliger Säure (Schiff-Reagenz) unter Bildung eines roten, basischen Farbstoffs. Dementsprechend stellte sich die extrazelluläre Matrix rot-violett dar. Die Zellkerne erschienen nach Mayer's Hämalaun Färbung blau (Lüllmann-Raucher, 2006).

Für die PAS-Färbung wurden Paraffinschnitte verwendet. In einem ersten Schritt erfolgten die Entparaffinierung sowie eine Hydratisierung der Präparate über eine Xylol-Isopropanol-Reihe nach folgendem Protokoll:

- 2x 100 % Xylol 10 min
- 2x 100 % Isopropanol 10 min
- 2x 96 % Isopropanol 5 min
- 2x 80 % Isopropanol 5 min
- 1x 70 % Isopropanol 5 min
- $\text{H}_2\text{O}$  dest. 5 min

Die eigentliche PAS-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- 1 % Perjodsäure in 70 %igem EtOH 10 min
- 3x  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1 min
- Schiffs Reagenz (Roth) 15 min
- 3x Sulfitwasser 1 min
- Fließend wässern 10 min
- Mayer's Hämalaun (Roth) 5 min
- Fließend wässern 5 min
- 0,1 % HCl-Alkohol 2 – 5 s
- $\text{H}_2\text{O}$  dest. 10 min

#### **1 % Perjodsäure**

$\text{HIO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	4 g
---	-----

mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. Ad 200 ml

#### **Sulfitwasser**

$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$	6 g
1 N HCl	60 ml

mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. Ad 600 ml

#### **HCl-Alkohol 0,1 %**

25 % HCl	2 ml
70 % Isopropanol	200 ml

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte über eine aufsteigende Isopropanol-Xylol-Reihe dehydriert (erste Behandlungsreihe in umgekehrter Reihenfolge) und mit Depex eingedeckelt.

Wichtig für die anschließende Auswertung der PAS-Färbung war, dass alle Schnitte die miteinander verglichen wurden, gleichzeitig, also unter gleichen Bedingungen, gefärbt wurden und anschließend unter den gleichen mikroskopischen Belichtungsbedingungen aufgenommen wurden.

#### **4.6.6 Immunhistochemische Färbungen**

Mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen können Proteine spezifisch in Zellen bzw. Geweben lokalisiert werden. In dieser Arbeit wurde dafür das indirekte Immunfluoreszenz-Verfahren verwendet, welches dem vom Prinzip der Methode des spezifischen Nachweises von Proteinbanden in Western Blot Analysen entspricht. Auch hier bindet ein Primärantikörper an sein spezifisches Antigen, während sich der Sekundärantikörper an ein Epitop des ersten Antikörpers anlagert. Der Unterschied besteht darin, dass hier der sekundäre Antikörper mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Neben der indirekten Immunfluoreszenz kam für die direkte Markierung der DNA des Zellkerns der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zum Einsatz. Mit Hilfe der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht entsprechender Wellenlänge (Alexa 488: 495 nm; Cy3: 550 nm; DAPI: 358 nm) wurde die Lage der Antikörperkomplexe bzw. des interkalierenden Farbstoffs sichtbar gemacht. Dabei wurde das emittierte Licht durch einen entsprechenden, für die spezifische Wellenlänge durchlässigen Filter unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

##### **4.6.6.1 Fluoreszenz-Färbungen von Gewebeschnitten**

Die Fluoreszenz-Färbungen von Geweben wurden an den angefertigten Kryoschnitten vorgenommen.

###### Ablauf der Fluoreszenz-Färbung von Geweben:

- 5 min mit Php spülen (zum Entfernen von Tissue-Tek®)
- Optional: 5 min in der Mikrowelle mit Citratpuffer aufkochen
- Kurz mit Php spülen
- Optional: 5 min mit 0,5 % Triton X-100 in Php inkubieren
- 1 h bei RT mit entsprechender Blockierlsg. Blockieren
- 1 h bei RT bzw. ü.N. bei 4 °C mit Primärantikörper in 1:10 Blockierlsg. Verdünnt inkubieren

- 3x mit PhP spülen
- 1 h bei RT im Dunkeln mit Sekundärantikörper in 1:10 Blockierlsg. Verdünnt inkubieren
- 3x mit PhP spülen
- Mit 1:10 DAPI in *Fluorescent Mounting Medium* eindeckeln

Der Einsatz der entsprechenden Antikörper ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Protein	Wasch-puffer	Blockierung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>Ohne Vorbehandlung</b>				
Col IV (Rockland)	0,1 M PhP	3 % BSA 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal rabbit anti- Col IV, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP	goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP
Fibronektin (Dako)	0,1 M PhP	3 % BSA 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal rabbit anti-FN, 1:500 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP	goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP
CTGF (GeneTex)	1 x TBS	1 % BSA 0,2 % CWFG 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal rabbit anti- CTGF, 1:400 in 1:10 Blockierlsg. In 1 x TBS	goat anti-rabbit Cy™3, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 1 x TBS
PAI-1 (H135; Santa Cruz)	1 x TBS	1 % BSA 0,2 % CWFG 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal rabbit anti-PAI- 1, 1:50 in 1:10 Blockierlsg. In 1 x TBS	goat anti-rabbit Cy™3, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 1 x TBS
α-SMA (Dianova)	0,1 M PhP	3 % BSA 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal mouse anti- α- SMA, 1:200 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP	goat anti-mouse Alexa Fluor® 488, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP
Synaptopodin (P19; Santa Cruz)	1 x TBS	1 % BSA 0,2 % CWFG 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal goat anti- Synaptopodin, 1:100 in 1:10 Blockierlsg. In 1 x TBS	horse anti-goat Biotin, 1:500; Streptavidin Alexa Fluor® 488, 1:1000; in je 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP
Smad7 (B8; Santa Cruz)	0,1 M PhP	3 % BSA 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal mouse anti- Smad7, 1:50 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP	goat anti-mouse Cy™3, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP
TGF-β RII (C16; Santa Cruz)	0,1 M PhP	3 % BSA 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal rabbit anti- TGFβ-R2, 1:50 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP	goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP
<b>Mit Vorbehandlung</b>				
5 min Aufkochen in Citratpuffer + 5 min Inkubation in Triton X100				
pSmad2 (Abcam)	0,1 M PhP	3 % BSA 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal rabbit anti- pSmad2, 1:50 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP	goat anti-rabbit Cy™3, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP
WT-1 (C19; Santa Cruz)	0,1 M PhP	3 % BSA 0,1 % Triton X in 0,1 M PhP	polyclonal rabbit anti-WT- 1, 1:50 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP	goat anti-rabbit Cy™3/ Alexa Fluor® 488, 1:1000 in 1:10 Blockierlsg. In 0,1 M PhP

**Tab. 23:** Liste der Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Für Negativkontrollen wurden die Schnitte wie oben behandelt, jedoch ohne Inkubation mit Primärantikörper. Im Anschluss wurden die gefärbten Präparate bis zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 4 °C gelagert.

#### Citrat-Puffer pH 6,0

Natriumcitrat x H <sub>2</sub> O	0,2 M
mit 0,2 M Citronensäure auf pH 6,0 einstellen	

#### 4.6.6.2 Fluoreszenz-Färbungen von *in vitro*-Zellen

Für die Fluoreszenz-Färbungen an Zellen wurden diese auf Cover slips ausgesät, kultiviert und je nach Versuchsvorhaben behandelt. Nach Beendigung des Experiments wurde das Medium entfernt, mit PBS gespült und die Zellen anschließend mit 4 % PFA-Fixierlsg. Fixiert. Daraufhin erfolgte die Durchführung der Fluoreszenz-Färbung nach dem unter 4.6.6.1 aufgeführten Protokoll. Eine Antigen-Demaskierung wurde hier jedoch nie angewendet. Die fertigen Objekträger wurden auch hier bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

#### 4.6.7 Histologische Auswertungen

##### 4.6.7.1 Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz

*Foot Process Effacement* ist das pathologische Erscheinungsbild eines Podozytenschadens, bei dem es zum Zusammenfall der spezifischen Morphologie der Podozyten kommt. Der Verlust der Podozyten-Architektur geht mit einem Verlust der Ultrafiltrationsfunktion einher und äußert sich an EM-Aufnahmen durch das Verschwinden der definierten Fußfortsatzstrukturen. Die einzelnen Fußfortsätze der geschädigten/kollabierten Podozyten erscheinen breiter und liegen dabei flach der GBM auf.

Mit Hilfe von ImageSP Viewer wurde die Länge der GBM einer EM-Aufnahme von 2500facher Vergrößerung gemessen und anschließend die Anzahl der einzelnen Fußfortsätze entlang der gemessenen GBM bestimmt. Die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz konnte somit als Maß für einen Podozytenschaden herangezogen werden.

$$\text{Fußfortsatz-Frequenz} = \frac{\text{Anzahl der Fußfortsätze}}{\text{Länge der GBM [\mu m]}}$$

#### 4.6.7.2 Vermessung der relativen Dicke der glomerulären Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist eine spezialisierte Basallamina, die sowohl von den Endothelzellen des Glomerulus als auch von den Podozyten synthetisiert wird. Elektronenmikroskopisch weist sie einen typisch 3-schichtigen Charakter auf. Dabei können die *Lamina rara interna* auf der Endothel-zugewandten Seite, die dunkle elektronendichte *Lamina densa* und die *Lamina rara externa* unterhalb der Podozyten unterschieden werden. Unter pathologischen Bedingungen der verschiedensten Nierenerkrankungen kommt es häufig zu einer Verdickung der GBM. Dieser Befund deutet folglich auf eine Schädigung der glomerulären Einheit hin.

Die relative Bestimmung der GBM Dicke erfolgte an EM-Aufnahmen von 12500-facher Vergrößerung mit Hilfe von ImageJ. In einem ersten Schritt wurde die Länge der GBM entlang der *Lamina rara interna* vermessen. Im nächsten Schritt wurde die gesamte Fläche über der gemessenen GBM bestimmt. Durch den Quotienten der beiden erhaltenen Werte wurde schließlich die relative Dicke/Höhe errechnet.

$$\text{GBM-Dicke [nm]} = \frac{\text{GBM Fläche } [\text{nm}^2]}{\text{Länge der GBM } [\text{nm}]}$$

#### 4.6.7.3 Semi-quantitative Bestimmung des Sklerose Indexes

Die Auswertung von PAS-gefärbten Paraffin-Nierenschnitten erfolgte durch die semi-quantitative Bestimmung des Sklerose Indexes.

Hierfür wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops Mosaik-Aufnahmen der gesamten transversalen Nierenschnitte bei einer 20-fachen Vergrößerung hergestellt. Im Anschluss wurden alle Glomeruli eines Schnitts im Hinblick auf das Ausmaß der sklerotischen Fläche (=PAS-positive Fläche) innerhalb der Glomeruli beurteilt. Dabei wurden die einzelnen Glomeruli mittels einer graduellen Einteilung von 0 – 4 in Gruppen eingeteilt.

Gruppeneinteilung:	0 = keine Sklerose
	1 = weniger als 25 % sklerotische, PAS-positive Fläche
	2 = 25 – 50 % sklerotische, PAS-positive Fläche
	3 = 50 – 75 % sklerotische, PAS-positive Fläche
	4 = mehr als 75 % sklerotische, PAS-positive Fläche

Die anschließende Berechnung des Sklerose Indexes erfolgte durch folgende Formel:

$$\text{Sklerose Index} = \frac{\sum(\text{Gruppennummer} * \text{Anzahl der Glomeruli})}{\text{Gesamtzahl der Glomeruli}}$$

## 4.7 Mikroskop-Verfahren

### 4.7.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse der Gewebeschnitte sowie der *in vitro* Zellen erfolgte mit Hilfe des *Axio Imager Z1*-Mikroskops (Carl Zeiss, Göttingen).

Fluoreszenzbilder wurden zusätzlich mit Hilfe des von Zeiss entwickelten ApoTome aufgenommen, wodurch die Bildqualität gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie deutlich verbessert wurde.

Die Entwicklung des ApoTomes basiert auf dem Prinzip der Streifenprojektion durch strukturierte Beleuchtung. Der ApoTome Mikroskop-Einschub wird einfach in die Leuchtfeldblendenebene des Fluoreszenzstrahlengangs des Lichtmikroskops eingesetzt. Hierdurch wird eine Gitterstruktur in die Fokusebene des Präparates projiziert und über einen Scanning-Mechanismus in drei definierte Positionen verschoben. An jeder Gitterposition wird ein digitales Bild aufgenommen – die drei Rohbilder werden softwarebasiert zu einem optischen Schnitt mit verbessertem Kontrast und erhöhter Auflösung verrechnet. In dem Ergebnisbild sind anschließend keine Gitterstrukturen mehr sichtbar.

Zur Feststellung quantitativer Unterschiede in Bezug auf ein bestimmtes Protein wurden die Präparate mit gleicher Belichtungszeit aufgenommen und bei identischer Einstellung miteinander verglichen.

### 4.7.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die angefertigten Ultradünnsschnitte wurden mit einem Zeiss EM 10 Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) betrachtet (Zeiss, Oberkochen). Die Beschleunigungsspannung betrug immer 120 kV. Die Belichtungszeit schwankte zwischen 600 ms und 1000 ms.

Das Prinzip des TEM ist ähnlich dem des Lichtmikroskops, jedoch wird die Probe statt mit Licht mit hochenergetischen Elektronen durchstrahlt. Die Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe erzeugt ein Bild des durchstrahlten Probenbereichs, welches mit einer Kamera aufgenommen werden kann.

#### 4.7.3 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die Analyse der Oberflächenbeschaffenheit der Glomeruli erfolgte mit Hilfe des Leo 1530 Gemini Rasterelektronenmikroskops (Zeiss, Oberkochen).

Bei dieser Mikroskop-Technik wird ein Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster über das vergrößert abzubildende Objekt geführt (gerastert). Die entstehenden Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt werden dabei zur Erzeugung eines Bildes des Objekts genutzt, wodurch sich die Rasterelektronenmikroskopie besonders zur Abbildung der Oberflächen eignet.

### 4.8 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der numerischen Daten sowie deren graphische Darstellung erfolgte mittels *Microsoft® Excel* (Microsoft® Corporation, Redmond, USA).

Für die statistische Analyse der *in vitro* Versuche, die mindestens dreimal durchgeführt wurden, kam der studentische T-Test zum Einsatz. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für  $p < 0,05$  und statistisch hoch signifikante Unterschiede für  $p < 0,001$  angenommen. In den Diagrammen wurde dies mit \*für  $p < 0,05$  bzw. \*\* für  $p < 0,001$  vermerkt. Hierzu wurde *CorelDraw®* (Corel® Corporation, Ottawa, Canada) verwendet.

## 5 Ergebnisse

Die Analyse der funktionellen Rolle des TGF- $\beta$  Signalwegs in den Podozyten der Niere erfolgte durch die Generierung zweier Mauslinien mit einem konditionellen Podozytenspezifischen Knockout von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II (TGF- $\beta$  RII). Hierfür kam die transgene sog. Podo-Cre Maus (2,5-kb NPHS2 P-Cre) zum Einsatz. Diese Mauslinie enthält ein Konstrukt einer Cre-Rekombinase, welches unter der Kontrolle eines fragmentierten humanen Podocin-Promotors steht. Hierdurch wurde eine Podozytenspezifische Cre-Expression sichergestellt, die bereits während der *Capillary-loop* Phase der Glomerulo-genese beginnt. Durch die Verpaarung der Podo-Cre Maus mit geflochtenen Smad7 Mäusen (Smad7<sup>flox/flox</sup>) bzw. mit geflochtenen TGF- $\beta$  RII Tieren (TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>) wurden zwei weitgehend gegenläufige Modellsysteme entwickelt. Zum einen sollte es durch das Entfernen von Smad7 zu einer verminderten Inhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs kommen, zum anderen sollte das Ausschalten des TGF- $\beta$  RII zu einer völligen Inhibition der TGF- $\beta$  Signaltransduktion führen.

Die erste Beobachtung war, dass beide generierten Mauslinien Nachkommen hervorbrachten, die lebensfähig waren und deren Genotypen der mendelschen Verteilung entsprachen.

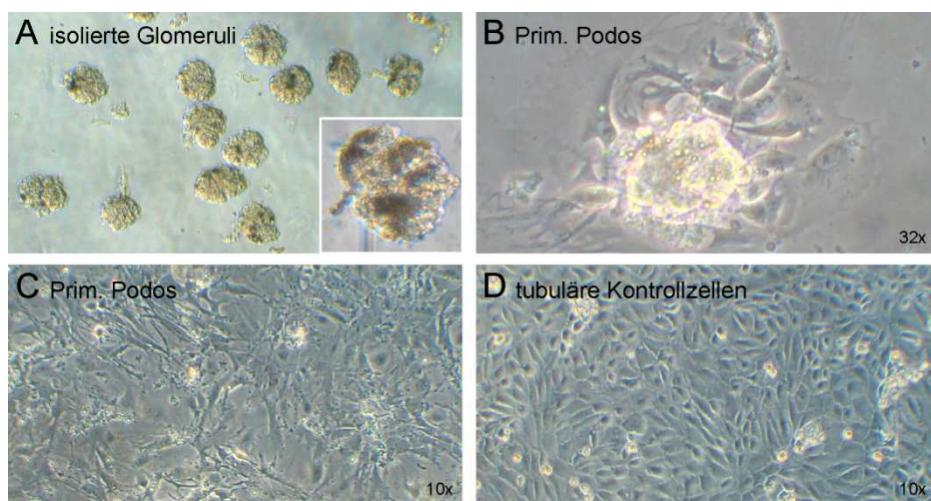
Die Podozyten-spezifischen Smad7-Knockout Mäuse wurden in dieser Arbeit als P-S7 kn Mäuse bezeichnet. Bei den dazugehörigen "Wildtyp" Kontrolltieren handelte es sich um Smad7<sup>flox/flox</sup>-Geschwistertiere. Die zweite verwendete Mauslinie mit dem Podozyten-spezifischen Knockout des TGF- $\beta$  RII wurde P-TR2 kn genannt. Als entsprechende Kontrollmäuse wurden TGF $\beta$ -RII<sup>flox/flox</sup>-Geschwistertiere verwendet.

### 5.1 Etablierung von primären *in vitro* Podozytenkulturen

Als Folge des verwendeten gewebsspezifischen Cre-loxP-Systems sollte der Knockout jeweils nur in den Podozyten der Niere erfolgen. Da die Podozyten nur einen Bruchteil der Zellen in der gesamten Niere ausmachen, war das erste Versuchsvorhaben dieser Arbeit die Etablierung primärer Podozytenkulturen der jeweiligen Mauslinien.

Die primären Zellen sollten daraufhin zum einen der Verifizierung des Knockouts dienen, zum anderen sollten diese die Möglichkeit für weiterführende *in vitro* Analysen bieten, um die Auswirkungen des veränderten TGF- $\beta$  Signalwegs in Podozyten genauer analysieren zu können.

Für die Herstellung der primären Podozyten-Zelllinien wurden die Glomeruli vom restlichen Nierengewebe getrennt. Die Isolierung der Glomeruli erfolgte durch die Perfusion der Nieren mit magnetischen Mikropartikeln. Durch die Embolisation dieser Partikel in den glomerulären Blutkapillaren und dem anschließenden zeitlich definierten Verdau der Nieren konnten die einzelnen Glomeruli durch magnetische Separation isoliert werden. Durch mehrmalige Wiederholung der Waschschrifte und der lichtmikroskopischen Überprüfung des Waschüberstands wurde sichergestellt, dass weitgehend reine Glomeruli-Isolate in Zellkulturgefäße ausgesät und kultiviert wurden (Abb. 7A). Nach 3 – 5-tägiger Inkubation begannen die Podozyten mit der Auswanderung aus dem glomerulären Aggregat und siedelten sich am Boden der Zellkulturgefäße an (Abb. 7B).

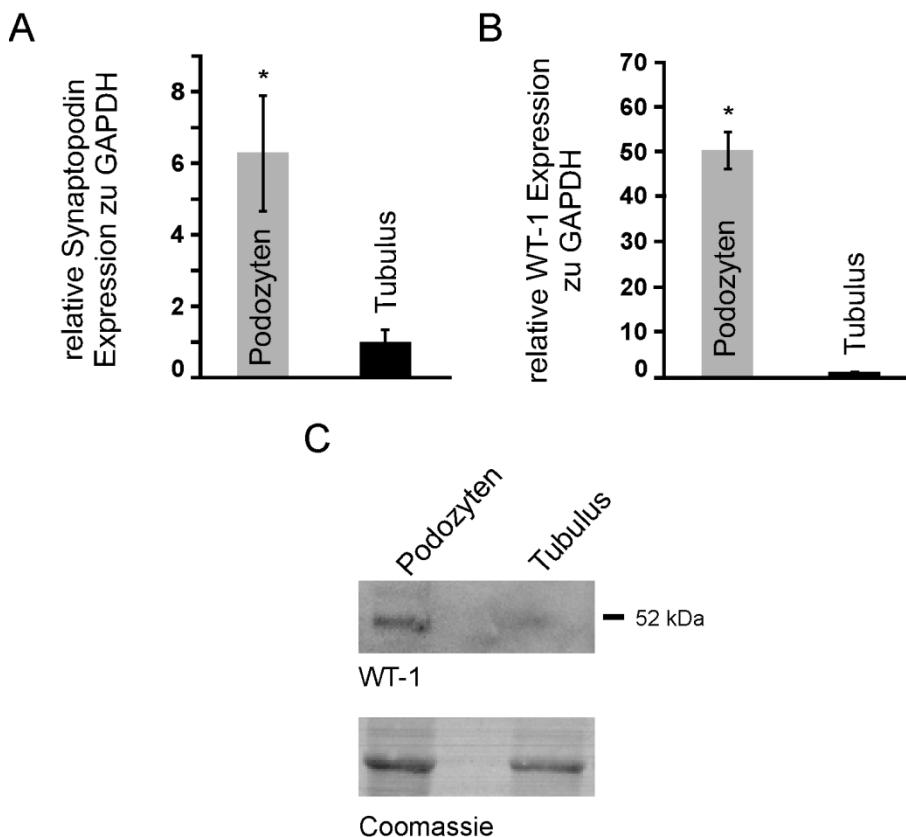


**Abb. 7: Isolierte primäre Podozyten zeigten eine charakteristische längliche und verzweigte Morphologie.**  
 (A) Einzelne isolierte Glomeruli, die weitgehend ohne tubuläre Verunreinigungen ausgesät wurden. Im Inneren der Glomeruli waren deutlich die embolisierten magnetischen Mikropartikel zu erkennen (vergrößerter Ausschnitt).  
 (B) Nach 3-5 Tagen begannen die Podozyten aus dem glomerulären Aggregat auszuwandern. (C) Konfluenter Podozytenrasen mit charakteristisch länglichen und verzweigten Podozyten. (D) Primäre Tubulus-Zellen als Vergleichskontrolle.

Um Kontaminationen mit Fremdzellen zu verringern, erfolgte ein zusätzlicher Siebschritt durch ein 40 µm Zellsieb, der die inneren mesangialen Kerne der Glomeruli von den bereits vereinzelten Podozyten trennen sollte. Nach einer ca. 7-tägigen Inkubation wurde meist ein konfluenter Zellrasen aus primären Zellen in den Kulturgefäßen beobachtet (Abb. 7C).

Um die erhaltenen Zellen als Podozyten zu identifizieren, wurde zuerst das morphologische Erscheinungsbild beurteilt. Die Zellen wiesen eine längliche Form mit vielen radiär vom Zellkörper abzweigenden Zellfortsätzen auf (Abb. 7C), die sich deutlich von den primären Tubulus-Zellen, die aus dem Waschüberstand gewonnen wurden, unterschied. Die Tubulus-Zellen waren rund geformt und zeigten einen stark epithelialen Charakter (Abb. 7D). Demnach konnte für die aus den Glomeruli isolierten primären Zellen eine typische podozytäre Zellmorphologie nachgewiesen werden.

Die molekulare Charakterisierung der primären Zellen erfolgte durch quantitative real time RT-PCRs. Hierbei wurden die Expressionslevel (relativ zur Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) der spezifischen Podozyten-Marker Synaptopodin und WT-1 (Wilms-Tumor-Protein 1) innerhalb der primären Podozyten mit den jeweiligen Expressionslevel der primären Tubulus-Zellen verglichen.



**Abb. 8: Primäre Podozyten exprimierten typische Podozyten-Marker wie Synaptopodin und WT-1.**

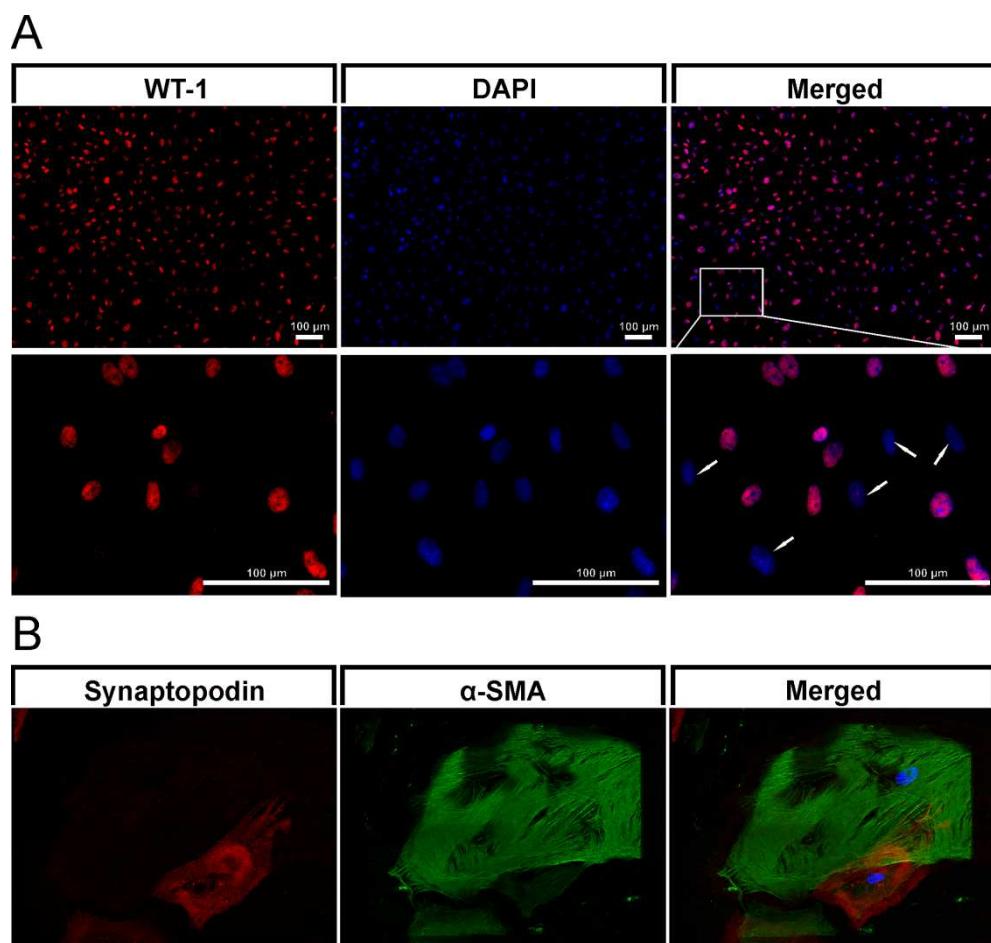
(A, B) Quantitative real time RT-PCR Analysen von Synaptopodin bzw. WT-1 als Podozyten-Marker anhand von RNA/cDNA-Proben aus isolierten primären Podozyten und Tubulus-Zellen als Kontrolle. (C) Western Blot Analysen von WT-1 anhand von Gesamtproteinextrakten. Die Detektion einer spezifischen Bande für WT-1 erfolgte auf einer Höhe von ~52 kDa. Die Coomassie-Färbung diente als Ladungskontrolle. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05.

Diese Charakterisierung der isolierten Zellen zeigte eine starke Expression von Synaptopodin und WT-1 in den primären Podozytenkulturen, während diese Marker in den Kontrollzellen kaum detektierbar waren. Die Bestimmung des Expressionsunterschieds zeigte, verglichen zu den Kontrollen, in primären Podozyten eine ≥ 6-fache Erhöhung der Synaptopodin-Expression (Abb. 8A; PrimPodo:  $6,25 \pm 1,65$ ; Tubulus:  $1 \pm 0,36$ ). Die Analyse der WT-1 Expression ergab bei den primären Podozyten im Vergleich zu den Kontrollen eine mehr als 50-fach erhöhte WT-1 Expressionsrate. (Abb. 8B; PrimPodo:  $50,1 \pm 4,23$ ; Tubulus:  $1 \pm 0,31$ ).

Um Kontaminationen der Primärkulturen mit Endothel-Zellen auszuschließen, wurden die Zellen auf die Expression des Endothel-Markers CD 31 (Cluster of differentiation Faktor 31)

getestet. Diese Analyse ergab weder in den isolierten Podozyten noch in den tubulären Kontrollzellen eine Detektion von CD 31 (Daten nicht gezeigt). Hierdurch erwiesen sich die hergestellten primären Zellen jeweils als Endothelzell-frei.

Die real time RT-PCR Daten konnten anschließend auf Protein-Ebene durch Western Blot Analysen bestätigt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Gesamtprotein-Extrakte aus primären Podozyten eine deutliche und starke Bande für WT-1 auf der Höhe von 52 kDa lieferten, während in den primären Tubulus-Zellen WT-1 kaum detektierbar war (Abb. 8C). Immunhistochemische Analysen zeigten, dass die überwiegende Mehrheit der Zellen ein deutliches WT-1 Fluoreszenz-Signal aufwies (Abb. 9A, oben). Eine spezifische Färbung für diesen Transkriptionsfaktor wurde im Bereich des Zellkerns sichtbar und ermöglichte hierdurch eine eindeutige Identifikation aller WT-1 positiven Zellen als Podozyten.



**Abb. 9: Primäre Zellkulturen zeigten überwiegend WT-1 positive Podozyten mit geringen Verunreinigungen von α-SMA positiven Mesangial-Zellen.**

(A) Immunzytochemische Färbung von WT-1 als Podozyten-Marker an primär angelegten Podozytenkulturen. Es zeigte sich eine deutliche Überzahl an WT-1 positiven Zellen. Die Pfeile der unteren Reihe zeigen WT-1 negative Zellen bei höherer Vergrößerung. (B) Immunzytochemische Färbung von Synaptopodin als Podozyten-Marker und α-SMA als Mesangial-Marker zur genaueren Charakterisierung der Zell-Verunreinigungen.

Bei genauerer Betrachtung wurde jedoch festgestellt, dass nicht alle Zellen eine WT-1 Färbung enthielten. Diese Beobachtung machte deutlich, dass die hergestellten Zellkulturen keine absoluten Reinkulturen darstellten, sondern zu geringen Anteilen Verunreinigungen mit Fremdzellen aufwiesen (Abb. 9A, unten). Da vermutet wurde, dass es sich bei den Kontaminationen um Mesangial-Zellen handelte, sollten diese Zellen anhand von Fluoreszenz-Färbungen mit einem spezifischen Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin; charakteristischer Mesangial-Marker) näher bestimmt werden. Bei dieser Untersuchung diente die Doppelfärbung mit Synaptopodin der Identifikation der Podozyten. Die Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ergab, dass beide Fluoreszenz-Signale (für Synaptopodin und  $\alpha$ -SMA) detektierbar waren. Das entsprechend grüne Signal für  $\alpha$ -SMA fiel allerdings insgesamt deutlich schwächer aus. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass jeweils Synaptopodin-negative Zellen eine Färbung für  $\alpha$ -SMA enthielten und entsprechend umgekehrt (Abb. 9B). Somit konnte festgehalten werden, dass es sich bei den enthaltenen Fremdzellen um geringe Kontaminationen mit Mesangial-Zellen handelte.

Die anschließende Quantifizierung der WT-1/Synaptopodin positiven Zellen im Vergleich zur Gesamzellzahl ergab, dass die hergestellten primären Podozytenkulturen durchschnittlich eine Reinheit von > 86 % aufwiesen.

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass erfolgreich angereicherte primäre Podozytenkulturen etabliert wurden, die sich für weiterführende *in vitro* Experimente eigneten.

## 5.2 Verifizierung des Podozyten-spezifischen Knockouts

Im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung der Podozytenkulturen konnte mit der Analyse der beiden Mauslinien begonnen werden. In einem ersten Schritt sollte der Podozyten-spezifische Knockout der beiden Mauslinien bestätigt werden. Die Untersuchungen hierfür erfolgten auf DNA Ebene sowie auf der Ebene der Gen-Transkription und Protein-Translation.

### 5.2.1 Nachweis der Rekombination innerhalb der Glomeruli-DNA

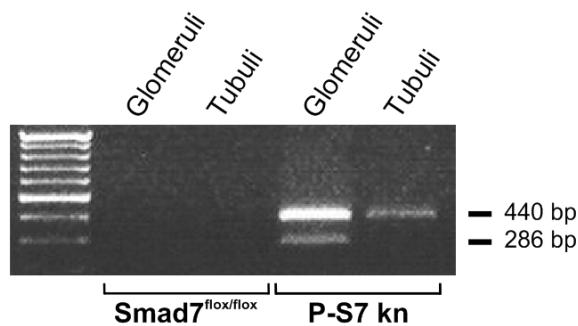
Durch den Einsatz des Cre-loxP-Systems unter Verwendung eines gewebsspezifischen Promotors (Podocin-Promotor) sollte es nur innerhalb der Podozyten zu einer Cre-vermittelten Rekombination kommen. Um dies zu untersuchen, wurden Glomeruli der beiden Mauslinien und der entsprechenden Kontrolltiere für die Gewinnung von genomischer DNA

isoliert. Zusätzlich wurden DNA-Proben von Tubuluszellen hergestellt. Anschließend erfolgte die Analyse der genomischen DNA auf eine erfolgreiche Rekombination mit Hilfe von spezifischen Primern über die Deletions-PCR.

### 5.2.1.1 Detektion der Rekombination in Glomeruli-DNA von P-S7 kn Mäusen

Für den Nachweis der erfolgreichen Rekombination wurden Smad7-Primer verwendet, deren Sequenzen der Erstveröffentlichung der Smad7<sup>fl/fl</sup>-Maus entnommen wurden (Tab. 4) (Kleiter *et al.*, 2010).

Primer und Elongationszeit der Deletions-PCR wurden so gewählt, dass es nur nach der Rekombination der geflochtenen Sequenz zu einer Amplifikation eines 286 bp langen DNA-Fragments kommen sollte. Zusätzlich wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt, um in den transgenen Tieren das Vorhandensein des Podo-Cre-Konstrukts zu bestätigen.



**Abb. 10: Glomeruli-DNA von P-S7 kn Mäusen zeigte eine erfolgreich stattgefundene Rekombination.**

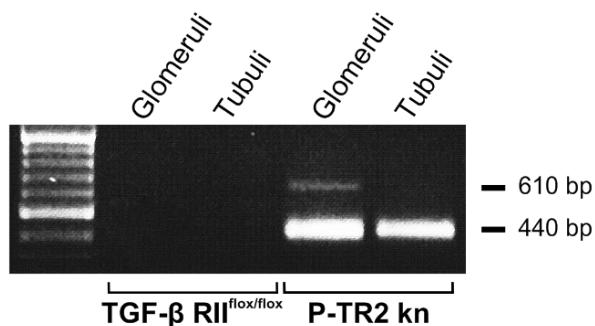
Deletions- und Genotypisierungs-PCR von genomischer DNA aus Glomeruli und Tubulus-Zellen von P-S7 kn und Smad7<sup>fl/fl</sup>-Kontrollmäusen. Nach erfolgreicher Rekombination erhielt man ein Amplikon mit einer Länge von 286 bp. Die Bande auf der Höhe von 440 bp zeigte das enthaltene Podo-Cre Konstrukt.

Das 286 bp lange Amplikon konnte nur in Glomeruli-DNA von P-S7 kn Mäusen detektiert werden (Abb. 10, Spur 4). Die Tubuli-DNA dieser Mäuse wies zwar eine Bande für das vorhandene Podo-Cre-Konstrukt auf, zeigte aber keine Bande für eine erfolgte Rekombination. Glomeruli- und Tubuli-DNA der Smad7<sup>fl/fl</sup>-Kontrollmäuse zeigten in beiden PCRs keine Bande (Abb. 10).

### 5.2.1.2 Detektion der Rekombination in Glomeruli-DNA von P-TR2 kn Mäusen

Eine erfolgreiche Rekombination innerhalb der P-TR2 kn Mäuse sollte ebenfalls mit der PCR-Technik analysiert werden. Durchgeführte Genotypisierungs-PCRs dienten dem Nachweis, dass erst eine zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase zu einer Deletion

führte und dass das alleinige Vorhandensein des Podo-Cre-Konstrukts keinen Effekt verursachte.



**Abb. 11: Glomeruli-DNA von P-TR2 kn Mäusen zeigte eine erfolgreich stattgefunden Rekombination.**

Deletions- und Genotypisierungs-PCR von genomischer DNA aus Glomeruli und Tubulus-Zellen von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>fl/fl</sup>-Kontrollmäusen. Nach erfolgreicher Rekombination erhielt man ein Amplikon mit einer Länge von 610 bp. Die Bande auf der Höhe von 440 bp zeigte das enthaltene Podo-Cre Konstrukt.

Ein 610 bp langes DNA-Fragment konnte nur in der DNA aus Glomeruli der P-TR2 kn Mäuse detektiert werden (Abb. 11, Spur 4) (Baffi *et al.*, 2004). Die Tubuli-DNA dieser Mäuse wies eine Bande für das vorhandene Podo-Cre-Konstrukt auf, zeigte aber keine Deletionsbande. Glomeruli- und Tubuli-DNA der TGF $\beta$ -RII<sup>fl/fl</sup>-Kontrollmäuse zeigten bei beiden PCRs keine Bande (Abb. 11).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es im Bereich der Glomeruli von P-S7 kn und P-TR2 kn Mäusen zu einem Cre-vermittelten Rekombinationsereignis kam. Gleichzeitig wurde bewiesen, dass weder andere Nierenzellen dieser Mäuse noch Glomeruli- oder Tubuli-Zellen der jeweiligen Kontrolltiere eine Deletion aufwiesen.

### 5.2.2 Analyse der mRNA Transkription von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$ RII

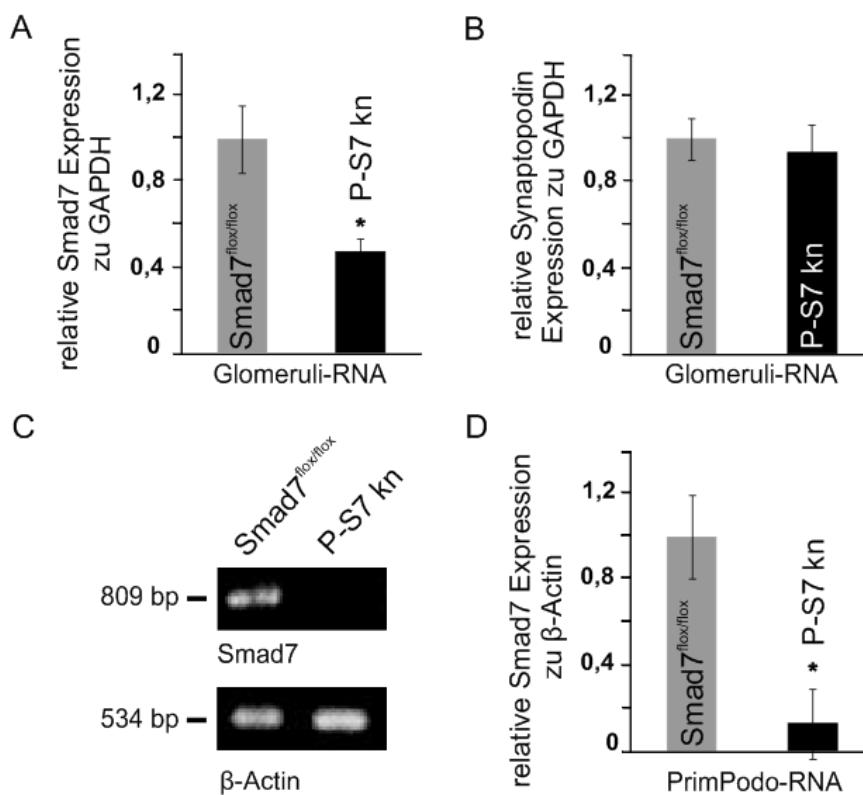
Neben dem genomischen Nachweis der erfolgreichen Rekombination ist eine Analyse des Transkriptoms des Gewebes von besonderem Interesse. Für die Bestätigung eines funktionellen Knockouts war der nächste Schritt der Nachweis, dass die Cre-vermittelte Rekombination tatsächlich zu einer fehlenden Smad7 bzw. TGF- $\beta$  RII mRNA Expression in den Podozyten der beiden Mauslinien führte. Dies wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR oder quantitativer real time RT-PCR untersucht.

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA Proben dienten zum einen isolierte Glomeruli und zum anderen primäre Podozyten aus P-S7 kn, P-TR2 kn und den entsprechenden Kontrollmäusen.

### 5.2.2.1 Reduktion der Smad7 mRNA Expression in P-S7 kn Mäusen

Der Nachweis einer verminderten Smad7 mRNA Expression in P-S7 kn Mäusen wurde an Glomeruli RNA-Proben mit Hilfe von semi-quantitativen RT-PCRs analysiert. Für die Auswertung wurde die Expression von Smad7 relativ zur GAPDH-Expression errechnet. Zusätzlich wurde die relative Expression von Synaptopodin (als Podozyten-Marker) ermittelt, um sicherzustellen, dass Expressionsveränderungen nicht durch Unterschiede der eingesetzten Podozyten-Zahlen verursacht wurden.

Als Folge der Cre-vermittelten Deletion der geflochtenen Smad7 Sequenz konnte eine Reduktion der Smad7 mRNA innerhalb der Glomeruli von P-S7 kn Mäusen um ca. 50 %, im Vergleich zu den Kontrolltieren, detektiert werden ( $\text{Smad7}^{\text{flox/flox}}$ :  $1 \pm 0,16$ , P-S7 kn:  $0,52 \pm 0,06$ ) (Abb. 12A). Die Bestimmung der Expressionslevel von Synaptopodin zeigte keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Glomeruli-Proben aus P-S7 kn bzw. aus Kontrolltieren ( $\text{Smad7}^{\text{flox/flox}}$ :  $1 \pm 0,10$ , P-S7 kn:  $0,94 \pm 0,13$ ) (Abb. 12B). Die Verringerung der Smad7 Expression wurde somit als eine Folge des Podozyten-spezifischen Knockouts gewertet, die nicht durch unterschiedliche Podozyten-Mengen verursacht wurde.

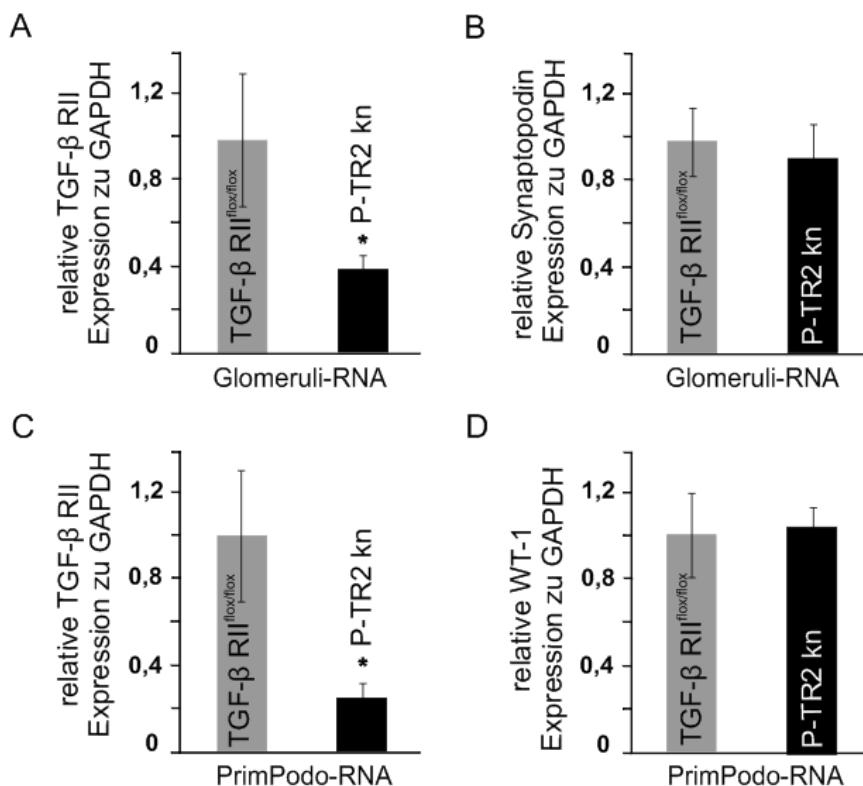


**Abb. 12: Der Podozyten-spezifische Knockout führte zu einer Reduktion der Smad7 Expression.**  
 (A; B) Quantitative real time RT-PCR Analysen von Smad7 (A) und Synaptopodin (B) mit RNA/cDNA aus isolierten Glomeruli von P-S7 kn und Kontrollmäusen. (C) Repräsentative semi-quantitative RT-PCR Analyse von Smad7 mit RNA/cDNA aus primären Podozyten von P-S7 kn und Kontrollmäusen. (D) Densitometrische Auswertung der semi-quantitativen RT-PCR Analysen.  $n \geq 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; \*:  $p < 0,05$ .

