



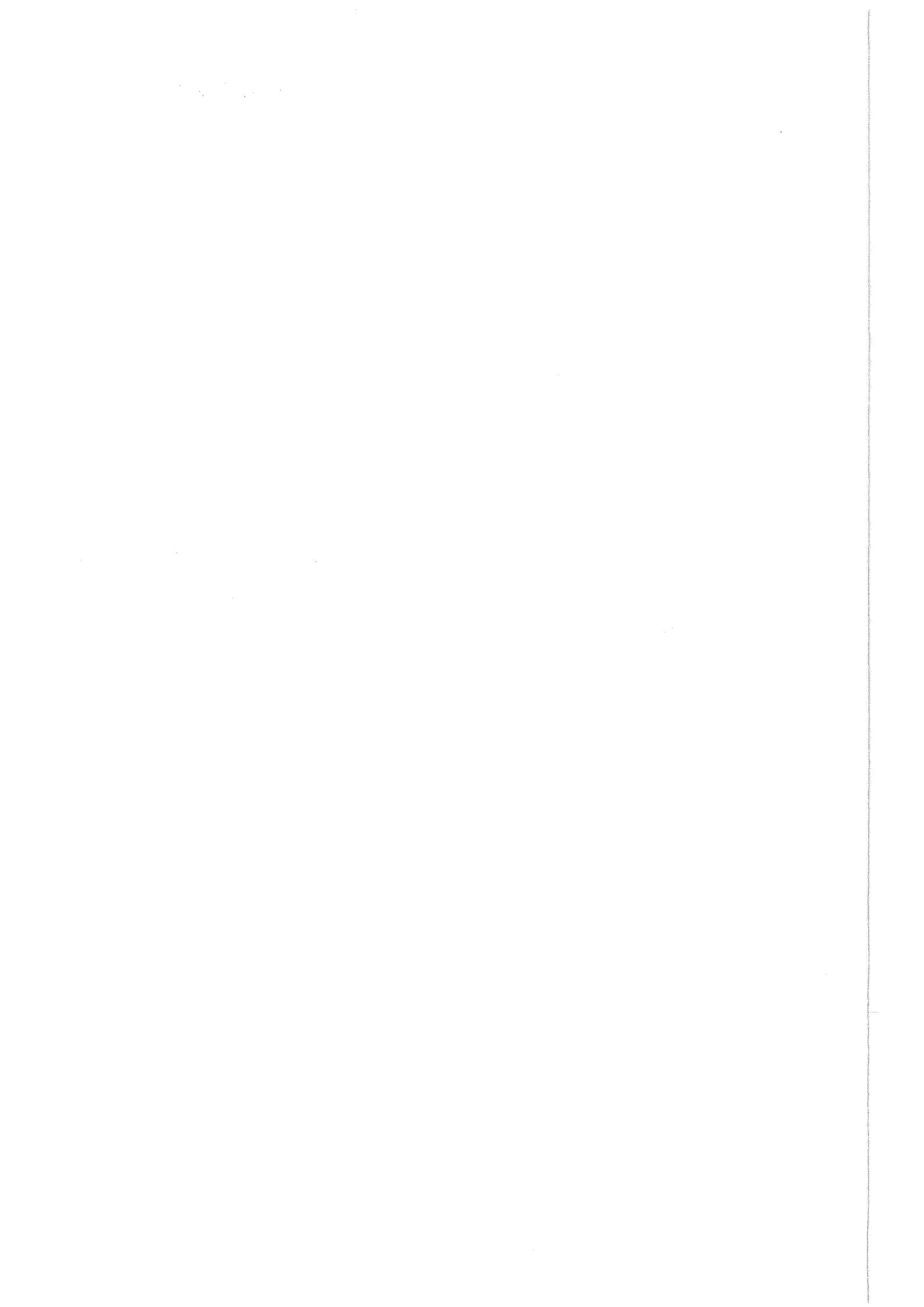
Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5883

**Innenohrdefekt und Studien
zum Pathomechanismus der
Mpv17-negativen Maus**

A. Reuter
Institut für Genetik

März 1997



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5883

**Innenohrdefekt und Studien zum
Pathomechanismus der Mpv17-negativen
Maus**

Alexander Reuter

Institut für Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH) genehmigte
Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1997

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Innenohrdefekt und Studien zum Pathomechanismus der Mpv17-negativen Maus

Die Mpv17-Mausmutante ist eine retrovirale Insertionsmutante, die durch Bluthochdruck, einen erhöhten Cholesterinspiegel, Proteinurie und eine fokale segmentale Glomerulosklerose gekennzeichnet ist. Das betroffene sogenannte Mpv17-Gen kodiert für ein peroxisomales Protein von etwa 20 kDa.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mpv17-Mausmutante zusätzlich zu dem bereits bekannten Nierenphänotyp auch starke Läsionen im Innenohr zeigt. So konnten eine Degeneration von *Stria vascularis* und Organ von Corti sowie eine Atrophie des Spiralganglions nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopisch war besonders die Verdickung und longitudinale Aufspaltung der Basalmembranen der Striakapillaren zu bemerken. Diese Ergebnisse ähneln den Befunden bei Patienten mit Alport-Syndrom, einer Erbkrankheit, die auf einem Defekt in einzelnen Ketten des Typ IV-Kollagens beruht. Die untersuchten Ketten des Typ IV-Kollagens und Laminins zeigten in Mpv17-negativen Tieren eine verstärkte Expression von Kollagen IV $\alpha 1/2$ in Striakapillaren und *Glomeruli* sowie von Laminin $\beta 1$ in *Glomeruli* und Laminin $\beta 2$ in Striakapillaren.

Als mögliche molekulare Ursache des Phänotyps in Niere und Innenohr von Mpv17-negativen Mäusen konnte eine Überexpression der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) in den betroffenen Geweben sowie in Zellkulturfibroblasten festgestellt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Funktion des Mpv17-Gens in der Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) liegt, da in Mpv17-negativen Zellen weniger ROS gemessen wurden als in Wildtyp-Zellen. Eine Überexpression von Mpv17 führt dagegen zu einer Erhöhung der zellulären ROS. Der Einfluss von Mpv17 auf MMP-2 funktioniert höchstwahrscheinlich über eine Beeinflussung des zellulären Redoxstatus, da der Einfluss von Mpv17 auf die MMP-2-Expression durch Behandlung mit H_2O_2 simuliert werden kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die Zusammenhänge zwischen einer Deregulation des zellulären Redoxmetabolismus, der Überexpression eines matrixabbauenden Enzyms und erblichen Nieren- bzw. Innenohrleiden auf und werden damit entscheidend zur Erforschung der Pathogenese von Nieren- und Innenohrkrankheiten beitragen.

Abstract

Inner ear defect and studies of the pathomechanism of the Mpv17-deficient mouse

The Mpv17 mutant mouse is a retroviral insertion mutant that is characterized by a high cholesterol level, proteinuria and focal segmental glomerulosclerosis. The disrupted so called Mpv17 gene encodes a peroxisomal protein of about 20 kD.

In this thesis it could be shown that in addition to the well known kidney phenotype the Mpv17 mutant mouse also shows lesions in the inner ear. By light and electron microscopy a degeneration of the organ of Corti, atrophy of the spiral ganglion and a desintegration of the *stria vascularis* as well as a thickening and longitudinal splitting of the basement membrane of the strial vasculature was detected. This inner ear phenotype shows a remarkable similarity to the inner ear defects seen in Alport syndrome, a hereditary disease caused by mutations in various chains of type IV collagen.

Investigations on the distribution and amount of type IV collagen chains revealed in Mpv17 negative mice an enhanced expression of collagen IV $\alpha 1/2$ in the *glomeruli* and the strial vasculature as well as a stronger signal of laminin $\beta 1$ in the *glomeruli* and laminin $\beta 2$ in the vessels of the *stria*.

As a possible molecular mediator of the kidney and inner ear phenotype an overexpression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in kidney, *cochlea* and tissue culture cells of Mpv17-negative mice was detected.

Furthermore a role of the Mpv17 protein in the production of reactive oxygen species (ROS) was found since in Mpv17-negative cells less ROS could be measured as well as more ROS could be seen in cells overexpressing Mpv17. The influence of Mpv17 on the MMP-2 expression is most likely mediated via the cellular redox status, since treatment of cells with hydrogen peroxide mimicks the function of the Mpv17 protein and therefore leads to a downregulation of MMP-2 expression.

The results presented in this work for the first time show the relations between deregulation of the cellular redox system, overexpression of a matrix-degrading enzyme and the development of kidney and inner ear disease and therefore will contribute to uncover the pathomechanisms leading to the above mentioned diseases.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Der transgene Mausstamm Mpv17	2
1.2.	Phänotyp von Mpv17-Mäusen	3
1.3.	Molekulargenetischer Hintergrund	4
1.4.	Niere-Innenohr-Beziehungen	5
1.5.	Die Niere	5
1.6.	Das Innenohr	7
1.7.	Krankheiten mit Nieren- und Innenohrphänotyp	10
1.8.	Ziel der Arbeit	12
2.	Material	13
2.1.	Chemikalien und Bezugsquellen	13
2.2.	Radiochemikalien	15
2.3.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
2.4.	Bakterien und eukaryontische Zelllinien	17
2.5.	Versuchstiere	17
2.6.	Kulturmedien	18
2.7.	Oligonukleotide	18
2.8.	Plasmide und Plasmidkonstruktionen	19
2.9.	Antikörper und Seren	20
3.	Methoden	21
3.1.	Analyse von Nucleinsäuren	21
3.1.1.	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	21
3.1.2.	Extraktion von Nucleinsäuren	21
3.1.3.	Fällung von Nucleinsäuren	22
3.1.4.	Sequenzierung von DNA	22
3.2.	Klonierungstechniken	23
3.2.1.	Restriktionsverdau von DNA	23
3.2.2.	Dephosphorylierung von DNA	23

3.2.3.	Auffüllen von überhängenden Enden	24
3.2.4.	Ligation von DNA-Fragmenten	24
3.2.5.	Herstellung kompetenter Bakterien	24
3.2.6.	Transformation von Bakterien	25
3.2.7.	Herstellung von Selektiv-Agarplatten	25
3.3.	Präparation von Nukleinsäuren	26
3.3.1.	Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Mini-Präp")	26
3.3.2.	Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")	26
3.3.3.	Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Geweben	27
3.3.4.	Isolation von RNA aus Geweben	28
3.3.5.	Isolation von polyA ⁺ -RNA aus Zellen	28
3.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
3.5.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen	29
3.5.1.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	29
3.5.2.	Agarose-Gelelektrophorese von RNA	30
3.5.3.	Denaturierende Harnstoff-Gelelektrophorese	31
3.5.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
3.6.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	32
3.7.	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	33
3.7.1.	Radioaktive Markierung von DNA nach der "Random-Priming"-Methode	33
3.7.2.	Radioaktive Markierung von RNA durch <i>in-vitro</i> Transkription	33
3.8.	Blot-und Hybridisieretechniken	34
3.8.1.	Transfer von DNA auf Nylonmembranen	34
3.8.2.	Transfer von RNA auf Nylonmembranen	34
3.8.3.	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	35
3.8.4.	Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten	35
3.8.5.	Detektion immobilisierter Proteine mit spezifischen Antikörpern	36
3.8.6.	Proteingel-Färbung mit Coomassie Brilliant Blue	36
3.8.7.	Proteinbestimmung	37
3.9.	Zellkultur	37
3.9.1.	Allgemeine Kulturbedingungen	37
3.9.2.	Transfektion eukaryotischer Zellen durch Kalziumphosphat-Koprazipitation (Chen und Okayama, 1987)	37

3.9.3.	Selektion und Isolation von Zellklonen	38
3.9.4.	Zellfärbung mit Hydroethidin	38
3.9.5.	Trypsinieren von Zellen	39
3.9.6.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
3.10.	Histlogische Techniken	40
3.10.1.	Fixierung von Geweben	40
3.10.2.	Einbettung in Paraffin	40
3.10.3.	Immunhistochemie	40
3.10.4.	"In situ" Hybridisierung	41
3.10.5.	Indirekte Immunfluoreszenz	43
4.	Ergebnisse	45
4.1.	Untersuchungen am Innenohr von Mpv17-Mäusen	45
4.1.1.	Die Innenohren von Mpv17-negativen Mäusen zeigen starke Läsionen	45
4.1.2.	Der Innenohrdefekt in Mpv17-negativen Mäusen gleicht elektronenoptisch den Befunden bei Alport-Syndrom	50
4.2.	Analyse der Mpv17-Expression im Innenohr	53
4.2.1.	Technik der in-situ-Hybridisierung und Synthese der Sonden	53
4.2.2.	Expression von Mpv17 im Innenohr	56
4.3.	Untersuchung des Kollagen IV-Status von Mpv17-Mäusen	59
4.3.1.	Niere und Striakapillaren zeigen verstärkte Kollagen IV $\alpha 1/\alpha 2$ -Expression	60
4.3.2.	Keine Unterschiede in der Expression von Kollagen IV $\alpha 4$ und $\alpha 5$ zwischen Mpv17- und Wildtyp-Tieren	62
4.4.	Untersuchung des Laminin-Status von Mpv17-Mäusen	66
4.4.1.	Expression von Laminin $\beta 1$ in Niere und Innenohr	66
4.4.2.	Expression von Laminin $\beta 2$ in Niere und Innenohr	67
4.5.	Expression von MMP-2 in Mpv17-Mäusen	71
4.6.	Untersuchungen zur Funktion des Mpv17-Proteins	76
4.6.1.	Der Einfluss von Mpv17 auf den intrazellulären Redoxmetabolismus	77
4.6.2.	Der Einfluss von Mpv17 auf die Genregulation	83

5.	Diskussion	87
5.1.	Mpv17 und die <i>Cochlea</i>	88
5.1.1.	Degeneration der <i>Stria vascularis</i>	89
5.1.2.	Degeneration des Cortischen Organs und Atrophie des Spiralganglions	91
5.1.3.	Alport-Syndrom, Refsum-Syndrom und Mpv17	93
5.1.4.	Mpv17-Expression im Innenohr	95
5.2.	Die extrazelluläre Matrix in Mpv17-negativen Mäusen	96
5.3.	MMP-2 und Mpv17	99
5.4.	Die Funktion des Mpv17-Proteins	102
5.5.	Mpv17 und Genregulation	105
6.	Literaturverzeichnis	109

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosinriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Endocochleäres Potential
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GSH	Glutathion, reduziert
h	Stunde
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
MCS	Multiple Cloning Site (=Polylinker)
min.	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
V	Volt

1. Einleitung

Die Nutzung von Tieren als Modell für den Menschen ist in der Medizin und Naturwissenschaft seit langem bekannt. Bereits im ersten medizinischen Handbuch, dem *Corpus Hippocratorum* (ca. 400 v.Chr.), wurden Beispiele des Einsatzes von Tieren beschrieben, und die Experimente Galens (129-199 n.Chr.) an Schweinen, Hunden und Affen bildeten die Grundlagen für die Medizin nicht nur seiner Zeit, sondern auch vieler Jahrhunderte danach.

Heute bilden Mäuse aufgrund der leichten Handhabbarkeit und der relativ kurzen Generationsdauer das wichtigste Säugetiermodell in der biologischen und medizinischen Forschung. Insbesondere Mausmutanten waren und sind für das Verständnis von regulatorischen Systemen, Entwicklungsvorgängen und Krankheitsfällen wichtig. Zu den teilweise seit langem bekannten, spontan entstandenen Mutanten kamen im Laufe der Zeit noch experimentell durch Strahlung oder Chemikalien erzeugte Mutanten hinzu und erweiterten die Zahl der möglichen Studienobjekte. Die Zuordnung des beobachteten Phänotyps zu den genauen molekularen Ursachen, wie zum Beispiel das Auffinden einer Mutation eines spezifischen Gens, bereitete jedoch lange Zeit große Schwierigkeiten.

Als Alternative zur Untersuchung von Spontanmutationen und chemischer Mutagenese wurde die Insertionsmutagenese entwickelt (Übersichtsartikel: Gridley *et al.*, 1987). Diese Methode beruht darauf, exogene DNA in die Keimbahn einzubringen. Die so eingebrachte DNA inseriert in das Genom und kann am Insertionsort durch Zerstörung oder Beeinflussung der Expression eines Gens zu einer Mutation führen. Weiterhin kann die eingeführte DNA als Marker dienen, um den Ort der Mutation aufzuspüren und damit sehr schnell einen Zusammenhang zwischen dem beobachteten Phänotyp und dem betroffenen Gen herzustellen. Ist man dann in der Lage, den Phänotyp durch Wiedereinbringen eines Transgens zu retten, hat man auch den formalen Beweis für den Zusammenhang zwischen Ausfall bzw. Mutation des Gens und Phänotyp erbracht.

Insertionsmutagenese durch natürlich vorkommende transponierbare Elemente wurde zuerst im Mais beobachtet, inzwischen sind eine Vielzahl derartiger Elemente in Prokaryoten, Hefen und *Drosophila* bekannt (Übersichtsartikel Shapiro *et al.*, 1983, Knippers *et al.*, 1990) und werden zur experimentellen Mutagenese verwendet. In Mäusen können Insertionsmutanten prinzipiell auf drei Wegen erzeugt werden. Zum einen können Embryonen in frühen Stadien mit Retroviren infiziert werden. Der Retrovirus inseriert an einer beliebigen Stelle in das Genom und zerstört dort

möglicherweise ein Gen. Die zweite Möglichkeit besteht darin, klonierte DNA durch Mikroinjektion in einen der beiden Vorkerne einer befruchteten Eizelle zu injizieren.

Die dritte Möglichkeit beinhaltet, exogene DNA in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) einzuführen. Nach einer homologen Rekombination in den ES-Zellen, mit der oft ein Gen inaktiviert wird, werden diese Zellen sodann in Blastozysten injiziert und tragen möglicherweise zur Keimbahn des daraus entstehenden Organismus bei (zur Übersicht: Schenkel 1995). Diese Methode, das „Gene Targeting“, wird hauptsächlich zur Herstellung von „Knock outs“ verwendet, das heißt, zum gezielten Ausschalten bekannter Gene.

Der Vorteil aller dieser Techniken ist die Möglichkeit, den Ort der Mutation zum Beispiel mittels für die eingebrachte DNA spezifischer Sonden aufzuspüren und das betroffene Gen schnell zu lokalisieren.

1.1. Der transgene Mausstamm Mpv17

Der Mpv17-Mausstamm wurde geschaffen, indem CFW-Mausembryonen im 4- bis 16-Zellstadium mit virusproduzierenden Zellen (Rat 1-Zellen, die mit MPSV_{neo} und F-Mulv als Helfervirus infiziert waren) kokultiviert wurden (Weiher *et al.*, 1990). Das rekombinante Retrovirus MPSV_{neo} trägt ein neo-Resistenzgen und ist eine replikationsdefiziente Variante des Myeloproliferativen Sarkoma Virus (Seliger *et al.*, 1986). Als Retrovirus integriert es in das Genom der Wirtszellen und kann dadurch zur Ausschaltung oder verstärkten Expression von in der Nähe der Integrationsstelle liegenden Genen führen.

