

# **Expressionsanalyse der Integrin Linked Kinase (ILK) bei Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere**

Paul Gerson Unschuld

2003



Aus der Medizinischen Poliklinik der Ludwig Maximilians Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Detlef Schlöndorff

# **Expressionsanalyse der Integrin Linked Kinase (ILK) bei Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig Maximilians Universität zu München

vorgelegt von Paul Gerson Unschuld

aus Berkeley

2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig Maximilians Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Detlef Schlöndorff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch

Mitberichtersteller: PD Dr. Martin Aepfelbacher  
Prof. Dr. Franz Xaver Beck  
Prof. Dr. Manfred Schliwa

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Matthias Kretzler

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2003

Meinen Eltern,



## Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG .....	2
1. EINLEITUNG .....	3
1.1 <i>Pathogenese Proteinurie</i> .....	3
1.2 <i>Integrine und Signalvermittlung</i> .....	10
1.3 <i>ILK</i> .....	19
1.4 <i>CNF und eine veränderte ILK mRNA Expression</i> .....	23
1.5 <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i> .....	28
2. METHODEN UND MATERIAL .....	29
2.1 <i>Arbeiten mit Nukleinsäuren</i> .....	29
2.2 <i>Untersuchung von Proteinen mit Quantitativem Semi-dry Western Blot</i> .....	42
2.3 <i>Modelle der glomerulären Schädigung</i> .....	46
2.4 <i>Materielliste</i> .....	52
3. ERGEBNISSE .....	62
3.1 <i>ILK mRNA ist in humanem CNF Nierenkortexmaterial erhöht</i> .....	62
3.2 <i>ILK mRNA ist in murinen Proteinurie Modellen erhöht</i> .....	63
3.3 <i>ILK mRNA und Proteine sind bei Schädigung kultivierter Podozyten mit Puromycin Aminoglykosid (PA) erhöht</i> .....	67
3.4 <i>Nachweis erhöhter ILK Proteinmengen bei gleichem FAK, Paxillin und <math>\beta</math>1-Integrin Anteil</i> .....	68
3.5 <i>ILK mRNA ist bei Schädigung kultivierter Podozyten mit Protaminsulfat erhöht</i> .....	69
4. DISKUSSION .....	70
4.1 <i>ILK Aktivierung im Prozess der glomerulären Schädigung</i> .....	70
4.2 <i>Schlußfolgerungen und Ausblicke</i> .....	77
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	78
TABELLENAPPENDIX MIT ROHDATEN .....	79
LEBENS LAUF .....	83
LITERATURVERZEICHNIS .....	84

## **Expressionsanalyse der Integrin Linked Kinase (ILK) bei Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere**

### ***Zusammenfassung***

In der vorliegenden Arbeit werden Veränderungen der Expression der Integrin Linked Kinase (ILK) in *in vitro* und *in vivo* Modellen der glomerulären Schädigung untersucht.

ILK kodiert für eine Serin-Threonin Kinase, die an der integrinvermittelten Signaltransduktion beteiligt ist. Diese Signale dienen unter anderem der Regulation von Genexpression im Zellkern und führen zu Veränderungen zellulären Verhaltens, beispielsweise der Adhäsion im Extrazellulärraum [1].

In unserer Arbeitsgruppe konnte mit Differential Display Polymerase Kettenreaktion (DDPCR) vermehrte ILK mRNA in Glomeruli von Patienten mit Congenitalem Nephrotischem Syndrom Finnischen Typs (CNF) nachgewiesen werden [2]. Auf der Grundlage dieser Vorarbeiten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression von ILK in anderen Situationen glomerulärer Schädigung untersucht.

Als Modelle der ILK Expressionsregulation wurden *in vitro* mit Puromycin Aminoglykosid (PA) bzw. Protaminsulfat inkubierte Podozyten und *in vivo* GH-transgene Mäuse mit fokaler und segmentaler Glomerulosklerose und Mäuse mit Nephrotoxischer Serum Nephritis (NTX) verwendet. Die Untersuchung der einzelnen Proben erfolgte für mRNA Bestimmungen mit semi-quantitativer RT-PCR und mit RealTime TaqMan RT-PCR. Untersuchungen hinsichtlich Veränderungen auf Proteinebene erfolgten mit semi-quantitativem Western Blot.

Auf mRNA-Ebene zeigten sich bei *in vivo* Modellen (NTX und GH-transgene-Mäuse) und *in vitro* Modellen (PA, Protaminsulfat) ein erhöhtes ILK Expressionsniveau im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Auf Protein-Ebene konnten im Western Blot erhöhte ILK Proteinspiegel beim *in vitro* Modell der Puromycin Aminoglykosid Nephrose nachgewiesen werden.

In unserer Arbeitsgruppe konnte in mit ILK stabil transfizierten Podozyten verändertes Adhäsionsverhalten und Zellmorphologie nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine veränderte ILK Phosphorylierungsaktivität in *in vitro* Schädigungsmodellen gezeigt werden [3].

Die veränderte ILK Expression in Schädigungsmodellen und die ILK-abhängigen Veränderung der Podozytenmorphologie und des Adhäsionsverhaltens sind Hinweise auf eine zentrale Bedeutung der ILK in intrazellulären Signalkaskaden, die im Prozess der glomerulären Schädigung in Podozyten aktiviert werden.

## **1. Einleitung**

### **1.1 Pathogenese Proteinurie**

#### **1.1.1 Definition und Einteilung der Proteinurie** (nach Denker 1998, Bernard 1995, Cotran 1983 [4-6])

Im Rahmen der physiologischen Nierendurchblutung passieren große Mengen im Blutplasma gelöster Proteine die glomerulären Kapillaren. Durch den glomerulären Filter wird der Großteil der Plasmaproteine daran gehindert, in den Bereich der Tubuli zu gelangen. Plasmaproteine mit einem hohen Molekulargewicht wie Albumin und Globuline werden kaum filtriert, im Gegensatz dazu passieren kleinere Proteine (<20 kDa) die glomeruläre Filtrationsbarriere frei, werden aber im nachfolgenden proximalen Tubulussystem wieder resorbiert. Eine tägliche Ausscheidung von 30 bis 150 mg Gesamtprotein gilt als physiologisch. Davon sind normalerweise bis zu 30 mg pro Tag Albumin, die restlichen im Urin enthaltenen Proteine werden entweder durch die Tubuli sezerniert (Tamm-Horsefall, IgA, Urokinase) oder setzen sich aus kleinen Mengen frei filtrierter kleiner Moleküle wie  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Apoproteinen, Enzymen und Peptidhormonen zusammen. Eine Ausscheidung von mehr als 150mg Proteinen pro Tag gilt als pathologisch. Ab einer Menge von 3g täglich im Urin ausgeschiedenen Proteinen, spricht man von nephrotischem Syndrom. Pathologische Proteinmengen im Urin können verschiedene Ursachen haben, in den meisten Fällen lassen sie sich auf die folgenden drei Mechanismen zurückführen:

#### *1. Glomeruläre Proteinurie*

Krankheiten mit Störung der Funktion des Glomerulus (siehe folgende Abschnitte dieses Kapitels) sind verantwortlich für 90% der klinisch symptomatischen Proteinurien und nephrotischen Syndrome.

Eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere kann zu einer erhöhten glomerulären Permeabilität und zum Verlust großer Mengen von Proteinen führen. Die begrenzte Rückresorptionskapazität der Tubuli wird überschritten, die Proteine können nicht resorbiert werden und werden im Urin ausgeschieden. Es sind dabei hauptsächlich Proteine wie Albumin und Immunglobuline betroffen, die aufgrund ihrer molekularen Größe normalerweise durch die glomeruläre Filtrationsbarriere zurückgehalten werden.

Bei der glomerulären Proteinurie wird zwischen einem selektiven und unselektiven Typ unterschieden. Die selektive glomeruläre Proteinurie beruht auf einer überwiegenden Ausschei-

dung von Albumin und ist ein Hinweis auf eine beginnende Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere, z.B. bei minimal change Glomerulonephritis (s.Abb.3). Einer unselektiven Proteinurie dagegen liegt meist ein fortgeschrittener glomerulärer Schaden zugrunde.

### 2. *Tubuläre Proteinurie*

Schädigung und Dysfunktion der Tubuli führen zu einer verminderten Absorptionskapazität im proximalen Tubulus. Frei filtrierte Moleküle mit niedrigem molekularem Gewicht werden vermindert rückresorbiert und können zu einer Proteinurie von bis zu ein bis drei Gramm Protein pro Tag führen. Es sind Moleküle wie  $\alpha$ 1-Mikroglobulin betroffen, der Albumin-Anteil ist gering. In seltenen Fällen beruht eine erhöhte Proteinkonzentration im Urin auf einer vermehrten tubulären Proteinproduktion.

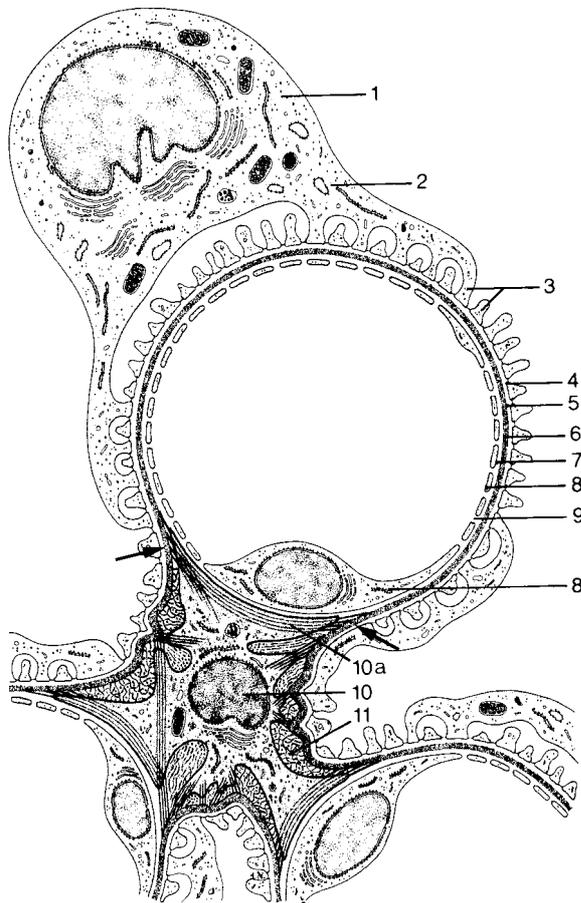
### 3. *Overload Syndrom oder prärenale Proteinurie*

Eine pathologisch erhöhte Serumkonzentration von niedermolekularen Proteinen kann die Rückresorptionskapazität der Tubuli übersteigen und zu Proteinurie führen. Krankheitsbilder, bei denen häufig prärenale Proteinurie auftritt, sind die monoklonale Gammopathie mit Bence-Jones-Proteinurie, Muskeltraumata mit Myoglobinurie oder eine hämolytische Krise mit Hämoglobinurie.

## 1.1.2 **Anatomie und Funktion des Glomerulus (nach Kriz 1996) [7, 8]**

Der erste Schritt bei der Bildung von Urin ist die Ultrafiltration von Plasma im Glomerulus. Für die Funktion der Niere ist der Glomerulus somit von zentraler Bedeutung. Der Glomerulus ist ein Komplex anastomosierender Kapillaren, der von der Bowmanschen Kapsel umhüllt wird. Das Blut fließt durch eine afferente Arteriole in den Glomerulus. Diese Arteriole verzweigt sich in ein komplexes kapilläres System. Die Kapillaren stehen in Verbindung mit mesangialen Zellen und mesangialer Matrix. Das Plasma wird durch die Kapillarwand in den Primärharnraum zwischen Kapillare und Bowmanscher Kapsel filtriert. Die Bowmansche Kapsel besteht aus einer inneren epithelialen Schicht, die von einer Basalmembran umgeben ist. Während des Filtrationsvorganges durchtritt das Plasma verschiedene Untereinheiten der glomerulären Filtrationseinheit und formt ein Ultrafiltrat (Primärharn), in dem keine großen Proteine und Zellen mehr enthalten sind [9]. Die Filtrationsbarriere im Glomerulus setzt sich aus einer fenestrierten Schicht von Epithelzellen auf der Blutseite, der glomerulären Basalmembran (GBM) und aus einer Lage Podozyten auf der urinären Seite zusammen. Die endotheliale Fensterung ermöglicht einen direkten Kontakt zwischen Blutbestandteilen und GBM [10, 11]. Das mesangiale Gewebe zwischen den Kapillaren besteht aus mesangialen Zellen

und interzellulärer Matrix. Die Fortsätze der mesangialen Zellen sind mit den Kapillaren verbunden. Mesangiale Zellen enthalten Mikrofibrillen und sind aufgrund deren Kontraktilität in der Lage den Durchmesser und den Tonus einer Kapillare zu verändern. Damit haben sie Einfluß auf die Perfusionsverhältnisse im Glomerulus [12].



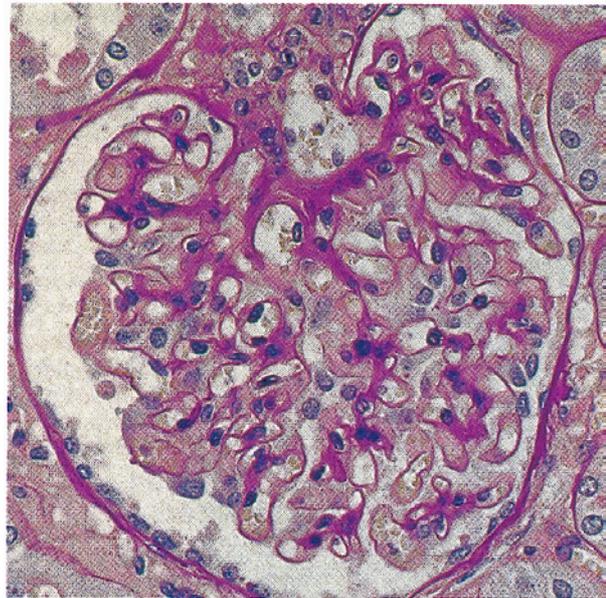
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung einer Glomeruluskapillare: 1 = Podozytenkörper; 2 = Primärfortsatz; 3 = Fußfortsätze; 4 = Schlitzmembran; 5 = Lamina rara externa; 6 = Lamina densa und 7 = Lamina rara interna der Basalmembran; 8 = Endothel; 9 = Endothelpore; 10 = Mesangiumzelle mit 10a = Mikروفilament-bündel; 11 = mesangiale Matrix. Die beiden Pfeile zeigen auf die Umschlagspunkte der Basalmembran, an denen diese aus ihrem perikapillären Verlauf in die Mesangiumbedeckung übergeht. Abb. aus Benninghoff Anatomie, 1994, 15.Aufl., Band 2, S.44

Die Filtrationsbarriere ist frei durchgängig für Wasser und kleine Ionen. Zellen, große Proteine und andere Makromoleküle werden jedoch retiniert. Die Filtration von Makromolekülen, Proteinen und Polysacchariden ist um so geringer, je höher das molekulare Gewicht ist. Substanzen mit einem Molekulargewicht über 60 – 70 kDa überschreiten die Filtrationsbarriere physiologischerweise nicht. Zusätzlich zum molekularen Gewicht hat auch die dreidimensionale Konfiguration und die Ladung eines Proteins Einfluss auf die Filtration. Negativ geladene Moleküle werden weniger leicht filtriert als neutrale oder positiv geladene. Ein wesentlicher Grund dafür ist die negative Ladung von Elementen der GBM, insbesondere der Oberfläche von endothelialen und epithelialen Zellen und der Schlitzmembranen.

Der Durchmesser der Fenestrierungen in Endothelzellen beträgt 40-70nm, der Durchmesser der Öffnungen in der GBM beträgt 10nm [9-12]. Bei Erwachsenen wird täglich 170 Liter Primärharn in den Glomeruli gebildet, über 99% davon werden in den Tubuli und Sammelrohren rückresorbiert. In den proximalen Tubuli wird der grösste Teil der Glukosemoleküle, Aminosäuren, Peptiden und Proteinen reabsorbiert, die die Filtrationsbarriere durchtreten haben [13, 14].

### ***Die glomeruläre Basalmembran (GBM)***

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) dient als Stützgewebe für das gesamte glomeruläre System und als ladungsselektiver Filter für Proteine mit einem Molekulargewicht über 100kDa. Während der Nephrogenese wird die GBM von Podozyten und glomerulären Endothelzellen zuerst als zwei separate Lagen produziert, die dann in einem weiteren Schritt zu einer gemeinsamen Basalmembran fusionieren [15, 16]. Die adulte GBM enthält eng vernetztes Kollagen IV, Laminin, Nidogen und Proteoglykane [17, 18]. Kollagen Typ IV und Laminin bilden zwei unabhängige Netzwerke, die durch Nidogen miteinander vernetzt sind. Kollagen Typ IV und Laminin sind wichtig für die Statik der GBM, stellen aber auch wesentliche Verankerungspunkte für Endothelzellen und Podozyten dar. Farquar et al. zeigten die Anwesenheit von anionischen Abschnitten in der glomerulären Basalmembran und wiesen darin enthaltenes Heparan Sulfat nach [19-21]. Hassel und Groffen identifizierten die basalmembranspezifischen Heparan Sulfat Proteoglykane Perlecan [22] und Agrin [23] als stark negativ geladene Komponenten der GBM. Starke negative Ladungen verhindern die Adsorption von anionischen Proteinen. Damit wird verhindert, daß sich diese Proteine in der GBM ansammeln, filtriert werden und den Filtrationsvorgang stören [24, 25].



**Abb 2:** Glomerulus in PAS Färbung Harnapparat & männliches Genitale, Gröne, 1994, S.5

### ***Die Podozyten***

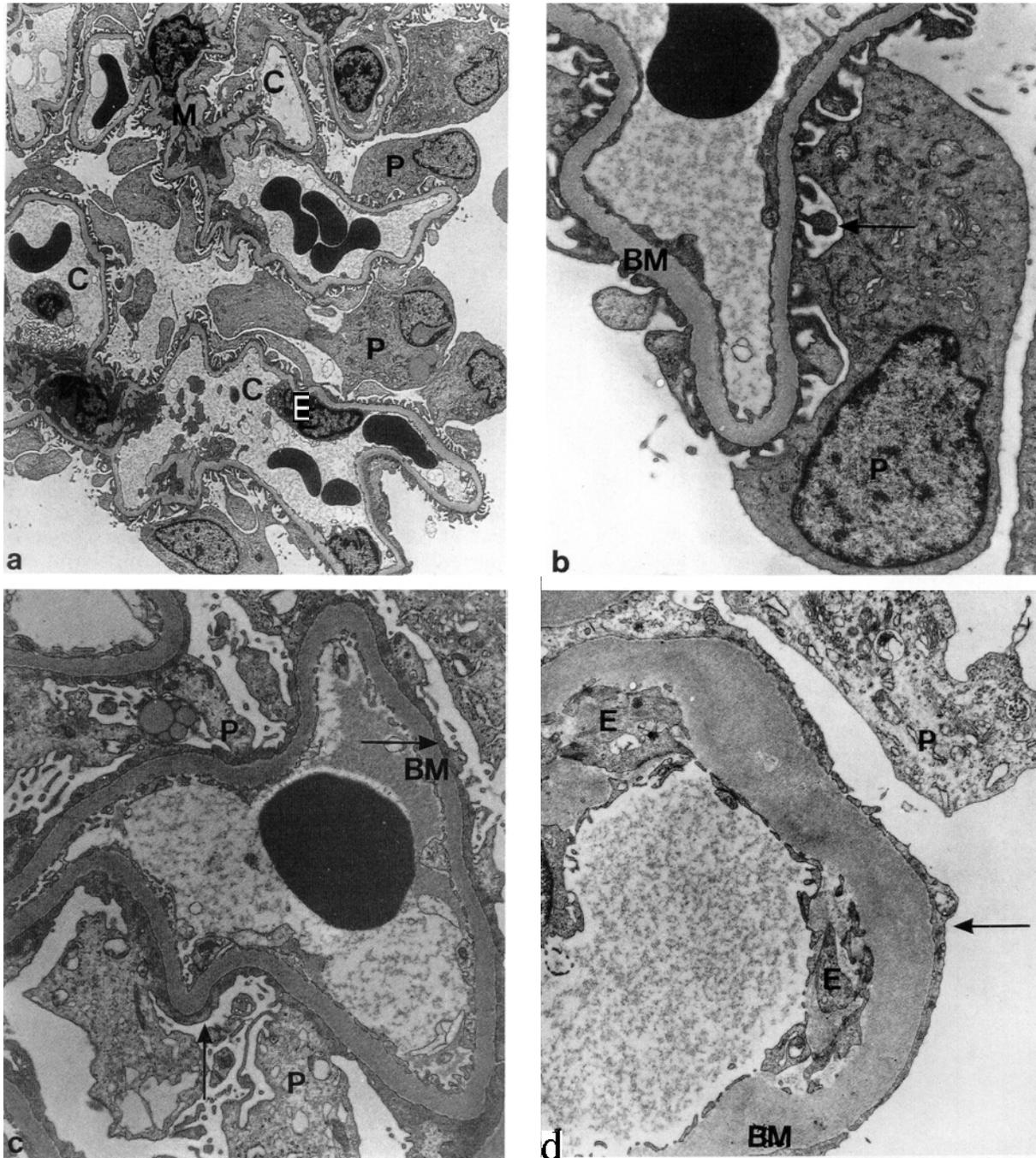
Die GBM ist an ihrer Außenseite von spezialisierten Epithelzellen (Podozyten) beschichtet, die unter physiologischen Bedingungen ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben [26]. Diese Podozyten haben verschiedene Funktionen. Sie stellen den letzten Teil der glomerulären Filtrationsbarriere zum Tubulussystem hin dar und bilden mit ihren Fußfortsätzen ein feines Netz, die Schlitzmembranen. In den Schlitzmembranen (slit diaphragms) befinden sich Poren, die mit Glutamat, Aspartat und Sialinsäure enthaltenden anionischen Glykoproteinen beschichtet sind. Bei physiologischem PH sind sie negativ geladen. Nur kleine Moleküle (unter 20kDa) können diese letzte Barriere passieren, Moleküle wie Albumin werden hier zurückgehalten [27, 28]. Die Schlitzmembranen sind 20 - 50nm dick[29, 30], können bei zu-

nehmendem intraglomerulärem Druck noch dicker werden und sind elastisch. Die Schlitzmembranen sind in einer reißverschlußartigen Struktur mit 4 x 14 nm großen Poren angeordnet [27]. Essentiell für die Funktion des Glomerulus ist die Aufrechterhaltung dieser komplexen Architektur gegenüber dem hohen hydrostatischen Druck (40mmHg), der während der Ultrafiltration auftritt. Der Verlauf der GBM wird an ihrer Innenseite von Mesangialzellen bestimmt, die Podozyten bilden ein elastisches Netz an der Außenseite. Podozyten sind reich an kontraktilen intrazellulären Strukturen und können durch Kontraktion die Faltung der GBM beeinflussen.

### **1.1.3 Entwicklung des glomerulären Schadens (nach Kriz 1998 [31])**

Das Fortschreiten von chronischer Nierenerkrankung scheint in vielen Fällen nach einem einheitlichen Schema zu erfolgen [31]. Wenn ein erheblicher Teil des Nierengewebes zerstört ist, kommt es unabhängig von der Ursache der anfänglichen Schädigung zu einer kontinuierlichen Abnahme der glomerulären Filtrationsrate verbunden mit einem Verlust von überlebenden Nephronen. Histologisch kann man in diesen Fällen eine fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) mit tubulointerstitieller Fibrose beobachten [32-34]. Der Glomerulus spielt für die Nierenfunktion eine essentielle Rolle. Seine Schädigung beeinträchtigt die Funktion des ganzen Organs und ist ein wesentlicher Schritt in der Progredienz einer Nierenerkrankung. Rennke beschrieb für Glomeruli bei FSGS anhand histologischer Beobachtungen charakteristische Schädigungen. Im Zentrum steht ein globaler oder segmentaler Kollaps von Kapillaren. Dabei verschwinden zelluläre Elemente und mikrovaskuläre Lumina, Schaumzell-Makrophagen werden eingeschlossen, zelluläre Abbauprodukte und hyalines Material lagern sich ab. Das glomeruläre Gefäßkonvolut bildet mit der Bowmanschen Kapsel Synechien. Nach W. Kriz ist die Schädigung des Glomerulus bei FSGS Resultat eines fortschreitenden Verlustes von Strukturen, die zur Stabilisierung des glomerulären Gefäßkonvolutes notwendig sind. Schon im physiologischen Zustand herrscht im Glomerulus ein für Kapillaren hoher hydrostatischer Druck. Um die komplexe Architektur der verschiedenen Strukturen im Glomerulus aufrechtzuerhalten, müssen glomeruläre Basalmembran, Mesangialzellen und Podozyten zusammenwirken um eine Dilatation des gesamten Systems zu verhindern. Im Gegensatz zu anderen Zellen, wie Endothelzellen und Mesangialzellen, die auch an der Aufrechterhaltung der glomerulären Architektur beteiligt sind, sind Podozyten hochspezialisierte, terminal differenzierte Epithelzellen, die sich postnatal nicht mehr replizieren können. Unter pathologischen Bedingungen sind vergrößerte Zellen mit Kernteilungen beschrieben, jedoch keine Zellteilungen. Auf Schädigung können Podozyten nur mit Zellhypertrophie und nicht mit Pro-

liferation reagieren. Die Hypertrophie geht mit funktionellen Einbußen einher. Der Verlust eines Podozyten ist endgültig. Damit stellen Podozyten die empfindlichste Struktur der glomerulären Filtrationsbarriere dar. Eine Schädigung der Podozyten fördert die Progredienz der Nierenschädigung auf zwei Arten. Der Verlust einer wichtigen stabilisierenden Struktur führt zu lokalen Veränderungen (mesangiale Expansion, kapilläres „ballooning“, Verlust der speziellen Faltung der GBM) mit funktioneller Beeinträchtigung der betroffenen Strukturen. Gleichzeitig fehlt mit dem Verlust von Podozyten ein wichtiges Element der glomerulären Filtrationsbarriere. Die passierenden Proteine und Lipoproteine lagern sich in der Filtrationsbarriere ab, beeinträchtigen die Permeabilität und initiieren Entzündungsreaktionen, die zu weiterer Gewebeschädigung führen. Auf zellulärer Ebene äußert sich eine Podozytenschädigung in typischen morphologischen Veränderungen und einer Beeinträchtigung der Verankerung an die GBM. In glomerulären Stresssituationen verändern sich Podozyten in eine undifferenzierte, hypertrophe Form mit verdickten Fußfortsätzen. Im Verlauf der Schädigung lösen sich die Fußfortsätze von der GBM und der Podozyt geht in den Bowmanschen Raum verloren. An den freien Bereichen der GBM bilden sich Synechien mit Elementen der Bowman'schen Kapsel. Bei der Verankerung der Podozyten mit der GBM und bei der Interaktion von intrazellulären kontraktilen Filamenten mit dem extrazellulären Raum spielen Integrine eine wichtige Rolle.