Diese q RT-PCR Daten aus Glomeruli konnten durch die Analyse der RNA/cDNA Proben aus primären Podozyten mittels semi-quantitativer RT-PCR bestätigt werden. Mit Hilfe von Smad7 spezifischen Primern sollte hierbei ein 809 bp langes DNA-Fragment amplifiziert werden. Die entsprechende Bande für Smad7 wurde jeweils in primären Podozyten aus Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen detektiert, während P-S7 kn Podozyten kein oder nur ein sehr schwaches Smad7-Signal lieferten (Abb. 12C). Die anschließende densitometrische Auswertung ergab im Vergleich zu Smad7<sup>flox/flox</sup>-Zellen eine Reduktion der Smad7 mRNA Expression innerhalb der primären P-S7 kn Podozyten um ca. 87 % (Abb. 12D).

### 5.2.2.2 Reduktion der TGF- $\beta$ RII mRNA Expression in P-TR2 kn Mäusen

In parallelen Untersuchungen wurden die Expressionslevel des TGF- $\beta$  RII in P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen analysiert, um nachzuweisen, dass die erfolgte Rekombination in P-TR2 kn Glomeruli auf mRNA-Ebene zu einer Reduktion der TGF- $\beta$  RII Expression führte.



**Abb. 13: Der Podozyten-spezifische Knockout führte zu einer Reduktion der TGF- $\beta$  RII Expression.**

(A; B) Quantitative real time RT-PCR Analysen von TGF- $\beta$  RII (A) und Synaptopodin (B) mit RNA/cDNA aus isolierten Glomeruli von P-TR2 kn und Kontrollmäusen. (C; D) Quantitative real time RT-PCR Analysen von TGF- $\beta$  RII (C) und WT-1 (D) mit RNA/cDNA aus primären Podozyten von P-TR2 kn und Kontrollmäusen. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05.

Mittels quantitativer real time RT-PCR wurde gezeigt, dass das Expressionsniveau der TGF- $\beta$  RII mRNA innerhalb der Glomeruli von P-TR2 kn Mäusen im Vergleich zu TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tieren bei nur ca. 40 % lag, (Abb. 13A; TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $1,0 \pm 0,29$ ; P-TR2 kn:  $0,39 \pm 0,09$ ). Die jeweiligen Glomeruli-RNA-Proben wiesen jedoch eine gleiche Expression für Synaptopodin auf (TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $1,0 \pm 0,16$ ; P-TR2 kn:  $0,92 \pm 0,17$ ), wodurch der Einsatz von unterschiedlichen Podozyten-Mengen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 13B).

Anhand der quantitativen real time RT-PCR Analysen der primären Podozyten konnte zusätzlich bestätigt werden, dass es in P-TR2 kn Podozyten zu einer weiteren Reduktion der TGF- $\beta$  RII mRNA kam. In P-TR2 kn Podozyten konnte eine deutliche Reduktion der TGF- $\beta$  RII Expression um ca. 75 % im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert werden (Abb. 13C). Die Analyse der WT-1 Expression ergab wiederum ein gleiches Expressionsniveau (TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $1,0 \pm 0,19$ ; P-TR2 kn:  $1,04 \pm 0,09$ ) und zeigte, dass vergleichbare Mengen an Podozyten eingesetzt wurden (Abb. 13D).

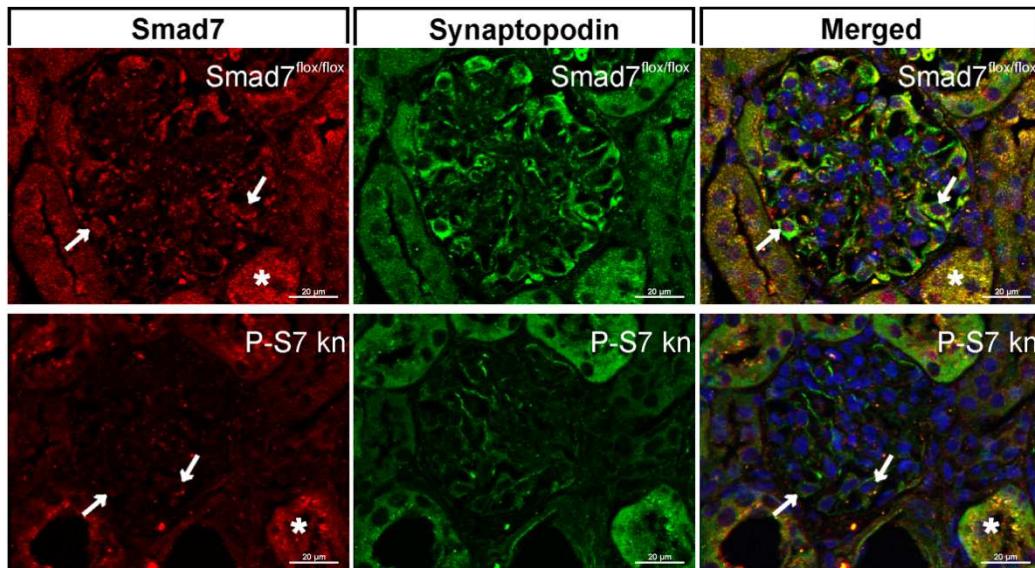
Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die zuvor auf DNA-Ebene bestätigte Deletion der geflochtenen Sequenzen in P-S7 kn und P-TR2 kn Mäusen zu einer verminderten Transkription von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII führte. Außerdem erfolgte die Bestätigung, dass diese reduzierte Expression durch den Knockout innerhalb der Podozyten hervorgerufen wurde.

### 5.2.3 Analyse der Protein-Translation von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$ RII

Der letzte Schritt der Verifizierung des Podozyten-spezifischen Knockouts bestand in der Analyse, ob die bisher nachgewiesenen Veränderungen in den jeweiligen Tieren auch zu einer verminderten Protein-Synthese von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII führten. Dies sollte durch immunhistochemische Färbungen und durch Western Blot Analysen überprüft werden.

#### 5.2.3.1 Reduktion der Smad7 Protein-Expression in P-S7 kn Mäusen

Die Detektion von Smad7 innerhalb der Glomeruli erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen Smad7. Um innerhalb der Glomeruli Fluoreszenz-markierte Proteine den Podozyten zuzuordnen, wurden die Schnitte zusätzlich mit einem spezifischen Antikörper gegen Synaptopodin behandelt.

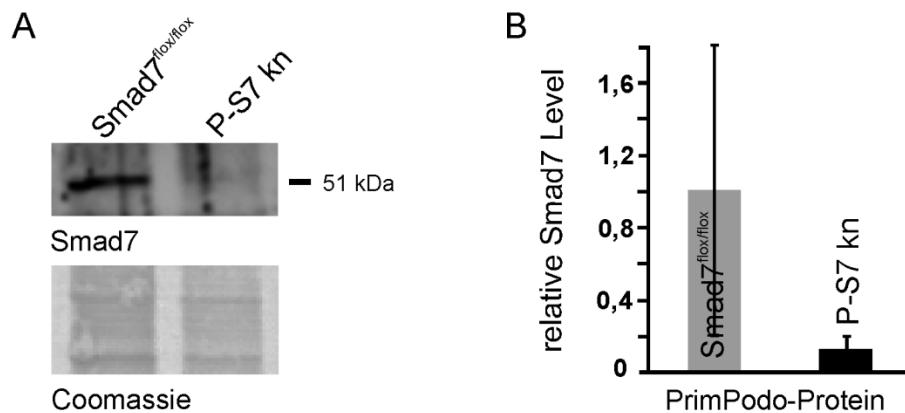


**Abb. 14: Podozyten in P-S7 kn Glomeruli zeigten keine Expression von Smad7.**

Fluoreszenz-Doppelfärbung von Smad7 zusammen mit Synaptopodin an Gefrierschnitten von P-S7 kn und Smad7<sup>fl/fl</sup>-Kontrollnieren. Der Pfeil markiert Podozyten. Der Stern markiert tubuläre Strukturen. Rot: Smad7; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 20 μm.

Die Fluoreszenz-Doppelfärbung der Smad7<sup>fl/fl</sup>-Kontrollnieren zeigte sowohl im Bereich der Glomeruli (Abb. 14, oben) als auch im Bereich des Tubulus-Systems eine deutliche Färbung von Smad7. Eine Fluoreszenz-Markierung konnte dabei im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Durch die Kolokalisation der Smad7- und der Synaptopodin-Färbung konnte die Smad7 Expression innerhalb der Glomeruli vorwiegend in den Podozyten lokalisiert werden. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde anhand von Kontroll-Färbungen überprüft. Die Intensität des Fluoreszenz-Signals für Smad7 fiel innerhalb der Glomeruli von P-S7 kn Tieren deutlich geringer aus (Abb. 14, unten). Es konnte keine Kolokalisation der Smad7- und Synaptopodin-Färbung detektiert werden. Der Podozyten-spezifische Knockout von Smad7 hatte dabei keinen Einfluss auf andere Zelltypen der Niere, da im Tubulus-System vergleichbare Smad7 Färbungen sichtbar waren.

Zusätzlich wurde die Proteinexpression von Smad7 mittels Western Blot Analysen anhand von Gesamtprotein-Extrakten aus primären Podozyten von Smad7<sup>fl/fl</sup>- und P-S7 kn Mäusen untersucht. Proteinproben aus primären Smad7<sup>fl/fl</sup>-Podozyten zeigten eine deutliche und spezifische Smad7 Bande auf einer Höhe von 51 kDa, während P-S7 kn Proteinextrakte sehr schwache bis keine Banden aufwiesen (Abb. 15A). Durch die Coomassie-Färbung der Blots wurde stets eine gleichmäßige Proteinbeladung überprüft.

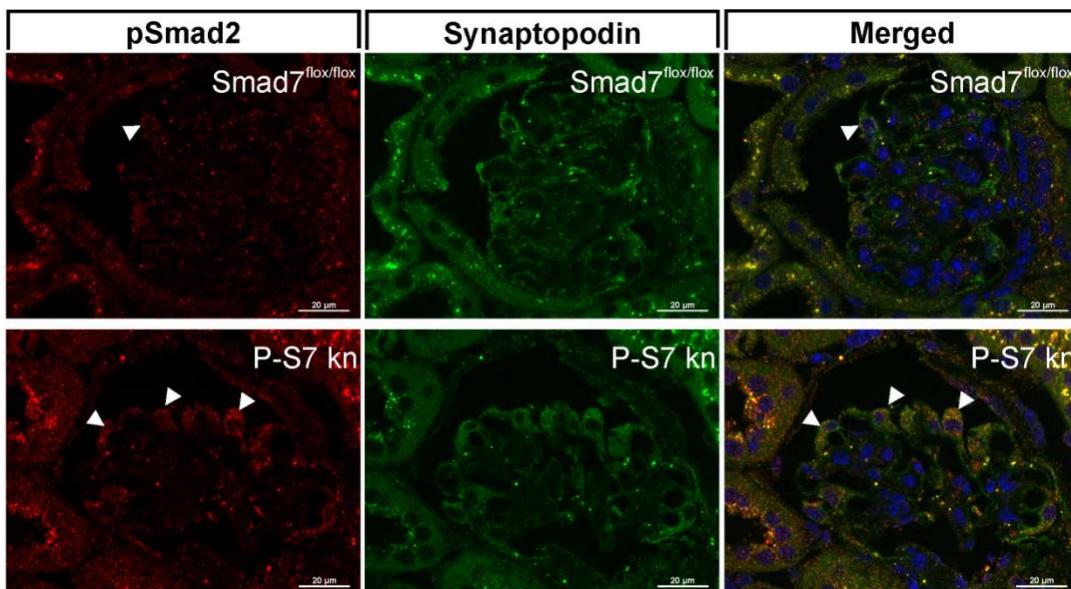


**Abb. 15: Primäre P-S7 kn Podozyten exprimierten kein Smad7.**

(A) Western Blot Analysen von Gesamtprotein-Extrakten aus primären P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>- Podozyten. Eine spezifische Smad7 Bande wurde auf einer Höhe von ~ 51 kDa detektiert. Als Ladungskontrolle diente die Coomassie-Färbung. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen. n≥3; Mittelwert ± SD.

Die densitometrische Auswertung ergab für P-S7 kn Podozyten eine Reduktion von Smad7 um ca. 85 % im Vergleich zu Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollzellen (Abb. 15B). Dieses Ergebnis verifizierte damit die Resultate der Smad7 mRNA Expressionsanalysen.

Durch die vorangegangenen Experimente konnte der konditionelle Knockout von Smad7 bestätigt werden. Als nächstes wurde untersucht, ob eine verringerte Expression von Smad7 sich tatsächlich funktional auf den TGF-β Signalweg auswirkt. Dazu wurde das Phosphorylierungsmuster von Smad2 analysiert, das als charakteristischer Signalvermittler der TGF-β Signaltransduktion gilt.



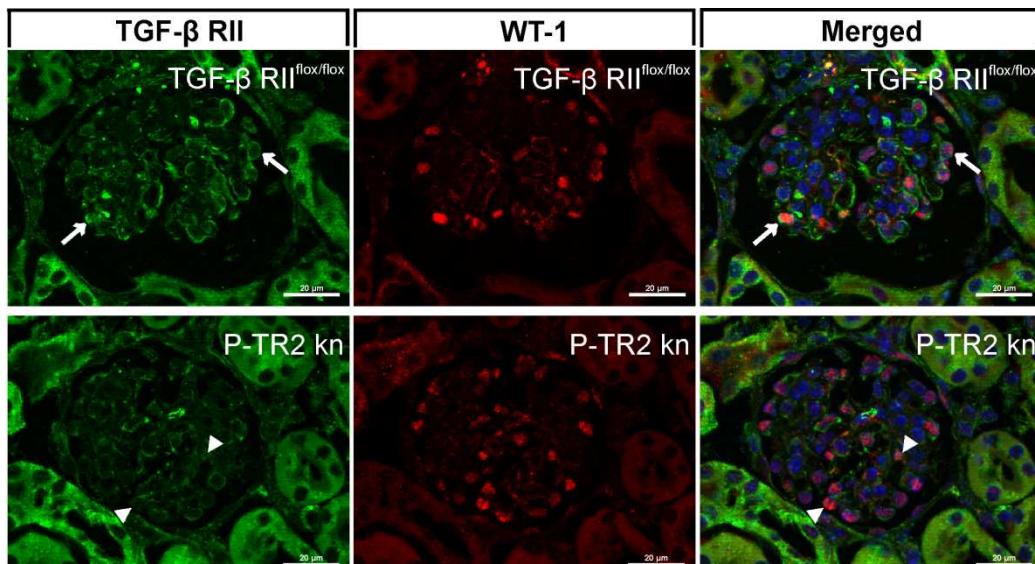
**Abb. 16: Podozyten von P-S7 kn Glomeruli zeigten eine verstärkte Phosphorylierung von Smad2.**

Fluoreszenz-Doppelfärbung von pSmad2 zusammen mit Synaptopodin an Gefrierschnitten von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Die Pfeilspitze markiert pSmad2 positive Podozyten in Smad7<sup>flox/flox</sup>- und P-S7 kn Glomeruli. Rot: pSmad2; Grün: Synaptopodin; blau: DAPI; Messbalken: 20 μm.

Die Fluoreszenz-Färbungen mit einem spezifischen Antikörper gegen pSmad2 zeigte in den P-S7 kn Glomeruli eine deutlich stärkere Färbung für pSmad2 verglichen mit der Färbung in den Glomeruli der Smad7<sup>flox/flox</sup>-Nieren (Abb. 16). Durch die Doppelfärbung mit Synaptopodin konnte die gesteigerte pSmad2 Färbung vor allem innerhalb der Podozyten lokalisiert werden.

### 5.2.3.2 Reduktion der TGF-β RII Protein-Expression in P-TR2 kn Mäusen

Die Verifizierung des Podozyten-spezifischen Knockouts des TGF-β RII auf Protein-Ebene erfolgte ebenso durch immunhistochemische Doppel-Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen den TGF-β RII und WT-1.



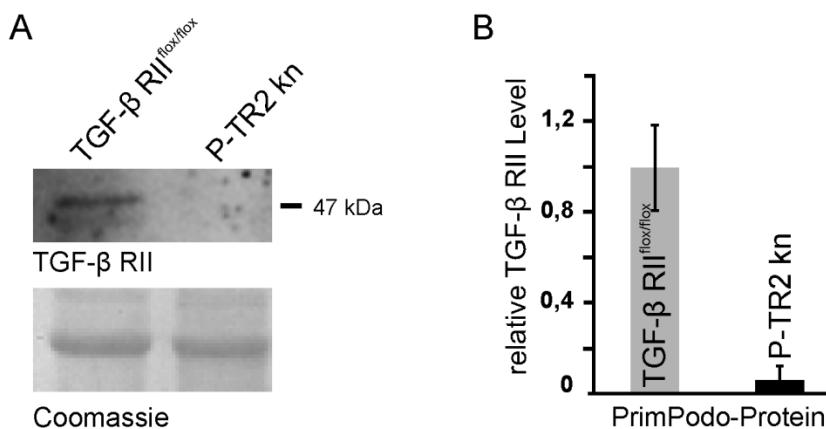
**Abb. 17: Podozyten von P-TR2 kn Glomeruli zeigten keine Expression des TGF-β RII.**

Fluoreszenz-Doppelfärbung von TGF-β RII zusammen mit WT-1 an Gefrierschnitten von P-TR2 kn und TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Der Pfeil markiert TGF-β RII positive Podozyten in TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Glomeruli. Die Pfeilspitze zeigt TGF-β RII negative Podozyten in P-TR2 kn Glomeruli. Grün: TGF-β RII; Rot: WT-1; Blau: DAPI; Messbalken: 20 µm.

TGF-β RII konnte eindeutig innerhalb der Glomeruli von TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren detektiert werden (Abb. 17, oben). Das Fluoreszenz-Signal war dabei als schmaler Streifen um die einzelnen Zellen herum sichtbar. Dies entsprach einer typischen Lokalisation eines Rezeptors innerhalb der Zellmembran (Abb. 17, Pfeil). Für die Bestimmung des Zelltypus wurde in diesem Fall der Podozyten-Marker WT-1 verwendet. Es zeigte sich, dass neben den Podozyten auch Mesangial-Zellen den TGF-β RII exprimierten.

Die Fluoreszenz-Färbung des TGF- $\beta$  RII innerhalb der P-TR2 kn Gewebeschnitte war nur sehr schwach sichtbar (Abb. 17, unten). Lediglich im inneren Bereich der Glomeruli waren WT-1 negative Zellen erkennbar, die eine ringförmige Färbung für TGF- $\beta$  RII aufwiesen. Eine podozytäre Lokalisation konnte demzufolge ausgeschlossen werden und deutete darauf hin, dass es zu keiner Proteinexpression des TGF- $\beta$  RII innerhalb von P-TR2 kn Podozyten kam.

Anhand der nächsten Experimente wurde die Translation von TGF- $\beta$  RII anhand von Western Blot Analysen mit Gesamtprotein-Extrakten aus primären Podozyten untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutlich schwächere Bande für TGF- $\beta$  RII in Protein-Proben von P-TR2 kn Podozyten verglichen mit Proben aus TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollzellen (Abb. 18A). Um eine gleichmäßige Beladung der Gele sicherzustellen, wurden die Blots jeweils mit Coomassie angefärbt. Die Detektion einer Bande erfolgte auf einer Höhe von ca. 47 kDa und entsprach dem Molekulargewicht der C-terminalen intrazellulären Domäne des TGF- $\beta$  RII.

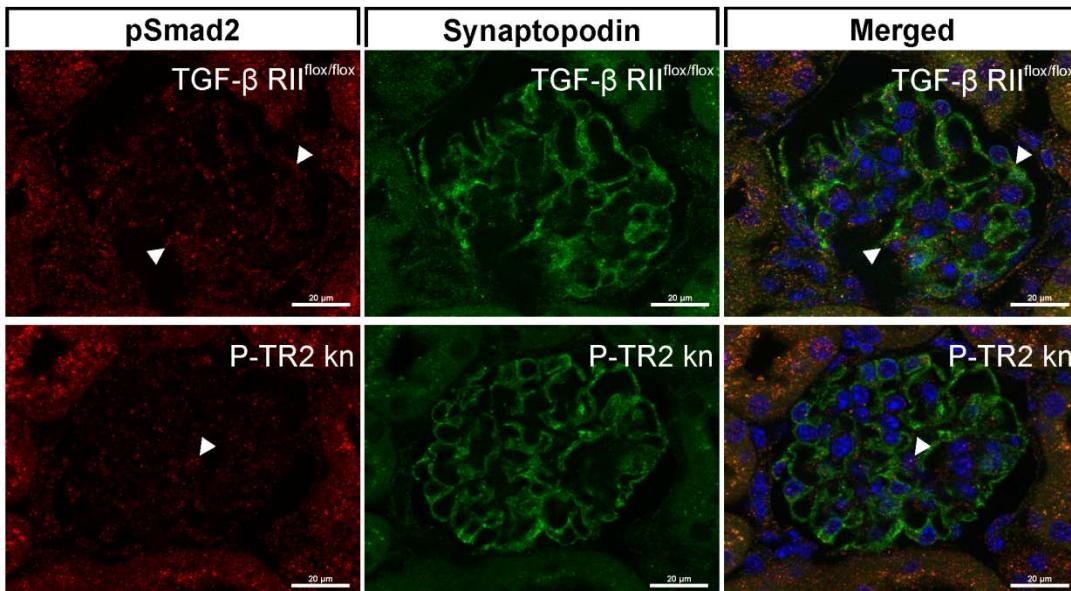


**Abb. 18: Primäre P-TR2 kn Podozyten exprimierten kein TGF- $\beta$  RII.**

(A) Western Blot Analysen von Gesamtprotein-Extrakten aus primären P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Podozytenkulturen. Eine TGF- $\beta$  RII Bande wurde auf einer Höhe von ~ 47 kDa detektiert. Als Ladungskontrolle diente die Coomassie-Färbung. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05

Die densitometrische Auswertung ergab für P-TR2 kn Podozyten eine Reduktion des TGF- $\beta$  RII um ca. 92 % im Vergleich zu TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollzellen (Abb. 18B). Dieses Resultat entsprach auch hier den Ergebnissen der Rezeptor mRNA Expressionsanalysen.

Für den TGF- $\beta$  Signalweg ist es essentiell, dass die TGF- $\beta$  Liganden an den TGF- $\beta$  RII binden. Durch das Ausschalten des TGF- $\beta$  RII kommt es folglich zu einer völligen Inhibition der Signaltransduktionskaskade. Um die Funktionalität des konditionellen Knockouts zu überprüfen, wurde ebenfalls die Phosphorylierung des Signalvermittlers Smad2 analysiert.



**Abb. 19: Podozyten von P-TR2 kn Glomeruli zeigen keine Phosphorylierung von Smad2.**

Fluoreszenz-Doppelfärbung von pSmad2 zusammen mit Synaptopodin an Gefrierschnitten von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Die Pfeilspitze markiert pSmad2 positive Zellen in TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>- und P-TR2 kn Glomeruli. Rot: pSmad2; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 20  $\mu$ m.

In Glomeruli von TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen konnte eine Färbung für pSmad2 detektiert werden (Abb. 19, oben). Die Intensität und Verteilung der Färbung war dabei mit den Färbungen der Smad7<sup>flox/flox</sup>-Gefrierschnitte vergleichbar. Im Gegensatz dazu konnte eine pSmad2-Fluoreszenz in Nierenschnitten von P-TR2 kn Mäusen kaum gesichtet werden. Anhand der Markierung der Podozyten mit Synaptopodin konnte aufgezeigt werden, dass es zu keiner Detektion einer pSmad2 Fluoreszenz innerhalb von P-TR2 kn Podozyten kam (Abb. 19, unten). Die Spezifität des Signals wurde erneut mit Hilfe von Kontrollfärbungen getestet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es in beiden Mausmodellen auch auf Proteinebene zu einem Knockout von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII kam. Zusätzlich wurde aufgezeigt, dass sich der Knockout auf molekularer Ebene funktionell auf das Signalmoleköl Smad2 auswirkte. P-S7 kn Mäusen wiesen eine gesteigerte Phosphorylierung von Smad2 auf, während in P-TR2 kn Mäusen kein pSmad2 in Podozyten beobachtet werden konnte.

## 5.3 Phänotyp-Analysen der Podozyten-spezifischen Knockout Modelle

Nach der Bestätigung des funktionellen Podozyten-spezifischen Knockouts wurde im nächsten Schritt die Phänotyp-Analyse der Mausnieren und deren Glomeruli vorgenommen. Der Fokus der Phänotyp-Analysen lag dabei auf der Untersuchung möglicher Effekte des podozytären Knockouts auf die allgemeine Glomerulogenese und Nierenmorphologie sowie auf die Differenzierung und Polarität der Podozyten.

### 5.3.1 Auswirkungen des Podozyten-spezifischen Knockouts auf die Glomerulogenese und allgemeine Nierenmorphologie

Die funktionell wichtige Rolle der verschiedenen Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie bei der Nierenentwicklung ist zum Teil bekannt. Die Auswirkung der einzelnen Komponenten auf die speziellen Zelltypen innerhalb der Glomeruli wird stark diskutiert. Die in dieser Arbeit generierten Mausmodelle boten erstmals die Möglichkeit, die Rolle des TGF- $\beta$  Signalwegs für die Podozyten *in vivo* zu untersuchen. Aus diesem Grund standen bei den ersten phänotypischen Analysen die generelle Nierenmorphologie und die Anzahl der Nephrene im Vordergrund.

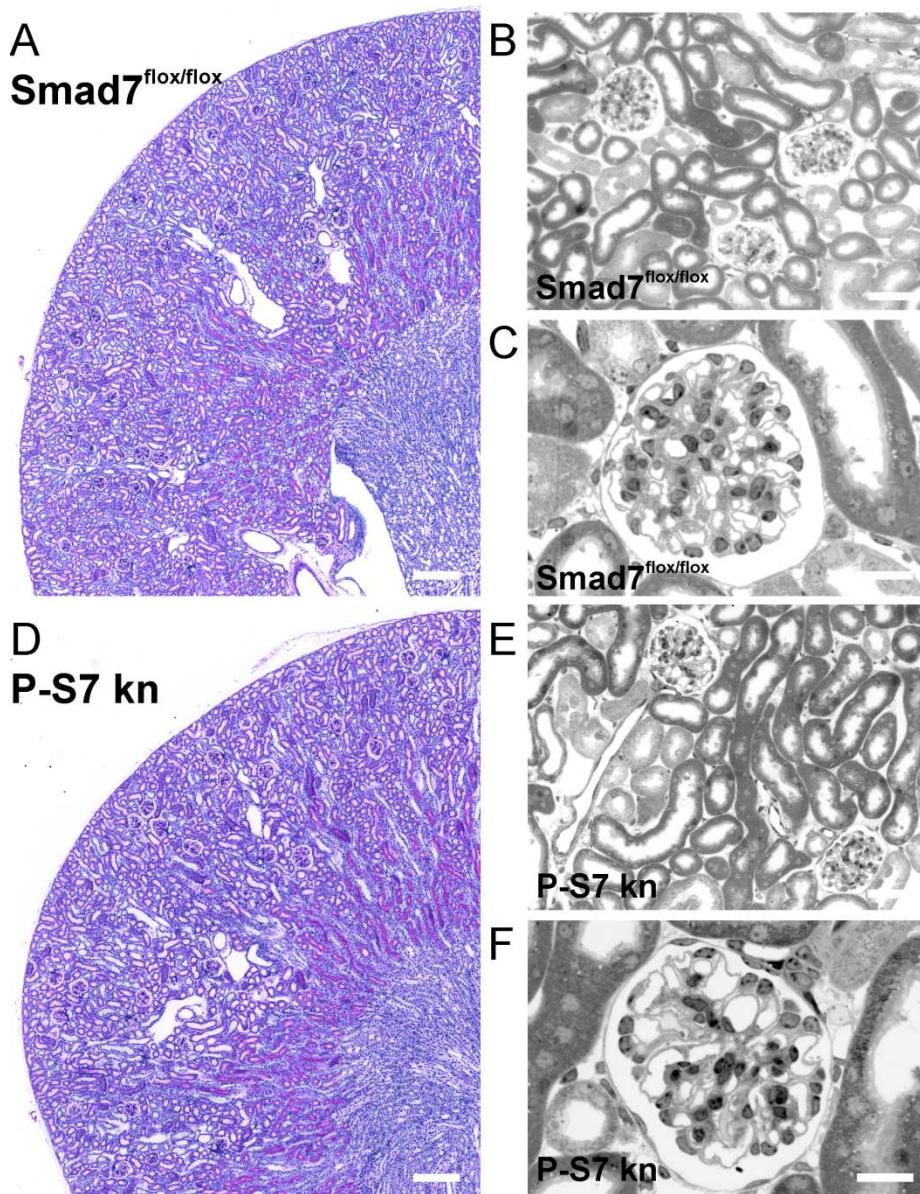
Die Beurteilung der Morphologie der Nieren erfolgte durch die lichtmikroskopische Betrachtung des Nierengewebes von adulten Mäusen, um den Status einer vollständig entwickelten Niere zu analysieren.

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte durch die Bestimmung der Glomeruli-Anzahl sowie die Vermessung der glomerulären Gesamtfläche und die Vermessung der Nierenfläche eines Transversalschnitts. Außerdem wurde das Gewicht der fixierten Nieren mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt.

#### 5.3.1.1 P-S7 kn Mäuse wiesen keine atypische Glomerulogenese oder Veränderungen der allgemeinen Nierenmorphologie auf

Die makroskopische Betrachtung der Nieren der P-S7 kn Mäuse zeigte keinerlei Auffälligkeiten in Form und Größe dieser Organe im Vergleich zu Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Dies wurde auch durch die Bestimmung des Nierengewichts nach Perfusionsfixierung bestätigt. Hierbei zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen dem durchschnittlichen Gewicht der P-S7 kn Nieren ( $218,83 \pm 50,36$  mg) und dem Gewicht der Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren ( $219,53 \pm 42,45$  mg) (Tab. 24).

Die lichtmikroskopische Betrachtung des Nierengewebes an transversalen, PAS-gefärbten Nierenschnitten von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen ergab keinerlei gewebspezifische Auffälligkeiten. Die Nieren von P-S7 kn Mäusen ließen einen normalen inneren Aufbau, bestehend aus Nierenrinde, Nierenmark, Nierenkelch und Nierenbecken erkennen und entsprachen damit exakt dem Aufbau der Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren (Abb. 20 A, D).



**Abb. 20: P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten eine vergleichbare und normale Nierenmorphologie.**

Übersichtsaufnahme von PAS gefärbten Transversalschnitten der Niere von adulten (Alter: 2 Monate) Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen (A) und P-S7 kn Mäusen (D). Lichtmikroskopische Aufnahmen von Richardson gefärbten Semidünnsschnitten von Kontrolltieren in höherer Vergrößerung (B) und P-S7 kn Mäusen (E) sowie entsprechend einzelne Glomeruli-Aufnahmen der beiden Mäuse (C, F).

Nach lichtmikroskopischer Betrachtung konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Nieren beobachtet werden. Messbalken: A, D = 200 µm; B, E = 50 µm; C, F = 20 µm

Auch bei höherer Vergrößerung wurden keine weiteren Veränderungen festgestellt. Weder das Tubulus-System noch die Glomeruli der P-S7 kn Niere schienen durch den Podozyten-spezifischen Knockout beeinflusst zu werden (Abb. 20B, C). Die Glomeruli wiesen alle wichtigen Zelltypen auf, bildeten einen Kapillarkonvolut sowie das Lumen des Harnraums und wurden von der Bowman-Kapsel umgeben (Abb. 20E, F).

Zur genaueren histologischen Auswertung wurde zunächst die Gesamtfläche eines Transversalschnitts der Niere ermittelt. Die Vermessung ergab, dass die Nieren der P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse jeweils vergleichbare Nierenflächen aufwiesen (P-S7 kn:  $17,08 \pm 0,84 \text{ mm}^2$ ; Smad7<sup>flox/flox</sup>:  $17,38 \pm 3,16 \text{ mm}^2$ ) (Tab. 24).

	Smad7 <sup>flox/flox</sup>	P-S7 kn
Glomeruli Anzahl	$114 \pm 13$	$102 \pm 16$
Glomeruläre Gesamtfläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	$2601,32 \pm 309,48$	$2565,00 \pm 106,24$
Nierenfläche [ $\text{mm}^2$ ]	$17,38 \pm 3,16$	$17,08 \pm 0,84$
Nierengewicht [mg]	$219,53 \pm 42,45$	$218,83 \pm 50,36$

**Tab. 24: P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten vergleichbare morphologische Nieren-Parameter.**

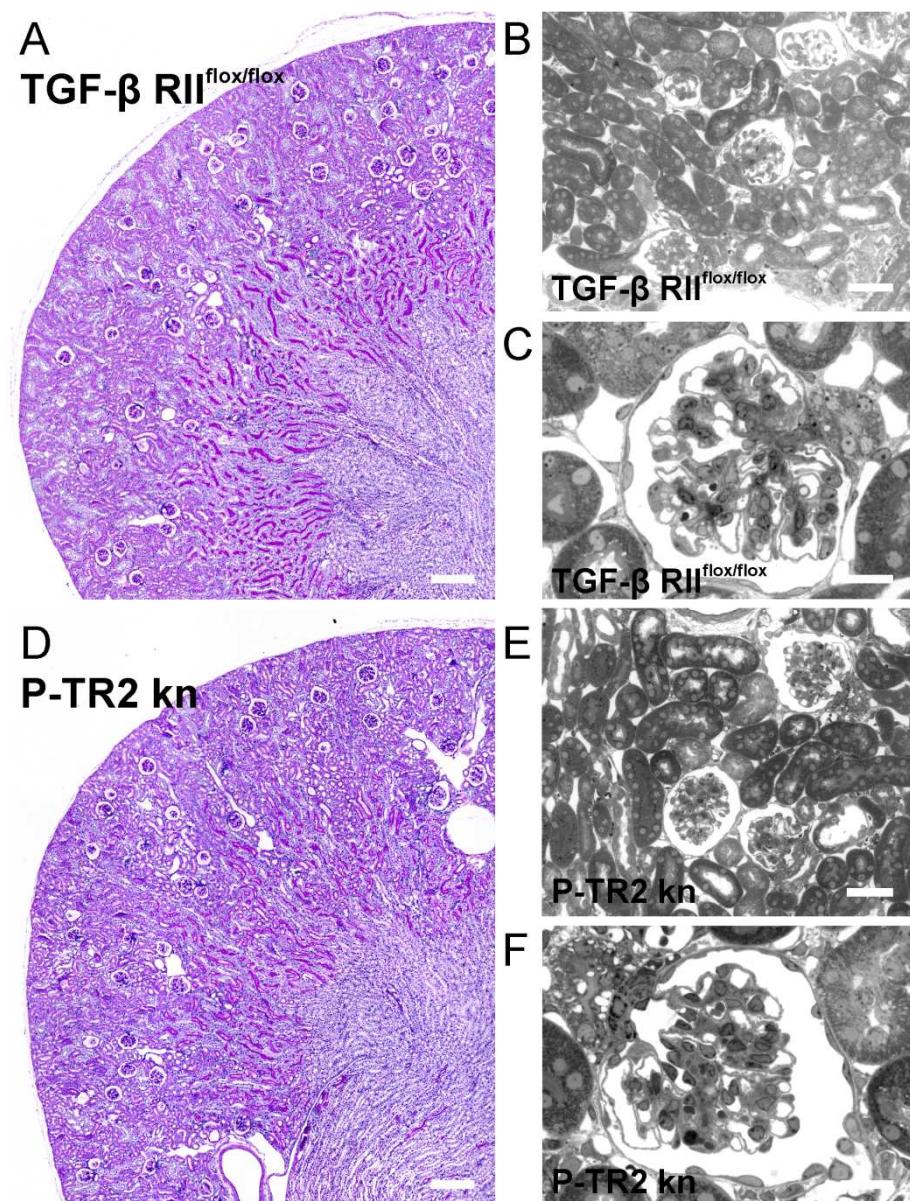
Die Auswertung erfolgte an PAS-gefärbten Transversalschnitten durch Zählung der einzelnen Glomeruli, Vermessung der glomerulären Einheit (Kapillarknäuel ohne Harnraum) sowie die Bestimmung der Nierenfläche eines Transversalschnitts und des Gewichts der Nieren. n≥3; Mittelwert ± SD.

Um einen Einfluss des Knockouts auf die generelle Anlage der Glomeruli während der Entwicklung zu untersuchen, wurde die Anzahl der Glomeruli pro Nierenschnitt bestimmt. Die Quantifizierung ergab, dass in P-S7 kn Mäusen durchschnittlich  $102 \pm 16$  Glomeruli pro Gewebeschnitt gebildet wurden. Dabei konnte kein statistisch relevanter Unterschied zu Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollen festgestellt werden, die eine durchschnittliche Glomeruli-Anzahl von  $114 \pm 13$  aufwiesen (Tab. 24).

Als letztes wurde untersucht, ob der Podozyten-spezifische Smad7-Knockout zu Veränderungen in der funktionellen Einheit des Glomerulus führte, ohne dabei direkte Auswirkungen auf die Gesamtzahl der Glomeruli zu haben. Hierfür wurde die Gesamtfläche der einzelnen Glomeruli vermessen. Dabei konnte festgehalten werden, dass P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse vergleichbare Glomeruli-Flächen aufwiesen. Die glomeruläre Gesamtfläche der P-S7 kn Nierenschnitte betrug durchschnittlich  $2565,00 \pm 106,24 \mu\text{m}^2$ , während in Smad7<sup>flox/flox</sup>-Schnitten eine glomeruläre Fläche von  $2601,32 \pm 309,48 \mu\text{m}^2$  gemessen wurde (Tab. 24).

### 5.3.1.2 P-TR2 kn Mäuse wiesen keine atypische Glomerulogenese oder Veränderungen der allgemeinen Nierenmorphologie auf

Die Nieren von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen wurden ebenfalls nach den oben genannten Kriterien beurteilt. Auch in diesem Fall wurden keine offensichtlichen Veränderungen bezüglich des Aussehens, der Form und der Größe der Nieren aus P-TR2 kn Mäusen im Vergleich zu den TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Nieren festgestellt.



**Abb. 21:** P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten eine vergleichbare und normale Nierenmorphologie. Übersichtsaufnahme von PAS gefärbten Transversalschnitten der Niere von adulten (Alter: 3 Monate) TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen (A) und P-TR2 kn Mäusen (D). Lichtmikroskopische Aufnahmen von Richardson gefärbten Semidünnschnitten von Kontrolltieren in höherer Vergrößerung (B) und P-TR2 kn Mäusen (E) sowie entsprechend einzelne Glomeruli Aufnahmen der beiden Mäuse (C, F). Nach lichtmikroskopischer Betrachtung konnten auch hier keine morphologischen Unterschiede zwischen P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Nieren beobachtet werden. Messbalken: A, D = 200  $\mu$ m; B, E = 50  $\mu$ m; C, F = 20  $\mu$ m.

Dieses Ergebnis spiegelte auch die Bestimmung des Nierengewichts wider. Während P-TR2 kn Nieren ein Gewicht von  $211,93 \pm 14,29$  mg besaßen, wurde bei TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollen ein Nierengewicht von  $207,85 \pm 22,14$  mg gemessen (Tab. 25).

Die Übersichtsbilder der Nieren von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen wiesen beide eine normal entwickelte Morphologie auf (Abb. 21A, D). Es kam zu einem normal entwickelten Tubulus-System und auch die Betrachtung der Glomeruli bei höherer Vergrößerung ergab keine besonderen Auffälligkeiten (Abb. 21B, E und C, F).

	TGF- $\beta$ RII <sup>flox/flox</sup>	P-TR2 kn
Glomeruli Anzahl	$128 \pm 15$	$129 \pm 18$
Glomeruläre Gesamtfläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	$2519,83 \pm 157,94$	$2743,46 \pm 124,40$
Nierenfläche [ $\text{mm}^2$ ]	$16,77 \pm 0,82$	$18,67 \pm 3,70$
Nierengewicht [mg]	$207,85 \pm 22,14$	$211,93 \pm 14,29$

**Tab. 25: P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten vergleichbare morphologische Nieren-Parameter.**  
Die Auswertung erfolgte an PAS-gefärbten Transversalschnitten durch Zählung der einzelnen Glomeruli, Vermessung der glomerulären Einheit (Kapillarknäuel ohne Harnraum) sowie die Bestimmung der Nierenfläche eines Transversalschnitts und des Gewichts der Nieren. n≥3; Mittelwert ± SD.

Diese Beobachtungen wurden anschließend durch die histologischen Auswertungen verifiziert. In den Nieren von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen wurden jeweils vergleichbare Glomeruli-Anzahlen ermittelt (P-TR2 kn:  $129 \pm 18$ ; TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $128 \pm 15$ ). Des Weiteren wurden keine statistisch relevanten Unterschiede im Ausmaß der Nierengesamtfläche (P-TR2 kn:  $18,67 \pm 3,70 \text{ mm}^2$ , TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $16,77 \pm 0,82 \text{ mm}^2$ ) oder der glomerulären Gesamtfläche eines Nierenschnitts (P-TR2 kn:  $2743,46 \pm 124,40 \mu\text{m}^2$ , TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $2519,83 \pm 157,94 \mu\text{m}^2$ ) festgestellt (Tab. 25).

### 5.3.2 Auswirkungen des Knockouts auf die Entwicklung/Differenzierung der Podozyten

Da die bisherigen Ergebnisse keinen Einfluss auf die allgemeine Nierenentwicklung und generelle Glomerulogenese zeigten, wurde als Nächstes der Fokus auf die genaue Analyse der Podozyten-Morphologie gelegt.

Die Literatur liefert Hinweise darauf, dass der TGF- $\beta$  Signalweg an Ausdifferenzierungsprozessen der Podozyten beteiligt ist, indem TGF- $\beta$  einen Wachstumsstopp induziert (Wu *et al.*, 2005). Da es sich bei den Podozyten um epitheliale Zellen handelt, konnte weiter spekuliert werden, ob TGF- $\beta$  eine Rolle bei der Ausbildung der starken Polarität dieser Zellen

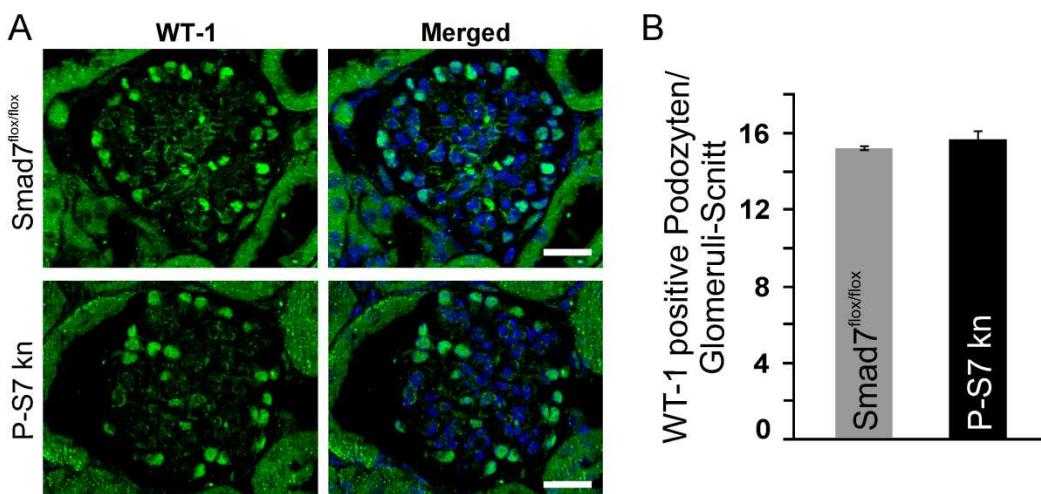
spielte, wie sie von Ozdamar *et al.* an epithelialen HEK-293 Zellen beschrieben wurde (Ozdamar *et al.*, 2005).

Demzufolge boten die beiden in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle erstmals die Möglichkeit, Aufschluss darüber zu erhalten, ob bzw. inwieweit der TGF- $\beta$  Signalweg an den Entwicklungsprozessen der Podozyten im lebenden Organismus beteiligt ist.

### 5.3.2.1 Der Podozyten-spezifische Knockout von Smad7 hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung und Polarität der Podozyten

Um einen Einfluss des Smad7-Knockouts auf die Anlage der Podozyten zu untersuchen, wurde die Podozyten-Anzahl ermittelt. Diese erfolgte durch immunhistochemische Färbungen des Transkriptionsfaktors WT-1 an Gefrierschnitten der Nieren von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen.

Die Betrachtung der Fluoreszenz-Färbungen zeigte ein deutliches und spezifisches Signal für WT-1, das ausschließlich im Zellkern von Podozyten vorlag und somit eine genaue Quantifizierung dieser Zellen innerhalb der Glomeruli ermöglichte (Abb. 22A).