Die so behandelten Embryonen wurden in die Uteri von scheinchwangeren C57BL/6J x CBA Mäuseweibchen transferiert. Im Alter von 4 Wochen wurde getestet, ob die daraus entstehenden Mäuse provirale Sequenzen in ihrem Genom enthielten. Mäuse, welche nur eine einzige Integration besaßen, wurden, sofern sie die Integration über die Keimbahn weitergeben konnten, bis hin zur Homozygotie gezüchtet. Zwei der 20 auf diese Weise erzeugten Mutanten zeigten einen rezessiv lethalen Phänotyp, einer davon war der Mpv17-Mausstamm (Weiher *et al.*, 1990).

1.2. Phänotyp von Mpv17-Mäusen

Bis zum Alter von 2 oder 3 Monaten sind homozygote Mpv17-Mäuse nicht von Wildtyp-Mäusen gleichen Alters zu unterscheiden. Ab diesem Zeitpunkt entwickeln homozygote Tiere die ersten sichtbaren Symptome wie Inaktivität, Gewichtsverlust und Anämie (Weiher *et al.*, 1990). Weiterhin konnte ein erhöhter Blutdruck und eine Steigerung der Herzfrequenz festgestellt werden (Clozel, persönliche Mitteilung). Die meisten Tiere sterben im Alter zwischen 2 und 8 Monaten an Nierenversagen, obwohl einige Individuen über ein Jahr alt werden.

Die ersten pathologischen Veränderungen im Blut zeigen sich bereits 6 bis 8 Wochen nach der Geburt. Als eines der ersten Symptome kann ein erhöhter Cholesterinspiegel festgestellt werden, gefolgt von einer Erhöhung des Gehalts an Blutstickstoff und Kreatinin. Auch werden ein verminderter Gehalt von Serumalbumin, eine verminderte Erythrozytenzahl und damit verminderte Hämoglobinwerte sowie eine starke Proteinurie gemessen, während Blutdruck und Herzfrequenz zu dieser Zeit noch nicht signifikant unterschiedlich zu Wildtyp-Kontrollen sind.

Tabelle 1 zeigt einen Vergleich von Mpv17- und Wildtyp-Tieren in den oben genannten Parametern.

Genotyp	Kreatinin (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Blutstickstoff (mg/dl)	Hämatokrit (%)	Urin Protein (mg/dl)	Urin Volumen (ml/24h)	Urin Osmolarität (mOsm/l)	Blutdruck (mm Hg)	Herzfrequenz (bpm)
Wt	0,32 ± 0,04	110 ± 15	22 ± 3,9	48,8 ± 3,3	30	1,1 ± 0,2	1062 ± 44	112 ± 11	291 ± 27
Mpv17	0,89 ± 0,19	424 ± 130	30 ± 12,5	26,3 ± 5	500	1,9 ± 0,2	909 ± 47	138 ± 9	400 ± 19

Tabelle 1: Plasma-, Urin- und hämodynamische Parameter in Mpv17-negativen und Kontrolltieren.

Das Alter der Tiere betrug 3 Monate. Die Werte wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

Diese Symptome weisen auf Nierenversagen hin und sind charakteristisch für das menschliche nephrotische Syndrom. Lichtmikroskopisch lässt sich eine fokale segmentale Glomerulosklerose feststellen, das heißt, daß in frühen Stadien Läsionen in Teilen einzelner *Glomeruli* sichtbar sind (fokale Läsionen). Im weiteren Krankheitsverlauf treten diese Läsionen in der ganzen Niere gehäuft auf (segmentale Läsionen). Die *Glomeruli* werden hierbei im Endstadium vollständig durch eine hyaline Substanz ersetzt, welche aus Plasmaproteinen und Basalmembranbestandteilen wie

Kollagen, Laminin und Heparansulfatproteoglykan besteht, so daß sie nur noch aus einer azellulären, eosinophilen Masse bestehen.

Elektronenmikroskopisch können eine leichte Verdickung der glomerulären Basalmembran sowie degenerative Veränderungen der glomerulären viszeralen Zellen (Podozyten) bis hin zur Verschmelzung der Zellfortsätze der Podozyten in späteren Stadien beobachtet werden.

1.3. Molekulargenetischer Hintergrund

Nach Klonierung der Insertionsstelle des integrierten Provirus konnte auf den flankierenden Sequenzen ein Gen gefunden werden, dessen Transkript zwar in Wildtypen und heterozygoten, nicht jedoch in homozygoten Tieren nachweisbar war und Mpv17-Gen genannt wurde.

Dies legt den Schluß nahe, daß die retrovirale Insertion die Expression stabiler Mpv17-mRNA verhindert. Der formale Beweis, daß das Fehlen des Mpv17-Gens tatsächlich kausal mit dem Phänotyp zusammenhängt, konnte kürzlich durch Einbringen eines humanen Mpv17-Minigens unter der Kontrolle des Metallothionein-Promoters in homozygote Mpv17-negative Mäuse erbracht werden (Schenkel *et al.*, 1995), welche dadurch keinen sklerotischen Phänotyp mehr in der Niere zeigen.

Soweit untersucht zeigt sich eine ubiquitäre Expression mit etwas stärkerem Expressionsgrad in Herz, Gehirn und Nieren sowie etwas schwächer in Leber und Milz.

Die Klonierung der cDNA ergab eine Sequenz von 1426 Nukleotiden in der Maus und 974 Nukleotiden im Menschen. Beide beinhalten einen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 176 Aminosäuren kodiert (Weiher *et al.*, 1990; Zwacka *et al.*, 1994). Dieses ist bei einer Identität von 92% zwischen Mensch und Maus evolutionär stark konserviert. Außer zwei hydrophoben Regionen, die eventuell als Transmembran-Domänen fungieren könnten, existieren keine weiteren funktionellen Domänen, die Hinweise auf eine mögliche Funktion geben könnten. Einzig die Ähnlichkeit mit PMP22, einem peroxisomalen Membranprotein (Kaldi *et al.*, 1993) mit möglicher Membrantransportaktivität (Diestelkötter *et al.*, 1993) und die erfolgte Lokalisation des Mpv17-Proteins auf Peroxisomen (Zwacka *et al.*, 1994) legen eine Funktion in einem peroxisomalen Stoffwechselweg nahe.

1.4. Niere-Innenohr-Beziehungen

Klinische Beobachtungen zeigen eine Reihe von Beziehungen zwischen Niere und Innenohr auf. So haben eine ganze Reihe von Medikamenten sowohl nephrotoxische als auch ototoxische Nebenwirkungen (Begg und Barclay, 1995, Schacht, 1993). Beide Organe besitzen spezialisierte Epithelien (*Stria vascularis* und tubuläres Epithelium) zum aktiven Transport von Flüssigkeiten und Elektrolyten durch zelluläre Membranen, welche unter ähnlicher hormoneller Kontrolle stehen. So wurden im Innenohr zum Beispiel Rezeptoren für natriuretische Peptide (ANF und Urodilatin) (Meyer z. Gottesberge *et al.*, 1992) sowie mit denen der Niere identische Na,K-ATPase-Isoformen (Feraille *et al.*, 1995, Piepenhagen *et al.*, 1995, Ogborn *et al.*, 1995, Keithley *et al.*, 1995, Nakazawa *et al.*, 1995, McGuirt und Schulte, 1994, Ryan und Watts, 1991) identifiziert. Weiterhin ist in Niere (Kafalides 1971) und Innenohr (Tokahashi und Hokunan, 1992) Kollagen Typ IV als wichtigste Komponente der dortigen Basalmembranen vorhanden, was sich auch darin zeigt, daß Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran mit der *Cochlea* und umgekehrt reagieren (Quick *et al.*, 1973). Weiterhin reagieren Antikörper gegen glomeruläre Epithelzellen ebenfalls mit dem Innenohr (Arnold *et al.*, 1976). Schließlich existieren eine Reihe von erblichen Krankheiten, welche Symptome sowohl in der Niere als auch im Innenohr zeigen. (Übersichtsartikel: Schuknecht, 1973, Arnold und Friedmann, 1992). Als bekannteste seien hier nur das Alport-Syndrom (Alport, 1927), das Branchio-Oto-Renale Syndrom (Smith und Kimberling, 1996) und das Refsum-Syndrom (Refsum, 1946) genannt. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, dass auch im *Diabetes mellitus* Läsionen sowohl in Niere als auch im Innenohr sowie Veränderungen der Basalmembranen festgestellt werden können. Bevor jedoch auf diese Krankheiten eingegangen werden kann, muß kurz die Morphologie von Niere und Innenohr näher erläutert werden.

1.5. Die Niere

Die grundlegende Funktion der Niere ist die Entgiftung des Bluts durch Filtration und Rückresorption der gewünschten Substanzen (wie z.B. Glukose, Aminosäuren und bestimmte Ionen), wodurch die Konzentration einiger Ionen in der extrazellulären Flüssigkeit (wie z.B. Natrium, Kalium und pH-Wert) geregelt wird.

Das *Nephron* ist die funktionelle Einheit der Niere. Ein *Nephron* besteht aus der Sammelröhre, dem proximalen *Tubulus*, der Henleschen Schleife, dem distalen *Tubulus* und dem *Glomerulus*, welcher wiederum in die Bowmansche Kapsel und ein Kapillarnetz unterteilt werden kann. Die Filtration des Blutes zum Primärharn geschieht im *Glomerulus*, während die Rückresorption eines Teils des Wassers und der gelösten Stoffe im distalen und proximalen *Tubulus* geschieht. Abbildung 1 zeigt den Aufbau eines Nephrons und die ablaufenden Transportvorgänge.

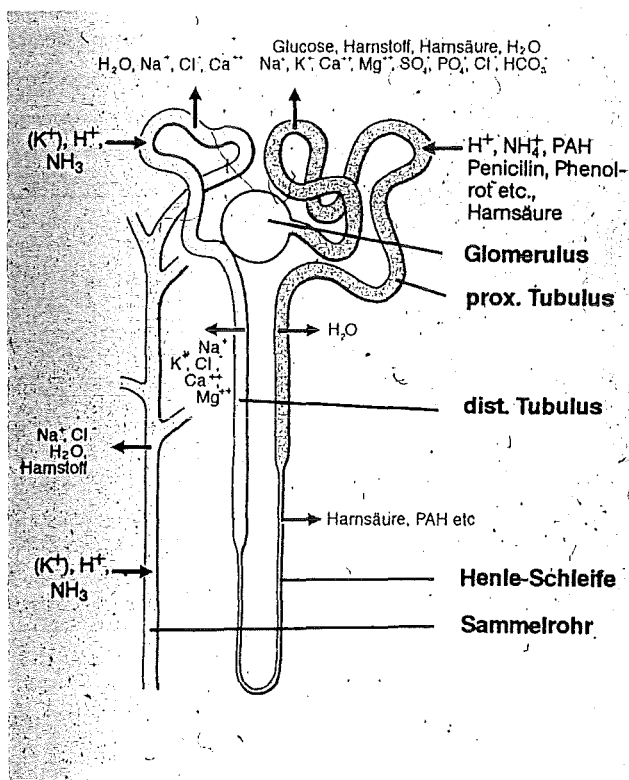


Abbildung 1: Struktur des Nephrons und Lokalisation der Transportvorgänge

Die aus dem Primärharn rückresorbierten Substanzen sind hierbei rot, die in den Harn sezernierten Substanzen schwarz dargestellt. Schaubild nach Schmidt und Thews, Physiologie des Menschen, verändert.

Eine besondere Rolle bei diesem Druckfiltrationsprozeß kommt der glomerulären Membran zu. Sie fungiert gewissermaßen als das Sieb, durch welches das Blut gefiltert wird. Aus diesem Grund ist die Integrität dieser Membran für die korrekte Bildung des Urins besonders wichtig. Prinzipiell besteht die glomeruläre Membran aus einer Schicht endothelialer Zellen auf der Plasmaseite, der Basalmembran und einer Schicht epithelialer Zellen auf der anderen (Urin-) Seite. Diese Zellschichten bilden jedoch keine undurchlässige Schicht, sondern sind von Öffnungen durchbrochen, welche Poren oder *Fenestrae* (bei den Endothelzellen) und Filtrationsschlitze (zwischen den Fußfortsätzen der epithelialen Zellen) genannt werden.

Die Basalmembran zwischen diesen beiden Zellschichten ist ein Netzwerk kollagenöser Fasern, welches hauptsächlich aus Ketten des Kollagens Typ IV sowie aus Laminin, Entactin (Nidogen) und Proteoglykan besteht. Die Kollagen IV-Genfamilie wiederum besteht aus 6 verschiedenen α -Ketten: $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 3(IV)$, $\alpha 4(IV)$, $\alpha 5(IV)$ und $\alpha 6(IV)$, für die Laminin-Genfamilie sind bisher 7 Ketten ($\alpha 1, \beta 1, \gamma 1, \alpha 2, \alpha 3, \beta 2$ und $\gamma 2$) beschrieben. Verschiedene Basalmembranen enthalten, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Funktionen, unterschiedliche Mengenverhältnisse der verschiedenen Ketten.

Die Basalmembran befindet sich in einem Fließgleichgewicht, das heißt, daß sie einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt. Hauptsächlich verantwortlich für den Abbau sind Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), dies sind Exoenzyme mit einem Metallion als katalytisches Zentrum. Es liegt nahe, dass diese Matrix-Metalloproteinasen einer genauen Regulation unterliegen müssen.

Die Regulation dieser MMPs erfolgt deshalb auf mehreren Ebenen, zum Beispiel bei der Transkription, der proteolytischen Aktivierung des Proenzym und der Inhibition vor Ort durch TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases).

1.6. Das Innenohr

Das Säugerohr lässt sich prinzipiell in drei Teile unterteilen: zunächst das äußere Ohr, dann das Mittelohr, welches im Wesentlichen aus dem *Tympanum* und den Gehörknöchelchen besteht, und schließlich das Innenohr.

Letzteres wird wiederum unterteilt in zwei Sinnessysteme: Das Gehörorgan (*Cochlea*) und das Gleichgewichts- und Schweresinnesorgan (*Vestibulum*).

Betrachtet man einen Schnitt durch eine *Cochlea* (Abbildung 2), so fällt zuerst ein zentraler, mit Nerven, Bindegewebe und Blutgefäßen gefüllter Bereich auf, der *Modiolus*. Um den *Modiolus* zeigen sich die Windungen der *Cochlea* sowie das Spiralganglion.

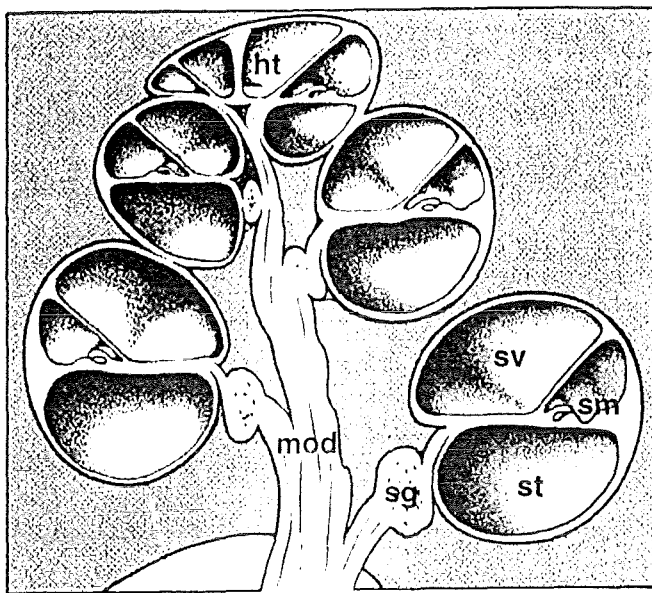


Abbildung 2:
Schematischer
Querschnitt durch eine
Cochlea

sv *Scala vestibuli*, st *Scala tympani*, sm *Scala media*, mod *Modiolus*, ht *Helicotrema*, sg *Spiralganglion*

Diese Windungen sind in drei flüssigkeitsgefüllte Röhren unterteilt: die mit Endolymphe gefüllte *Scala media* sowie die mit Perilymphe gefüllten *Scala tympani* und *Scala vestibuli*. die beiden letzteren stehen über das *Helicotrema* am apicalen Ende der *Cochlea* miteinander in Verbindung.

Die *Scala media* wird von einem häutigen Gang, dem *Ductus cochlearis*, ausgekleidet, durch den die Trennung von Endolymphe und Perilymphe gewährleistet wird. Apikal trennt hierbei die Reissnersche Membran *Scala vestibuli* und *Scala media*, während die Lateralwand des *Ductus cochlearis* aus der *Stria vascularis* und dem *Ligamentum spirale* besteht (Abbildung 3). Basal schließlich wird der *Ductus cochlearis* von der Basilmembran und dem darauf lokalisierten Cortischen Organ begrenzt.

Das *Ligamentum spirale* ist eine Bindegewebsstruktur, welche den größten Teil der lateralen Wand des *Ductus cochlearis* bildet. Ihre Matrix besteht aus Fibroblasten-ähnlichen Zellen, externen *Sulcus*-Zellen sowie einer Vielzahl extrazellulärer Filamente.

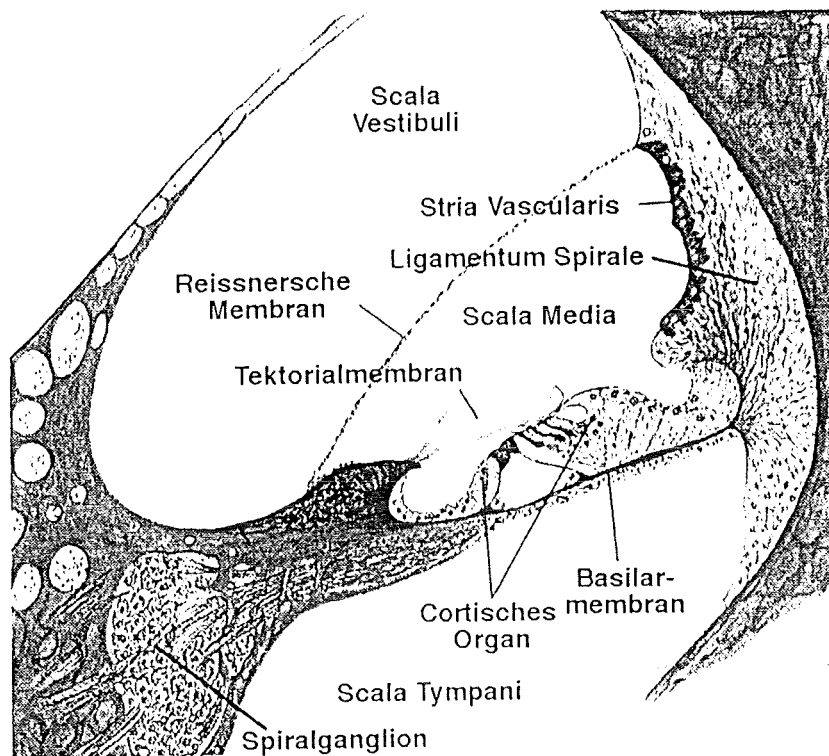


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Cochleawindung

Ebenfalls an der lateralen Wand der *Cochlea* ist die *Stria vascularis* lokalisiert, ein spezialisiertes, stark vaskularisiertes Epithel, welches aus drei Zellschichten besteht. Die Marginalzellen bilden eine kontinuierliche Zellschicht, die die *Stria vascularis* zum endolymphatischen Raum abgrenzt. Sie sind untereinander durch „tight junctions“ verbunden und bilden somit ein Hindernis für den perizellulären Fluss von Ionen und anderen niedermolekularen Metaboliten. Ihre basolaterale Membran ist sehr stark gefaltet und die Fortsätze enthalten viele Mitochondrien. Die Membran selbst enthält große Mengen an Na,K-ATPase. Die Intermediärzellen oder Melanozyten bilden die zweite Schicht unterhalb der Marginalzellen, sie kommen nicht mit der Endolymphe in Berührung, wohl aber mit den Kapillaren. Die flachen Basalzellen schließlich begrenzen die *Stria vascularis* zum Spiralligament hin, sie sind ebenfalls durch „tight junctions“ untereinander verbunden.