**Abb. 3:** Ultrastruktur eines Glomerulus mit Veränderungen der Podozyten und der Basalmembranen. a) Regelrechter Glomerulus. Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild eines Glomerulussegments. In den von Endothelzellen (E) ausgekleideten Kapillaren (C) eingeschlossene Erythrozyten. Podozyten (P) mit typischen Fußfortsätzen auf glomerulärer Membran. M = Mesangium mit Mesangiumzelle und mesangialer Matrix. b) Kapillare eines Glomerulus. BM = Basalmembran. P = Podozyt mit Fußfortsätzen (Pfeil). Zwischen diesen »Slit«-Membranen (Pfeil). c) Minimal-changes-Glomerulopathie: Kapillare mit zentral liegendem Erythrozyten und regelrechter Basalmembran (BM). Fußfortsätze (Pfeil) der Podozyten (P) sind nicht erhalten. d) Glomerulosklerose: Breite Basalmembran (BM), Fußfortsätze (Pfeil) der Podozyten (P) nicht erhalten. E = Endothelzelle. Aus Harnapparat & männliches Genitale, Gröne, 1994, S.7 [14]

## 1.2 Integrine und Signalvermittlung

### 1.2.1 Molekulare Struktur

Integrine sind eine große Gruppe heterodimerer in die Zellmembran integrierte Zelloberflächen-Rezeptoren, die Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix (ECM) und zwischen Zelle und Zelle vermitteln. Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Zur Zeit sind 8 verschiedene  $\beta$ -Ketten und 16 verschiedene  $\alpha$ -Ketten bekannt die in 22 verschiedenen Kombinationen nachgewiesen sind [35]. 10 Kombinationen davon enthalten die fast ubiquitär exprimierte  $\beta$ 1-Integrine. Die Klassifikation der Integrine erfolgt nach Kombination der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typen. Die  $\beta$ 1 Untereinheit kann mit 10 verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 9,  $\alpha$ v) dimerisieren. Die N-terminale Hälfte der  $\alpha$ -Kette ist in einer  $\beta$ -Faltblatt Propeller Struktur (Sekundärstruktur) angeordnet und enthält sieben sich wiederholende Aminosäuresequenzen (FG-GAP) [36]. Die  $\beta$ -Faltblätter sind propellerartig in Spiralform um eine Zentralachse angeordnet. Dabei befinden sich  $Mg^{++}$  Ionen an den oberen Propeller Flächen und  $Ca^{++}$  Ionen an den unteren Flächen. Die Bindung von Liganden erfolgt an den oberen Flächen der Propeller innerhalb der FG-GAP Sequenzen [37, 38]. Sowohl  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sind membranintegrierte Glykoproteine mit langen extrazellulären Domänen, die die Ligandenbindungsstellen darstellen. Die  $\alpha$ -Kette enthält vier Aminosäuresegmente, die Kalzium ( $Ca^{++}$ ) und andere divalente Kationen wie  $Mg^{++}$  und  $Mn^{++}$  [39, 40] binden. Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus mindestens vier Cystein reiche Abschnitten, in linearer Juxtaposition, die den großen extrazellulären Bereich stabilisieren. Beide Ketten sind notwendig um die Kontaktstelle zu bilden, mit der extrazelluläre Liganden gebunden werden können. Die Ligandenspezifität hängt zu einem großen Teil von den spezifischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten in einem Heterodimer ab. Im Gegensatz zu den extrazellulären Domänen sind die intrazellulären Abschnitte sowohl bei  $\alpha$ - als auch bei  $\beta$ -Ketten verhältnismäßig kurz (ausgenommen beim  $\beta$ 4 Typ). Der kurze  $\beta$ -zytoplasmatische Teil enthält Regionen, die an zytoskeletale Proteine binden, so daß die Integrine mit dem zytoskeletalen Aktin System verbunden sind. Im Gegensatz zu den  $\beta$ -Ketten ist wenig bekannt über Proteine, die mit dem intrazellulären Teil der  $\alpha$ -Kette interagieren. Michalak u.a. beschrieben eine Assoziation mit Calreticulin, welches den Kalzium Influx über transmembranöse Kanäle regelt [41].



## 1.2.2 Rolle für die Zelle

### *Verteilung von Integrinen im Organismus*

Integrine sind in jedem Gewebe und jeder Zelle des Organismus an Vorgängen beteiligt, die essentiell für den Fortbestand und die physiologische Funktion der Zelle sind [44]. Im Frühstadium der embryonalen Entwicklung sind die verschiedenen Integrinsubtypen ubiquitär vorhanden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von morphogenetischen Zellbewegungen und Migration [45]. Im Verlauf der Differenzierung zum adulten Gewebe nimmt der Expressionsgrad von Integrinen jedoch ab. In den fertig entwickelten Geweben und Zellen variiert die Verteilung der einzelnen Integrin-Subtypen erheblich. Bei kultivierten Zellen konnte man große Unterschiede in der Anzahl der verschiedenen exprimierten Integrintypen feststellen [46].

**Tabelle 1:** Integrine und ihre zelluläre Verteilung [42]

Integrin Untereinheit	Rezeptorname	Vorkommen
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1	Glatte Muskeln, T-Zellen, Endothel, Hepatozyten
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2	Epithel, Endothel, Leukozyten, Thrombozyten
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3	Epithel, Endothel
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4	Leukozyten, Melanome
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5	Endothel, Thrombozyten, Hepatozyten, Lymphozyten
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6	Fast alle Zellen, Thrombozyten, Epithel, Endothel
$\alpha_7\beta_1$	VLA-7	Muskeln, Melanome
$\alpha_8\beta_1$	VLA-8	Epithel, ZNS, Endothel, Myeloidzellen
$\alpha_v\beta_1$	VNR	Fibroblasten, Tumorzellen, Osteoblasten

$\alpha_L\beta_2$	LFA-1	Leukozyten, Meloidzellen
$\alpha_m\beta_2$	MAC-1	Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten
$\alpha_X\beta_2$	P150, 95	Granulozyten, Monozyten
$\alpha_{11b}\beta_{3a}$	Major platelet receptor	Megakaryozyten, Thrombozyten, Melanome
$\alpha_V\beta_3$	Platelet IIIa, VN receptor	Osteoklasten, Tumorzellen, Endothel, Fibroblasten
$\alpha_6\beta_4$	VLA-6 <sub>alt</sub>	Neurone, Fibroblasten, Epithel
$\alpha_V\beta_5$	VNR <sub>alt</sub>	Pankreas, Fibroblasten
$\alpha_V\beta_6$	VNR- $\beta$	Epithel, Tumorzellen

Zellen im Gewebeverband scheinen je nach physiologischer Anforderung bestimmte Integrintypen zu exprimieren. Zum Beispiel werden  $\alpha_6\beta_1$ - und  $\alpha_6\beta_4$ -Integrine hauptsächlich in epithelialen Zellen exprimiert, die auf einer Basalmembran befestigt sind. Sie dienen als Rezeptoren für Laminin und andere Komponenten der Basalmembran. Im Gegensatz dazu kommen  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_V\beta_3$ -Integrine besonders bei beweglichen Zellen vor und können bei Migration aktiviert werden [47]. Manche Zellen exprimieren hochspezialisierte Integrine:  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wird von Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert und vermittelt Plättchenadhäsion [48]. Die  $\beta_2$ -Integrine sind besonders wichtig bei Leukozyten [49], in denen sie bei der Extravasation eine wichtige Rolle spielen. Substanzen, die einen Einfluß auf Zellproliferation und Differenzierung haben, können die Expression von Integrinen beeinflussen. Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) kann beispielsweise eine Steigerung der Integrin-Expression auf Zellen verursachen [50]. Die Möglichkeit einer kurzfristigen Regulation der Expression von bestimmten Integrintypen auf der Zelloberfläche und damit ihres Adhäsionsverhaltens kann für Zellen wichtig sein, um im Rahmen von Migration durch selektive Adhäsion ihr Ziel im Körper zu finden. Integrine dienen darüber hinaus als Rezeptoren bei Entzündung, Wundheilung und Blutplättchenaggregation [51, 52]. Außerdem sind Integrine in der Lage adhäsive Vorgänge während verschiedener Stadien der Kanzerogenese wie maligne Transformation, Tumorwachstum und -progression, -invasion und Metastasierung sowie Apoptose zu vermitteln.

***Kontakt zur extrazellulären Matrix (ECM)***

Die Interaktion einer Zelle mit der ECM ist essentiell für die Regulation zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Genexpressionen. Integrine stellen die Schnittstelle zwischen Zelle und ECM dar. Integrine sind die Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren, die hauptverantwortlich für Interaktionen der Zelle mit der ECM sind und dienen als bidirektionale Transduktoren von extra- und intrazellulären Signalen [53, 54]. Die Störung der Interaktion von epithelialen und endothelialen Zellen mit ihrer extrazellulären Matrix induziert bei den betroffenen Zellen Apoptose („Anoikis“) [44]. So hat beispielsweise die Bindung von Fibroblasten an Integrine Einfluß auf die Aktivität des Zellzyklusses indem die Expression von Cyclin A und D verändert wird.

Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine interagieren als Signaltransduktoren mit dem Aktin-Zytoskelett und regulieren eine nachgeschaltete Kaskade von Kinasen wie ILK und FAK [55, 56], Tyrosin- und MAP-Kinasen, Kalzium bindenden Proteinen, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporthern, und Transkriptionsfaktoren wie NFκB und API [57, 58].

Viele der Integrinsubtypen binden an mehr als einen ECM Liganden und es gibt Überlappungen bei einzelnen Integrintypen und den jeweils bindenden Proteinen der extrazellulären Matrix [59]. Der Grund für diese Redundanz bei der Ligandenspezifität ist unbekannt. Es ermöglicht jedoch kooperative Zellinteraktionen und die Übertragung von verschiedenen Informationen aus der Umgebung. Aufgrund der Redundanz für Bindungspartner führt die Blockade eines Integrintyps auf einer Zelle durch einen spezifischen Antikörper selten zu einer wesentlichen Hemmung des Adhäsionsverhaltens [60]. Es gibt immer noch genügend andere Integrin-Moleküle auf der Zelle, die den Liganden des blockierten Integrintyps genauso binden. Wichtige zelluläre Vorgänge wie Zellwachstum, Homöostase und Entwicklung werden durch diese Redundanz der Integrinsubtypen in ihrer Ligandenspezifität besonders abgesichert.

In der Zellkultur erfolgt die Bindung von Zellen an die Matrix über gruppierte Integrinmoleküle, sogenannte Cluster, die fest mit dem jeweiligen komplementären Liganden in der ECM verbunden sind [61, 62]. Diese Verbindungen sind in Epithelzellen im Gewebeverband ähnlich. Allerdings hat man beobachtet, daß die Verbindungen von Integrinen zu ihren Liganden hier lockerer sind [61], möglicherweise um mehr Flexibilität und Zellbeweglichkeit zu ermöglichen.

### 1.2.3 Integrine in der Niere

Die Verteilung der einzelnen Integrinsubtypen verändert sich im Rahmen der Organentwicklung. Dies wird als Hinweis auf eine wichtige Rolle der Integrine im Rahmen der Morphogenese verstanden [63-67]. In der adulten Niere findet man eine charakteristische Verteilung bestimmter Integrinsubtypen und -rezeptoren auf den verschiedenen Gewebestrukturen. Auf Podozyten und auf den Basalseiten von distalen tubulären Zellen findet man hauptsächlich  $\alpha 6\beta 1$ - und bei adulten Nieren  $\alpha 3\beta 1$ -Integrinsubtypen. Der  $\alpha 3\beta 1$ -Rezeptor ist der einzige Integrintyp auf glomerulären Epithelzellen, für den eine Interaktion mit Fibronectin nachgewiesen werden konnte [170]. Dem  $\alpha 3\beta 1$ -Rezeptor wird in der adulten Niere eine herausragende Rolle im Rahmen der Interaktion von glomerulären Epithelzellen und Podozyten mit ihrer Basalmembran zugeschrieben. Kerjaschki und seine Arbeitsgruppe [64] wiesen mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie eine erhöhte Dichte von  $\beta 1$  enthaltenden Rezeptoren an den basalmembranwärts gerichteten Seiten von glomerulären Epithelzellen und Podozyten nach und lieferten damit einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der  $\beta 1$ -Integrine bei der Zell-Basalmembran Interaktion.

**Tabelle 2:** Integrine in der Niere [68]

Integrinsubtyp	Bindungspartner	Gewebestrukturen
$\alpha 1\beta 1$	Laminin, Kollagen	Mesangialzellen, Endothelzellen und im Interstitium
$\alpha 2\beta 1$	Laminin, Kollagen	Mesangialzellen, Endothelzellen, distale Tubuluszellen
$\alpha 3\beta 1$	Kollagen, Laminin, Fibronectin	Glomeruläre Kapillarwand, Bowmansche Kapsel, Podozyten, Mesangialzellen, Basalseite von distalen tubulären Zellen
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectin	Nicht nachweisbar in der menschlichen Niere
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectin	Geringe Mengen auf Endothelzellen und Mesangialzellen
$\alpha 6\beta 1$	Laminin	Basalseite von distalen tubulären Zellen, transient auf glomerulären Epithelzellen und Podozyten im Rahmen der Nierenentwicklung
$\alpha v\beta 3$	Vitronectin	Glomeruläre Endothelzellen

#### 1.2.4 Integrinvermittelte Signalweiterleitung

Integrine vermitteln Signaltransduktion durch die Zellmembran in beide Richtungen: Die Bindung von Liganden an Integrine löst in der Zelle Signale aus und führt zu zytoskeletaler Reorganisation, Gen Expression und zellulärer Differenzierung (outside-in signaling). [43] Darüberhinaus können Signale von der Innenseite der Zelle über Integrine das Integrinbindungsverhalten und die Zelladhäsion beeinflussen (inside-out signaling) [35, 69]. Dabei spielen die zytoplasmatischen Domänen der Integrine und die direkt an sie bindenden zytoplasmatischen Proteine des FAC eine große Rolle. Im Rahmen der intrazellulären Signalweiterleitung scheint die  $\beta$ -Kette besonders wichtig zu sein [70-73]. Bis jetzt (1/2002) sind 21 Proteine veröffentlicht, die eine oder mehrere  $\beta$ -Ketten binden. Zu diesen Proteinen gehören Aktin bindende Proteine, Enzyme, Adaptor Proteine, ein transkriptioneller Ko-Aktivator und Proteine mit derzeit noch unbekannter Funktion [43] (Tabelle 2). Verschiedene Integrine lagern sich bei Bindung an extrazelluläre Bindungspartner zu sogenannten Clustern zusammen (clustering). Im Rahmen der Zusammenlagerung zu einem Cluster findet eine Interaktion der Proteine der verschiedenen FACs miteinander statt [74].

##### *Aktin bindende Proteine*

Die korrekte Positionierung von Integrinen in der Zellmembran und die Zusammenlagerung zu isolierten Adhäsionspunkten („clustering“), die wichtige Rolle von Integrinen bei Zellausbreitung, Migration und Gewebebildung wird durch die zytoplasmatische Verbindung zum Aktinzytoskelett ermöglicht. Diese Verbindung wird durch direkten oder indirekten Kontakt der aktinbindenden Proteine mit Integrin  $\beta$  Ketten gebildet [75, 76]. Man nimmt an, daß bestimmte zytoskeletale Proteine zusätzlich zu ihren strukturellen Aufgaben auch noch als Adaptormoleküle im Rahmen der Signalweiterleitung dienen [75].

Tabelle 3, [43]

Bindungs Partner	Integrin Untereinheit	Nachweismethode	Referenz
<b>Aktin bindende Proteine</b>			
Talin	$\beta$ 1a, $\beta$ 1d, $\beta$ 2, $\beta$ 3	COIP, PEP, EQ, INT,	Horwitz et al., 1986; Knezevic et al., 1996; Pfaff et al., 1998; Goldmann, 2000
Filamin	$\beta$ 1a, $\beta$ 2, $\beta$ 3, $\beta$ 7	COIP, PEP, 2HYB,	Pavalko et al., 1989; Loo et al., 1998; Pfaff et al., 1998; Goldmann, 2000
a-Actinin	$\beta$ 1a, $\beta$ 2	PEP, INT, COIP	Otey et al., 1990 ; Pavalko et al., 1991; Cattelino et al., 1999
F-actin	$\alpha$ 2	PEP	Kieffer et al., 1995
Myosin	$\beta$ 3	PEP, COIP	Jenkins et al., 1998; Sajid et al., 2000
Skelemin	$\beta$ 1, $\beta$ 3	2HYB, PEP	Reddy et al., 1998
<b>Signaltransmitter</b>			
ILK	$\beta$ 1, $\beta$ 3	2HYB, COIP	Hannigan et al., 1996
FAK	$\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3	PEP, COIP	Schaller et al., 1995; Chen et al., 2000
Cytohesin-1	$\beta$ 2	2HYB, COIP, PEP	Kolanus et al., 1996
Cytohesin-3	$\beta$ 2	2HYB	Hmama et al., 1999
<b>Proteine mit noch unklarer Funktion</b>			
Paxillin	$\beta$ 1, $\beta$ 3, $\alpha$ 4	PEP, COIP	Schaller et al., 1995; Chen et al., 2000; Liu et al., 1999
Grb2	$\beta$ 3	PEP	Law et al., 1996
Shc	$\beta$ 3	PEP	Law et al., 1996
$\beta$ 3-endonexin	$\beta$ 3	2HYB, INT, PEP	Shattil et al., 1995; Eigenthaler et al., 1997
TAP-20	$\beta$ 5	PEP	Tang et al., 1999
CIB	$\alpha$ IIB	2HYB, PEP, COIP	Naik et al., 1997; Shock et al., 1999; Valler et al., 1999
Calreticulin	$\alpha$	PEP, COIP	Rojiani et al., 1991; Leung-Hagesteijn et al., 1994; Coppolino et al., 1995
Caveolin-1	$\alpha$	COIP	Wary et al., 1998
Rack1	$\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 5	2HYB, PEP, COIP	Liliental et al., 1998
WAIT-1	$\beta$ 7	2HYB, PEP	Rietzler et al., 1998

JAB1	$\beta 2$	2HYB, PEP, COIP	Bianchi et al., 1998
Melusin	$\beta 1a$ , $\beta 1b$ , $\beta 1d$	2HYB, INT	Brancaccio et al., 1999
MIBP	$\beta 1a$ , $\beta 1d$	2HYB, PEP, COIP	Li et al., 1999
ICAP-1	$\beta 1a$	2HYB, PEP, INT	Chang et al., 1997; Zhang and Hemler, 1999
CD98	$\beta 1a$ , $\beta 3$	PEP	Zent et al., 2000
DRAL/FHL2	$\alpha 3a$ , $\alpha 3b$ , $\alpha 2a$	2HYB, PEP	Wixler et al., 2000

COIP = Koimmunopräzipitation; PEP = Synthetisch/Rekombinante Peptid Untersuchungen; 2HYB = "Yeast two-hybrid screen"; INT = Bindung an gereinigte Integrine; EQ = Aequilibrium Gel Filtration.

### ***Beziehungen zwischen Integrin- und Wachstumsfaktor-vermittelter Signaltransduktion***

Für Integrine und verschiedene Wachstumsfaktoren ist bekannt, daß sie Signalkaskaden aktivieren, die bei der transkriptionellen Regulation konvergieren [69, 77, 78]. Ein Beispiel für diesen Synergismus ist die von Miyamoto et al. 1996 und Plopper et al. 1995 beschriebene Stimulation der MAP Kinase durch Integrin-Growth Factor im Rahmen der kurzfristigen Regulation von Wachstum und Differenzierung. Bei diesem Mechanismus beobachtet man eine Integrin vermittelte Konzentration von Growth Factor-Rezeptoren an FACs [79, 80]. Es kommt zu einer synergistischen Steigerung der Growth Factor-Rezeptor Tyrosin Phosphorylierung, vorausgesetzt EGF, PDGF oder FGF ist vorhanden. Dies führt zu einer wesentlich gesteigerten Aktivierung der MAP Kinase [79].

### ***Proteine, die an der zellulären Signalweiterleitung beteiligt sind***

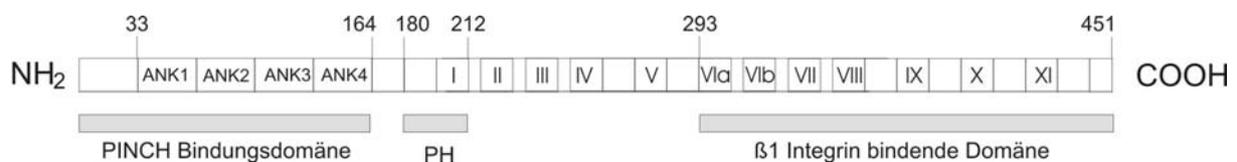
Die intrazellulären Proteine, die an die  $\beta$ -Kette von Integrinen binden, regulieren das „outside-in“ und das „inside-out signaling“. Die zytoplasmatischen Integrindomänen haben keine intrinsische enzymatische Aktivität, man nimmt deshalb an, daß für integrinvermittelte Signalweiterleitung zusätzliche Signalproteine nötig sind. Solche Proteine wären Kinasen und Adaptormoleküle, die Kontakt zu Kinasen oder anderen intrazellulären Signalkaskaden herstellen können. Es sind zwei Kinasen bekannt, die an Integrin  $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -Ketten binden: Focal Adhesion Kinase (FAK) und Integrin Linked Kinase (ILK).

## 1.3 ILK

### 1.3.1 Entdeckung und Daten zum Molekül

Integrin Linked Kinase (ILK) ist eine ubiquitär exprimierte, 451 Aminosäuren große Serin/Threonin Kinase mit einem Molekulargewicht von 59kDa. Mit einem yeast two-hybrid screen wurde nachgewiesen, daß ILK mit der zytoplasmatischen Domäne von  $\beta$ 1-Integrinen interagiert [1].

ILK ist in der Zelle im Focal Adhesion Complex lokalisiert und besteht aus drei strukturellen Einheiten [1, 81-84]. Am N-terminalen Ende des Moleküls befindet sich eine Domäne, die hauptsächlich vier ANK (Ankyrin) Abschnitte enthält, die verantwortlich für die Interaktion mit PINCH sind [83], einem Adaptorprotein, das fünf LIM Domänen enthält. LIM Domänen werden durch die drei Gene Lin-11, Isl-1 und Mec-3 kodiert; sie ermöglichen Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen [85]. Am ILK Molekül befindet sich c-terminal von der Domäne mit den ANK Abschnitten eine PH Domäne (PH = Pleckstrin Homology), die Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns-3,4,5-P3) bindet und an der Regulation der Kinasenaktivität beteiligt ist [82]. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Domäne, mit zwölf katalytischen Abschnitten für Protein Kinasen. Zusätzlich befindet sich in diesem Bereich eine Bindungsstelle für die zytoplasmatische Domäne von  $\beta$ 1-Integrinen.



**Abb. 5:** Multidomänenstruktur von ILK [98]

#### *Die Ankyrin (ANK) Abschnitte*

Am N-terminalen Ende des ILK Moleküls befinden sich vier Ankyrin Abschnitte hintereinander (AS 33-164). Jeder einzelne Abschnitt ist 33-Aminosäuren lang und enthält die charakteristische Aminosäurefolge von erythrozyten-typ Ankyrinen (-G-TPLH-AA—GH---V/A--LL--GA--N/D---) [86]. Die Hauptfunktion von Ankyrinen besteht in der Vermittlung von Protein – Protein Interaktionen [87, 88]. Dazu gehört bei der ILK die Interaktion mit PINCH, einem weiteren Adaptorprotein, das fünf LIM Domänen enthält [83].

### ***Die Pleckstrin homologe (PH) Domäne***

Im Bereich der Aminosäuren 180-212 befindet sich eine Domäne mit einer Pleckstrin homologen consensus Sequenz (GWLXK—GXXXXK-----WKXRW) [82]. Über PH Domänen findet eine Interaktion mit anderen Proteinen und Lipiden statt [89, 90]. Die Bindung des second messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns-3,4,5-P3) an PH Domänen führt zu Phosphorylierung und anschließender Aktivierung der Protein Kinase B (PKB) durch eine vorgeschaltete Kinase [91, 92]. In der PH Domäne von ILK befindet sich die Aminosäurefolge, die essentiell für diese Art der Interaktion ist [93]. Die Aktivität von ILK wird durch Zell-Fibronektin Interaktionen und durch Insulin über die Bindung von PtdIns-3,4,5-P3 an die PH-Domäne von ILK stimuliert [82].

### ***Der katalysierende Abschnitt***

Auf der C-terminalen Hälfte von ILK befinden sich zwölf Subdomänen (I, II, III, IV, V, VIa, VIb, VII, VIII, IX, X, XI) die katalysierend bei der Kinaseaktivität von ILK wirken [94, 95]. Die Kinaseaktivität kann durch Zelladhäsion und Insulin reguliert werden [82].

### ***Die Bindungsstelle für Integrine***

Innerhalb der katalytischen Domäne befindet sich die Bindungsstelle für Integrine (AS 293-452). Die grösste Affinität besteht hier zum zytoplasmatischen Abschnitt von  $\beta$ 1-Integrinen [1].

## **1.3.2 Physiologische Bedeutung von ILK**

Der Transfer von Informationen von der extrazellulären Matrix (ECM) und von Wachstumsfaktoren in den Zellkern kann auf verschiedenen Ebenen koordiniert werden. Entweder extrazellulär durch direkte Interaktionen zwischen ECM und Wachstumsfaktoren auf Rezeptorebene oder intrazellulär durch eine Regulation von Effektoren intrazellulärer Signalkaskaden [76]. ILK ist ein Effektor, der eine zentrale Rolle bei der Transduktion von Signalen von der ECM und von Wachstumsfaktoren in den Zellkern spielt (outside-in signaling) [96]. Im Rahmen des 'outside-in signaling' konnte für ILK gezeigt werden, daß eine Integrinbindung durch

Adhäsion einer Epithelzelle an  $\beta_1$ -bindende Matrix (Laminin oder Fibronectin) die ILK-Aktivität im Vergleich zu matrixfreien Kulturbedingungen hemmt [97]. Gleichzeitig ist ILK als Bindeglied zwischen intrazellulären Signalkaskaden und der zellulären Kontaktstelle zum Extrazellulärraum, den Integrinen, an der Umsetzung nukleärer Prozesse auf extrazellulärer Ebene (inside-out signaling) von zentraler Bedeutung [98, 99]. Im Rahmen des 'inside-out signaling' führt die ILK-Überexpression zu erniedrigter Zelladhärenz [100]. In diesem Sinne ist ILK an der Regulation von Zelladhäsion, der zellulären Gestalt, des Wachstums und der Differenzierung beteiligt. Eine Dysregulation von ILK führt zu Störungen in diesen Bereichen [101]. Die genauen molekularen Interaktionen sind Gegenstand intensiver Forschung.

### 1.3.3 Mit ILK interagierende Moleküle

ILK interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von  $\beta$ - Integrinen (z.B.  $\beta_1$ -Integrin). Darüberhinaus bindet es mit hoher Affinität an PINCH, ein Protein des Focal Adhesion Komplexes, das aus fünf LIM-Domänen besteht [102]. Die erste LIM Domäne (LIM1) enthält zwei aneinander angrenzende Zink (Zn)-Finger Motive. Die ILK-PINCH Bindung wird am ILK Molekül über einen Abschnitt mit Ankyrin (ANK)-repeats am N-Terminus vermittelt. Am PINCH Molekül findet die Bindung an der am weitesten N-terminal gelegenen LIM Domäne (LIM1) an einem darin enthaltenen Zn-Finger Motiv statt [103].