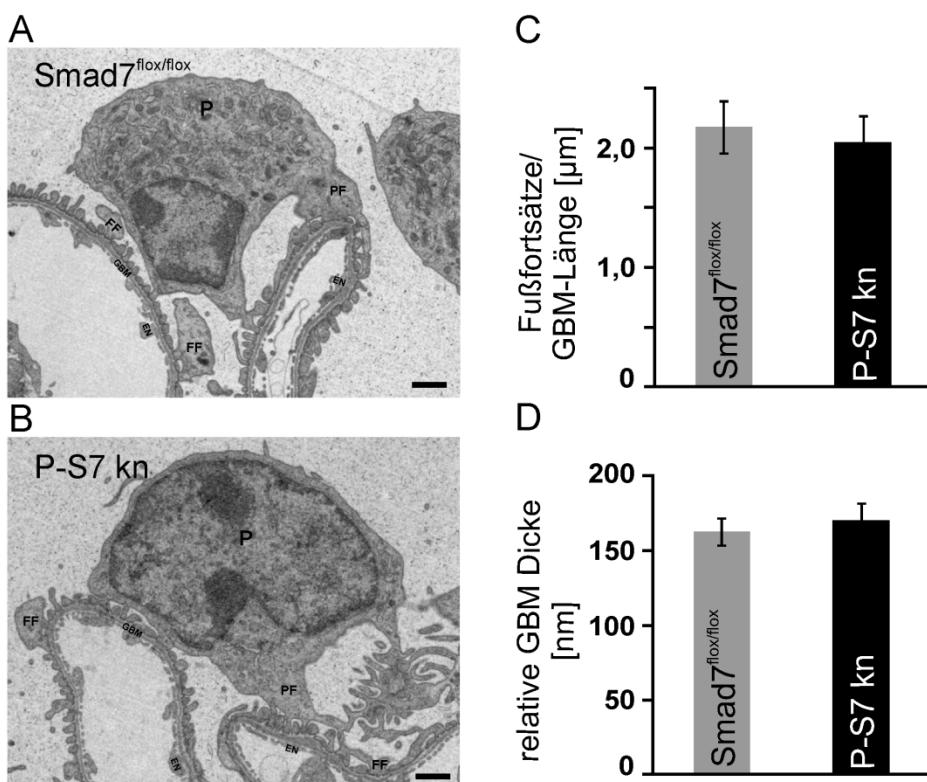


**Abb. 22: P-S7 kn Mäuse zeigten die gleiche Anzahl WT-1 positiver Podozyten pro Glomeruli.**  
(A) Fluoreszenz-Färbung von WT-1 an Gefrierschnitten von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Grün: WT-1; Blau: DAPI. (B) Quantifizierung der WT-1 positiven Podozyten pro Glomeruli innerhalb eines transversalen Nierenschnitts. n≥3; Mittelwert ± SD; Messbalken: 20 µm.

Durch das Auszählen der WT-1 positiven Podozyten konnte gezeigt werden, dass der Podozyten-spezifische Knockout von Smad7 keinen Einfluss auf die Anzahl der Podozyten besaß (Abb. 22B). Innerhalb eines transversalen Nierenschnitts von P-S7 kn Mäusen befanden sich im Durchschnitt  $15,68 \pm 0,50$  Podozyten pro Glomerulus. Dies entsprach genau der Anzahl der Podozyten, die in den Glomeruli von Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen gebildet wurden ( $15,24 \pm 0,13$ ).

Anschließend wurden die Glomeruli von P-S7 kn Mäusen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) beurteilt und mit dem podozytären Erscheinungsbild der Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollen verglichen. Dabei konnte festgehalten werden, dass weder offensichtliche zell-morphologische Unterschiede auftraten noch gravierende Entwicklungsstörungen der Podozyten innerhalb der Glomeruli detektiert wurden. Die Podozyten der P-S7 kn Tiere zeigten, genau wie Kontroll-Podozyten, einen in den Harnraum ragenden Zellkörper sowie primäre Fortsätze, die sich weiter in stark verzweigte und ineinander verzahnte Fußfortsätze aufteilten (Abb. 23A, B). Bei höheren Vergrößerungen waren die Schlitzmembranen zwischen den einzelnen Fußfortsätzen zu erkennen. Auch hier wurden keine besonderen Veränderungen in P-S7 kn Glomeruli im Vergleich zu Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollen detektiert.

Um diese Beobachtungen zu quantifizieren, wurden die TEM-Bilder durch die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz (Anzahl der Fußfortsätze pro GBM-Länge) und die Vermessung der relativen Dicken der glomerulären Basalmembran (GBM) ausgewertet.



**Abb. 23: P-S7 kn Mäuse zeigten die gleiche Podozyten-Morphologie und GBM-Beschaffenheit.**

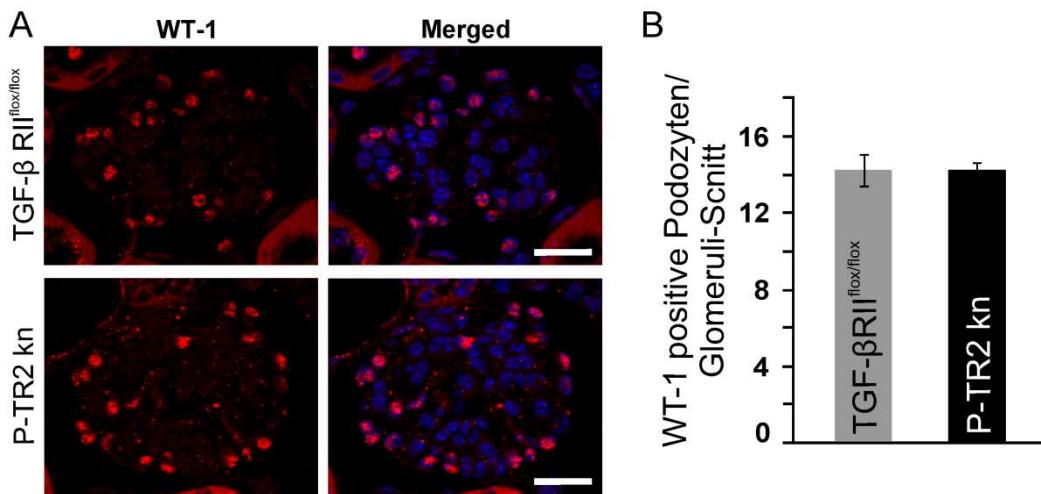
Analysiert wurden PS7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren im Alter von 2 Monaten. (A, B) Ausschnitt einer TEM-Aufnahme des Glomerulus. FF: Fußfortsatz; PF: Primärfortsatz; GBM: Glomeruläre Basalmembran; EN: fenestrierte Endothel-Zelle. (C, D) Histologische Auswertung durch Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz (C) und Vermessung der relativen GBM Dicke (D). n≥3; Mittelwert ± SD; Messbalken: 1000 nm.

Die Frequenz Bestimmung der Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäuse ergab, dass durchschnittlich  $2,22 \pm 0,22$  Fußfortsätze pro 1 µm GBM detektiert wurden, während P-S7 kn Mäuse eine Frequenz von  $2,04 \pm 0,07 \frac{1}{\mu m}$  aufwiesen (Abb. 23C). Obwohl hierbei keine signifikanten Unterschiede detektiert wurden, konnte dennoch eine leichte Verschlechterung der Fußfortsatz-Organisation in P-S7 kn Mäusen ermittelt werden.

Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Vermessung der relativen GBM-Dicke. Es kam zu einer geringfügigen Verdickung der GBM in P-S7 kn Mäusen im Vergleich zu Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen. Die relative Höhe der GBM von Knockout-Tieren betrug  $170,75 \pm 11,51$  nm. Damit wiesen die PS7 kn Mäuse tendenziell dickere GBMs auf, dessen Unterschiede zur relativen Dicke der GBM von Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen ( $163,05 \pm 9,11$  nm) aber keine Signifikanz aufzeigte (Abb. 23D).

### 5.3.2.2 Der Podozyten-spezifische Knockout von TGF-β RII hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung und Polarität der Podozyten

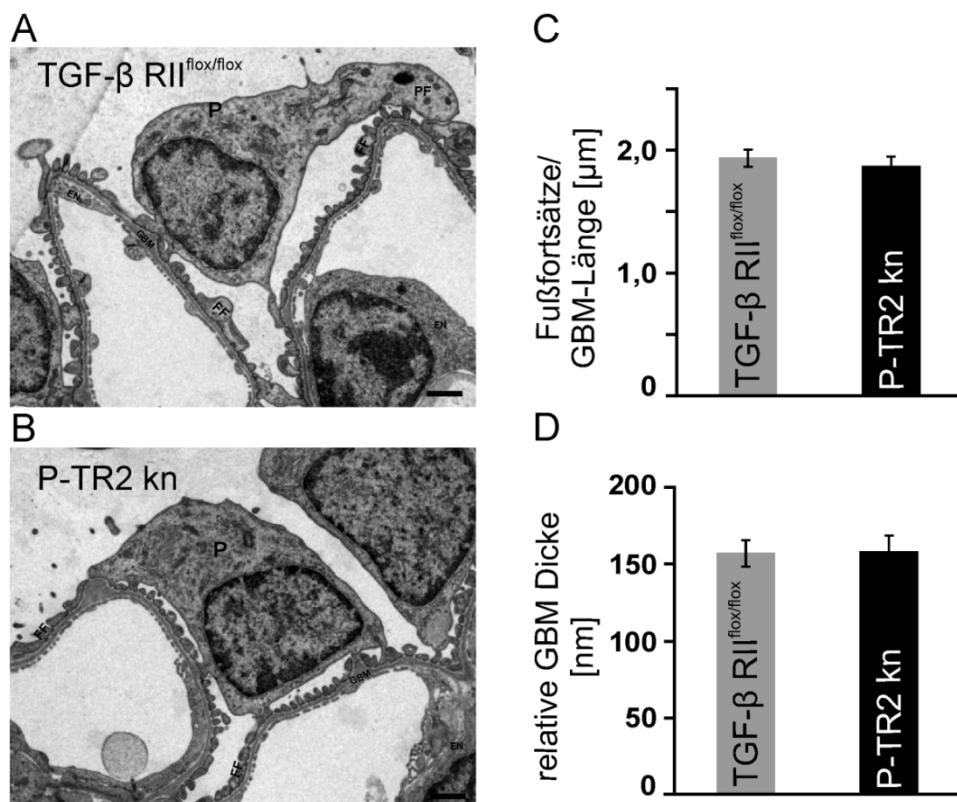
Um die Auswirkungen einer Blockade der TGF-β Signaltransduktion innerhalb von Podozyten zu untersuchen, wurde die Anzahl der sich entwickelnden Podozyten in P-TR2 kn Glomeruli mit der Anzahl in TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Glomeruli verglichen.



**Abb. 24:** P-TR2 kn Mäuse zeigten die gleiche Anzahl WT-1 positiver Podozyten pro Glomeruli.  
 (A) Immunhistochemische Färbung von WT-1 an Kryoschnitten von P-TR2 kn und TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Rot: WT-1; Blau: DAPI. (B) Quantifizierung der WT-1 positiven Podozyten pro Glomeruli innerhalb eines transversalen Nierenschnitts. n≥3; Mittelwert ± SD; Messbalken: 20 µm.

Durch das Auszählen der WT-1 positiven Podozyten (Abb. 24A) konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor-Knockout keine Auswirkungen auf die Anlage der Podozyten hatte. Glomeruli aus P-TR2 kn Tieren wiesen eine Podozyten-Zahl von  $14,35 \pm 0,39$  auf und spiegelten damit genau die Anzahl der Podozyten von TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollen mit einem Wert von  $14,35 \pm 0,81$  wider (Abb. 24B).

Die ultrastrukturelle Betrachtung der P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Glomeruli ergab, dass es auch in dieser Mauslinie zu keinen auffälligen morphologischen Veränderungen der Podozyten kam. In den Glomeruli der P-TR2 kn Tiere wurden normal entwickelte Podozyten beobachtet, die dem Erscheinungsbild der Podozyten bei TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen entsprachen. Ebenso bildeten P-TR2 kn genau wie TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Podozyten primäre Zellfortsätze und die charakteristischen Fußfortsätze (Abb. 25A, B). Bei höherer Vergrößerung waren die Schlitzmembranen zwischen den einzelnen Fußfortsätzen deutlich zu erkennen und wiesen keine auffälligen Besonderheiten auf.



**Abb. 25: P-TR2 kn Mäuse zeigten die gleiche Podozyten-Morphologie und GBM-Beschaffenheit.**

Analysiert wurden PTR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren im Alter von 3 Monaten. (A, B) Ausschnitt einer TEM-Aufnahme des Glomerulus. FF: Fußfortsatz; PF: Primärfortsatz; GBM: Glomeruläre Basalmembran; EN: fenestrierte Endothel-Zelle. (C, D) Histologische Auswertung durch Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz (C) und Vermessung der relativen GBM Dicke (D). n≥3; Mittelwert ± SD; Messbalken: 1000 nm.

Die Quantifizierung zeigte, dass der Knockout des TGF- $\beta$  RII keine strukturellen Auswirkungen auf die Fußfortsätze besaß. Die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz der P-TR2 kn Mäuse ergab einen Wert von  $1,87 \pm 0,08 \frac{1}{\mu m}$  und zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede zu der Anzahl von  $1,94 \pm 0,07$  Fußfortsätzen pro  $1 \mu m$  GBM der TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrolltiere (Abb. 25C).

Anhand der Vermessung der relativen GBM-Dicke konnte gezeigt werden, dass es durch den Knockout zu keiner statistisch relevanten Beeinflussung der GBM-Beschaffenheit kam. Die Höhe der GBM von P-TR2 kn Tieren betrug  $158,62 \pm 10,57$  nm und entsprach damit genau der gemessenen GBM-Dicke von TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen ( $158,06 \pm 8,71$  nm) (Abb. 25C).

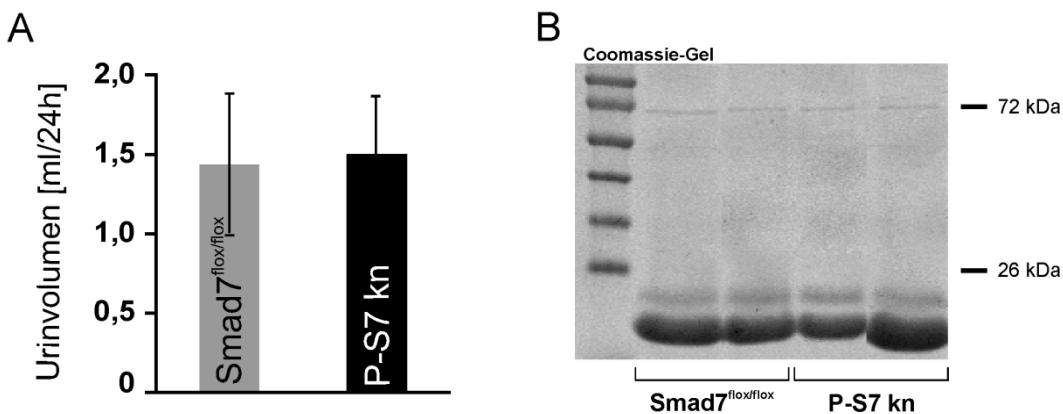
Insgesamt konnte durch die oben genannten Analysen gefolgert werden, dass weder eine Desinhibierung des podozytären TGF- $\beta$  Signalwegs (P-S7 kn) noch eine völlige Blockierung des TGF- $\beta$  Signalwegs in Podozyten (P-TR2 kn) einen Einfluss auf die Morphologie dieser Zellen hatte. Die Differenzierung sowie die Ausprägung der spezifischen Polarität der Podozyten wurden durch die jeweilige genetische Veränderung nicht beeinträchtigt.

### 5.3.3 Funktionelle Untersuchungen des Urins

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob es durch die Desinhibition bzw. Inhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs zu Veränderungen in der Funktion der Niere kam. Eine mögliche Fehlleistung der Nieren sollte dabei anhand der Menge und der Zusammensetzung des ausgeschiedenen Urins untersucht werden. Die Gewinnung des Urins der Mäuse erfolgte durch die 24-stündige Haltung der Tiere in metabolischen Käfigen. Die Untersuchung einer möglichen pathologischen Veränderung in Form von Proteinurie sollte anhand von Urin-Analyse-Gelen analysiert werden. Im Falle einer Proteinurie sollte es dabei zur Detektion einer charakteristischen Albuminbande auf einer Höhe von ca. 70 kDa kommen.

### 5.3.3.1 Der Podozyten-spezifische Knockout von Smad7 hatte keinen Einfluss auf das Urinvolumen und verursachte keine Proteinurie

Die Quantifizierung des Urinvolumens von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigte, dass P-S7 kn Tiere innerhalb von 24 Stunden  $1,50 \pm 0,37$  ml Urin abgaben und damit vergleichbare Mengen ausschieden, wie sie bei Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen gemessen wurden ( $1,44 \pm 0,45$  ml Urin pro Tag) (Abb. 26A).



**Abb. 26: P-S7 kn Tiere lieferten vergleichbare Ergebnisse der Urinanalyse.**

(A) Bestimmung des Urinvolumens durch die Haltung der Mäuse für 24 h in metabolischen Käfigen.  $n \geq 10$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM. (B) Urinanalyse-Gel. 5 µl Urin wurden auf ein 10 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen, welches anschließend mit Coomassie gefärbt wurde. Es konnte keine Fehlfunktion der Niere in Form von Proteinurie in P-S7 kn Mäusen beobachtet werden.

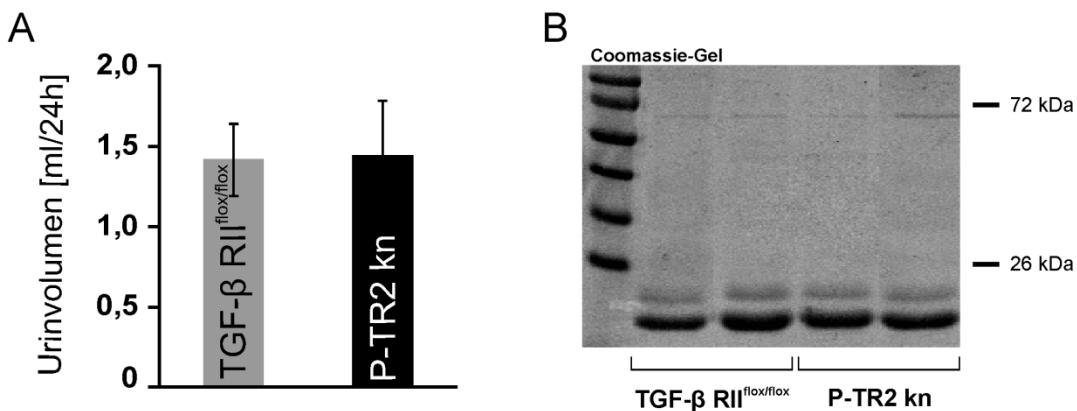
Die Analyse des Harns im Bezug auf eine vermehrte Proteinausscheidung ergab, dass keine besonderen Auffälligkeiten der Urinzusammensetzung gefunden wurden (Abb. 26B). Urinproben von P-S7 kn Mäusen wiesen im Vergleich zum Smad7<sup>flox/flox</sup>-Urin keine Unterschiede im Bandenmuster der Gele auf. Eine Proteinurie anhand einer verstärkten Albuminbande auf der Höhe von ca. 70 kDa konnte weder bei P-S7 kn noch bei Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen nicht detektiert werden.

### 5.3.3.2 Der Podozyten-spezifische Knockout von TGF-β RII hatte keinen Einfluss auf das Urinvolumen und verursachte keine Proteinurie

Die oben genannte Untersuchung des Urins wurde parallel an der zweiten Mauslinie mit dem TGF-β RII Knockout durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Urinvolumen von P-TR2 kn Mäusen ( $1,45 \pm 0,34$  ml/24h) der physiologischen Urinmenge von TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Tieren ( $1,42 \pm 0,22$  ml/24h) entsprach (Abb. 27A). Ebenso wenig wurden besondere Auffälligkeiten oder Unterschiede im

Bandenmuster der Urin-Analyse-Gele von P-TR2 kn oder TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Mäusen detektiert (Abb. 27B).



**Abb. 27: P-TR2 kn Tiere lieferten vergleichbare Ergebnisse der Urinanalyse.**

(A) Bestimmung des Urinvolumens durch die Haltung der Mäuse für 24 h in metabolischen Käfigen. N≥11; Mittelwert ±SEM. (B) Urinanalyse-Gel. 5 µl Urin wurden auf ein 10 % Polyacrylamidgel aufgetragen, welches anschließend mit Coomassie gefärbt wurde. Es konnte keine Fehlfunktion der Niere in Form von Proteinurie in P-TR2 kn Mäusen beobachtet werden.

Die Auswertung der Urin-Analyse-Gele lieferte auch hier keine Hinweise darauf, dass es zu Fehlfunktionen der Niere kam. Es konnte keine deutliche Albuminbande auf der Höhe von ca. 70 kDa in Urinproben von P-TR2 kn Mäusen detektiert werden.

## 5.4 Untersuchungen von altersprogressiven Veränderungen

Die weiterführenden Untersuchungen sollten einen Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss eine Beeinträchtigung der podozytären TGF- $\beta$  Signaltransduktion auf altersbedingte Veränderungen der Niere besitzt.

Obwohl das Altern *per se* einen physiologischen Prozess darstellt und nicht als Krankheit bezeichnet werden kann, finden hier dennoch Veränderungen statt, die pathologischen Abläufen sehr ähnlich sind. TGF- $\beta$  wird in zahlreichen krankheitsbedingten Vorgängen, die mit einer Podozytenschädigung assoziiert werden, eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Aus diesem Grund stellte sich für die nachfolgenden Experimente die Frage, ob sich die genetische Veränderung des Podozyten-spezifischen Knockouts erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt manifestiert.

Die Untersuchungen auf mögliche altersprogressive Veränderungen erfolgten daraufhin durch den Vergleich morphologischer Analysen der Glomeruli von adulten jungen Tieren mit 9 Monate alten Mäusen.

#### 5.4.1 P-S7 kn Mäuse zeigten im Alter eine progressive Steigerung von Glomerulosklerosen und *Foot Process Effacement*

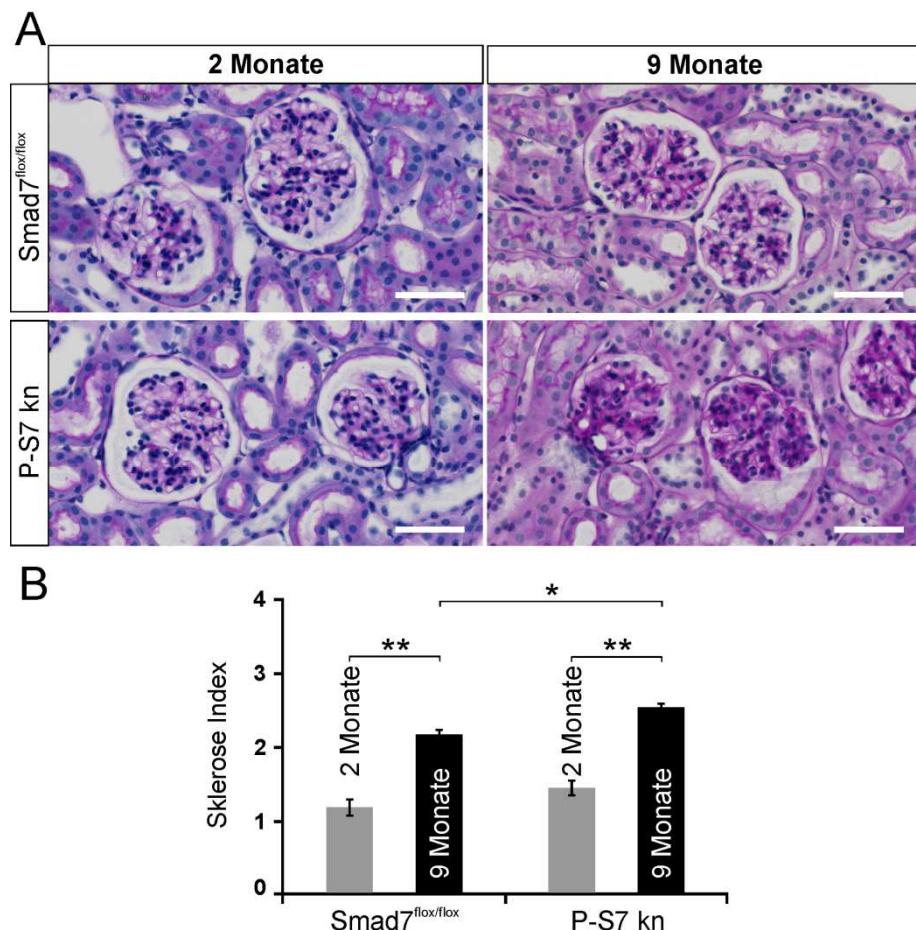
Um altersprogressive Veränderungen zwischen P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Geschwistertieren zu detektieren, wurde die Glomeruli-Morphologie von Mäusen im Alter von 2 Monaten mit dem glomerulären Erscheinungsbild von Mäusen im Alter von 9 Monaten verglichen.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der PAS-gefärbten Nierenschnitte von 2 Monate alten Mäusen (sowohl P-S7 kn als auch Smad7<sup>flox/flox</sup>) konnten keine offensichtlichen Unterschiede der Morphologie der Glomeruli festgestellt werden. Es waren vermehrt Glomeruli mit einem locker erscheinenden Kapillarkonvolut sichtbar, während dunkel gefärbte (PAS-positive) sklerotische Bereiche innerhalb der Glomeruli nur sehr vereinzelt sichtbar waren (Abb. 28A, links). Die PAS-gefärbten Nierenschnitte von 9 Monate alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigten offensichtliche Veränderungen im Vergleich zu jungen Tieren. Es war deutlich zu erkennen, dass die Glomeruli alter Tiere erheblich dunkler gefärbt waren und wesentlich weniger aufgelockert erschienen (Abb. 28A, rechts). Anhand des Vergleichs von 9 Monate alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollen wurde zusätzlich festgestellt, dass es innerhalb von P-S7 kn Mäusen zu einer weiteren Verschlechterung der glomerulären Morphologie kam. Der Anteil der dunkel gefärbten sklerotischen Fläche nahm hier nochmal deutlich zu (Abb. 28A, rechts oben vs. rechts unten).

Die semi-quantitative Auswertung der PAS-Färbungen erfolgte durch die Bestimmung des sog. Sklerose Indexes. Der Vergleich der jungen 2 Monatstiere ergab eine tendenzielle Steigerung der sklerotischen Flächen innerhalb der Glomeruli von P-S7 kn Mäusen (Abb. 28B). Als Sklerose Index für 2-monatige P-S7 kn Tiere wurde ein Wert von  $1,46 \pm 0,11$  ermittelt, der damit höher lag als der Sklerose Index der Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäuse, der einen Wert von  $1,19 \pm 0,11$  lieferte.

Beim Vergleich der Glomerulosklerosen in jungen Tieren mit denen in 9-monatigen Mäusen konnte festgestellt werden, dass alte Tiere jeweils einen deutlichen Anstieg von Glomerulosklerosen aufwiesen. Der Sklerose Index von alten P-S7 kn Tieren ergab einen Wert von  $2,54 \pm 0,06$  und zeigte dadurch eine hoch signifikante Steigerung der sklerotischen Areale im Vergleich zu jungen P-S7 kn Mäusen (Abb. 28B). Entsprechende Ergebnisse wurden durch den Vergleich von jungen und alten Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen erzielt. Der ermittelte Sklerose-Index von 9-monatigen Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tieren stieg hier auf einen durchschnittlichen Wert von  $2,17 \pm 0,08$ , dessen Steigerung sich, verglichen mit jungen Tieren, als hoch signifikant herausstellte (Abb. 28B). Interessanterweise zeigte der Vergleich von alten Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen mit 9 Monate alten P-S7 kn Tieren eine signifikante Erhöhung des Sklerose-Indexes. Hierdurch konnte festgehalten werden, dass alte P-S7 kn Mäuse eine

eindeutige altersprogressive Verschlechterung der Glomeruli-Morphologie aufwiesen, als entsprechende gleichaltrige Smad7<sup>flox/flox</sup>-Geschwistertiere (Abb. 28B).



**Abb. 28: Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse eine zusätzliche Verstärkung von Glomerulosklerose.**

Analysiert wurden PS7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren im Alter von 2 und 9 Monaten. (A) Ausschnitt eines PAS-gefärbten Nierenschnitts. (B) Semi-quantitative Bestimmung des Sklerose Indexes anhand einer graduellen Einteilung von 0 – 4 der sklerotischen Fläche innerhalb der Glomeruli. 0 = keine Sklerose; 1 = < 25%; 2 = 25 – 50 %; 3 = 50 -75 %, 4 = > 75 %. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; \*\*:p<0,001; Messbalken: 50 µm.

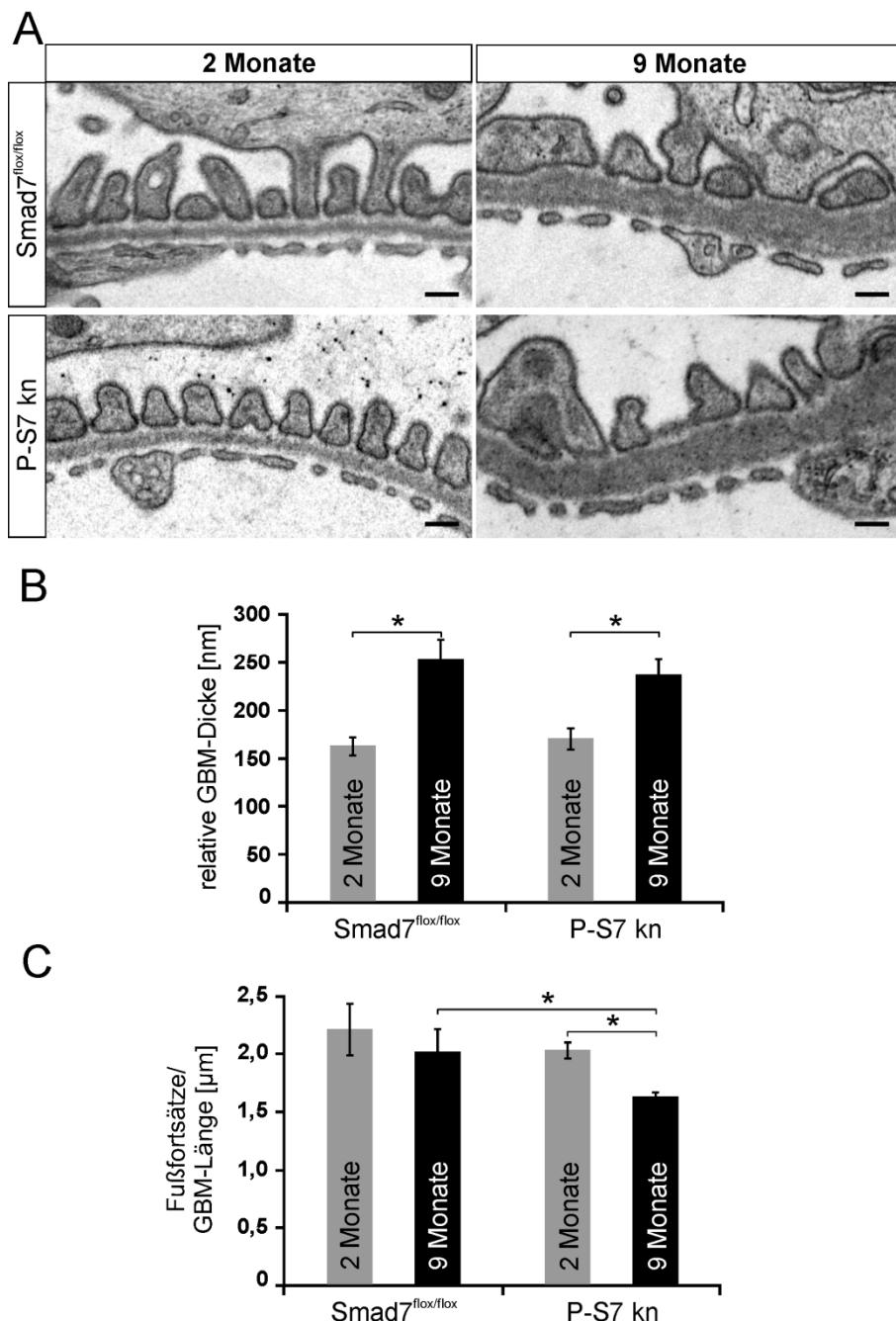
Weiterführende Untersuchungen erfolgten durch die Bestimmung der relativen GBM-Dicke und der Fußfortsatz-Frequenz anhand von TEM-Bildern.

Die Ergebnisse für den Vergleich von jungen P-S7 kn und den entsprechenden Kontrolltieren wurden bereits in der Phänotypanalyse (Punkt 5.3.2.1; Abb. 23C, D) beschrieben.

Aus diesem Grund wird im Folgenden nur auf den Vergleich zwischen jungen und alten Tieren eingegangen.

Die ultrastrukturelle Betrachtung der Glomeruli von 9 Monate alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigte im Vergleich zu den entsprechend jüngeren Tieren deutliche strukturelle Veränderungen der GBM. Die GBM ließ auf den Aufnahmen eine deutliche Verbreiterung, die

vor allem die *Lamina densa* betraf, erkennen. Gleichzeitig verloren die einzelnen Fußfortsätze der Podozyten ihre regelmäßige Verteilung (Abb. 29A). Die einzelnen Fußfortsätze zeigten dabei zum einen eine Verbreitung, zum anderen ging die strukturierte Organisation verloren.



**Abb. 29:** Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse eine zusätzliche Verstärkung von *Foot Process Effacement*, während sich die Beschaffenheit der GBM nicht zusätzlich verschlechtert.

Analysiert wurden PS7 kn und Smad7<sup>fl/fl</sup>-Kontrollnieren im Alter von 2 und 9 Monaten. (A) Ausschnitt einer TEM-Aufnahme der GBM. (B, C) Histologische Auswertung durch Vermessung der relativen GBM Dicke (B) und die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz (C). n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; Messbalken: 100 nm

Die Bestimmung der relativen Dicke der GBM ergab, dass es sowohl in 9 Monate alten P-S7 kn als auch in Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zu einer eindeutigen und signifikanten Steigerung der relativen GBM-Dicke im Vergleich zu den jungen Mäusen kam. Die relative GBM-Höhe von P-S7 kn Mäusen betrug  $237,16 \pm 17,94$  nm, während für die glomeruläre Smad7<sup>flox/flox</sup>-Basalmembran eine relative Dicke von  $252,99 \pm 23,05$  nm gemessen wurde (Abb. 29B). Die Verdickung der GBM von P-S7 kn Mäusen im Vergleich zu jungen Tieren betrug dabei ca. 42 %. Durch den Vergleich von alten und jungen Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tieren konnte eine durchschnittliche Erhöhung der GBM-Dicke von ca. 52 % ermittelt werden (Abb. 29B). Zwischen den jeweils 9 Monate alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Geschwistermäusen konnten keine statistisch relevanten Unterschiede ausgemacht werden.

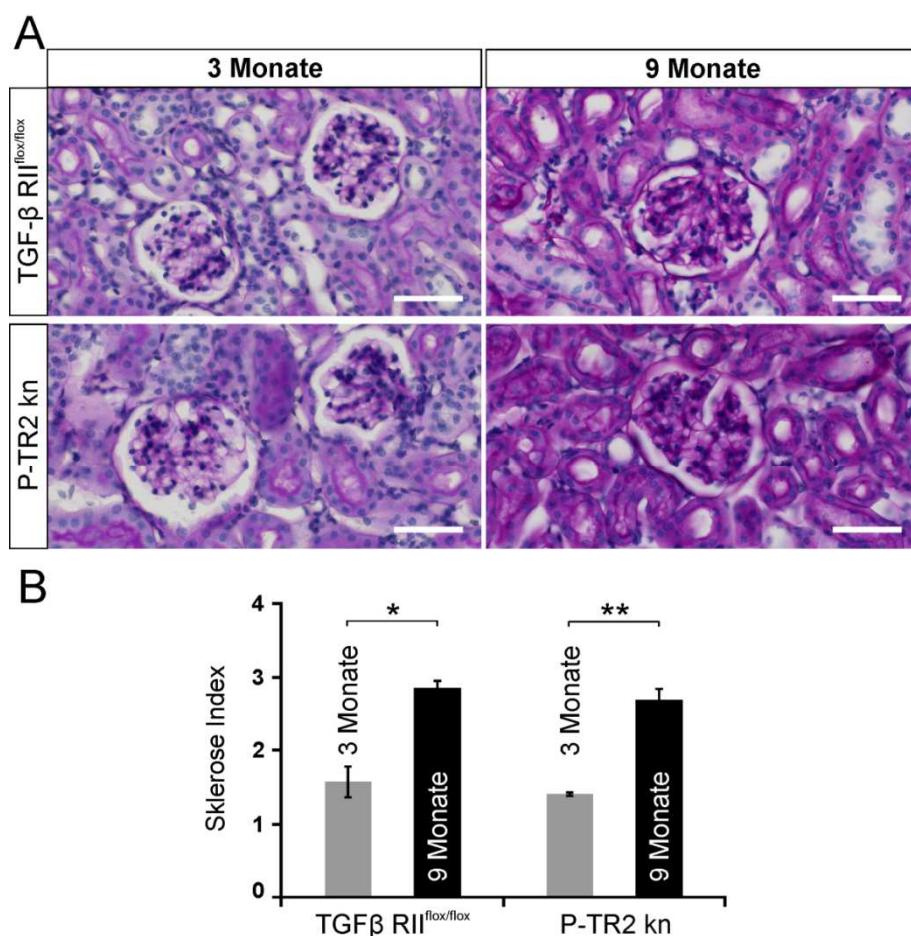
In einem nächsten Schritt wurde die Fußfortsatz-Frequenz quantifiziert. Es zeigte sich, dass es bei 9 Monate alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen jeweils zu einer Verminderung des Frequenzwertes im Vergleich zu den Werten der entsprechenden jungen Tiere kam (Abb. 29C). Demzufolge konnte gezeigt werden, dass im altersprogressiven Verlauf morphologische Veränderungen in Form von *Foot Process Effacement* begonnen hatten. 9 Monate alte P-S7 kn Mäuse lieferten dabei den niedrigsten Wert von  $1,63 \pm 0,05 \frac{1}{\mu m}$  und zeigten eine signifikante Reduktion der Anzahl der Fußfortsätze pro GBM-Länge im Vergleich zu 2-monatigen P-S7 kn Tieren. Der Frequenz-Wert von alten Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen betrug  $2,03 \pm 0,20 \frac{1}{\mu m}$  und lag damit ebenfalls unterhalb der entsprechenden jungen Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollgruppe. Diese Verschlechterung der Fußfortsatz-Frequenz erwies sich zwar nicht als signifikant, deutete aber dennoch auf ein beginnendes *Foot Process Effacement* hin. Interessant war allerdings, dass durch den Vergleich der 9 Monate alten P-S7 kn Mäuse mit 9-monatigen Smad7<sup>flox/flox</sup>-Geschwisterkontrollen eine signifikante Verschlechterung der Fußfortsatz-Frequenz gezeigt werden konnte und damit einen eindeutigen Hinweis lieferte, dass ein Fehlen von Smad7 zu einer Verstärkung von *Foot Process Effacement* Prozessen innerhalb der Glomeruli führte.

#### 5.4.2 P-TR2 kn Mäuse zeigten im Alter vergleichbare Glomerulosklerosen und *Foot Process Effacement* Prozesse

Die Aufklärung möglicher altersprogressiver Veränderungen in P-TR2 kn und TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen wurde anhand von 3 Monate bzw. 9 Monate alten Tieren durchgeführt.

Der Vergleich von PAS-gefärbten Nierenschnitte von jungen Geschwistertieren zeigte sowohl bei P-TR2 kn als auch bei TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen vorwiegend morphologisch normal aussehende Glomeruli, die lediglich vereinzelt sklerotisierte Flächen innerhalb der Glomeruli

aufwiesen (Abb. 30A, links). Der Anteil der dunkel gefärbten PAS-positiven Fläche nahm bei 9 Monate alten P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Mäusen erkennbar zu (Abb. 30A, rechts). Der Vergleich der 3-monatigen PTR2 kn Mäuse mit TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Geschwisterkontrollen ergab keinen statistisch relevanten Unterschied der sklerotischen Anteile innerhalb der Glomeruli (Abb. 30B). Junge P-TR2 kn Mäuse lieferten einen Sklerose Index von  $1,40 \pm 0,16$ , während der Wert von TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Geschwisterkontrollen etwas höher bei  $1,58 \pm 0,21$  lag. Infolgedessen konnte lediglich eine geringe Tendenz einer Reduktion von Glomerulosklerosen in jungen P-TR2 kn Mäusen beobachtet werden.



**Abb. 30: Im Alter zeigten P-TR2 kn Mäuse ein vergleichbares Ausmaß an Glomerulosklerose.**

Analysiert wurden P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Kontrollnieren im Alter von 3 und 9 Monaten. (A) Ausschnitt eines PAS gefärbten Nierenschnitts. (B) Semiquantitative Bestimmung des Sklerose Indexes anhand einer graduellen Einteilung von 0 – 4 der sklerotischen Fläche innerhalb der Glomeruli. 0 = keine Sklerose; 1 = < 25%; 2 = 25 – 50 %; 3 = 50 - 75 %, 4 = > 75 %. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; \*\*: p<0,001; Messbalken: 50 µm.

Im Alter zeigen sowohl P-TR2 kn als auch TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Mäuse eine deutliche Erhöhung des Sklerose Indexes und ließen dadurch eine gesteigerte Glomerulosklerose erkennen (Abb. 30B). Der Sklerose Index der 9 Monate alte P-TR2 kn Tiere lag bei  $2,69 \pm 0,16$  und ergab eine hoch signifikante Steigerung der sklerotischen Anteile innerhalb der Glomeruli im Vergleich zu jungen P-TR2 kn Kontrollen (3-monatige P-TR2 kn:  $1,40 \pm 0,01$ ). Ähnliche

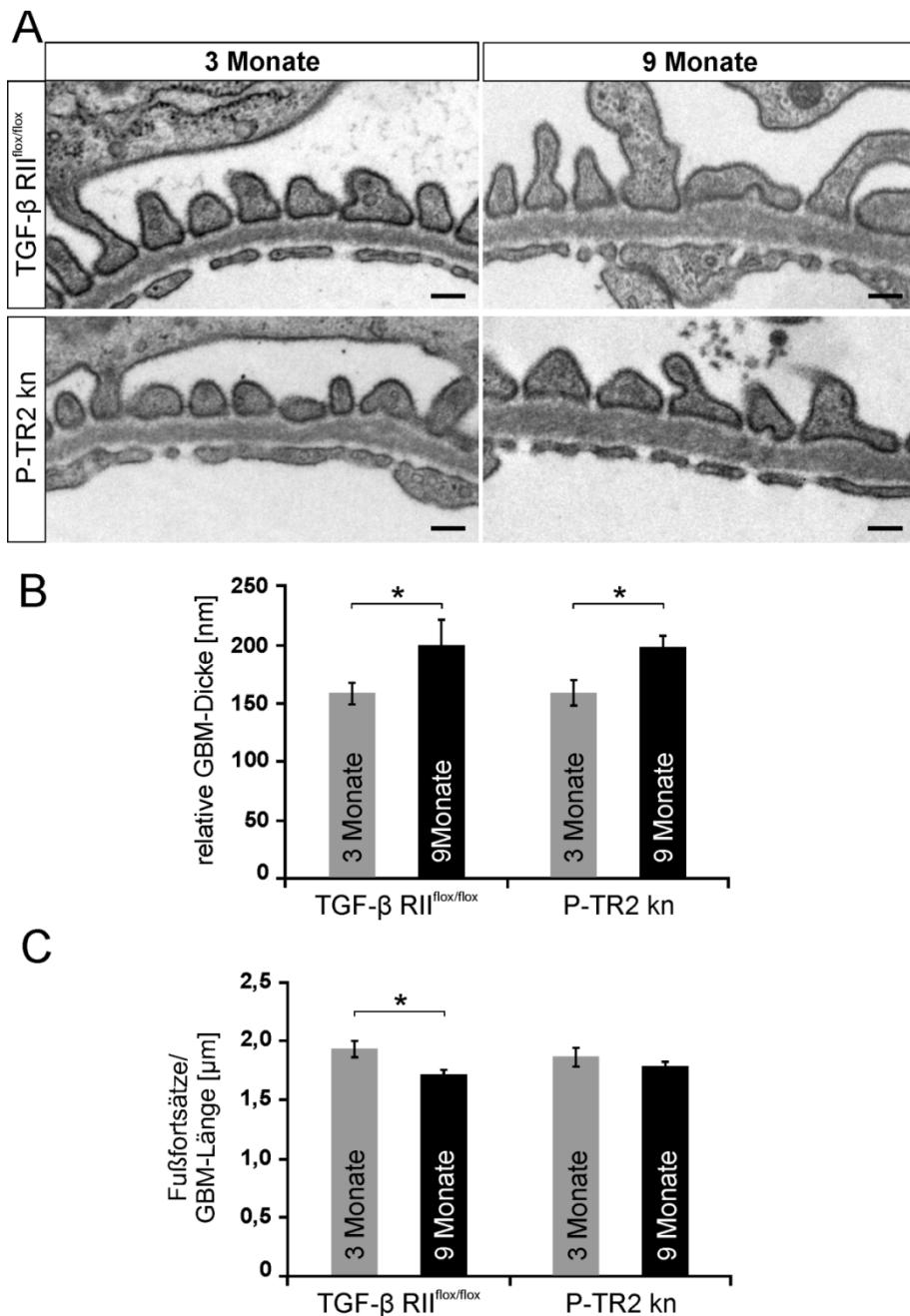
Ergebnisse zeigte der Vergleich von 9-monatigen TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen mit den entsprechenden 3 Monate alten Kontrolltieren. Hier zeigte sich eine signifikante Steigerung der Glomerulosklerose durch die Erhöhung des Sklerose Indexes auf  $2,87 \pm 0,11$  im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren (3-monatige TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $1,58 \pm 0,21$ ). Die Gegenüberstellung der 9 Monate alten P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse untereinander zeigte eine leichte Tendenz einer verringerten sklerotischen Aktivität in P-TR2 kn Tieren (Abb. 30B).

Als nächstes wurde die relative Dicke der GBM und die Fußfortsatz-Frequenz von jungen und alten P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen bestimmt.

Auch hier wurden die Ergebnisse der 3 Monate alten Tiere bereits während der Phänotypanalyse besprochen, infogedessen hier lediglich auf den Vergleich mit den älteren Mäusen eingegangen werden soll (Punkt 5.3.2.2; Abb. 25C, D).