Die Funktion der *Stria vascularis* besteht im aktiven Ionentransport, welcher den Grund für die ungewöhnliche ionale Zusammensetzung der Endolymphe (hohe K^+ , niedrige Na^+ -Konzentration) und für das positive endocochleäre Potential darstellt.

Basal wird die *Scala media* durch die Basilarmembran und das darauf lokalisierte Organ von Corti von der *Scala tympani* getrennt.

Das Cortische Organ oder Spiralorgan besteht aus einer Reihe innerer Haarsinneszellen und drei Reihen äusserer Haarsinneszellen sowie mehrere Arten unterstützender Zellen wie zum Beispiel zwei Reihen von Säulenzellen, die eine große Menge von Microtubuli enthalten und die inneren von den äusseren Haarsinneszellen trennen, oder Deiterszellen, die unter den äusseren Haarsinneszellen lokalisiert sind. Die inneren und äusseren Haarsinneszellen unterscheiden sich in mehreren Aspekten, so zum Beispiel in Form und Innervierung. Während die äusseren Haarsinneszellen zylindrisch geformt sind, haben die inneren Haarsinneszellen eine flaschenähnliche Form. Besonders deutlich sind die Unterschiede in der Innervation, so innervieren 95% der afferenten Nerven die inneren Haarsinneszellen, während nur 5% die äusseren Haarsinneszellen innervieren, obwohl deren Anzahl dreimal größer ist. Die efferenten Nerven dagegen innervieren hauptsächlich die äusseren Haarsinneszellen.

Basalmembranen sind an vielen Stellen im Innenohr zu finden, so zum Beispiel in Form der Basilarmembran und um die Kapillaren sowie um die externen Sulkuszellen.

1.7. Krankheiten mit Nieren- und Innenohrphänotyp

Wie bereits erwähnt existieren eine Reihe von erblichen und nicht erblichen Krankheiten, die einen Phänotyp sowohl in Niere als auch im Innenohr zeigen.

Das Alport-Syndrom wurde zuerst 1927 von A.L. Alport als eine erbliche Nierenkrankheit mit Hämaturie und sensorineuraler Taubheit beschrieben (Alport, 1927). Später konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, daß Unregelmäßigkeiten in der glomerulären Basalmembran typisch für diese Krankheit sind (Atkin *et al.*, 1988), und kurz danach wurden Mutationen im Collagen IV $\alpha 5$ -Gen (Barker *et al.*, 1990) und im $\alpha 3$ -und $\alpha 4$ -Gen bei Alport-Patienten gefunden (Mochizuki *et al.*, 1994). Der Phänotyp in der Niere zeichnet sich durch teilweise verdickte, teilweise verdünnte glomeruläre Basalmembranen aus, welche häufig noch longitudinal in mehrere Lagen aufgesplittet sind (Rumpelt *et al.*, 1974). Im Innenohr von Alport-Patienten konnte eine teilweise Desintegration des Striaepithels beobachtet werden (Weidauer und Arnold,

1976), weiterhin ist das Kapillarmuster der *Stria vascularis* verarmt und die Basalmembran der Kapillaren mehrschichtig angeordnet und verdickt. Die Sinneszellen sind pyknotisch verändert oder fehlen ganz, während die umgebenden Stützzellen keine morphologischen Abweichungen zeigen. Schließlich ist die Anzahl der Ganglionzellen in Spiralganglion teilweise vermindert.

Auch das Branchio-Oto-Renale Syndrom (BOR) zeigt Symptome in beiden Organen. Es handelt sich hierbei um eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die durch phänotypische Anomalien der Kiemenbogenderivate, Taubheit und Nierendefekte charakterisiert ist, wobei die Nierendefekte von Hypoplasie und Dysplasie bis zu einer kompletten Agenesie reichen können (Smith und Kimberling, 1996). Das Gen für BOR wurde kürzlich auf Chromosom 8 q12-22 lokalisiert.

Eine weitere menschliche Erbkrankheit mit Phänotyp in Niere und Innenohr ist das Refsum-Syndrom (Refsum, 1946), eine hereditäre Neuropathie. Es handelt sich hierbei um eine seltene autosomal rezessive Erbkrankheit, die durch periphere Neuropathie, *Retinitis Pigmentosa*, Taubheit und Herzanomalien gekennzeichnet ist. Weiterhin ist eine diffuse Verdickung der peripheren Nerven in Form konzentrischer Lamellen um einzelne Axone zu beobachten, die auf eine Verdickung des Bindegewebes zurückzuführen ist. Häufig zeigt sich ein kompletter Verlust der Myelinscheide und der Nerv besteht nur noch aus Nervenfasern und Kollagenfasern. Im Innenohr lassen sich ein Kollaps der Reissnerschen Membran, eine Desorganisation des Cortischen Organs, eine Degeneration der *Stria vascularis* und die Atrophie des Spiralganglions feststellen (Hallpike, 1967). Der Nierenphänotyp besteht aus Lipidablagerungen im proximalen und distalen *Tubulus* (Pabico *et al.*, 1981), Lipidurie, minimaler Proteinurie und leichter mesangialer Sklerose. Mikroskopisch zeigen sich eine Vakuolisierung von tubulären Epithelzellen und Podozyten sowie Veränderungen der Mitochondrien in den tubulären Epithelzellen. Molekular konnte ein Defekt der Phytansäureoxidase als Ursache von Refsum-Syndrom identifiziert werden (Roels, 1991). Der Verlust dieses peroxisomalen Enzyms führt zu einer Akkumulation von Phytansäure in Serum und Urin. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Phytansäureoxidase im Peroxisom lokalisiert ist, also im selben Organell wie das Mpv17-Gen.

Obwohl nicht erblich, soll auch auf den Nieren- und Innenohrphänotyp beim *Diabetes mellitus* kurz eingegangen werden. Die Beobachtungen reichen von einer PAS-anfärbbaren Verdickung der Basalmembran der Kapillaren in der *Stria vascularis* (Jorgensen, 1961) über PAS-positive Ablagerungen im *Ligamentum spirale* bis hin zu einer verminderten Anzahl von Zellen im Spiralganglion (Kovar, 1973).

Als Grund für den Hörverlust wird eine Mikroangiopathie des *Sacculus* oder der Basilarmembranengefäße diskutiert (Kovar, 1973). In der Niere lassen sich ebenfalls eine

fortschreitende Verdickung der glomerulären Basalmembran, eine PAS-positive Verdickung der tubulären Basalmembran und ein dünneres Epithel feststellen.

1.8. Ziel der Arbeit

Die Mpv17-Mausmutante ist eine rezessive Mutante, die Glomerulosklerose und ein Nephrotisches Syndrom entwickelt. Aufgrund der rezessiven Vererbung und der Ähnlichkeit des Nierenphänotyps mit menschlichen Nierenkrankheiten ist das Mpv17-Gen ein guter Kandidat als Ursache für menschliche erbliche Nierenkrankheiten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, einen Einblick in den Pathomechanismus des der Mpv17-Mausmutante zugrundeliegenden Defekts zu bekommen. Deshalb soll zunächst eine weitere Charakterisierung der Mausmutante vorgenommen werden, um zusätzliche Hinweise auf die Natur einer möglichen menschlichen Entsprechung des mutanten Phänotyps sowie auf die biochemische Grundlage des Defekts zu gewinnen. Dabei soll wegen der häufig zu beobachtenden Gemeinsamkeiten zwischen Niere und Innenohr besonderen Wert auf Veränderungen im Innenohr, speziell in der *Cochlea*, gelegt werden.

Ausgehend von den dadurch gewonnenen Erkenntnissen und der peroxisomalen Lokalisation des Mpv17-Proteins sollen sodann Untersuchungen zur Funktion dieses Gens vorgenommen werden, um einen Einblick in den molekularen Pathomechanismus von erblichen Nieren- und möglicherweise Innenohrerkrankungen zu gewinnen.

Hierbei steht die Frage nach einer Untersuchung der bisher bekannten peroxisomalen Stoffwechselwege im Vordergrund. Im weiteren soll untersucht werden, ob das Mpv17-Genprodukt die Glomerulosklerose möglicherweise durch einen Eingriff in die Regulation der beteiligten Gene, zum Beispiel von Basalmembranbestandteilen, bewirkt.

2. Material

2.1. Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheitsstufe (p.A.) verwendet. Zur Herstellung von wäßrigen Lösungen wurde über eine Milli-QPlus Anlage (Millipore) gereinigtes Wasser benutzt. Wäßrige Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hameln
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
ATP	Boehringer, Mannheim
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
BES	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Coomassie Brilliant Blau R250	BioRad, München
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Buchs
DMSO	Fluka, Buchs
DMEM	Gibco, Eggenstein
DTT	Boehringer, Mannheim
ECL-System	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA	Merck, Darmstadt
Entellan neu ®	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
FKS	Gibco, Eggenstein
Formamid	Sigma, München
G-50 Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Gelatine, gepulvert	Merck, Darmstadt
Glaswolle	Merck, Darmstadt

Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzergel	Dako, Hamburg
Guanidiniumthiocyanat	Sigma, München
Hämatoxylin-Lösung	Sigma, München
Harnstoff	BioRad, München
Hefe-Gesamt-RNA	Boehringer, Mannheim
HEPES	Roth, Karlsruhe
Heringssperma-DNA Typ III	Sigma, München
Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Hydroethidin	Polysciences, Warrington
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kaliumazetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
LM-1 Emulsion für die Autoradiographie	Amersham-Buchler, Braunschweig
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
b-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol (technisch)	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, München
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Sigma, München
Oligo-dT Zellulose	Pharmacia, Freiburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin	Bio Whittacker, Walkersville
PMSF	Sigma, München
"Prime It TM Random Primer Kit"	Stratagene, Heidelberg
Proteinase-K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
	Boehringer, Mannheim
	Pharmacia, Freiburg
	Promega, Heidelberg
	USB, Cleveland
	Sigma, München
	Promega, Heidelberg
	Roth, Karlsruhe
	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe
	BioRad, München
	Bio Whittacker, Walkersville
RNase A	
RNasin	
Rotihistol	
Salzsäure	
SDS	
SDS-PAGE Eichproteine vorgefärbt	
Streptomycin	

T4-DNA-Ligase	Promega, Heidelberg
T7-Sequenase-Kit	USB, Cleveland
Taq-Polymerase	Amersham-Buchler, Braunschweig
TEMED	BioRad, München
TESPA	Sigma, München
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	BioRad, München
t-RNA (aus Hefe)	Sigma, München
Trypsin (Zellkultur)	Difco, Detroit
Wasserstoffperoxyd	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner (p.A) Qualität von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.2. Radiochemikalien

α -³²P-dCTP (370 MBq/ml)
 α -³⁵S-dATP (296 MBq/ml)
 α -³⁵S-UTP (370 MBq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen.

2.3. Geräte und Verbrauchsmaterial

Axioskop Mikroskop	Zeiss, Jena
Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
Deckgläser	Bender und Hobein, Bruchsal
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Einbettautomat	Shandon, Frankfurt
Einbettformen	Reichert und Jung, Nußloch
Einmalzellschaber	Costar,
Einmalspritzen, steril	Becton Dickinson, Braunschweig

Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven
Geltrockner	BioRad, München
Hybond N ⁺	Amersham-Buchler, Braunschweig
Injektionskanülen, steril	Rose, Trier
Kühlzentrifuge Kontron-Hermle Centrikon H-401	Hermle, Gosheim
Nitrozellulose	Schleicher und Schuell, Dassel
Nylon-Membranen, positiv geladen	Quiagen, Hilden
	Amersham-Buchler, Braunschweig
Mikrotom (Rotationsmikrotom 2035)	Reichert und Jung, Nußloch
Objektträger	Bender und Hobein, Bruchsal
Proteingel-Apparatur "Mighty Small TM " SE250	Hoefer Scientific Instr., San Fransisco
Petrischalen (Bakterien)	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme	Amersham-Buchler, Braunschweig
Röntgenfilmkassetten	Dupont,
Spektralphotometer (Spekol UV/VIS)	Zeiss, Jena
Szintillationsflüssigkeit	Packard, Groningen
Szintillationsmeßgerät (BETAmatic)	Kontron,
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Transferapperatur für Western Blot	BioRad, München
Transilluminator (IL-350M)	Bachofer, Reutlingen
Ultrazentrifugen (L8-70, TL-100)	Beckman, Stuttgart
Vakuum-Konzentrator (Speed Vac®)	Savant, Farmingdale
Vapoklav-Dampfsterilisator	Sterico AG, Dieticon
Whatman 3MM-Papier	Bender und Hobein, Bruchsal
Zellkulturflaschen und Schalen	Greiner, Nürtingen

2.4. Bakterien und eukaryontische Zelllinien

- E.coli* DH5 α :** Genotyp: F⁻; endA1; hsdR17 (r_k⁻,m_k⁺); supE44; thi-1; l⁻; recA1; gyrA96; relA1
- GM 637 :** mit SV40 transformierte Hautfibroblasten eines gesunden Individuums
- NIH 3T3:** embryonale Mausfibroblasten
- LuSVX:** transformierte Lungenfibroblasten von Mpv17-negativen Tieren
- 293:** mit Adenovirus 5-E1A transformierte menschliche, embryonale Nierenfibroblasten
- RSV-1 und RSV-7:** NIH 3T3-Zellen kotransfiziert mit pBabePuro und RSV-Mpv17

2.5. Versuchstiere

CFW x Balb/c Hybridmäuse, infiziert mit einem rekombinanten Retrovirus (MPV-17 Mäuse). Diese Mäuse wurden von Dr. H. Weiher, Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

Wildtyp-Kontrollen der Mpv17-Mäuse wurden auf dem genetischen Hintergrund von CFWx Balb/c in verschiedenen Generationen gezüchtet.

Balb/c-Mäuse, von Charles River Deutschland bezogen

NMRI-Mäuse, von Charles River Deutschland bezogen

2.6. Kulturmedien

L-Broth: 0,5%(w/v) Bacto-Hefeextrakt, 1%(w/v) NaCl, 1%(w/v) Bacto-Trypton

PSI: 2%(w/v) Bacto-Trypton, 0,5%(w/v) Bacto-Hefeextrakt, 0,4%(w/v) MgSO₄, 10 mM KCl, pH 7,7

SOB: 2%(w/v) Bacto-Trypton, 0,5%(w/v) Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

SOC: SOB mit 20 mM Glukose

TY: 0,5% NaCl, 1% Bacto-Hefeextrakt, 2% Bactotrypton

Bakterienselektionsmedium: TY-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin

Einfriermedium (Bakterien): 90%(v/v) L-Broth, 10%(v/v) DMSO

Kulturmedium für LuSVX-Zellen, NIH 3T3, GM637, 293: DMEM, 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin

Einfriermedium für Zellkultur : 80% DMEM, 10% FKS, 10% DMSO

2.7. Oligonukleotide

2236: ATG GCA CTC TGG CGG GCA TAC CAG C

2239: TGG AGT GAG GCA GGC TTA GAG CCG A

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersbach bezogen.

2.8. Plasmide und Plasmidkonstruktionen

- RSV-0:** RSV-0 (Ynag-Yen et al., 1990) ist ein Kontrollvektor, der keine gencodierende Sequenzen besitzt.
- p21:** pBluescript II KS mit der kompletten hMpv17-cDNA
- pBabePuro:** retroviraler Expressionsvektor, enthält ein Puromycin- und ein Ampicillinresistenzgen
- NF- κ B-TATACAT:** Vektor für Promotorstudien, enthält das Chloramphenicol-acetyltransferasegen unter Kontrolle einer TATA-Box und einer NF- κ B-Bindestelle.
- RSV-Mpv17:** Ein Expressionsvektor, der das hMpv17-Gen unter Kontrolle des RSV-Promotors beinhaltet.

2.9. Antikörper und Seren

- anti-Kollagen IV $\alpha 1/2$:** Polyklonaler Ziege anti-Typ IV-Kollagen-Antikörper, bezogen von Southern Biotechnology Associates, Inc.
- anti-Kollagen IV $\alpha 4$:** Monoklonaler Maus anti-Typ IV Kollagen $\alpha 4$ -Untereinheit, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Miner.
- anti-Kollagen IV $\alpha 5$:** Monoklonaler Maus anti-Typ IV Kollagen $\alpha 5$ Untereinheit, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Miner.
- anti-MMP-2:** Monoklonaler Maus-anti-MMP-2-Antikörper, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Höythyä.
- anti-LamininB1:** Monoklonaler Ratte anti-Maus Laminin B1-Kette, bezogen von Upstate Biotechnology Inc.
- anti-LamininB2:** Monoklonaler Ratte anti-Maus Laminin B2-Kette, bezogen von Upstate Biotechnology Inc.

3. Methoden

3.1. Analyse von Nukleinsäuren

3.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde die Extinktion der wässrigen Lösung bei 260 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht 50 mg/ml doppelsträngiger DNA, 40 mg/ml RNA und im Falle von einzelsträngigen Oligonukleotiden 20 mg/ml.

3.1.2. Extraktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden zur Abtrennung von Enzymen und anderen Proteinen mittels Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Hierzu wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit dem gleichen Volumen Phenol (mit TE gesättigt) gemischt. Anschließend wurde nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform/Isoamylalkohol nochmals gut gemischt und die Phasen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 14000 UpM, 2 min, RT) getrennt. Die obere, wäßrige Phase wurde entnommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol auf die gleiche Weise extrahiert.

TE: 10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8
Chloroform /Isoamylalkohol (24:1, v/v)

3.1.3. Fällung von Nukleinsäuren

Der zu fällenden Nukleinsäurelösung wurde Natriumacetat, pH 4,8 bis zu einer Endkonzentration von 0,3M zugesetzt (zur besseren Fällung von RNA wurde alternativ hierzu Ammoniumacetat bis zu einer Konzentration von 2,5M zugesetzt). Nach Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol wurde 30 min bei -80°C inkubiert und anschließend 15 min (14000 UpM) in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Sediment wurde mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator (Speed Vac®) oder dem Exsiccator getrocknet.