Weiterhin interagiert ILK mit CH-ILKBP, einem Aktin bindenden Focal Adhesion Protein mit zwei Calponin homologen (CH) Domänen. Humanes CH-ILKBP ist strukturell dem Ratten Actopaxin sehr verwandt, einem Aktin und Paxillin bindenden Protein [104]. Zusätzlich bindet ILK an das Paxillin LD1 Motiv. Die Interaktion zwischen ILK und CH-ILKBP wird über die C-terminale Domäne von ILK und die CH2- Domäne von CH-ILKBP vermittelt. Gleichzeitige Interaktionen der zwei verschiedenen Domänen von ILK am N- und C- Ende führen zur Bildung eines stabilen PINCH -- ILK -- CH-ILKBP Komplexes. Dieser stellt eine wichtige Verbindung zwischen Transmembranrezeptoren wie Integrinen und Aktin Filamenten dar [94].

ILK spielt darüber hinaus eine bedeutende Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung. Bekannte „downstream targets“ von ILK sind PKB/Akt, GSK-3,  $\beta$ -Catenin und p44/42 MAP kinasen [82, 105]. Die Produktion von matrixmodifizierenden Proteasen (MMP-9) wird durch ILK induziert [106]. ILK-Überexpression führt in Rattenepithelzellen zur Repression des



Domänen und eine C-terminale SH2 Domäne. Über die dritte SH3 Domäne findet eine Interaktion mit der LIM4 Domäne von PINCH statt. Zusätzlich kann Nck-2 mit IRS-1 über seine verschiedenen SH3 Domänen und mit Wachstumsfaktor Rezeptoren wie dem PDGF Rezeptor  $\beta$  über die SH2 Domäne interagieren. Es wird davon ausgegangen, daß die Interaktionen, die über die verschiedenen Nck-2 Domänen vermittelt werden, eine Kommunikation zwischen Zelladhäsions und Wachstumsfaktor Signalkaskaden ermöglichen [112]. Diese Interaktionen sind experimentell belegt, haben aber noch hypothetischen Charakter und sind in Abbildung 6 mit roten Doppelpfeilen dargestellt. Weitere Nck-2 bindende Proteine sind PAK, WASPs und DOCK180, die wichtige Rollen bei der Cdc42 und Ras vermittelten Aktinzytoskelett Organisation spielen [111].

## **1.4 CNF und eine veränderte ILK mRNA Expression**

### **1.4.1 Definition CNF**

Das kongenitale Syndrom des finnischen Typs (CNF, NPHS1) ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die bei finnischen Neugeborenen mit einer Inzidenz von 1:10.000 auftritt. CNF-Fälle außerhalb von Finnland sind mit einer Inzidenz von 1:50.000 noch seltener [113]. Die Krankheit betrifft primär nur die Niere, andere Organe können sekundär durch das schwere nephrotische Syndrom geschädigt werden. Charakteristisch für CNF ist eine massive Proteinurie ( $\sim 10\text{g/l}$ ), die bereits im Uterus beginnt. Zusätzlich kann man eine vergrößerte Plazenta beobachten, die häufig über 25% des Geburtsgewichtes des Säuglings wiegt. Die pränatale Diagnose erfolgt in CNF Risikofamilien durch den Nachweis erhöhter  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) Spiegel in der Amnionflüssigkeit und im mütterlichen Serum [114, 115]. Die meisten Neugeborenen sind unreif, zeigen eine verzögerte Ossifikation (große Fontanellen) und innerhalb der ersten Lebensstage ein schnell fortschreitendes nephrotisches Syndrom [116-118]. Früher starben die betroffenen Kinder innerhalb der ersten sechs Lebensmonate. Heutzutage ist die Prognose erheblich besser. Direkt nach der Geburt wird Albumin substituiert, die Kinder werden speziell ernährt, und es wird eine konsequente Infektionsprophylaxe durchgeführt. Die derzeit einzige Therapie ist eine Nierentransplantation, die bei den betroffenen Kindern etwa im Alter von zwei Jahren durchgeführt wird. Nach Holmberg et al. überleben 98% der transplantierten Kinder die Operation und bei 82% bleibt die transplantierte Niere nach fünf Jahren noch funktionsfähig [117]. 25% der Patienten erleiden Rezidive des nephrotischen Syndroms, die mit Cyclophosphamid behandelt werden müssen [119]. Bei 90% aller an CNF Erkrankten konnten Mutationen in dem Gen Nephtrin nachgewiesen werden, das für ein transmembranä-

res Protein kodiert, welches nur in der Niere vorkommt [120].

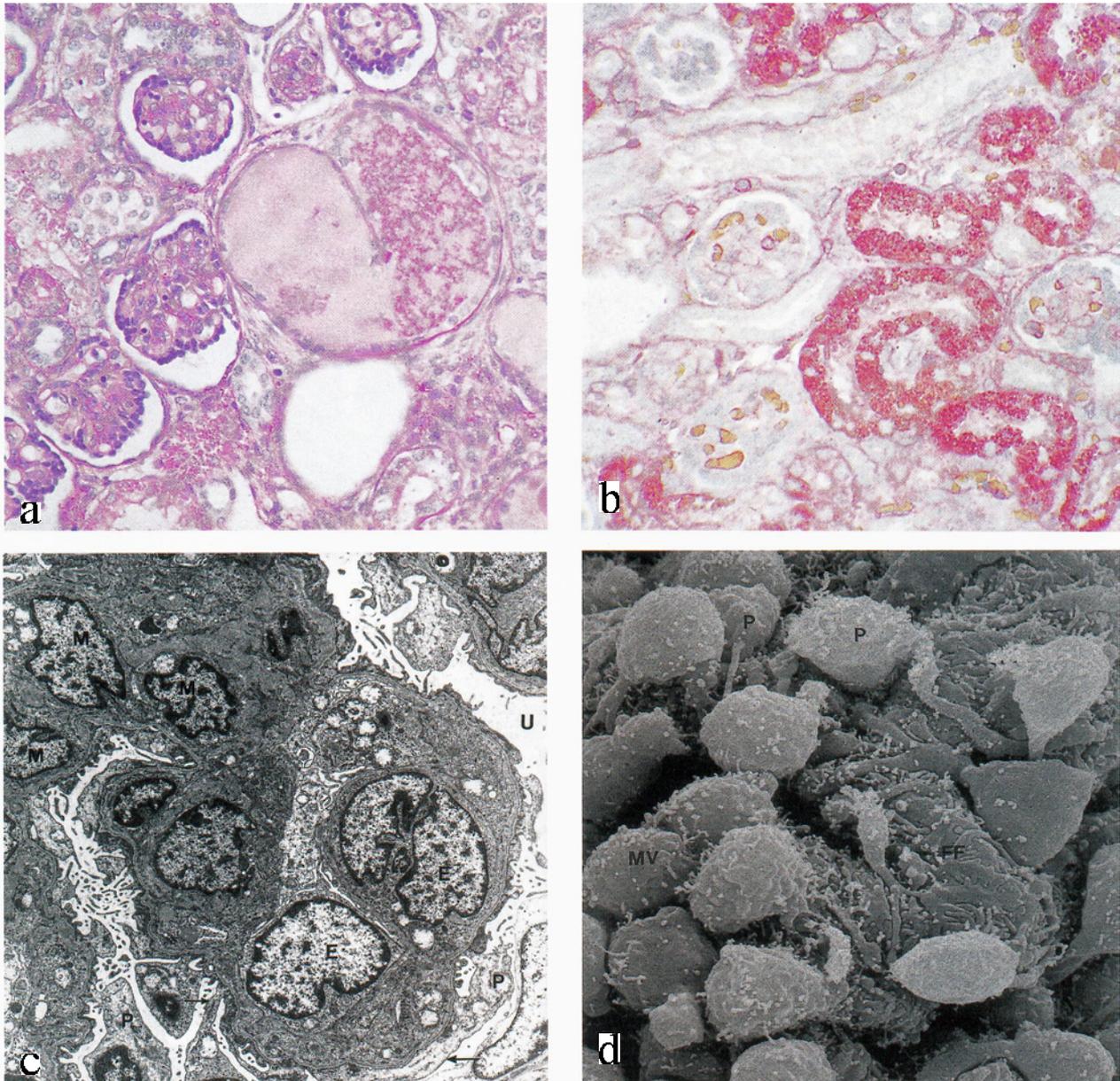
### 1.4.2 Pathologie des CNF

Es gibt keine pathognomonischen pathologischen Befunde für CNF. Man findet jedoch charakteristische Veränderungen vor allem im Bereich der Glomeruli. Die Nieren sind bis zu dreimal größer als normal [121]. Die Glomeruli sind abnorm groß für das Alter des Patienten, das durchschnittliche Volumen ist doppelt so groß wie der altersbezogene Normwert. Zusätzlich ist die Gesamtzahl der Glomeruli vermehrt. Insgesamt ergibt sich ein Gesamtvolumen der Glomeruli, das dreimal über dem Normwert liegt [122]. Charakteristisch ist eine glomeruläre Fibrose und eine Proliferation der Mesangialzellen. Häufig beobachtet man atrophierte und mit Kolloid gefüllte, zystisch ausgeweitete Tubuli [121]. Mikroskopisch fallen abnorme Podozyten mit plumpen oder fehlenden Fußfortsätzen, die Ausbildung von Mikrovilli und ein Abheben der Zellen in den Bowman- Kapselraum auf [121]. Die glomeruläre Basalmembran ist oft verdickt und in ihrer Zusammensetzung verändert. Beschrieben wird eine veränderte Konzentration und Verteilung von Matrixkomponenten wie Laminin, Plasma- und zelluläres Fibronectin, Kollagen Typ IV, Heparan Sulphat Proteoglykanen und Thrombospondin [123]. Die anionische Ladung der GBM bleibt unverändert [124].

### 1.4.3 Nephtrin

1998 konnten bei Patienten mit CNF Mutationen im sogenannten Nephtrin-Gen nachgewiesen werden [120]. Das Gen Nephtrin enthält 29 Exons und kodiert für ein transmembranöses Protein der Immunglobulinfamilie und könnte eine Rolle in der Zelladhäsion spielen [125]. Bei 90% der finnischen CNF Patienten konnte eine von zwei verschiedenen Nephtrin Mutationen nachgewiesen werden. Eine zwei Basenpaar Deletion in Exon 2 (Fin-Major), die eine Rasterverschiebung (Frameshift) und einen Translationsstop im selben Exon zur Folge hat und zweitens eine nonsense mutation in Exon 26 (Fin.minor). 78% der CNF Patienten hatten die Fin-Major Mutation und 16% die Fin-Minor Variante. Bei CNF- Patienten außerhalb von Finnland konnten 46 weitere unterschiedliche Mutationen des Nephtrin Gens identifiziert werden [113]. Man geht davon aus, daß bei den Nephrotischen Syndrom- Rezidiven, die bei einem Teil der CNF Patienten nach Nierentransplantation auftreten, zirkulierende Anti- Nephtrin Antikörper eine zentrale Rolle spielen [119]. Das Protein Nephtrin ist in der Schlitzmembran zwischen den Podozytenfußfortsätzen lokalisiert. Hier könnte es im Extrazellulärraum mit anderen Nephtrin Domänen und intrazellulär mit dem CD2 assoziierten Protein (CD2AP) interagieren, welches wichtig für die T-Zell Adhäsion an Antigen präsentierende Zellen ist

[125, 126]. Mutationen von Nephrin sind mit schwerer Proteinurie assoziiert. Man geht davon aus, das Nephrin eine entscheidende Rolle für die korrekte Funktion der glomerulären Basalmembran hat und möglicherweise noch bei anderen Erkrankungen mit Beeinträchtigung der glomerulären Filtration eine Rolle spielt [113].



**Abb.7:** Kongenitales Nephrotisches Syndrom des finnischen Typs. A) In der Lichtmikroskopie ektatische bis zystische Tubuli. PAS - Fbg. B) Immunhistologisch eine deutliche, über die Norm hinausgehende Ausscheidung von Immunglobulin G (IgG) im Primärharn mit Speicherung von IgG (rote Tröpfchen) in proximalen Tubuli. C) In der Transmissionselektronenmikroskopie ein verbreitertes Mesangium und plumpe Podozyten Fortsätze. D) Rasterelektronenmikroskopisch stielartig in den Bowman-Kapselraum ragende Podozyten mit verdickten Fortsätzen. E = Endothel, M = Mesangium, P = Podozyt, U = Bowman-Kapselraum; fetale Niere, MV = Mikrovilli, FF = Fußfortsätze. Aus Harnapparat & männliches Genitale, Gröne, 1994, S.55

#### 1.4.4 ILK – Expression bei CNF

In jeder Zelle des menschlichen Organismus sind etwa 30000 Gene kodiert [127]. Man geht davon aus, daß von den 30000 Genen in jeder einzelnen Zelle, jeweils nur etwa 15% exprimiert werden [128]. Die physiologische Entwicklung von Zellen aber auch krankhafte Veränderungen, wie die Kanzerogenese, werden nach dem heutigen Stand der Wissenschaft durch Veränderungen in der Genexpression gesteuert [129]. Eine Identifikation der in ihrer Expression veränderten Gene und ihre weitere Untersuchung kann zum Verständnis molekularer Grundlagen von Krankheiten und zur rationalen Entwicklung von Therapiestrategien führen. Ein molekularbiologischer Ansatz um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, ist die 1992 entwickelte Differential Display PCR (DDPCR) [130]. Differential Display PCR ist eine PCR Variation, die Hinweise auf quantitative Unterschiede in der mRNA Expression zweier verschiedener Gewebe- oder Zellproben geben soll. Dafür wird bei beiden Proben zuerst die zelluläre messenger RNA (mRNA) isoliert und danach revers transkribiert. Die resultierenden cDNAs (complementary DNA) werden mittels PCR mit unspezifischen Primern amplifiziert und in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Korrelierende PCR-Produkte der zwei Ansätze, die auf dem Gel unterschiedlich starke Banden zeigen, werden hinsichtlich ihrer Basenfolge weiter untersucht und in einer Genbank mit bekannten Genen verglichen. In unserer Arbeitsgruppe wurden mittels Differential Display PCR Glomeruli von CNF Patienten mit Glomeruli aus nicht erkrankten Nieren verglichen. Beim Vergleich von CNF Glomeruli mit gesundem Material zeigten sich Expressionsunterschiede in 37 cDNAs. Zum Zeitpunkt des Experiments zeigten zwei dieser cDNAs Homologien zu bekannten Genen [131]. Eines dieser PCR-Produkte wies eine 92% Nukleotidbasenidentität über 526 bp mit Integrin-linked Kinase (ILK), einem Signaltransduktionsmolekül von Zell-Matrix Kontakten, auf [2].

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll die ILK-Expression bei der Entwicklung glomerulärer Schädigung untersucht werden.

Beim Versagen der glomerulären Filtrationsbarriere zeigen sich bei den zellulären Bestandteilen des Glomerulus zuerst an Podozyten charakteristische Veränderungen wie Ablösung von der GBM und ein abgeflachter Phänotyp [26]. Die Podozytenschädigung ist als zentraler Faktor bei der Entwicklung von Proteinurie und progredienter Nierenschädigung anzusehen [31].

Die Veränderungen, die dabei histologisch bei Podozyten nachweisbar sind, können ILK assoziierten Strukturen zugeordnet werden:

Der Verlust der Haftung von Podozyten an der glomerulären Basalmembran ist mit einem veränderten Bindungsverhalten von Zell-Matrix Adhäsionsmolekülen wie Integrinen verbunden. Diesen Adhäsionsmolekülen sind intrazelluläre Signalkaskaden nachgeschaltet. An dieser intrazellulären Signalverarbeitung ist die Kinase ILK wesentlich beteiligt [2, 107].

Die Veränderung der Zellmorphologie von Podozyten beruht auf einer Alteration des Zytoskeletts. Ein Einfluss von ILK auf zytoskeletale Proteine und auf die Zellmorphologie ist beschrieben [2, 111].

Um beurteilen zu können, ob eine veränderte ILK – Expression in Podozyten ein frühes Zeichen der progredienten Nierenschädigung darstellt, sollen mit dieser Arbeit folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Wird ILK mRNA in Podozyten auf zellulärer Ebene reguliert?
2. Wird ILK mRNA in murinen Modellen der Nierenschädigung mit Proteinurie verändert exprimiert?
3. Lassen sich die Veränderungen auf mRNA Ebene auch auf Proteinebene nachweisen?
4. Wie verhalten sich die Expressionen weiterer Elemente des FAC wie FAK, Paxillin und  $\beta$ 1- Integrin im Vergleich zu ILK?

## **2. Methoden und Material**

### **2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

#### **2.1.1 mRNA Expressionsanalysen**

Im Folgenden werden die Schritte bei der Präparation von cDNA, wie sie bei der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, der Reihe nach erläutert.

#### ***Isolation von RNA***

Die Isolation von RNA umfasst vier Arbeitsschritte:

- Zellen oder Gewebe aufschließen,
- Komplexe aus Proteinen und Nukleinsäuren denaturieren,
- endogene RNAsen inhibieren,
- Verunreinigungen durch DNA und Proteine eliminieren,

Besonders muß dabei auf eine Inhibition der RNAsen geachtet werden. Der Zellaufschluss erfolgt durch Guanidiniumthiocyanat (GTC) allein oder im Verbund mit  $\beta$ -Mercaptoethanol. Dies sind stark denaturierende Mittel, die RNAsen inhibieren und Nukleoprotein-Komplexe denaturieren.

Nach Aufschluß des Ausgangsmaterials wird mit der RNA Isolation begonnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur RNA Gewinnung die saure Phenolextraktion mit TRI Reagent® angewandt und ab 2000 auch die Säulentitration mit RNA-Adhäsion an Glasperlen.

#### ***Saure Phenolextraktion mit TRI Reagent***

Bei der RNA Isolation mit dem TRI Reagent handelt es sich um eine Single-Step Extraktionsmethode, bei der mit einem monophasischen Gemisch aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol der Aufschluß des Ausgangsmaterials und die Herauslösung der RNA in einem Arbeitsschritt erfolgt. Das Gemisch aus Ausgangsmaterial und TRI Reagenz wird nach Zugabe von Chloroform zentrifugiert und aus der wässrigen Phase wird die RNA mit Isopropanol gefällt.

#### **Protokoll: RNA Isolation mit TRI Reagenz**

##### **I. Vorbereitung der Probe**

Proben in TRI Reagenz aufnehmen (10 $\mu$ g Gewebe in 100ml TRI bzw. 1ml TRI für 10cm<sup>2</sup> Zellkultur),

Gewebeprobe mit Gas-Teflon-Homogenisator zerkleinern und etwa 5-10s mit Ultraschall behandeln,

Zellkulturmaterial und TRI mit Pippette gleichmäßig durchmischen,

2 $\mu$ l Microcarrier Gel pro 1ml TRI Reagenz zugeben,

## II. Trennung der Phasen

Bei RT 10 min inkubieren, 15sec mischen, 3min bei RT inkubieren,

1/5 des Volumens Chloroform zugeben. Bei 4°C mit 12.000 G 15 min zentrifugieren,

Obere Phase abnehmen und Extraktion wiederholen (gleiches Volumen TRI und 1/5 des Volumens Chloroform zugeben), bei Raumtemperatur für 3 min. inkubieren, bei 4°C mit 12.000 G 15min zentrifugieren,

nach Zentrifugation zeigen sich drei Phasen. Die oberste Phase enthält die RNA und muss zur weiteren RNA Isolation mit einer Pipette sorgfältig abgenommen werden. In der mittleren Phase befindet sich die DNA und in der untersten Phase sind Proteine.

## III. RNA Präzipitation durch Isopropanol Fällung

0,5ml Isopropanol pro 1ml TRI zur obersten Phase geben,

Mischen, Inkubation bei RT für 5-10 min,

Bei 12.000 G und 4°C 10 min zentrifugieren,

Die RNA befindet sich in einem weißen Pellet,

## *Säulentitration mit RNA-Adhäsion an Glasperlen*

Bei der Säulentitration nach der RNeasy Methode® macht man sich die Eigenschaft von Nucleinsäuren zunutze, daß sie in Gegenwart von Salzen wie Natriumjodid, Guanidiniumthiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid an Glasoberflächen binden. Die Bindungseigenschaften sind von der Ionenstärke und dem PH der Lösungen abhängig. Die Bindung an das Glas findet innerhalb weniger Sekunden statt und wird durch die Zerstörung der Hydrathülle der Nucleinsäuren gefördert. Das Glas liegt in Form von kleinen Kügelchen in einem Plastikröhrchen vor.

## Protokoll RNA Isolation mit Rneasy

Zerkleinerung und Homogenisieren der Probe mit Lysis Puffer RLT (bis 20mg Material 350µl und bis 30mg 600µl RLT Puffer) und mit Quia Schredder Röhrchen,

Bei 12000 G 3 Minuten lang in Mikrozentrifuge zentrifugieren,

Die RNA befindet sich im Überstand, zelluläres Material befindet sich als Pellet am Boden des Röhrchens. Überstand mit Pipette abschöpfen.

350 bzw. 600µl 70% Ethanol zum Klaren Lysat geben, mit Pipette gut mischen,

700µl des Gemisches in ein Rneasy Spin Röhrchen mit 2ml Sammelröhrchen geben und 15sek bei 8000 G zentrifugieren,

700µl RW1 Puffer in Rneasy Spin Röhrchen geben und 15 sek bei 8000 G zentrifugieren, - die RNA hängt an den Glaskügelchen im Rneasy Spin Röhrchen,

Sammelröhrchen mit Inhalt verwerfen,

Rneasy Spin Röhrchen auf neues Sammelröhrchen geben, 500µl RPE Puffer auf Rneasy Spin Röhrchen geben, 15 sek bei 8000G zentrifugieren,

Sammelröhrchen mit Inhalt verwerfen,

500µl RPE Puffer auf Rneasy Spin Röhrchen geben und 2min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren um Rneasy Membran zu trocknen,

Rneasy Spin Röhrchen vorsichtig vom Sammelröhrchen entfernen und Sammelröhrchen samt Inhalt verwerfen,

Rneasy Spin Röhrchen auf neues Sammelröhrchen setzen, 30-50 $\mu$ l RNase freies Wasser dazugeben und 1 min bei 8000 G zentrifugieren um RNA auszuwaschen, Die RNA befindet sich in den 30-50 $\mu$ l Wasser im Sammelröhrchen.

### ***DNase Behandlung***

Um die RNA von kontaminierender genomischer DNA zu reinigen, wurden die Proben mit DNase Puffer behandelt. Das Enzym DNase degradiert genomische DNA.

#### **Protokoll: DNase Behandlung**

RNA-Pellet (TRI) in 50 $\mu$ l DNase-Ansatz lösen,

DNase Ansatz:           1U DNase

                          RNase Inhibitor

                          1 x DNase Puffer

10 min bei 37°C inkubieren,

Mit Phenol/Chloroform und Ether extrahieren,

2 $\mu$ l Glykogen zugeben,

Mit Natriumacetat/ Ethanol fällen,

### ***RNA- Messung***

Die RNA Konzentration wurde in einem Spektrometer gemessen, indem die Absorption bei 260nm ( $A_{260}$ ) gemessen wurde. Bei  $A_{260}$  sind RNA Absorptionswerte ab einer optischen Dichte (OD) 0,15 signifikant. Eine OD von 1,0 bei  $A_{260}$  entspricht 40 $\mu$ g RNA pro ml Wasser. Diese Beziehung gilt für in Wasser verdünnte RNA.

Um zu gewährleisten, daß die Meßküvetten RNase frei sind, wurden sie mit 0,1M NaOH, 1mM EDTA, danach mit RNase freiem Wasser gespült.

### ***Bestimmung der Reinheit der RNA***

Das Verhältnis der optischen Dichten einer Probe bei 260nm und bei 280nm ( $A_{260}/ A_{280}$ ) in 10mM Tris-Cl bei PH 7,5 gibt einen Hinweis auf die Reinheit der RNA.

Reine RNA hat einen  $A_{260}/ A_{280}$  Wert von 1,8-2,1 in 10mM Tris Cl. Kontaminationen insbesondere mit Proteinen, führen zu niedrigeren Werten.

### ***Reverse Transkription***

Mittels reverser Transkription ist es möglich RNA in cDNA umzuwandeln. In dieser Form sind die Informationen, die ursprünglich auf RNA gespeichert waren, stabiler konserviert und lassen sich mit PCR Techniken analysieren. Wir verwendeten zur reversen Transkription Moloney-Mouse Leucemia Virus (M-MLV) reverse Transkriptase (SUPERSCRIPT Polymerase). M-MLV reverse Transkriptase besitzt keine RNase Aktivität. Als Primer verwendeten wir oligo-dT-Ketten um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren. Es ist kaum möglich, vollkommen reine RNA zu isolieren ohne DNA Kontamination. Um diese Verunreinigungen abschätzen zu können, wurde jede Probe halbiert. Zur einen Hälfte wurde reverse Transkriptase gegeben (RT+), die andere Hälfte wurde genau gleich behandelt, allerdings ohne reverse Transkriptase (RT-).

#### **Protokoll: Reverse Transkription (RT) von RNA**

RNA-Lysat mit RT-Primer Ansatz (siehe 2.4.7 Rezepte für Gele, Lösungen und Puffer) vermischen,

kurz zentrifugieren und 5 Minuten auf 65°C erhitzen. Damit sollen Enzyme inaktiviert werden, die sich im Lösungsansatz befinden und die RT stören könnten.

10 µl RT-Ansatz (siehe 2.4.7 Rezepte für Gele, Lösungen und Puffer) dazugeben,

Anschließend Inkubation bei 42°C 1 Stunde lang, hierbei findet die reverse Transkription statt,

Ammoniumazetat / Ethanol Fällung, resultierendes Pellet in 10-20µl TE resuspendieren.

### ***Lagerung von Gewebe, RNA, cDNA***

RNA wurde in Wasser bei -80°C in einem Teil des Labors gelagert, der für Arbeiten mit RNA reserviert war. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### **2.1.2 Polymerasekettenreaktion**

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine enzymatische Vermehrung eines DNA-Segmentes, das zwischen zwei Abschnitten bekannter Sequenz liegt. Mit Hilfe geeigneter Oligonukleotid-Primerpaare, den Nukleotiden ATP, GTP, CTP, TTP, dem Enzym Polymerase und einem DNA-Template wird in einem Thermocycler in ca. 25-35 Reaktionszyklen der durch die Primerauswahl bestimmte Bereich der DNA millionenfach kopiert. Ein Reaktionszyklus besteht aus Denaturierung, Primeranlagerung und Doppelstrangsynthese. Die

große Menge identischer Kopien des DNA -Segmentes ermöglicht dessen Darstellung durch Gel-Elektrophorese (meistens Agarose- oder Polyacrylamidgel).

### ***Quantitative RT-PCR***

Bei der quantitativen RT-PCR dient RNA, die revers zu cDNA transkribiert wurde, als Ausgangsmaterial für die Polymerasekettenreaktion. Von der Menge des PCR Produktes wird auf die Menge des RNA Ausgangsmaterials geschlossen. Die PCR liefert unter Standardbedingungen einen reproduzierbaren Amplifikationsfaktor. Im linearen Amplifikationsbereich des Assays ist die Produktmenge zur cDNA Ausgangsmenge proportional. Durch eine quantitative Auswertung der Reaktionsergebnisse kann man so auf die Ausgangsmenge rückschließen.