Die anfängliche Betrachtung der TEM-Bilder ließ erkennen, dass 9 Monate alte P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere, im Vergleich zu den jeweils entsprechenden 3-monatigen Kontrollmäusen, deutliche strukturelle Veränderungen im Bereich der Glomeruli aufwiesen, da das gesamte Erscheinungsbild der Glomeruli-Aufnahmen ungeordneter erschien (Abb. 31A). Es war eine Verbreiterung der *Lamina densa* sowie der einzelnen Fußfortsätze zu beobachten. Letztere verloren außerdem ihre gleichmäßige Verteilung entlang der GBM.

Die Vermessung der GBM erbrachte, dass bei 9 Monate alten P-TR2 kn sowie TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen, im Vergleich zu den entsprechenden 3-monatigen Kontrolltieren, eine deutliche und signifikante Erhöhung der GBM-Dicke gemessen wurde. Die relative Höhe der GBM von alten P-TR2 kn Mäusen betrug  $198,64 \pm 10,32$  nm, während für die glomeruläre TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Basalmembran im Alter eine relative Dicke von  $199,09 \pm 23,13$  nm gemessen wurde (Abb. 31B). Die Verdickung der GBM im Vergleich zu jungen Tieren betrug dabei jeweils ca. 25 % (Abb. 31B). Verglich man die 9 Monate alten P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse untereinander, wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.



**Abb. 31: Im Alter zeigten P-TR2 kn Tiere eine tendenzielle Verbesserung von *Foot Process Effacement*, während sich die Beschaffenheit der GBM nicht verbesserte.**

Analysiert wurden PTR2 kn und TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren im Alter von 3 und 9 Monaten. (A) Ausschnitt einer TEM-Aufnahme der GBM. (B, C) Histologische Auswertung durch Vermessung der relativen GBM Dicke (B) und die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz (C). n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; Messbalken: 100 nm

Die Analyse der Fußfortsatz-Frequenz zeigte, dass die 9-monatigen P-TR2 kn und TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse jeweils eine leichte Reduktion der Fußfortsatz-Frequenz im Vergleich zu jungen Tieren aufwiesen. Verglich man den Frequenz-Wert von  $1,72 \pm 0,05 \frac{1}{\mu m}$  der alten TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse mit dem durchschnittlichen Wert der 3-monatigen TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere, wurde festgestellt, dass es zu einer signifikanten Reduzierung der Fußfortsätze pro

GBM-Länge kam. Damit konnte gezeigt werden, dass 9 Monate alte TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse strukturelle Veränderungen von altersprogressivem *Foot Process Effacement* aufwiesen. Ein solcher Befund konnte anhand des Vergleichs von 9-monatigen P-TR2 kn Mäusen mit 3 Monate alten P-TR2 kn Tieren nicht beobachtet werden. Der erhaltene Frequenz-Wert von  $1,79 \pm 0,04 \frac{1}{\mu m}$  dieser Tiere zeigte keine eindeutige Verschlechterung der Fußfortsatz-Frequenz im Vergleich zu den entsprechenden 3 Monate alten Tieren und lag zudem höher als der von alten TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen. Damit wiesen P-TR2 kn Mäuse eine Tendenz auf, von altersprogressiven Veränderungen in Form von *Foot Process Effacement* weniger stark betroffen zu sein (Abb. 31C).

## 5.5 Untersuchungen von TGF- $\beta$ induzierbaren Proteinen

Die bisherigen Ergebnisse konzentrierten sich auf die morphologischen Unterschiede der beiden Podozyten-spezifischen Knockout-Modelle.

Der Fokus des nächsten Abschnitts lag auf möglichen molekularen Veränderungen, die durch den Knockout innerhalb der Podozyten ausgelöst werden.

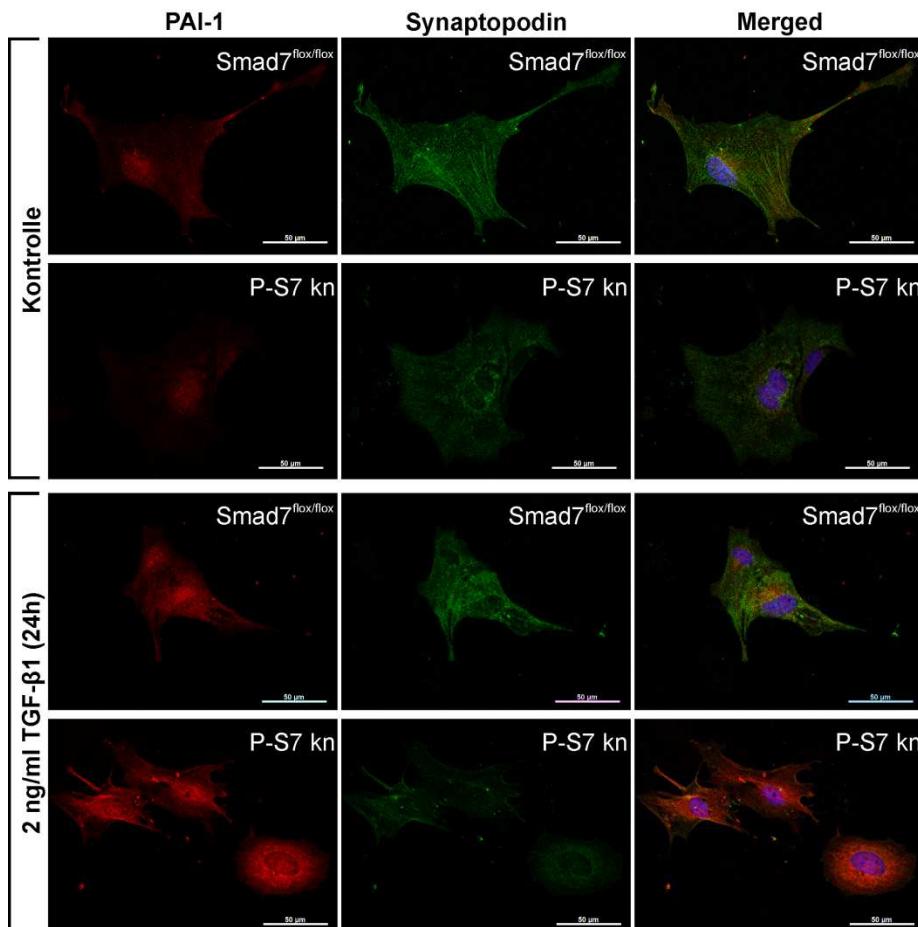
### 5.5.1 *In vitro* Untersuchungen von TGF- $\beta$ induzierbaren Proteinen

Nach der erfolgreichen Etablierung der primären *in vitro* Podozytenkulturen (Punkt 5.1), lag im nächsten Schritt der Fokus auf den funktionellen Veränderungen, die durch den jeweils modifizierten TGF- $\beta$  Signalweg hervorgerufen werden. Dazu wurden die Expressionsmuster von PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1) und CTGF (Connective Tissue Growth Factor) innerhalb der jeweiligen Knockout- und Kontrollpodozyten analysiert. PAI-1 und CTGF gelten als charakteristische Reporterproteine, deren Expression durch die Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalwegs induziert wird.

#### 5.5.1.1 P-S7 kn Podozyten zeigten *in vitro* eine verstärkte Induktion von PAI-1 und CTGF

Nach der Herstellung von primären P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Podozyten wurden die Zellen nach einer 24-stündigen Kultivierung unter serumfreien Bedingungen mit 2 ng/ml rekombinantem TGF- $\beta$ 1 behandelt.

Die immunzytochemischen Färbungen von PAI-1 zeigten in allen primären Zellen ein Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der Podozyten. Unbehandelte P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Podozyten wiesen dabei lediglich eine sehr geringe Basalexpression von PAI-1 auf (Abb. 32, oben).

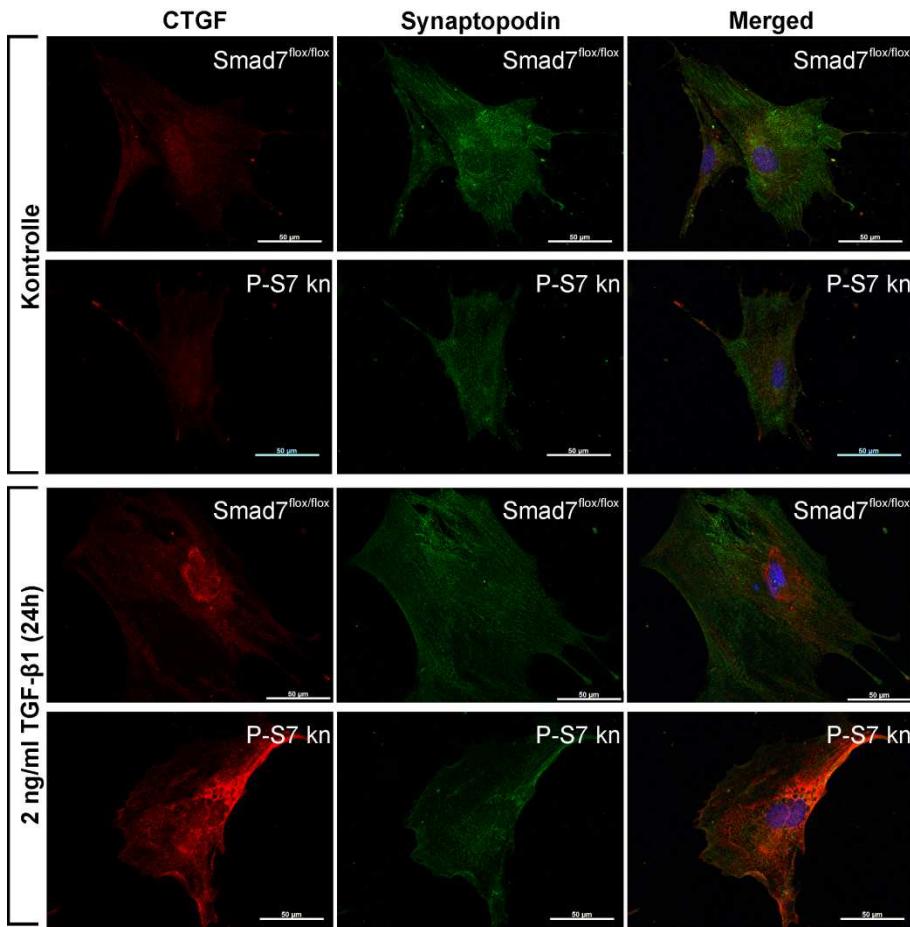


**Abb. 32: P-S7 kn Podozyten zeigten nach TGF-β1 Behandlung eine verstärkte PAI-1 Expression.**

Immunzytochemische Färbung von PAI-1 in primären P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup> Podozyten. Die primären Zellen wurden für 24 h mit 2 ng/ml rekombinantern TGF-β1 behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen mit serumfreiem Medium. Beide Zelltypen zeigten eine Induktion von PAI-1 nach TGF-β1 Behandlung, welche in P-S7 kn Podozyten weiter verstärkt wurde. Rot: PAI-1; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50 µm

In TGF-β1 behandelten primären Podozyten aus P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen konnte eine deutliche Steigerung des PAI-1 Signals detektiert werden. Demzufolge konnte hierdurch eine TGF-β1-induzierte Expressionserhöhung von PAI-1 bestätigt werden (Abb. 32, oben). P-S7 kn Podozyten zeigten dabei nach der Behandlung das stärkste Signal, das zeigte, dass hier die PAI-1 Expression zusätzlich angehoben wurde.

Die anschließende Analyse der Induzierbarkeit von CTGF lieferte entsprechend vergleichbare Ergebnisse. Auch hier konnte in allen Zellen ein Fluoreszenz-Signal für CTGF detektiert werden, das sich im gesamten Zytoplasma der Podozyten verteilte.



**Abb. 33: P-S7 kn Podozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung eine verstärkte Expression von CTGF.**

Immunzytochemische Färbung von CTGF in primären P-S7 kn und Smad7<sup>fl/fl</sup>-Podozyten. Die primären Zellen wurden für 24 h mit 2 ng/ml rekombinanter TGF- $\beta$ 1 behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen mit serumfreiem Medium. Beide Zelltypen zeigten eine Induktion von CTGF nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung, welche in P-S7 kn Podozyten weiter verstärkt wurde. Rot: CTGF; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50  $\mu$ m

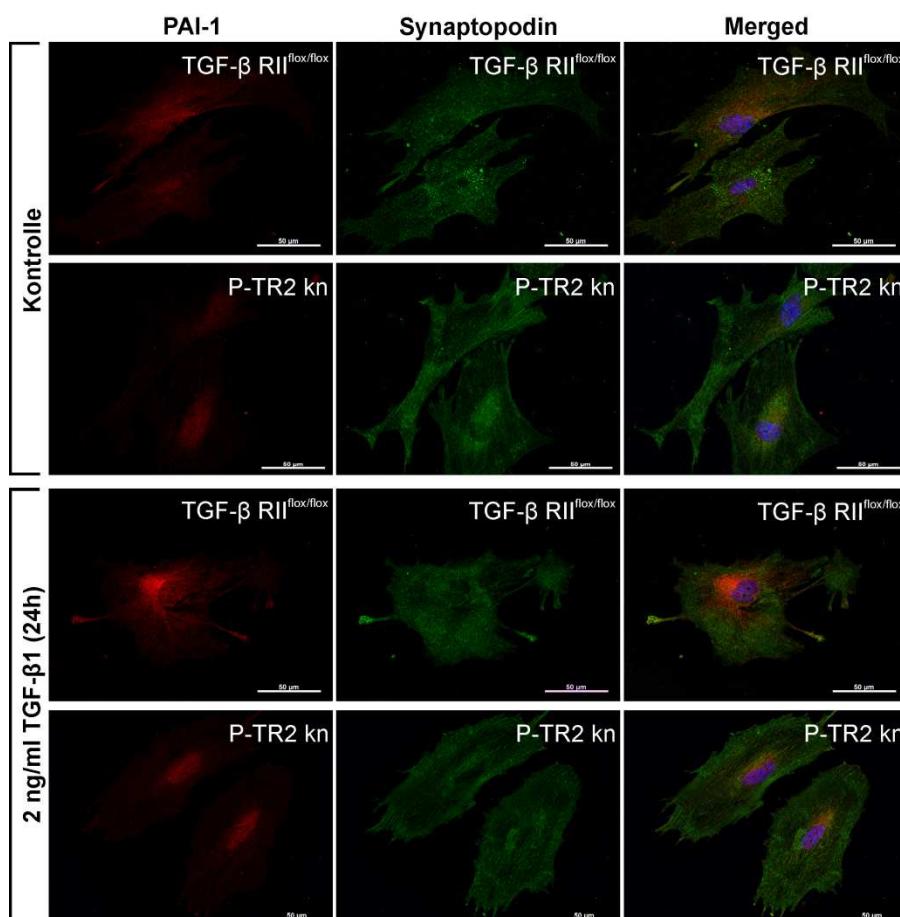
Unbehandelte primäre P-S7 kn und Smad7<sup>fl/fl</sup>-Podozyten wiesen erneut eine relativ geringe basale Expression von CTGF auf, die in P-S7 kn Podozyten leicht erniedrigt schien (Abb. 33, obere Reihen). Eine Induktion von CTGF konnte durch die Behandlung mit 2 ng/ml TGF- $\beta$ 1 sowohl in Smad7<sup>fl/fl</sup>- als auch in P-S7 kn Podozyten erzielt werden. Diese gesteigerte Expression von CTGF wurde in P-S7 kn Podozyten allerdings zusätzlich verstärkt. Dementsprechend konnte auch hier bestätigt werden, dass die Desinhibierung des TGF- $\beta$  Signalwegs in P-S7 kn Podozyten dazu führte, dass es zu einer Verstärkung der induzierten Expression von typischen TGF- $\beta$  Reporterproteinen, wie CTGF, kam.

Während der Analyse konnte eine weitere interessante Feststellung gemacht werden. Es war deutlich zu erkennen, dass P-S7 kn Podozyten eine deutlich schwächere Synaptopodin-Färbung aufwiesen, als Smad7<sup>fl/fl</sup>-Podozyten (Abb. 32; Abb. 33). Demnach schien sich ein Knockout von Smad7 negativ auf das Expressionsniveau von Synaptopodin auszuwirken.

### 5.5.1.2 P-TR2 kn Podozyten zeigten *in vitro* keine Induktion von PAI-1 und CTGF

Die oben genannten Experimente wurden parallel an primären P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten durchgeführt.

Unbehandelte primäre P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten wiesen auch hier eine sehr geringe basale Expression von PAI-1 auf.

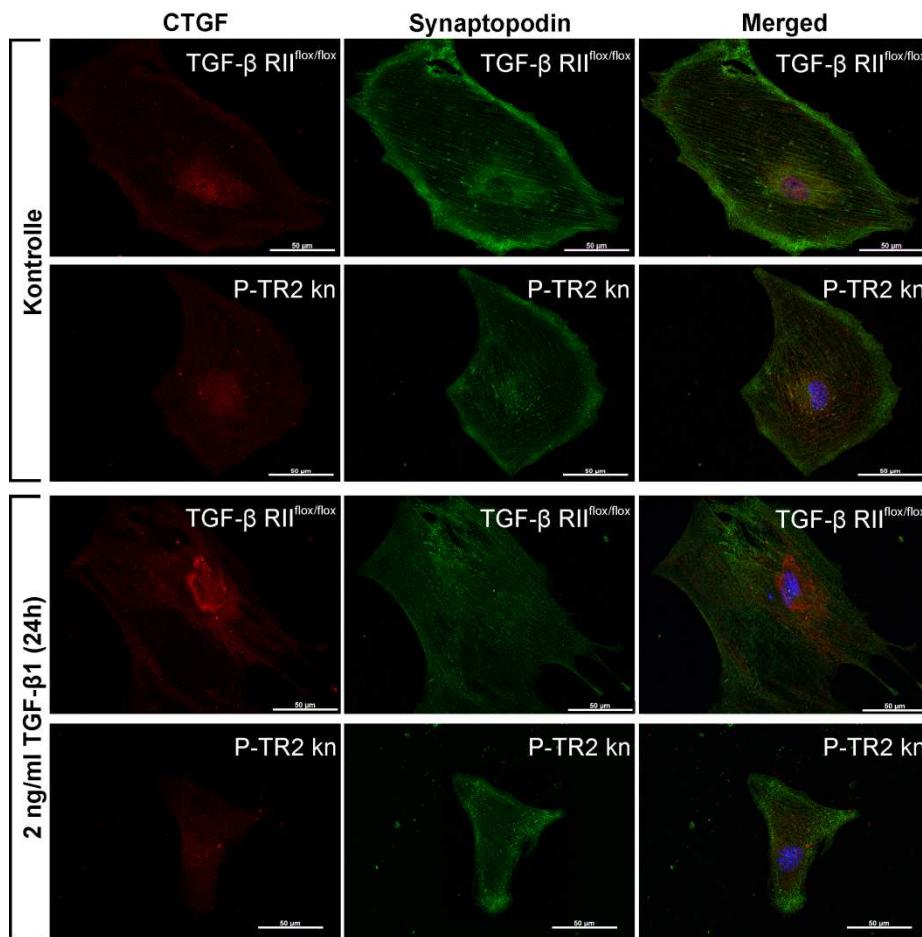


**Abb. 34:** Primäre P-TR2 kn Podozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung keine Induktion von PAI-1.

Immunzytochemische Färbung von PAI-1 in primären P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten. Die primären Zellen wurden für 24 h mit 2 ng/ml rekombinantern TGF- $\beta$ 1 behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen mit serumfreiem Medium. Die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Expression von PAI-1 konnte lediglich in TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten beobachtet werden, während P-TR2 kn Podozyten keine verstärkte Expression von PAI-1 aufwiesen. Rot: PAI-1; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50  $\mu$ m

Die Behandlung mit 2 ng/ml TGF- $\beta$ 1 führte bei diesem Experiment jedoch lediglich in TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Kontrollpodozyten zu einer gesteigerten Expression von PAI-1, während primäre P-TR2 kn Podozyten nach der Behandlung keine Induktion von PAI-1 aufwiesen (Abb. 34).

Die anschließende Analyse von CTGF bestätigte den oben genannten Befund, dass P-TR2 kn Podozyten nicht in der Lage waren, auf eine Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 zu reagieren.



**Abb. 35: Primäre P-TR2 kn Podozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung keine Induktion von CTGF.**

Immunzytochemische Färbung von CTGF in primären P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten. Die primären Zellen wurden für 24 h mit 2 ng/ml rekombinantem TGF- $\beta$ 1 behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen mit serumfreiem Medium. Die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Expression von CTGF konnte lediglich in TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten beobachtet werden, während P-TR2 kn Podozyten keine verstärkte Expression von CTGF aufwiesen. Rot: CTGF; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50 μm

In unbehandelten primären P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten konnte eine basale Menge von CTGF detektiert werden. Durch die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 konnte die CTGF-Expression jedoch nur in TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Podozyten gesteigert werden. In P-TR2 kn Podozyten kam es zu keiner Induktion von CTGF, wodurch gezeigt werden konnte, dass der Knockout des TGF- $\beta$  RII tatsächlich dazu führte, dass diese Zellen nicht auf eine Aktivierung des Signalwegs mit einer induzierten Expressionssteigerung von CTGF reagieren konnten (Abb. 35).

Die Auffälligkeit eines unterschiedlichen Expressionsniveaus von Synaptopodin, wie sie für P-S7 kn Podozyten beobachtet wurde, konnten in P-TR2 kn Podozyten nicht detektiert werden. P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Podozyten exprimierten vergleichbare Level von Synaptopodin (Abb. 35).

### **5.5.2 *In vivo* Untersuchungen von TGF- $\beta$ induzierten Proteinen**

Als Nächstes sollte überprüft werden, ob die erhobenen Daten der *in vitro* Experimente tatsächlich der *in vivo* Situation entsprachen. Infolgedessen wurden Gefrierschnitte von Knockout und Kontrolltieren angefertigt, um die beiden durch TGF- $\beta$  induzierten Proteine PAI-1 und CTGF anhand von immunhistochemischen Färbungen zu untersuchen. Da die *in vitro* Ergebnisse bestätigten, dass eine Induktion von PAI-1 und CTGF durch die Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalwegs hervorgerufen wurde und dass es ohne die exogene Zugabe von TGF- $\beta$ 1 lediglich zu einer basalen Expression der beiden Proteine kam, wurden die Fluoreszenz-Färbungen jeweils an jungen und alten Knockout- sowie Kontrolltieren durchgeführt. Grund hierfür war, dass junge Tiere eher der Situation der *in vitro* Kontrollbehandlung entsprachen, während alte Tiere, bedingt durch Alterungsprozesse eher der TGF- $\beta$  Behandlung entsprechen sollten.

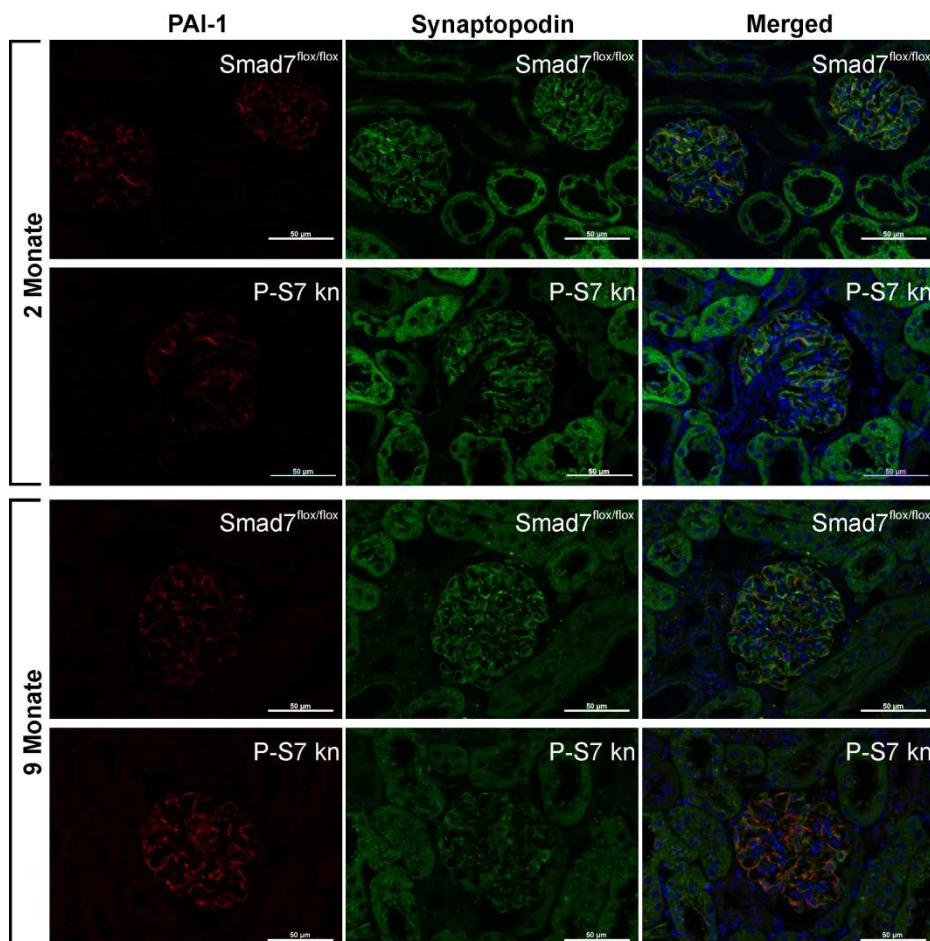
#### **5.5.2.1 P-S7 kn Glomeruli zeigten im Alter eine verstärkte Induktion von PAI-1 und CTGF**

Die Betrachtung der Fluoreszenz-Färbungen verdeutlichte, dass die zuvor beobachteten *in vitro* Ergebnisse tatsächlich den *in vivo* Gegebenheiten in P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen entsprachen.

Die PAI-1 Färbung konnte in allen Nierenschnitten detektiert werden. Ein Fluoreszenz-Signal wurde dabei überwiegend im Bereich der Glomeruli gefunden. Durch die Kolokalisation mit Synaptopodin konnte eine Expression von PAI-1i vor allem den Podozyten zugeschrieben werden.

Die Glomeruli von 2 Monate alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen wiesen jeweils eine sehr geringe und vergleichbare Expression von PAI-1 auf (Abb. 36, oben).

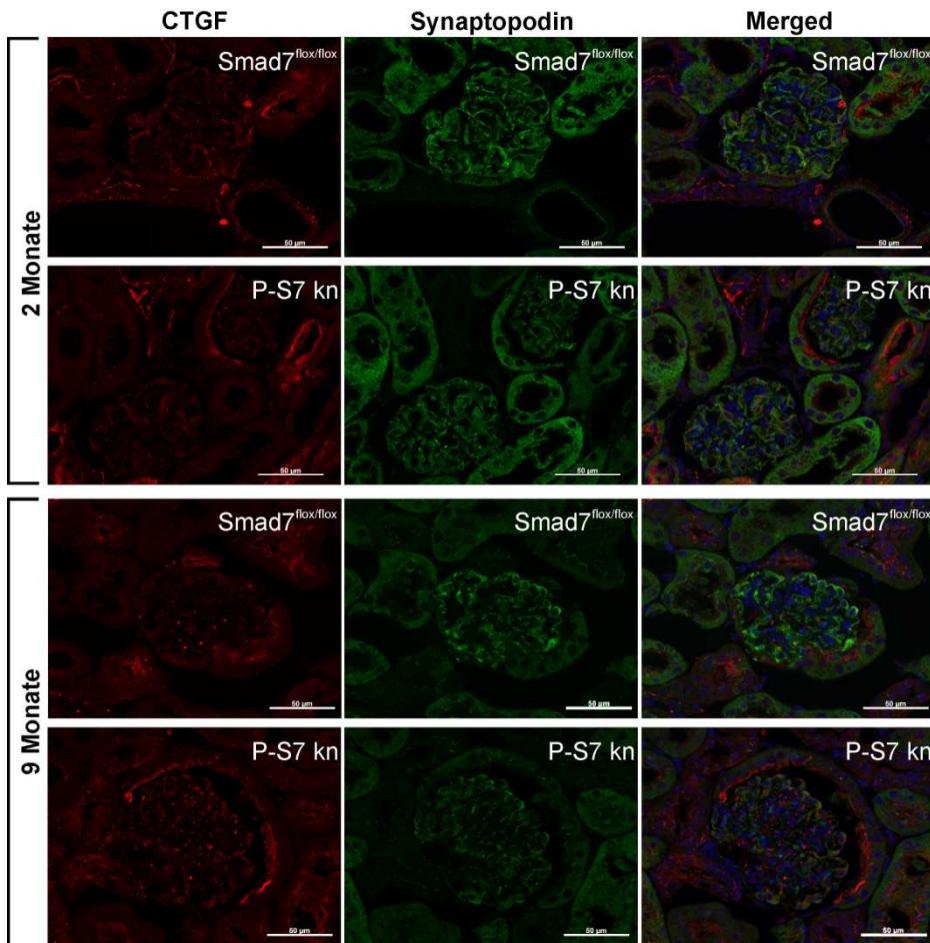
Im Vergleich zu den jungen Mäusen zeigten die Glomeruli beider 9-monatigen Tiere eine eindeutige Verstärkung des PAI-1-Signals (Abb. 36, unten). In 9 Monate alten P-S7 kn Mäusen kam es allerdings nochmals zu einer besonders deutlichen Vermehrung von PAI-1, im Vergleich zu gleichaltrigen Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrolltieren.



**Abb. 36: Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli eine verstärkte Expression von PAI-1.**  
Fluoreszenz-Doppelfärbung von PAI-1 zusammen mit Synaptopodin an Gefrierschnitten von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Im Alter kam es zu einer verstärkten Expression von PAI-1, die in P-S7 kn Mäusen zusätzlich verstärkt wurde. Rot: PAI-1; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50 µm.

Entsprechend den Erwartungen konnten ähnliche Ergebnisse auch für die Färbung von CTGF aufgezeigt werden.

Eine CTGF-Färbung konnte sowohl innerhalb der Glomeruli als auch im Tubulus-System detektiert werden.



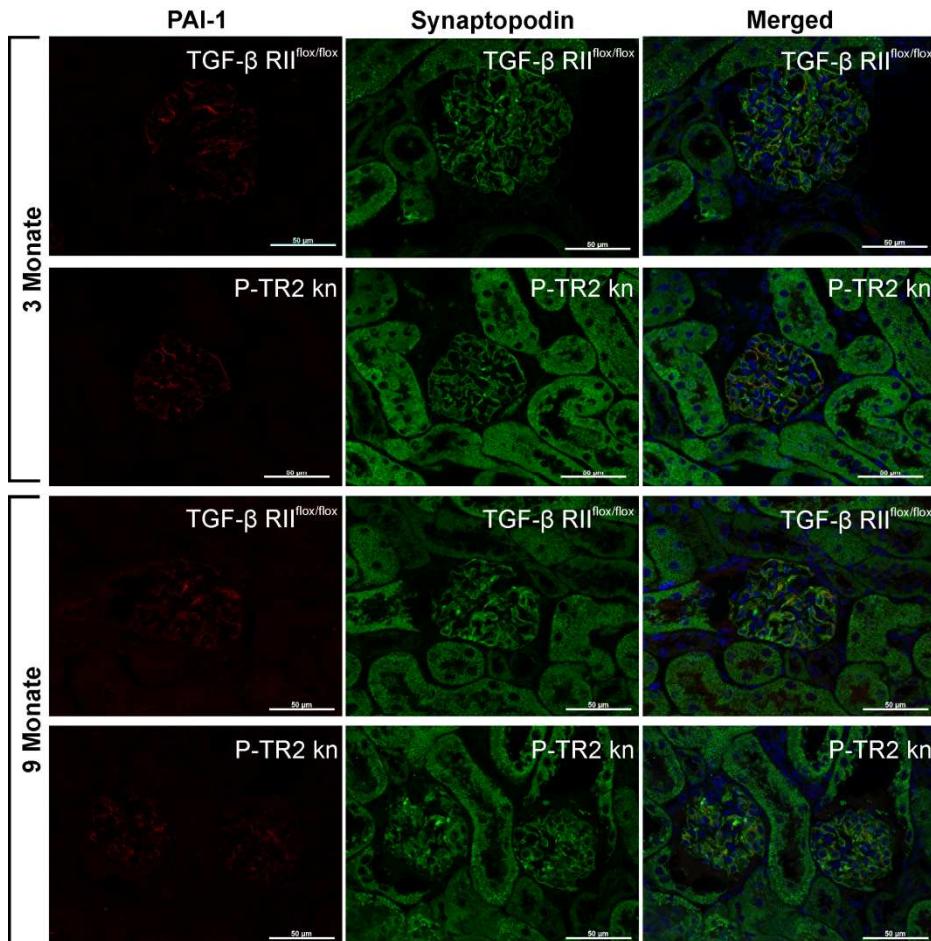
**Abb. 37: Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli eine verstärkte CTGF-Expression.**  
Fluoreszenz-Doppelfärbung von CTGF zusammen mit Synaptopodin an Gefrierschnitten von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Im Alter kam es zu einer verstärkten Expression von CTGF, die in P-S7 kn Mäusen zusätzlich verstärkt wurde. Rot: CTGF; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50 µm.

In 2 Monate alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen zeigten die Glomeruli vergleichbare, relativ niedrige Level einer CTGF Expression (Abb. 37, oben). In Glomeruli der 9 Monate alten Tiere kam es zu einer Steigerung von CTGF, welche in Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen jedoch nicht so stark war, wie die, der PAI-1 Expressionssteigerung. Der Vergleich von den jeweils alten P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tieren verdeutlichte erneut, dass es in P-S7 kn Mäusen zu einer deutlich erhöhten CTGF Expression kam (Abb. 37, oben).

Auffällig war außerdem, dass das veränderte Expressionsniveau von Synaptopodin, das die *in vitro* Podozyten-Färbungen bereits aufzeigten, ebenfalls innerhalb der Glomeruli der gefärbten Nierenschnitte beobachtet werden konnte. Sowohl junge wie auch alte P-S7 kn Glomeruli zeigten eine deutliche Reduktion der Synaptopodin Expression. Zusätzlich konnte eine weitere Verminderung in alten P-S7 kn Tieren detektiert werden (Abb. 36, grün).

### 5.5.2.2 P-TR2 kn Glomeruli zeigten im Alter keine Induktion von PAI-1 und CTGF

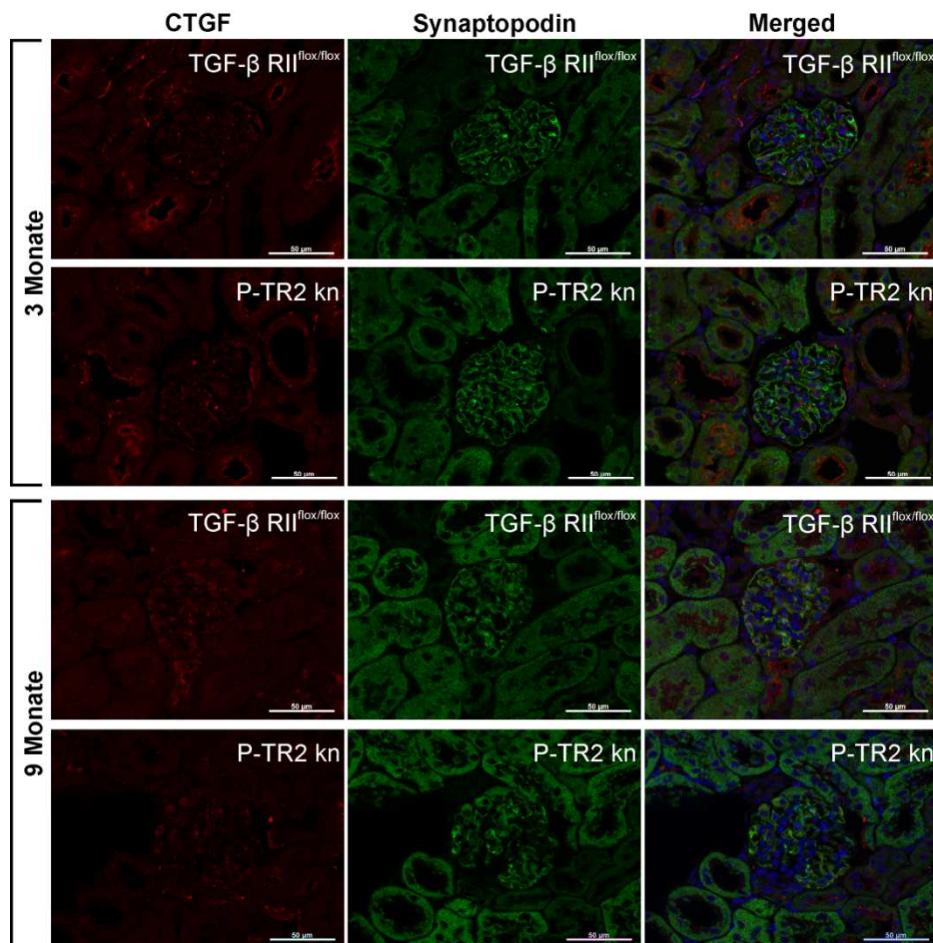
Die Analyse der PAI-1 Färbungen der P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Nieren bestätigte die vorherigen Untersuchungen, bei der PAI-1 vorwiegend im Bereich der Glomeruli, speziell in den Podozyten zu erkennen war.



**Abb. 38: Im Alter zeigten P-TR2 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli keine Induktion von PAI-1.**  
Fluoreszenz-Doppelfärbung von PAI-1 zusammen mit Synaptopodin an Gefrierschnitten von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Kontrollnieren. Im Alter kam es zu keiner Induktion der Expression von PAI-1. Rot: PAI-1; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50  $\mu$ m.

Anhand von jungen 3 Monate alten P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Kontrolltieren konnte festgestellt werden, dass PAI-1 in den Glomeruli nur in relativ geringen Mengen exprimiert wurde (Abb. 38, oben). Die Betrachtung der alten, 9-monatigen TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Kontrollen zeigte eine detektierbare Erhöhung der PAI-1 Expression. An Fluoreszenz-Färbungen von alten P-TR2 kn Mäusen konnte diese PAI-1 Expressionssteigerung nicht beobachtet werden (Abb. 38, unten) und entsprach damit der fehlenden Induktion, wie sie in TGF- $\beta$ 1 behandelten primären P-TR2 kn Podozyten aufgezeigt wurde.

Der Befund, dass P-TR2 kn Podozyten nicht auf eine Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalwegs mit einer Induktion von typischen TGF- $\beta$  Zielproteinen antworteten, konnte zusätzlich anhand von CTGF Fluoreszenz-Färbungen bewiesen werden.



**Abb. 39 Im Alter zeigten P-TR2 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli keine Induktion von CTGF.**

Fluoreszenz-Doppelfärbung von CTGF zusammen mit Synaptopodin an Gefrierschnitten von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Kontrollnieren. Im Alter kam es zu keiner Induktion der Expression von CTGF. Rot: CTGF; Grün: Synaptopodin; Blau: DAPI; Messbalken: 50 µm.

Junge P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Kontrollmäuse zeigten innerhalb der Glomeruli vergleichbare, relativ niedrige Level einer CTGF Expression (Abb. 39, oben). Der Vergleich mit 9 Monate alten TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Tieren machte deutlich, dass es im Alter zu einer erhöhten Expression von CTGF kam. Diese Expressionssteigerung blieb in Glomeruli von 9 Monate alten P-TR2 kn Mäusen aus (Abb. 39, unten).

Die Beobachtung einer veränderten Synaptopodin Expression innerhalb der Glomeruli der Smad7 Knockout-Linie konnte für die Rezeptor-Knockout-Mäuse nicht gezeigt werden. Hier kam es sowohl in P-TR2 kn als auch in TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Kontrolltieren zu jedem Zeitpunkt zu einer vergleichbaren Expression von Synaptopodin.

## 5.6 Streptozotocin-induzierte DN als Podozyten-Schadensmodell

Die bislang erhobenen Daten verdeutlichen, dass ein podozytär veränderter TGF- $\beta$  Signalweg die Funktionalität der Podozyten kaum beeinflusste, dass es jedoch zu einer Modulation bei altersabhängigen Veränderungen der Niere kam.

TGF- $\beta$  wird häufig als entscheidender pro-fibrotischer Faktor bei der Pathogenese von Podozyten-assoziierten Nierenerkrankungen, wie beispielsweise die diabetischen Nephropathie (DN), diskutiert. Die pathologischen Effekte, die TGF- $\beta$  innerhalb der Podozyten ausübt, sind bisher nicht ausreichend detailliert bekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das etablierte System der Streptozotocin (STZ)-induzierten DN als Schadensmodell der Podozyten gewählt.

Bisherige Ergebnisse konnten zeigen, dass sich der Podozyten-spezifische Knockout im Alter auf das Ausmaß von *Foot Process Effacement* auswirkt, während eine Verbreiterung der GBM durch den Knockout nicht weiter moduliert wurde. Die Literatur liefert Hinweise, dass diese beiden pathologischen Prozesse eng mit dem progressiven Verlauf einer Proteinurie bei DN einhergehen. Dabei ist jedoch nicht bekannt, welche Veränderung zuerst auftritt oder welche Erscheinung unter Umständen die andere bedingt. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit eine Kurzzeitbehandlung mit STZ von 2 Monaten dazu dienen, die initialen histopathologischen Erscheinungsbilder einer DN zu analysieren.

### 5.6.1 Untersuchung charakteristischer klinischer Parameter nach STZ Injektion

Für die Induktion der diabetischen Bedingungen in den Mäusen wurde das Low-Dose STZ Protokoll verwendet. Nach einer 2-monatigen Behandlungsdauer wurden als Erstes klinisch relevante Parameter, wie die Bestimmung der abgegebenen Urinmenge, die Messung des Blutglucose-Spiegels sowie die Bestimmung der Gewichtsveränderung untersucht, um die Induktion der *Diabetes mellitus* (DM) Erkrankung zu beurteilen.

#### 5.6.1.1 Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten vergleichbare Symptome von DM

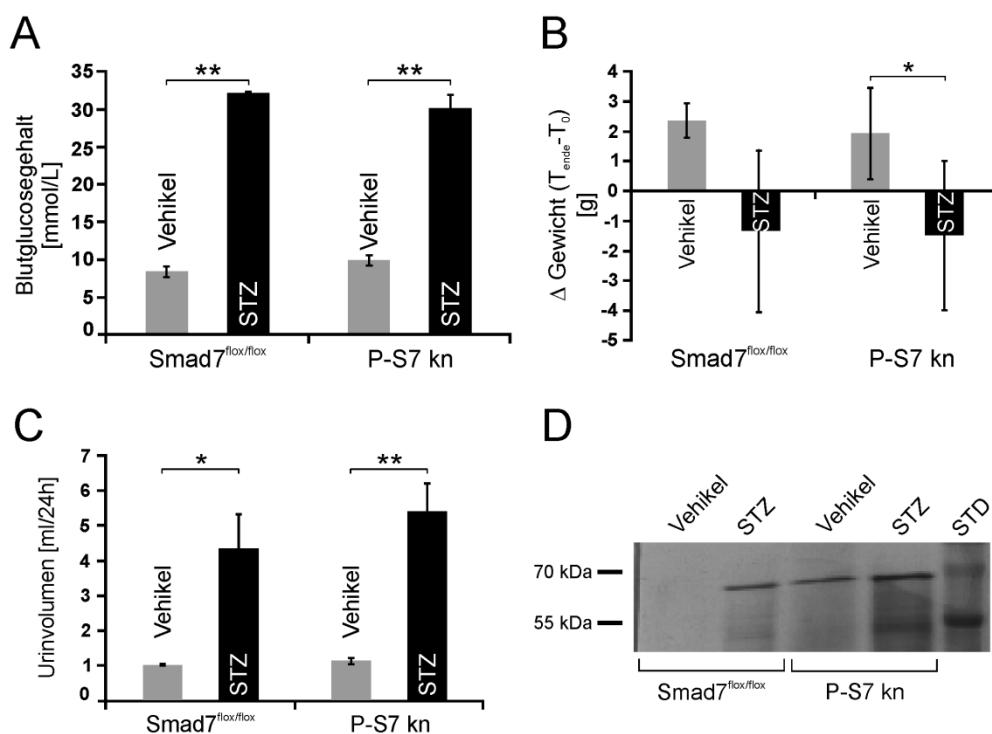
2 Monate nach der Behandlung von P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen konnten keine äußereren Anzeichen krankheitsbedingter Veränderungen beobachtet werden.

Die Analyse des Blutglucose-Spiegels ergab, dass Vehikel-injizierte (Vh-) P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tiere jeweils vergleichbar niedrige Blutzucker-Spiegel aufwiesen (Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>:  $8,36 \pm 1,30$  mmol/L; Vh-P-S7 kn:  $9,89 \pm 1,46$  mmol/L), die den physiologischen

Blutzucker-Werten im nicht-hungernden Zustand entsprachen (Abb. 40A). Demzufolge konnten die Tiere der Vh-Gruppe als nicht-diabetisch gewertet werden.

Die Blutglucose-Messung von STZ-injizierten (STZ-) Tieren ergab sowohl für STZ-P-S7 kn als auch STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tiere einen deutlichen Anstieg der Werte (Abb. 40A). Diese erwiesen sich im Vergleich zu den jeweiligen Vh-Kontrolltieren als hoch signifikant und bestätigten damit die Induktion von hyperglykämischen Bedingungen. STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tiere zeigten einen Blutglucose-Gehalt von  $32,14 \pm 0,33$  mmol/L. Die Bestimmung des Blutzuckers von STZ-P-S7 kn Mäusen lieferte einen Wert von  $30,23 \pm 1,84$  mmol/L. Tiere der Diabetes-Gruppen zeigten damit vergleichbare hyperglykämische Bedingungen, die keine statistisch relevanten Unterschiede der Diabetes-Tiere untereinander aufzeigten.