3.1.4. Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch- Methode mit dem "T7-Sequenase-Kit" der Firma USB, Cleveland sequenziert. Die Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 5 mg lyophilisierte Plasmid-DNA in 20 ml Denaturierungspuffer aufgenommen. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz durch Zugabe von 2ml 2M NH₄Acetat neutralisiert, die DNA erneut ausgefällt und getrocknet. Die denaturierte DNA wurde mit 2 ml 5x Reaktionspuffer versetzt und mit ddH₂O auf ein Volumen von 9 ml gebracht. Anschließend wurden 1 ml Sequenzierprimer (1 pmol/ml) hinzugegeben, 2 min bei 65 °C inkubiert und danach langsam auf RT abgekühlt. Nach einer kurzen Strangverlängerung mit α-³⁵S-d-ATP erfolgte die Kettenabbruch-Reaktion mit den vier Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Formamid-Probenpuffer und 3 min Inkubation bei 100 °C abgestoppt. Die Auftrennung erfolgte in einem 6% denaturierendem Acrylamidgel.

Denaturierungspuffer:	0,2 mM EDTA; 0,2 M NaOH
5x Reaktionspuffer:	200 mM Tris pH 7,5; 100 mM MgCl ₂ ; 250 mM NaCl
Formamid-Probenpuffer:	20 mM EDTA pH 7,8; 99% Formamid; 0,03% Xylencyanol; 0,03% Bromphenolblau

3.2. Klonierungstechniken

3.2.1. Restriktionsverdau von DNA

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe einer 10x konzentrierten Puffer/Salz-Lösung das für die jeweilige Restriktionsendonuklease optimale Milieu, entsprechend den Angaben des Herstellers, eingestellt. Je mg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease hinzugegeben. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzymlösung. Die Reaktion wurde bei 37°C (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) und mindestens für 2 h durchgeführt.

3.2.2. Dephosphorylierung von DNA

Die wässrige Lösung der linearisierten Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 10x konzentriertem CIP-Puffer in einem Endvolumen von 50 µl auf 1x konzentrierten CIP-Puffer eingestellt. Pro mg DNA wurde 1 U Alkalische Phosphatase eingesetzt. Sollte an überhängenden Enden ("sticky ends") dephosphoryliert werden, wurde 1 h bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 min erneut dieselbe Menge Enzym hinzugegeben wurde. Sollten jedoch nicht überstehende Enden ("blunt ends") dephosphoryliert werden, erfolgte die Inkubation mit 1 U Enzym für 15 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 56°C. Danach wurde erneut 1 U Enzym dazugegeben und der Vorgang wiederholt. Zur Beendigung der Enzymreaktion wurde in beiden Fällen 42,5 µl ddH₂O, 10 µl 10x TNE und 2,5 µl 20% SDS hinzugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Anschließend wurde die DNA gefällt.

10x CIP-Puffer: 0,5 M Tris pH 9,1; 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂;
10 mM Spermidin
10x TNE: 1 M NaCl; 100 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA pH 8

3.2.3. Auffüllen von überhängenden Enden

Zu getrockneter DNA wurden 2 ml 10 mM DTT, 1 ml 10x dNTP-Mix, 2 ml 10x Polymerase-Puffer hinzugegeben und mit ddH₂O auf 19 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 ml *E.coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/ml) wurde für 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion abgestoppt. Bei dieser Reaktion werden 5' überhängende Enden aufgefüllt, wohingegen 3' überhängende Enden abgebaut werden.

10x dNTP-Mix: 10 mM dATP; 10 mM dCTP; 10 mM dGTP;
 10 mM dTTP; 10 mM Tris pH 7,5
10x Polymerase-Puffer: 700 mM Tris pH 7,5; 70 mM MgCl₂

3.2.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden gemischt und mit 2 µl 10 mM ATP, 2 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (2 U/µl) versetzt. Anschließend wurde mit ddH₂O das Volumen der Reaktion auf 20 µl eingestellt und für 16 h bei 15°C inkubiert. Für Addition von Linker-DNA wurden 2 µl phosphorylierte Linker benutzt.

10x Ligase-Puffer: 500 mM Tris pH 7,4; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT;
 10 mM Spermidin

3.2.5. Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Einzelkolonie des verwendeten Bakterienstamms *E.coli* DH5α wurde von einer Selektiv-Agarplatte gepickt und damit eine 6 ml Kultur (PSI-Medium) angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C kultiviert, bis ihre A₆₀₀ zwischen 0,25 und 0,3 lag. Mit dieser Vorkultur wurde eine 100 ml Kultur (PSI-Medium) angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer A₆₀₀ von 0,48 inkubiert. Danach wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min sedimentiert (Centrifuge Kühlzentrifuge H-401, Rotor A 6.9, 5000 UpM, 4°C), in 10 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 3 h auf Eis gestellt. Danach wurden die Bakterien erneut für 10 min bei 4°C sedimentiert (Centrifuge Kühlzentrifuge, Rotor AS 4.13, 5000

UpM) und in 10 ml eiskalten TFB2-Puffer resuspendiert, in 100 ml Aliquots abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

TFB1-Puffer: 100 mM RbCl_2 ; 50 mM MnCl_2 ; 30 mM Ka-Acetat; 10mM CaCl_2 ;
pH 7,2 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert

TFB2-Puffer: 10 mM MOPS pH 7; 10 mM RbCl_2 ; 75 mM CaCl_2 ; 15% Glycerin

3.2.6. Transformation von Bakterien

Ein 100 μl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Zu 50 μl der Bakterienlösung wurde der Ligationsansatz oder 20 ng der entsprechenden DNA hinzugegeben und vorsichtig auf Eis gemischt. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis belassen und anschließend 3 min. bei 37°C inkubiert. Nach weiterer Inkubation für 2 min auf Eis wurde zu dem Ansatz 3 ml SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien 1 h bei 37°C unter Schütteln wachsen gelassen. 200 μl der Bakteriensuspension wurden danach auf eine Selektiv-Agarplatte ausgestrichen.

3.2.7. Herstellung von Selektiv-Agarplatten

Zu 1 l frisch angesetzttem TY-Medium wurde 1,5% (w/v) Bacto-Agar hinzugegeben. Diese Mischung wurde autoklaviert. Nach Abkühlen auf 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 mg/ml zugegeben. Damit konnten ca. 30 Agarplatten (9 cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme entfernt. Nachdem der Agar erstarrt war, wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert (maximal 6 Wochen).

3.3. Präparation von Nukleinsäuren

3.3.1. Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Mini-Präp")

Die Bakterien, deren Plasmid isoliert werden sollte, wurden mit einer Pipettenspitze von einer Selektiv-Agarplatte gepickt und in 3 ml TY-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von der Übernachtskultur wurden 1,5 ml für 5 min bei 5000 UpM (Tischzentrifuge, RT) zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Sodann wurden 200 µl Denaturierungspuffer hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 3M NaAcetat, pH 4,8 hinzugegeben und für weitere 10 min auf Eis inkubiert, wobei Proteine und die "chromosomale" DNA ausfallen. Daraufhin wurde der Ansatz zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15 min, RT, 14000 UpM) und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol und Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Plasmid-DNA ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15 min, 14000 UpM) wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Abschließend wurden die Plasmid-DNA, die nur noch durch RNA verunreinigt ist, erneut durch Zugabe von 500 µl Ethanol ausgefällt und nach Zentrifugation und Trocknen in einem Vakuum-Konzentrator in 50 µl dd H₂O aufgenommen.

Resuspensionspuffer:	15 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA pH 8; 50 mM Glukose; 2mg/ml Lysozym (Zugabe erst unmittelbar vor Gebrauch)
Denaturierungspuffer:	0,2 M NaOH; 1%(w/v) SDS

3.3.2. Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")

Die Präparation wurde nach dem Protokoll für Quiagen-Säulen der Firma Quiagen durchgeführt. Hierbei werden die Bakterien, deren Plasmid isoliert werden sollte, mit einer Pipettenspitze von einer Selektiv-Agarplatte gepickt und in 200 ml TY-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Durch eine Zentrifugation bei 5000 UpM für 10 min wurden die Bakterien pelletiert und der Überstand verworfen. Sodann wurde das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurde vorsichtig durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im

Folgenden wurden 10 ml Puffer P3 zugegeben, vorsichtig gemischt und die ausgefallenen Proteine sowie die genomische DNA bei 4°C und 8000 g pelletiert.

Währendessen wurde die Säule mit 5 ml Puffer QB equilibriert und der Überstand aus der obigen Zentrifugation durch ein Filterpapier in die Säule gefiltert.

Nachdem der Überstand hindurchgelaufen war, wurde die Säule mit 10 ml Puffer QC gewaschen, die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von 4 ml Isopropanol gefällt.

Die DNA wurde sodann bei 8000 g abzentrifugiert, mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 400 µl dd H₂O aufgenommen.

Puffer P1:	100 µg/ml Rnase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
Puffer P2:	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3:	2,55 M KAc, pH 4,8
Puffer QB:	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0, 0,15% Triton X-100
Puffer QC:	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol pH 7,0
Puffer QF:	1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 8,2

3.3.3. Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Geweben

Zu dem Gewebestück oder den pelletierten Zellen wurden 710 µl Tail-Puffer sowie 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und bei 55 °C über Nacht inkubiert.

Sodann wurde für 5 min geschüttelt, 250 µl 6M NaCl-Lösung zugegeben, weitere 5 min geschüttelt und die Zell- und Gewebestandteile für 5 min bei 14000 UpM in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Isopropanol zugegeben und für 2 min geschüttelt. Die ausgefallene DNA wurde durch einminütiges Zentrifugieren (14000 UpM) in einer Tischzentrifuge pelletiert, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

Tail-Puffer:	50 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS
--------------	---

3.3.4. Isolation von RNA aus Geweben

Ein kleines Gewebestück (frisch oder gefroren) wurde in 2 ml Gewebe-Guanidinium-Lösung im Ultraturax 30 s lang zerkleinert und die Gewebereste bei 8000 g abzentrifugiert. Zu dem Überstand wurden 400 µl 10% Sarcosyllösung zugefügt, worauf die Lösungen gemischt und für 2 min bei 65 °C inkubiert wurden. Sodann wurden 0,2 g CsCl hinzugefügt. In ein SW56-Polyallomerröhrchen wurde 1 ml einer CsCl-Lösung vorgelegt und diese dann vorsichtig mit obigem Überstand überschichtet. Nach einer Zentrifugation über Nacht (mind. 6 h) bei 20 °C und 28000 UpM (Beckmann Ultrazentrifuge, SW-41-Rotor) wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 400 µl TE-Puffer resuspendiert, mit Phenol extrahiert, gefällt und in 100 µl DEPC-behandeltem ddH₂O aufgenommen.

Gewebe-Guanidinium-Lösung:	4M Guanidin-Isothiocyanat, 50 mM Tris/HCl pH 7,5 , 10 mM EDTA, 5% β-Mercaptoethanol, mit NaAc auf pH 5,2 einstellen
CsCl-Lösung	5,7 M CsCl, 100 mM EDTA

3.3.5. Isolation von polyA⁺-RNA aus Zellen

5 bis 6 fast konfluent bewachsene 15cm-Gewebekulturschalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Sodann wurden 10 ml STE-SDS-Lösung in die erste Schale gegeben, die Zellen lysiert, mit einem Einmalzellschaber verrührt und in die nächste Schale überführt bis zur letzten Schale. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 300 µg/ml) wurde die Lösung in ein 50mm-Falcon Tube gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Sodann wurde die Lösung mit 5M NaCl auf eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl gebracht, etwa 100 mg Oligo dT-Cellulose (in Ladepuffer) zugegeben und über Nacht auf einem Rotator bewegt. Am nächsten Tag wurde die Oligo-dT-Cellulose durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 5000 UpM in einer Tischzentrifuge pelletiert, das Pellet dreimal mit Ladepuffer und einmal mit Waschpuffer gewaschen und sodann die poly-A⁺-RNA in 2 Schritten mit 1 und 2 ml 0,2 % SDS eluiert.

STE-SDS:	100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS
----------	---

Waschpuffer:	100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2 % SDS
Ladepuffer:	400 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 0,2 % SDS

3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient zur Amplifikation von DNA Sequenzen. Zu der jeweils als Matrize benutzten DNA (50 ng) wurden die beiden Oligonukleotide (je 50pmol), Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in einer Endkonzentration von 0,2 mM und 10 ml 10x PCR-Puffer sowie 5 U Taq-DNA-Polymerase hinzugegeben und das Volumen mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz mit 50 µl Mineralöl überschichtet und in einen Thermocycler gestellt. Mit Hilfe des Thermocyclers wurde folgendes Inkubations-Profil 35 mal wiederholt: 1 min 95°C (Denaturierung), 2 min X°C (Anlagern der Oligonukleotid-Primer an die verwendete DNA-Matrize) und 1-3 min 72°C (Strangverlängerung durch die Taq-Polymerase). Anschließend wurde ein 5 µl Aliquot der Reaktion in einem Agarosegel aufgetrennt und das amplifizierte DNA-Fragment durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die Temperatur X°C wurde für die jeweiligen Oligonukleotide optimiert.

10x PCR-Puffer: 400 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,8; 50 mM MgCl₂;
0,1%(w/v) Gelatine

3.5. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen

3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8% bis 2,5% Agarose-Gele benutzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 50 ml TBE versetzt und

durch Kochen geschmolzen. Nach Zugabe von 3 μ l Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) wurde das Gel in eine horizontale Gelapparatur gegossen, wobei mit Hilfe eines Kammes Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart wurden. Nach ca. 30 min wurde der Kamm entfernt und das Gel mit TBE überschichtet. Die Proben wurden in Glycerin-Ladepuffer aufgenommen und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Lichtkasten sichtbar gemacht und fotografiert.

TBE: 90 mM Tris; 90 mM Borat; 2,5 mM EDTA
6 x Glycerin-Ladepuffer: 10 mM EDTA pH 8; 60%(v/v) Glycerin;
0,02%(w/v) Bromphenolblau

3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Im allgemeinen wurden 1% ige Agarosegele benutzt. Ein Gramm Agarose wurde mit 86 ml ddH₂O und 5 ml 20 x MOPS-Puffer zum Lösen der Agarose gekocht, die Lösung wurde mit ddH₂O wieder auf 86 ml gebracht, auf 60 °C abgekühlt und sodann mit 9 ml 37 % Formaldehyd gemischt und in eine horizontale Gelapparatur gegossen.

Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die RNA-Lösung wurde mit einem Volumen Formamid-Denaturierungspuffer versetzt, 10 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis gekühlt, mit 1/6 Volumen 6x Glycerin-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 Volt für etwa 3 Stunden.

MOPS-Puffer: 20 mM MOPS, 5 mM NaAc, 0,5 mM
EDTA, pH 7,0
Formamid-Denaturierungspuffer:- 35 μ l Formaldehyd (37%), 1 μ l
Ethidiumbromid (10 mg/ml), 10 μ l 20x
MOPS, 100 μ l deionisiertes Formamid, 54
 μ l H₂O

3.5.3. Denaturierende Harnstoff-Gelelektrophorese

Für die denaturierende Gelelektrophorese von DNA oder RNA wurde ein Gel aus einer 6% Acrylamid/8 M Harnstoff-Gellösung hergestellt. Als Elektrophoresepuffer diente TBE. Das Gel wurde vor der Elektrophorese 30 min bei 1200 V vorlaufen gelassen. Anschließend wurden die Taschen mit TBE gespült. Die DNA-Probe wurde mit Formamid-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 95°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und sofort auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 1200 V für 1,5-4 h. Nach dem Lauf wurde eine Glasplatte angehoben, das Gel auf ein 3MM Filterpapier aufgezogen und auf einem Geltrockner getrocknet. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und bei -80°C exponiert.

10x TBE:	0,9 M Tris; 0,9 M Borat; 25 mM EDTA
6%Acrylamid/8M Harnstoff-Gellösung:	100 ml Acrylamid:Bisacrylamid (30:0,8) Stammlösung; 50 ml 10x TBE; 250 g Harnstoff; auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Formamid-Probenpuffer:	20 mM EDTA pH 8; 99% Formamid, 0,03% Xylencyanol; 0,03% Bromphenolblau

3.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der Methode von Lämmli (1970). Die Trenngellösung wurde durch Mischen von Trenngelpuffer, ddH₂O, Acrylamid-Stammlösung, SDS-Lösung und APS-Lösung hergestellt und hat eine Endkonzentration von 375 mM Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS. Die Polyacrylamid-Konzentration des Trenngels lag, je nach Verwendung, zwischen 8 und 15% und wurde durch entsprechendes Verdünnen der Acrylamid-Stammlösung mit den anderen Komponenten der Trenngellösung eingestellt. Das Starten der Polymerisation erfolgte durch Zugabe von TEMED in einer Endkonzentration von 0,01%. Die Trenngellösung wurde zwischen zwei, durch Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen und während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Für die Sammelgellösung wurde die Acrylamid-Stammlösung mit Sammelgelpuffer, ddH₂O, SDS-Lösung und APS-Lösung so gemischt, daß die Sammelgellösung eine Endkonzentration von 4% Acrylamid in 125

mM Tris pH 6,8; 0,1% SDS und 0,1% APS hatte. Nachdem das Trenngel polymerisiert und das Isopropanol entfernt war, wurde zum Starten der Polymerisation der Sammelgellösung TEMED in einer Endkonzentration von 0,01% hinzugefügt und damit das Trenngel überschichtet. Anschließend wurde ein entsprechender Kamm eingesetzt. Die Proben wurden in 2x Probenpuffer aufgenommen, vor dem Auftragen 5 min bei 95°C denaturiert und bei Bedarf 30 s im Branson Sonifier homogenisiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte von der Kathode zur Anode bei 25 mA. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde in den meisten Fällen vorgefärbte Eichproteine in einer Spur des Gels aufgetrennt.

Acrylamid-Stammlösung:	30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (v/w) Bisacrylamid
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris pH 6,8
Elektrodenpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS
SDS-Lösung	10%(w/v) SDS
APS-Lösung	10%(w/v) APS
2x Probenpuffer:	125 mM Tris pH6,8; 200 mM DTT; 20% Glycerol; 4% SDS; 0,01% Bromphenolblau

3.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Fragmentisolierungen aus Agarosegelen wurden mit Hilfe des Jetsorb-Kits (Genomed) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wurde das Gelstück in Gegenwart von 3 Volumenteil (v/w) Puffer 1 sowie 10 µl Silica-Matrix je 100 mg Gel für 10 min bei 50°C geschmolzen.

Nachdem das Gel aufgelöst war, wurde für 1 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, 14000 UpM), der Überstand verworfen und das Pellet mit Puffer 1 gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet mit Puffer 2 gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und die DNA mit 20-100 µl TE-Puffer pH 7,8 bei 50 °C für 10 min eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA spektralphotometrisch bestimmt.

Pufferzusammensetzung nicht bekannt.

3.7. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

3.7.1. Radioaktive Markierung von DNA nach der "Random-Priming"-Methode

DNA-Sonden wurden unter Verwendung des Rediprime-Kits (Amersham) gemäß den Herstellerangaben radioaktiv markiert.

Hierzu wurden 20-100 ng der gereinigten DNA-Sonde in 45 µl ddH₂O aufgenommen, bei 95 °C für 10 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und die Lösung sodann in das Reaktionsgefäß überführt, in dem sich bereits in lyophilisierter Form Reaktionspuffer, Desoxynukleotide sowie das Enzym befanden. Nach vorsichtiger Resuspendierung derselben wurden 5 µl α-³²P-dCTP zugegeben, gemischt und die Reaktion bei 37 °C für 15 min inkubiert. Nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide wurden anschließend durch Gelfiltration (G-50-Sepharose) entfernt.