Diese Eigenschaft der PCR wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt, um eine Aussage über Expressionsveränderungen eines Gens bei unterschiedlichen Experimentalbedingungen zu treffen. Dazu wurden die DNA-Mengen der jeweiligen Zeitpunkte auf ein gleiches Expressionsniveau eines "Housekeeping-Genes" angeglichen. Als Standard diente die Expression von beta-Actin, Glycerin Aldehyd 3 Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und von Adenin Nukleotid Carrier (ANC). Diese Gene sind wichtig für basale Stoffwechselaktivitäten der Zelle. Man sucht sich solche Gene als housekeeper, von denen man annimmt, daß sie sich in ihrem Expressionsniveau möglichst wenig verändern. Wir haben in Vorversuchen festgestellt, dass die von uns verwendeten housekeeper  $\beta$ -Actin, GAPDH und ANC nur geringe, gleichsinnige Veränderungen in ihrer Expression in den hier untersuchten Materialien zeigten.

Das untersuchte Gen wird in seiner Expression zu den housekeeping Genen ins Verhältnis gesetzt. Dadurch werden die unterschiedlichen Proben, denen unterschiedliche Mengen an Ausgangsgewebe zugrundeliegen, bezüglich der Expression des untersuchten Gens vergleichbar.

Die RT PCR wurde mit seriell verdünnten Proben durchgeführt, um eine Linearität des Assays zu gewährleisten. Die Proben wurden hinsichtlich gleicher Konzentrationen der housekeeper standardisiert.

### **Protokoll: PCR**

**Reaktionsansatz (25 $\mu$ l):**        17 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
  4 $\mu$ l 1,25mM dNTP  
  2,5 $\mu$ l 10x DD PCR Puffer  
  0,25 $\mu$ l 10pM Sense Primer  
  0,25 $\mu$ l 10pM Antisense Primer  
  0,125 $\mu$ l Taq-Polymerase/ Ansatz

in 1,5ml Röhrchen und mit 2 Tropfen Mineralöl bedecken

**Reaktionsbedingungen:**

Initiale Denaturierung		94°C	3min
30 Zyklen	Denaturierung	94°C	45sek
	Anlagerung	56°C	60sek
	Extension	72°C	45sek
Finale Extension		72°C	7 min

**2.1.3 Auswertung des PCR Produktes**

Die mittels PCR amplifizierte cDNA Sequenzen wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die Gele mit Vistra Green gefärbt und mit dem Storm Bilderfassungssystem gescannt.

***Darstellung des PCR-Produktes mit Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (PAGE)***

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auftrennung der Nukleinsäuren nach dem Molekulargewicht ein vertikales Elektrophoresesystem mit Polyacrylamidminigelen verwendet. Man hätte auch Agarose Gele verwenden können, wir haben uns für Polyacrylamid Gele entschieden, da diese eine genauere DNA Auftrennung ermöglichen und für quantitative Untersuchungen mit Vistra-Green Farbstoff besser geeignet erscheinen, da die horizontale Diffusion von DNA und Farbstoff geringer als bei Agarose Gelen ist.

Die Gele wurden in einen Gelelektrophorese Apparat für Minigele von BioRad eingespannt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE Puffer verwendet.

Die Proben wurden bei einer Spannung von 140 V aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele 10 min mit 30 ml Vistra Green Färbelösung/ Gel gefärbt

***Storm- Phosphorimagingssystem***

Das Storm Bildgebungssystem besteht aus einem computergestützten Lesegerät, das markierte und gelelektrophoretisch aufgetrennte und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Proben mit einem Laser misst. Die ermittelten Daten werden anschließend mit den Programmen „Imagequant“ und „MS Excel“ weiterbearbeitet. Für jede Bande wird mit diesem Bildverarbeitungssystem ein „Volume“- Zahlenwert ermittelt, der sich aus der Verrechnung der Summe der im markierten Bereich erfassten Färbungsintensitätswerte eines jeden Pixels abzüglich eines Hintergrundwertes, der für jedes einzelne Gel ermittelt wurde, ergibt. Je mehr Vistra Green in eine Bande eingelagert wird, desto dunkler erscheint sie in der digitalen Abbildung

und einen umso höheren Volumewert erhält sie in der Bildverarbeitung durch die Imagequant Software. Innerhalb eines Experiments wurde für jede Bande ein exakt gleich großer Bereich auf dem Gel markiert und ausgewertet.

#### **2.1.4 Real-Time Quantitative PCR**

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von cDNA stellt die Real-Time Quantitative PCR dar [132, 133]. Im Gegensatz zur klassischen PCR wird nicht über die Menge des Endproduktes im Gel auf die cDNA Ausgangsmenge geschlossen, sondern während der PCR wird kontinuierlich die Vermehrung des PCR Produktes gemessen.

##### ***ABI Prism 7700 Sequence Detection System***

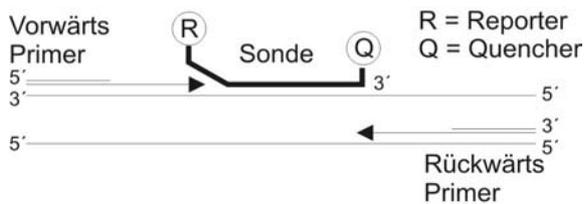
Wir benützten für Real-Time Quantitative PCR das ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Das ABI Prism 7700 Sequence Detection System besteht aus einem Thermo-Cycler für 96 Proben und einem Laser, der durch 96 Glasfaserkabel zu jeder einzelnen Probe geleitet wird, um dort Fluoreszenz zu induzieren. Die Fluoreszenzemission wird durch die Glasfaserkabel zurück zu einer CCD Kamera (CCD = charge coupled device) geleitet und in ihrer Intensität gemessen.

##### ***Prinzip der Real-Time PCR***

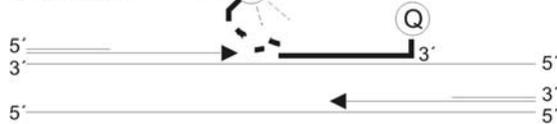
Die Real-Time PCR wurde in dieser Arbeit nach dem Taqman-Prinzip durchgeführt [132, 133]. Zusätzlich zu dem für die Amplifikation benötigten Primerpaar wird der Reaktion ein kurzes Oligonukleotid zugesetzt, das als Gensonde (probe) spezifisch an das entstehende PCR-Produkt bindet. Dieses als Taqman-Sonde bezeichnete Oligonukleotid ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (=Reporter: FAM oder VIC) und in unmittelbarer Nähe zu diesem mit einer fluoreszenzlöschenden Verbindung (= Quencher: TAMRA) verknüpft. Die Fluoreszenzlöschung wird mit dem Försterschen Energietransfer erklärt [134, 135]. Im Falle einer vorhandenen Ziel-DNA im PCR-Ansatz verlängert die Taq-Polymerase die spezifisch gebundenen Primer und stößt dabei auf die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde, die aufgrund der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut wird. Die dadurch eintretende räumliche Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher führt zu einem Fluoreszenzsignal, welches direkt mit der PCR-Produktzunahme korreliert. Ein Fluoreszenzsignal entsteht nur dann, wenn die Ziel-DNA tatsächlich kopiert wird. Da die Taq-Polymerase ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität nur am DNA-Doppelstrang entfalten kann, bleiben die nicht hybridisier-

ten Sondenmoleküle unbeschadet und zeigen kein Fluoreszenzsignal. Zusätzlich wurde ein interner Farbstoff (ROX) verwendet, um Variationen im Reaktionsvolumen auszugleichen. Die Uracil-N-Glykosylase AmpErase® UNG wurde eingesetzt um Kontaminationen mit Produkten vorangegangener PCRs zu vermeiden. Die ermittelten Daten wurden automatisch mit dem ABI Sequence Detection System 1.6.3. verarbeitet und mit MS Excel ausgewertet. Der große Vorteil einer Quantifizierung mittels Real-Time PCR im Vergleich zur konventionellen PCR liegt in der kontinuierlichen Messung des entstehenden PCR-Produkts während der PCR. Somit ist eine Mengenbestimmung in der jeweils linearen Phase der PCR-Reaktion möglich. Dies führt zu wesentlich genaueren Ergebnissen bei der Quantifizierung als die Endpunktmessung bei konventionellen PCR Methoden.

#### Strangverlängerung



#### Abspaltung des Reporters



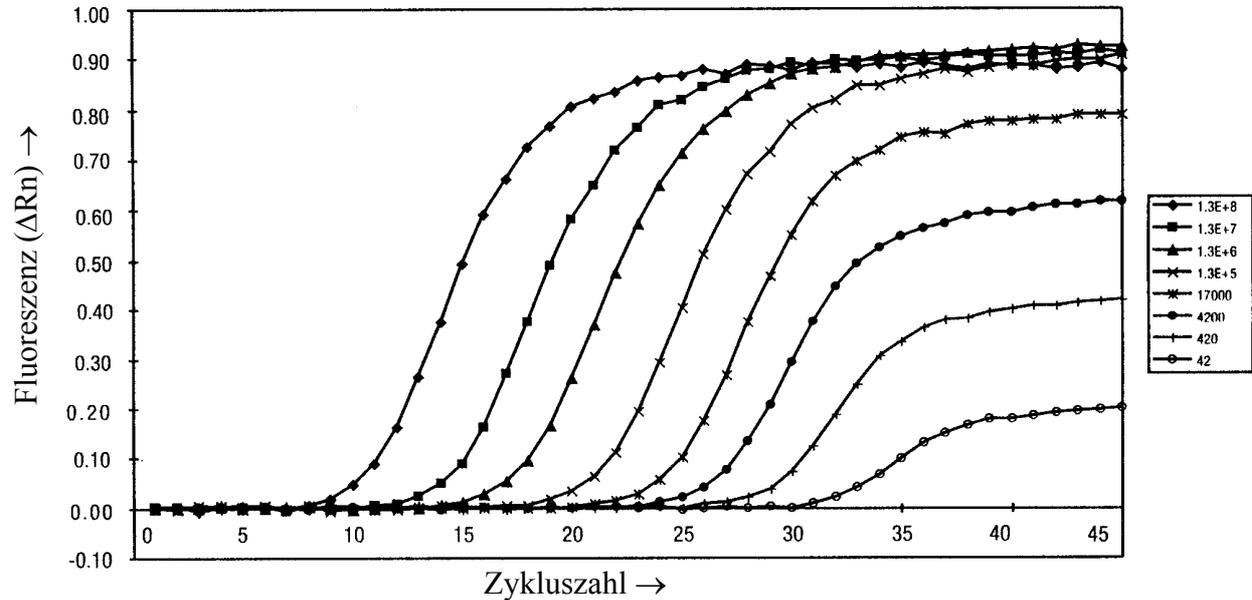
#### Komplette Polymerisation



**Abbildung 8:** TaqMan PCR Reaktionsschema; PE Applied Biosystems Manual for Real-Time PCR, S.2.

**Quantifizierung mit Real- Time PCR**

## TaqMan RT-PCR Amplifikations Plot



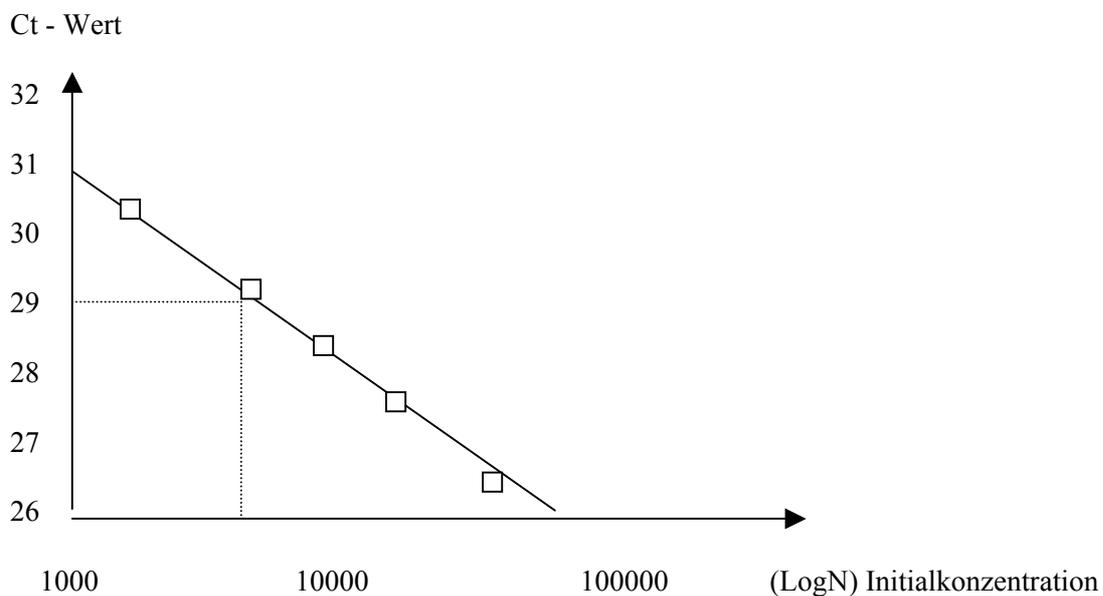
**Abbildung 9:** Gezeigt sind Amplifikations Kurven für Reaktionen mit Ausgangs RNA Mengen von 42 bis  $1,3 \cdot 10^8$  Kopien. Die Zykluszahl ist der mittleren Fluoreszenzveränderung gegenüber dem Ausgangswert gegenübergestellt.

PE Applied Biosystems Manual for Real-Time PCR, S.4.

Auf dem Amplifikationsplot werden Reaktionszyklen gegenüber Fluoreszenzintensität  $\Delta R_n$  dargestellt.  $\Delta R_n$  wird alle sieben Sekunden gemessen, eine Messung dauert 25 Millisekunden. Bei frühen Zyklen sieht man kaum Veränderungen von  $\Delta R_n$ . Die Fluoreszenzintensität  $\Delta R_n$  in diesen frühen Zyklen nennt man „baseline“. Die Entstehung und Vermehrung von PCR Produkt zeigt sich in einem Ansteigen der Fluoreszenzintensität über dieses anfänglich niedrige Niveau. Oberhalb der baseline in der exponentiellen Phase der PCR wird eine Fluoreszenzintensität als Schwellenwert (treshold) festgelegt. Mit dem  $C_t$  Wert („treshold-cycle“) wird die Zykluszahl bezeichnet, bei der  $\Delta R_n$  einer Probe das erste Mal den Schwellenwert überschreitet.

Der  $C_t$  Wert ist der natürliche Logarithmus der Initialkonzentration einer cDNA in einer Probe [136]. Die Ermittlung der Ausgangsmenge eines Zielnukleotids in einer unbekanntem Probe erfolgt, indem der  $C_t$  Wert der Probe mit der Standardkurve für diesen Primer durch die Software des ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems verrechnet wird. Je höher die ini-

tiale Menge an DNA, desto eher wird der Schwellenwert der Fluoreszenzintensität erreicht und desto niedriger ist der  $C_t$  Wert. Um bei unterschiedlichen Mengen an Ausgangsmaterial vergleichende Aussagen über die Menge eines bestimmten Nukleotids machen zu können, bestimmten wir zu jeder Probe gleichzeitig die Menge eines housekeeping Gens. Indem wir die berechneten Mengen des Zielnukleotids ins Verhältnis zu den berechneten Mengen des housekeepers setzten, erhielten wir die relative Menge. Hierzu verwendeten wir den  $dC_t$  Wert, der die Differenz aus dem  $C_t$  Wert des Zielgens und dem  $C_t$  Wert des housekeeping Gens einer Probe darstellt.  $2^{dC_t}$  ergibt das Verhältnis der Konzentrationen von Zielgen zu Housekeeping-Gen einer Probe.



**Abbildung 10:**  $C_t$  – Wert vs. (LogN) Initialkonzentration von fünf bekannten Proben. PE Applied Biosystems Manual for Real-Time PCR, S.4.

### Protokoll Real Time PCR mit ABI PRISM 7700

#### Reaktionsansatz 50 $\mu$ l

Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)	Endkonzentration
TaqMan Master Mix	40,0	1X
Sense und Antisense Primer	2,5	200 nM
TaqMan Sonden	2,5	100 nM
cDNA Probe	5,0	0,4 ng/ $\mu$ l

**Reaktionsbedingungen**

Aktivierung der AmpErase® UNG		2 min	50°C
Initiale Denaturierung		10 min	95°C
40 Zyklen	Schmelzen	15 sek	95°C
	Anlagerung/ Verlängern	60 sek	60°C

**2.1.5 Design von Sonden und Primern mit dem Programm Primer Express**

Nach BioRad Primer and Probe design session:

([http://www.biosci.ohio-state.edu/~pmgf/probe&primer\\_design.htm](http://www.biosci.ohio-state.edu/~pmgf/probe&primer_design.htm))

Eine Nukleotidsequenz auf der gesuchten cDNA muß verschiedene Voraussetzungen erfüllen, um optimal als Primer bzw. Sonde bei der Taq Man PCR zu funktionieren. Um eine solche Nukleotidsequenz auf der gesuchten cDNA zu finden, verwendeten wir das Programm Primer Express.

***Design der Sonde***

Für einen optimalen Ablauf der Taq Man PCR muss die Sonde folgende Voraussetzungen erfüllen:

- Länge von maximal 30 Nukleotiden,
- Gering ausgeprägte Sekundärstruktur,
- Guanin oder Cytosin Anteil 30% - 80%,
- Keine Folgen von identischen Basen, v.a. Abfolgen von über drei Guanin Basen vermeiden,
- Mehr Cytosin als Guanin Basen,
- Kein Guanin am 5' Ende,
- Bindungslösungstemperatur (melting temperature, T<sub>m</sub>) 68 - 70°C,
- Erfassung von Exon-Intron Grenzen erhöht Spezifität für revers transkribierte cDNA,

### ***Design der Primer***

Der Primer muss bei der Taq Man PCR verschiedene Voraussetzungen erfüllen, um die gewünschte cDNA spezifisch zu binden:

- Lage möglichst nah zur Sonde ohne diese zu überlappen,
- Keine Interaktionen mit der Sonde,
- Abstand zwischen den Primerpaaren von 75 bis 150 bp,
- 50 bis 60% der Basen Guanin oder Cytosin,
- Keine Folgen von identischen Basen, v.a. Abfolgen von über drei Guanin Basen vermeiden,
- Möglichst gering ausgeprägte Sekundärstruktur,
- Keine Interaktionen zwischen sense und antisense Primern,
- am Ende des Primers Guanin und Cytosin Basen, aber nicht mehr als zwei in den letzten fünf Basen am 3'Ende,
- Bindungslösungstemperatur (melting temperature, T<sub>m</sub>) 58-60°C,
- Spezifität für einen einzigen Abschnitt der gesuchten cDNA,
- Erfassung von Exon-Intron Grenzen erhöht Spezifität für revers transkribierte cDNA,

#### **2.1.6 Test der Primer und Sonden**

Nach der mit dem Programm Primer Express bestimmten Nukleotidfolge für Primer und Sonden wurden diese von der Firma Applied Biosystems Oligonukleotide hergestellt. Bevor wir diese Oligonukleotide für Real Time PCR benützten, unterzogen wir sie einem Testverfahren auf Spezifität und Effizienz.

#### ***Test der Primer mit PCR und Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE)***

Wir führten mit den Primern für Real Time PCR eine konventionelle PCR nach den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen durch. Das PCR Produkt wurde mit PAGE auf korrekte Größe und Einmaligkeit überprüft.

#### ***Optimierung der Primerkonzentrationen***

Um das beste Verhältnis von niedrigen Konzentrationen für sense- und antisense -Primer bei optimaler Fluoreszenzintensität  $\Delta R_n$  zu ermitteln, wurden TaqMan PCRs mit unterschiedlichen Konzentrationen der neuen Primer durchgeführt.

	Sense Primer (nM)		
Antisense Primer (nM)	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

Sondenkonzentration: 100nM

Im Amplifikationsplot werden  $\Delta R_n$ - und Ct -Werte verglichen und die niedrigstmögliche Konzentrationskombination gewählt mit hohem  $\Delta R_n$ - und niedrigem Ct -Wert.

### ***Optimierung der Sondenkonzentrationen***

Genauso wie bei den Primern werden verschiedene Konzentrationen der Sonden miteinander verglichen um die niedrigstmögliche Konzentration bei hohem  $\Delta R_n$ - und niedrigem Ct -Wert zu ermitteln.

	Probe 1 (nM)		
Probe 2 (nM)	100	200	300
100	100/100	200/100	300/100
200	100/200	200/200	300/200
300	100/300	200/300	300/300

## 2.2 Untersuchung von Proteinen mit Quantitativem Semi-dry Western Blot

Western Blots oder Immunoblots werden eingesetzt, um spezifische Antigene mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Western Blot eingesetzt, um Aussagen über unterschiedliche Mengen eines bestimmten Proteins in den eingesetzten Proben zu machen. In diesem Sinne ist es besonders wichtig, daß die Reaktionsbedingungen optimal aufeinander abgestimmt sind. Die Proteinproben wurden mit Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) vorbehandelt. Dadurch werden Faltungen und Ladungen der Proteine beseitigt, die Tertiär- und Sekundärstruktur wird aufgehoben. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Proteine in einem eindimensionalen SDS-PAGE Gel elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und mit Hilfe eines elektrischen Feldes vom Gel auf eine Membran transferiert (Blot). Auf dieser Membran können die Proteine unspezifisch gefärbt werden (z.B. mit Ponceau Färbung) oder spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Nach dem Blot wurde die Membran mit einer proteinblockenden Lösung behandelt. Zum spezifischen Proteinachweis benützten wir ein System mit zwei Antikörpern. Der erste Antikörper gegen das Proteinantigen, der zweite ein anti IgG Antikörper mit Meerrettich Peroxidase. Über eine Induktion von Chemolumineszenz mit dieser Peroxidase können Proteine im Autoradiogramm dargestellt werden. Als Substrat für die Chemolumineszenz Reaktion verwendeten wir Amersham ECL Lösung (enhanced chemoluminescence, Amersham International, Braunschweig).

### 2.2.1 Präparation der Proteine

Die Isolation von Proteinen aus dem Ausgangsmaterial erfolgte mit RIPA - Puffer und mit dem TRI Reagenz des Molecular Research Centers. Bei Zellkulturen wurde die RIPA Methode angewendet, zur Proteinextraktion aus Gewebe die TRI Methode.

#### RIPA Proteinisolation bei kultivierten Podozyten

- Überstand absaugen,
- Zellrasen 2 x mit kaltem PBS (Phosphate buffered saline) waschen,
- Zellen in kaltem PBS abschaben,
- zentrifugieren 5 min bei 2000 Upm, 4 °C,
- Überstand absaugen,
- Aufnahme des Pellets in Ripa-Puffer,
- 20 min 2000 g, 4 °C,
- Überstand in neues tube pipettieren,
- Proteinbestimmung, Lagerung bei -20 °C,

### ***Bestimmung der Proteinmenge (Biorad DC)***

Die Biorad DC Methode erlaubt eine Proteinkonzentrationsbestimmung bei besonders niedrigen Konzentrationen und bietet sich deshalb an, wenn das zu untersuchende Material knapp ist.

Lösung A und Assay Reagent S im Verhältnis 1:20 kurz vor Gebrauch mischen:

25 µl / Probe bzw. Standard

Lösung B in 15 ml Falconröhrchen abfüllen: 200 µl / Probe bzw. Standard,

5 µl Probe bzw. Standard in 96-well Platte pipettieren,

Zugabe von 25 µl frisch gemischter Lösung A + Assay Reagent S pro Probe bzw. Standard,

Zugabe von 200 µl Lösung B pro Probe bzw. Standard,

inkubieren bei Raumtemperatur (Farb-Maximum nach ca. 15 min),

messen bei 750 nm (Absorbtion ist für ca. 1 Stunde stabil),

mit Hilfe einer Standardkurve Proteinkonzentrationen berechnen.

### **2.2.2 Elektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinlysate benutzen wir ein Einkammersystem von BioRad mit Minigelen aus Polyacrylamid.

#### ***Herstellung der Gele***

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Zwei Phasen Gel benützt. Zwei Phasen Gele setzen sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen. Das Sammelgel unterscheidet sich vom Trenngel in der Porengröße, dem pH und der elektrophoretischen Beweglichkeit seiner Ionen. Dadurch findet im Sammelgel eine Konzentration des Proteinlysats statt und im Trenngel eine Auftrennung nach Proteingröße. Die Gele enthalten SDS damit die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen abläuft. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtet sich nach der molekularen Größe der Proteine, die aufgetrennt werden sollen(siehe Materialteil):

#### ***Vorbereitung der Proben***

Vor der Elektrophorese werden die eisgekühlten Proben mit einem Loading Buffer 3-5 Minuten lang bei 95°C aufgeköcht. Es ist wichtig, die Proben schnell aufzukochen nachdem man den Ladepuffer zugefügt hat um eine Degradation durch Proteasen zu verhindern, die sich häufig im SDS befinden. Um die Proben hinsichtlich der enthaltenen Menge des gesuchten Proteins besser vergleichen zu können, wurde jede Probe in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Als Standard wurden je nach Größe des untersuchten Proteins ein bestimmterdie Protein-Standardmischung VIII (Bereich 42700 - 200000 daltons) von Merck, SDS-PAGE

Standard, High Range (Bereich 45000 - 200000 daltons) von Biorad oder SDS-PAGE Standard, Low Range (Bereich 14400 - 97400 daltons) von Biorad eingesetzt. Im Ladepuffer befindet sich SDS (Natriumdodecylsulfat) und  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Der Zusatz von SDS bewirkt:

- Eine Überdeckung der individuellen Ladungsunterschiede der Proteine,
- Spaltung der Wasserstoffbrücken,
- Aufhebung der hydrophoben Wechselwirkungen,
- Verhinderung einer Aggregatbildungen von Proteinen,
- Streckung der Polypeptidfäden( Aufhebung der Sekundärstruktur)

Man verwendet 1 - 2 % (w/v) SDS im Probenpuffer, 0,1 % im Gel.

Der Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol bewirkt zusätzlich eine Reduzierung von Disulfidbindungen.

Die Vorbehandlung der Proben mit dem Ladepuffer führt dazu, daß die Proteine im Lysat nach ihrer molekularen Größe unabhängig von ursprünglicher Ladung und Faltung aufgetrennt werden.

### ***Ablauf der Elektrophorese***

Die Elektrophoresekammern werden mit Elektrophoresepuffer gefüllt, die Gele leicht in die Elektrophoresekammern eingespannt, und die Elektrophorese bei 140V durchgeführt (genaue Transferbedingungen siehe 2.4.8. Details zum Western Blot).

### **2.2.3 Semidry-Blotting**

Mit Semidry-Blotting bezeichnet man den horizontalen Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel in eine Membran mit Hilfe eines elektrischen Feldes.

Gel und Membran liegen dabei zwischen Filterpapieren, die mit verschiedenen Puffern (=diskontinuierliches System) leicht angefeuchtet sind.

Dabei haben wir das BioRad Blotsystem mit einem diskontinuierlichen Puffersystem benützt.

In unserem Labor hat sich gezeigt, daß das sogenannte diskontinuierliche Puffersystem zu schärferen Banden und effektiverem Transfer führt als das kontinuierliche Puffersystem.

## 2.2.4 Überprüfung des Transfers

Eine Färbung von Gel und Membran kann auf ein mögliches Problem beim Transfer hinweisen.

Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt und die Membran mit Ponceau S. Die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 ist sehr stabil, so daß wir die gefärbten Gele trocknen und aufbewahren konnten. Die Ponceau Färbung der Membran ist abwaschbar, nachdem man den Proteintransfer z.B. mit einem Fotokopiergerät nachgewiesen hat. Bei der Membran kann später eine Immundetektion durchgeführt werden.