Gewichtsverlust stellt ein weiteres klassisches Symptom einer DM Erkrankung dar. Vh-Kontrollmäuse zeigten nach 2-monatiger Behandlungsdauer eine Gewichtszunahme (Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>:  $+2,37 \pm 0,57$  g; Vh-P-S7 kn:  $+1,94 \pm 1,52$  g) (Abb. 40B). Im Gegensatz dazu kam es bei STZ-Tieren zu einem Verlust an Körpergewicht (Abb. 40B). Im Schnitt verloren STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse  $-1,33 \pm 2,75$  g und STZ-P-S7 kn Tiere  $-1,47 \pm 2,49$  g. Dabei erwies sich die Gewichtsänderung zwischen behandelten und unbehandelten P-S7 kn Mäusen als signifikant, während der Vergleich von diabetischen und nicht-diabetischen Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen keine statistisch relevanten Gewichtsunterschiede ergab.



**Abb. 40: Diabetische P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten typische Symptome von DM.**

(A) Messung des Blutglucose-Gehalts an nicht-hungernden Mäusen. (B) Bestimmung des Körpergewichts der Mäuse im Laufe der Experimentdauer. (C) Volumen-Bestimmung des abgegebenen Urins durch die 24-stündige Haltung der Mäuse in metabolischen Käfigen (D) Silber-gefärbdetes Urin-Analysegel zur Detektion einer Proteinurie.  $n \geq 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$ .

Die Bestimmung des Urinvolumens verdeutlichte zusätzlich die Auswirkungen des induzierten DM. Während Vh-Tiere jeweils vergleichbare und im Normalbereich liegende Urinmengen innerhalb von 24 Stunden ausschieden (Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>:  $1,03 \pm 0,06$  ml/24h; Vh-P-S7 kn:  $1,14 \pm 1,22$  ml/24h), stieg das Urinvolumen der STZ-Mäuse signifikant um ein Vielfaches an (Abb. 40C). STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse schieden durchschnittlich  $4,37 \pm 1,70$  ml Urin pro 24 Stunden aus, während es bei STZ-P-S7 kn Tieren zu einem weiteren Anstieg der ausgeschiedenen Urinmenge kam (STZ-P-S7 kn:  $5,39 \pm 1,84$  ml/24h).

Um den Urin auf ein verstärktes Ausscheiden von Proteinen hin zu untersuchen, wurden die Urinproben anhand von Urin-Analyse-Gelen betrachtet. Während der Urin von Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen keine bis sehr schwache Albuminbanden bei 70 kDa lieferte, kam es in Vh-P-S7 kn Urinproben zum Teil zu einer Detektion einer leichten Albuminbande. P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Urinproben der STZ-Behandlungen lieferten stets eine detektierbare Albuminbande (Abb. 40D), die bei STZ-P-S7 kn Mäusen jeweils am stärksten ausfiel.

#### 5.6.1.2 Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten vergleichbare Symptome von DM

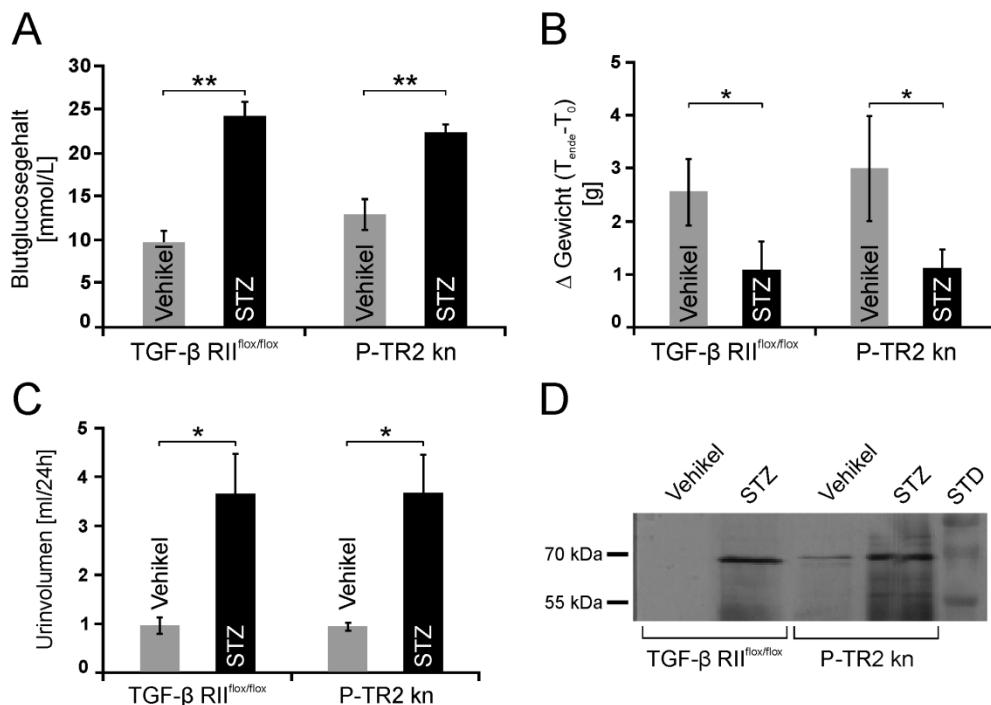
Die STZ-Behandlung der Tiere zeigte auch bei P-TR2 kn und TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen keine Beeinträchtigung im äußeren Erscheinungsbild oder des Verhaltens.

Die Messung der Blutglucose-Spiegel von Vh-Tieren lieferte sowohl bei P-TR2 kn als auch bei TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen physiologische Werte (Vh-P-TR2 kn:  $12,96 \pm 3,55$  mmol/L; Vh-TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>:  $12,96 \pm 3,55$  mmol/L) (Abb. 41A). Eine hoch signifikante Hyperglykämie konnte im Vergleich zu Vh-Kontrollen in allen STZ-Tieren bewiesen werden. STZ-P-TR2 kn Mäuse zeigten eine deutliche Erhöhung des Blutglucose-Gehalts auf  $22,33 \pm 2,16$  mmol/L. Die entsprechenden STZ-TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere lieferten eine Steigerung auf  $24,15 \pm 4,90$  mmol/L (Abb. 41A). Der Vergleich der beiden STZ-Mausgruppen untereinander lieferte dabei keinen signifikanten Unterschied.

Die Bestimmung der Gewichtsveränderung im Verlauf des Experiments ergab bei den nicht-diabetischen Kontrollen ein Zunahme des Körpergewichts (Abb. 41B). Nach 2 Monaten zeigten Vh-TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere eine Erhöhung des Gewichts um  $2,56 \pm 0,63$  g, während Vh-P-TR2 kn Mäuse  $3,00 \pm 0,99$  g an Körpermasse zunahmen. Beim Wiegen der STZ-P-TR2 kn und STZ-TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere wurde zwar kein Verlust an Körpergewicht gemessen, dennoch kam es zu einem deutlich reduzierten Anstieg der Körpermasse (Abb. 41B). STZ-P-TR2 kn Mäuse nahmen im Durchschnitt nur um  $1,11 \pm 0,38$  g zu, bei STZ-TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Tieren stieg das Gewicht nur um  $1,09 \pm 0,55$  g. Die Gewichts-

veränderung erwies sich dabei im Vergleich zu den entsprechenden Vh-Kontrollen als signifikant.

Die Urinvolumina lagen bei Vh-P-TR2 kn und Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen im Normalbereich und ergaben untereinander verglichen keine Unterschiede (Vh-P-TR2 kn:  $0,95 \pm 0,17$  ml/24h, Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $0,97 \pm 0,29$  ml/24h) (Abb. 41C). Im Gegensatz dazu, führte die STZ-Gabe sowohl in P-TR2 kn als auch in TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zu einer extremen Erhöhung der ausgeschiedenen Urinvolumina, die sich, verglichen mit den jeweiligen Vh-Kontrollen, als signifikant erwiesen (Abb. 41C). Die Urinmengen lagen bei STZ-P-TR2 kn Mäusen bei  $3,68 \pm 1,77$  ml/24h und entsprachen dem durchschnittlichen Volumen der STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere von  $3,67 \pm 1,21$  ml/24h.



**Abb. 41: Diabetische P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten typische Symptome von DM.**

(A) Messung des Blutglucose-Gehalts an nicht-hungernden Mäusen. (B) Bestimmung des Körpergewichts der Mäuse im Laufe der Experimentdauer. (C) Volumen-Bestimmung des abgegebenen Urins durch die 24-stündige Haltung der Mäuse in metabolischen Käfigen (D) Silber-gefärbtes Urin-Analysesegel zur Detektion einer Proteinurie. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; \*\*: p<0,001.

Die Betrachtung der ausgeschiedenen Proteine ergab auch in dieser Mauslinie nach der Behandlung mit STZ eine deutliche Albuminbande auf der Höhe von 70kDa, was eine beginnende Proteinurie anzeigen. Der Vergleich zwischen STZ-P-TR2 kn und STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen diesen Mäusen (Abb. 41D).

Die Ergebnisse der charakteristischen klinischen Daten deuteten insgesamt darauf hin, dass es bei dem Diabetes-Experiment in beiden untersuchten Mauslinien nach der Injektion von

STZ zu einer Induktion von hyperglykämischen Bedingungen innerhalb der behandelten Versuchsgruppen kam, während die physiologischen Bedingungen in den jeweiligen Kontrollgruppen erhalten blieben.

### 5.6.2 Untersuchungen von STZ-induzierten morphologischen Veränderungen

DN löst im Bereich der Glomeruli charakteristische histopathologische Merkmale wie *Foot Process Effacement* und eine Verdickung der GBM aus. Des Weiteren kommt es durch die Vermehrung der EZM zu Glomerulosklerosen. Das Auftreten solcher Veränderungen war Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen.

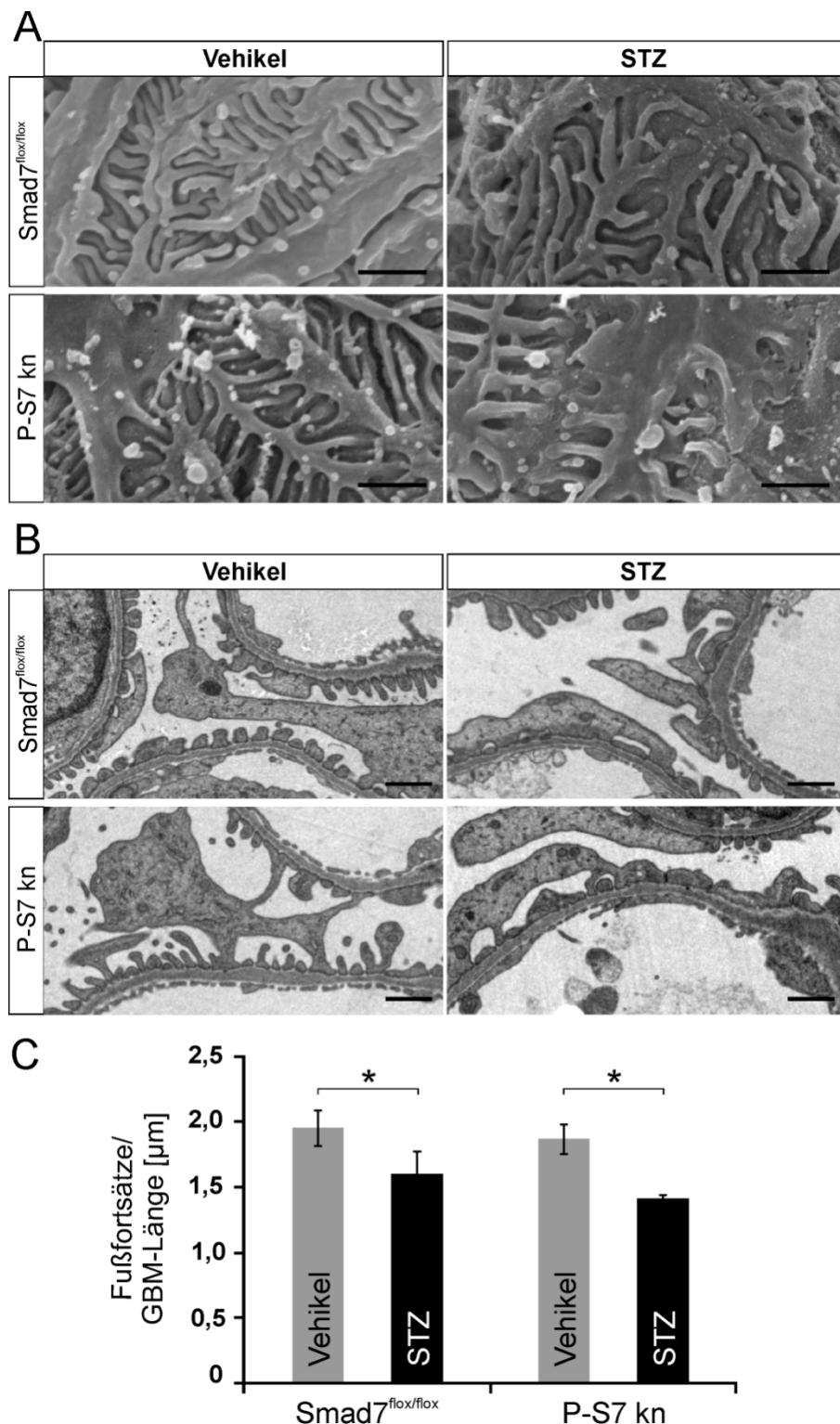
#### 5.6.2.1 Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten eine Verschlechterung der Glomeruli-Morphologie

Der Effekt von *Foot Process Effacement* ist eine Verbreiterung der einzelnen Fußfortsätze der Podozyten sowie deren Anlagerung an die GBM. Dieses Erscheinungsbild sollte zunächst durch die Betrachtung der Oberflächenbeschaffenheit der Glomeruli mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht werden.

Die REM-Aufnahmen von Vh-P-S7 kn und Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigten dabei strukturell normal aussehende und geformte Glomeruli. Es wurden fast ausschließlich charakteristische Podozyten mit Primärfortsätzen und Fußfortsätzen gesichtet (Abb. 42A, links). Im Gegensatz dazu, konnten in den Glomeruli diabetischer P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse atypische und strukturell veränderte Podozyten nachgewiesen werden. Es kam teilweise zum Verlust der geordneten und ineinander verzahnten Anordnung der einzelnen Fußfortsätze und die Glomeruli-Oberfläche erschien im Vergleich zu den Vh-Kontrollmäusen kompakter (Abb. 42A, links). Neben den strukturell stark veränderten Arealen waren allerdings stellenweise Bereiche sichtbar, die kaum Veränderungen aufwiesen.

Ähnliche Eindrücke erhielt man auch bei der Betrachtung der TEM-Aufnahmen. P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Glomeruli der Vh-Kontrollgruppe zeigten jeweils eine gleichmäßig geformte GBM, auf der die einzelnen Fußfortsätze der Podozyten in einer geordneten Verteilung aufsaßen (Abb. 42B, links). Dieses organisierte Erscheinungsbild konnte innerhalb von diabetischen P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen nur streckenweise entdeckt werden, während vermehrt stark verbreiterte Fußfortsätze zu erkennen waren (Abb. 42B, rechts). Zusätzlich ging die regelmäßige Beschaffenheit der GBM in diabetischen Tieren verloren. Der Vergleich der diabetischen P-S7 kn Mäuse mit STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigte eine

zunehmende Verschlechterung des morphologischen Erscheinungsbilds in STZ-P-S7 kn Tieren.



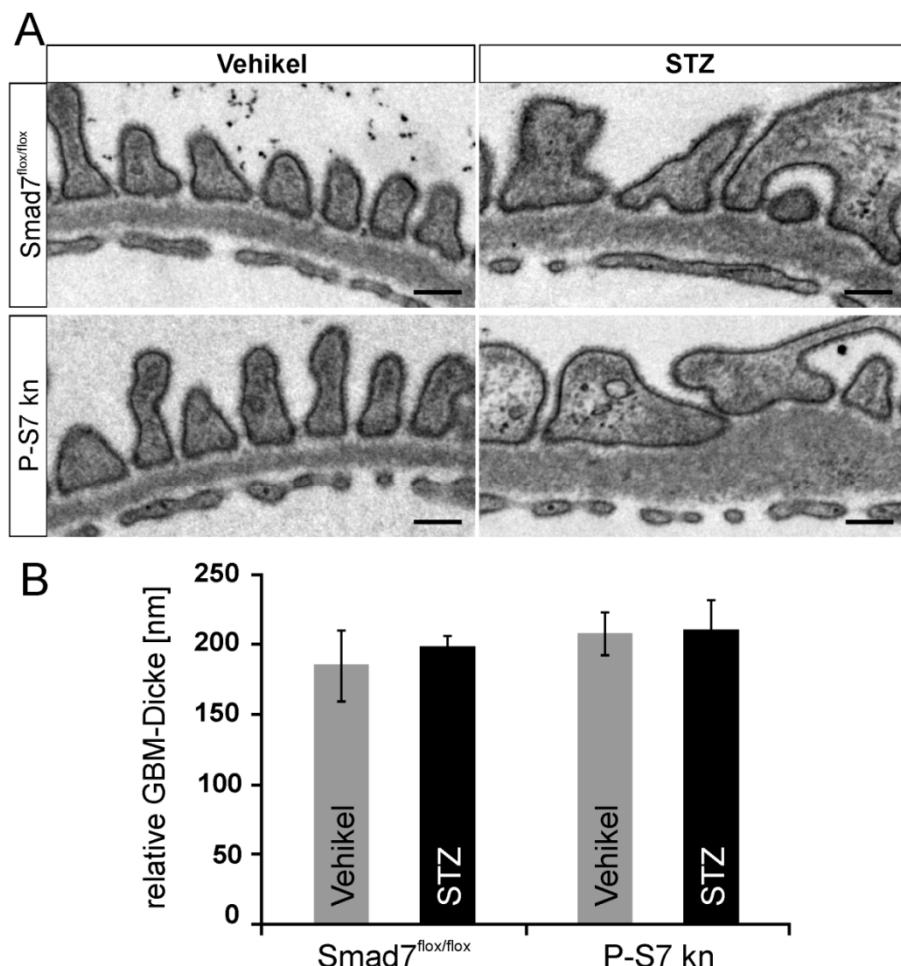
**Abb. 42: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten tendenziell eine Verschlechterung der Fußfortsatz-Frequenz.**  
 Analysiert wurden PS7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren 2 Monate nach Induktion von DM. (A) Exemplarische REM-Aufnahmen bei 20.000-facher Vergrößerung des Glomerulus. (B) Ausschnitte von TEM-Aufnahmen der Glomeruli. (C) Histologische Auswertung durch die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; REM-Messbalken: 1 µm; TEM-Messbalken: 500 nm.

Die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz ergab keinen Unterschied zwischen Vh-P-S7 kn Mäusen ( $1,88 \pm 0,12 \frac{1}{\mu m}$ ) und Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen ( $1,96 \pm 0,14 \frac{1}{\mu m}$ ) (Abb. 42C).

Durch die Behandlung mit STZ kam es sowohl bei P-S7 kn als auch bei Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Fußfortsätze entlang der GBM im Vergleich zu den entsprechenden Vh-Kontrollgruppen (Abb. 42C). Die Fußfortsatz-Frequenz von STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen betrug  $1,61 \pm 0,17 \frac{1}{\mu m}$ , in STZ-P-S7 kn Mäusen wurde ein Wert von  $1,42 \pm 0,04 \frac{1}{\mu m}$  ermittelt, wodurch eindeutig *Foot Process Effacement* Prozesse innerhalb der diabetischen Mausgruppen nachgewiesen werden konnten. Beim Vergleich der STZ-Tiere untereinander konnte zudem eine tendenzielle Verschlechterung bei STZ-P-S7 kn Mäusen festgestellt werden.

Die ultrastrukturelle Betrachtung der GBM in Vh-P-S7 kn und Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigte eine gleichmäßig geformte, dreischichtige Struktur (Abb. 43A, links), während es in beiden diabetischen Versuchsgruppen vermehrt zu einer deutlichen Verbreiterung der GBM kam (Abb. 43A, rechts). Sowohl STZ-P-S7 kn als auch diabetische Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tiere ließen stellenweise eine starke Zunahme der *Lamina densa* der GBM erkennen.

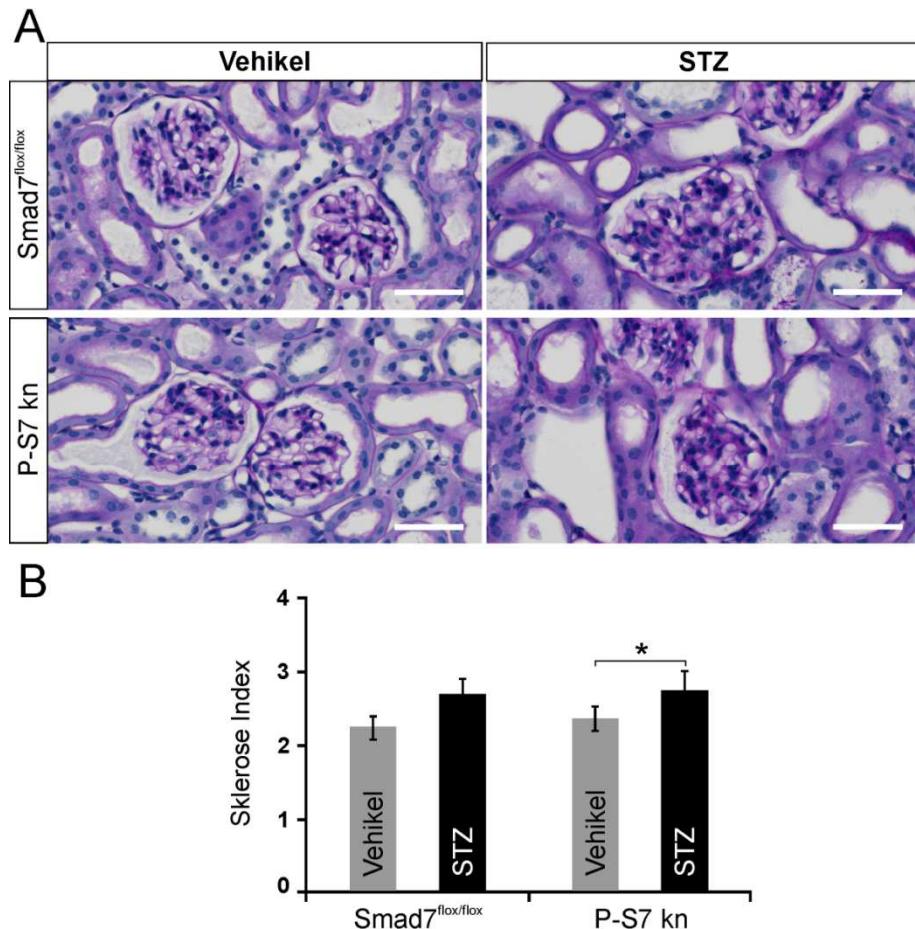
Die anschließende Quantifizierung der relativen GBM-Dicke ergab bei den Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tieren einen Wert von  $185,32 \pm 25,28$  nm, während es in Vh-P-S7 kn Mäusen zu einer leichten Verdickung der GBM auf  $207,74 \pm 15,46$  nm kam (Abb. 43B). Im Falle der Diabetes-Mäuse wurde festgestellt, dass STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tiere, im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren, insgesamt kaum eine Verdickung der GBM aufwiesen (STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>:  $198,79 \pm 8,13$  nm). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kam die Quantifizierung der GBM-Dicke von STZ-P-S7 kn Mäusen (STZ-P-S7 kn:  $210,04 \pm 22,41$  nm). Auch hier konnte kaum eine GBM-Dicken-Zunahme im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren detektiert werden (Abb. 43B).



**Abb. 43: Diabetische P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten nach 2 Monaten keine GBM-Verdickung.**  
 (A) Ausschnitt einer TEM-Aufnahme der GBM. (B) Histologische Auswertung durch Vermessung der relativen GBM Dicke. n≥3; Mittelwert ± SD; Messbalken: 100 nm

Insgesamt zeigten die beiden oben genannten Experimente, dass nach einem 2-monatigen Verlauf von DN initial *Foot Process Effacement* in diabetischen Mäusen auftritt, das bei diabetischen P-S7 kn Tieren tendenziell verstärkt wurde, während die Beschaffenheit der GBM zu diesem Zeitpunkt kaum bzw. nur streckenweise Veränderungen aufwies.

Als Nächstes sollten die morphologischen Veränderungen der EZM in den Glomeruli der Tiere des Diabetes-Versuchs analysiert werden. Mittels der Bestimmung des Sklerose Indexes wurde das Ausmaß von Glomerulosklerosen untersucht.



**Abb. 44: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten eine Verstärkung von Glomerulosklerose.**

(A) Ausschnitt eines PAS gefärbten Nierenschnitts. (B) Semiquantitative Bestimmung des Sklerose Indexes anhand einer graduellen Einteilung von 0 – 4 der sklerotischen Fläche innerhalb der Glomeruli. 0 = keine Sklerose; 1 = < 25%; 2 = 25 – 50%; 3 = 50 -75 %, 4 = > 75 %. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; Messbalken: 50 µm.

Vh-P-S7 kn und Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse offenbarten normal aussehende und relativ aufgelockert erscheinende Glomeruli, mit wenigen sklerotischen Flächen (Abb. 44A, links). Die STZ-Mäuse zeigten im Gegensatz dazu einen deutlichen Anstieg von Glomerulosklerosen (Abb. 44A, rechts).

Anhand der semi-quantitativen Bestimmung des Sklerose Indexes wurde festgestellt, dass die Vh-Kontrollgruppe für beide Maustypen ähnliche Index-Werte ergab (Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>: 2,25 ± 0,15; Vh-P-S7 kn: 2,38 ± 0,16), die untereinander verglichen keine statistisch relevanten Unterschiede aufwiesen (Abb. 44A). Im Gegensatz dazu lieferten STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäuse einen Sklerose Index von 2,69 ± 0,21 und zeigten somit eine graduelle Verschlechterung der Glomeruli-Beschaffenheit im Vergleich zu Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Tieren. In diabetischen P-S7 kn Mäusen war dieser Index noch weiter erhöht (STZ-P-S7 kn: 2,75 ± 0,28) und zeigte dabei im Vergleich zu den entsprechenden Vh-Kontrolltieren, dass es bereits zu einem signifikanten Anstieg von Glomerulosklerosen kam (Abb. 44A).

### 5.6.2.2 Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine Verbesserung der Glomeruli-Morphologie

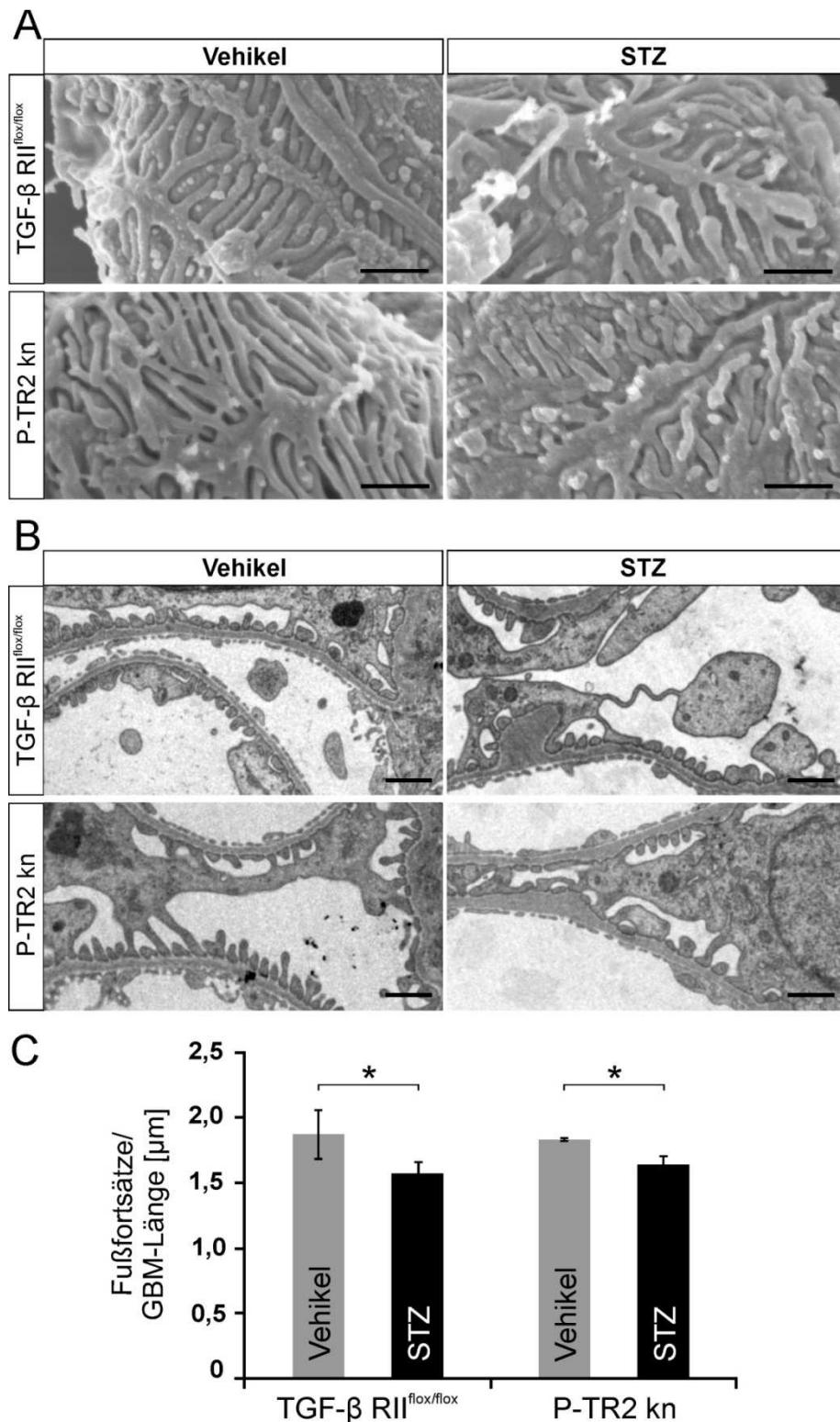
Parallel wurde nach einer 2-monatigen STZ-Behandlung die glomeruläre Morphologie von nicht-diabetischen und diabetischen P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen analysiert und beurteilt.

Sowohl Vh-P-TR2 kn als auch Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere lieferten REM-Aufnahmen, die morphologisch normal aussehende Podozyten und ihre ineinander verzahnten Fußfortsätze aufzeigten (Abb. 45A, links).

Verglich man diese REM-Aufnahmen mit Bildern von P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen der Diabetes-Gruppen, wurde erkennbar, dass diabetische P-TR2 kn und STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Glomeruli ihre geordnete und ineinander verzahnte Anordnung der podozytären Fußfortsätze verloren und damit streckenweise *Foot Process Effacement* Prozesse aufwiesen (Abb. 45A, rechts).

Die Betrachtung der TEM-Bilder von Vh-P-TR2 kn und Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen zeigten ein normales Erscheinungsbild der strukturellen Komponenten der Glomeruli (Abb. 45B, links), während die organisierte Fußfortsatz-Anordnung sowohl in diabetischen P-TR2 kn als auch STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tieren in weiten Strecken verloren ging (Abb. 45B, rechts).

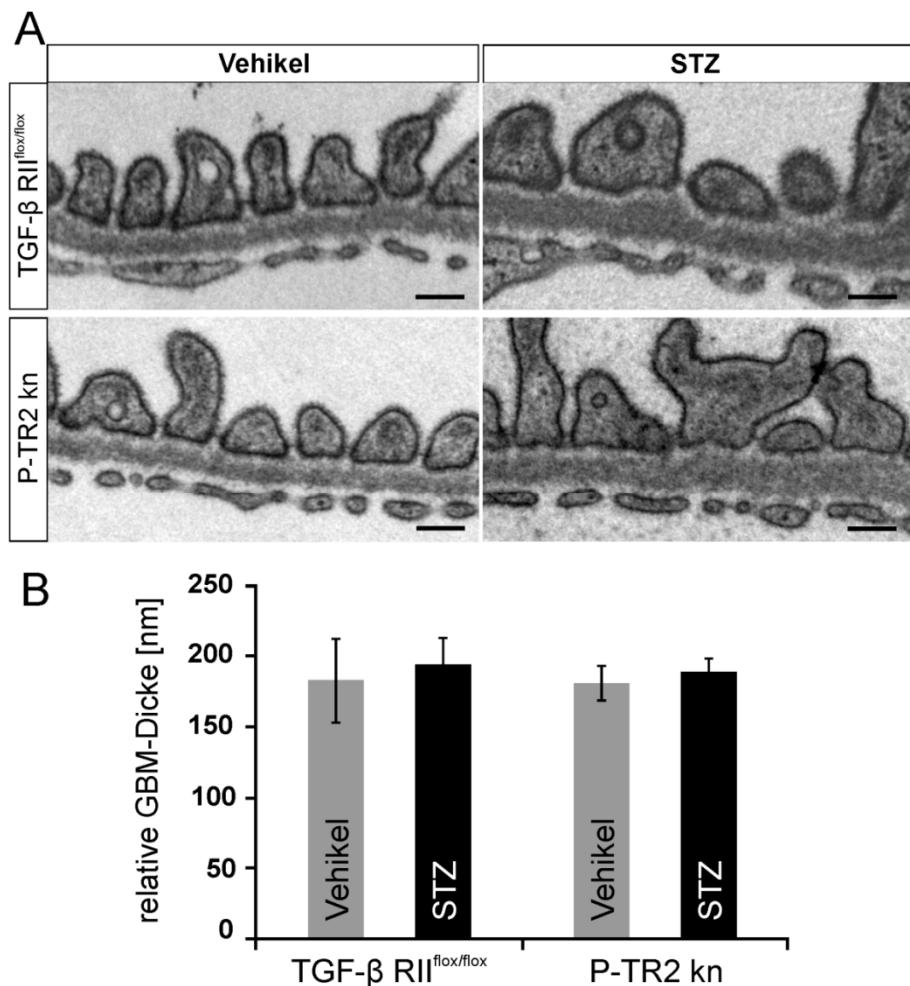
Um diese Eindrücke zu verifizieren, erfolgte die histologische Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz. Hierbei wurde festgestellt, dass die Tiere der nicht-diabetischen Kontrollgruppen jeweils vergleichbare Frequenz-Werte aufwiesen (Vh-P-TR2 kn:  $1,83 \pm 0,01 \frac{1}{\mu m}$ ; Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $1,87 \pm 0,19 \frac{1}{\mu m}$ ) (Abb. 45C). Im Gegensatz dazu konnten beginnende *Foot Process Effacement* Prozesse sowohl in diabetischen P-TR2 kn als auch STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tieren durch eine signifikante Reduktion der Fußfortsatz-Frequenz ermittelt werden (STZ-P-TR2 kn:  $1,64 \pm 0,08 \frac{1}{\mu m}$ ; STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $1,57 \pm 0,10 \frac{1}{\mu m}$ ) (Abb. 45C). Verglich man diabetische P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse untereinander, konnte eine leichte, tendenzielle Verbesserung der Fußfortsatz-Frequenz innerhalb von diabetischen P-TR2 kn Mäusen detektiert werden.



**Abb. 45: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine Verbesserung der Fußfortsatz-Frequenz.**

Analysiert wurden P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{flox/flox}$ -Kontrollnieren 2 Monate nach Induktion von DM. (A) REM-Aufnahmen bei 20.000facher Vergrößerung des Glomerulus. (B) Ausschnitte von TEM-Aufnahmen der Glomeruli. (C) Histologische Auswertung durch die Bestimmung der Fußfortsatz-Frequenz. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; REM-Messbalken: 1 µm; TEM-Messbalken: 500 nm.

Die Analyse der GBM-Beschaffenheit zeigte sowohl bei Vh-P-TR2 kn als auch bei Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen der Kontrollgruppen eine normale dreischichtige Struktur (Abb. 46A, links), während es in den diabetischen Versuchsgruppen bei STZ-P-TR2 kn und STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tieren teilweise zu einer Verbreiterung der GBM im Bereich der *Lamina densa* kam (Abb. 46A, rechts).



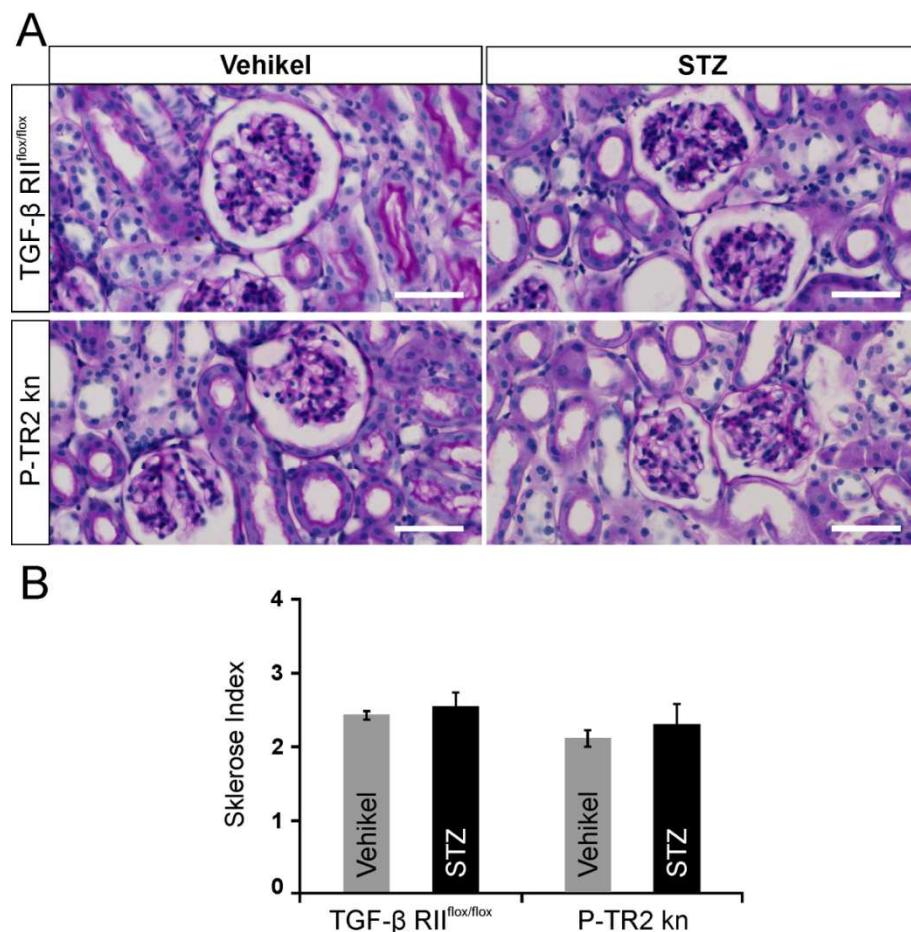
**Abb. 46: Diabetische P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse zeigten nach 2 Monaten keine GBM-Verdickung.** (A) Ausschnitt einer TEM-Aufnahme der GBM. (B) Histologische Auswertung durch Vermessung der relativen GBM Dicke. n≥3; Mittelwert ± SD; Messbalken: 100 nm

Durch die Vermessung der relativen GBM-Dicke konnten vergleichbare GBM-Dicken von Vh-P-TR2 kn und Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen ermittelt werden (Vh-P-TR2 kn:  $181,59 \pm 12,61$  nm; Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>:  $182,90 \pm 29,18$  nm) (Abb. 46B). Im Falle der Diabetes-Mäuse wurde festgestellt, dass auch bei dieser Mauslinie nach einer Behandlungsdauer von 2 Monaten insgesamt kaum eine bis keine Verdickung der GBM auftrat. STZ-P-TR2 kn Mäuse lieferten eine relative GBM-Dicke von  $189,31 \pm 10,76$  nm, während STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere eine GBM-Dicke von durchschnittlich  $193,95 \pm 19,40$  nm zeigten (Abb. 46B).

Demzufolge konnte auch hier betätigt werden, dass die Pathogenese von DN mit *Foot Process Effacement* Prozessen begann, während die GBM Homöostase anfänglich noch unverändert blieb.

Die anschließend durchgeführten Untersuchungen beschäftigten sich mit den sklerotischen Prozessen innerhalb der Glomeruli.

Unter dem Lichtmikroskop wurde sichtbar, dass Vh-P-TR2 kn und Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse relativ normal erscheinende Glomeruli mit sehr geringen Anteilen an PAS-positiven Flächen besaßen (Abb. 47A, links). Die Gegenüberstellung dazu zeigte, dass in diabetischen P-TR2 kn und STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen vermehrt PAS-positive, sklerotische Flächen im Inneren der Glomeruli gesichtet wurden (Abb. 47A, rechts).



**Abb. 47: Diabetische Mäuse zeigten keine eindeutige Steigerung von Glomerulosklerose.**

(A) Ausschnitt eines PAS gefärbten Nierenschnitts. (B) Semiquantitative Bestimmung des Sklerose Indexes anhand einer graduellen Einteilung von 0 – 4 der sklerotischen Fläche innerhalb der Glomeruli. 0 = keine Sklerose; 1 = < 25%; 2 = 25 – 50%; 3 = 50 -75 %, 4 = > 75 %. n≥3; Mittelwert ± SD; \*: p<0,05; Messbalken: 50 µm.

Die Quantifizierung dieser Beobachtungen erfolgte anschließend durch die Bestimmung des Sklerose-Indexes. Der niedrigste Sklerose Index wurde dabei bei Vh-P-TR2 kn Tieren ermittelt und ergab einen Wert von  $2,11 \pm 0,11$ , während der Index-Wert der Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrolltiere leicht erhöht bei  $2,43 \pm 0,06$  lag (Abb. 47B). Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Vh-P-TR2 kn Kontrollmäusen einen leicht erhöhten Sklerose Index (STZ-P-TR2 kn:  $2,30 \pm 0,27$ ). Den höchsten Sklerose Index wiesen STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäuse mit einem durchschnittlichen Wert von  $2,54 \pm 0,21$  auf (Abb. 47B). Insgesamt konnte in den Diabetes Gruppen nach 2 Monaten jedoch noch kein statistisch relevanter Anstieg von Glomerulosklerose detektiert werden.

### 5.6.3 Untersuchungen von extrazellulären Matrix Proteinen nach Induktion von DN

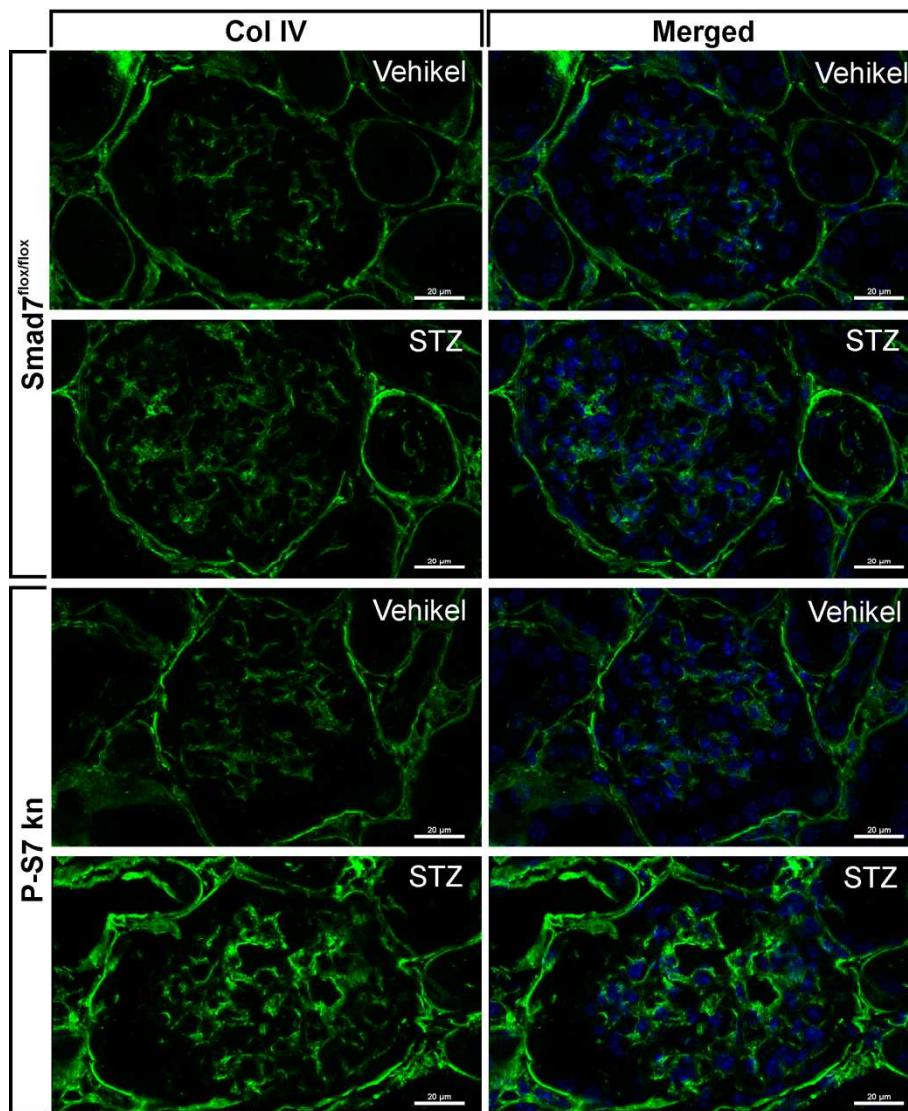
DN geht mit einer Dysregulation der Homöostase der EZM einher. Typisch ist eine Akkumulation von EZM-Proteinen im Bereich der Glomeruli und der GBM. Charakteristische Marker für diese Veränderungen sind Kollagen Typ IV (Col IV) und Fibronektin. Infolgedessen wurden in den folgenden Experimenten die Expressionsmuster von Col IV und Fibronektin in den Glomeruli von Tieren des Diabetes-Versuchs untersucht.