3.7.2. Radioaktive Markierung von RNA durch *in-vitro* Transkription

Für die *in-vitro* Transkription wurde der entsprechende Vektor mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert. Durch die Wahl des jeweiligen Restriktionsenzym und die Verwendung von T7- bzw. SP6- oder T3-Phagen-RNA-Polymerase war es möglich, sowohl "antisense" wie auch "sense"-Transkripte herzustellen. Nachdem das Plasmid mit dem jeweiligen Restriktionsenzym linearisiert war, wurden die Enden der Schnittstellen aufgefüllt, um eine unspezifische Initiation der Transkription an etwaigen 3'-überhängenden Enden zu verhindern. Sodann wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die DNA ausgefällt. Nach dem Waschen und Trocknen wurde das linearisierte Plasmid in ddH₂O in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Danach wurde der Transkriptionsansatz zusammengemischt. In einem Volumen von 20 µl wurden 10 µg DNA mit 2 µl 10x TSC-Puffer, 2U RNasin, 4 µl 100 mM DTT, 625 µM rNTPs (ohne UTP), 50 mCi α-³⁵S-UTP und 30 U Phagen-RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6) inkubiert. Anschließend wurde dem Transkriptionsansatz 5-10 µg t-RNA und 3 U Rnase-freie DNase hinzugefügt und die Plasmid-DNA für 15 min bei 37°C verdaut. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Zur Entfernung nicht eingebauter Radioaktivität wurde die RNA zweimal mit 2 M NH₄Cl und 2,5 Volumina Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation

(Tischzentrifuge, 10 min, 13000 UpM) wurde das Pellet getrocknet und in 53 µl 100 mM DTT aufgenommen. Ein 1 µl Aliquot wurde im Szintillationszähler gemessen, und 2 µl in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Die restliche Probe wurde wieder in 2 M NH₄Cl aufgenommen, mit 2,5 Volumina Ethanol versetzt und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

10x TSC-Puffer: 0,4 M Tris pH 8; 100 mM MgCl₂; 200 mM DTT; 100 mM NaCl; 40 mM Spermidin; 0,5 mg/ml BSA

3.8. Blot-und Hybridisertechniken

3.8.1. Transfer von DNA auf Nylonmembranen

Zum Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen wurde die Kapillarblottechnik angewandt, eine genaue Beschreibung des Versuchsaufbaus findet sich in Maniatis (1982). Der Transfer erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 0,4 M NaOH über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham). Im Anschluß wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und bis zur Hybridisierung bei 4°C aufbewahrt.

3.8.2. Transfer von RNA auf Nylonmembranen

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA erfolgte wie im Southern-Transfer von DNA, jedoch wurde als Transferpuffer 20x SSC verwendet. Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (120 mJ, Stratagene UV-Crosslinker) auf der Membran fixiert und diese in 2x SSC gewaschen. Die Aufbewahrung bis zur Hybridisierung erfolgte ebenfalls in 2x SSC bei 4°C.

3.8.3. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen erfolgte mittels einer Semi-Dry-Elektroblotting-Apparatur (Biorad).

Nach der Elektrophorese wurde hierbei das SDS-Polyacrylamidgel für 10 min in Blotting-Puffer äquilibriert. Dann wurde das Gel auf eine ebenfalls in Blotting-Puffer äquilibrierte Nitrozellulose-Membran gelegt, zwischen je drei Lagen feuchtes 3MM-Papier gepackt und in der Semidry-Apparatur fixiert. Die Membran wurde so in die Transferkammer eingesetzt, daß die Membran zur Anode hin orientiert war. Die Überführung der Proteine auf die Membran erfolgte bei Raumtemperatur, $5,5 \text{ mA/cm}^2$ konstanter Stromstärke und einem Limit von 20 V für 30 min bis 1 h. Die Aufbewahrung der Membran erfolgte in 5% Milchpulver in PBS bei 4°C .

Blotting-Puffer : 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol

3.8.4. Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen (Prähybridisierung) wurde die Membran für mindestens 1 h in einem Zylinder mit 5 ml Hybridisierungslösung bei 65°C inkubiert. Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA bei 95°C für 5 min denaturiert und zu der, auf 10 ml reduzierten, Hybridisierungslösung hinzugegeben. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 65°C . Überschüssige Probe wurde durch mehrmaliges Waschen der Membran in Puffern mit sinkender Salzkonzentration entfernt (Zweimal 15 min mit 2x SSC, 0,1% SDS, 15 min mit 1x SSC, 0,1% SDS, 15 min mit 0,1x SSC, 0,1% SDS). Die Membran wurde anschließend in Folie eingeschweißt und die radioaktiven Signale durch Autoradiographie visualisiert.

20x SSC:	3M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat
100x Denhardt's Lösung:	2% Ficoll; 2% PVP; 2% BSA
Hybridisierungslösung:	6x SSC; 5x Denhardt's Lösung; 0,5% SDS; 100 mg/ml Heringssperma-DNA

3.8.5. Detektion immobilisierter Proteine mit spezifischen Antikörpern

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran nach Beendigung des Transfers zunächst für eine Stunde in Blocking-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurde die Membran mit Blocking-Lösung (1-2 ml/10 cm² Membran) und Primärantikörper (Verdünnung antikörperspezifisch zwischen 1:100 und 1:4000) in Folie eingeschweißt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur bewegt. Im Anschluß daran wurde die Membran dreimal je 5 min mit Blocking-Lösung gewaschen, worauf sie mit Blocking-Lösung (1-2 ml/cm² Membran) und Peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper in Folie eingeschweißt und 45 min bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung inkubiert wurde. Daraufhin schlossen sich wiederum drei Waschschriffe von 5 min in Blockierlösung und ein Waschschriff in PBS an.

Die Detektion erfolgte mittels des ECL-Kits (Amersham). Hierbei wurde die entsprechende Menge Reagenz 1 mit derselben Menge Reagenz 2 gemischt und auf die Membran aufgetragen. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit Zellstoff die überschüssige Flüssigkeit entfernt, die Membran in Zellophanfolie gepackt und Röntgenfilme für unterschiedliche Zeiten aufgelegt.

Blocking-Lösung: 5% Milchpulver in PBS, 0,1 % Tween.
Die Zusammensetzung der Reagenzien des ECL-Kits ist nicht bekannt

3.8.6. Proteingel-Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Das Gel wurde 1 h in Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde durch Inkubation in Entfärbelösung nach Sicht entfärbt.

Färbelösung: 0,25%(w/v) Coomassie Brilliant Blau R250; 40%(v/v) Methanol;
10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung: 40%(v/v) Methanol; 10%(v/v) Essigsäure

3.8.7. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford. Konzentriertes Bradford-Reagenz (BioRad) wurde mit ddH₂O 1:4 verdünnt. 190 µl gebrauchsfertiges Bradford-Reagenz wurde mit 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung gemischt. Als Konzentrationsstandard wurden Proteinlösungen bekannter Konzentration verwendet. Nach 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand der gemessenen Werte der Proteinlösungen bekannter Konzentration konnte der Proteingehalt in der zu bestimmenden Probe errechnet werden.

3.9. Zellkultur

3.9.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in Falcon-Gewebekulturflaschen oder Falcon-Gewebekulturpetrischalen in Fibroblasten-Kulturmedium bei 37 °C und 6% CO₂ kultiviert. Transfizierte Zelllinien, welche das Puromycin-Resistenzgen exprimieren, erhielten zusätzlich das Antibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 1 bis 2,7 µg/ml. Zum Passagieren wurden die adhärent wachsenden Zellen mit 1 ml 0,25% Trypsin in PBS abgelöst, entsprechend verdünnt und in frisches Medium eingesät.

Fibroblasten-Medium: DMEM, 10 % FCS, 1 % PenStrep

3.9.2. Transfektion eukaryotischer Zellen durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation

Zur Transfektion von Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/9 cm-Kulturschale ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Sodann wurde 20 µg der entsprechenden DNA mit 0,5 ml 0,25 M CaCl₂ gemischt und unter starkem Schütteln in 0,5 ml 2x BBS pipettiert. Die Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise unter Schwenken der Petrischale auf die Zellen gegeben. Nach

Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 35°C und 3% CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

2xBBS: 50 mM BES, pH 6,95; 280 mM NaCl, 1,5 mM
 Na₂HPO₄

3.9.3. Selektion und Isolation von Zellklonen

Zur Erzeugung stabiler Transfektanden wurden Zellen zunächst mit 20 µg des entsprechenden DNA-Konstruktes sowie 0,5 µg eines Resistenzplasmids (pPuroBabe) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden trypsinisiert und 1:10 verdünnt in neue Petrischalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde zur Selektion stabiler Transfektanden das entsprechende Antibiotikum zugefügt (NIH 3T3-Zellen: 1 µg/ml Puromycin) und die Zellen für 1 bis 2 Wochen weiter kultiviert.

Kolonien, die nach der Selektion gewachsen waren und die mithin das Resistenzplasmid enthielten, wurden leicht antrypsinisiert (0,25 % Trypsin in PBS, 1 min) und die gelösten Zellklone mit einer Eppendorf-Pipette in eine 6-well-Platte in neues Medium überführt.

Nach der Expansion der Zellen wurde mittels PCR auf das Vorhandensein des entsprechenden DNA-Konstruktes und danach auf Expression der mRNA getestet.

3.9.4. Zellfärbung mit Hydroethidin

Zur Messung des Redoxzustandes der Zellen wurde der Farbstoff Hydroethidin (Polysciences) verwendet. Dieser blau fluoreszierende Farbstoff wird leicht von Zellen aufgenommen und durch Radikale, Peroxide und wasserstoffabspaltende Enzyme in die rot fluoreszierende Verbindung Ethidium umgesetzt. Das Ethidium ist geladen und kann damit die Zelle nicht mehr verlassen, es interkaliert in die DNA und fluoresziert nach Anregung durch sichtbares (535 nm) oder ultraviolettes (370 nm) Licht.

Zur Messung wurden 10⁵ bis 10⁶ Zellen abtrypsinisiert, mit PBS gewaschen und in 300 µl PBS aufgenommen. Hierzu wurden 300 µl der Hydroethidin-Färbelösung gegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 min inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1 min bei 1500 UpM, Eppendorfcentrifuge), in 500 µl PBS aufgenommen und bis zur Messung auf Eis im Dunkeln aufbewahrt oder in Glyzergel eingebettet.

Hydroethidin-Stocklösung: 20 mg/ml Hydroethidin in DMF, Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff

Hydroethidin-Färbelösung: 5µl Hydroethidin-Stocklösung in 1 ml PBS

3.9.5. Trypsinieren von Zellen

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen, mit 0,05% Trypsin gespült und mit 0,05% Trypsin (1 ml pro 10 cm Kulturschale) für 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und bei 300 x g sedimentiert. Das Sediment wurde in frischem Medium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in gewünschter Dichte ausgesät.

3.9.6. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach dem Ablösen der Zellen durch Trypsin wurden die Zellen bei 300 x g sedimentiert, das Sediment in eiskaltem Einfrier-Medium aufgenommen, so daß die Zellzahl $2-5 \times 10^6$ /ml betrug, und auf Einfrier-Ampullen verteilt. Die Ampullen wurden schrittweise abgekühlt (1 h auf Eis, 2 h bei -20°C, 24 h bei -80°C).

Anschließend wurden die Ampullen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde eine Ampulle direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C Wasserbad überführt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in 5 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert, für 3 min bei 300 x g zentrifugiert und das Sediment in 10 ml frischem Medium resuspendiert und ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt.

Einfriermedium: Fibroblasten-Medium + 10% DMSO

3.10. Histlogische Techniken

3.10.1. Fixierung von Geweben

Entnommene Organe oder Gewebsproben wurden zunächst in PBS gewaschen, sodann wurden sie in frischer Fixierungslösung über Nacht fixiert, bevor sie wieder gewaschen, eventuell entkalkt und dann entwässert wurden. Die Entkalkung erfolgte in Morse`s Reagenz für 2 bis 4 Tage.

Entwässert wurden die Organe und Gewebe über eine Standard-Alkoholreihe, je nach Organgröße für 1-5 Stunden/Schritt, zur längeren Aufbewahrung wurden die Proben in 70 % Ethanol gelagert.

Fixierlösung:	4% Paraformaldehyd in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
Morse`s Reagenz:	10% Natriumcitrat; 22,5% Ameisensäure

3.10.2. Einbettung in Paraffin

Die entwässerten Gewebe wurden aus dem 100 % Ethanol zunächst zweimal für je 1 Stunde in Aceton überführt, bevor sie dann für 2 Stunden in Xylol und weiter für 3 Stunden in Xylol:Histowax (1:1, 59 °C) überführt wurden. Schließlich wurden sie für mindestens 3 Stunden in Histowax (59°C) inkubiert. Die Gewebe wurden sodann in vorgewärmte Einbettungsförmchen überführt, mit frischem Histowax (60°C) übergossen und auf Eis schnell abgekühlt. Nach Entnahme aus den Einbettförmchen wurden sie bis zum Schneiden bei 4°C gelagert. Es wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 6 -10 µm zugeschnitten und bei 50°C im Wasserbad auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

3.10.3. Immunhistochemie

Zum immunhistologischen Nachweis von Proteinen wurden entweder Gefrierschnitte oder Paraffinschnitte verwendet. Gefrierschnitte wurden zur Fixation 5 min in Ethanol bei -20°C inkubiert, bevor sie in PBS gewaschen wurden. Zum Nachweis von Kollagen

IV-Untereinheiten wurden die Schnitte zusätzlich für 45 min in 6M Harnstoff, 0,1M Glyzin pH 4 bei 4°C inkubiert.

Paraffinschnitte wurden über eine Standard-Alkoholreihe (2x Xylol, 100 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70% Ethanol, 50 % Ethanol, PBS) entparaffiniert. Sollte die Farbreaktion über einen peroxidasegekoppelten Zweitantikörper erfolgen, wurden durch Inkubation in 2% H₂O₂ zunächst endogene Peroxidasen inaktiviert. Sodann wurden die Schnitte in 10 % FKS/PBS zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert, im Falle des Kollagen-Nachweises wurde mit 10% Milchpulver/PBS geblockt. Nach der Blockierung wurde der Erstantikörper in 1% RSA/PBS (10 % Milchpulver/PBS bei Anti-Kollagen-Antikörpern) für 1 Stunde aufgetragen.

Nach dreimaligem Waschen in PBS (5 min) wurde der Zweitantikörper in 1% RSA/PBS aufgetragen und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung ungebundenen Antikörpers wiederum dreimal mit PBS gewaschen.

Im Falle der Kollagenfärbung, bei der ein fluoreszenzgekoppelter Zweitantikörper benutzt wurde, konnten die Schnitte sofort mit Glyzergel eingedeckt werden. Handelte es sich um einen peroxidasegekoppelten Zweitantikörper, so wurde zunächst für 5-10 min AEC-Färbelösung aufgetragen, bevor wiederum gewaschen, eventuell mit Hämatoxylin gegengefärbt und schließlich in Glyzergel eingedeckt wurde.

AEC-Stammlösung:	10 mg AEC + 1 ml DMF
AEC-Färbelösung:	50 µl AEC-Stammlösung, 1 ml Acetatpuffer, 1µl H ₂ O ₂
Acetatpuffer:	50 mM NaAc, pH 4,9

3.10.4. "In situ" Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung wurde nach dem Verfahren von Wilkinson und Green, (1990), durchgeführt. Alle Arbeiten erfolgten unter RNase freien Bedingungen.

Die Gewebeschnitte wurden durch Inkubation für zweimal 10 min in Xylol entwacht. Durch die absteigende Alkoholreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 30% Ethanol, je 2 min) wurden die Gewebe rehydriert. Nach zwei Waschsritten in PBS und 0,83%(w/v) NaCl für je 5 min wurden die Schnitte 20 min in Fixierlösung inkubiert. Nach erneuter Waschen in PBS (zweimal 5 min) wurden die Proteine im Gewebe mit Proteinase K (Endkonzentration 10 mg/ml in 20 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA) verdaut. Erneut wurde für 5 min mit PBS gewaschen und die Gewebe für weitere 5 min in Fixierlösung

inkubiert. Nach 5 min Waschen in PBS wurden positive Ladungen durch Inkubation (10 min) in Blockierungspuffer neutralisiert und damit unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Nach erneutem Waschen für 5 min in PBS wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe oben) dehydriert und anschließend bei RT getrocknet.

Die in Ethanol aufbewahrte radioaktive RNA-Probe wurden pelletiert (Tischzentrifuge, 14000 UpM, 10 min), mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 100 mM DTT (1/10 des Hybridisierungsvolumens) aufgenommen. Die RNA-Probe wurde 5 min bei 80°C denaturiert, anschließend in Hybridisierungspuffer aufgenommen und je 20 µl ($1,5 \times 10^5$ cpm/ml Hybridisierungslösung) auf einen vorhybridisierten Schnitt gleichmäßig aufgebracht und mit silikonisierten Deckgläschen abgedeckt. Zur Hybridisierung wurde eine Glasschale mit drei Lagen in 2x SSC getränktem 3MM-Whatman-Papier und einer Aluminiumfolie ausgelegt. Die Objektträger wurden in die Glasschale gelegt, die mit einem Deckel verschlossen und über Nacht bei 59 °C im Wasserbad inkubiert wurde. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte mit 2x SSC; 50% Formamid; 20 mM β-Mercaptoethanol (einmal 15 min bei 37°C, einmal 30 min bei 65°C, einmal 2-6 h bei 37°C) gewaschen. Danach wurden die Schnitte einmal 15 min bei 37°C in NTE inkubiert. Zur Entfernung einzelsträngiger RNA wurden die Gewebeschnitte für 15 min bei 37°C in NTE mit Rnase H (Endkonzentration 20 mg/ml) inkubiert. Nach erneutem Waschen in NTE (einmal 15 min bei 37°C) folgte ein weiterer Waschschrift in 2x SSC; 50% Formamid; 20 mM β-Mercaptoethanol (einmal 30 min bei 37°C). Abschließend wurde die Schnitte bei RT in 2x SSC (einmal 15min) und 0,1x SSC (einmal 15 min) gewaschen. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (siehe oben) wurden die Gewebe entwässert. Die Objektträger wurden bei RT getrocknet, ein Röntgenfilm aufgelegt und über Nacht exponiert. Anschließend wurden die Objektträger in der Dunkelkammer durch Eintauchen in eine 42°C warme, flüssige Photoemulsion (LM-1 Photoemulsion mit H₂O 1:1 verdünnt) beschichtet und im Dunkeln getrocknet. Die Objektträger wurden lichtdicht verpackt und je nach Stärke des Signals auf dem Röntgenfilm 5 bis 14 Tage bei 4°C exponiert. Anschließend wurde die Photoemulsion entwickelt (16% Kodak D-19 Entwickler 3min), fixiert (Eisessig 1 min, 30% Natriumthiosulfat 3 min), und gewässert (Leitungswasser zweimal 10 min und einmal 30 min). Die Objektträger wurden getrocknet und die Gewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt. Anschließend wurden die Objektträger mit dem Eindeckmittel Entellan eingebettet und mit einem Zeiss-Axioskop-Mikroskop im Hell- und Dunkelfeld analysiert.