### Färbung des Gels mit Coomassie Brillant Blue R 250

20 - 30 min in Coomassie-Färbelösung färben,  
dann wieder entfärben bis Hintergrund hell ist,  
Trocknen der Gele im Geltrockner bei (80 °C, ca. 1 - 2 Stunden, Vakuum),

### Färbung der PVDF-Membran mit Ponceau S

PVDF-Membran 10 min mit Ponceau S - Färbelösung färben, dann wieder mit MilliporeWasser entfärben (Vorgang kann wiederholt werden bei zu geringer Färbung oder zu starker Entfärbung)

Probenstandard mit Kugelschreiber markieren! (rechts und links von Banden)

Gel in Frischhaltefolie wickeln und fotokopieren, dann absättigen

PVDF-Membran darf nicht trocken werden

## 2.2.5 Detektion

Zum Nachweis der gesuchten Proteine auf der Membran muss die Membran nach dem Blot mit einem Blocking Reagenz abgesättigt werden.

Aufgaben und Anforderungen an ein Blocking Reagenz sind:

- Blockade von unbesetzten Proteinbindungsstellen auf der Membran
- Es darf nicht in die Antikörperbindung eingreifen oder mit dem Antikörper reagieren
- Es darf nicht mit transferierten Proteinen interagieren
- Es darf nicht zur Färbung der Membran beitragen oder andersweitig das Färbemuster beeinträchtigen

### **Protokoll zur Proteindetektion auf der Membran**

PVDF-Membran absättigen in 3 % Magermilchpulver in PBS,

1. Antikörper verdünnt in 3 % Magermilchpulver/PBS inkubieren,

6 x 6 min mit TBS + 0,05 - 0,1 % Tween 20 auf Taumler bei Raumtemperatur spülen,

2. Antikörper verdünnt in 3 % Magermilchpulver/PBS, z. B. Anti-Kaninchen Peroxidase konjugiert waschen:

6 x 6 min mit TBS + 0,05 - 0,1 % Tween 20 auf Taumler bei Raumtemperatur spülen,

1 - 2 x 6 min mit TBS ohne Tween,

Blotmembran 1min im Dunkeln in ECL (Chemilumineszenz-Lösung) inkubieren,

auf Whatman Papier leicht abtrocknen und in Frischhaltefolie einpacken,

Blot 1 min auf Filmstreifen legen, Filmstreifen entwickeln, danach entscheiden ob kürzer oder länger inkubiert werden muß,

## **2.3 Modelle der glomerulären Schädigung**

### **2.3.1 Zellkulturen**

#### ***tsSV40 transgene konditionell immortalisierte Podozyten***

Um die Schädigung der Podozyten im Experiment auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, verwendeten wir Podozyten Zellkulturen. Es stand uns eine Linie kultivierbarer Podozyten von Peter Mundel, Albert Einstein Hospital, NY, zur Verfügung. Diese Zellen entstammen glomerulären Epithelzellen eines Mausstammes, der für das temperatursensitive Simian Virus 40 (tsSV40) large T Antigen transgen ist. Transgenität mit tsSV 40 Antigen führt zu einer konditionalisierten Immortalisierung, transgene Zellen sind nur unter bestimmten permissiven Bedingungen proliferationsfähig[137, 138]. Bei diesen immortalisierten Podozyten sind die podozytenspezifischen Gene Wilmstumor 1 (WT1), Glepp 1, der Gefäßpermeabilitätsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Synaptopodin nachweisbar (eigene Experimente und Vortrag Peter Mundel, Kongress für Nephrologie, 1999, Freiburg). Die tsSV40 transgenen Zellen von Peter Mundel proliferieren bei 33°C und Zugabe von Interferon  $\gamma$ , da tsSV40 aktiviert ist. Bei 37°C ist tsSV40 deaktiviert und es findet keine Proliferation mehr statt. Der Phänotyp der Zellen verändert sich hin zu einer verzweigten, flachen ausgebreiteten Form. Wir haben Zellen mit dem Phänotyp im nichtproliferierenden Zustand als zelluläres Modell für differenzierte Podozyten benützt. Die Expression des Proteins WT-1 gilt als Hinweis auf die Fähigkeit der Zellen, sich in den differenzierten Phänotyp umzuwandeln, und ist bei den immortalisierten Podozyten nachweisbar[139]. Die Proteine Synaptopodin und Desmin lassen sich bei diesen Zellen nur im differenzierten Zustand nachweisen und sind

gemeinsam mit dem verzweigten Phänotyp charakteristisch für eine erfolgte Differenzierung der Zellen [139].

### **Kultivierung der Immortu-Podozyten**

#### **Permissive Bedingungen**

Zellkulturflaschen beschichtet mit Kollagen Typ I, (Biochrom, Berlin)  
RPMI 1640 Medium (Life Technologies) + 10%FCS (Bio Whittaker, Verviers, Belgium),  
100 U/ml Penicillin  
100 mg/ml Streptomycin  
10 U/ml rekombinantes Interferon  $\gamma$   
Brutschrank 33°C

#### **nonpermissive Bedingungen**

Zellen nach 12-24 Zyklen unter permissiven Bedingungen  
Zellkulturflaschen beschichtet mit Kollagen Typ I, 4 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, (Biochrom, Berlin)  
RPMI 1640 Medium (Life Technologies) + 2%FCS (Bio Whittaker, Verviers, Belgium),  
100 U/ml Penicillin  
100 mg/ml Streptomycin  
Brutschrank 37°C,

### ***Puromycin Aminoglykosid induzierte Podozytenschädigung***

Intraperitoneale Injektionen des Aminoglykosids Puromycin (PA) führen bei Ratten zu einer histologischen Veränderung der Niere mit massiver Proteinurie. Die Histologie der Ratten-Nieren nach einmaliger Injektion von PA ähnelt dem Bild der minimal change Glomerulonephritis beim Menschen. Bei wiederholten Injektionen von PA kommt es zu einer Vernarbung der Ratten-Glomeruli, die der humanen Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) ähnelt[140]. Der genaue Mechanismus, der bei Puromycin Applikation zur Nierenschädigung führt, ist unklar. Puromycin Injektion führt bei Ratten zu einer Retraktion der Fußfortsätze von Podozyten und zu einer Ablösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran. Man geht davon aus, daß diese irreversible toxische Schädigung der glomerulären Epithelzellen und die damit verbundene Veränderung des Kontakts dieser Zellen zu einem Versagen der glomerulären Filtrationsbarriere führt[140, 141] Als zelluläres Korrelat der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose bei Mäusen, ausgelöst durch Puromycin Aminoglykosid, verwendeten wir Zellkulturen mit tsSV40 Podozyten, die vorher mindestens 7 Tage unter nonpermissiven Bedingungen kultiviert worden waren. Bei den einzelnen Experimenten wurde 1 bis 20  $\mu$ g/ml Puromycin (ICN Eschwege) zu den Zellkulturen gegeben. Bei den Kontrollgruppen verwendeten wir das Lösungsmittel PBS (Phosphate buffered saline). 48 Stunden nach Zugabe von Puromycin bzw. PBS wurden die Zellen geerntet und mRNA und Proteine isoliert. Bei Puro-

mycinkonzentrationen oberhalb von 200µg/ml konnten wir unter den Versuchsbedingungen erhöhte LDH-Spiegel messen und haben dies als Hinweis auf Zytotoxizität gewertet.

### ***Protaminsulfat Experimente***

Protaminsulfat ist ein polyvalentes Kation. Intravenöse Infusionen führen bei Ratten schon in niedrigen Dosen (110-150 µg/ml) zu einer Proteinurie. Histologisch kann man bei niedrigen Dosen keine Veränderungen feststellen. Die Proteinurie wird durch eine Neutralisation von polyanionischen Oberflächenstrukturen von Podozyten erklärt.

Erst bei höheren intravenösen Dosen (250-330 µg/ml) wird eine histologisch sichtbare Schädigung der glomerulären Epithelzellen in Form von Podozytenfußfortsatzretraktion und einer Ablösung von der glomerulären Basalmembran beschrieben [142, 143]. In vitro werden für Protaminsulfat antiproliferative Effekte auf Mesangialzellen beschrieben [144]. Wir versetzten Podozyten mit 1 – 50 µg/ml Protaminsulfat. Bei den Kontrollgruppen verwendeten wir PBS. 48 Stunden nach Zugabe von Puromycin bzw. PBS wurden die Zellen geerntet und mRNA und Proteine isoliert.

## **2.3.2 Experimente mit Mäusen**

### ***Isolation von Glomeruli mittels sequentieller Siebung***

Um Glomeruli für nachfolgende Untersuchungen aus murinem Nierengewebe zu isolieren, führten wir eine sequentielle Siebung durch. Hierbei wird das zerkleinerte Nierengewebe mit Spüllösung durch vier hintereinanderangeordnete Edelstahlsiebe mit abnehmender Porengröße gewaschen. Der Inhalt des letzten Siebes enthält einen lichtmikroskopisch erkennbaren Anteil von 90±5% Glomeruli

#### **Sieben von Nierengewebe**

- Nieren in Glaspetrischale mit etwas PBS auf Eis geben,
- Nieren mit Rasierklinge halbieren, Mark entfernen,
- 1ml Collagenase (1,5 mg/ml) in die Glaspetrischale geben und darin das Gewebe mit einer Rasierklinge kleinhacken bis ein homogener Brei entsteht,
- Siebe nach Größe geordnet zusammenbauen (150µm→106 µm→63 µm→50 µm),
- Siebe mit Spülflüssigkeit befeuchten,

**150 µm Sieb:** Homogenisat mit Spülflüssigkeit durchspülen,  
Zugabe von 1 ml Collagenase (1,5mg/ml),  
Gewebe durchpressen und spülen bis nur noch Bindegewebeanteile im 150 µm Sieb sind.

- 106 µm Sieb:** mit Spülflüssigkeit spülen,  
Zugabe von 1 ml Collagenase (1,5mg/ml),  
15 sec einwirken lassen, sofort wieder Flüssigkeit nachgeben,  
Gewebe sanft durchpressen,
- 63 µm Sieb:** durchspülen,  
Zugabe von 1 ml Collagenase (1,5mg/ml),  
15 sec einwirken lassen, sofort wieder Flüssigkeit,  
Im Sieb zurückbleibende Fraktion in Röhrchen sammeln und tiefgekühlt aufbewahren.
- 50 µm Sieb:** durchspülen,  
Zugabe von 1 ml Collagenase (1,5mg/ml),  
15 sec einwirken lassen, sofort wieder Flüssigkeit nachgeben,  
eventuell nochmals Collagenase (1,5mg/ml) einwirken lassen,  
spülen,  
Im Sieb zurückbleibende Fraktion in Röhrchen sammeln und tiefgekühlt aufbewahren.

abzentrifugieren 10 min bei 2000 Upm und 4 ° C,

Überstand absaugen,

Isolierte Fraktionen mikroskopisch beurteilen und Verhältnis Tubuli : Gloms beurteilen,

Protein oder RNA Isolation aus isoliertem glomerulären Material,

### ***Wachstumshormon (GH) transgene Mäuse mit FSGS***

Professor Wanke (Institut für Tierpathologie der Universität München, Abteilung für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie) stellte uns GH transgene Mäuse zur Verfügung, die in seiner Arbeitsgruppe gezüchtet wurden. Diese Mäuse sind transgen für bovines Wachstumshormon unter einem Methallothionein I Promotor. Bedingt durch eine erhöhte Wachstumshormonwirkung zeigen sie ein charakteristisches klinisches Bild mit insgesamt vergrößertem Körpergewicht, vermehrter Knochensubstanz und Organomegalie. Die Lebenserwartung dieser Tiere ist hauptsächlich aufgrund schwerer Nierenschäden stark verkürzt (ca. 160 Tage). Histologisch kann man nach 4-5 Wochen an den Glomeruli eine mesangiale Proliferation beobachten. Nach ca. 12 Wochen kommt es zu einer im Verhältnis zur Nieren bzw. Körpergröße überproportionalen Vergrößerung der Glomeruli mit mesangialer Sklerosierung. Nach 30 Wochen besteht eine komplette Glomerulosklerose mit Atrophie von Nephronen und zystischer Dilatation der Tubuli. Parallel zur Glomerulosklerose entwickelt sich eine Albuminurie[145-147]. Etwa 30% der Tiere entwickeln eine Myokardfibrose, einzelne Fälle von hepatozellulärem Karzinom sind beschrieben[146]. Wir benützten für unsere Untersuchungen 90 Tage alte Mäuse mit schwerer Albuminurie (13mg/dl), bei denen der Genotyp mit genomischer PCR bestätigt worden war. Aus gesiebttem Kortex und glomerulärem Material isolierten wir mRNA und Proteine. Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp Mäuse desselben Stammes.

### *Nephrotoxische Serum Nephritis (NTX)*

Bei 4-6 Wochen alten weiblichen CD-1 Mäusen (Charles River, Malsch, Deutschland) wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Erik Schadde eine Nephrotoxische Serum Nephritis induziert [148, 149]. Fünf Tage nach intraperitonealer Präimmunisierung mit 0,2 mg Kaninchen IgG wurde 0,4mg einer Protein A gereinigten IgG Fraktion eines nephrotoxischen Kaninchen anti-Maus GBM Antiserums (K. Assmann, Nijmegen) intravenös injiziert. Die Kontrolltiere erhielten 0,4 mg normales Kaninchen IgG. Die Mäuse aus Experimental- und Kontrollgruppe wurden nach 0, 2, 5 und 7 Tagen getötet und mittels Siebung wurden Glomeruli isoliert. Histologisch zeigte sich bei lichtmikroskopischer Untersuchung dieser Glomeruli eine fokale segmentale Ablagerung von homogenem, fein granuliertem Period-Säure-Schiff (PAS) Reaktion positivem Material in den kapillären Schlingen. In den Glomeruli, die zwei Tage nach Nephritis Induktion entnommen worden waren, zeigte sich eine kapilläre Erweiterung und eine Schädigung des Endothels. Bei Glomeruli vom siebten Tag nach NTX Induktion waren diese Veränderungen noch ausgeprägter. Zusätzlich entwickelte sich eine fokale Nekrose der kapillären Schlingen. In der Immunfluoreszenz zeigte sich an Tag 2 eine starke lineare Färbung der GBM für Kaninchen und Maus IgG. Entlang der kapillären Wand und im Bereich der Mesangialzellen konnten Komplementfaktor 3 (C3) Ablagerungen in einem feinen granulären Muster beobachtet werden. Segmentale Fibrin-Ablagerungen waren ab Tag 2 nachweisbar, und nahmen bis zum Tag 7 weiter zu. In den Schnitten der Nieren der Kontrolltiere zeigten sich keine krankhaften Veränderungen oder Besonderheiten in der Färbung. Im Urin der Mäuse wurde zum Zeitpunkt der Tötung Albumin mit einem Elisa System für Maus (Exocell, Philadelphia, PE) und Kreatinin mit einem Hitachi Autoanalyzer untersucht und das Verhältnis von Protein zu Kreatinin im Urin (Up/Ucr) bestimmt. Dabei stieg der Quotient Up/Ucr bei den Tieren mit Nephritis ab Tag 2 NTX auf Werte, die weit über denen der Kontrolltiere lagen und nahm auch im weiteren Verlauf der Nephritis noch zu (siehe Tabelle III im Tabellenappendix) [148]. Nachdem die histologische Untersuchung der Glomeruli schon 1998 durch Erich Schadde durchgeführt worden war, wurde im Rahmen dieser Arbeit aus dem seitdem tiefgekühlten glomerulären Material mittels Säulentitration (siehe oben) mRNA isoliert und mit TaqMan PCR untersucht.

### **2.3.3 Humane Biopsien**

Wie schon unter 1.4 ausgeführt, besteht die einzige kurative Therapie bei congenitalem nephrotischen Syndrom finnischen Typs (CNF) in einer bilateralen Transplantation gesunder Nieren in den ersten Lebensjahren. Dabei werden die erkrankten Nieren explantiert. Professor Holthöfer (Universität Helsinki) stellte uns Glomeruli und Kortex von humanen CNF Nieren zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit RT-PCR und TaqMan Real Time PCR Kortexmaterial aus von der Krankheit betroffenen Nieren gegenüber gesunden Organen hinsichtlich einer veränderten ILK Expression untersucht. Bei den untersuchten gesunden Organen handelte es sich um Spenderorgane, die wegen Gefäßanomalien untransplantierbar waren. Die Gewebeproben aus den explantierten Nieren wurden lichtmikroskopisch auf glomerulosklerotische Veränderungen untersucht.

## 2.4 Materialliste

### 2.4.1 Chemikalien

Acrylamid	Bio Rad, München
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Heidelberg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreonin (DTT)	Pharmacia, Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer, Holland
Ether	Merck, Darmstadt
Fetal Calve Serum (FCS)	Bio Whittaker, Vervieures, Belgium
Glykogen	Boehringer Mannheim
Guanidinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Hexanukleotid-Mix	Boehringer Mannheim
Interferon $\gamma$	Sigma, Deisenhofen
Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kollagen Typ I	Biochrom, Berlin
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Microcarrier Gel-TR	Molecular Research Center Inc., USA
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt

---

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P-140	Sigma, Deisenhofen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	Serva, Heidelberg
Phenol (Tris gepuffert)	Biomol, Hamburg
Ponceau S	Roth
Protamin Sulfat	Sigma, Deisenhofen
Puromycin Aminoglykosid	Serva, Heidelberg
RPMI 1640 Medium	Life Technologies/ Gibco BRL, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfat	Bio Rad, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TRI Reagent	Molecular Research Center Inc., USA
Tris	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Gibco BRL, Karlsruhe
Vistra Green Färbelösung	Vistra

#### **2.4.2 Fotomaterialien**

Autoradiographie Filme	Kodak
Photoemulsion NTB2	Kodak

### 2.4.3 Enzyme und Reagenzien-Kits

Ampli-Taq Polymerase	PE Applied Biosystems
BioRad DC Protein Assay	BioRad, München
ECL System (enhanced chemoluminescence)	Amersham International, Braunschweig
Rnase freie Dnase	Promega, Mannheim
Rnasin (Ribonuklease Inhibitor)	Promega, Mannheim
Rneasy RNA Isolation Mini Kit	QUIAGEN, Hilden
SUPERSCRIPT Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Karlsruhe
TaqMan Master Mix	PE Applied Biosystems

### 2.4.4 Oligonukleotidprimer

#### *RT-PCR*

Alle Primer wurden von der Firma Life Technologies/ Gibco BRL, Karlsruhe erworben

<i>Sense Primer</i>	Sequenz	Länge	PCR- Produkt
mILK	5'-CTC ATC ACA CACT GGA TGC C-3'	20bp	330bp
mANC	5'-GCT GGA CTT TGC TAG GAC-3'	18bp	287bp
<i>Antisense Primer</i>			
mILK	5'-TCC ACA TGT CTG CTG AGC GT-3'	20bp	
mANC	5'-AAA GCA CCA CCC ATG CCT C-3'	19bp	

***TaqMan Real Time PCR***

Alle Primer für TaqMan Real Time PCR wurden von der Firma PE Biosystems, Weiterstadt erworben

<i>Sense Primer</i>	Sequenz	Länge
mILK	5'-ATG ACT GCC CGA ATT AGC ATG-3'	21bp
mGAPDH	5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3'	20bp
<i>Antisense Primer</i>		
mILK	5'-GCT ACC CAG GCA GGT GCA TA -3'	20bp
mGAPDH	5'-ATG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3'	21bp
<i>Sonde</i>		
mILK	5'-TTC TCT TTC CAA TGT CCT GGT CGC ATG-3'	27bp
mGAPDH	5'-CCC AAT GTG TCC GTC GTG GAT CTG A-3'	25bp

**2.4.5 Antikörper**

Name	Herkunft	Größe Zielprotein	Firma
ILK	Kaninchen	59kDa	Biomol, Hamburg
FAK	Maus	125kDa	Transduction Laboratories, BD Biosciences - Life Science Research, Heidelberg
β1Integrin	Maus	130kDa	
Paxillin	Maus	68kDa	
Gout anti rabbit peroxidase labeled IgG			Dianova, Hamburg
Rabbit anti mouse peroxidase labeled IgG			Promega, Madison, Wisconsin, USA

## 2.4.6 Molekulargewichtsstandards

### 1.DNA

DNA Längenstandard VIII

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

### 2.Proteine

Protein-Standardmischung VIII	42700 - 200000 daltons	Merck, Darmstadt
SDS-PAGE Standard, High Range	45000 - 200000 daltons	BioRad, München
SDS-PAGE Standard, Low Range	14400 - 97400 daltons	BioRad, München

## 2.4.7 Rezepte für Gele, Lösungen und Puffer

### RNA Isolation

*RT-Primer Ansatz (Rneasy RNA Isolation Mini Kit):*

0,25µg oligo(dt) 12-18 Primer

0,5µl RNase Inhibitor

10mM DTT

*Rneasy RT-Ansatz (Rneasy RNA Isolation Mini Kit):*

100U M-MLV RT Enzym

0,5mM dNTP-Mix

1xsingle strand Puffer

0,5% bovines Serumalbumin (BSA)

### PCR

*PCR Ladepuffer, 6-fach*

0,025 g Xylene

0,025 g Bromphenol Blau

7,0ml ddH<sub>2</sub>O

1,4ml 0,5 M EDTA

3,6ml Glyzerol

*Polyacrylamidgele*

0,6	ml	10x TBE-Puffer
1,02	ml	Acrylamid / Bis
4,32	ml	Millipore- Wasser
0,06	ml	10% APS
0,006	ml	Temed

*TBE Puffer, 10-fach*

540 g Trisbase  
 275 g Borsäure  
 200 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)  
 mit aqua bidest auf 5 Liter Gesamtvolumen auffüllen

***Western Blot****RIPA Puffer*

150 mM NaCl	aus 5M Stammlsg.	3 ml
1 % NP-40(Nonidet P-40)	aus 100 %	1 ml
0,5 % DOC (Natriumdesoxycholat)		0,5 g
0,1 % SDS (Biorad)	aus 20 % Stammlsg.	0,5 ml
50 mM Tris (pH 8,0)	aus 1M Stammlsg.	5 ml

mit aqua bidest auf 100 ml auffüllen

Proteaseinhibition:

+1 µg/ml Pepstatin	1 mg/ml in Methanol
+1 µg Leupeptin	10 mg/ml in Aqua bidest

*Zwei Phasen Western Blot Gel*

Proteingröße in kDa	12 bis 45	16 bis 70	60 bis 200
Acrylamidanteil	15%	10%	5%

Gel-Mix für 2 Gele, 1.Trenngel

	8 % Gel	10 % Gel	15 % Gel
Aqua bidest	9,3 ml	7,9 ml	4,6 ml
30 % Acrylamidmix	5,3 ml	6,7 ml	10 ml
1,5M Tris-HCL pH8,8	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
10 % (w/v) SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
10 % (w/v) APS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Temed	0,012ml	0,008 ml	0,008ml

Gel-Mix für 2 Gele, 2.Sammelgel

Aqua bidest	5,6 ml
30 % Acrylamidmix	1,7 ml
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml
10 % (w/v) APS	0,1 ml
Temed	0,01 ml

*SDS-PAGE Ladepuffer, 2-fach:*

1,25 M Tris-HCL, pH 6,8	2,5ml
Glycerol (87 %)	5,8ml
SDS	1 g
β-Mercaptoethanol	2,5ml
Bromphenolblau	5 mg
Aqua bidest	35 ml ,

*Elektrophoresepuffer, 5-fach:*

15 g Tris base  
 72 g Glycin  
 5 g SDS  
 in 1 Liter Aqua bidest lösen

*Diskontinuierliches Puffer-System*

	Volumen	Endkonzentration
Anodenpuffer I	150 ml von 1 M Tris pH 10,4 100 ml Methanol mit Millipore-Wasser ad 500 ml	0,3 M Tris pH 10,4 20 % Methanol
Anodenpuffer II	12,5 ml von 1M Tris pH 10,4 100 ml Methanol mit Millipore-Wasser ad 500 ml	25 mM Tris pH 10,4 20 % Methanol
Kathodenpuffer	12,5 ml von 1 M Tris pH 9,4 20 ml von 1 M 6-Aminohexansäure 100 ml Methanol mit Millipore-Wasser ad 500 ml	25 mM pH 9,4 40 mM 6-Aminohexansäure 20 % Methanol

*Rezept Coomassie-Färber*

1 g Coomassie Brilliant Blue R 250  
400 ml Methanol  
100 ml Eisessig  
500 ml Millipore-Wasser

*Coomassie-Entfärber*

300ml Methanol  
100ml Eisessig  
600ml Millipore-Wasser

*Rezept Ponceau S Färbelösung:*

5 g Ponceau S  
10 ml Eisessig  
990 ml Millipore-Wasser

## 2.4.8 Details zum Western Blot

### Anordnung von Filterpapieren, Gel und Membran

Oben: Anode

4 x Whatman: Anoden I Lsg

2 x Whatman: Anodenlsg II Lsg

Blotting-Membran.

Gel

6 x Whatman: Kathodenlsg

Unten: Kathode

### Transferbedingungen

BIORAD-Kammer: konstant 25 V, ca. 1 h

## 2.4.9 Geräte und Maschinen

Mikroskop	Leica DMR XE	Leica, Wetzlar
Storm Phosphor Imaging system		Molecular Dynamics, Krefeld
PCR-Cycler	PE9600	Perkin Elmer
	96 Temperature Cycler	Stratagene
TaqMan PCR Gerät	ABI-PRISM 7700	PE Applied Biosystems
Gelelektrophoresesystem	Mini Protean II	Bio Rad, München
Photometer	DU-62 Spectrophotometer	Beckman
Ultraschallgerät	Sonifier B-12	Branson, Connecticut
Zentrifugen		Bio Rad, München
		Sorvall, Bad Homburg

#### **2.4.10 Versuchstiere und Zellstämme**

GH-FSGS: Wachstumshormon transgene Mäuse von Prof. Wanke, Institut für Tierpathologie der Universität München

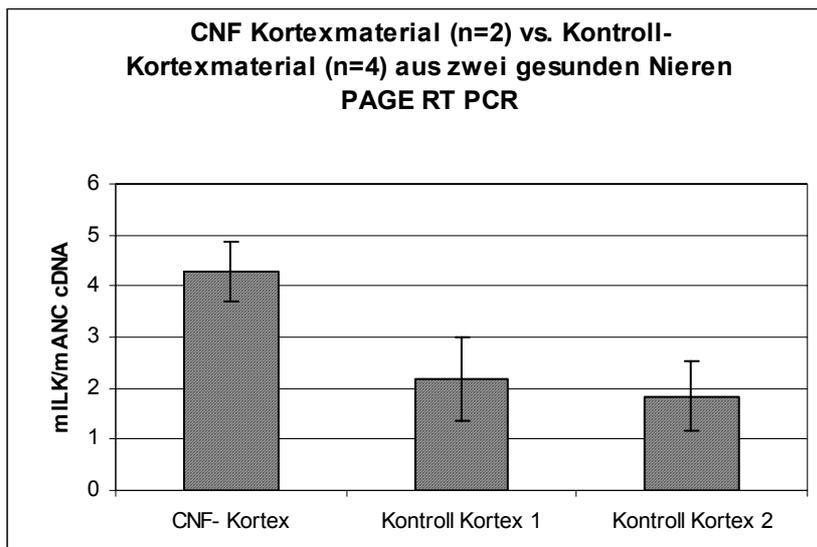
NTX: CD-1 Mäuse, Charles River Wiga GmbH, Malsch, Deutschland

PAN: tsSV40 transgene konditionell immortalisierte Podozyten von Peter Mundel, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 ILK mRNA ist in humanem CNF Nierenkortexmaterial erhöht

Hintergrund der Annahme, daß das Molekül ILK im Rahmen des glomerulären Schädigungsprozesses eine besondere Rolle spielt, war die Entdeckung der Tatsache, daß bei Untersuchung von mRNA aus CNF Glomeruli im Differentialdisplay gegenüber mRNA aus gesunden Glomeruli bei einem Molekül Expressionsunterschiede nachgewiesen wurden, das 92% Nukleotidbasenidentität zu dem Gen Integrin linked Kinase (ILK) hat [2]. Um eine differentielle Expression von ILK im Rahmen der Veränderungen bei CNF zu verifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit Kortexmaterial aus zwei CNF- Nieren mit jeweils zwei Kortexgewebeproben aus zwei gesunden Nieren mit PAGE RT-PCR und spezifischen ILK Primern verglichen. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte aus den Absorptionswerten für jeweils zwei Verdünnungen einer PCR verwendet, bei denen die PCR im linearen Amplifikationsbereich stattgefunden hat.