#### 5.6.3.1 Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten eine verstärkte Induktion von Col IV und Fibronektin

Die Fluoreszenz-Färbung von Col IV war in allen Strukturen der Nieren zu erkennen, die eine Basalmembran aufwiesen.

In den Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen konnte der Level einer basalen Expression von Col IV nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz-Färbung verteilte sich dabei gleichmäßig innerhalb des gesamten Glomerulus (Abb. 48, Reihe 1). Innerhalb der Vh-P-S7 kn Tiere erhöhte sich bereits die Intensität des Fluoreszenz-Signals für Col IV (Abb. 48, Reihe 3). Die Verteilung der Col IV-Färbung fiel dabei im Vergleich zu den Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollen diffuser aus.

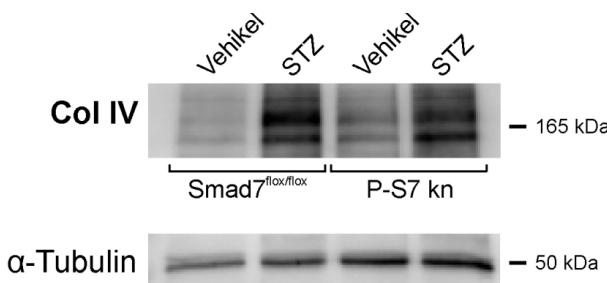
Bei allen Mäusen der diabetischen Versuchsgruppen (STZ-P-S7 kn und STZ-Smad7<sup>flox/flox</sup>) kam es zu einer eindeutigen Verstärkung des Col IV-Signals. Diese Erhöhung konnte dabei im Vergleich zu Vh-Smad7<sup>flox/flox</sup>-Mäusen, aber auch verglichen mit Vh-P-S7 kn Tieren beobachtet werden. (Abb. 48, Reihe 2). Die Untersuchung des Col IV Fluoreszenz-Signals von diabetischen P-S7 kn Mäusen machte deutlich, dass die Col IV Expression in diesen Tieren zusätzlich verstärkt wurde. (Abb. 48, Reihe 4).



**Abb. 48: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten die stärkste Induktion der Col IV Expression.**

Fluoreszenz-Färbung von Col IV an Gefrierschnitten von nicht-diabetischen und diabetischen P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Nicht-diabetische Smad7<sup>flox/flox</sup>-Glomeruli zeigten eine basale Expression von Col IV, die bereits in nicht-diabetischen P-S7 kn Tieren leicht gesteigert wurde. Diabetische Smad7<sup>flox/flox</sup>- und P-S7 kn Mäuse zeigen eine deutliche Induktion von Col IV, welche in STZ-P-S7 kn Tieren nochmals verstärkt wurde. Grün: Col IV; Blau: DAPI; Messbalken: 50 µm.

Dieser Befund sollte daraufhin durch Western Blot Analysen bestätigt werden. Hierfür wurden Gesamtprotein-Extrakte aus Glomeruli der Mäuse des Diabetes-Experiments herangezogen. Die Analyse der Expressionslevel von Col IV erfolgte daraufhin durch die Detektion spezifischer Col IV Banden auf einer Höhe von ca. 164 kDa.



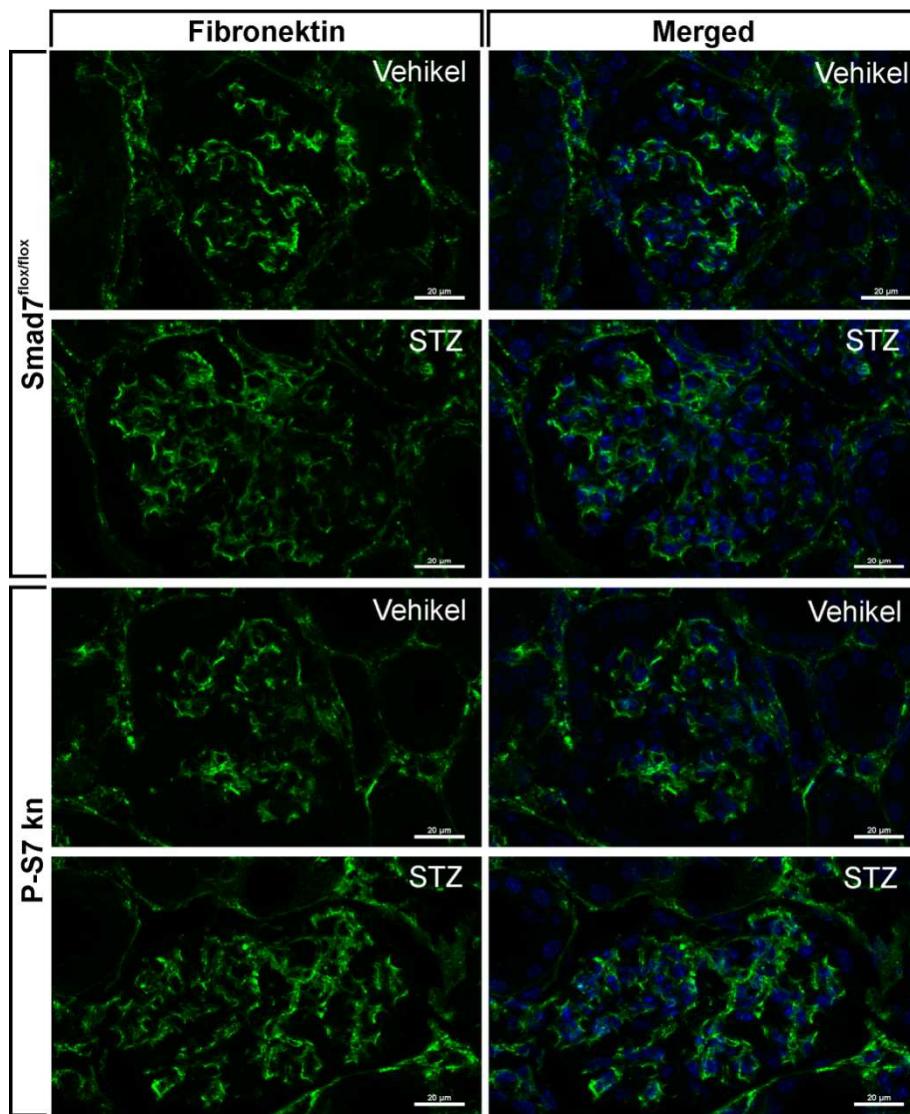
**Abb. 49: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten die stärkste Induktion der Col IV Expression.**

Western Blot Analyse von Glomeruli-Proteinen aus nicht-diabetischen und diabetischen P-S7 kn und Smad7<sup>fl/fl</sup>-Mäusen. Eine spezifische Col IV Bande wurde auf einer Höhe von ~ 164 kDa detektiert. Als Ladungskontrolle des Western Blots diente  $\alpha$ -Tubulin auf einer Höhe von 50 kDa.

Das erhaltene Western Blot Ergebnis entsprach dabei den zuvor erzielten Ergebnissen der Fluoreszenz-Färbung. Während Vh-Smad7<sup>fl/fl</sup>-Mäuse das schwächste Signal für Col IV lieferten, kam es in Vh-P-S7 kn Tieren bereits zu einer leichten Steigerung der Col IV Expression. Diabetische P-S7 kn und STZ-Smad7<sup>fl/fl</sup>-Tiere zeigten jeweils eine eindeutige und starke Induktion der Col IV Expression. Diese wurde in STZ-P-S7 kn Mäusen nochmals verstärkt (Abb. 49).

Als nächstes Experiment erfolgte die Fluoreszenz-Färbung von Fibronektin. In den Glomeruli von Vh-Smad7<sup>fl/fl</sup>-Mäusen war eine basale Expression von Fibronektin zu erkennen, die gleichmäßig verteilt innerhalb der Glomeruli vorlag (Abb. 50, Reihe 1). Nicht-diabetische P-S7 kn Tiere zeigten eine leichte Induktion von Fibronektin. (Abb. 50, Reihe 3).

Eine stark erhöhte Intensität für Fibronektin konnte in allen Mäusen der Diabetes-Versuchsgruppen beobachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass STZ-Smad7<sup>fl/fl</sup>-Tiere, im Vergleich zu den entsprechenden Vh-Kontrolltieren, eine vermehrte Fibronektin Expression vorwiegend im Bezug auf das flächige Ausmaß aufwiesen, während die Intensität des Signals nur leicht stieg (Abb. 50, Reihe 2). Die deutlich stärkste Färbung für Fibronektin wurde in STZ-P-S7 kn Mäusen detektiert. Im Vergleich zu allen anderen Färbungen (Vh-Smad7<sup>fl/fl</sup>; Vh-P-S7 kn und STZ-Smad7<sup>fl/fl</sup>) wurde hier eine Induktion von Fibronektin beobachtet, die sowohl flächig als auch bezüglich der Intensität verstärkt wurde (Abb. 50, Reihe 4).

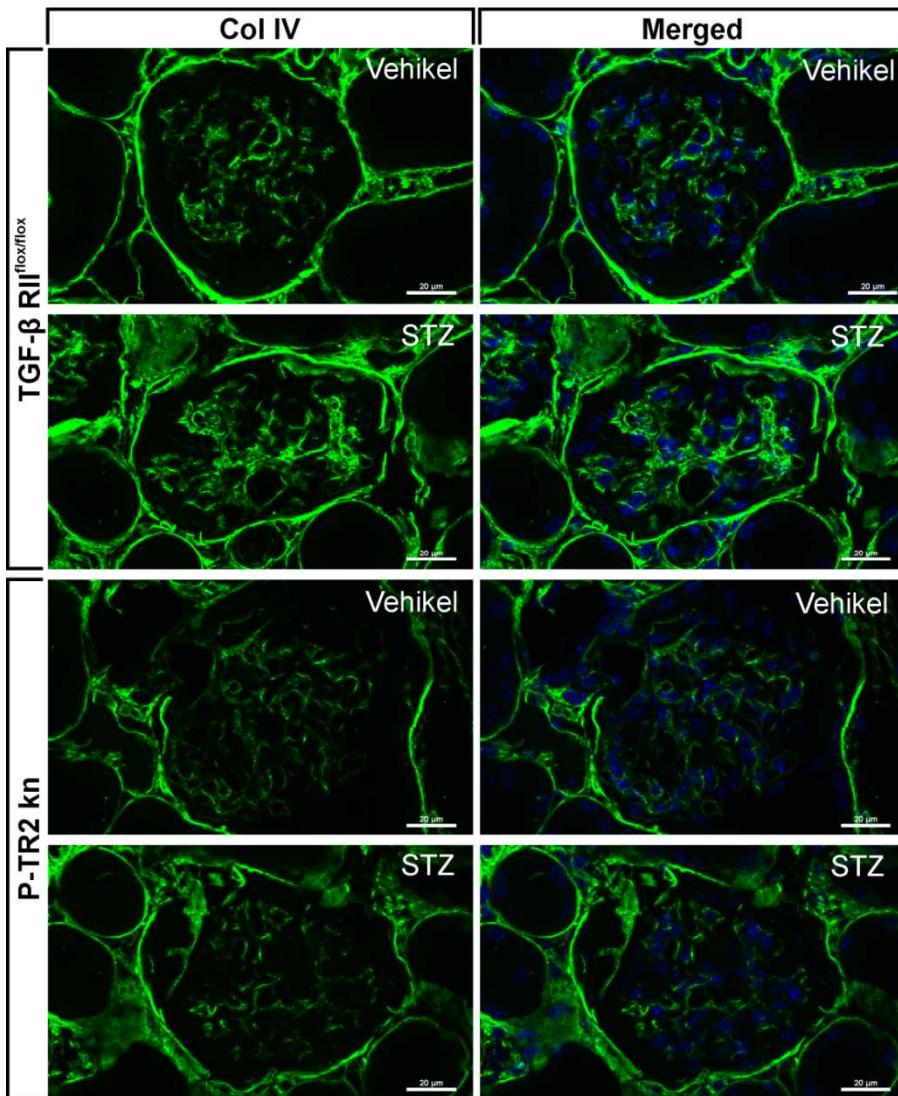


**Abb. 50: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten die stärkste Induktion der Fibronektin Expression.**

Fluoreszenz-Färbung von Fibronektin an Gefrierschnitten von nicht-diabetischen und diabetischen P-S7 kn und Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollnieren. Nicht-diabetische Smad7<sup>flox/flox</sup>-Glomeruli zeigten eine basale Expression von Fibronektin, die bereits in nicht-diabetischen P-S7 kn Tieren leicht gesteigert wurde. Diabetische Smad7<sup>flox/flox</sup>- und P-S7 kn Mäuse zeigen eine deutliche Induktion von Fibronektin, welche in STZ-P-S7 kn Tieren nochmals verstärkt wurde. Grün: Fibronektin; Blau: DAPI; Messbalken: 50 µm.

#### 5.6.3.2 Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine Induktion von Col IV und Fibronektin

Das Col IV Expressionsmuster wurde analog in nicht-diabetischen und diabetischen P-TR2 kn und TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen untersucht.

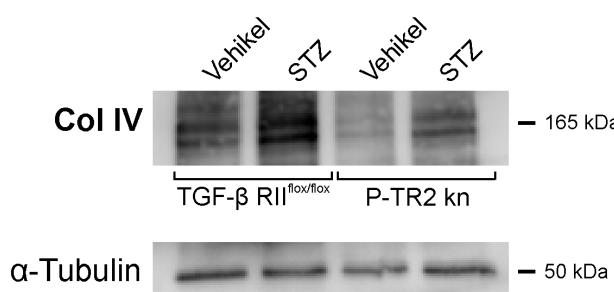


**Abb. 51: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine gesteigerte Induktion der Col IV Expression.**

Fluoreszenz-Färbung von Col IV an Gefrierschnitten von nicht-diabetischen und diabetischen P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>fl/fl</sup>-Kontrollnieren. Nicht-diabetische TGF- $\beta$  RII<sup>fl/fl</sup>- und P-TR2 kn Glomeruli zeigten eine basale Expression von Col IV. Diabetische TGF- $\beta$  RII<sup>fl/fl</sup>-Mäuse zeigten eine deutliche Induktion von Col IV, welche in STZ-P-TR2 kn nicht stattfand. Grün: Col IV; Blau: DAPI; Messbalken: 50  $\mu$ m.

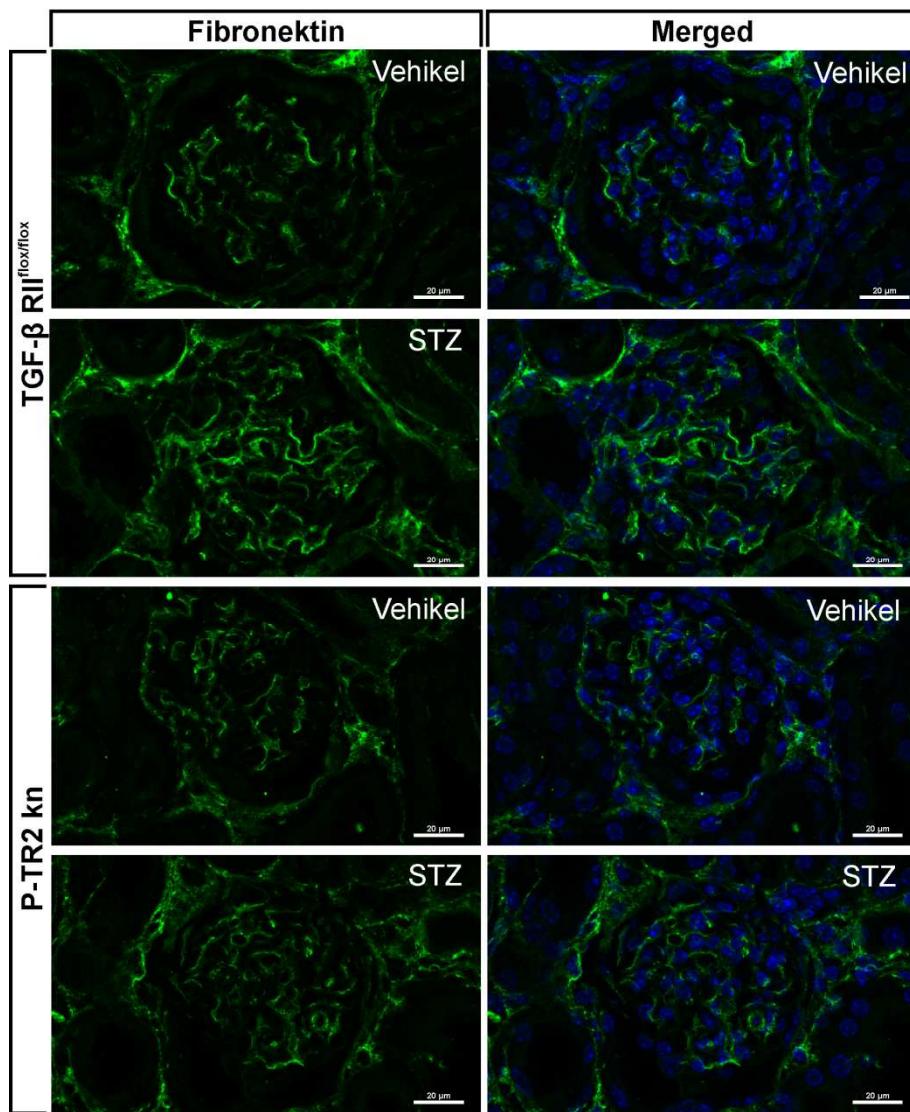
Innerhalb der Glomeruli von Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>fl/fl</sup>-Mäusen konnte ein gleichmäßig verteilter, basaler Level einer Col IV Expression beobachtet werden (Abb. 51, Reihe 1). In Vh-P-TR2 kn Glomeruli wurde eine Reduktion der basalen Expression von Col IV detektiert (Abb. 51, Reihe 3). Die eindeutig stärkste Col IV-Färbung war in STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>fl/fl</sup>-Glomeruli zu erkennen (Abb. 51, Reihe 2). Diese durch die STZ-Behandlung induzierte Expressionssteigerung war an Färbungen der diabetischen P-TR2 kn Mäuse nicht zu erkennen. Innerhalb dieser Glomeruli wurde eine Col IV-Expression sichtbar, die dem Erscheinungsbild der Col IV-Färbung der Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>fl/fl</sup>-Tiere ähnlich war (Abb. 51, Reihe 4).

Um diese beobachteten Ergebnisse genauer zu verifizieren, sollten die verschiedenen Expressionsmuster anhand von Western Blot Analysen überprüft werden. Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Tiere zeigten eine deutliche Col IV Bande auf der erwarteten Höhe von ca. 164 kDa. Im Vergleich dazu wiesen nicht-diabetische P-TR2 kn Mäuse eine deutliche Reduktion von Col IV auf und lieferten damit die schwächste Bande. Eine eindeutige und starke Induktion der Col IV Expression konnte bei STZ-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen detektiert werden. Eine solche Induktion fehlte bei STZ-P-TR2 kn Tieren, deren Col IV Menge nur auf das basale Expressionsniveau von Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen angehoben werden konnte (Abb. 52).



**Abb. 52: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten eine minimal gesteigerte Induktion der Col IV Expression.**  
Western Blot Analyse von Glomeruli-Proteinen aus nicht-diabetischen und diabetischen P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen. Eine spezifische Col IV Bande wurde auf einer Höhe von ~164 kDa detektiert. Als Ladungskontrolle des Western Blots diente  $\alpha$ -Tubulin auf einer Höhe von 50 kDa.

Abschließend beschäftigten sich die Untersuchungen mit dem Expressionsprofil von Fibronectin. Es konnte gezeigt werden, dass Glomeruli von Vh-TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Mäusen eine basale Expression von Fibronectin aufwiesen, die sich über den gesamten Glomerulus verteilte (Abb. 53, Reihe 1). Innerhalb der Vh-P-TR2 kn Tiere kam es zu vergleichbar geringen Fibronectin Expressionslevel (Abb. 53, Reihe 3).



**Abb. 53: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine gesteigerte Induktion der Fibronektin Expression.**

Fluoreszenz-Färbung von Fibronektin an Gefrierschnitten von nicht-diabetischen und diabetischen P-TR2 kn und TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Kontrollnieren. Nicht-diabetische TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ - und P-TR2 kn Glomeruli zeigten eine basale Expression von Col IV. Diabetische TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Mäuse zeigten eine deutliche Induktion von Fibronektin, welche in STZ-P-TR2 kn nicht stattfand. Grün: Fibronektin; Blau: DAPI; Messbalken: 50  $\mu$ m.

Eine Reduktion des Signals, wie sie bei Col IV detektiert wurde, konnte hier nicht festgestellt werden. Das deutlich stärkste Fibronektin-Signal wurde bei STZ-TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Tieren beobachtet (Abb. 53, Reihe 2). Eine starke, durch STZ-induzierte Erhöhung von Fibronektin konnte in diabetischen P-TR2 kn Mäusen nicht festgehalten werden (Abb. 53, Reihe 4). Eine Induktion von Fibronektin erreichte lediglich das Expressionsniveau von nicht-diabetischen TGF- $\beta$  RII $^{fl/fl}$ -Tieren.

## 6 Diskussion

### 6.1 Generierung der Podozyten-spezifischen Knockout Mauslinien P-S7 kn und P-TR2 kn

Die Analysen zur funktionellen Rolle des TGF- $\beta$  Signalwegs in Podozyten sollten durch die Generierung zweier Mausmodelle mit einem Podozyten-spezifischen Knockout erfolgen.

Durch das genetische Entfernen des inhibitorisch wirkenden Smad7 sollten die Folgen eines desinhibierten TGF- $\beta$  Signalwegs untersucht werden (P-S7 kn). Zusätzlich wurde eine Mauslinie generiert, deren Podozyten durch den Zell-spezifischen Knockout des TGF- $\beta$  RII nicht in der Lage sein sollten, auf eine Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalwegs zu reagieren (P-TR2 kn). Dementsprechend wurden zwei weitgehend gegenläufige, konditionelle Knockout-Modelle entwickelt, die erstmals die Möglichkeit boten, Aufschlüsse über die funktionelle Wirkungsweise des TGF- $\beta$  Signalwegs innerhalb der Podozyten *in vivo* zu erhalten.

Durch die Verpaarung der p2.5P-Cre- (Podo-Cre) Maus mit geflochtenen Smad7 bzw. TGF- $\beta$  RII Mäusen wurden die beiden Mauslinien P-S7 kn und P-TR2 kn mit ihren entsprechenden Geschwister-Kontrolltieren ( $\text{Smad7}^{\text{flox/flox}}$  und  $\text{TGF-}\beta\text{ RII}^{\text{flox/flox}}$ ) generiert (Chytil *et al.*, 2002; Kleiter *et al.*, 2010; Moeller *et al.*, 2003; Seo and Serra, 2007).

Anhand der vorgenommenen Analysen zur Verifizierung des Knockouts konnten sowohl für P-S7 kn als auch P-TR2 kn Mäuse insgesamt folgende Ergebnisse festgehalten werden: (1) Die erfolgreiche Rekombination innerhalb der Glomeruli-DNA. (2) Die Reduktion der Smad7 bzw. TGF- $\beta$  RII mRNA Expression in Glomeruli und primären Podozyten. (3) Die Reduktion der Smad7 bzw. TGF- $\beta$  RII Protein-Translation in Glomeruli und primären Podozyten. (4) Eine gesteigerte Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalwegs durch eine vermehrte Phosphorylierung von Smad2 (pSmad2) in Glomeruli von P-S7 kn Mäusen und entgegengesetzt eine reduzierte Aktivierung von pSmad2 in Glomeruli von P-TR2 kn Mäusen.

Die Analysen auf Transkriptions- und Translationsebene wurden zum einen an Glomeruli und zum anderen an primären Podozyten durchgeführt. P-S7 kn Glomeruli wiesen eine ~ 50 %ige Reduktion von Smad7 auf, während P-TR2 kn Glomeruli sogar eine Verringerung des TGF- $\beta$  RII um ~ 60 % zeigten. Die restliche Expression dieser Proteine in den Glomeruli der PS7 und PTR2 Tiere ist der Tatsache geschuldet, dass die verwendeten Glomeruli neben den, vom Knockout betroffenen Podozyten, auch einen geringen Anteil an Fremdzellen wie Mesangial- und Endothel-Zellen enthielten. Diese Zellen waren durch den Podozyten-spezifischen Knockout nicht betroffen und wiesen infolgedessen normale basale

Expressionslevel von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII auf. Ähnliche Ergebnisse erzielten El-Aouni *et al.*, der ebenfalls die Podo-Cre Maus für einen zellspezifischen Knockout verwendete. Nach dem podozytären Knockout der Integrin-like Kinase (ILK) konnten eine deutliche Reduktion der ILK Expression innerhalb der Glomeruli detektiert werden (El-Aouni *et al.*, 2006).

Die weiterführenden Untersuchungen zum Nachweis des Knockouts lieferten in angereicherten primären Podozytenkulturen eine zusätzliche Reduktion des Expressionsniveaus von Smad7 und des TGF- $\beta$  RII, jedoch konnte kein 100-prozentiger Knockout nachgewiesen werden. Aus anderen Studien ist bekannt, dass ein kritischer Punkt bei dieser Aussage die Reinheit der primären Zellkultur darstellt. Eine Kontamination mit Fremdzellen führt als Folge zu einer veränderten Aussage. Ma *et al.* zeigten auf Protein-Ebene für Mäuse mit einem Podozyten-spezifischen Knockout für FAK (Focal adhesion Kinase), dass der Nachweis des Knockout vom Reinheitsgrad der primär isolierten Podozyten abhängig ist. Erst bei einer Reinheit von 97% wiesen die primären Podozyten keine Bande auf der entsprechenden Höhe von FAK auf (Ma *et al.*, 2010). Vergleicht man diese Ergebnisse, mit der noch verbleibenden Rest-Expression von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII in dieser Arbeit, könnte der Unterschied damit erklärt werden, dass die hier verwendeten Podozyten eine Anreicherung von ca. 87 % zeigten. Das Ausmaß der verbleibenden Rest-Expression entsprach folglich genau dem verhältnismäßigen Grad der Kontaminationen mit Fremdzellen und kann daher als Grund für diese Rest-Expression gelten. Der nächste starke Hinweis, dass Podozyten der jeweiligen Knockout-Linien nicht in der Lage waren die betroffenen Proteine zu exprimieren, wurde in dieser und anderen Arbeiten durch Fluoreszenz-Färbungen bestätigt (George *et al.*, 2012; Johnstone *et al.*, 2011).

## 6.2 Phänotypanalyse der P-S7 kn und P-TR2 kn Mauslinien

Nach der Verifizierung des erfolgreichen Podozyten-spezifischen Knockouts von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII konnte mit der Analyse des morphologischen Phänotyps der beiden Mauslinien begonnen werden. Der Fokus wurde hierbei zum einen auf die allgemeine Glomerulogenese und die Morphologie der einzelnen Glomeruli gelegt, zum anderen sollte die Podozyten-Morphologie im Speziellen untersucht werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Analyse der Funktion des TGF- $\beta$  Signalwegs während der Glomerulogenese ist, dass die Cre-Rekombinase zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung exprimiert wird. Moeller *et al.* konnten nach Verpaarung der Podo-Cre Maus mit einer Reportermaus anhand von LacZ-Färbungen nachweisen, dass der Promoter während der Capillary-loop Phase aktiviert wird (Moeller *et al.*, 2003), was dem Zeitpunkt der

beginnenden Ausdifferenzierung der Podozyten entspricht, die bei Mäusen beim Übergang der s-förmigen zur *Capillary-loop* Phase während der Glomerulogenese am embryonalen Tag 13,5 bis E15,5 eingeleitet wird (Brunskill *et al.*, 2011; Dressler, 2006).

Anhand der morphologischen Analysen der Nieren konnten für P-S7 kn und P-TR2 kn Tiere folgende Ergebnisse festgehalten werden: (1) Die Nieren beider Mauslinien, ebenso wie die Glomeruli, zeigten eine normale Morphologie, die sich nicht von Kontrolltieren unterschied. (2) Es kam zu ausdifferenzierten Podozyten, die alle strukturellen Merkmale eines funktionstüchtigen Podozyten aufwiesen. (3) Die Nierenfunktion beider Mauslinien wurde nicht beeinträchtigt.

Die erste Betrachtung der Nieren von P-S7 kn und P-TR2 kn Nieren von adulten Tieren ließen keine strukturellen Auffälligkeiten erkennen. Im Vergleich zu den Kontrollnieren wurde das gleiche Nierengewicht, die gleiche Anzahl von Glomeruli und eine vergleichbare Glomeruli-Flächen bestimmt.

Der Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Anlage der Glomeruli wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine TGF- $\beta$ 1 Behandlung von Metanephrenen-Organkulturen eine Verkleinerung der Nieren und eine Reduktion der Nephrone und damit verbunden eine Verringerung der Glomeruli-Anzahl zur Folge hat (Bush *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2001). Die Untersuchungen von Clark *et al.* deuten dabei aber auf eine zeitlich begrenzte Wirkungsweise von TGF- $\beta$  hin. Er diskutiert, dass TGF- $\beta$ 1 nicht *per se* für die Anlegung der Nephrone entscheidend ist, sondern vorwiegend das Wachstum der Ureterknospe und deren Aufzweigung hemmt. Zu diesem Schluss kommt diese Arbeitsgruppe, da eine exogene TGF- $\beta$ 1 Behandlung der Metanephrenen nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen keinen Einfluss mehr auf die Ausbildung von Nephronen/Glomeruli ausübt. Diese Schlussfolgerung konnte durch die hier vorliegende Arbeit anhand der *in vivo* Daten bestätigt werden. Der Knockout der TGF- $\beta$  Signalkomponenten erfolgt hier zum Zeitpunkt der Entstehung der Podozyten, kurz vor der Ausreifung der Glomeruli. Infolgedessen ist zu diesem Zeitpunkt die Anlegung der Glomeruli bereits abgeschlossen und ein späteres Entfernen von Smad7 und die damit verbundene Desinhibierung/Verstärkung der TGF- $\beta$  Signaltransduktion führten nachträglich zu keiner Reduktion der Glomeruli-Zahl. Genauso wenig konnte gezeigt werden, dass der Knockout des TGF- $\beta$  RII mit einer Erhöhung der Glomeruli-Anzahl einhergeht.

Obwohl unterschiedliche Untersuchungen, vorwiegend durch *in situ* Hybridisierungen, zeigen, dass es zur Expression der verschiedenen molekularen Komponenten des TGF- $\beta$  Signalwegs (TGF- $\beta$  RI und RII; R- und I Smads) während der Nierenentwicklung und insbesondere der Glomerulogenese kommt (Banas *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 1997; Oxburgh and Robertson, 2002), belegen die hier erhaltenen Ergebnisse jedoch eindeutig, dass der TGF- $\beta$  Signalweg für die Entstehung und Differenzierung der Podozyten keine Rolle spielt.

Hierdurch können allerdings die Ergebnisse von Vrljicak *et al.* bekräftigt werden, die durch RT-PCRs und *in situ* Hybridisierungen zeigen konnten, dass Smad2, -3 und -4 im kondensierten Mesenchym bis hin zum reifen Stadium kaum detektierbar sind, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass diese Komponenten in diesen Entwicklungsphasen keine entscheidenden Funktionen übernehmen (Vrljicak *et al.*, 2004).

Auch andere Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie beeinflussen die Entwicklung der Nieren. Interessante Ergebnisse lieferten Untersuchungen der BMP7<sup>-/-</sup> Maus. Diese Tiere sterben bereits 48 Stunden nach der Geburt an einer massiven Fehlentwicklung der Nieren. Es zeigte sich, dass es zu einem fast vollständigen Verlust der Glomeruli kam (Dudley *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das kondensierte Mesenchym ohne BMP7 nicht in der Lage war, Metanephros-Bläschen zu bilden. Demzufolge konnte BMP7 als Signalmolekül für die Induktion von mesenchymal-epithelialen Transitionen (MET) in Zusammenhang gebracht werden. Doch obwohl der BMP-Signalweg mit der TGF- $\beta$  Signaltransduktion verwandt ist und mit Smad7 einen gemeinsamen Inhibitor aufweist und daher vermutet werden konnte, dass sich ein Knockout von Smad7 möglicherweise auf BMP7 gesteuerte MET Prozesse während der Entwicklung auswirkte, konnte dies durch die vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Smad7 vorwiegend inhibitorisch auf den TGF- $\beta$  Signalweg wirkt und die BMP-Signaltransduktion neben Smad7 auch durch Smad6 gehemmt werden kann. Hierdurch kann spekuliert werden, dass Smad6 die Aufgabe von Smad7 übernehmen könnte.

Über die genauen molekularen Abläufe während der Entwicklung und die Regulation von MET ist bislang allerdings nur wenig bekannt. TGF- $\beta$  gilt als stark potenter Faktor, der unter pathologischen Bedingungen epithelial-mesenchymale Transitionen (EMT) induziert (Kriz *et al.*, 2011; Wendt *et al.*, 2009). Solche EMT Prozesse können auch im Bereich des Glomerulus beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass immortalisierte Podozyten *in vitro* auf eine exogene TGF- $\beta$ 1 Behandlung mit Dedifferenzierungsprozessen reagieren, indem epithiale Marker wie beispielsweise P-Cadherin supprimiert und mesenchymale Proteine wie  $\alpha$ -SMA hochreguliert werden (Fuchshofer *et al.*, 2011; Herman-Edelstein *et al.*, 2011). Dieser Befund wurde auch durch *in vivo* Experimente bestätigt. Demzufolge führen verschiedene Pathogenesen innerhalb der Glomeruli zu einer Reduktion von P-Cadherin und einer Induktion von  $\alpha$ -SMA im Sinne von EMT-Veränderungen (Shimizu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005). Infolgedessen konnte spekuliert werden, ob es sich bei embryonalen MET Prozessen möglicherweise um den ursprünglichen Differenzierungsvorgang handelt, der während verschiedenen Pathogenesen in umgekehrter Weise Dedifferenzierungsprozesse entsprechend einer EMT abläuft. Da sich sowohl P-S7 kn als auch P-TR2 kn Glomeruli vollkommen normal entwickelten und Podozyten sich entsprechend normal differenzierten,

kann jedoch davon ausgegangen werden, dass MET Prozesse während der Embryogenese unabhängig von TGF- $\beta$  ablaufen.

Als Folge einer funktionsfähigen Differenzierung der Podozyten zeigen P-S7 kn und P-TR2 kn ihre charakteristische und einzigartige Architektur. Es kommt zur Ausbildung eines in den Harnraum ragenden Zellkörpers, der radial primäre Zellfortsätze ausbildet. Ebenso erfolgt die weitere Aufzweigung in die einzelnen Fußfortsätze, die sich regelmäßig angeordnet an die glomerulären Basalmembran (GBM) anheften und zwischen ihren verzahnten Fußfortsätzen eine Schlitzmembran ausbilden. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der TGF- $\beta$  Signalweg keinen Einfluss auf die Polarität der Podozyten ausübt. Par6 und aPKC sind typische Schlüsselfaktoren der Zell Polarität (Etienne-Manneville and Hall, 2003), die auch an der Zellmorphologie von Podozyten beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass Par6, aPCK und Par3 in Podozyten mit Neph1 und Nephrin interagieren, wodurch sich dieser Komplex im Bereich der Schlitzmembran lokalisiert und damit die 3-dimensionale Struktur der Podozyten unterstützt. Ein Verlust der aPKC Aktivität hat zur Folge, dass die reguläre podozytäre Fußfortsatz-Architektur verloren geht (Hartleben *et al.*, 2008). An anderen epithelialen Zellen konnte zudem ein regulierender Einfluss der TGF- $\beta$  Rezeptoren auf Par6 gezeigt werden (Bose and Wrana, 2006; Ozdamar *et al.*, 2005). Eine TGF- $\beta$  RII vermittelte Phosphorylierung von Par6 führte beispielsweise in HEK-293 Zellen zu einem Verlust der Formierung der Tight Junctions. Trotz allem kann dieser regulierende Einfluss des TGF- $\beta$  Signalwegs auf die Zellpolarität nicht auf Podozyten übertragen werden, wie die normal entwickelte Morphologie der P-S7 kn und P-TR2 kn Podozyten dieser Arbeit zeigte.

Reife, ausdifferenzierte Podozyten sind post-mitotische Zellen. Während der Embryonalentwicklung treten die noch teilungsaktiven Podozyten-Vorläufer-Zellen in einen Wachstumsstopp ein und beginnen mit der endgültigen Differenzierung zu reifen Podozyten (Pavenstadt *et al.*, 2003; Saleem *et al.*, 2002). TGF- $\beta$  gilt im Allgemeinen als anti-proliferativ, wie Untersuchungen an den verschiedensten Zellen belegen (Cheng and Grande, 2002; Wu *et al.*, 2005). Anhand der beiden Podozyten-spezifischen Knockout Modelle dieser Arbeit konnte erstmals durch ein *in vivo* System untersucht werden, ob der TGF- $\beta$  Signalweg an der Zellzyklus-Kontrolle während der Ausdifferenzierung der anfänglich proliferierenden Podozyten-Vorläufer-Zellen zu post-mitotischen reifen Podozyten beteiligt ist. Es kam jedoch zu vollkommen normal entwickelten Podozyten und die Bestimmung der Podozyten-Zahl ergab für P-S7 kn Glomeruli keine Reduktion der Podozyten, als Folge einer verstärkten Induktion eines Wachstumsstopps. Ebenso wenig kam es im gegenläufigen Modell der P-TR2 kn Mäuse zu einer Vermehrung der Podozyten-Zahl. Es konnte dementsprechend festgehalten werden, dass die Blockierung der TGF- $\beta$  Signaltransduktion zu keiner Steigerung der Podozyten-Zahl führte. Diese Erkenntnisse stehen allerdings im Widerspruch

zu den von Wu *et al.* gewonnenen Ergebnissen zur Rolle von TGF- $\beta$  als Zellzyklus-regulierender Faktor in Podozyten. Hierzu führten Wu *et al.* Untersuchungen an konditionell immortalisierten murinen Podozyten durch. Dabei ging Wu von der Annahme aus, dass diese Zellen unter permissiven Bedingungen (Kultivierung bei 33 °C unter Zugabe von Interferon  $\gamma$ ) dem Status der proliferierenden Podozyten-Vorläufer-Zellen entsprechen, und dass die anschließende 14-tägige Differenzierungsphase unter nicht-permissiven Bedingungen (Kultivierung bei 37 °C ohne Zugabe von Interferon  $\gamma$ ) mit dem natürlichen Entwicklungsvorgang während der Glomerulogenese vergleichbar ist. Anhand der Untersuchungen konnte Wu zeigen, dass es während der Ausdifferenzierung der Zellen zur Expression des Podozyten-spezifischen Markers Synaptopodin und der Differenzierung der Zellen zu post-mitotischen Podozyten kam. Als initialen Auslöser dieses Prozesses identifizierte er den Faktor TGF- $\beta$ 2. Des Weiteren konnte er zeigen, dass TGF- $\beta$ 2 autokrin auf die Podozyten wirkt und dadurch einen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Arrest über die TGF- $\beta$ /Smad3-abhängige Induktion von Cdkn2b (Cyclin dependent kinase inhibitor 2B) bewirkt (Wu *et al.*, 2005). Die letztendliche Schlussfolgerung, dass dieser Mechanismus auf den *in vivo* Vorgang der Podozyten-Differenzierung übertragen werden kann, konnten die vorliegenden Daten dieser Arbeit jedoch eindeutig widerlegen. Zudem zeigen sie auf, dass *in vitro* Untersuchungen stets die Gefahr mit sich bringen, artifiziell zu sein und machen vor allem deutlich, dass reale embryonale Entwicklungsprozesse schwierig durch *in vitro* Systeme simuliert werden können.

### 6.3 Altersprogressive Veränderungen in P-S7 kn und P-TR2 kn Mäusen

Da die Phänotypanalyse gezeigt hatte, dass es zu einer vollständig normalen und funktionsfähigen Glomerulogenese kam, sollte anschließend untersucht werden, ob sich Veränderungen der jeweiligen Podozyten-spezifischen Knockouts möglicherweise erst im Altersverlauf manifestieren. Obwohl Alterungsprozesse *per se* keine Krankheit, sondern einen physiologischen Prozess darstellen, kommt es dennoch zu typischen histologischen Erscheinungsbildern, die denen renaler Pathologien ähneln. Infolgedessen erfolgte die Analyse altersprogressiver Veränderungen durch den morphologischen Vergleich der Nieren/Glomeruli von jungen adulten Mäusen (2 – 3 Monate), mit Tieren im Alter von 9 Monaten. P-S7 kn, P-TR2 kn und die jeweiligen Kontrolltiere wurden im Hinblick auf charakteristische histopathologische Folgen von Nierenschädigungen untersucht.

### Altersbedingte Veränderungen von sklerotischen Prozessen:

Zu den altersprogressiven Veränderungen gehören beispielsweise sklerotische Prozesse, die vor allem im Bereich der Glomeruli (Glomerulosklerosen) auftreten. Dessen Ausmaß wurde durch die Bestimmung des Sklerose Indexes bestimmt, welche folgende Ergebnisse lieferte: (1) Alle 9-monatigen Tiere (P-S7 kn, P-TR2 kn und beide geflochten Kontrollmäuse) zeigten einen eindeutigen Anstieg der sklerotischen Flächen im Bereich der Glomeruli im Vergleich zu den jeweiligen jungen Mäusen. (2) P-S7 kn Mäuse wiesen eine stärkere Verschlechterung der Glomeruli-Morphologie, durch eine zusätzliche Steigerung von Glomerulosklerosen, auf. (3) Eine entsprechend gegenläufige Verbesserung der Glomeruli-Struktur in P-TR2 kn Mäusen konnte nicht beobachtet werden.

Der physiologische Prozess des Alterns wirkt sich in den Nieren durch eine zunehmend regressive Funktionsleistung sowie Morphologie-Veränderungen der Niere aus (Zhou *et al.*, 2008). Die Betrachtung der morphologischen Veränderungen zeigt als Hauptcharakteristikum der seneszenten Niere eine progressiv verlaufende Glomerulosklerose (Percy *et al.*, 2008). Unter all den Risikofaktoren, die mit dem Alter in Verbindung gebracht werden, ist der oxidative Stress in den letzten Jahren besonders in den Fokus der Diskussion getreten (Romano *et al.*, 2010).

Die Folgen von oxidativem Stress sind vielfältig, führen aber häufig zur Stimulation von Wachstumsfaktoren (Yang and Fogo, 2010). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten eine gesteigerte Expression von TGF- $\beta$  als Folge von oxidativem Stress (Choudhury and Levi, 2011; Lodha *et al.*, 2002; Rashed *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass TGF- $\beta$  als typische profibrotischer Faktor gilt, der maßgeblich an der Regulation der extrazellulären Matrix (EZM)-Proteine beteiligt ist und eine Akkumulation von EZM Komponenten in der Niere verursachen kann (Branton and Kopp, 1999; Ihn, 2002). Ein mögliches Zusammenspiel von altersbedingtem oxidativen Stress und TGF- $\beta$  kann durch Untersuchungen von Ruiz-Torres *et al.* nahegelegt werden. An Ratten durchgeföhrte histologische Analysen zeigen, dass sklerotische Alterserscheinungen innerhalb der Glomeruli in Form von Glomerulosklerosen und eine Verdickung der GBM mit einer Induktion von TGF- $\beta$ 1 einhergehen (Ruiz-Torres *et al.*, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass es in allen alten Mäusen (P-S7 kn, P-TR2 kn und Kontrollmäuse) zu typischen Glomerulosklerosen innerhalb der Niere kam. Die Ergebnisse belegen aber zusätzlich, dass ein desinhibierter TGF- $\beta$  Signalweg, wie ihn P-S7 kn Tiere aufweisen, eine weitere Steigerung der sklerotischen Aktivität innerhalb der Glomeruli induziert. Der besonders interessante Punkt dabei war, dass die alleinige 'Verstärkung' der Signaltransduktion in Podozyten in der Lage war, die Akkumulation von EZM-Proteinen zu verursachen, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass eine negative Verstärkung von histopathologischen Prozessen durch die

Podozyten vermittelt wird. Des Weiteren kann vermutet werden, dass die Desinhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs der Podozyten einen negativ wirkenden parakrinen Effekt auf Mesangial-Zellen ausübt und somit eine zusätzliche Induktion der EZM-Proteine nicht nur durch Podozyten verursacht wird, sondern additiv durch Mesangial-Zellen hervorgerufen wird.

Im Gegenzug dazu hätte man vermuten können, dass das gegenläufige Modell der vollständigen Inhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs (P-TR2 kn Mäuse), ein entsprechend verbessertes Bild der Nierenmorphologie aufweist. Da dies nicht der Fall war, wäre eine mögliche Begründung, dass der Effekt des Rezeptor-Knockouts, der nur durch die beeinflussten Podozyten entstehen konnte, zu gering war, um eine protektive Wirkung auszuüben. Ebenso verdeutlicht dieses Ergebnis, dass die morphologischen Veränderungen entweder nicht ausschließlich durch TGF- $\beta$  induziert werden, oder dass auch Mesangial-Zellen eine bedeutende Rolle während der altersbedingten sklerotischen Veränderungen zukommt.