Fixierlösung:	4%(w/v) Paraformaldehyd in PBS
Blockierungspuffer:	1,25%(v/v) Triethanolamin; 0,25%(v/v) Essigsäureanhydrid
20x SSC:	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

NTE: 0,5 M NaCl; 10 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA
Hybridisierungspuffer: 1x Hyb-Salz (10x Hyb-Salz: 0,2% PVP; 0,2% Ficoll; 0,38% NaH₂PO₄; 50 mM EDTA; 3 M NaCl; 0,1 M Tris pH 8); 50% Formamid; 10% Dextransulfat; 10 mM DTT; 0,01 mg/ml tRNA

3.10.5. Indirekte Immunfluoreszenz

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation in 4%(w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen durch Inkubation (15 min) mit 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen in PBS (dreimal 5 min) wurden durch Inkubation (10 min) mit Blockierungslösung unspezifische Bindungstellen abgesättigt und die Zellen anschließend mit den in Blockierungslösung verdünnten Primär-Antikörpern 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS (dreimal 5 min) wurden die Zellen 1 h bei RT mit dem in Blockierungslösung verdünnten Sekundär-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Glasplättchen nach erneutem Waschen in PBS (dreimal 5 min) in einem Tropfen Glyzergel auf einem Objektträger mit der zellbedeckten Seite nach unten eingebettet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter UV-Anregung mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop.

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM MgCl₂; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,6
Blockierungslösung: PBS; 10% FKS

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen am Innenohr von Mpv17-Mäusen

Die Mpv17-Maus ist eine rezessive transgene Mausmutante, welche im Alter von 2-8 Monaten an Glomerulosklerose und Nephrotischem Syndrom erkrankt. Die diesem Phänotyp am ähnlichsten erscheinende erbliche menschliche Nierenkrankheit ist das Kongenitale Nephrotische Syndrom von Finnischen Typus (CNS-F), welches auf Chromosom 19 kartiert (Kestilä *et al.*, 1994). Da das Mpv17-Gen auf Chromosom 2 (Karasawa *et al.*, 1993) lokalisiert wurde, also als Kandidatengen für CNS-F ausscheidet, soll nun eine weitere Charakterisierung der Mpv17-Mausmutante vorgenommen werden, um damit zusätzliche Hinweise auf eine mögliche Entsprechung des mutanten Phänotyps im Menschen zu gewinnen.

Aufgrund der durch klinische Daten manifestierten Beziehung von Niere und Innenohr war es naheliegend, zunächst das Innenohr von Mpv17-negativen Mäusen auf Defekte zu untersuchen.

4.1.1. Das Innenohr von Mpv17-negativen Mäusen zeigt starke Läsionen

Das Säugerinnenohr ist ein komplexes Organ mit Strukturen der Reizperzeption (z. B. Organ von Corti mit inneren und äußeren Haarsinneszellen), der Reizweiterleitung (z. B. Spiralganglion) sowie unterstützenden Strukturen (z. B. *Stria vascularis*), deren Unversehrtheit für den Hörprozeß von großer Bedeutung ist.

Um einen groben Überblick über mögliche histopathologische Veränderungen zu bekommen, wurden zunächst die Innenohren von Mpv17-Tieren sowie von Wildtyp-Kontrolltieren lichtmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden Paraffinpräparate von perfundierten, nach Bouin fixierten Mpv17-negativen und Wildtyp-Innenohren senkrecht zum Modiolus mit einer Dicke von 10 µm geschnitten, mit PAS gefärbt und optisch ausgewertet. Das Alter der untersuchten Tiere betrug 3-6 Monate.

Lichtmikroskopisch zu erkennen waren Veränderungen im Spiralganglion, im Cortischen Organ und in der *Stria vascularis*. Im einzelnen war eine reduzierte Anzahl

von Neuronen im Spiralganglion von Mpv17-negativen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu erkennen (Abbildung 4).

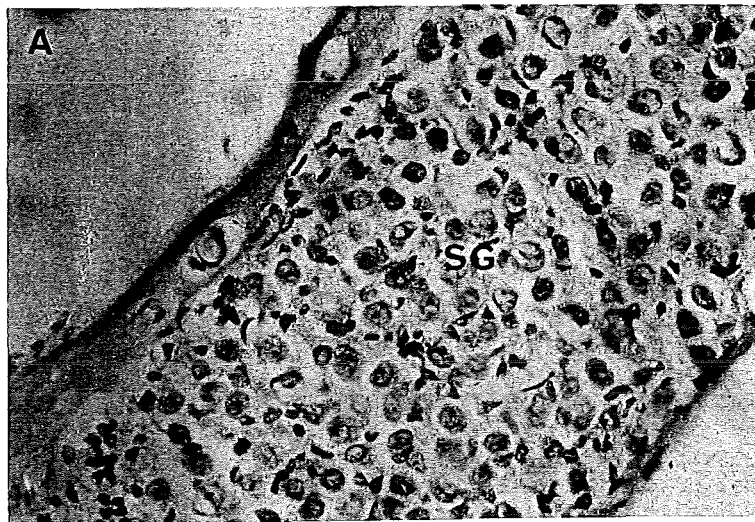
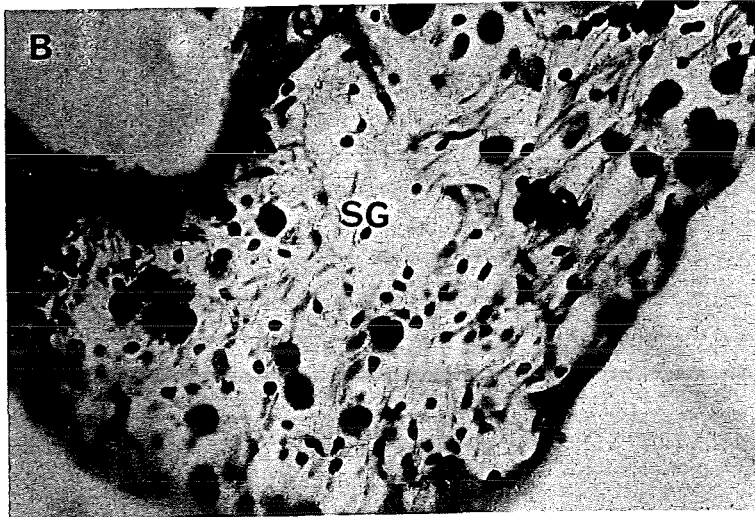


Abbildung 4:
Vergleich des
Spiralganglions
von Mpv17-
negativen und
Kontrolltieren

A: Wildtyp, B: Mpv17
Die Innenohren der Mäuse wurden präpariert, für 12 Stunden in Fixierlösung nach Bouin fixiert, über eine Alkoholreihe entwässert, in Histowax eingebettet und mit 10 μm Dicke geschnitten. Nach PAS-Färbung wurden die Schnitte in Entellan eingebettet und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Vergrößerung 400x

SG: Spiralganglion

Auch konnte eine teilweise Degeneration des Cortischen Organs in Mpv17-negativen Tieren festgestellt werden (Abbildung 5). Die äußeren Haarsinneszellen fehlen zumeist und sind durch wenig differenzierte Epithelzellen ersetzt, während die inneren Haarsinneszellen teilweise noch erhalten sind.

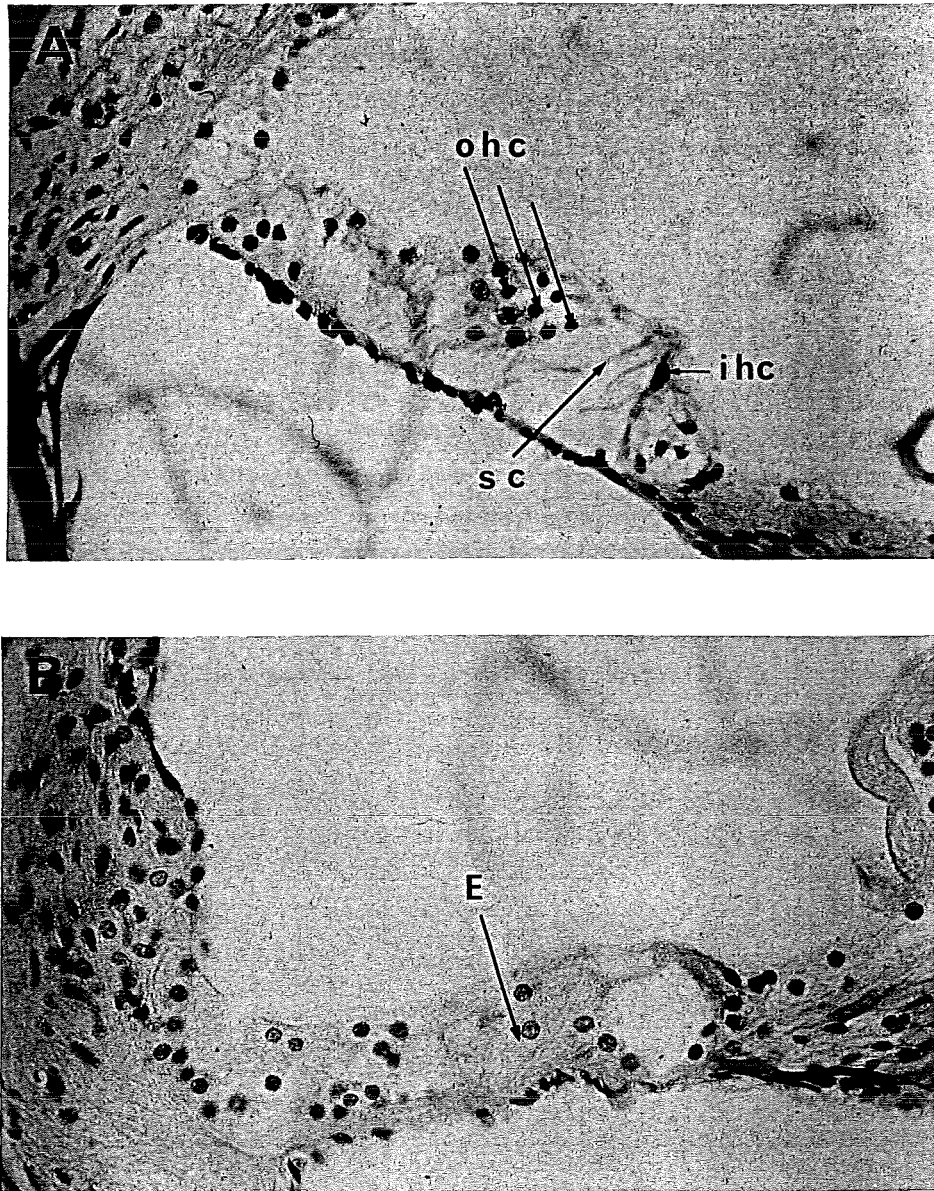


Abbildung 5 : Degeneration des Cortischen Organs in Mpv17-negativen Mäusen

A: Wildtyp, B: Mpv17.

Präparation wie in Abbildung 4.

In diesem Präparat waren auch die inneren Haarsinneszellen nicht vorhanden.

Vergrößerung 400x.

ohc: äußere Haarsinneszellen, ihc: innere Haarsinneszellen, sc: Säulen von Corti, E: Epithel

Diese Befunde werden auch durch ein Aufsichtsbild auf das Cortische Organ bestätigt. Zu dieser Untersuchung des Organs von Corti wurde die *Cochlea* in 2,5 % Glutaraldehyd fixiert, mit Osmium nachfixiert und über 70% Ethanol in Glycerin überführt. Sodann wurde die zweite Windung der *Cochlea* lateral geöffnet. Da ein Herauslösen der Tektorialmembran ohne Zerstörung der Haarsinneszellen nicht möglich war, wurden die Haarsinneszellen durch die Tektorialmembran hindurch mit der

Numarski-Optik aufgenommen. Während bei der Wildtyp-Kontrolle die drei Reihen der äusseren Haarsinneszellen deutlich sichtbar regelmässig angeordnet sind (Abbildung 6a), zeigen sich große Lücken bei den äusseren Haarsinneszellen von Mpv17-negativen Tieren (Abbildung 6b). Die inneren Haarsinneszellen erscheinen bei diesem Präparat normal.

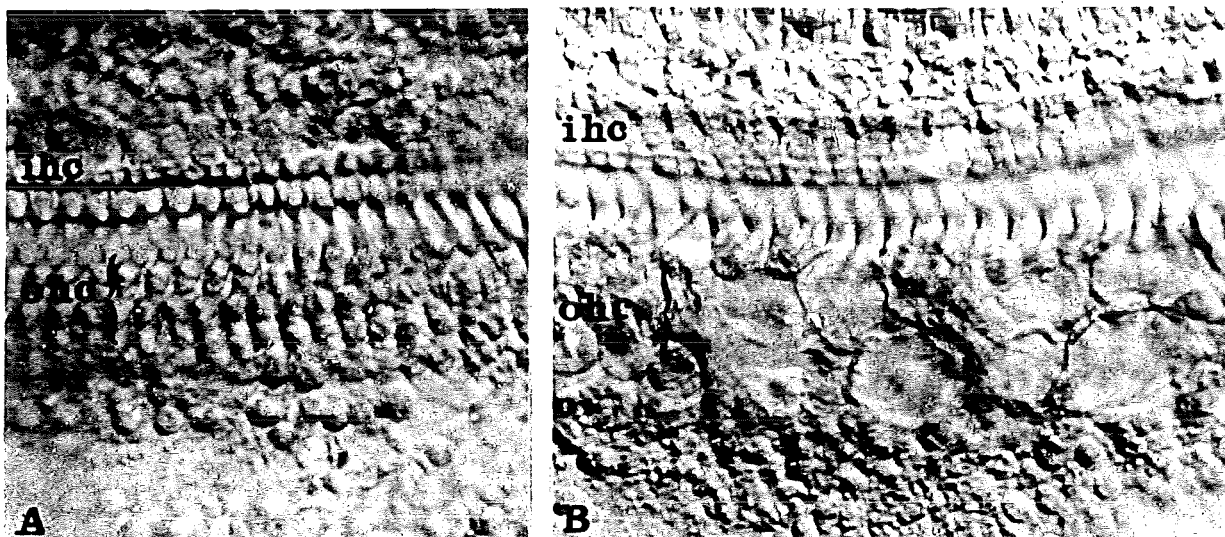


Abbildung 6 : Aufsicht auf das Cortische Organ

A: Wildtyp, B: Mpv17.

Die *Cochlea* wurde mit Glutaraldehyd und Osmium fixiert, lateral geöffnet und in Glycerin eingebettet.

Vergrosserung 400x

ohc: äussere Haarsinneszellen, ihc: innere Haarsinneszellen

Schließlich kann eine Reduktion in der Dicke der *Stria vascularis* gesehen werden (Abbildung 7). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß alle diese Veränderungen nicht zwangsläufig überall auf einem Präparat zu beobachten sein müssen, sondern vielmehr fokal auftreten. Wenngleich eine starke Schädigung des Cortischen Organs meist mit einer verminderten Neuronenzahl im Spiralganglion und einer stark veränderten *Stria vascularis* einhergeht, können bisweilen diese Veränderungen auch einzeln lichtmikroskopisch beobachtet werden. Auch zeigt sich häufig ein Gradient in den Strukturveränderungen des Cortischen Organs. So ist in den basalen Windungen der *Cochlea* das Organ von Corti zumeist stark verändert, während die apikalen Windungen derselben *Cochlea* lichtmikroskopisch völlig normal oder zumindest weniger stark verändert erscheinen.

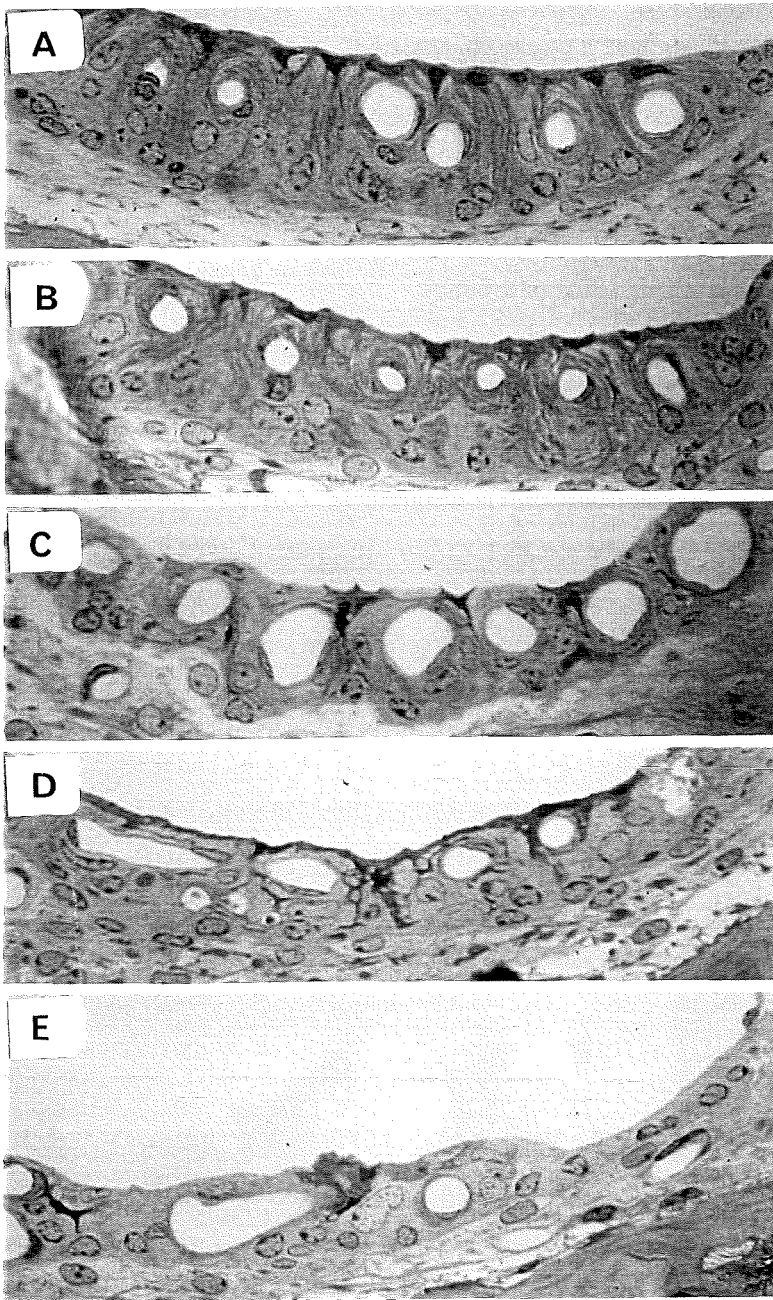


Abb. 7: Degeneration der *Stria vascularis* von Mpv17-negativen Mäusen

A: Wildtyp, B-E: Mpv17.
 Präparation wie in Abbildung 4.
 Beachtenswert die Variation im Ausmass der Degeneration: B-E stammen aus einer einzigen Cochlea, B: apikal bis E: basal.
 Vergrößerung 400x.
 sv: *Stria vascularis*, ls: *Ligamentum spirale*

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Innenohren von Mpv17-negativen Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen histopathologisch stark verändert sind. Aufgrund dieser massiven Änderungen in wichtigen Komponenten des Innenohres wurden diese Veränderungen sodann elektronenmikroskopisch weiter charakterisiert werden.