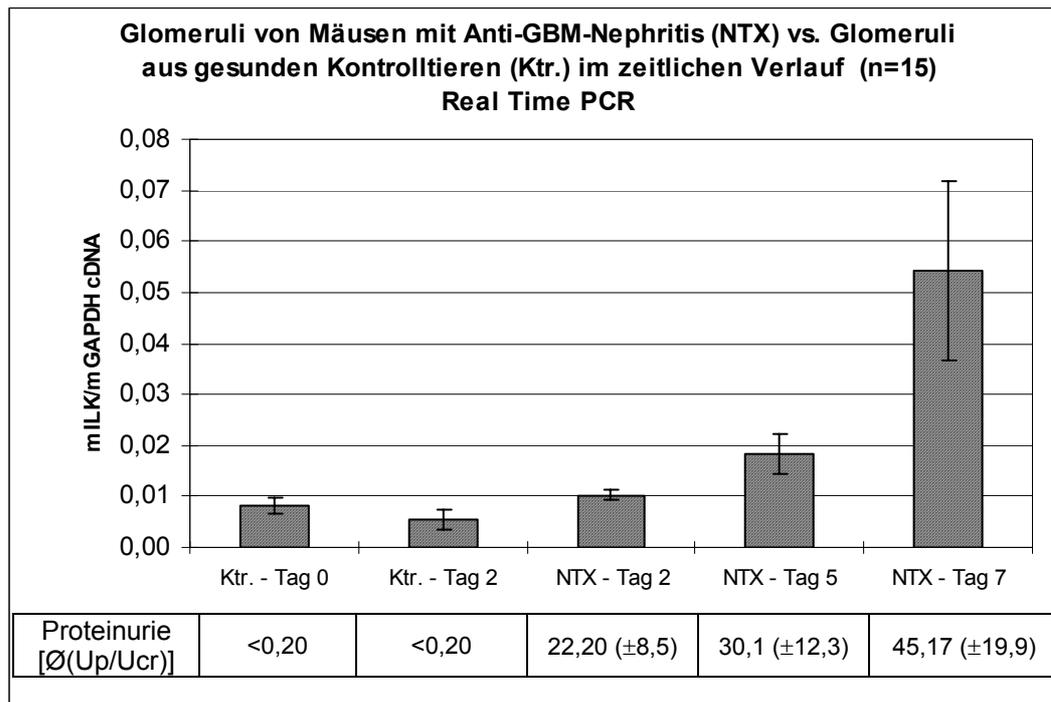
**Abb.11:** PAGE RT PCR mit mILK/mANC, Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.I

Bei der Untersuchung von Kortexmaterial mit RT-PCR zeigte sich ein mILK/mANC Quotient bei dem CNF Material von 4,29 ( $\pm 0,59$ ) gegenüber Werten von 2,18 ( $\pm 0,83$ ) und 1,84 ( $\pm 0,69$ ) bei den Kontrollen. Das entspricht einer durchschnittlichen Zunahme des mILK/mANC Quotienten um einen Faktor von 2,1 und stimmt mit vorausgegangenen DD-PCR Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein [2]. Ein erhöhtes ILK mRNA Expressionsniveau in Nierenkortexmaterial von CNF Patienten scheint ein reproduzierbares Phänomen zu sein.

## 3.2 ILK mRNA ist in murinen Proteinurie Modellen erhöht

### 3.2.1 Anti – GBM - Nephritis

Als experimentelles Modell der Proteinurie untersuchten wir zunächst das immunologisch – entzündliche Modell der Anti – GBM - Nephritis. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit TaqMan Real Time PCR glomeruläres Material von Mäusen untersucht, bei denen 1998 durch Erik Schadde in unserer Arbeitsgruppe eine Anti – GBM - Nephritis induziert worden war [148]. Das Material lagerte seit 1998 als Gewebe bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Kurz vor dem Experiment wurde aus den bis dahin gelagerten Glomeruli RNA isoliert und revers zu cDNA transkribiert. Die TaqMan Technologie steht in unserer Arbeitsgruppe seit 2000 zur Verfügung, sodaß erst jetzt eine cDNA Analyse mit dieser Technik durchgeführt werden konnte. Es wurden die Glomeruli von insgesamt 15 verschiedenen Mäusen untersucht. Dabei verteilen sich jeweils drei Versuchstiere auf jede der fünf verschiedenen Experimentalgruppen. Bei den Experimentalgruppen wurden zwei Kontrollgruppen an den Tagen 0 und 2 nach Beginn des Experiments mit Anti – GBM - Nephritis Mäusen der Zeitpunkte 2, 5 und 7 Tage verglichen. Der mit TaqMan PCR gemessene Quotient aus mILK zu mGAPDH Ausgangs cDNA betrug bei den Kontrollen an Tag 0:  $0,008 \pm 0,002$ , und an Tag 2:  $0,005 \pm 0,002$ . Bei den Tieren mit Nephritis waren die Werte für mILK/mGAPDH cDNA an Tag 2:  $0,010 \pm 0,001$ , an Tag 5:  $0,018 \pm 0,004$  und an Tag 7  $0,054 \pm 0,018$ . Das entspricht einer durchschnittlichen Zunahme des mILK/mGAPDH Quotienten um einen Faktor von 2,8 am fünften Tag der Anti – GBM - Nephritis und um einen Faktor von 8,3 am siebten Tag gegenüber den durchschnittlichen Werten der Kontrolltiere. Die mILK/mGAPDH cDNA Quotienten korrelieren in ihrem Verlauf mit den von E. Schadde gemessenen Proteinuriewerten dieser Mäuse [148]. Mit vermehrter Proteinurie nimmt auch der Wert des mILK/mGAPDH cDNA Quotienten zu. Die fortschreitende Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere bei muriner Anti – GBM – Nephritis scheint mit einem erhöhten ILK mRNA Expressionsniveau in glomerulärem Material assoziiert zu sein.



**Abb.12:** Diagramm der TaqMan mILK/mGAPDH Werte in Zusammenhang mit dem zeitlichen Verlauf der Serum Nephritis und den von E. Schadde [148] gemessenen Protein konzentrationen im Urin im Verhältnis zu den Kreatininkonzentrationen im Urin (Up/Ucr).

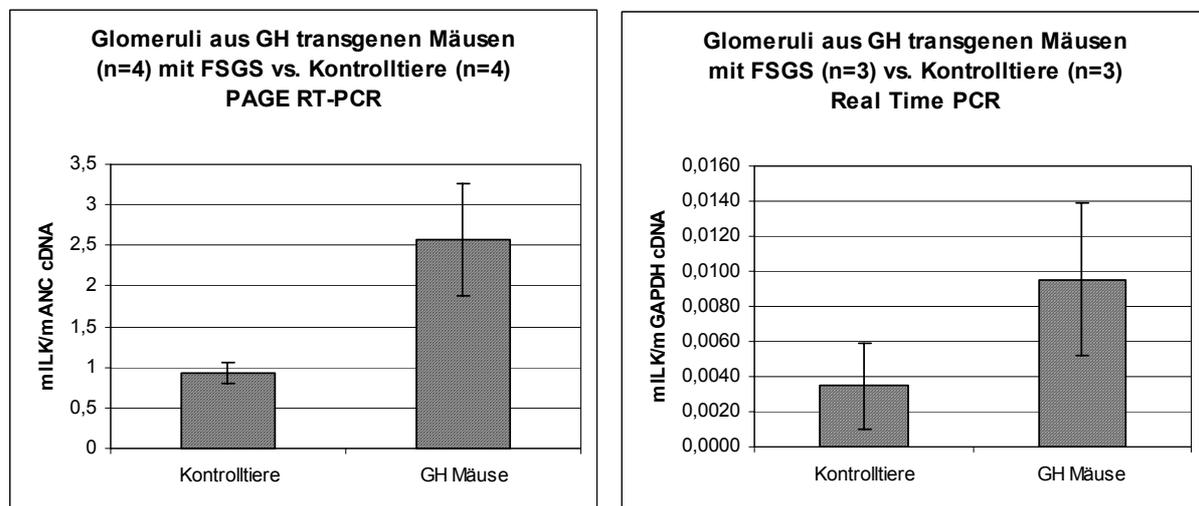
Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.II u. III

Der Quotient mILK/mGAPDH nimmt durchschnittlich um einen Faktor von 2,8 am fünften Tag der NTX und um einen Faktor von 8,3 am siebten Tag gegenüber den Werten der Kontrolltiere zu. Mit vermehrter Proteinurie nimmt auch die ILK mRNA Expression zu.

### 3.2.2 FSGS bei GH transgenen Mäusen - Vergleich der Ergebnisse aus PAGE RT-PCR und TaqMan Real Time PCR

Als Modell einer nicht immunologisch, nicht entzündlichen Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere wählten wir das Modell der FSGS bei GH transgenen Mäusen. Es wurden Glomeruli mit PAGE RT-PCR untersucht, die von 90 Tage alten Mäusen mit massiver Proteinurie (13mg/dl) stammten. Bei den mit PAGE RT-PCR ermittelten mILK/mANC Quotienten ergab sich bei den GH transgenen Mäusen ein Mittelwert von 2,57 ( $\pm 0,70$ ) gegenüber 0,92 ( $\pm 0,12$ ) bei den Kontrolltieren. Das entspricht einer durchschnittlichen Zunahme des mILK/mANC Quotienten um einen Faktor von 2,8. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte aus den Absorptionwerten für jeweils zwei Verdünnungen einer PCR verrechnet, bei denen die PCR im linearen Amplifikationsbereich stattgefunden hat.

In der Untersuchung desselben Materials mit TaqMan Real Time PCR zwei Jahre später wurde das Verhältnis von mILK zum housekeeper mGAPDH ermittelt. Es ergab sich bei den GH transgenen Mäusen ein Mittelwert von 0,0095 ( $\pm 0,0043$ ) gegenüber 0,0035 ( $\pm 0,0024$ ) bei den Kontrolltieren. Das entspricht einer durchschnittlichen Zunahme des mILK/mANC Quotienten um einen Faktor von 2,7.



**Abb.13:** links: PAGE RT-PCR mit mILK/mANC, Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.IV, rechts: TaqMan Real Time PCR mit mILK/mGAPDH, Rohdaten s. Tabellenappendix Tab.V, Mit beiden Methoden und unterschiedlichen housekeeper Enzymen zeigt sich bei Untersuchung desselben Materials eine um den Faktor 2,8 (PAGE RT-PCR) bzw. Faktor 2,7 (Real Time PCR) gesteigerte ILK mRNA Expression.

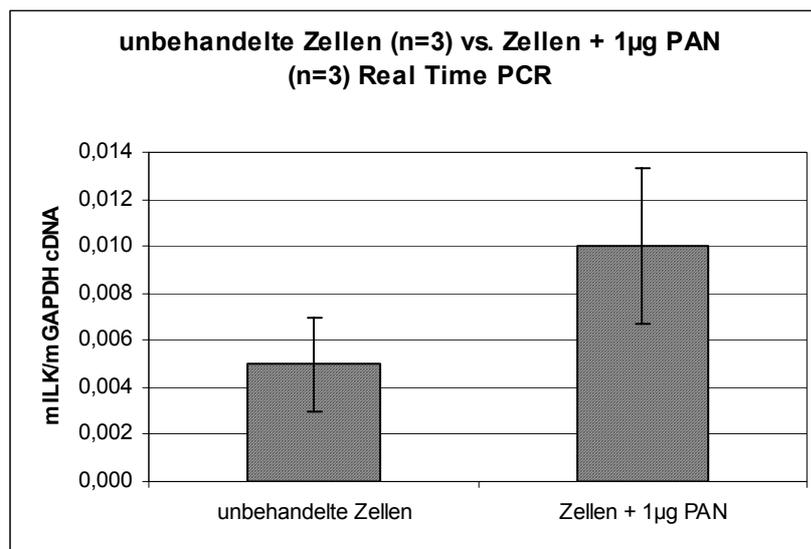
Bei GH transgenen Mäusen mit chronischer progressiver fokaler Glomerulosklerose zeigte sich im proteinurischen Stadium eine deutlich vermehrte Expression (Faktor 2,8 bzw. 2,7) von ILK auf mRNA Ebene. Mit PAGE RT-PCR wurde ein Wert von 2,8 ermittelt, der zwei Jahre später mit TaqMan Real Time PCR bestätigt werden konnte, hier wurde beim selben Untersuchungsmaterial ein Wert von 2,7 ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die glomeruläre Schädigung im Rahmen von FSGS bei GH transgenen Mäusen mit einem erhöhten ILK mRNA Expressionsniveau einhergeht. Die Tatsache, daß die Untersuchungen mit PAGE RT PCR und TaqMan Real Time PCR sehr ähnliche Ergebnisse liefern, belegt die Vergleichbarkeit von Ergebnissen beider Methoden. Der Vorteil der Real Time PCR liegt in der besseren Anwendbarkeit bei sehr kleinen Mengen an Untersuchungsmaterial und in der hier vorhandenen Kontrolle des PCR Verlaufes auf Linearität.

### 3.3 ILK mRNA und Proteine sind bei Schädigung kultivierter Podozyten mit Puromycin Aminoglykosid (PA) erhöht

Bei dem *in vivo* Modell der Puromycin Aminoglykosid Nephrose (PAN) bei Ratten kommt es zu einer ausgeprägten Schädigung der Podozyten [140]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als *in vitro* Modell der Podozytenschädigung kultivierte Podozyten mit Puromycin Aminoglykosid (PA) versetzt.

Sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (siehe Kap. 3.4) konnten vermehrte ILK Mengen in den behandelten Zellen gegenüber dem Kontrollmaterial nachgewiesen werden.

Mit TaqMan Real Time RT-PCR wurden bei den mit 1 µg/ml PA behandelten Zellen mILK/mGAPDH Quotienten mit einem Mittelwert von 0,010 ( $\pm 0,003$ ) gegenüber 0,005 ( $\pm 0,002$ ) bei den Kontrollen ermittelt. Das entspricht einer durchschnittlichen Zunahme des mILK/mANC Quotienten um einen Faktor von 2,0. Die toxische Wirkung von PA an kultivierten Podozyten ist demnach mit einem erhöhten ILK mRNA Spiegel verbunden.

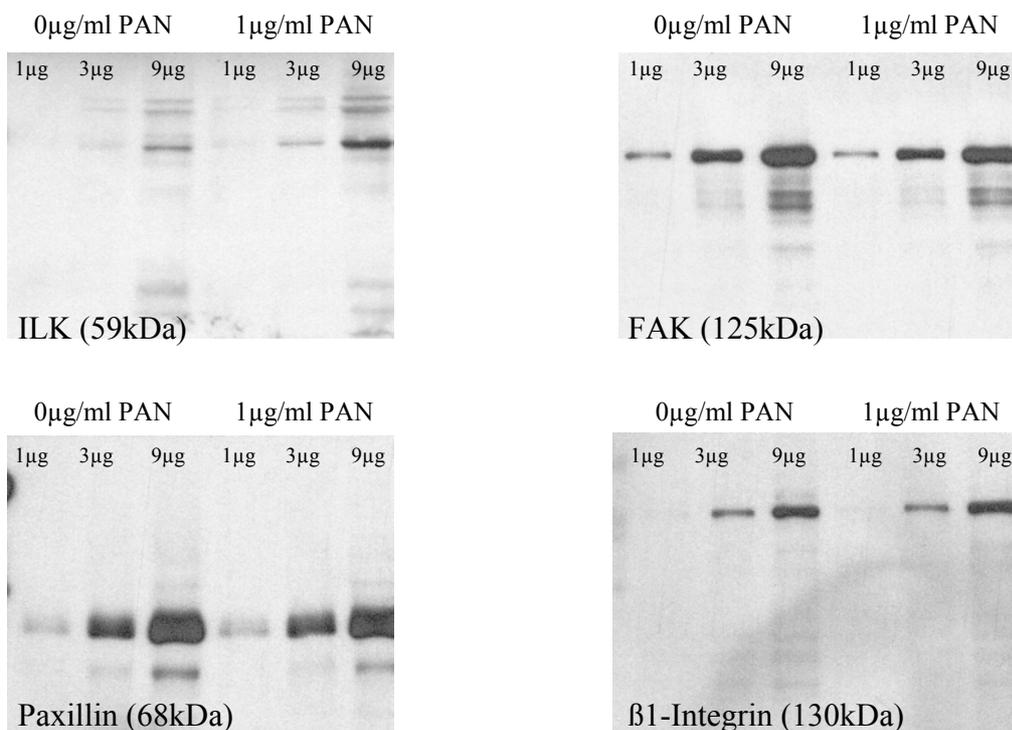


**Abb.14:** TaqMan Real Time PCR mit mILK/mGAPDH, Rohdaten s. Tabellenappendix Tab.VI

Bei mit 1µg Puromycin Aminoglykosid/ ml Lösung behandelten kultivierten Podozyten zeigte sich gegenüber unbehandelten Zellen eine um einen Faktor 2,0 vermehrte ILK mRNA Expression.

### 3.4 Nachweis erhöhter ILK Proteinmengen bei gleichem FAK, Paxillin und $\beta$ 1-Integrin Anteil

Um eine Vermehrung ganzer Integrinkomplexe inklusive aller Focal Adhesion Complex Bestandteile von einer isolierten ILK Vermehrung zu differenzieren, wurden Western Blots durchgeführt, bei denen Proteinlysate mit ILK,  $\beta$ 1-Integrin, FAK und Paxillin Antikörpern gleichzeitig untersucht wurden. Das PAN- Modell auf zellulärer Ebene hat sich für diese umfangreiche Untersuchung angeboten, da hier Proteinlysat in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Es zeigte sich eine Verstärkung der ILK Banden bei 1  $\mu$ g/ml PAN (siehe Abb.15). Die Banden für FAK, Paxillin und  $\beta$ 1-Integrin erscheinen dagegen kaum verändert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die vermehrte Expression von ILK bei zellulärer Schädigung von kultivierten Podozyten durch Puromycin wahrscheinlich ein ILK spezifisches Phänomen darstellt.



**Abb.15:** Western Blots mit ILK, FAK, Paxillin und  $\beta$ 1-Integrin Antikörpern.

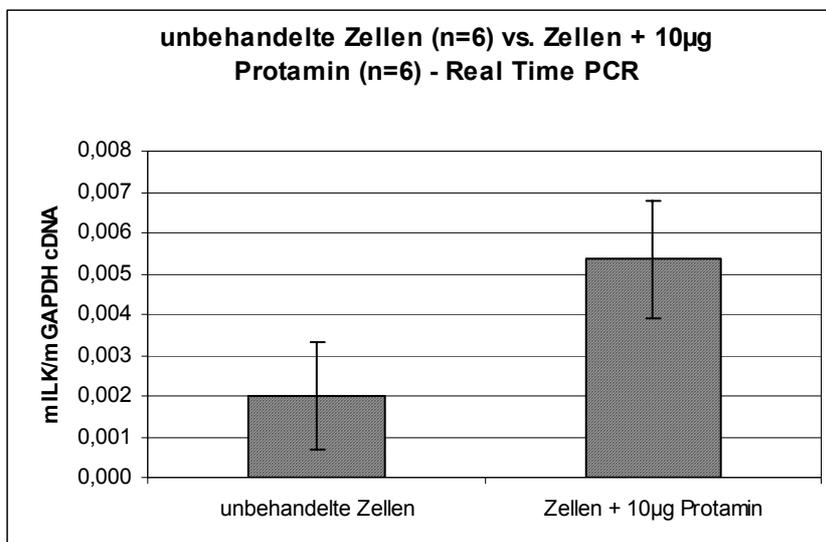
Untersucht wurde Podozyten-Proteinlysat aus Zellkulturen, die mit 0 und 1  $\mu$ g/ml Puromycin versetzt wurden. Proteinlysat aus jeder Experimentalgruppe wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (entsprechend 1  $\mu$ g, 3  $\mu$ g, 9  $\mu$ g Proteingehalt) in jede Spur geladen.

Es zeigt sich eine deutliche Vermehrung der ILK Konzentration bei Zellen, die mit 1  $\mu$ g/ml PA behandelt wurden, gegenüber unbehandelten Zellen. Bei den FAC Komponenten FAK, Paxillin und  $\beta$ 1-Integrin zeigen sich keine Veränderungen.

### 3.5 ILK mRNA ist bei Schädigung kultivierter Podozyten mit Protaminsulfat erhöht

Durch Injektionen von Protaminsulfat kann bei Ratten Proteinurie induziert werden, histologisch ist eine dosisabhängige Schädigung der Podozyten nachweisbar [142, 143]. Analog zum *in vivo* Modell wurden im Rahmen dieser Arbeit kultivierte Podozyten mit Protaminsulfat versetzt. Diese Experimente wurden zusätzlich zu den in Kapitel 3.3 und 3.4 erwähnten PAN Experimenten durchgeführt, um einen Zusammenhang von zellulärer Podozytenschädigung und erhöhter ILK Expression unabhängig vom schädigenden Agens feststellen zu können.

Mit TaqMan Real Time PCR wurde die Expression von ILK auf mRNA Ebene untersucht. Es ergab sich bei den mit 10 $\mu$ g Protamin pro ml Lösung behandelten Podozyten ein durchschnittlicher mILK/mGAPDH Quotient von 0,005 ( $\pm$ 0,001) gegenüber 0,002 ( $\pm$ 0,001) bei den Kontrollen. Das entspricht einer durchschnittlichen Zunahme des mILK/mGAPDH Quotienten um einen Faktor von 2,5 der mit Protamin behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen. Diese Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen der Schädigung von kultivierten Podozyten mit Protaminsulfat und einem erhöhten ILK mRNA Expressionsniveau.



**Abb.16:** TaqMan Real Time PCR mit mILK/mGAPDH, Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.VII

Die mit 10 $\mu$ g Protamin pro ml Lösung behandelten kultivierten Podozyten zeigten gegenüber unbehandelten Zellen eine um einen Faktor 2,5 gesteigerte ILK mRNA Expression.

## **4. Diskussion**

Die Entdeckung von podozytenspezifischen Molekülen, die molekularbiologische Untersuchung von hereditären Nephrosen und die Identifikation von zugrundeliegenden Mechanismen auf genetischer Ebene haben in den letzten Jahren zu einem immer besseren Verständnis der Pathophysiologie der progredienten glomerulären Schädigung geführt. Zu dieser Wissensentwicklung haben *in vitro* Methoden wie die Analyse von Genexpressionsmustern in Glomeruli und Podozyten, und die Etablierung einer konditionell immortalisierten glomerulären Epithelzelllinie wesentlich beigetragen [150]. Inzwischen sind verschiedene Moleküle bekannt, die am glomerulären Schädigungsprozess beteiligt sind. Über den Nachweis der Beteiligung bestimmter Moleküle kann man auf mögliche molekulare Steuerungsmechanismen schließen. Durch die Untersuchung von Expressionsveränderungen ist es möglich, bei genetischen Defekten charakteristische, nachgeschaltete mRNA-Veränderungen zu erkennen. Damit kann man über die Ergebnisse positioneller Klonierung hinaus auf weitere beteiligte molekulare Mechanismen schließen. Ein Beispiel hierfür ist der in unserer Arbeitsgruppe erfolgte Nachweis von Expressionsveränderungen auf mRNA Ebene in Glomeruli von Kindern mit CNF mittels Differential Display PCR.

### **4.1 ILK Aktivierung im Prozess der glomerulären Schädigung**

Wie schon unter 1.4 erwähnt, wurden bei der Untersuchung von Glomeruli von Kindern mit CNF verschiedene cDNA Segmente mit Expressionsveränderungen isoliert. Eines dieser cDNA Fragmente zeigte eine 92% Übereinstimmung der Nukleotidbasenfolge mit dem Signaltransduktionsmolekül Integrin-linked Kinase (ILK), das an Zell-Matrix Kontakten beteiligt ist [2]. Die weitere Untersuchung dieses Moleküls erschien aus folgenden Gründen vielversprechend: Ultrastrukturelle Analysen der Podozytenschädigung ließen darauf schließen, daß Zell-Matrix Interaktionen der Podozyten mit der Basalmembran eine wichtige pathogenetische Rolle im Prozess der glomerulären Schädigung spielen könnten [193], über die molekulare Regulation der komplexen Fußfortsatz-Interdigitationen durch Zell-Matrix Interaktion war jedoch erst wenig bekannt [151]. Der Nachweis einer Induktion von ILK bei CNF erschien uns als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieser Kinase an der Regulation von Prozessen auf zellulärer Ebene im Glomerulus.

Für eine korrekte Funktion der glomerulären Filtrationseinheit im Glomerulus ist eine komplexe Interaktion der beteiligten strukturellen Einheiten notwendig [68, 152]. Im Folgenden

soll auf die Interaktion von Podozyten mit der glomerulären Basalmembran und den Elementen der extrazellulären Matrix über transmembranäre Adhäsionsrezeptoren eingegangen werden. In diesem Zusammenhang soll auch die spezielle Bedeutung der Integrin Linked Kinase für intrazelluläre Regulationskaskaden der Podozyten, die für die mechanische Ankopplung und Zell-Matrix Signalübertragung verantwortlich sind, erläutert werden.

#### **4.1.1 Interaktion von Podozyten und GBM**

Neben statischen Aufgaben sind Podozyten im adulten Glomerulus wichtig für die Aufrechterhaltung der komplexen physiologischen Zusammensetzung der GBM aus Matrixmolekülen wie Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Entactin, Agrin und Perlecan. Podozyten synthetisieren besagte Komponenten und stellen auch die korrespondierenden proteolytischen Enzyme zur Verfügung [153]. Martin und McMillan beschrieben eine gesteigerte Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-9 bei Podozytenschädigung *in vivo* und *in vitro* [154, 155]. Podozyten sind damit in der Lage, die Komposition der GBM sowohl durch Synthese als auch durch Proteolyse zu steuern. Schädigungen der GBM führen zu Proteinurie. Genetische Defekte von GBM Bestandteilen wie das nephrotische Syndrom der Laminin- $\beta_2$  defizienten Maus [156] und die Mutation des Kollagen IV bei der hereditären Nephritis des Alportsyndroms des Menschen [157] zeigen die Bedeutung der GBM für die Funktion des glomerulären Filters.