#### Altersbedingte Veränderungen der GBM:

Die nächsten Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob Veränderungen der GBM im Altersverlauf auftraten. Eine Verdickung dieser Basallamina gilt als weitere typische Erscheinungsform der seneszenten Niere (Silva, 2005; Taylor and Price, 1982). Anhand der Bestimmung der GBM-Dicke konnten folgende Ergebnisse festgehalten werden: (1) Alle 9-monatigen Tiere (P-S7 kn, P-TR2 kn und beide geflochtenen Kontrollmäuse) zeigten eine eindeutige Erhöhung der relativen GBM-Dicke, im Vergleich zu den jeweils jüngeren Mäusen. (2) P-S7 kn Mäuse wiesen keine zusätzliche Verdickung auf. (3) P-TR2 kn Tiere zeigten keine Reduktion der altersbedingten GBM-Dickenzunahme.

Die drei-schichtige GBM gehört zu einer der Hauptkomponenten der Filtrationsbarriere der Glomeruli. Enthaltene charakteristische Proteine sind Fibronectin, Laminin und Nidogen sowie Kollagen Typ IV (Col IV), das vorwiegend im Bereich der *Lamina densa* lokalisiert ist (Jefferson *et al.*, 2011; Patrakka and Tryggvason, 2010). Die detektierte Verbreiterung der GBM aller untersuchten Versuchsmäuse bezog sich überwiegend auf die *Lamina densa*, wodurch vermutet werden kann, dass es vor allem zu einer induzierten Expression von Col IV kam. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass *in vitro* Behandlungen von Podozyten mit exogenem TGF- $\beta$ 1 eine Expressionssteigerung von Col IV zur Folge haben (Chen *et al.*, 2004; Herman-Edelstein *et al.*, 2011; Iglesias-de la Cruz *et al.*, 2002). Des Weiteren zeigen Analysen transgener Mäuse mit einer glomerulären TGF- $\beta$  Überexpression eine Synthesesteigerung von Col IV und damit verbunden, eine aberrante Verteilung von Col IV in der GBM (Chai *et al.*, 2003). Eine Blockierung durch anti-TGF- $\beta$  Antikörper resultiert in diabetischen db/db Mäusen (Mausmodell für *Diabetes mellitus* (DM)

Typ II; verursacht durch eine Punktmutation im Leptin-Rezeptor) in einer Reduktion der Col IV Expression (Alpers and Hudkins, 2011; Ziyadeh *et al.*, 2000).

TGF- $\beta$  ist jedoch nicht nur in die Akkumulation von EZM-Proteinen involviert, sondern wirkt zusätzlich modulierend auf Degradations-Mechanismen der EZM. An solchen Abbau-Prozessen ist unter anderen die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt. MMPs werden als inaktive Zymogene (Pro-Peptide) translatiert und erhalten erst nach proteolytischer Spaltung ihre vollständige Aktivität (Ra and Parks, 2007). Aktivierte MMPs können wiederum durch die Familie der TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) gehemmt werden (Visse and Nagase, 2003). Der modulative Effekt von TGF- $\beta$  resultiert dabei vorwiegend in einer Expressionssteigerung dieser inhibitorisch wirkenden TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Diese Effekte konnten sowohl für Podozyten als auch für Mesangial-Zellen bestätigt werden. Durch die exogene TGF- $\beta$ 1 Behandlung *in vitro* kam es in Podozyten zu einer Steigerung von TIMP1 (Martin *et al.*, 1998), während in Mesangial-Zellen TIMP2 hochreguliert wurde (Hubchak *et al.*, 2003). Interessante Ergebnisse lieferte auch Akool *et al.*, der für Mesangial-Zellen zeigen konnte, dass oxidativer Stress zu einer TGF- $\beta$  vermittelten TIMP1 Induktion führt (Akool *et al.*, 2005).

Dieser Befund legt eine Kombination von Mechanismen, bestehend aus oxidativem Stress, TGF- $\beta$  Signalweg, EZM-Akkumulation und EZM-Degradation nahe und verdeutlicht die Komplexität von Alterungsprozessen und Zellkommunikationsabläufen.

Die oben beschriebenen Daten lassen den Schluss zu, dass TGF- $\beta$  eine Schlüsselrolle bei der Modulation von GBM-Komponenten zukommt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine verstärkte Aktivität des TGF- $\beta$  Signaling in P-S7 kn Tieren keine zusätzliche Verbreiterung der GBM zur Folge hat, ebenso wenig wie eine Blockade der Signaltransduktion in P-TR2 kn Mäusen eine Verbesserung der altersbedingten GBM-Verdickung bewirkt. Demnach scheint eine podozytäre Dysregulation des TGF- $\beta$  Signalwegs alleine keine entscheidende Rolle für die Homöostase der GBM-Zusammensetzung zu spielen. Die GBM ist eine Fusion aus endothelialer und podozytärer Basalmembran (Miner, 2011b). Aufgrund der erhaltenen Daten, muss daher angenommen werden, dass alle glomerulären Zellen durch die Alterungsprozesse in Mitleidenschaft gezogen wurden und dass eine Veränderung nur eines Kompartiments nicht ausreicht, um substanzelle Verschlechterungen bzw. Verbesserungen hervorzurufen. Demnach sprechen die Ergebnisse dafür, dass zusätzlich den glomerulären Endothel-Zellen eine bedeutende Rolle für die Homöostase der GBM zukommt. Eine andere Annahme wäre, dass möglicherweise Mesangial-Zellen eine wichtige kompensatorische Wirkung auf die jeweiligen Knockout-Effekte ausübt, indem sie im Falle der P-S7 kn Mäuse mit einem verstärkten Abbau von EZM reagieren, bzw. im Falle der P-TR2 kn Tiere selbst für die gesteigerte Expression von Kollagen verantwortlich sind.

Altersbedingte Veränderungen von *Foot Process Effacement* Prozessen:

Ein weiteres pathologisches Erscheinungsbild der seneszenten Niere ist der progressive Funktionsverlust der Filtrationsleistung. Dies äußert sich unter anderem durch *Foot Process Effacement* Prozesse, bei denen die gleichmäßige Organisation der einzelnen Fußfortsätze aufgehoben wird und es zu einer Verbreiterung der einzelnen Fußfortsätze kommt. Durch die Bestimmung der Anzahl der Fußfortsätze pro GBM-Länge (Fußfortsatz-Frequenz) kann dieses pathologische Erscheinungsbild quantifiziert werden. Diese Analyse wurde für die Untersuchungen der altersprogressiven Veränderung herangezogen und lieferte dabei folgende Ergebnisse: (1) Während 9 Monate alte Smad7<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäuse kein eindeutiges *Foot Process Effacement* zeigen, weisen 9-monatige P-S7 kn Tiere bereits deutlich erkennbare Verschlechterungen der Fußfortsatz-Organisation auf. (2) In TGF-β RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäusen treten bereits nach 9 Monaten *Foot Process Effacement* Erscheinungen auf, die bei alten P-TR2 kn Tieren nicht detektiert wurden. Folglich konnte gezeigt werden, dass der Podozyten-spezifische Knockout von Smad7 einen negativen Effekt auf die gesamte Integrität der Glomeruli ausübt. Die Blockade der podozytären TGF-β Signaltransduktion hingegen ließ auf einen tendenziell protektiven Einfluss schließen.

Eine mögliche Erklärung für die Verbreiterung der Fußfortsätze ist ein Umbau des streng organisierten Zytoskeletts. Es ist bekannt, dass TGF-β an Rekrutierungs-Mechanismen des Zytoskeletts beteiligt ist (Moustakas and Heldin, 2008). Immortalisierte Podozyten zeigen nach TGF-β1 Behandlung eine Umverteilung von F-Aktin Filamenten. Dabei kommt es zu einem Verlust der Zytoskelett-Organisation durch eine radiale Zusammenlagerung der Aktin-Fasern um den Nukleus und der deutlichen Induktion von Stressfasern (Peters *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010). Für den Podozyten spielen die Proteine Synaptopodin und α-Actinin eine wichtige strukturgebende Rolle. In den verschiedensten renalen Krankheiten, die mit einem Podozytenschädigung und einer induzierten Expression von TGF-β einhergehen, wird eine Reduktion dieser Proteine beobachtet (Fuchshofer *et al.*, 2011; Hirakawa *et al.*, 2006). Demzufolge geht man davon aus, dass ein verändertes Expressionsprofil von podozytären Zytoskelett-Proteinen für das Auftreten von *Foot Process Effacement* mitverantwortlich ist.

Eine weitere Ursache für diese Veränderung könnte ein gestörtes Zusammenspiel des Zytoskeletts der Podozyten mit Integrinen sein. Besonders deutlich wird dies durch die Untersuchungen von Kanasaki *et al.*, die aufzeigten, dass *in vivo* ein Podozyten-spezifischer Verlust von Integrin β1 zu massivem *Foot Process Effacement* führt, das letztendlich sogar den Tod der Mäuse verursacht (Kanasaki *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte Dessapt *et al.* zeigen, dass TGF-β1 in Podozyten zu einer signifikanten Reduktion von Integrin α3β1 führte (Dessapt *et al.*, 2009). Diese Daten können eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die podozytäre Verstärkung des TGF-β Signalwegs in P-S7 kn Mäusen eine Umverteilung

des Aktin-Zytoskeletts des Podozyten begünstigt und gleichzeitig die Verankerung über Integrine negativ beeinflusst, während im umgekehrten Falle, bei P-TR2 kn Tieren diese Effekte nicht vermittelt werden konnten und sich daher ein podozytärer Knockout von TGF- $\beta$  RII positiv auf die gesamte Integrität des Podozyten auswirkte.

## 6.4 TGF- $\beta$ induzierte Proteine

Die Multifunktionalität von TGF- $\beta$  entsteht durch die Wechselwirkung und die Beeinflussung von zahlreichen Effektor-Proteinen. Typische Reporterproteine sind Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) und Connective Tissue Growth Faktor (CTGF). PAI-1 kann durch seine inhibierende Wirkung auf tPA (gewebespezifische Plasminogen-Aktivator, tissue-type plasminogen activator) und uPA die Aktivierung von Plasmin verhindern und damit negativ auf proteolytische Prozesse wirken (Ghosh and Vaughan, 2011). CTGF gilt als Downstream-Mediator von TGF- $\beta$  und ist vorwiegend in der Lage die Akkumulation von EZM-Proteinen zu stimulieren (Phanish *et al.*, 2010). Beide Proteine sind folglich unabhängig voneinander in der Lage, die pro-fibrotische Wirkungsweise von TGF- $\beta$  zu unterstützen. Aus diesem Grund wurden diese beiden Proteine in der vorliegenden Arbeit herangezogen, um zum einen die allgemeine Funktionalität der jeweils veränderten TGF- $\beta$  Signalwege zu analysieren und zum anderen, um mögliche molekulare Auswirkungen der beiden Podozyten-spezifischen Knockouts zu untersuchen. Als Ergebnisse der *in vitro* Analysen anhand von TGF- $\beta$ 1 behandelten primären Podozyten konnten folgende Beobachtungen festgehalten werden:

(1) Alle Podozyten (P-S7 kn, P-TR2 kn und die jeweiligen Kontrollen) wiesen eine sehr geringe basale Expression von PAI-1 und CTGF auf. (2) Smad7<sup>flox/flox</sup>- und TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollpodozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung eine Induktion der PAI-1 und CTGF Synthese. (3) Diese Induktion wurde in P-S7 kn Podozyten nochmals verstärkt. (4) P-TR2 kn Podozyten waren nicht in der Lage auf eine TGF- $\beta$ 1 Behandlung zu reagieren.

Diese Befunde bestätigen erneut die Funktionalität der generierten Podozyten-spezifischen Knockouts. Demzufolge führt ein desinhibierter TGF- $\beta$  Signalweg, wie ihn P-S7 kn Mäuse aufweisen, in Podozyten zu einer Verstärkung der Induktion von TGF- $\beta$  Zielproteinen, wohingegen eine Blockade der Signaltransduktion in P-TR2 kn Podozyten dazu führt, dass keine Antwort auf ein TGF- $\beta$  Signal erfolgen kann.

Die oben beschriebenen Ergebnisse konnten anschließend auf die Gegebenheiten *in vivo* übertragen werden, wodurch folgendes festgehalten werden konnte: (1) Alle jungen Mäuse (P-S7 kn, P-TR2 kn und die jeweiligen Kontrollen) wiesen eine sehr geringe basale Expression von PAI-1 und CTGF innerhalb der Glomeruli auf. (2) Smad7<sup>flox/flox</sup>- und

TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup>-Kontrollmäuse zeigten im Alter eine Induktion von PAI-1 und CTGF. (3) In 9-monatigen P-S7 kn Tieren konnte eine zusätzliche Verstärkung dieser Proteine detektiert werden. (4) P-TR2 kn Mäuse waren auch im Alter nicht in der Lage PAI-1 und CTGF in Podozyten zu induzieren.

Interessant ist, dass beide durch TGF- $\beta$  induzierte Proteine (CTGF und PAI-1) pro-fibrotisch wirken können. Die jeweiligen Wirkungsweisen unterscheiden sich allerdings deutlich. Während PAI-1 vorwiegend seinen Einfluss auf Degradationsmechanismen von EZM-Proteinen ausübt (Seo *et al.*, 2009), führt CTGF vor allem zu einer Steigerung der EZM-Produktion (Mason, 2009).

Eine rasche und deutliche Hochregulation von PAI-1 kann in einer Vielzahl von akuten und chronischen Nierenerkrankungen des Menschen sowie in experimentellen Modellen beobachtet werden (Eddy and Fogo, 2006). Zudem ist belegt, dass verschiedene renale Zellen, einschließlich der Podozyten auf pathologische Bedingungen mit einer solchen Induktion reagieren (Eddy, 2002). Interessanterweise zeigen transgene Mäuse mit einer renalen Überexpression von TGF- $\beta$ 1 bei einem gleichzeitigen Knockout von PAI-1 einen milderer Verlauf der TGF- $\beta$  induzierten pathologischen glomerulären Erscheinungsbilder, was sich durch eine verringerte Steigerung der TGF- $\beta$  abhängigen GBM-Verbreiterung und durch eine reduzierte Akkumulation von Kollagenen in den Glomeruli ausdrückte (Krag *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen von Krag *et al.* zeigten, dass Mäuse mit der renalen Überexpression von TGF- $\beta$ 1 nach Induktion von DN morphologische Veränderungen, die mit einer Verdickung der GBM und einer gesteigerten Akkumulation von EZM-Proteinen einhergehen. Dabei wiesen diabetische transgene TGF- $\beta$ 1-Mäuse eine zusätzlich gesteigerte Expression von PAI-1 und TIMP1 auf und legen dadurch einen gesteigerte fibrotische Wirkung durch die Hemmung von Degradations-Mechanismen nahe (Krag *et al.*, 2007). Überträgt man diese Befunde auf die Gegebenheiten dieser Arbeit, könnte die verstärkte Verschlechterung der P-S7 kn Glomeruli-Morphologie damit erklärt werden, dass durch den Podozyten-spezifischen Knockout von Smad7 eine gesteigerte altersbedingte TGF- $\beta$  Induktion vorliegen könnte, die über die detektierte Expressionssteigerung von PAI-1 zu einer nochmals verstärkten Akkumulation von EZM-Proteinen und GBM-Komponenten führte. Des Weiteren kann spekuliert werden, dass dieser Mechanismus über die veränderte Aktivität von MMPs und TIMPs abläuft. Die normalen altersbedingten morphologischen Erscheinungsbilder der alten P-TR2 kn korrelieren dabei mit den beobachteten PAI-1 Expressionsmuster. Die Blockade der TGF- $\beta$  Signaltransduktion führte zu keiner PAI-1 Induktion in Podozyten. Demnach müssen andere bzw. zusätzliche Mechanismen für die Erhöhung der EZM und GBM-Proteine verantwortlich sein, während gleichzeitig gezeigt

werden konnte, dass sich eine fehlende Expression von PAI-1 alleine in Podozyten nicht positiv auf glomeruläre Komponenten auswirken kann.

Grundsätzlich ähnliche morphologische Auswirkungen liefert der Wachstumsfaktor CTGF. Der zugrundeliegende pro-fibrotische Mechanismus über den CTGF wirken kann, beruht vor allem auf der induktiven Wirkung von CTGF auf die Syntheseleistung der EZM-Proteine (Phanish *et al.*, 2010).

CTGF kann durch verschiedene Faktoren stimuliert werden. Zu den potentesten Induktoren zählt dabei TGF- $\beta$ , der neben anderen renalen Zellen, auch in Podozyten zu einer gesteigerten Expression von CTGF führt (Wang and Hirschberg, 2003; Abstract: Huang *et al.*, 2004). Daraus ergibt sich, dass auch in verschiedenen Nierenerkrankungen eine gesteigerte CTGF Expression detektiert werden kann, wie es in zahlreichen humanen Pathologien und experimentellen *in vivo* Modellen bewiesen wurde (Umezono *et al.*, 2006; Wahab and Mason, 2004).

Diese pro-fibrotische Wirkung von CTGF ist durch unterschiedliche *in vitro* Studien an renalen und nicht-renalen Zellen belegt (Fuchshofer *et al.*, 2005; Gore-Hyer *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2006). Eigene Untersuchungen zeigen, dass Behandlungen von immortalisierten Podozyten mit rekombinantem CTGF in einer gesteigerten Synthese von Col IV und Fibronectin resultieren (Fuchshofer *et al.*, 2011). Obwohl Yokoi *et al.* dies nicht für ihre Untersuchungen an transgenen Podozyten-spezifischen CTGF Überexpressionsmäusen zeigen konnten, belegen diese Daten dennoch, dass es nach Induktion von DN zu einer zusätzlich gesteigerten Akkumulation von EZM-Proteinen und damit verbunden zu sklerotischen Prozessen im Bereich der Glomeruli kommt, die mit einer reduzierten Aktivität von MMP2 einhergehen (Yokoi *et al.*, 2008). Demzufolge konnte gezeigt werden, dass ein vermehrtes Vorkommen von CTGF innerhalb der Glomeruli einen negativen Einfluss auf die strukturelle Integration der Filtrationseinheit ausübt. Des Weiteren belegen Experimente an diabetischen heterozygoten CTGF<sup>+/−</sup>-Mäusen, dass eine Reduktion von CTGF (~ 50 %) eine verminderte GBM-Zunahme mit sich bringt und die Aktivität von MMPs erhalten bleibt (Nguyen *et al.*, 2008). Zum anderen führt die Administration von Antisense Oligonukleotiden gegen CTGF in diabetischen Tieren zu einer verbesserten Funktionalität der Niere, die mit einer Verminderung der Fibronectin, Col I, Col IV und PAI-1 Expression einhergehen (Guha *et al.*, 2007). Demnach könnte die hier detektierte gesteigerte CTGF Expression innerhalb der 9 Monate alten P-S7 kn Mäuse, neben der PAI-1 Erhöhung, ebenfalls für die Verschlechterung der altersbedingten sklerotischen Prozesse innerhalb der Glomeruli verantwortlich sein. P-TR2 kn Mäuse zeigen zwar, dass eine podozytäre Blockade des TGF- $\beta$  Signalwegs Effektor-Proteine reduziert, dessen Einfluss jedoch nicht ausreicht, um

deutlich protektive Effekte zu erzielen, wodurch vermutet werden muss, dass die anderen Komponenten der Glomeruli für die Akkumulation der EZM mitverantwortlich sein müssen.

Ein besonders interessantes Ergebnis, das die *in vitro* und *in vivo* Untersuchung der TGF- $\beta$  induzierten Proteine offenbarte, war, dass sich das Expressionsmuster von Synaptopodin änderte. Dabei konnten folgende Beobachtungen festgestellt werden: (1) P-S7 kn Podozyten/Glomeruli wiesen eine deutliche Reduktion von Synaptopodin auf, die im Altersverlauf weiter vermindert wurde. (2) P-TR2 kn Podozyten/Glomeruli zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Veränderungen des Synaptopodin Expressionsprofils.

Über die spezifische Wirkung, die TGF- $\beta$  auf Synaptopodin ausübt ist bislang noch wenig bekannt. Eine Untersuchung die sich darauf bezieht, konnte zeigen, dass eine transiente renale Überexpression von TGF- $\beta$ 1, hervorgerufen durch einen adenoviral-vermittelten Gentransfer, zu einer deutlichen Reduktion von Synaptopodin führt, welche morphologisch mit dem Auftreten von *Foot Process Effacement* einhergeht (Ghayur *et al.*, 2012).

Der erhaltene Befund, dass P-S7 kn Podozyten eine Reduktion von Synaptopodin aufweisen, welche im Verlauf des Alterns der Mäuse weiter abnimmt, korreliert mit den Beobachtungen, dass im Alter dieser Mäuse ein gesteigertes *Foot Process Effacement* detektiert wurde und legt daher eine Wechselwirkung von TGF- $\beta$  und Synaptopodin nahe. Dennoch muss beachtet werden, dass alte P-TR2 kn Tiere ebenfalls *Effacement* Effekte aufweisen, ohne dass dabei ein verändertes Expressionsmuster von Synaptopodin vorlag. Demnach scheint der TGF- $\beta$  Signalweg nicht der initiale Auslöser dieses Prozesses zu sein, sondern wirkt vermutlich über sekundäre Effekte modulierend auf die Expression von Synaptopodin.

## 6.5 STZ-induzierte DN als Podozyten-Schadensmodell in P-S7 kn und P-TR2 kn Mäusen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die podozytäre Beeinträchtigung des TGF- $\beta$  Signalwegs erst im Laufe von Altersprozessen zu einer Manifestation von morphologischen Veränderungen führte. Als nächstes stellte sich die Frage, wie sich die beiden Podozyten-spezifischen Knockout-Modelle in einem induzierten und damit 'akuten' Schaden verhalten. Es gilt als allgemein akzeptiert, dass der TGF- $\beta$  Signalweg eine entscheidende Funktion bei der Pathogenese von podozytären Nierenerkrankungen, wie die Diabetische Nephropathie (DN) übernimmt (Kim *et al.*, 2003; Lee, 2011; Umezono *et al.*, 2006). Infolgedessen wurde als Schadensmodell der nachfolgenden Untersuchungen die Streptozotocin (STZ)-induzierte DN gewählt. Es ist bislang nicht bekannt, ob die strukturellen Veränderungen in den

Glomeruli bei DN unabhängig voneinander oder durch eine zeitliche Kausalität verursacht werden. Aus diesem Grund wurde eine kurze Behandlungsdauer von STZ gewählt, um Aufschlüsse über die initialen Veränderungen zu erhalten. Diese Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse: (1) Alle diabetischen Mäuse (P-S7 kn, P-TR2 kn und geflokte Kontrollmäuse) wiesen klassische Parameter einer DM Erkrankung auf. (2) Alle diabetischen Tiere zeigten das typische morphologische Krankheitsbild von *Foot Process Effacement*. (3) Sklerotische Prozesse sowie eine Verbreiterung der GBM konnte nach 2 Monaten noch nicht detektiert werden. (4) Diabetische Kontrollmäuse zeigten eine Induktion von Col IV und Fibronectin innerhalb der Glomeruli, die in diabetischen P-S7 kn Tieren zusätzlich verstärkt wurde, während diese Induktion in diabetischen P-TR2 kn Mäusen blockiert war.

Klassische Symptome einer DM Erkrankung sind ein erhöhter Blutglucose-Spiegel, Gewichtsverlust sowie Polyurie und Proteinurie (Tesch and Allen, 2007; Ziyadeh and Wolf, 2008). Das vermehrte Ausscheiden von Proteinen mit dem Urin ließ sich zwar nachweisen, jedoch waren die Proteinmengen geringer als sie für eine klassische Proteinurie im Endstadium betragen würden. Die relativ geringe Erhöhung der ausgeschiedenen Proteine bei den STZ-Tieren zeigt somit den Beginn der DN an, deren Induktion durch die anderen untersuchten klinischen Parameter (Blutglucose-Spiegel, Urinvolumen und Gewichtsverlust) bestätigt werden konnte.

Zusätzlich wurde die Funktionalität der experimentell induzierte DN durch das charakteristische Auftreten von *Foot Process Effacement* für alle STZ-Tiere des Diabetes-Versuchs bestätigt (Li et al., 2007; Stitt-Cavanagh et al., 2009).

Interessant war der Befund, dass es trotz beginnender DN in keiner der diabetischen Mäuse zu einer signifikanten Verbreiterung der GBM kam. Dies lieferte zum ersten Mal den Hinweis, dass sich die pathologischen Merkmale von *Foot Process Effacement* und Verdickung der GBM unabhängig voneinander manifestieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *Foot Process Effacement* Prozesse initial, also früher durch pathogene Bedingungen ausgelöst werden und im möglichen Zusammenhang mit einer Mikroalbuminurie stehen, während eine Verbreiterung der GBM das Resultat eines chronischen Verlaufs zu sein scheint und damit vermutlich unterstützend auf eine Proteinurie einwirkt. Verglichen mit dem altersbedingten Auftreten der GBM-Verbreiterung kann weiterhin vermutet werden, dass die Verbreiterung möglicherweise durch die glomerulären Endothel-Zellen vermittelt wird und aus einem progressiven Verlauf der DN resultiert.

Anhand der Analysen der Fußfortsatz-Frequenz konnte eine tendenzielle Verschlechterung der Fußfortsatz-Organisation innerhalb der diabetischen P-S7 kn Mäuse festgestellt werden. Die negative Wirkung einer fehlenden Smad7 Expression wurde von Chen et al. durch die Langzeitbehandlung mit STZ (6 Monate) von Smad7<sup>Exon1</sup>-Knockout-Mäusen beschrieben

(Chen *et al.*, 2011). Bei diesen Mäusen kommt es zur Expression einer trunzierten Form von Smad7, die eine stark verminderte Funktionalität dieses Proteins aufweist (Li *et al.*, 2006).

Nach der Induktion von DN in Smad7<sup>Exon1 -/-</sup>-Mäusen kam es, im Vergleich zu diabetischen Wildtyp-Mäusen, nach 6 Monaten zu einer zusätzlich gesteigerten Akkumulation von EZM-Proteinen in verschiedenen Bereichen der Niere, einschließlich der Glomeruli (Chen *et al.*, 2011). Diabetische P-S7 kn Mäuse dieser Arbeit zeigten ebenfalls eine vermehrte Steigerung der sklerotischen Flächen innerhalb der Glomeruli. Es kann daher vermutet werden, dass ein verstärktes TGF-β Signal innerhalb der Podozyten alleine für die Induktion von EZM-Proteinen im Bereich der Glomeruli verantwortlich ist. Außerdem konnte von Chen *et al.* ebenfalls eine gesteigerte Expression von Col IV und Fibronectin detektiert werden, dessen Induktion vor allem innerhalb der Glomeruli auftrat (Chen *et al.*, 2011). Demnach führt der Verlust von Smad7 in Podozyten zu einer gesteigerten Verschlechterung der glomerulären Morphologie durch die induzierte Synthesesteigerung von Col IV und Fibronectin.

Obwohl in den diabetischen Mäusen keine eindeutige Verdickung der GBM gemessen werden konnte, legt die induzierte Col IV Synthese dennoch nahe, dass sich im Verlauf einer längeren Expositionsdauer eine Verdickung der GBM manifestieren könnte, ähnlich dem Befund, der erst im Alter auftretenden progressiven Erhöhung der GBM.

Insgesamt deuten diese Daten also darauf hin, dass der TGF-β Signalweg der Podozyten *per se* vor allem durch eine Reduktion von Smad7 negativ auf pathologische Morphologien wirkt.

Die Umkehrfolgerung des negativen Einflusses von TGF-β bzw. eines desinhibierten Signalwegs lautet infolgedessen, dass eine Blockierung der TGF-β Signaltransduktion einen protektiven Effekt auf die Niere aufweisen sollte. Untersuchungen hierzu wurden von Kim *et al.* unternommen. Aufgrund des letalen Phänotyps des Komplett-Knockout von TGF-β RII verwendete Kim heterozygote TGF-β RII<sup>+/−</sup>-Mäuse für seine Analysen, um die Auswirkungen einer Inhibition der TGF-β Signaltransduktion auf die Pathogenese von DN zu untersuchen (Kim *et al.*, 2004). Der heterozygote Knockout resultiert in einer ca. 50 % Reduktion der Rezeptor-Expression und führt zu keinen phänotypisch auffälligen Besonderheiten (Im *et al.*, 2001). Die Analyse von sklerotischen Prozessen in diabetischen TGF-β RII<sup>+/−</sup>-Mäusen ergab eine deutliche Reduktion von akkumulierten EZM-Proteinen im Bereich der Glomeruli (Kim *et al.*, 2004). Diabetische P-TR2 kn Tiere in dieser Arbeit wiesen keine bis allenfalls eine geringe Verminderung der sklerotischen Flächen innerhalb der Glomeruli auf. Daraus kann geschlossen werden, dass unter diabetischen Bedingungen eine Akkumulation von EZM-Proteinen induziert wird, die entweder unabhängig von TGF-β abläuft, oder, was als wahrscheinlicher gilt, die überwiegend von Mesangial-Zellen der Glomeruli ausgeht. Als erwiesen muss angesehen werden, dass der Podozyt durch die

Blockade der TGF- $\beta$  Signaltransduktion *per se* nicht in der Lage ist, protektiv auf sklerotische Prozesse zu wirken. Als weiteres Ergebnis konnten Kim *et al.* zeigen, dass es innerhalb der heterozygoten Mäuse zu einer Reduktion der renalen Col IV mRNA Expression kam (Kim *et al.*, 2004). Dieser Befund konnte auf die glomeruläre Expression von Col IV in STZ-P-TR2 kn Mäuse übertragen werden und verdeutlicht, dass der Podozyten-spezifische Knockout von TGF- $\beta$  RII durchaus das Expressionsmuster von EZM-Proteinen, wie Col IV, ebenso wie Fibronektin in Glomeruli verändern kann, obwohl sich daraus kein positiver Effekt auf die Glomerulosklerose oder die GBM ergab. Demnach müssen zusätzliche Proteine für die Akkumulation der EZM verantwortlich sein, deren Induktion vermutlich vorwiegend durch die glomerulären Mesangial-Zellen vermittelt wird.

Insgesamt zeigen die hier erhobenen Daten, dass eine Inhibition des TGF- $\beta$  Signalwegs alleine in Podozyten keinen eindeutig protektiven Effekt auf pathologische Prozesse innerhalb der Glomeruli ausübt. Demnach müssen für eine Verbesserung der Glomeruli-Morphologie verschiedene Komponenten involviert werden.

## 6.6 Kurzzusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Rolle des TGF- $\beta$  Signalweg für Podozyten durch die Generierung der konditionellen Podozyten-spezifischen Knockout-Mauslinien von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII von zwei unabhängigen Seiten beleuchtet. Zum einen konnten die Auswirkungen eines desinhibierten TGF- $\beta$  Signalwegs in Podozyten untersucht werden und zum anderen konnten die Effekte einer Blockade der TGF- $\beta$  Signaltransduktion analysiert werden. Ein zusätzlicher Vorteil der eingesetzten Podo-Cre Maus war die frühe Expression der Cre-Rekombinase in der *Capillary-loop* Phase, die es erstmals ermöglichte die Rolle von TGF- $\beta$  für die Entwicklung und Differenzierung der Podozyten *in vivo* zu untersuchen.

Insgesamt konnte anhand der vorliegenden Daten gezeigt werden, dass weder eine fehlende Inhibition noch eine Blockierung der TGF- $\beta$  Signaltransduktion einen Einfluss auf die allgemeine Glomerulogenese oder die normale Entwicklung und Differenzierung der Podozyten besitzt. Infolgedessen konnten die Untersuchungen von Clark *et al.* bestätigt werden, die nahelegen, dass der anfänglich negative Effekt von TGF- $\beta$  auf die Morphogenese der Niere zu einem späteren Zeitpunkt keinen inhibierenden Einfluss mehr besitzt (Clark *et al.*, 2001). Des Weiteren untermauern die erhaltenen *in vivo* Daten die Ergebnisse von Vrljicak *et al.*, die aufzeigten, dass R-Smads ab der Phase der Bildung des kondensierten Mesenchyms kaum noch exprimiert werden (Vrljicak *et al.*, 2004). Wu *et al.* legten durch Untersuchungen an immortalisierten Podozyten eine Beteiligung von TGF- $\beta$ 1 für die Induktion des Wachstumsstopps während der Ausdifferenzierung der Podozyten nahe

(Wu *et al.*, 2005). Diese Hypothese konnte durch die hier erhobenen *in vivo* Daten jedoch völlig widerlegt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich immortalisierte Zellsysteme nur sehr bedingt eignen, um Rückschlüsse auf embryologische Entwicklungsprozesse *in vivo* zu ziehen. Die normal entwickelten und funktionsfähigen Podozyten der beiden verwendeten Knockout-Modelle lassen zusätzlich vermuten, dass die von Simons *et al.* postulierte Beteiligung von TGF- $\beta$  an der korrekten Ausbildung der Polarität von epithelialen Zellen, wie Podozyten, die von Ozdamar an HEK-Zellen gezeigt wurde, nicht auf Podozyten übertragen werden können (Ozdamar *et al.*, 2005; Simons *et al.*, 2009).

Um die detaillierte Rolle des TGF- $\beta$  Signalweg während der Glomerulogenese *in vivo* weiterführend aufzudecken, könnten Untersuchungen an Mäusen helfen, die durch die Verpaarungen der beiden geflochtenen Smad7 und TGF $\beta$  RII-Mäuse mit einer transgenen Cre-Maus, deren Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Tenascin-c Promoters steht (Kohan, 2008). In dieser transgenen Maus, welche sich allerdings noch in der Entwicklung befindet, soll es zur Synthese der Cre-Rekombinase in renalen interstitiellen Zellen und im Mesenchym während der Entwicklung kommen (Aufderheide *et al.*, 1987), wodurch die Möglichkeit gegeben wäre, die Befunde von Bush *et al.* und Clark *et al.* in einem *in vivo* Modell zu verifizieren.

Nachdem der TGF- $\beta$  Signalweg für die Ausdifferenzierung von unbedeutender Rolle ist und nicht für die Induktion des Wachstumsstopps verantwortlich ist, wäre es weiterführend interessant zu untersuchen, welche anderen Zellzyklus-Faktoren daran beteiligt sind. Dabei könnten Untersuchungen an Podozyten-spezifischen Knockout Mäusen helfen, in denen konditionell Mediatoren der Zellzyklus-Kontrollpunkte (beispielsweise Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor, wie p21 oder Ink4) entfernt wurden.

Gegenstand der weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeit war die Beteiligung des podozytären TGF- $\beta$  Signalwegs an altersprogressiven Veränderungen sowie an pathologischen Prozessen. Insgesamt konnte hierbei festgestellt werden, dass der alleinige Knockout von Smad7 in Podozyten fähig war, progressive histopathologische Veränderungen, wie beispielsweise Glomerulosklerose und *Foot Process Effacement* innerhalb der Glomeruli negativ zu verstärken. Die daraus resultierende gegenläufige Hypothese lautet folglich, dass Smad7 protektiv auf die Niere wirken kann und unterstützt hierdurch beispielsweise die Untersuchungen von Ka *et al.*, die belegen konnten, dass sich in experimentellen Maus-Pathologie-Modellen ein Nieren-spezifischer Gentransfer von Smad7 positiv auf die Nierenmorphologie auswirkte, wodurch ein therapeutisches Potential für Smad7 gezeigt werden konnte (Ka *et al.*, 2007; Ka *et al.*, 2012).

Die Blockade des TGF- $\beta$  Signalwegs durch den Knockout des TGF- $\beta$  RII alleine in Podozyten hatte tendenziell protektive Effekte auf histopathologische Prozesse. Diese Befunde weisen in die Richtung der Untersuchungen von Kim *et al.* Diese zeigten, dass eine Reduktion der TGF- $\beta$  RII Expression (in heterozygoten Mäusen) den progressiven Verlauf einer DN oder der bogenförmigen Glomerulonephritis (crescentic glomerulonephritis) abmildert (Kim *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2007). Dennoch verdeutlicht der Vergleich dieser Ergebnisse, dass die positive Wirkung einer völligen Inhibierung der TGF- $\beta$  Signaltransduktion stärkere Effekte hervorruft, sobald verschiedene Kompartimente der Glomeruli gleichzeitig betroffen sind.

Ein weiterer interessanter Befund der vorliegenden Arbeit war, dass durch die Kurzzeitbehandlung von STZ die initialen Pathogenesen analysiert werden konnten, die zum ersten Mal aufzeigten, dass *Foot Process Effacement* Prozesse zuerst auftreten, bevor sich die pathologischen Bedingungen auf die Homöostase der GBM auswirken, wodurch vermutet werden kann, dass eine anfängliche Mikroalbuminurie mit dem Auftreten von *Foot Process Effacement* assoziiert werden kann, und dass eine Verbreiterung der GBM anschließend einen progressiven Verlauf einer Proteinurie unterstützt.

Um die oben genannten Ergebnisse weiterführend zu analysieren und zu verifizieren, könnte der Fokus nachfolgender Untersuchungen auf detailliertere molekulare Abläufe gelegt werden. Experimente zur Aufklärung der reduzierten Synaptopodin Expression in Podozyten von P-S7 kn Mäusen könnten Aufschlüsse darüber geben, in welchem Zusammenhang der TGF- $\beta$  Signalweg mit der Regulation des podozytären Aktin-Zytoskeletts steht und inwieweit TGF- $\beta$  und Synaptopodin an *Foot Process Effacement* Prozesse beteiligt sind.

Um die Rolle von TGF- $\beta$  während der Pathogenese von renalen Erkrankungen genauer aufzuklären, wäre es interessant die Funktion der Mesangial-Zellen und der Endothel-Zellen für die Homöostase der GBM-Zusammensetzung und der Modulation der EZM näher zu untersuchen. Hilfreich könnten hier Experimente unter Verwendung einer transgenen Cre-Maus mit einem induzierbaren Promotor für die Expression der Cre-Rekombinase sein. Dafür könnte sich die CAGGCre-ER<sup>TM</sup>-Maus eignen, dessen Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert wird (Danielian *et al.*, 1998; Hayashi and McMahon, 2002). Nach der jeweiligen Verpaarung mit Smad7<sup>flox/flox</sup> bzw. TGF- $\beta$  RII<sup>flox/flox</sup> Mäusen könnte durch die Administration von Tamoxifen über die *Arteria renalis* eine vorwiegend Nieren-spezifische Cre-Expression induziert werden. Die Folge wäre ein gezielter Knockout von Smad7 bzw. des TGF- $\beta$  RII in verschiedenen Zellen der Niere, einschließlich aller Komponenten der Glomeruli (glomeruläre Endothel- und Mesangial-Zellen sowie Podozyten). Daraufhin könnte das gesamte glomeruläre Zusammenspiel dieser Komponenten bei altersprogressiven Veränderungen analysiert werden. Außerdem könnte eine anschließende Induktion von DN

Aufschlüsse über die Zusammenhänge der TGF- $\beta$  Signalwege von verschiedenen glomerulären Zellen unter pathologischen Bedingungen geben.

Insgesamt zeigen die hier erhobenen Daten, genau wie andere Untersuchungen, dass gerade pathologische Prozesse ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Zellen, Signalwegen und Wachstumsfaktoren ist, deren Abläufe erst detailliert analysiert werden müssen, um daraus therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- Akhtar, M., and Al Mana, H. (2004): Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 11, 304-309.
- Akool, e.-S., Doller, A., Muller, R., Gutwein, P., Xin, C., Huwiler, A., Pfeilschifter, J., and Eberhardt, W. (2005): Nitric oxide induces timp-1 expression by activating the transforming growth factor beta-smad signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 39403-39416.
- Alpers, C.E., and Hudkins, K.L. (2011): Mouse models of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20, 278-284.
- Anderson, T.F. (1951): Technique for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscop. *Trans N Y Acad Sci* 13, 1-134.
- Attisano, L., and Lee-Hoeftlich, S.T. (2001): The smads. *Genome Biol* 2, REVIEWS3010.
- Aufderheide, E., Chiquet-Ehrismann, R., and Ekblom, P. (1987): Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J. Cell Biol.* 105, 599-608.
- Ayadi, A., Ferrand, G., Goncalves da Cruz, I., and Warot, X. (2011): Mouse breeding and colony management. *Current Protocols in Mouse Biology*, Online Posting.
- Baffi, M.O., Slattery, E., Sohn, P., Moses, H.L., Chyttil, A., and Serra, R. (2004): Conditional deletion of the tgf-beta type ii receptor in col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones. *Dev. Biol.* 276, 124-142.
- Banas, M.C., Parks, W.T., Hudkins, K.L., Banas, B., Holdren, M., Iyoda, M., Wietecha, T.A., Kowalewska, J., Liu, G., and Alpers, C.E. (2007): Localization of tgf-beta signaling intermediates smad2, 3, 4, and 7 in developing and mature human and mouse kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 275-285.
- Barisoni, L., Kriz, W., Mundel, P., and D'Agati, V. (1999): The dysregulated podocyte phenotype: A novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and hiv-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 51-61.
- Blutke, A. (2008): Common patterns of glomerular gene expression profiles in different murine models of early nephropathy Dissertation, Tierärztliche Fakultät, LMU München. S. 37.
- Bose, R., and Wrana, J.L. (2006): Regulation of par6 by extracellular signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 206-212.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P., and Antignac, C. (2000): Nphs2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 24, 349-354.

- Branton, M.H., and Kopp, J.B. (1999): Tgf-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1, 1349-1365.
- Breyer, M.D., Bottinger, E., Brosius, F.C., 3rd, Coffman, T.M., Harris, R.C., Heilig, C.W., and Sharma, K. (2005): Mouse models of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 27-45.
- Brosius, F.C., 3rd, Alpers, C.E., Bottinger, E.P., Breyer, M.D., Coffman, T.M., Gurley, S.B., Harris, R.C., Kakoki, M., Kretzler, M., Leiter, E.H., Levi, M., McIndoe, R.A., Sharma, K., Smithies, O., Susztak, K., Takahashi, N., and Takahashi, T. (2009): Mouse models of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2503-2512.
- Brunskill, E.W., Georgas, K., Rumballe, B., Little, M.H., and Potter, S.S. (2011): Defining the molecular character of the developing and adult kidney podocyte. *PLoS One* 6, e24640.
- Bush, K.T., Sakurai, H., Steer, D.L., Leonard, M.O., Sampogna, R.V., Meyer, T.N., Schwesinger, C., Qiao, J., and Nigam, S.K. (2004): Tgf-beta superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud. *Dev. Biol.* 266, 285-298.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., and Markl, J. (2003): Biologie. (Spektrum Akademischer Verlag).
- Chai, Q., Krag, S., Miner, J.H., Nyengaard, J.R., Chai, S., and Wogensen, L. (2003): Tgf-beta1 induces aberrant laminin chain and collagen type iv isotype expression in the glomerular basement membrane. *Nephron Exp. Nephrol.* 94, e123-136.
- Chen, H.Y., Huang, X.R., Wang, W., Li, J.H., Heuchel, R.L., Chung, A.C., and Lan, H.Y. (2011): The protective role of smad7 in diabetic kidney disease: Mechanism and therapeutic potential. *Diabetes* 60, 590-601.
- Chen, S., Kasama, Y., Lee, J.S., Jim, B., Marin, M., and Ziyadeh, F.N. (2004): Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(iv) collagen production by transforming growth factor-beta1 in mouse podocytes. *Diabetes* 53, 2939-2949.
- Cheng, H., and Harris, R.C. (2010): The glomerulus--a view from the outside--the podocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1380-1387.
- Cheng, J., and Grande, J.P. (2002): Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 227, 943-956.
- Choi, M.E., Liu, A., and Ballermann, B.J. (1997): Differential expression of transforming growth factor-beta receptors in rat kidney development. *Am. J. Physiol.* 273, F386-395.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987): Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chomczynski, P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of rna, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-534, 536-537.
- Choudhury, D., and Levi, M. (2011): Kidney aging--inevitable or preventable? *Nat Rev Nephrol* 7, 706-717.
- Chuang, P.Y., and He, J.C. (2009): Signaling in regulation of podocyte phenotypes. *Nephron Physiol.* 111, p9-15.

- Chytil, A., Magnuson, M.A., Wright, C.V., and Moses, H.L. (2002): Conditional inactivation of the tgf-beta type ii receptor using cre:Lox. *Genesis* 32, 73-75.
- Clark, A.T., Ford, M.D., Nurcombe, V., Alcorn, D., Key, B., Puche, A.C., and Bertram, J.F. (1995): Expression of transforming growth factor- $\beta$  type ii receptor mRNA in embryonic and adult rat kidney. *Nephrology* 1, 547-553.
- Clark, A.T., Young, R.J., and Bertram, J.F. (2001): In vitro studies on the roles of transforming growth factor-beta 1 in rat metanephric development. *Kidney Int.* 59, 1641-1653.
- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., and McMahon, A.P. (1998): Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of cre recombinase. *Curr. Biol.* 8, 1323-1326.
- Deen, W.M., Lazzara, M.J., and Myers, B.D. (2001): Structural determinants of glomerular permeability. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281, F579-596.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003): Smad-dependent and smad-independent pathways in tgf-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Dessapt, C., Baradez, M.O., Hayward, A., Dei Cas, A., Thomas, S.M., Viberti, G., and Gnudi, L. (2009): Mechanical forces and tgf $\beta$ 1 reduce podocyte adhesion through alpha3beta1 integrin downregulation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 2645-2655.
- Dressler, G.R. (2006): The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 509-529.
- Dudley, A.T., Lyons, K.M., and Robertson, E.J. (1995): A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* 9, 2795-2807.
- Dunker, N., and Kriegstein, K. (2000): Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur. J. Biochem.* 267, 6982-6988.
- Durvasula, R.V., Petermann, A.T., Hiromura, K., Blonski, M., Pippin, J., Mundel, P., Pichler, R., Griffin, S., Couser, W.G., and Shankland, S.J. (2004): Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int.* 65, 30-39.
- Eddy, A.A. (2002): Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, F209-220.
- Eddy, A.A., and Fogo, A.B. (2006): Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: Evidence and mechanisms of action. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2999-3012.
- El-Aouni, C., Herbach, N., Blattner, S.M., Henger, A., Rastaldi, M.P., Jarad, G., Miner, J.H., Moeller, M.J., St-Arnaud, R., Dedhar, S., Holzman, L.B., Wanke, R., and Kretzler, M. (2006): Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1334-1344.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003): Cell polarity: Par6, apkc and cytoskeletal crosstalk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 67-72.
- Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., and Mundel, P. (2007): Actin up: Regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 17, 428-437.