4.1.2. Der Innenohrdefekt in Mpv17-negativen Mäusen gleicht elektronenoptisch den Befunden bei Alport-Syndrom

Zur elektronenoptischen Untersuchung wurden die Innenohren nach der Fixation mit Glutaraldehyd mit Osmiumtetroxid nachfixiert, in Epon eingebettet und in einer Dicke von 100 nm geschnitten. Die Auswertung erfolgte optisch.

Die *Stria vascularis* besteht aus drei Zellschichten: den Basalzellen, den Intermediärzellen und den Marginalzellen. Die Funktion der *Stria vascularis* besteht im aktiven Ionentransport, was durch die Morphologie sowie die starke Expression von Na,K-ATPase-Untereinheiten in der *Stria vascularis* unterstützt wird (Nakazawa *et al.*, 1995, McGuirt und Schulte, 1994). Insbesondere sollte untersucht werden, ob die beobachtete Reduktion in der Dicke der *Stria vascularis* durch das Fehlen einer oder mehrerer der die *Stria* bildenden Zelltypen verursacht wird, wie dies bei der sogenannten "white spotting" Maus der Fall ist (Steel *et al.*, 1987, Schrott und Spöndlin 1987).

Im Gegensatz zu dieser Mutante, bei der die Intermediärzellen (Melanozyten) fehlen, waren in Mpv17-negativen Mäusen alle drei Zelltypen vorhanden (Abbildung 8).

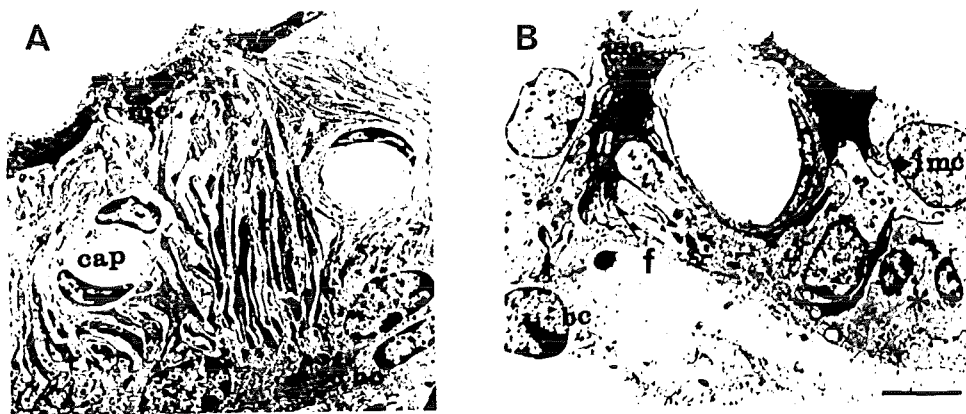


Abbildung 8 : Vergleich der *Stria vascularis* von Mpv17-negativen und Wildtyp-Mäusen

A Wildtyp, B Mpv17.

Vergrößerung 2000x

mc: Marginalzellen, ic: Intermediärzellen, bc: Basalzellen, cap: Kapillare, f: Basalfortsätze

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. A. Meyer z. Gottesberge zur Verfügung gestellt.

Es ist jedoch deutlich zu erkennen, daß die Marginalzellen von Mpv17-negativen Tieren weniger basale Fortsätze ausbilden als die Marginalzellen von Kontrolltieren: es sind weniger und dickere basale Faltungen der dunklen Zellen zu sehen. Weiterhin ist eine große Variation der Kapillardurchmesser in Mpv17-negativen Tieren zu beobachten, die von normalem Durchmesser bis zu stark vergrößertem Durchmesser reicht (siehe auch Abbildung 7).

Bei stärkerer Vergrößerung konnte beobachtet werden, daß die Basalmembran der Striakapillaren von Mpv17-negativen Mäusen stets verdickt und häufig longitudinal in mehrere Schichten aufgesplittet ist (Abbildung 9). Die Kapillaren des benachbarten *Ligamentum spirale* zeigen im Gegensatz dazu keine vergleichbare Verdickung oder Aufsplittung ihrer Basalmembranen. Ebenfalls bemerkenswert ist die Verdickung der endothelialen Zellschicht, welche in Mpv17-negativen Tieren beträchtlich dicker als in Kontrolltieren ist.

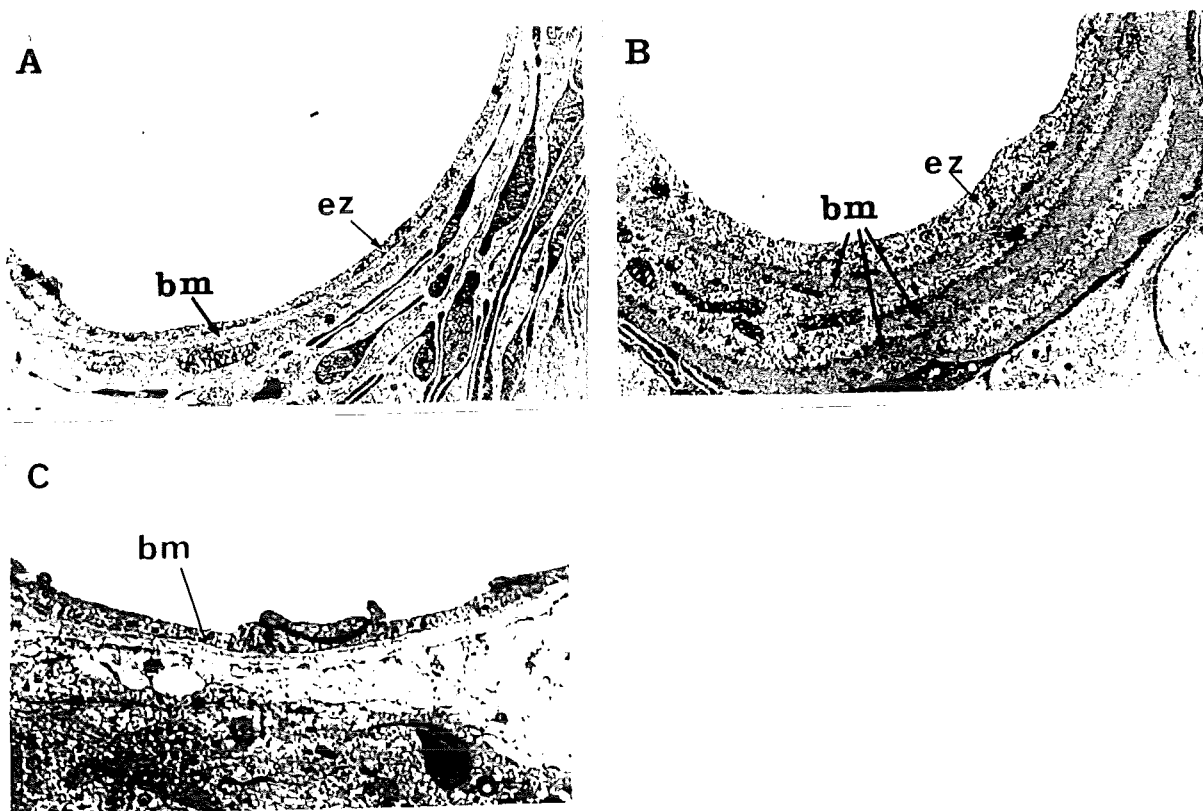


Abbildung 9: Aufsplittung der Basalmembranen der Striakapillaren in Mpv17-negativen Mäusen

A Striakapillare Wildtyp, B Striakapillare Mpv17, C Kapillare im *Ligamentum spirale* Mpv17.

Bemerkenswert ist die größere Dicke der Endothelzellen in der *Stria vascularis* von Mpv17-negativen Tieren.

Vergrößerung 10000x.

bm: Basalmembran ez: Endothelzellen

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. A. Meyer z. Gottesberge zur Verfügung gestellt.

Der Mpv17-Phänotyp zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit den bei Alport-Syndrom beschriebenen Innenohrveränderungen (Arnold und Weidauer, 1976). Hier wie dort kann eine Degeneration der *Stria vascularis*, eine Verdickung und Aufspaltung der Striakapillaren sowie eine reduzierte Zellzahl im Spiralganglion festgestellt werden. Zwar zeigen die Nieren von Mpv17-negativen Tieren nur eine Verdickung der glomerulären Basalmembran und keine longitudinale Aufspaltung in mehrere Lagen (Abbildung 10), wie dies häufig in den Nieren von Alport-Patienten der Fall ist (Rumpelt *et al.*, 1974), jedoch könnte dies auch auf die bisher zu geringe Zahl an untersuchten Nieren von Mpv17-negativen Mäusen oder auf den generellen Unterschied zwischen Maus und Mensch zurückzuführen sein. Insgesamt lässt die Ähnlichkeit der beiden Phänotypen möglicherweise auf einen ähnlichen Pathomechanismus, mithin also eine Störung des Stoffwechsels der Basalmembran, schließen.

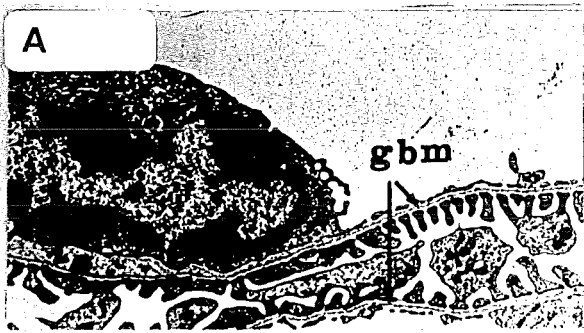


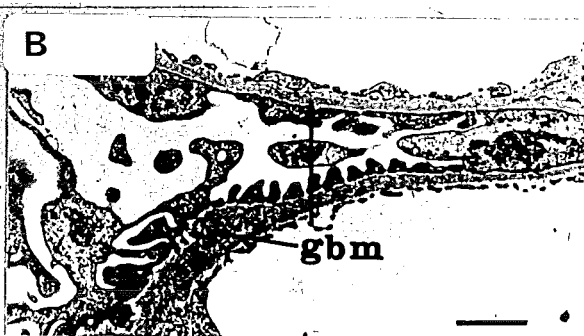
Abbildung 10: Verdickung der glomerulären Basalmembran von Mpv17-negativen Tieren

A Wildtyp, B Mpv17.

Vergrößerung 8000x

gbm: glomeruläre Basalmembran

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. A. Meyer z. Gottesberge zur Verfügung gestellt.



4.2. Analyse der Mpv17-Expression im Innenohr

4.2.1. Technik der *in-situ*-Hybridisierung und Synthese der Sonden

Die oben beschriebenen Läsionen werfen nun die Frage auf, ob es sich bei den beobachteten Schädigungen um einen direkten Effekt des fehlenden Mpv17-Proteins oder um einen sekundären Effekt handelt, welcher nur indirekt auf das Ohr Auswirkungen zeigt. Als notwendige, wenngleich nicht hinreichende Voraussetzung für einen direkten Effekt wäre eine Expression von Mpv17 im Innenohr zu postulieren. .

Da kein für Western Blot oder Immunohistochemie geeigneter Antikörper gegen das Mpv17-Protein vorhanden war, wurde die *in-situ*-Hybridisierungstechnik (Wilkinson und Green, 1990) gewählt., um die Expression des Mpv17-Gens im Innenohr nachzuweisen. Hierzu wurde eine RNA:RNA-Hybridisierung auf Gewebeschnitten vorgenommen (Leitch *et al.*, 1994). Mit dieser Methode ist es möglich, differentielle Genexpression im Organismus zu determinieren. Abbildung 11 gibt eine schematische Übersicht über den Ablauf einer *in-situ*-Hybridisierung.

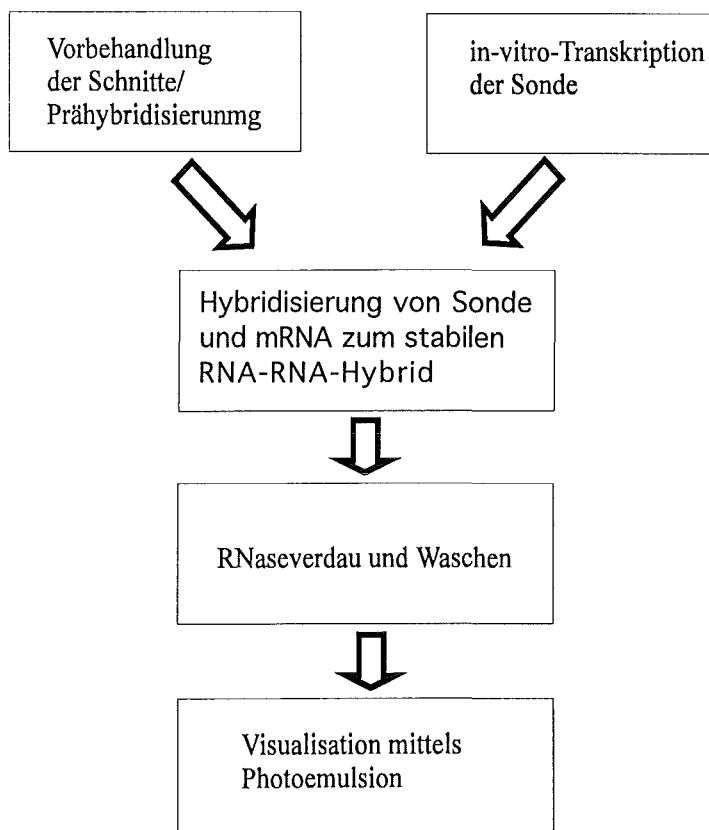


Abbildung 11: Schematische Darstellung der *in-situ*-Hybridisierungstechnik

Hierbei wird eine radioaktiv markierte RNA-Sonde *in vitro* synthetisiert. Diese *antisense* Sonde kann sodann unter geeigneten Bedingungen mit den auf dem Gewebeschnitt immobilisierten mRNA-Molekülen zu einem RNase-A-insensitiven Doppelstrang hybridisieren. Nach der Entfernung nichthybridisierter Sonden durch Waschen kann nun mit Hilfe von Photoemulsion, welche auf den Objektträger aufgetragen wird, das Hybridisierungssignal sichtbar gemacht werden. Als negative Kontrolle, um das unspezifische Hintergrundsignal zu bestimmen, dient die *sense* Sonde, welche aufgrund ihrer Orientierung nicht spezifisch mit der mRNA hybridisieren kann sowie Gewebeschnitte von Mpv17-negativen Mäusen, welche kein Mpv17-Transkript besitzen.

Um ein gutes Eindringen der Sonde in die Gewebeschnitte zu gewährleisten, sind RNA-Transkripte mit einer Länge von nicht mehr als 500 Basenpaaren am besten geeignet. Da die klonierte cDNA von Mpv17 mit 974 Basenpaaren für diesen Zweck zu lang ist, wurde ein Mpv17-Fragment von 383 Basenpaaren Länge in den Vektor pBluescript II KS kloniert. Weiterhin wurde als zusätzliches Konstrukt für *antisense*-Sonden mittels Polymerase-Kettenreaktion der 5'-Bereich des Mpv17-Gens amplifiziert und vor den 5'-Bereich der cDNA-Sequenz in pGEM 3 kloniert, so daß ein Konstrukt von Position -442 bis +160 entstand. Abbildung 12 zeigt die beiden Konstrukte und die Restriktionschnittstellen, welche zum Linearisieren benutzt wurden.

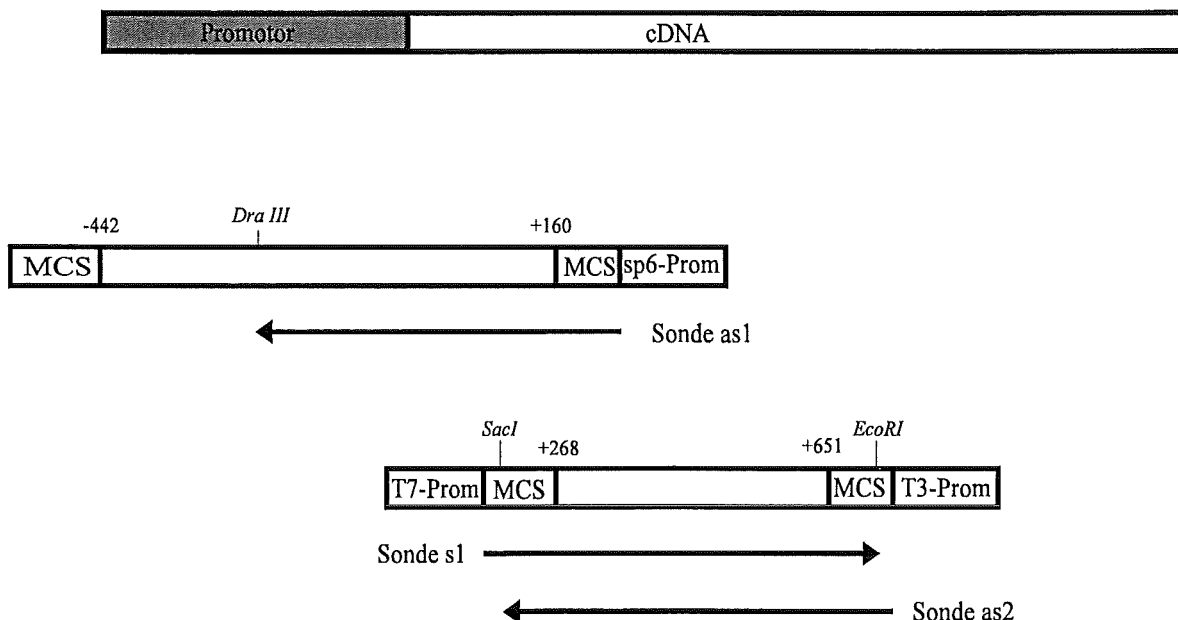


Abbildung 12: Konstrukte für die *in vitro* Transkription

MCS Multiple Cloning Site

Nach dem Linearisieren wurden die überhängenden Enden aufgefüllt, um einen unspezifischen Transkriptionsstart an dieser Stelle zu verhindern. Die *in vitro* Transkription mit *sp6*- bzw. T3 und T7-Polymerase ergab die erwarteten Fragmente von 449 bp für die *sense*-Sonde s1 und 394 bp beziehungsweise 502 bp für die *antisense* 1 bzw. 2 Sonden (Abbildung 13).

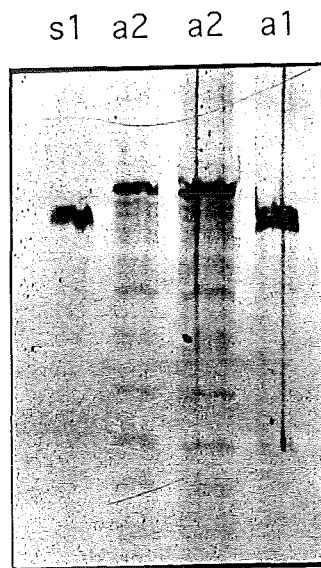


Abbildung 13:
Autoradiographie der *in vitro*-synthetisierten RNA-Sonden

s sense, a antisense

Diese wurden für die im folgenden beschriebenen *in situ*-Hybridisierungen verwendet.