#### **4.1.2 Interaktion von Podozyten mit der extrazellulären Matrix und die Bedeutung der Integrinfunktion**

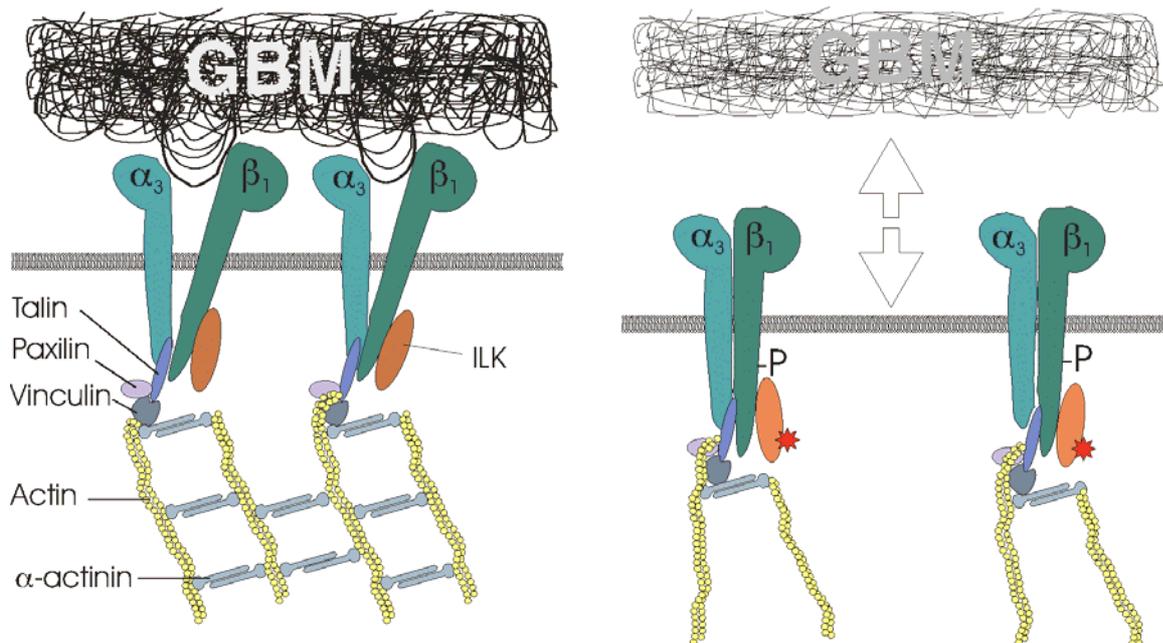
Podozyten interagieren mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix hauptsächlich über  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine [68, 158]. Über sie werden Zell-Matrix Interaktionen vermittelt. Jeder Integrin-typ hat hierbei spezifische Bindungscharakteristika.  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine binden vornehmlich die glomerulären Basalmembranbestandteile Fibronectin, Laminin und Kollagen IV [159, 160]. Eine Bindung der passenden Liganden führt zu einer Aggregation der Integrine an bestimmten Kontaktpunkten und zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, welches die mechanischen Belastungen durch die Verbindung zur ECM tragen muß. Die intrazelluläre Signalübertragung wird durch Kinasen vermittelt, die an diese fokalen Adhäsionspunkte assoziiert sind. Experimentelle Daten verschiedener Arbeitsgruppen zeigen die Bedeutung der Integrine für eine physiologische glomeruläre Filtrationsfunktion. Mäuse mit einer Defizienz für das wichtigste Podozytenintegrin  $\alpha_3\beta_1$  [161, 162] zeigen eine gestörte Ontogenese der Podozy-

ten. Die Podozyten dieser Mäuse haben verbreiterte, plumpe Fußfortsätze und sind nicht in der Lage ihre Funktion im glomerulären Filter zu erfüllen. Es entwickelt sich ein nephrotisches Syndrom [151]. Die Ergebnisse von Baraldi, Kerjaschki und Rodewald legen nahe, daß die  $\alpha_3\beta_1$  Integrine auch bei podozytärer Schädigung eine zentrale Rolle spielen [64, 163, 164]. Bei Experimenten mit nephritogenen Antikörpern zeigte sich eine Inhibition der Podozytenadhärenz *in vivo* und *in vitro* und zusätzlich eine direkte Bindung an podozytäre  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine. Die Antikörperbindung an die  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine war mit einer erhöhten Albuminpermeabilität assoziiert [68, 161, 165]. Für eine Veränderung der Menge an glomerulären  $\beta_1$ -Integrinen beim nephrotischen Syndrom gibt es keine Hinweise [166-170]. Es scheint daher die Integrinfunktion beeinträchtigt zu sein. Integrine sind nicht nur für die mechanische Verankerung von Zellen in der extrazellulären Matrix verantwortlich, sondern dienen zusätzlich als Matrixrezeptoren dem Informationsaustausch [171]. Hierbei wird beim „outside-in signaling“ Information von der Matrix in die Zelle vermittelt [96, 172] und beim „inside-out signaling“ wird ausgehend von intrazellulären Signalen die Bindungsaffinität der Integrine zur Matrix moduliert [99]. Die an dieser Informationsübertragung beteiligten molekularen Strukturen und Mechanismen sind gegenstand intensiver Forschung. Gerade bei Podozyten ist über diese Prozesse erst wenig bekannt [160]. Kobayashi zeigte, daß bei Podozytenschädigung Phosphorproteine des Focal Adhesion Komplexes eine erhöhte Phosphorylierung aufweisen [173]. Ein wichtiges Element der integrinvermittelten Signaltransduktion in anderen Zellsystemen, die Focal Adhesion Kinase (FAK), zeigte in diesem Zusammenhang keine einheitliche Regulation [166, 174, 175].

#### **4.1.3 Podozytenschädigung ist *in vivo* und *in vitro* mit ILK Induktion assoziiert**

Nachdem wir in Kortexmaterial und in Glomeruli von CNF Patienten erhöhte ILK-mRNA Spiegel beobachtet hatten (siehe Ergebnisse 3.1), untersuchten wir die ILK Expression in anderen Situationen glomerulärer Schädigung. Wir führten Expressionsanalysen in glomerulärem Material von Mäusen mit nephrotoxischer Serumnephritis und von GH-transgenen Mäusen mit chronisch-progredienter Glomerulosklerose (siehe Ergebnisse 3.2) durch [2]. In beiden Experimentalgruppen zeigte sich in Verbindung mit der glomerulären Schädigung eine ILK Expressionsinduktion. CNF und die glomerulären Krankheitsmodelle der Maus haben zwar unterschiedliche Pathogenesen, aber eine gemeinsame Endstrecke in der progredienten Podozytenläsion. Es lag die Hypothese nahe, daß die ILK Induktion mit den Podozytenschäden assoziiert sein könnte. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit Einzel-Zell RT-PCR ILK

mRNA aus einzelnen Podozyten von nephrotischen und intakten Glomeruli quantifiziert. Mit dieser Untersuchung konnte die im glomerulären Material gemessene ILK mRNA Vermehrung den Podozyten zugeordnet werden, die etwa 1/3 der Zellen im Glomerulus stellen [2]. Zur weiteren Analyse der ILK Funktion wurden konditionell immortalisierte Podozyten verwendet. Mit Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte ILK in den Fokalkontakten der Podozyten lokalisiert werden. *In vitro* Schädigung mit Puromycin und Protaminsulfat führte zu einer Steigerung der ILK mRNA und der Proteinmenge (siehe Ergebnisse 3.3 und 3.4). Darüberhinaus konnte in unserer Arbeitsgruppe mit *in vitro* Kinase-Assay gezeigt werden, daß bei der Schädigung von Podozyten mit Puromycin Aminonukleosid auch die ILK Kinase Aktivität gesteigert ist [2]. Diese Befunde weisen auf ein ILK vermitteltes „inside-out signaling“ in Podozyten hin. Im Rahmen der „outside-in“ Signaltransduktion konnte in unserer Arbeitsgruppe eine matrixabhängige Repression der ILK Kinaseaktivität in kultivierten Podozyten nachgewiesen werden [2]. Eine weitere Bestätigung für ILK abhängiges „inside-out signaling“ sind die Ergebnisse von Experimenten, die in unserer Arbeitsgruppe mit Podozytenzelllinien durchgeführt wurden, die aktive ILK oder ILK mit mutierter Kinasedomäne stabil überexprimierten. ILK Überexpression führte hierbei zu reduzierter Matrixadhäsion [2]. Die transfizierten Zellen zeigten eine ausgeprägte Phänotypveränderung die mit Rearrangement des Aktin-Zytoskeletts,  $\alpha$ -Aktinin Relokalisation und P-Cadherin Repression einherging [3]. Die Arbeitsgruppe von Wu konnte zeigen, daß der Phänotyp von Rattenepithelzellen über den Wnt-Signalfad reguliert wird [97]. Zu diesen Ergebnissen passend, konnte in unserer Arbeitsgruppe eine nukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin und Induktion des Transkriptionsfaktor LEF-1 in Podozyten nachgewiesen werden. Diese Mechanismen könnten mit einer Repression des Schlitzmembran-Moleküls P-Cadherin zusammenhängen [3]. Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung der ILK abhängigen Interaktion von Podozyten und der Glomerulären Basalmembran über Integrine [2].



**Abb.17:** Linkes Schema: Intakte Filtrationsbarriere: Integrin-cluster mit hoher Bindungsaffinität sichern Verbindung zwischen Zytoskelett und GBM. ILK ist im niedrigen Aktivitätszustand. Rechtes Schema: Geschädigte Filtrationsbarriere: Aktivierung der ILK, Integrine weisen niedrige Bindungsaffinität zur GBM auf, Disruption des Aktinzytoskeletts. (Kretzler 2001[2])

Die in Abb. 17 dargestellten Vorgänge können auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden:

1. Outside-in signaling:

GBM-Schädigung

→Veränderung der Integrin-Bindung

→Aktivierung der ILK

→Veränderungen des Zytoskeletts

2. Inside-out signaling:

Podozyten-Schädigung

→Aktivierung der ILK

→Veränderung der Integrin-Bindung

→Ablösung von der GBM

#### 4.1.4 Mögliche Wechselwirkungen von ILK mit vererbten nephrotischen Syndromen zugrundeliegenden Genen

Im selben Zeitraum, in dem in unserer Arbeitsgruppe die beschriebenen Genexpressionsstudien durchgeführt wurden, wurden erste Daten bezüglich der für drei hereditäre Nephrosen verantwortlichen Gene publiziert. Die Proteine, die den für diese drei Nephrosen verantwortlichen Genen zugeordnet werden können, sind in der Niere hauptsächlich in den Podozyten lokalisiert. Der Nachweis eines Zusammenhangs von Mutationen dieser Gene und der Entwicklung eines Nephrotischen Syndroms, ist ein auf human-genetischen Daten beruhender weiterer Hinweis auf die besondere Rolle der Podozyten bei der Proteinurie-Entstehung. Einer Bedeutung dieser Gene für erworbene, nicht ererbte Nephrosen wird in verschiedenen Forschungsgruppen intensiv nachgegangen.

##### *1. Kongenitales nephrotisches Syndrom (CNF) des finnischen Typs*

In der Arbeitsgruppe von Kestilä konnte 1998 gezeigt werden, daß ein Defekt im Gen NPHS1 mit dem Kongenitalen Nephrotischen Syndrom des finnischen Typs assoziiert ist [120]. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte das Genprodukt von NPHS1, Nephrin, in der Podozyten-Schlitzmembran lokalisiert werden [120, 126, 176]. CNF wird durch Mutation oder Deletion von Nephrin induziert. Bei Mäusen führt die Deletion von Nephrin mittels homologer Rekombination zu einer schweren Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsfähigkeit [177]. Die Funktionen von Nephrin und ILK könnten über eine ILK-abhängige Repression des Schlitzmembran-Moleküls P-Cadherin in Podozyten miteinander verbunden sein [151, 178]. In unserer Arbeitsgruppe wurden die Auswirkungen einer P-Cadherin Repression auf Nephrin noch nicht untersucht, da die uns zur Verfügung stehenden *in vitro* Systeme keine Nephrinexpression aufweisen. Eine vermehrte Expression von ILK führt zu deutlichen Veränderungen der Zytoskelettarchitektur [2]. Nephrin ist in Podozyten über das Adaptorprotein CD2ap mit dem Zytoskelett verbunden [179]. Auch in diesem Zusammenhang ist denkbar, daß Funktionsbeeinträchtigungen von Nephrin über den Zytoskelettkontakt zu ILK die Konfiguration der Schlitzmembran beeinflussen.

## **2. Autosomal-dominante fokal-segmentale Glomerulosklerose**

Fokale und segmentale Glomerulosklerose (FSGS) ist eine häufige und nicht krankheitsspezifische pathologische Veränderung der Niere. Eine FSGS kann sich als Folge verschiedener Systemerkrankungen wie z.B. HIV, krankhaftem Übergewicht und Diabetes entwickeln. FSGS tritt aber auch als isolierte, idiopathische Erkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang auf. Am Ende des Krankheitsverlaufs steht häufig ein chronisches Nierenversagen, das mit Dialyse oder Nierentransplantation behandelt werden muß. In der Arbeitsgruppe von Kaplan konnte 2000 in drei Familien mit hereditärer autosomal dominanter Fokal-segmentaler Glomerulosklerose eine Assoziation der Krankheit mit Mutationen des Gens  $\alpha$ -Actinin-4 nachgewiesen werden. Das Genprodukt von  $\alpha$ -Actinin-4 dient als zytoskeletales Adaptormolekül [180]. Der nephrotische Phänotyp wird durch einzelne Punktmutationen von Serin und Threonin induziert. Deletionen sind für  $\alpha$ -Actinin-4 nicht beschrieben. In unserer Arbeitsgruppe konnte eine Verbindung von ILK Überexpression mit  $\alpha$ -Actinin-4 Repression gezeigt werden. In *in vitro* Experimenten zeigte sich abhängig von der Aktivität der ILK eine Umverteilung des Moleküls  $\alpha$ -Actinin-4 von einem Aktin-assoziierten zu einem Adhäsionspunkt betonten Verteilungsmuster [2]. Ergebnisse von Experimenten mit Ko-Immunpräzipitationen von ILK und  $\alpha$ -Actinin zeigen eine Interaktion von ILK und  $\alpha$ -Actinin-4 (unveröffentlichte Ergebnisse von Matthias Kretzler). Als möglicher Mechanismus wäre eine ILK-abhängige Serin- und Threonin-Phosphorylierung von  $\alpha$ -Actinin-4 denkbar.

## **3. Autosomal-rezessive fokal-segmentale Glomerulosklerose**

Die autosomal-rezessiv vererbte fokal-segmentale Glomerulosklerose beginnt in früher Kindheit mit starker Proteinurie und ist durch schnelle Krankheitsprogression und Steroidresistenz gekennzeichnet. Die Arbeitsgruppe von Boute veröffentlichte 2000 zehn verschiedene Mutationen des Gens NPHS2, die für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich sind. NPHS2 kodiert für Podocin, ein bisher unbekanntes Molekül aus der Stomatinfamilie mit einer putativen Aktin-Adaptorfunktion [181]. Podocin wird in Podozyten exprimiert, intrazellulär ist es im Bereich der Schlitzmembraninsertionen lokalisiert. Schwarz et al. konnten 2001 eine Interaktion von Podocin mit dem Nephrin Adaptorprotein CD2ap und mit Nephrin selbst zeigen. Es wird vermutet, daß Podocin eine Rolle im Rahmen der strukturellen Organisation der Schlitzmembran und der Regulation ihrer Filtrationsfunktion spielt [182].

## 4.2 Schlußfolgerungen und Ausblicke

Eine Aktivierung von ILK scheint ein allgemeines Phänomen bei Podozytenschädigung unabhängig vom initialen Schädigungsmechanismus zu sein. Darauf weisen die in dieser Arbeit gezeigten *in vitro* und *in vivo* Induktionen von ILK hin (siehe Ergebnisse 3.1, 3.2, 3.3 und 3.5). Die Relevanz der Expressionsveränderung von ILK wird dadurch unterstrichen, daß andere Signalkaskadenbestandteile wie FAK, Paxillin und  $\beta$ 1-Integrin keine einheitliche Regulation im Rahmen von Podozytenschädigung zeigen (siehe Ergebnisse 3.4).

In diesem Sinne könnte die ILK-Aktivierung ein wichtiger Regulator der progredienten Veränderungen beim Versagen der Filtrationsbarriere sein und ein molekulares Korrelat der strukturell uniformen Podozytenschädigung darstellen. Damit hätte ILK bei der Progression der Glomerulosklerose eine Schlüsselrolle inne. Es gibt pharmakologisch herstellbare Antagonisten, die spezifisch auf bestimmte Kinasen wirken. Auch für ILK stehen verschiedene hemmende Substanzen zur Verfügung [183]. In unserer Arbeitsgruppe werden derzeit verschiedene spezifische ILK Inhibitoren in *in vitro* Podozytenschädigungsmodellen evaluiert und in den murinen Proteinuriemodellen getestet. Die pharmakologische Hemmung von ILK zur Verhinderung chronischer Schädigung des Glomerulus, ist ein neuer Therapieansatz, der auf histopathologischen Untersuchungen, der Identifizierung des hauptbetroffenen glomerulären Zelltyps bei Proteinurie [26, 184] und, wie in dieser Arbeit dargestellt, auf Genexpressions-Screenings mit nachfolgender molekularer Analyse beruht. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten legen in Verbindung mit anderen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und dem gegenwärtigen Stand der Forschung auf diesem Gebiet nahe, daß ein spezifisch auf ILK wirkendes Medikament möglicherweise in einem sehr frühen Stadium der glomerulären Schädigung eingreift. Vielleicht kann auf diesem Weg der Prozess des progredienten Nierenversagens unterbrochen werden und damit den betroffenen Patienten eine Nierenersatztherapie erspart bleiben.

**Abbildungsverzeichnis**

1	Schematische Darstellung einer Glomeruluskapillare	Benninghoff Anatomie, 1994, 15.Aufl., Band 2, S.44[9]
2	Glomerulus in PAS Färbung	Harnapparat & männliches Genitale, Gröne, 1994, S.5[14]
3	Ultrastruktur des Glomerulus mit Veränderungen der Podozyten und der Basalmembranen	Harnapparat & männliches Genitale, Gröne, 1994, S.7 [14]
4	Strukturmodell des Aufbaus eines Integrins und seiner Interaktion mit extrazellulärer Matrix, intrazellulären Signalkaskaden und dem Zytoskelett	Eigene Zeichnung nach Vorlagen von Mizejewski 1999[42], Liu 2000[43], Dedhar 1999[42]
5	Multidomänenstruktur von ILK	Nach Huang 1999[98]
6	Mit ILK interagierende Moleküle	ILK interactions, Wu 2001, [117]
7	Kongenitales Nephrotisches Syndrom des finnischen Typs	Harnapparat & männliches Genitale, Gröne, 1994, S.55 [14]
8	TaqMan PCR Reaktionsschema	Livak 1999, Perkins & Elmer Applied Biosystems - Manual for the Quantitation of DNA/RNA Using Real-Time PCR
9	TaqMan RT-PCR Amplifikationsplot	
10	TaqMan RT-PCR Standardkurve	
11	CNF Kortexmaterial (n=2) vs. Kontroll-Kortexmaterial aus zwei gesunden Nieren (n=2x2) PAGE RT PCR	Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.I
12	Glomeruli von Mäusen mit Anti-GBM-Nephritis (NTX) vs Glomeruli aus gesunden Kontrolltieren (Ktr.) im zeitlichen Verlauf (n=5x3) Real Time PCR	Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.II u. III
13	GH transgene Mäuse: PAGE RT-PCR mit mILK/mANC, TaqMan Real Time PCR mit mILK/mGAPDH	Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.IV bzw. Tab.V
14	unbehandelte Zellen vs. Zellen + 1µg PAN (n=2x3) Real Time PCR	Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.VI
15	Westernblot mit ILK, FAK, Paxillin und β1-Integrin AK bei PAN	19.5.99, Laborbuch I, Paul Gerson Unschuld
16	unbehandelte Zellen vs. Zellen + 10µg Protamin (n=2x6) - Real Time PCR	Rohdaten siehe Tabellenappendix Tab.VII
17	Interaktion von Podozyten und GBM	Kretzler 2001[2]

**Tabellenappendix mit Rohdaten****Table I:**

8.7.98, RT PCR mit mILK/mANC

Primer	tube	Inhalt	Verdünnung	Volume	mILK/ANC	Mittelwert	Std.abw.
<b>mILK</b>	13	Con4	1: 25	364558	1,59	2,18	0,83
	14		1:125	99866	2,76		
	15	CNF5	1: 25	198462	3,87	4,29	0,59
	16		1:125	39065	4,71		
	17	Con6	1: 25	371926	1,35	1,84	0,69
	18		1:125	156325	2,33		
	19	H2O Ktr.		0			
<b>mANC</b>	25	Con4	1: 25	228801			
	26		1:125	36145			
	27	CNF5	1: 25	51181			
	28		1:125	8292			
	29	Con6	1: 25	274893			
	30		1:125	66952			
	31	H2O Ktr.		0			

**Table II:**

25.5.00, TaqMan mit mILK/mGAPDH,

Primer	Inhalt	Ct	dCT	mILK/GAPDH	Mittelwert	Std.Abw
<b>mILK</b>	Con1 - Tag 0	25,96	6,67	0,0098	0,0080	0,0016
	Con2 - Tag 0	26,47	7,22	0,0067		
	Con3 - Tag 0	26,31	7,04	0,0076		
	Con1 - Tag 2	34,26	7,47	0,0056	0,0054	0,0018
	Con2 - Tag 2	34,89	8,15	0,0035		
	Con3 - Tag 2	34,12	7,12	0,0072		
	NTX1 - Tag 2	26,99	6,55	0,0107	0,0102	0,0010
	NTX2 - Tag 2	26,76	6,53	0,0108		
	NTX3 - Tag 2	27,12	6,78	0,0091		
	NTX1 - Tag 5	27,15	5,94	0,0163	0,0184	0,0040
	NTX2 - Tag 5	27,15	5,97	0,0160		
	NTX3 - Tag 5	26,79	5,44	0,0230		
	NTX1 - Tag 7	24,22	4,60	0,0412	0,0542	0,0177
	NTX2 - Tag 7	23,77	3,75	0,0743		
	NTX3 - Tag 7	24,09	4,41	0,0470		

<b>mGAPDH</b>	Con1 - Tag 0	19,29
	Con2 - Tag 0	19,25
	Con3 - Tag 0	19,27
	Con1 - Tag 2	26,79
	Con2 - Tag 2	26,74
	Con3 - Tag 2	27
	NTX1 - Tag 2	20,44
	NTX2 - Tag 2	20,23
	NTX3 - Tag 2	20,34
	NTX1 - Tag 5	21,21
	NTX2 - Tag 5	21,18
	NTX3 - Tag 5	21,35
	NTX1 - Tag 7	19,62
	NTX2 - Tag 7	20,02
	NTX3 - Tag 7	19,68

Con : Glomeruli aus Kontrolltieren

NTX: Glomeruli aus Mäusen mit nephrotoxischer Serum Nephritis

***Tabelle III:***

Von Erich Schadde gemessene Proteinuriewerte [148]

untersuchte Glomeruli	Mittelwert Up/Ucr	Standardabweichung
Kontrolle Tag 0 (n=3)	<0,20	
Kontrolle Tag 2 (n=3)	<0,20	
NTX Tag 2 (n=3)	22,20	8,5
NTX Tag 5 (n=3)	30,10	12,3
NTX Tag 7 (n=3)	45,17	19,9

**Table IV:**

18.3.98, RT PCR mit mILK/mANC

Primer	Inhalt	cDNA Nr.	Verdünnung	Vol.	mILK/ANC	Mittelwert	Std.Abw.	
mILK	Con Gloms	13	1:25	273769	1,05	0,92	0,12	
			1:125	73134	0,94			
	Con Gloms	14	1:25	209809	0,75	2,57	0,70	
			1:125	53998	0,94			
	GH Gloms	15	1:25	240179	1,73	2,57	0,70	
			1:125	67645	2,84			
	GH Gloms	16	1:25	191970	2,34	2,57	0,70	
1:125			46263	3,36				
H2O				0				
mANC	Con Gloms	13	1:25	260694				
			1:125	77423				
	Con Gloms	14	1:25	279251				
			1:125	56977				
	GH Gloms	15	1:25	138562				
			1:125	23802				
	GH Gloms	16	1:25	82140				
			1:125	13749				
	H2O				0			

**Table V:**

24.5.00, TaqMan Real Time PCR mit mILK/mGAPDH

Primer	Inhalt	Ct	dCT	mILK/GAPDH	Mittelwert	Std.Abw.
mILK	GH16 – 1	31,24	7,63	0,0050	0,0095	0,0043
	GH16 – 2	28,98	6,19	0,0137		
	GH16 – 3	29,1	6,66	0,0099		
	Con13 – 1	31,97	9,80	0,0011	0,0035	0,0024
	Con13 – 2	29,61	7,38	0,0060		
	Con13 – 3	30,31	8,22	0,0034		
mGAPDH	GH16 – 1	23,61				
	GH16 – 2	22,79				
	GH16 – 3	22,44				
	Con13 – 1	22,17				
	Con13 – 2	22,23				
	Con13 – 3	22,09				

**Table VI:**

19.5.00, TaqMan Real Time PCR mit mILK/mGAPDH

Primer	Inhalt	Ct	dCt	mILK/mGAPDH	Mittelwert	Std.Abw.	
<b>mILK</b>	1ug PAN	31,22	6,31	0,0126	0,0100	0,0033	
		31,64	6,49	0,0111			
		31,96	7,31	0,0063			
	Con	31,2	7,01	0,0068	0,0050	0,0020	
		31,61	7,7	0,0028			
		31,22	7,55	0,0053			
<b>mGAPDH</b>	1ug PAN	24,91					
		25,15					
		24,65					
	Con	24,19					
		23,91					
		23,67					

**Table VII:**

7.8.00, TaqMan Real Time PCR mit mILK/mGAPDH

Primer	Inhalt	Ct	dCT	mILK/mGAPDH	Mittelwert	Std.Abw.	
<b>mILK</b>	Ktr	30,67	8,050	0,00377	0,002	0,0013	
		30,62	8,580	0,00261			
		30,93	8,350	0,00306			
		32,88	10,510	0,00069			
		32,74	10,200	0,00085			
		32,52	9,890	0,00105			
		28,59	7,540	0,00537			0,005
	28,81	7,700	0,00481				
	28,96	7,910	0,00416				
	28,27	8,050	0,00377				
	27,7	7,290	0,00639				
	27,29	7,040	0,00760				
	<b>mGAPDH</b>	Ktr	22,62				
			22,04				
22,58							
22,37							
22,54							
22,63							
10ug Pro-tamin			21,05				
		21,11					
		21,05					
		20,22					
		20,41					
		20,25					

## Lebenslauf

Geburtstag: 2. März 1975  
Geburtsort: Berkeley/ Kalifornien

## Schulische Bildung

1985-1994: Ludwigsgymnasium, altsprachlicher Zweig, München  
Januar – Juni 1990: Nashua Senior High School, Nashua, New Hampshire, USA  
Abitur: 01.07.1994, Note: 1,6

## Wehrdienst

04.10.1994 – 30.09.1995: 6./Gebirgsjägerbataillon 233, Mittenwald

## Universitätsstudium

WS 1995/96 - SS 2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abschluss am 5.6.2002 mit der Gesamtnote „gut“

Kurzstipendium des Graduiertenkollegs vaskuläre Biologie im Rahmen der Dissertation

Während des praktischen Jahres Tätigkeit im Klinikum Großhadern und in der Medizinischen Poliklinik der LMU München, im Mt. Sinai Hospital, University of New York und im Royal Melbourne Hospital, University of Melbourne

Seit 1.8.2002 AIP an der Neurologischen Klinik, Klinikum Großhadern, München, Arbeitsgruppe für Neurogenetik

## Veröffentlichungen

### **Integrin Linked Kinase as a candidate downstream effector in proteinuria.**

FASEB J. 2001 Aug;15(10):1843-5.