- Fogo, A.B., and Kon, V. (2010): The glomerulus--a view from the inside--the endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1388-1397.
- Fuchshofer, R., Birke, M., Welge-Lussen, U., Kook, D., and Lutjen-Drecoll, E. (2005): Transforming growth factor-beta 2 modulated extracellular matrix component expression in cultured human optic nerve head astrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 568-578.
- Fuchshofer, R., Ullmann, S., Zeilbeck, L.F., Baumann, M., Junglas, B., and Tamm, E.R. (2011): Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury. *Histochem. Cell Biol.* 136, 301-319.
- Fujimoto, M., Maezawa, Y., Yokote, K., Joh, K., Kobayashi, K., Kawamura, H., Nishimura, M., Roberts, A.B., Saito, Y., and Mori, S. (2003): Mice lacking smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 1002-1007.
- George, B., Verma, R., Soofi, A.A., Garg, P., Zhang, J., Park, T.J., Giardino, L., Ryzhova, L., Johnstone, D.B., Wong, H., Nihalani, D., Salant, D.J., Hanks, S.K., Curran, T., Rastaldi, M.P., and Holzman, L.B. (2012): Crk1/2-dependent signaling is necessary for podocyte foot process spreading in mouse models of glomerular disease. *J Clin Invest* 122, 674-692.
- Ghayur, A., Liu, L., Kolb, M., Chawla, A., Lambe, S., Kapoor, A., and Margetts, P.J. (2012): Adenovirus-mediated gene transfer of tgf-beta1 to the renal glomeruli leads to proteinuria. *Am. J. Pathol.* 180, 940-951.
- Ghosh, A.K., and Vaughan, D.E. (2011): Pai-1 in tissue fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 227, 493-507.
- Gibson, U.E., Heid, C.A., and Williams, P.M. (1996): A novel method for real time quantitative rt-pcr. *Genome Res.* 6, 995-1001.
- Gilboa, L., Wells, R.G., Lodish, H.F., and Henis, Y.I. (1998): Oligomeric structure of type i and type ii transforming growth factor beta receptors: Homodimers form in the er and persist at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 140, 767-777.
- Gore-Hyer, E., Shegogue, D., Markiewicz, M., Lo, S., Hazen-Martin, D., Greene, E.L., Grotendorst, G., and Trojanowska, M. (2002): Tgf-beta and ctgf have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, F707-716.
- Goumans, M.J., and Mummery, C. (2000): Functional analysis of the tgfbeta receptor/smad pathway through gene ablation in mice. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 253-265.
- Greka, A., and Mundel, P. (2012): Cell biology and pathology of podocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 299-323.
- Guha, M., Xu, Z.G., Tung, D., Lanting, L., and Natarajan, R. (2007): Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *FASEB J.* 21, 3355-3368.

- Hartleben, B., Schweizer, H., Lubben, P., Bartram, M.P., Moller, C.C., Herr, R., Wei, C., Neumann-Haefelin, E., Schermer, B., Zentgraf, H., Kerjaschki, D., Reiser, J., Walz, G., Benzing, T., and Huber, T.B. (2008): Neph-nephrin proteins bind the par3-par6-atypical protein kinase c (apkc) complex to regulate podocyte cell polarity. *J. Biol. Chem.* 283, 23033-23038.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., and Falb, D. (1997): The mad-related protein smad7 associates with the tgf $\beta$  receptor and functions as an antagonist of tgf $\beta$  signaling. *Cell* 89, 1165-1173.
- Hayashi, S., and McMahon, A.P. (2002): Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Biol.* 244, 305-318.
- Herman-Edelstein, M., Thomas, M.C., Thallas-Bonke, V., Saleem, M., Cooper, M.E., and Kantharidis, P. (2011): Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor-beta: A model for diabetic podocytopathy. *Diabetes* 60, 1779-1788.
- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in phastsystem development unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993): Kinetic pcr analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030.
- Hirakawa, M., Tsuruya, K., Yotsueda, H., Tokumoto, M., Ikeda, H., Katafuchi, R., Fujimi, S., Hirakata, H., and Iida, M. (2006): Expression of synaptopodin and glepp1 as markers of steroid responsiveness in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Life Sci.* 79, 757-763.
- Holthofer, H., Miettinen, A., Lehto, V.P., Lehtonen, E., and Virtanen, I. (1984): Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Lab Invest* 50, 552-559.
- Hong, S.W., Isono, M., Chen, S., Iglesias-De La Cruz, M.C., Han, D.C., and Ziyadeh, F.N. (2001): Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor-beta1, its type ii receptor, and activation of the smad signaling pathway in the db/db mouse. *Am. J. Pathol.* 158, 1653-1663.
- Huang, H.C., Liang, Y., and Cheng, L.J. (2004): [transforming growth factor beta 1 modulates connective tissue growth factor expression via smad2 signaling pathway in podocyte in vitro]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 84, 574-577.
- Hubchak, S.C., Runyan, C.E., Kreisberg, J.I., and Schnaper, H.W. (2003): Cytoskeletal rearrangement and signal transduction in tgf-beta1-stimulated mesangial cell collagen accumulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 1969-1980.
- Ichimura, K., Kurihara, H., and Sakai, T. (2003): Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1589-1600.
- Iglesias-de la Cruz, M.C., Ziyadeh, F.N., Isono, M., Kouahou, M., Han, D.C., Kalluri, R., Mundel, P., and Chen, S. (2002): Effects of high glucose and tgf-beta1 on the expression of collagen iv and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int.* 62, 901-913.

- Ihn, H. (2002): Pathogenesis of fibrosis: Role of tgf-beta and ctgf. *Curr. Opin. Rheumatol.* 14, 681-685.
- Im, Y.H., Kim, H.T., Kim, I.Y., Factor, V.M., Hahm, K.B., Anzano, M., Jang, J.J., Flanders, K., Haines, D.C., Thorgeirsson, S.S., Sizeland, A., and Kim, S.J. (2001): Heterozygous mice for the transforming growth factor-beta type ii receptor gene have increased susceptibility to hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 61, 6665-6668.
- Ito, Y., Goldschmeding, R., Kasuga, H., Claessen, N., Nakayama, M., Yuzawa, Y., Sawai, A., Matsuo, S., Weening, J.J., and Aten, J. (2010): Expression patterns of connective tissue growth factor and of tgf-beta isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 299, F545-558.
- Jefferson, J.A., Nelson, P.J., Najafian, B., and Shankland, S.J. (2011): Podocyte disorders: Core curriculum 2011. *Am J Kidney Dis* 58, 666-677.
- Johnstone, D.B., Zhang, J., George, B., Leon, C., Gachet, C., Wong, H., Parekh, R., and Holzman, L.B. (2011): Podocyte-specific deletion of myh9 encoding nonmuscle myosin heavy chain 2a predisposes mice to glomerulopathy. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2162-2170.
- Ka, S.M., Huang, X.R., Lan, H.Y., Tsai, P.Y., Yang, S.M., Shui, H.A., and Chen, A. (2007): Smad7 gene therapy ameliorates an autoimmune crescentic glomerulonephritis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1777-1788.
- Ka, S.M., Yeh, Y.C., Huang, X.R., Chao, T.K., Hung, Y.J., Yu, C.P., Lin, T.J., Wu, C.C., Lan, H.Y., and Chen, A. (2012): Kidney-targeting smad7 gene transfer inhibits renal tgf-beta/mad homologue (smad) and nuclear factor kappaB (nf-kappaB) signalling pathways, and improves diabetic nephropathy in mice. *Diabetologia* 55, 509-519.
- Kanasaki, K., Kanda, Y., Palmsten, K., Tanjore, H., Lee, S.B., Lebleu, V.S., Gattone, V.H., Jr., and Kalluri, R. (2008): Integrin beta1-mediated matrix assembly and signaling are critical for the normal development and function of the kidney glomerulus. *Dev. Biol.* 313, 584-593.
- Kanwar, Y.S., Linker, A., and Farquhar, M.G. (1980): Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell Biol.* 86, 688-693.
- Kato, T., Mizuno, S., and Nakamura, T. (2011): Preservations of nephrin and synaptopodin by recombinant hepatocyte growth factor in podocytes for the attenuations of foot process injury and albuminuria in nephritic mice. *Nephrology (Carlton)* 16, 310-318.
- Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A., and Tryggvason, K. (1998): Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1, 575-582.
- Khoshnoodi, J., and Tryggvason, K. (2001): Congenital nephrotic syndromes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 322-327.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., and Hudson, B.G. (2008): Mammalian collagen iv. *Microsc Res Tech* 71, 357-370.

- Kim, H.W., Kim, B.C., Song, C.Y., Kim, J.H., Hong, H.K., and Lee, H.S. (2004): Heterozygous mice for tgf-beta1ir gene are resistant to the progression of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 66, 1859-1865.
- Kim, J.H., Kim, B.K., Moon, K.C., Hong, H.K., and Lee, H.S. (2003): Activation of the tgf-beta/smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 64, 1715-1721.
- Kim, T.S., Kim, J.Y., Hong, H.K., and Lee, H.S. (1999): Mrna expression of glomerular basement membrane proteins and tgf-beta1 in human membranous nephropathy. *J. Pathol.* 189, 425-430.
- Kleiter, I., Song, J., Lukas, D., Hasan, M., Neumann, B., Croxford, A.L., Pedre, X., Hovelmeyer, N., Yoge, N., Mildner, A., Prinz, M., Wiese, E., Reifenberg, K., Bittner, S., Wiendl, H., Steinman, L., Becker, C., Bogdahn, U., Neurath, M.F., Steinbrecher, A., and Waisman, A. (2010): Smad7 in t cells drives t helper 1 responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 133, 1067-1081.
- Kohan, D.E. (2008): Progress in gene targeting: Using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int.* 74, 427-437.
- Krag, S., Danielsen, C.C., Carmeliet, P., Nyengaard, J., and Wogensen, L. (2005): Plasminogen activator inhibitor-1 gene deficiency attenuates tgf-beta1-induced kidney disease. *Kidney Int.* 68, 2651-2666.
- Krag, S.r., Nyengaard, J.R., and Wogensen, L. (2007): Combined effects of moderately elevated blood glucose and locally produced tgf- $\beta$ 1 on glomerular morphology and renal collagen production. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, 2485-2496.
- Kriz, W., Kaissling, B., and Le Hir, M. (2011): Epithelial-mesenchymal transition (emt) in kidney fibrosis: Fact or fantasy? *J Clin Invest* 121, 468-474.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, H.S. (2011): Pathogenic role of tgf-beta in the progression of podocyte diseases. *Histol. Histopathol.* 26, 107-116.
- Lee, H.S. (2012): Mechanisms and consequences of tgf-ss overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res.* 347, 129-140.
- Lehnert, S.A., and Akhurst, R.J. (1988): Embryonic expression pattern of tgf beta type-1 rna suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development* 104, 263-273.
- Li, J.J., Kwak, S.J., Jung, D.S., Kim, J.J., Yoo, T.H., Ryu, D.R., Han, S.H., Choi, H.Y., Lee, J.E., Moon, S.J., Kim, D.K., Han, D.S., and Kang, S.W. (2007): Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.*, S36-42.
- Li, R., Rosendahl, A., Brodin, G., Cheng, A.M., Ahgren, A., Sundquist, C., Kulkarni, S., Pawson, T., Heldin, C.H., and Heuchel, R.L. (2006): Deletion of exon i of smad7 in mice results in altered b cell responses. *J. Immunol.* 176, 6777-6784.
- Li, Y., Kang, Y.S., Dai, C., Kiss, L.P., Wen, X., and Liu, Y. (2008): Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am. J. Pathol.* 172, 299-308.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods* 25, 402-408.
- Lodha, S., Dani, D., Mehta, R., Bhaskaran, M., Reddy, K., Ding, G., and Singhal, P.C. (2002): Angiotensin ii-induced mesangial cell apoptosis: Role of oxidative stress. *Mol Med* 8, 830-840.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., and Massague, J. (1994): Betaglycan can act as a dual modulator of tgf-beta access to signaling receptors: Mapping of ligand binding and gag attachment sites. *J. Cell Biol.* 124, 557-568.
- Luft, J.H. (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 409-414.
- Lüllmann-Raucher, R. (2006): *Histologie*, 2. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, 597-598.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A., and Karsenty, G. (1995): Bmp-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9, 2808-2820.
- Ma, H., Togawa, A., Soda, K., Zhang, J., Lee, S., Ma, M., Yu, Z., Ardito, T., Czyzyk, J., Diggs, L., Joly, D., Hatakeyama, S., Kawahara, E., Holzman, L., Guan, J.L., and Ishibe, S. (2010): Inhibition of podocyte fak protects against proteinuria and foot process effacement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1145-1156.
- Mariano, J.M., Montuenga, L.M., Prentice, M.A., Cuttitta, F., and Jakowlew, S.B. (1998): Concurrent and distinct transcription and translation of transforming growth factor-beta type i and type ii receptors in rodent embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1125-1136.
- Martin, J., Steadman, R., Knowlden, J., Williams, J., and Davies, M. (1998): Differential regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human glomerular epithelial cells in vitro. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1629-1637.
- Mason, R.M. (2009): Connective tissue growth factor(ccn2), a pathogenic factor in diabetic nephropathy. What does it do? How does it do it? *J Cell Commun Signal* 3, 95-104.
- Michaud, J.L., and Kennedy, C.R. (2007): The podocyte in health and disease: Insights from the mouse. *Clin. Sci. (Lond.)* 112, 325-335.
- Miner, J.H. (2011a): Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr. Nephrol.* 26, 1413-1417.
- Miner, J.H. (2011b): Organogenesis of the kidney glomerulus: Focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis* 7, 75-82.
- Moeller, M.J., Sanden, S.K., Soofi, A., Wiggins, R.C., and Holzman, L.B. (2002): Two gene fragments that direct podocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1561-1567.
- Moeller, M.J., Sanden, S.K., Soofi, A., Wiggins, R.C., and Holzman, L.B. (2003): Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 35, 39-42.
- Moore, K., Persaud, T.V.N., and Viebahn, C. (2007): *Embryologie*. (Elsevier, Urban&FischerVerlag).

- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2008): Dynamic control of tgf-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett.* 582, 2051-2065.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Mundel, P., Heid, H.W., Mundel, T.M., Kruger, M., Reiser, J., and Kriz, W. (1997a): Synaptopodin: An actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J. Cell Biol.* 139, 193-204.
- Mundel, P., Reiser, J., Zuniga Mejia Borja, A., Pavenstadt, H., Davidson, G.R., Kriz, W., and Zeller, R. (1997b): Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp. Cell Res.* 236, 248-258.
- Mundel, P., and Reiser, J. (2010): Proteinuria: An enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int.* 77, 571-580.
- Nguyen, T.Q., Roestenberg, P., van Nieuwenhoven, F.A., Bovenschen, N., Li, Z., Xu, L., Oliver, N., Aten, J., Joles, J.A., Vial, C., Brandan, E., Lyons, K.M., and Goldschmeding, R. (2008): Ctgf inhibits bmp-7 signaling in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 2098-2107.
- Nomura, M., and Li, E. (1998): Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* 393, 786-790.
- Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M.M. (1996): Tgf-beta receptor type ii deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 179, 297-302.
- Oxburgh, L., and Robertson, E.J. (2002): Dynamic regulation of smad expression during mesenchyme to epithelium transition in the metanephric kidney. *Mech. Dev.* 112, 207-211.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005): Regulation of the polarity protein par6 by tgfbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307, 1603-1609.
- Patrakka, J., and Tryggvason, K. (2010): Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 164-169.
- Pavenstadt, H., Kriz, W., and Kretzler, M. (2003): Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol. Rev.* 83, 253-307.
- Pelton, R.W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H.L., and Gold, L.I. (1991): Immunohistochemical localization of tgf beta 1, tgf beta 2, and tgf beta 3 in the mouse embryo: Expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J. Cell Biol.* 115, 1091-1105.
- Percy, C.J., Power, D., and Gobe, G.C. (2008): Renal ageing: Changes in the cellular mechanism of energy metabolism and oxidant handling. *Nephrology (Carlton)* 13, 147-152.
- Peters, I., Tossidou, I., Achenbach, J., Woroniecki, R., Mengel, M., Park, J.K., Paschy, M., de Groot, K., Haller, H., and Schiffer, M. (2006): Igf-binding protein-3 modulates tgf-beta/bmp-signaling in glomerular podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1644-1656.

- Phanish, M.K., Winn, S.K., and Dockrell, M.E. (2010): Connective tissue growth factor-(ctgf, ccn2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp. Nephrol.* 114, e83-92.
- Phillips, A., Janssen, U., and Floege, J. (1999): Progression of diabetic nephropathy. Insights from cell culture studies and animal models. *Kidney Blood Press. Res.* 22, 81-97.
- Pohlers, D., Brenmoehl, J., Loffler, I., Muller, C.K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R.W., and Wolf, G. (2009): Tgf-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 746-756.
- Putala, H., Soininen, R., Kilpelainen, P., Wartiovaara, J., and Tryggvason, K. (2001): The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: Inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1-8.
- Qi, W., Chen, X., Twigg, S., Polhill, T.S., Gilbert, R.E., and Pollock, C.A. (2006): Tranilast attenuates connective tissue growth factor-induced extracellular matrix accumulation in renal cells. *Kidney Int.* 69, 989-995.
- Quaggin, S.E., and Kreidberg, J.A. (2008): Development of the renal glomerulus: Good neighbors and good fences. *Development* 135, 609-620.
- Ra, H.J., and Parks, W.C. (2007): Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 26, 587-596.
- Raats, C.J., Van Den Born, J., and Berden, J.H. (2000): Glomerular heparan sulfate alterations: Mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* 57, 385-400.
- Rashed, T., Menon, M., and Thamilselvan, S. (2004): Molecular mechanism of oxalate-induced free radical production and glutathione redox imbalance in renal epithelial cells: Effect of antioxidants. *Am. J. Nephrol.* 24, 557-568.
- Reddy, G.R., Kotlyarevska, K., Ransom, R.F., and Menon, R.K. (2008): The podocyte and diabetes mellitus: Is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17, 32-36.
- Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M., and Mundel, P. (2000): The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 1-8.
- Riser, B.L., Cortes, P., Yee, J., Sharba, A.K., Asano, K., Rodriguez-Barbero, A., and Narins, R.G. (1998): Mechanical strain- and high glucose-induced alterations in mesangial cell collagen metabolism: Role of tgf-beta. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 827-836.
- Rodewald, R., and Karnovsky, M.J. (1974): Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol.* 60, 423-433.
- Rodriguez, C., Chen, F., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. (1995): Cooperative binding of transforming growth factor (tgf)-beta 2 to the types i and ii tgf-beta receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 15919-15922.
- Rogers, S.A., Ryan, G., Purchio, A.F., and Hammerman, M.R. (1993): Metanephric transforming growth factor-beta 1 regulates nephrogenesis in vitro. *Am. J. Physiol.* 264, F996-1002.
- Romano, A.D., Serviddio, G., de Mattheis, A., Bellanti, F., and Vendemiale, G. (2010): Oxidative stress and aging. *J Nephrol* 23 Suppl 15, S29-36.

- Ruiz-Torres, M.P., Bosch, R.J., O'Valle, F., Del Moral, R.G., Ramirez, C., Masseroli, M., Perez-Caballero, C., Iglesias, M.C., Rodriguez-Puyol, M., and Rodriguez-Puyol, D. (1998): Age-related increase in expression of tgf-beta1 in the rat kidney: Relationship to morphologic changes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 782-791.
- Saleem, M.A., O'Hare, M.J., Reiser, J., Coward, R.J., Inward, C.D., Farren, T., Xing, C.Y., Ni, L., Mathieson, P.W., and Mundel, P. (2002): A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 630-638.
- Sam, R., Wanna, L., Gudehithlu, K.P., Garber, S.L., Dunea, G., Arruda, J.A., and Singh, A.K. (2006): Glomerular epithelial cells transform to myofibroblasts: Early but not late removal of tgf-beta1 reverses transformation. *Transl Res* 148, 142-148.
- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. (1997): Tgfbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other tgfbeta knockout phenotypes. *Development* 124, 2659-2670.
- Satchell, S.C., and Braet, F. (2009): Glomerular endothelial cell fenestrations: An integral component of the glomerular filtration barrier. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296, F947-956.
- Sayers, R., Kalluri, R., Rodgers, K.D., Shield, C.F., Meehan, D.T., and Cosgrove, D. (1999): Role for transforming growth factor-beta1 in alport renal disease progression. *Kidney Int.* 56, 1662-1673.
- Schmid, H., Henger, A., Cohen, C.D., Frach, K., Grone, H.J., Schlondorff, D., and Kretzler, M. (2003): Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2958-2966.
- Schmierer, B., and Hill, C.S. (2007): Tgfbeta-smad signal transduction: Molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 970-982.
- Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M.A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A.S., Holzman, L.B., and Mundel, P. (2001): Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with cd2ap and nephrin. *J Clin Invest* 108, 1621-1629.
- Segarini, P.R. (1993): Tgf-beta receptors: A complicated system of multiple binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1155, 269-275.
- Seo, H.S., and Serra, R. (2007): Deletion of tgfbr2 in prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev. Biol.* 310, 304-316.
- Seo, J.Y., Park, J., Yu, M.R., Kim, Y.S., Ha, H., and Lee, H.B. (2009): Positive feedback loop between plasminogen activator inhibitor-1 and transforming growth factor-beta1 during renal fibrosis in diabetes. *Am. J. Nephrol.* 30, 481-490.
- Shankland, S.J. (2006): The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 69, 2131-2147.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003): Mechanisms of tgf-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.

- Shimizu, M., Kondo, S., Urushihara, M., Takamatsu, M., Kanemoto, K., Nagata, M., and Kagami, S. (2006): Role of integrin-linked kinase in epithelial-mesenchymal transition in crescent formation of experimental glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 2380-2390.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., and et al. (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.
- Silva, F.G. (2005): The aging kidney: A review -- part i. *Int. Urol. Nephrol.* 37, 185-205.
- Simons, M., Hartleben, B., and Huber, T.B. (2009): Podocyte polarity signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18, 324-330.
- Singh, A., Satchell, S.C., Neal, C.R., McKenzie, E.A., Tooke, J.E., and Mathieson, P.W. (2007): Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2885-2893.
- Sirard, C., de la Pompa, J.L., Elia, A., Itie, A., Mirtsos, C., Cheung, A., Hahn, S., Wakeham, A., Schwartz, L., Kern, S.E., Rossant, J., and Mak, T.W. (1998): The tumor suppressor gene smad4/dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* 12, 107-119.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Song, C.Y., Kim, B.C., Hong, H.K., and Lee, H.S. (2007): Tgf-beta type ii receptor deficiency prevents renal injury via decrease in erk activity in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 71, 882-888.
- Souchelnytskyi, S., Nakayama, T., Nakao, A., Moren, A., Heldin, C.H., Christian, J.L., and ten Dijke, P. (1998): Physical and functional interaction of murine and xenopus smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 25364-25370.
- Stitt-Cavanagh, E., MacLeod, L., and Kennedy, C. (2009): The podocyte in diabetic kidney disease. *ScientificWorldJournal* 9, 1127-1139.
- Takemoto, M., Asker, N., Gerhardt, H., Lundkvist, A., Johansson, B.R., Saito, Y., and Betsholtz, C. (2002): A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am. J. Pathol.* 161, 799-805.
- Tamsma, J.T., van den Born, J., Bruijn, J.A., Assmann, K.J., Weening, J.J., Berden, J.H., Wieslander, J., Schrama, E., Hermans, J., Veerkamp, J.H., and et al. (1994): Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: Decrease of heparan sulphate in the glomerular basement membrane. *Diabetologia* 37, 313-320.
- Taylor, S.A., and Price, R.G. (1982): Age-related changes in rat glomerular basement membrane. *Int. J. Biochem.* 14, 201-206.
- ten Dijke, P., and Hill, C.S. (2004): New insights into tgf-beta-smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* 29, 265-273.

- Tesch, G.H., and Allen, T.J. (2007): Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 12, 261-266.
- Tryggvason, K. (1999): Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: Nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2440-2445.
- Umezono, T., Toyoda, M., Kato, M., Miyauchi, M., Kimura, M., Maruyama, M., Honma, M., Yagame, M., and Suzuki, D. (2006): Glomerular expression of ctgf, tgf-beta 1 and type iv collagen in diabetic nephropathy. *J Nephrol* 19, 751-757.
- van Det, N.F., Verhagen, N.A., Tamsma, J.T., Berden, J.H., Bruijn, J.A., Daha, M.R., and van der Woude, F.J. (1997): Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor-beta by high glucose, not by angiotensin ii. *Diabetes* 46, 834-840.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92, 827-839.
- Vrljicak, P., Myburgh, D., Ryan, A.K., van Rooijen, M.A., Mummery, C.L., and Gupta, I.R. (2004): Smad expression during kidney development. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F625-633.
- Wahab, N.A., and Mason, R.M. (2004): Connective tissue growth factor and renal diseases: Some answers, more questions. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13, 53-58.
- Wang, S., and Hirschberg, R. (2003): Bmp7 antagonizes tgf-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284, F1006-1013.
- Weinstein, M., Yang, X., and Deng, C. (2000): Functions of mammalian smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 49-58.
- Welsch, U. (2005): Lehrbuch histologie. (Elsevier).
- Wendt, M.K., Allington, T.M., and Schiemann, W.P. (2009): Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by tgf-beta. *Future Oncol* 5, 1145-1168.
- Whiteside, C.I., Cameron, R., Munk, S., and Levy, J. (1993): Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am. J. Pathol.* 142, 1641-1653.
- Wiggins, R.C. (2007): The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 71, 1205-1214.
- Wolf, G., Sharma, K., Chen, Y., Erickson, M., and Ziyadeh, F.N. (1992): High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine tgf-beta. *Kidney Int.* 42, 647-656.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., and Massague, J. (1992): Tgf beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003-1014.
- Wu, D.T., Bitzer, M., Ju, W., Mundel, P., and Bottinger, E.P. (2005): Tgf-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3211-3221.

- Xu, Z.G., Ryu, D.R., Yoo, T.H., Jung, D.S., Kim, J.J., Kim, H.J., Choi, H.Y., Kim, J.S., Adler, S.G., Natarajan, R., Han, D.S., and Kang, S.W. (2005): P-cadherin is decreased in diabetic glomeruli and in glucose-stimulated podocytes in vivo and in vitro studies. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20, 524-531.
- Yan, X., and Chen, Y.G. (2011): Smad7: Not only a regulator, but also a cross-talk mediator of tgf-beta signalling. *Biochem. J.* 434, 1-10.
- Yang, H., and Fogo, A.B. (2010): Cell senescence in the aging kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1436-1439.
- Yaoita, E., Kawasaki, K., Yamamoto, T., and Kihara, I. (1990): Variable expression of desmin in rat glomerular epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 136, 899-908.
- Yeh, Y.C., Wei, W.C., Wang, Y.K., Lin, S.C., Sung, J.M., and Tang, M.J. (2010): Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces smad3-dependent  $\beta$ 1 integrin gene expression in epithelial-to-mesenchymal transition during chronic tubulointerstitial fibrosis. *Am. J. Pathol.* 177, 1743-1754.
- Yokoi, H., Mukoyama, M., Mori, K., Kasahara, M., Suganami, T., Sawai, K., Yoshioka, T., Saito, Y., Ogawa, Y., Kuwabara, T., Sugawara, A., and Nakao, K. (2008): Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. *Kidney Int.* 73, 446-455.
- Yu, L., Lin, Q., Liao, H., Feng, J., Dong, X., and Ye, J. (2010): Tgf-beta1 induces podocyte injury through smad3-erk-nf-kappab pathway and fyn-dependent trpc6 phosphorylation. *Cell. Physiol. Biochem.* 26, 869-878.
- Zhou, X.J., Rakheja, D., Yu, X., Saxena, R., Vaziri, N.D., and Silva, F.G. (2008): The aging kidney. *Kidney Int.* 74, 710-720.
- Ziyadeh, F.N., Sharma, K., Erickson, M., and Wolf, G. (1994): Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 93, 536-542.
- Ziyadeh, F.N., Hoffman, B.B., Han, D.C., Iglesias-De La Cruz, M.C., Hong, S.W., Isono, M., Chen, S., McGowan, T.A., and Sharma, K. (2000): Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8015-8020.
- Ziyadeh, F.N., and Wolf, G. (2008): Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev* 4, 39-45.

## 7.2 Allgemeines Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α	anti oder alpha
β	beta
γ	gamma
Δ	Delta
×	-fach/mal
°C	Grad Celsius
μ	mikro ( $10^{-6}$ )
∞	unendlich
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ad	zu
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary</i> )
cm	Zentimeter
CNSF	Kongenitales Nephrotisches Syndrom des Finnischen Typs
Col IV	Kollagen Typ IV
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
d	Tage
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DG	Dystroglycan
dH <sub>2</sub> O	einfach destilliertes Wasser
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN	Diabetische Nephropathie

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<b>E</b>	Extinktion oder Embryonalstadium
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure (Titriplex III)
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ESRD	<i>End-stage renal disease</i>
<i>et al.</i>	Und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetal bovine serum (fötales Kälberserum)
FF	Fußfortsatz
FL	Fluoreszenzlicht
FSGS	Fokale Segmentale Glomerulosklerose
<b>g</b>	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GDF	<i>Growth differentiation factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
<b>h</b>	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
ILK	<i>Integrin-linked Kinase</i>
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
<b>J</b>	Joule
<b>k</b>	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<b>l</b>	Liter
Lac-Z	Gen der $\beta$ -Galactosidase
<b>m</b>	Meter oder milli
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MCD	Minimal Change Disease

---

MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
<b>N</b>	Normal
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PF	Primärfortsatz
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen einer Lösung
P-TR2 kn	Podozyten-spezifischer Knockout des TGF-β RII
P-S7 kn	Podozyten-spezifischer Knockout von Smad7
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungszahl
RT	Reverse Transkription, Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SMA	<i>smooth-muscle α-Actin</i>
Smad	<i>small mothers against decapentaplegic</i>
sog.	sogenannten
Strep	Streptavidin
STZ	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TBS mit EDTA
TBS	Tris-Kochsalz-Puffer ( <i>tris buffered saline</i> )
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TF	Transkriptionsfaktor

TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-β RI bzw. RII	<i>Transforming Growth Factor beta Rezeptor I bzw. Rezeptor II</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ü.N.	über Nacht
<b>V</b>	Volt
vs.	versus
<b>W</b>	Watt
WT-1	Wilms-Tumor-Protein-1
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
ZO-1	Zonula Occludens-1

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der Verbrauchsmaterialien .....	26
Tab. 2: Liste der verwendeten Geräte .....	27
Tab. 3: Pufferzusammensetzung .....	28
Tab. 4: Liste der verwendeten PCR-Oligonukleotidprimer .....	29
Tab. 5: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR .....	29
Tab. 6: Cyclerprogramme der verschiedenen Genotypisierungs-PCRs .....	30
Tab. 7: Cyclerprogramme der beiden Deletions-PCRs .....	30
Tab. 8: Reaktionsansatz für cDNA Synthese .....	34
Tab. 9: PCR-Programm für cDNA Synthese .....	35
Tab. 10: Liste der verwendeten Primer der semi-quantitativen RT-PCRs .....	35
Tab. 11: Reaktionsansatz der semi-quantitativen RT-PCR .....	35
Tab. 12: Cyclerprogramme der semi-quantitativen RT-PCRs .....	36
Tab. 13: Liste der verwendeten Primer der quantitativen real time RT-PCRs .....	37
Tab. 14: Reaktionsansätze der q RT-PCR .....	37
Tab. 15: Cyclerprogramm der q RT-PCRs .....	38
Tab. 16: Puffer für die SDS-PAGE .....	41
Tab. 17: Rezepte für die Herstellung verschieden dichter Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE .....	41
Tab. 18: Aufbau des Semidry Blots .....	43
Tab. 19: Liste der verwendeten Antikörper für die Western Blot Analysen .....	44
Tab. 20: Puffer für die Silberfärbung .....	46
Tab. 21: Verwendete Zelllinien, die dazu gehörigen Medien und deren Kultivierungsbedingungen .....	47
Tab. 22: Präparation Besteck (bezogen von FST GmbH, Heidelberg) .....	53
Tab. 23: Liste der Antikörper für immunhistochemische Färbungen .....	64
Tab. 24: P-S7 kn und Smad7 <sup>flox/flox</sup> -Mäuse zeigten vergleichbare morphologische Nieren-Parameter .....	86
Tab. 25: P-TR2 kn und TGF-β RII <sup>flox/flox</sup> -Mäuse zeigten vergleichbare morphologische Nieren-Parameter .....	88

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des klassischen TGF- $\beta$ Signalwegs.....	11
Abb. 2: Aufbau des Nephrons und des Nierenkörperchens.....	14
Abb. 3: Spezifische Podozyten Morphologie mit ineinander verzahnten Fußfortsätzen.....	17
Abb. 4: Schematische Darstellung der Schlitzmembran von benachbarten Fußfortsätzen der Podozyten.....	18
Abb. 5: Verpaarungsschema.....	52
Abb. 6: Prinzip der Glomeruli-Isolierung mit Hilfe von magnetischen Micropartikeln .....	55
Abb. 7: Isolierte primäre Podozyten zeigten eine charakteristische längliche und verzweigte Morphologie. ....	70
Abb. 8: Primäre Podozyten exprimierten typische Podozyten-Marker wie Synaptopodin und WT-1. ....	71
Abb. 9: Primäre Zellkulturen zeigten überwiegend WT-1 positive Podozyten mit geringen Verunreinigungen von $\alpha$ -SMA positiven Mesangial-Zellen.....	72
Abb. 10: Glomeruli-DNA von P-S7 kn Mäusen zeigte eine erfolgreich stattgefundene Rekombination.....	74
Abb. 11: Glomeruli-DNA von P-TR2 kn Mäusen zeigte eine erfolgreich stattgefundene Rekombination.....	75
Abb. 12: Der Podozyten-spezifische Knockout führte zu einer Reduktion der Smad7 Expression. ....	76
Abb. 13: Der Podozyten-spezifische Knockout führte zu einer Reduktion der TGF- $\beta$ RII Expression. ....	77
Abb. 14: Podozyten in P-S7 kn Glomeruli zeigten keine Expression von Smad7.....	79
Abb. 15: Primäre P-S7 kn Podozyten exprimierten kein Smad7. ....	80
Abb. 16: Podozyten von P-S7 kn Glomeruli zeigten eine verstärkte Phosphorylierung von Smad2. ....	80
Abb. 17: Podozyten von P-TR2 kn Glomeruli zeigten keine Expression des TGF- $\beta$ RII. ....	81
Abb. 18: Primäre P-TR2 kn Podozyten exprimierten kein TGF- $\beta$ RII.....	82
Abb. 19: Podozyten von P-TR2 kn Glomeruli zeigen keine Phosphorylierung von Smad2... .	83
Abb. 20: P-S7 kn und Smad7 <sup>flox/flox</sup> -Mäuse zeigten eine vergleichbare und normale Nierenmorphologie.....	85
Abb. 21: P-TR2 kn und TGF- $\beta$ RII <sup>flox/flox</sup> -Mäuse zeigten eine vergleichbare und normale Nierenmorphologie.....	87
Abb. 22: P-S7 kn Mäuse zeigten die gleiche Anzahl WT-1 positiver Podozyten pro Glomeruli. ....	89

Abb. 23: P-S7 kn Mäuse zeigten die gleiche Podozyten-Morphologie und GBM-Beschaffenheit.....	90
Abb. 24: P-TR2 kn Mäuse zeigten die gleiche Anzahl WT-1 positiver Podozyten pro Glomeruli.....	91
Abb. 25: P-TR2 kn Mäuse zeigten die gleiche Podozyten-Morphologie und GBM-Beschaffenheit.....	92
Abb. 26: P-S7 kn Tiere lieferten vergleichbare Ergebnisse der Urinanalyse.....	94
Abb. 27: P-TR2 kn Tiere lieferten vergleichbare Ergebnisse der Urinanalyse.....	95
Abb. 28: Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse eine zusätzliche Verstärkung von Glomerulosklerose.....	97
Abb. 29: Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse eine zusätzliche Verstärkung von <i>Foot Process Effacement</i> , während sich die Beschaffenheit der GBM nicht zusätzlich verschlechtert.....	98
Abb. 30: Im Alter zeigten P-TR2 kn Mäuse ein vergleichbares Ausmaß an Glomerulosklerose.....	100
Abb. 31: Im Alter zeigten P-TR2 kn Tiere eine tendenzielle Verbesserung von <i>Foot Process Effacement</i> , während sich die Beschaffenheit der GBM nicht verbesserte.....	102
Abb. 32: P-S7 kn Podozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung eine verstärkte PAI-1 Expression.....	104
Abb. 33: P-S7 kn Podozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung eine verstärkte Expression von CTGF.....	105
Abb. 34: Primäre P-TR2 kn Podozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung keine Induktion von PAI-1.....	106
Abb. 35: Primäre P-TR2 kn Podozyten zeigten nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung keine Induktion von CTGF.....	107
Abb. 36: Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli eine verstärkte Expression von PAI-1.....	109
Abb. 37: Im Alter zeigten P-S7 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli eine verstärkte CTGF Expression.....	110
Abb. 38: Im Alter zeigten P-TR2 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli keine Induktion von PAI-1.....	111
Abb. 39 Im Alter zeigten P-TR2 kn Mäuse innerhalb der Glomeruli keine Induktion von CTGF.....	112
Abb. 40: Diabetische P-S7 kn und Smad7 <sup>flox/flox</sup> -Mäuse zeigten typische Symptome von DM.....	114
Abb. 41: Diabetische P-TR2 kn und TGF- $\beta$ RII <sup>flox/flox</sup> -Mäuse zeigten typische Symptome von DM.....	116

Abb. 42: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten tendenziell eine Verschlechterung der Fußfortsatz-Frequenz. ....	118
Abb. 43: Diabetische P-S7 kn und Smad7flox/flox-Mäuse zeigten nach 2 Monaten keine GBM-Verdickung. ....	120
Abb. 44: Diabetische P-S7 kn Mäusen zeigten eine Verstärkung von Glomerulosklerose..	121
Abb. 45: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine Verbesserung der Fußfortsatz-Frequenz. ....	123
Abb. 46: Diabetische P-TR2 kn und TGF- $\beta$ RIIIflox/flox-Mäuse zeigten nach 2 Monaten keine GBM-Verdickung. ....	124
Abb. 47: Diabetische Mäuse zeigten keine eindeutige Steigerung von Glomerulosklerose. ....	125
Abb. 48: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten die stärkste Induktion der Col IV Expression.....	127
Abb. 49: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten die stärkste Induktion der Col IV Expression.....	128
Abb. 50: Diabetische P-S7 kn Mäuse zeigten die stärkste Induktion der Fibronektin Expression.....	129
Abb. 51: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine gesteigerte Induktion der Col IV Expression.....	130
Abb. 52: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten eine minimal gesteigerte Induktion der Col IV Expression.....	131
Abb. 53: Diabetische P-TR2 kn Mäuse zeigten keine gesteigerte Induktion der Fibronektin Expression.....	132

## 7.5 Liste der Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
0,05 % Trypsin/EDTA	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
10 x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagenz A+B	Interchim, Wörgl, AUS
Borat (Natrumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CDP-Star	Roche, Penzberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Cold Water Fish Skin Gelatin (CWFG) 40 %	Aurion, Wageningen, Niederlande
Collagen (rat tail)	Roche Diagnostics, Mannheim
Collagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Qiagen, Hilden
Depex	Serva, Heidelberg
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol, min. 99 % Titration	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Dodecylsulfat ( $\text{Na}_2$ -Salz)	Serva, Heidelberg
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Fluorescein	Qiagen, Hilden

Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
L-Glutamin	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidin HCl	Roth, Karlsruhe
HBSS 1x	Gibco, Darmstadt
Heparin – Natrium 25000	Ratiopharm, Ulm
Immobilon™Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
ITS Supplement	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdisulfit ( $K_2S_2O_5$ )	Merck, Darmstadt
Ketamin	Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Magnetic Microparticles Polystyren, 4,14 µm	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt
Mayer´s Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver (MM)	Roth, Karlsruhe
N,N,N`N``-Tetramethylethylenediamin, (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS <i>Phosphate buffered saline</i>	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Perjodsäure ( $HIO_4$ )	Merck, Darmstadt
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva, Heidelberg
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid-stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe

Salzsäure 37% (HCl)	Merck, Darmstadt
Schiff-Reagenz	Roth, Karlsruhe
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tergitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Transforming Growth Factor 1 (TGF $\beta$ 1)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tissue-Tek <sup>®</sup>	Sakura, Zoeterwoude, NL
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
peqGold TriFast <sup>TM</sup> (Trizol)	PeqLab, Erlangen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser Rotisol (Rnase-frei)	Roth, Karlsruhe
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg

## 7.6 Danksagung

Mein größter und herzlichster Dank gilt Herrn PD Dr. Rudolf Fuchshofer für seine Betreuung und großartige Unterstützung in allen Belangen. Danke Rudi, dass Du über all die Jahre wie eine Eins hinter mir gestanden bist. Nur mit Deiner großen Hilfsbereitschaft, Deinen guten Ideen und Deiner Diskussionsfreudigkeit war es mir möglich diese Arbeit anzufertigen. Ich bin froh, dass Du mein Chef warst und ich hoffe, Dich darüber hinaus noch lange als Freund zu behalten.

Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm möchte ich danken, dass ich ein Mitglied seiner Arbeitsgruppe sein konnte und für die Übernahme des Vorsitzes meines Promotionskolloquiums.

Für die Übernahme des Zweigutachtens möchte ich Herrn Prof. Dr. Olaf Strauß meinen Dank aussprechen. Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner für Ihren Einsatz als 3. Prüfer und dafür, dass sie mir zu Beginn meiner Arbeit gerne mit Ihrer Erfahrung bei der Beurteilung der Nieren-Morphologie geholfen hat.

Bei Birgit Müller möchte ich mich ganz herzlich für Ihre überaus hilfreiche Mitarbeit bedanken. Danke für Dein Engagement, Dein großes Interesse und dafür, dass Du das Nieren-Projekt zu einer Gruppe gemacht hast. Mit Deinem wissenschaftlichen Können hast Du einen maßgeblichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen.

Margit Schimmel, Elke Stauber, Angelika Pach und Silvia Babl verdankte ich durch Ihre tatkräftige Unterstützung einen sehr angenehmen Laboralltag. Danke an Margit für alle Tricks am Mikroskop und an Elke für alle Tipps in der Histologie. Angelika und Silvia verdanke ich hunderte faltenfreie Nierenschnitte. Außerdem möchte ich mich bei Angelika noch zusätzlich für all Ihre Stunden am TEM und Ihr Interesse an meinem Projekt bedanken. Auf alle war stets Verlass, dass Sie mir gerne hilfreich zur Seite standen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Björn Neubauer für die Anleitung der Perfusionstechnik, bei Herrn Prof. Dr. Frank Schweda für die Technik der Glomeruli-Isolation und bei Herrn Prof. Dr. Hayo Castrop für die Zurverfügungstellung der metabolischen Käfige. Herrn Prof. Dr. Ralf Witzgall möchte ich für die Bereitstellung der transgenen Podo-Cre Maus und der Separationsmagnete danken. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Birgül Kurt, die mir mit Separationsmagneten, Antikörper-Spenden und Färbe-Protokollen sehr geholfen hat.

Vielmals möchte ich mich auch bei allen Laborkollegen bedanken. Die freundschaftliche und einzigartige Arbeitsatmosphäre brachte mich auch in stressigen und nervigen Zeiten dazu, immer wieder gerne ins Labor zu kommen. Für all die Unterstützung und Freundschaft über das Labor hinaus, bedanke ich mich besonders bei Euch: Rosi, Patrick, Martin, Leo, Sabrina, Ludwig, Martina, Chris, Benny und Andreas.

Außerhalb des Instituts möchte ich meinen Regensburger Mädels (Silke, Susi und Wiebke) und den Freunden aus Kaufbeuren Danke sagen, die mir immer wieder gezeigt haben, wie wichtig Freizeit ist. Michael danke ich für das tapfer Ertragen meine Launen. Danke auch an Gerhard, dass Du mir ganz spontan mit den Korrekturen geholfen hast. Und Bob, Dir danke ich im Speziellen dafür, dass Du immer für mich da bist und vor allem dafür, dass Du's fertig pipettiert hättest, wenn's nötig gewesen wäre. Das war gut zu wissen.

Meiner ganzen Familie danke ich für Ihre liebevolle Unterstützung. Danke an Christine für Deine Hilfe bei den letzten Korrekturen. Meinem Schwesternherz Yvonne und meinen Lieblingsneffen Ben und Moritz danke ich sehr für alle Ablenkungsversuche und alle erfolgreichen Ablenkungen.

Mein letzter Dank, aber dafür aus tiefsten Herzen, gilt Euch Mama und Papa. Ohne Euch im Rücken und Euren Glauben an mich wäre ich heute nicht das, was ich bin. Am meisten aber Danke ich Euch dafür, dass Ihr Zwei genau so seid, wie Ihr seid! Von Herzen Danke.