Kretzler M, Teixeira VP, Unschuld PG, Cohen CD, Wanke R, Edenhofer I, Mundel P, Schlöndorff D, Holthofer H.

### **Altering glomerular epithelial function *in vitro* using transient and stable transfection.**

J Nephrol. 2001 May-Jun;14(3):211-9.

Kretzler M, Teixeira VP, Berger T, Blattner S, Unschuld PG, Cohen C, Schlöndorff D.

## Kongressbeiträge

### **Integrin Linked Kinase (ILK) regulates podocyte phenotype and matrix interaction**

Journal of the American Society of Nephrology 10, 1999

V.P.C. Teixeira, P.G. Unschuld, I. Edenhofer, H. Holthöfer, P. Mundel, D. Schlöndorff, M. Kretzler

### **Integrin Linked Kinase (ILK) regulates podocyte phenotype *in vitro***

Kidney and Blood Pressure Research 22, 1999

V.P.C. Teixeira, P.G. Unschuld, I. Edenhofer, H. Holthöfer, P. Mundel, D. Schlöndorff, M. Kretzler

### **Integrin Linked Kinase (ILK) induction by podocyte damage *in vivo* and *in vitro***

Journal of the American Society of Nephrology 9, 1998

M. Kretzler, H. Holthöfer, P.G. Unschuld, R. Wanke, J. Reiser, P. Mundel, D. Schlöndorff

**Literaturverzeichnis**

1. Hannigan, G.E., *et al.*, *Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase*. *Nature*, 1996. **379**(6560): p. 91-6.
2. Kretzler, M., *et al.*, *Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria*. *Faseb J*, 2001. **15**(10): p. 1843-5.
3. Kretzler, M., *et al.*, *Altering glomerular epithelial function in vitro using transient and stable transfection*. *J Nephrol*, 2001. **14**(3): p. 211-9.
4. Cotran, R.S. and H.G. Rennke, *Anionic sites and the mechanisms of proteinuria [editorial]*. *N Engl J Med*, 1983. **309**(17): p. 1050-2.
5. Bernard, D.B. and S. D.J., *Clinical approach to the patient with proteinuria and the nephrotic syndrome*, in *The Principles and Practice of Nephrology*, G.S. HR Jacobsen, S Klahr, Editor. 1995, Mosby: St. Louis. p. 110-121.
6. Denker, B. and B. Brenner, *Cardinal manifestations of renal disease*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, J.D. et al., Editor. 1998, McGraw-Hill: New York. p. 260- 261.
7. Kriz, W., *et al.*, *A frequent pathway to glomerulosclerosis: deterioration of tuft architecture-podocyte damage-segmental sclerosis*. *Kidney Blood Press Res*, 1996. **19**(5): p. 245-53.
8. Kriz, W., *et al.*, *Stability and leakiness: opposing challenges to the glomerulus*. *Kidney Int*, 1996. **49**(6): p. 1570-4.
9. Kanwar, Y.S., *et al.*, *Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria*. *Semin Nephrol*, 1991. **11**(4): p. 390-413.
10. Briggs, J., W. Kriz, and J. Schnermann, *Overview of renal function and structure*, in *Primer of kidney diseases*, A. Greenberg, Editor. 1998, Academic Press, San Diego, USA: San Diego, USA.
11. Smoyer, W.E. and P. Mundel, *Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome*. *J Mol Med*, 1998. **76**(3-4): p. 172-83.
12. Lenkkeri, U., *Characterization of the Congenital Nephrotic Syndrome locus*, in *Bio-center Oulu and Department of Biochemistry, University of Oulu*. 1998, University of Oulu: Oulu. p. 77.
13. Tisher, C.C., K.M. Madsen, and J.W. Verlander, *Structural adaptation of the collecting duct to acid-base disturbances*. *Contrib Nephrol*, 1991. **95**(4): p. 168-77.
14. Madsen, K.M., *et al.*, *Morphological adaptation of the collecting duct to acid-base disturbances*. *Kidney Int Suppl*, 1991. **33**: p. S57-63.
15. Abrahamson, D.R., *Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidneys*. *J Cell Biol*, 1985. **100**(6): p. 1988-2000.
16. Abrahamson, D.R., *Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane*. *Am J Physiol*, 1987. **253**(5 Pt 2): p. F783-94.
17. Hudson, B.G., S.T. Reeder, and K. Tryggvason, *Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases*. *Molecular basis of Goodpasture and Alport*

- syndromes and diffuse leiomyomatosis*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26033-6.
18. Yurchenco, P.D. and J.J. O'Rear, *Basal lamina assembly*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 674-81.
  19. Caulfield, J.P. and M.G. Farquhar, *Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes: their possible role in filtration and attachment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(5): p. 1646-50.
  20. Kanwar, Y.S. and M.G. Farquhar, *Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes*. J Cell Biol, 1979. **81**(1): p. 137-53.
  21. Kanwar, Y.S. and M.G. Farquhar, *Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(3): p. 1303-7.
  22. Hassell, J.R., *et al.*, *Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(8): p. 4494-8.
  23. Groffen, A.J., *et al.*, *Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(1): p. 19-27.
  24. Kanwar, Y.S., A. Linker, and M.G. Farquhar, *Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion*. J Cell Biol, 1980. **86**(2): p. 688-93.
  25. Caulfield, J.P. and M.G. Farquhar, *Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis*. Lab Invest, 1978. **39**(5): p. 505-12.
  26. Kriz, W., *et al.*, *The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis*. Kidney Int Suppl, 1994. **45**(2): p. S64-72.
  27. Karnovsky, M.J. and S.K. Ainsworth, *The structural basis of glomerular filtration*. Adv Nephrol Necker Hosp, 1972. **2**(3): p. 35-60.
  28. Latta, H., *The glomerular capillary wall*. J Ultrastruct Res, 1970. **32**(5): p. 526-44.
  29. Furukawa, T., *et al.*, *Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution*. Kidney Int, 1991. **40**(4): p. 621-4.
  30. Ohno, S., *et al.*, *Ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in fresh unfixed kidneys by a quick-freezing method*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1992. **61**(5): p. 351-8.
  31. Kriz, W., N. Gretz, and K.V. Lemley, *Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit?* Kidney Int, 1998. **54**(3): p. 687-97.
  32. Ichikawa, I. and A. Fogo, *Focal segmental glomerulosclerosis*. Pediatr Nephrol, 1996. **10**(3): p. 374-91.
  33. Rennke, H., S. Anderson, and B. Brenner, *The progression of renal disease: Structural and functional correlations*, in *Renal Pathology*, C. Tisher and B. Brenner, Editors. 1994, J.B. Lippincott Company: Philadelphia. p. 116.
  34. Klahr, S., G. Schreiner, and I. Ichikawa, *The progression of renal disease*. N Engl J Med, 1988. **318**(25): p. 1657-66.
  35. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.

36. Springer, T.A., *Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 65-72.
37. Loftus, J.C., *et al.*, *The amino-terminal one-third of alpha IIb defines the ligand recognition specificity of integrin alpha IIb beta 3*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 2033-9.
38. Staatz, W.D., K.J. Peters, and S.A. Santoro, *Divalent cation-dependent structure in the platelet membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(1): p. 107-14.
39. Ginsberg, M.H., *et al.*, *Ligand binding to integrins: common and ligand specific recognition mechanisms*. Cell Differ Dev, 1990. **32**(3): p. 203-13.
40. Loftus, J.C., J.W. Smith, and M.H. Ginsberg, *Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25235-8.
41. Michalak, M., *et al.*, *Calreticulin*. Biochem J, 1992. **285**(Pt 3): p. 681-92.
42. Mizejewski, G.J., *Role of integrins in cancer: survey of expression patterns*. Proc Soc Exp Biol Med, 1999. **222**(2): p. 124-38.
43. Liu, S., D.A. Calderwood, and M.H. Ginsberg, *Integrin cytoplasmic domain-binding proteins*. J Cell Sci, 2000. **113**(Pt): p. 3563-3571.
44. Virtanen, I., *et al.*, *Integrins in human cells and tumors*. Cell Differ Dev, 1990. **32**(3): p. 215-27.
45. Albelda, S.M. and C.A. Buck, *Integrins and other cell adhesion molecules*. Faseb J, 1990. **4**(11): p. 2868-80.
46. Vogel, B.E., *et al.*, *A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition (alpha v beta 1)*. J Biol Chem, 1990. **265**(11): p. 5934-7.
47. Albelda, S.M., *Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis*. Lab Invest, 1993. **68**(1): p. 4-17.
48. Ginsberg, M.H., J.C. Loftus, and E.F. Plow, *Cytoadhesins, integrins, and platelets*. Thromb Haemost, 1988. **59**(1): p. 1-6.
49. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
50. Heino, J., *et al.*, *Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit*. J Biol Chem, 1989. **264**(1): p. 380-8.
51. Heino, J., *Integrin-type extracellular matrix receptors in cancer and inflammation*. Ann Med, 1993. **25**(4): p. 335-42.
52. Rudolph, R. and D. Cheresh, *Cell adhesion mechanisms and their potential impact on wound healing and tumor control*. Clin Plast Surg, 1990. **17**(3): p. 457-62.
53. Felding-Habermann, B. and D.A. Cheresh, *Vitronectin and its receptors*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(5): p. 864-8.
54. Akiyama, S.K., K. Olden, and K.M. Yamada, *Fibronectin and integrins in invasion and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1995. **14**(3): p. 173-89.
55. Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka, *Focal adhesions, contractility, and sig-*

- naling*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996. **12**(6): p. 463-518.
56. Edwards, J.G., H. Hameed, and G. Campbell, *Induction of fibroblast spreading by Mn<sup>2+</sup>: a possible role for unusual binding sites for divalent cations in receptors for proteins containing Arg-Gly-Asp*. *J Cell Sci*, 1988. **89**(Pt 4)(2): p. 507-13.
57. Schwartz, M.A., C. Lechene, and D.E. Ingber, *Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(17): p. 7849-53.
58. Kirchhofer, D., J. Grzesiak, and M.D. Pierschbacher, *Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(7): p. 4471-7.
59. Juliano, R.L. and J.A. Varner, *Adhesion molecules in cancer: the role of integrins*. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**(5): p. 812-8.
60. Gui, G.P., *et al.*, *In vitro regulation of human breast cancer cell adhesion and invasion via integrin receptors to the extracellular matrix*. *Br J Surg*, 1995. **82**(9): p. 1192-6.
61. Ruoslahti, E., *Stretching is good for a cell*. *Science*, 1997. **276**(5317): p. 1345-6.
62. Dedhar, S., *Integrin mediated signal transduction in oncogenesis: an overview*. *Cancer Metastasis Rev*, 1995. **14**(3): p. 165-72.
63. Cosio, F.G., D.D. Sedmak, and N.S. Nahman, Jr., *Cellular receptors for matrix proteins in normal human kidney and human mesangial cells*. *Kidney Int*, 1990. **38**(5): p. 886-95.
64. Kerjaschki, D., *et al.*, *A beta 1-integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli*. *Am J Pathol*, 1989. **134**(2): p. 481-9.
65. Korhonen, M., *et al.*, *Distribution of beta 1 and beta 3 integrins in human fetal and adult kidney*. *Lab Invest*, 1990. **62**(5): p. 616-25.
66. Korhonen, M., *et al.*, *The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron*. *J Cell Biol*, 1990. **111**(3): p. 1245-54.
67. Simon, E.E. and J.A. McDonald, *Extracellular matrix receptors in the kidney cortex*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(5 Pt 2): p. F783-92.
68. Adler, S., *Integrin receptors in the glomerulus: potential role in glomerular injury [editorial]*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(5 Pt 2): p. F697-704.
69. Schwartz, M.A., M.D. Schaller, and M.H. Ginsberg, *Integrins: emerging paradigms of signal transduction*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**(1): p. 549-99.
70. O'Toole, T.E., *et al.*, *Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction*. *J Cell Biol*, 1994. **124**(6): p. 1047-59.
71. Marcantonio, E.E., *et al.*, *Mapping of the functional determinants of the integrin beta 1 cytoplasmic domain by site-directed mutagenesis*. *Cell Regul*, 1990. **1**(8): p. 597-604.
72. Hayashi, Y., *et al.*, *Expression and function of chicken integrin beta 1 subunit and its cytoplasmic domain mutants in mouse NIH 3T3 cells*. *J Cell Biol*, 1990. **110**(1): p. 175-84.

73. Solowska, J., *et al.*, *Expression of normal and mutant avian integrin subunits in rodent cells*. J Cell Biol, 1989. **109**(2): p. 853-61.
74. Katz, B.Z. and K.M. Yamada, *Integrins in morphogenesis and signaling*. Biochimie, 1997. **79**(8): p. 467-76.
75. Calderwood, D.A., S.J. Shattil, and M.H. Ginsberg, *Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22607-10.
76. Critchley, D.R., *Focal adhesions - the cytoskeletal connection*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 133-9.
77. Lafrenie, R.M. and K.M. Yamada, *Integrin-dependent signal transduction*. J Cell Biochem, 1996. **61**(4): p. 543-53.
78. Juliano, R., *Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation*. Bioessays, 1996. **18**(11): p. 911-7.
79. Miyamoto, S., *et al.*, *Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors*. J Cell Biol, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1633-42.
80. Plopper, G.E., *et al.*, *Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(10): p. 1349-65.
81. Li, F., *et al.*, *Identification and characterization of a mouse protein kinase that is highly homologous to human integrin-linked kinase*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1358**(3): p. 215-20.
82. Delcommenne, M., *et al.*, *Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11211-6.
83. Tu, Y., *et al.*, *The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2425-34.
84. Huang, Y. and C. Wu, *Integrin-linked kinase and associated proteins (review)*. Int J Mol Med, 1999. **3**(6): p. 563-72.
85. Dawid, I.B., J.J. Breen, and R. Toyama, *LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions*. Trends Genet, 1998. **14**(4): p. 156-62.
86. Lux, S.E., K.M. John, and V. Bennett, *Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins*. Nature, 1990. **344**(6261): p. 36-42.
87. Lukas, J., *et al.*, *Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 503-6.
88. Michaely, P. and V. Bennett, *The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition*. Trends Cell Biol, 1992. **2**: p. 127-129.
89. Haslam, R.J., H.B. Koide, and B.A. Hemmings, *Pleckstrin domain homology*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 309-10.
90. Mayer, B.J., *et al.*, *A putative modular domain present in diverse signaling proteins*.

- Cell, 1993. **73**(4): p. 629-30.
91. Downward, J., *Lipid-regulated kinases: some common themes at last*. Science, 1998. **279**(5351): p. 673-4.
  92. Marte, B.M. and J. Downward, *PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(9): p. 355-8.
  93. Rameh, L.E., et al., *A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22059-66.
  94. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
  95. Hanks, S.K. and A.M. Quinn, *Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members*. Methods Enzymol, 1991. **200**: p. 38-62.
  96. Humphries, M.J., *Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(5): p. 632-40.
  97. Wu, C., et al., *Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 528-36.
  98. Dedhar, S., *Cell-substrate interactions and signaling through ILK*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(2): p. 250-6.
  99. Hughes, P.E. and M. Pfaff, *Integrin affinity modulation*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(9): p. 359-64.
  100. Radeva, G., et al., *Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13937-44.
  101. Tan, C., et al., *Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells*. Oncogene, 2001. **20**(1): p. 133-40.
  102. Zhang, Y., et al., *A critical role of the PINCH-ILK interaction in the regulation of cell shape change and migration*. J Biol Chem, 2001. **1**: p. 1.
  103. Velyvis, A., et al., *Solution structure of the focal adhesion adaptor PINCH LIM1 domain and characterization of its interaction with the integrin-linked kinase ankyrin repeat domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4932-9.
  104. Tu, Y., et al., *A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading*. J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. 585-98.
  105. Scandurro, A.B., et al., *Gene microarray analysis reveals a novel hypoxia signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells*. Int J Oncol, 2001. **19**(1): p. 129-35.
  106. Troussard, A.A., et al., *The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)*. [In Process Citation]. Oncogene, 2000. **19**(48): p. 5444-52.
  107. Wu, C., *ILK interactions*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 14): p. 2549-50.
  108. Novak, A., et al., *Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and*

- beta-catenin signaling pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4374-9.
109. Somasiri, A., *et al.*, *Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 6): p. 1125-36.
  110. Leung-Hagesteijn, C., *et al.*, *Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1*. Embo J, 2001. **20**(9): p. 2160-70.
  111. Tu, Y., D.F. Kucik, and C. Wu, *Identification and kinetic analysis of the interaction between Nck-2 and DOCK180*. FEBS Lett, 2001. **491**(3): p. 193-9.
  112. Tu, Y., *et al.*, *Src homology 3 domain-dependent interaction of Nck-2 with insulin receptor substrate-1*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 2): p. 315-22.
  113. Salomon, R., M.C. Gubler, and P. Niaudet, *Genetics of the nephrotic syndrome*. Curr Opin Pediatr, 2000. **12**(2): p. 129-34.
  114. Batstone, G.F., *et al.*, *Congenital (Finnish) nephrons as cause of abnormal amniotic fluid alpha-fetoprotein*. Lancet, 1981. **1**(8221): p. 664.
  115. Heinonen, S., *et al.*, *Prenatal screening for congenital nephrosis in east Finland: results and impact on the birth prevalence of the disease*. Prenat Diagn, 1996. **16**(3): p. 207-13.
  116. Holmberg, C., *et al.*, *Management of congenital nephrotic syndrome of the Finnish type*. Pediatr Nephrol, 1995. **9**(1): p. 87-93.
  117. Holmberg, C., *et al.*, *Congenital nephrotic syndrome*. Kidney Int Suppl, 1996. **53**: p. S51-6.
  118. Laine, J., *et al.*, *Post-transplantation nephrosis in congenital nephrotic syndrome of the Finnish type*. Kidney Int, 1993. **44**(4): p. 867-74.
  119. Patrakka, J., *et al.*, *Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin*. Transplantation, 2002. **73**(3): p. 394-403.
  120. Kestila, M., *et al.*, *Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 575-82.
  121. Huttunen, N.P., *et al.*, *Renal pathology in congenital nephrotic syndrome of Finnish type: a quantitative light microscopic study on 50 patients*. Int J Pediatr Nephrol, 1980. **1**(1): p. 10-6.
  122. Tryggvason, K., *Morphometric studies on glomeruli in the congenital nephrotic syndrome*. Nephron, 1978. **22**(4-6): p. 544-50.
  123. Ljungberg, P., *et al.*, *Congenital nephrosis of the Finnish type (CNF): matrix components of the glomerular basement membranes and of cultured mesangial cells*. Histochem J, 1993. **25**(9): p. 606-12.
  124. Ljungberg, P., *et al.*, *Glomerular anionic charge in congenital nephrotic syndrome of the Finnish type*. Histochem J, 1995. **27**(7): p. 536-46.
  125. Ruotsalainen, V., *et al.*, *Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7962-7.
  126. Holthofer, H., *et al.*, *Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is char-*

- acteristically spliced in the human kidney. Am J Pathol, 1999. 155(5): p. 1681-7.*
127. Venter, J.C., *et al.*, *The sequence of the human genome. Science, 2001. 291(5507): p. 1304-51.*
  128. Tupler, R., G. Perini, and M.R. Green, *Expressing the human genome. Nature, 2001. 409(6822): p. 832-3.*
  129. Zimmerman, K.A., *et al.*, *Differential expression of myc family genes during murine development. Nature, 1986. 319(6056): p. 780-3.*
  130. Liang, P. and A.B. Pardee, *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992. 257(5072): p. 967-71.*
  131. Haltia, A., *et al.*, *mRNA differential display analysis of nephrotic kidney glomeruli. Exp Nephrol, 1999. 7(1): p. 52-8.*
  132. Gibson, U.E., C.A. Heid, and P.M. Williams, *A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res, 1996. 6(10): p. 995-1001.*
  133. Heid, C.A., *et al.*, *Real time quantitative PCR. Genome Res, 1996. 6(10): p. 986-94.*
  134. Förster, *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Annals of Physics (Leipzig), 1948(2): p. 55-75.*
  135. Lakowicz, *Energy Transfer, in Principles of Fluorescent Spectroscopy. 1983, Plenum Press: New York. p. 303-339.*
  136. Higuchi, R., *et al.*, *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y), 1993. 11(9): p. 1026-30.*
  137. Jat, P.S. and P.A. Sharp, *Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. Mol Cell Biol, 1989. 9(4): p. 1672-81.*
  138. Jat, P.S., *et al.*, *Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(12): p. 5096-100.*
  139. Mundel, P., J. Reiser, and W. Kriz, *Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. J Am Soc Nephrol, 1997. 8(5): p. 697-705.*
  140. Diamond, J.R. and M.J. Karnovsky, *Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. Am J Pathol, 1986. 122(3): p. 481-7.*
  141. Krishnamurti, U., *et al.*, *Puromycin aminonucleoside suppresses integrin expression in cultured glomerular epithelial cells. J Am Soc Nephrol, 2001. 12(4): p. 758-66.*
  142. Firth, J.D., *Effect of polycations on the function of the isolated perfused rat kidney. Clin Sci (Colch), 1990. 79(6): p. 591-8.*
  143. Assel, E., *et al.*, *Glomerular albumin leakage and morphology after neutralization of polyanions. I. Albumin clearance and sieving coefficient in the isolated perfused rat kidney. Ren Physiol, 1984. 7(6): p. 357-64.*
  144. Pugliese, F., G.A. Cinotti, and P. Mene, *Regulation of cultured human mesangial cell growth by ionized macromolecules. J Am Soc Nephrol, 1992. 2(10 Suppl): p. S95-9.*
  145. Doi, T., *et al.*, *Glomerular lesions in mice transgenic for growth hormone and insulinlike growth factor-I. I. Relationship between increased glomerular size and mesan-*

- gial sclerosis*. Am J Pathol, 1990. **137**(3): p. 541-52.
146. Wanke, R., *et al.*, *Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview*. Pediatr Nephrol, 1991. **5**(4): p. 513-21.
147. Yang, C.W., *et al.*, *Glomerulosclerosis in mice transgenic for native or mutated bovine growth hormone gene*. Kidney Int Suppl, 1993. **39**: p. S90-4.
148. Schadde, E., *et al.*, *Expression of chemokines and their receptors in nephrotoxic serum nephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(7): p. 1046-53.
149. Neugarten, J., *et al.*, *Role of macrophages and colony-stimulating factor-1 in murine antiglomerular basement membrane glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 1995. **5**(11): p. 1903-9.
150. Mundel, P., *et al.*, *Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines*. Exp Cell Res, 1997. **236**(1): p. 248-58.
151. Kretzler, M., *Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane*. MicroscResTech, 2001: p. in press.
152. Mundel, P. and S.J. Shankland, *Glomerular podocytes and adhesive interaction with glomerular basement membrane*. Exp Nephrol, 1999. **7**(2): p. 160-6.
153. Mundel, P. and W. Kriz, *Structure and function of podocytes: an update*. Anat Embryol (Berl), 1995. **192**(5): p. 385-97.
154. Martin, J., *et al.*, *Differential regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human glomerular epithelial cells in vitro*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(9): p. 1629-37.
155. McMillan, J.I., *et al.*, *Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy*. J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 1094-101.
156. Noakes, P.G., *et al.*, *The renal glomerulus of mice lacking  $\alpha$ -laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1*. Nat Genet, 1995. **10**(4): p. 400-6.
157. Kashtan, C.E., *Alport syndromes: phenotypic heterogeneity of progressive hereditary nephritis*. Pediatr Nephrol, 2000. **14**(6): p. 502-12.
158. Kreidberg, J.A., *et al.*, *Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis*. Development, 1996. **122**(11): p. 3537-47.
159. Dedhar, S., *et al.*, *The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin alpha 3/beta 1*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18908-14.
160. Daniels, B.S., *et al.*, *Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 929-36.
161. Adler, S. and X. Chen, *Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth*. Am J Physiol, 1992. **262**(5 Pt 2): p. F770-6.
162. Kreidberg, J.A. and J.M. Symons, *Integrins in kidney development, function, and disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(2): p. F233-42.

163. Baraldi, A., *et al.*, *Beta 1 and beta 3 integrin upregulation in rapidly progressive glomerulonephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 1995. **10**(7): p. 1155-61.
164. Rodewald, R. and M.J. Karnovsky, *Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse*. *J Cell Biol*, 1974. **60**(2): p. 423-33.
165. Regoli, M. and M. Bendayan, *Alterations in the expression of the alpha 3 beta 1 integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 1997. **40**(1): p. 15-22.
166. Bains, R., P.N. Furness, and D.R. Critchley, *A quantitative immunofluorescence study of glomerular cell adhesion proteins in proteinuric states*. *J Pathol*, 1997. **183**(3): p. 272-80.
167. Baraldi, A., *et al.*, *Very late activation-3 integrin is the dominant beta 1-integrin on the glomerular capillary wall: an immunofluorescence study in nephrotic syndrome*. *Nephron*, 1992. **62**(4): p. 382-8.
168. Jin, D.K., *et al.*, *Distribution of integrin subunits in human diabetic kidneys*. *J Am Soc Nephrol*, 1996. **7**(12): p. 2636-45.
169. Remuzzi, G., C. Zoja, and T. Bertani, *Glomerulonephritis*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1993. **2**(3): p. 465-74.
170. Somlo, S. and P. Mundel, *Getting a foothold in nephrotic syndrome*. *Nat Genet*, 2000. **24**(4): p. 333-5.
171. Clark, E.A. and J.S. Brugge, *Integrins and signal transduction pathways: the road taken*. *Science*, 1995. **268**(5208): p. 233-9.
172. Cybulsky, A.V., *et al.*, *Extracellular matrix-stimulated phospholipase activation is mediated by beta 1-integrin*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(2 Pt 1): p. C323-32.
173. Kobayashi, N., *et al.*, *Morphogenetic activity of extracellular matrices on cultured podocytes. Laminin accelerates podocyte process formation in vitro*. *Ital J Anat Embryol*, 2001. **106**(2): p. 423-30.
174. Schaller, M.D., *Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1540**(1): p. 1-21.
175. Ben Mahdi, M.H., V. Andrieu, and C. Pasquier, *Focal adhesion kinase regulation by oxidative stress in different cell types*. *IUBMB Life*, 2000. **50**(4-5): p. 291-9.
176. Ahola, H., *et al.*, *Cloning and expression of the rat nephrin homolog*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(3): p. 907-13.
177. Luimula, P., *et al.*, *Nephrin in experimental glomerular disease*. *Kidney Int*, 2000. **58**(4): p. 1461-1468.
178. Holthofer, H., *et al.*, *Altered gene expression and functions of mitochondria in human nephrotic syndrome*. *Faseb J*, 1999. **13**(3): p. 523-32.
179. Li, C., *et al.*, *CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere [In Process Citation]*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **279**(4): p. F785-92.
180. Kaplan, J.M., *et al.*, *Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis*. *Nat Genet*, 2000. **24**(3): p. 251-6.

181. Boute, N., *et al.*, *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome [published erratum appears in Nat Genet 2000 May;25(1):125]*. *Nat Genet*, 2000. **24**(4): p. 349-54.
182. Schwarz, K., *et al.*, *Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(11): p. 1621-9.
183. Tan, C., A. Mui, and S. Dedhar, *The integrin-linked kinase (ILK) regulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in a NF-kappaB dependent manner*. *J Biol Chem*, 2001. **27**: p. 27.
184. Kretzler, M., I. Koeppen-Hagemann, and W. Kriz, *Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat*. *Virchows Arch*, 1994. **425**(2): p. 181-93.