4.2.2. Expression von Mpv17 im Innenohr

Um die mögliche Bedeutung des Mpv17-Gens für die Funktion des Innenohrs zu untersuchen, wurden Wildtyp-Kontrollmäuse und Mpv17-negative Mäuse im Alter von 4 Tagen getötet, ihre Köpfe in Paraformaldehyd fixiert, 2 Tage mit Morses Reagenz entkalkt und in Paraffin eingebettet.

Von den eingebetteten Köpfen wurden sodann 8 µm dicke Schnitte angefertigt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und vorhybridisiert. Anschließend wurde mit *sense* oder *antisense* Sonden hybridisiert, gewaschen, das Signal mit Photoemulsion visualisiert und die Schnitte mit Hämatoxylin gefärbt.

Die Expression von Mpv17 ist bereits früh in der Embryonalentwicklung, ab Tag 13 gd, nachzuweisen und ist relativ ubiquitär, wenn auch in sehr geringer Menge (Weiher *et al.*, 1990). Eine etwas stärkere Expression konnte bisher nur in Herz, Niere und Hirn, eine mittlere in Leber und Testis nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist eine Expression auch im Innenohr nicht unwahrscheinlich. Abbildung 14b zeigt die *in-situ*-Hybridisierung einer *Cochlea* einer Wildtyp-Maus.

Die Expression von Mpv17 ist in fast allen Zellen der *Cochlea* als schwaches, aber deutlich über dem Hintergrund abgehobenes Signal detektierbar. Verstärkt exprimieren die Zellen der *Stria vascularis* und des Spiralganglions das Mpv17-Transkript, während *Ligamentum spirale*, Reissnersche Membran und Cortisches Organ nur schwächere Signale zeigen. Im Gegensatz dazu zeigt die *sense*-Kontrolle auf Wildtyp-Gewebe (Abbildung 14c) sowie die *antisense*-Sonde auf Mpv17-negativem Gewebe (Abbildung 14d) nur ein sehr schwaches Hintergrund-Signal.

Dies ist auch in der Hellfeldaufnahme (Abbildung 15) deutlich sichtbar. Insbesondere im Spiralganglion (15a) und der *Stria vascularis* (15c) zeigt sich ein um die Zellkerne lokalisiertes Signal im Gegensatz zu *sense*-Kontrollen (Abbildung 15b und 15d) und Mpv17-negativen Tieren (Abbildung 15e), bei denen kein Signal detektierbar ist.

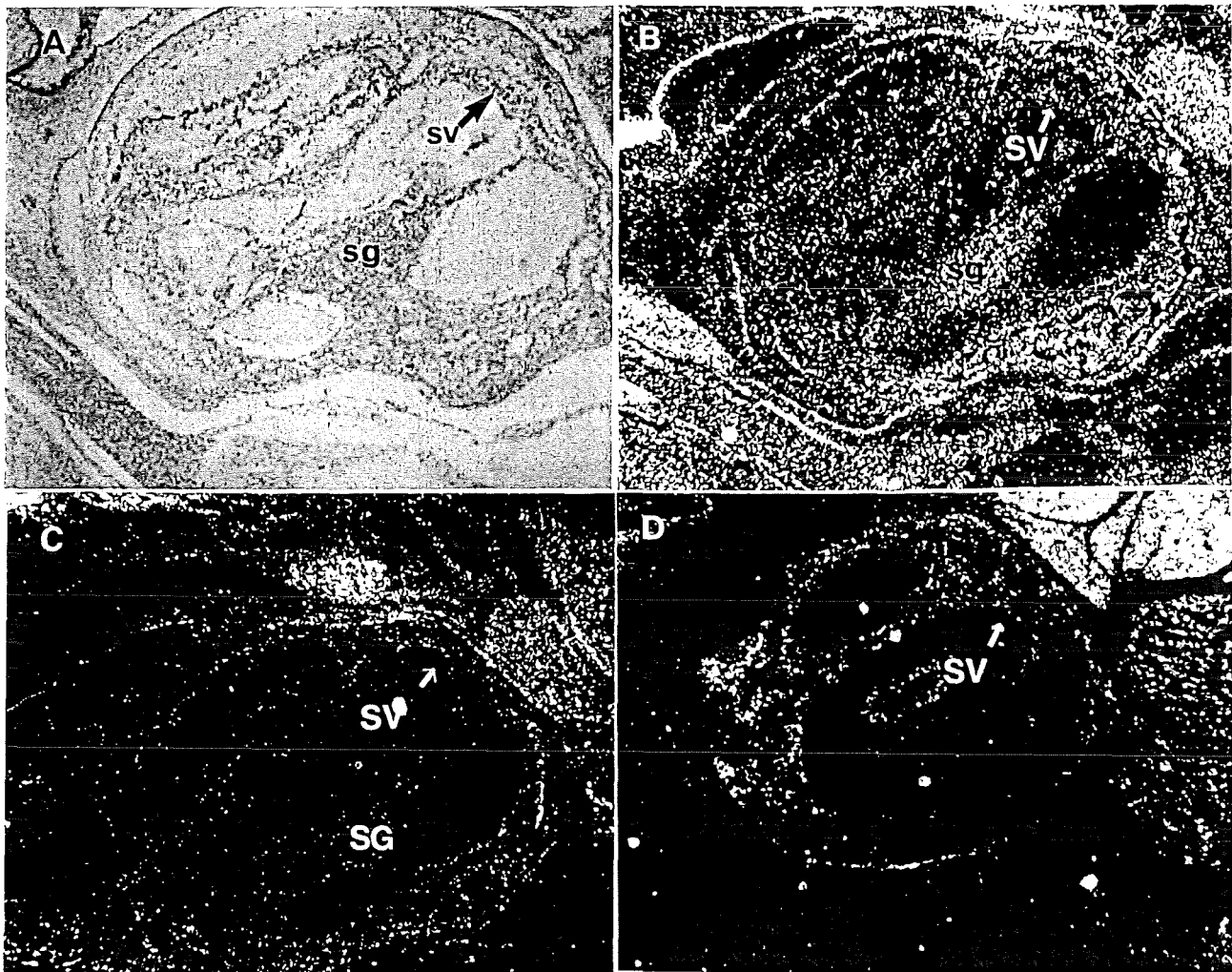


Abbildung 14: Expression des Mpv17-Transkriptes in der Cochlea

A: Hybridisierung mit der *antisense*-Sonde in einer Wildtyp-Cochlea, Hellfeldaufnahme B: Dunkelfeldaufnahme von A. C: *sense*-Kontrolle auf Wildtyp-Gewebe. D: Hybridisierung mit der *antisense*-Sonde in einer Mpv17-negativen Cochlea. Vergrößerung 50x.
sv: Stria vascularis, sg: Spiralganglion

Mpv17 wird somit in den Geweben der Cochlea verstärkt exprimiert, welche licht- und elektronenmikroskopisch sichtbare Läsionen zeigen. Eine Ausnahme bildet dabei das Cortische Organ, welches zwar deutliche Läsionen zeigt, jedoch eine verstärkte Expression von Mpv17 vermissen lässt.

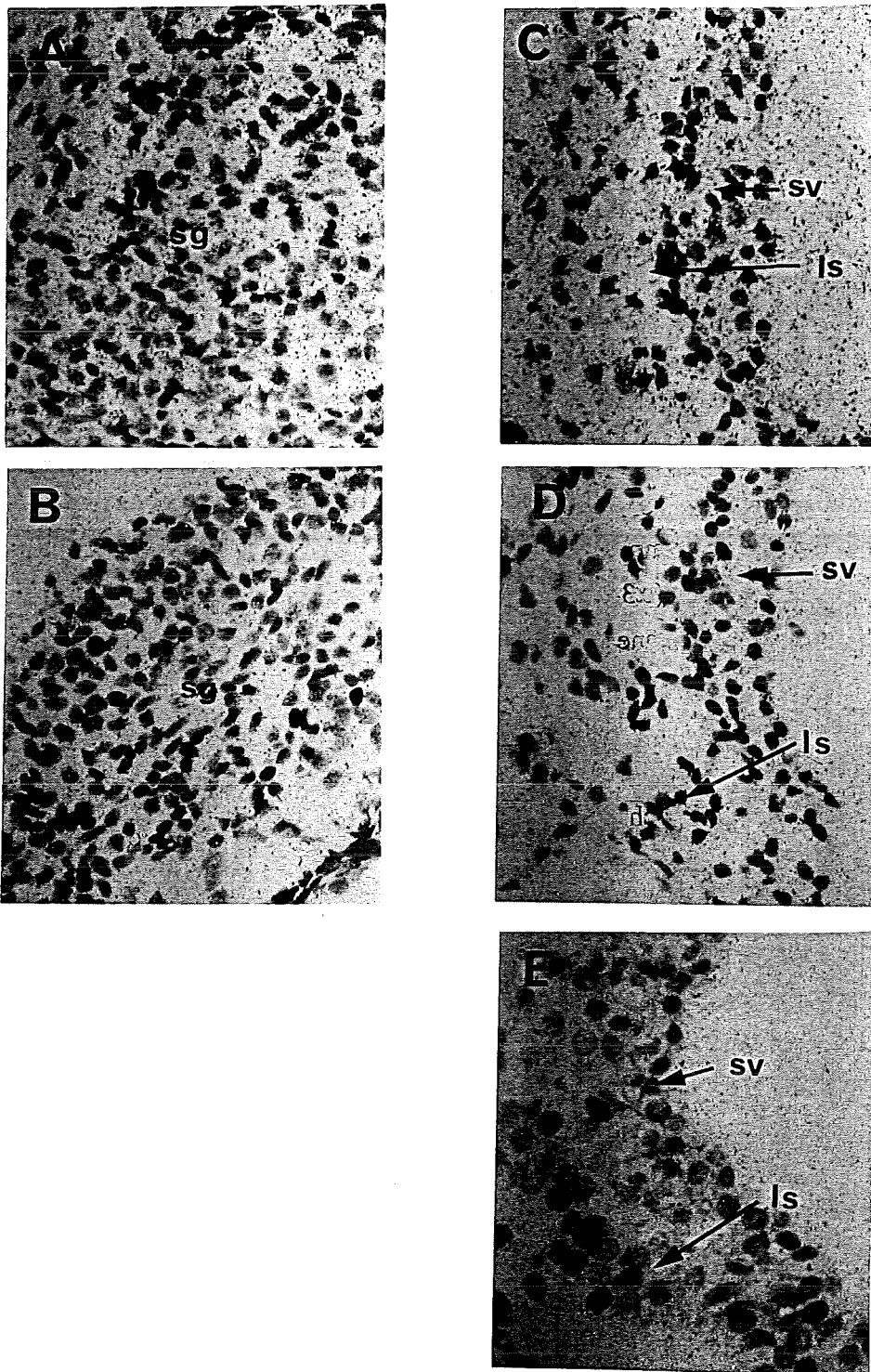


Abbildung 15: Expression von Mpv17 im Innenohr.

A, B Spiralganglion. A: Wildtyp hybridisiert mit *antisense*-Sonde. B: Wildtyp mit *sense*-Sonde.
 C, D, E *Stria vascularis* und *Ligamentum spirale*. C: Wildtyp hybridisiert mit *antisense*-Sonde, D: Wildtyp mit *sense*-Sonde, E: Mpv17 mit *antisense*-Sonde.
 Das Signal ist als schwarze Punkte gehäuft um die Zellkerne sichtbar, während bei *sense*- und Mpv17-negativen Kontrollen nur ein gleichmässiges Hintergrundsignal zu sehen ist. Vergrösserung 400x.
 sv: *Stria vascularis*, ls: *Ligamentum spirale*, sg: Spiralganglion

4.3. Untersuchung des Kollagen IV -Status von Mpv17-Mäusen

Die Ähnlichkeit des Mpv17-Phänotyps mit den für Alport-Syndrom beschriebenen Defekten legt den Schluß nahe, daß der Mpv17-Mutante ein ähnlicher Pathomechanismus zugrundeliegt. Als molekulare Ursache der X-gekoppelten Form des Alport-Syndroms wurden Mutationen im $\alpha 5$ -Gen des Typ IV-Kollagens identifiziert (Barker *et al.*, 1990), während bei der autosomalen Form Mutationen im $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Gen des Typ IV-Kollagens gefunden wurden (Mochizuki *et al.*, 1994).

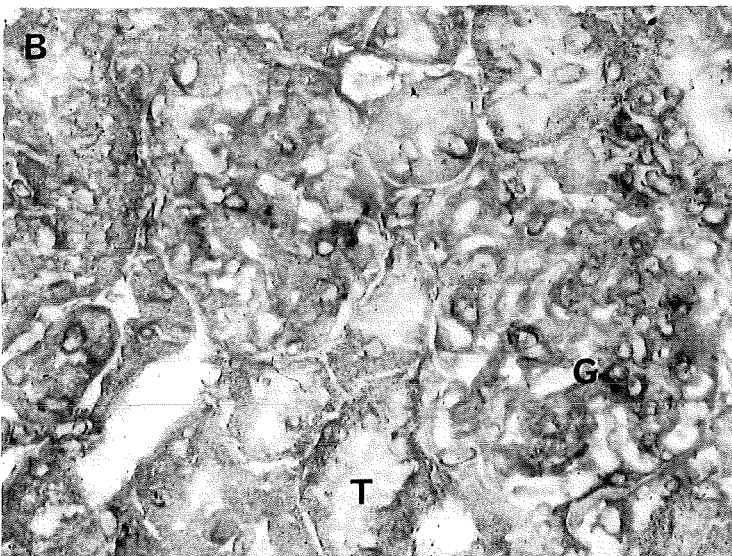
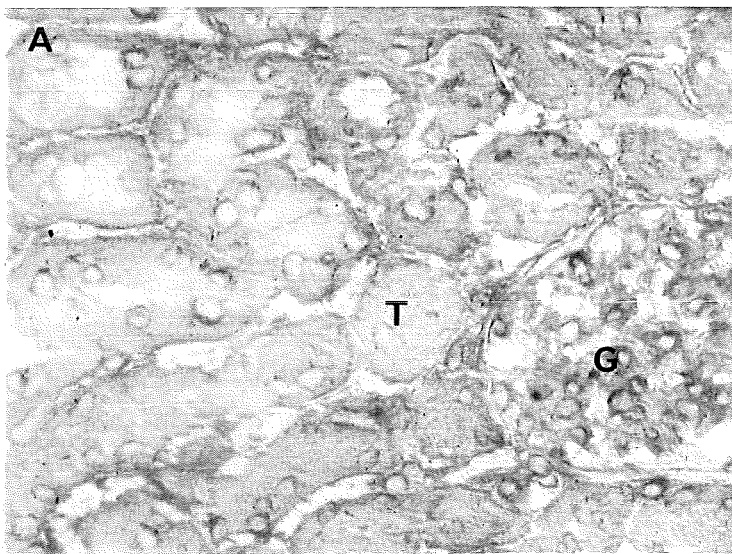
Typ IV-Kollagen ist zusammen mit Laminin einer der Hauptbestandteile der Basalmembranen. Es besteht aus einem Heterotrimer, welches in seiner häufigsten Form in allen Basalmembranen vorkommt und aus 2 $\alpha 2$ - und 1 $\alpha 1$ -Kette gebildet wird. Mit der Entdeckung weiterer Ketten ($\alpha 3$ - $\alpha 6$) (Übersichtsartikel: Hudson *et al.*, 1993) wurde jedoch klar, daß die Basalmembranen in den Kollagen IV-Isoformen variieren (Kleppel *et al.*, 1989; Sanes *et al.*, 1990). Dies bedeutet, daß zwar alle Basalmembranen Typ IV Kollagen beinhalten, jedoch in verschiedenen Isoform-Kombinationen, was möglicherweise der Grund für die funktionellen Unterschiede verschiedener Basalmembranen ist. Grundsätzlich scheinen die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten koexprimiert zu werden, ebenso wie die $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Ketten, welche nur in $\alpha 5$ -positiven Basalmembranen vorkommen (Miner *et al.*, 1994). Die $\alpha 6$ -Kette wird nicht mit der $\alpha 5$ -Kette koexprimiert (Ninomiya *et al.*, 1995).

Die Kollagen IV-Ketten sind häufig, wenngleich nicht immer, mit Laminin-Ketten assoziiert (Miner *et al.*, 1994).

Zur Untersuchung des Kollagen IV-Status von Mpv17-negativen Mäusen wurden zunächst Nieren von Mpv17-negativen und Kontrolltieren entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren, in Tissue-Tek eingebettet und bei -24°C in 8-10 μm dicke Schnitte geschnitten. Die Innenohren wurden mit 4% PFA beziehungsweise nach Carnoy fixiert, entnommen, in EDTA entkalkt, in Tissue Tek eingebettet und in 10 μm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden für 10 min in 100 % Ethanol bei -20°C nachfixiert, mit PBS gewaschen und für 1 h bei 4°C mit 6M Harnstoff, 0,1 M Glyzin pH 3,5 behandelt. Der Nachweis erfolgte immunhistochemisch mit Antikörpern, welche ein Epitop auf der $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Kette beziehungsweise die $\alpha 4$ und $\alpha 5$ -Ketten erkennen. Die Detektion erfolgte mittels fluoreszierender Sekundärantikörper oder über die Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode.

4.3.1. Niere und Striakapillaren zeigen verstärkte Kollagen IV $\alpha 1/\alpha 2$ -Expression

Das $\alpha 1/\alpha 2$ Heterotrimer stellt die verbreitetste Form des Typ IV-Kollagens dar. In der Niere ist diese Hauptform in allen tubulären Basalmembranen sowie im glomerulären *Mesangium* vorhanden (Abbildung 16a). Deutlich ist jedoch das stärkere Signal in den *Glomeruli* von Mpv17-negativen Mäusen zu bemerken (Abbildung 16b). Sowohl im *Glomerulus* als auch an den tubulären Basalmembranen zeigt sich eine deutlich stärkere Färbung in Mpv17-negativen Nieren verglichen mit den Nieren von Kontrolltieren.



**Abbildung 16 :
Immunhistochemische
Analyse der Kollagen
IV $\alpha 1/\alpha 2$ Ketten in
Nieren von
Kontrolltieren und
Mpv17-negativen
Tieren**

A: Wildtyp, B: Mpv17-Niere.

Kollagen IV $\alpha 1/2$ wurde auf Gefrierschnitten von 10 μ m Dicke mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Detektion erfolgte über einen peroxidasegekoppelten anti-Maus-Ig-Antikörper.

G: *Glomerulus*, T: *Tubulus*
Vergrößerung 100x

Im Innenohr färbt der $\alpha 1/\alpha 2$ -Antikörper die Basalmembranen der Gefäße von *Stria vascularis* und *Ligamentum spirale* sowie das Spiralganglion und die Nervenfasern in Rosenthals Kanal und *Modiolus* (Abbildung 17a, b). Bei stärkerer Vergrößerung ist eine stärkere Färbung in den Gefäßwänden der *Stria vascularis* von Mpv17-negativen Mäusen (Abbildung 17d) verglichen mit Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 17c) zu beobachten. Eine ähnliche Verstärkung konnte im Spiralganglion nicht beobachtet werden.

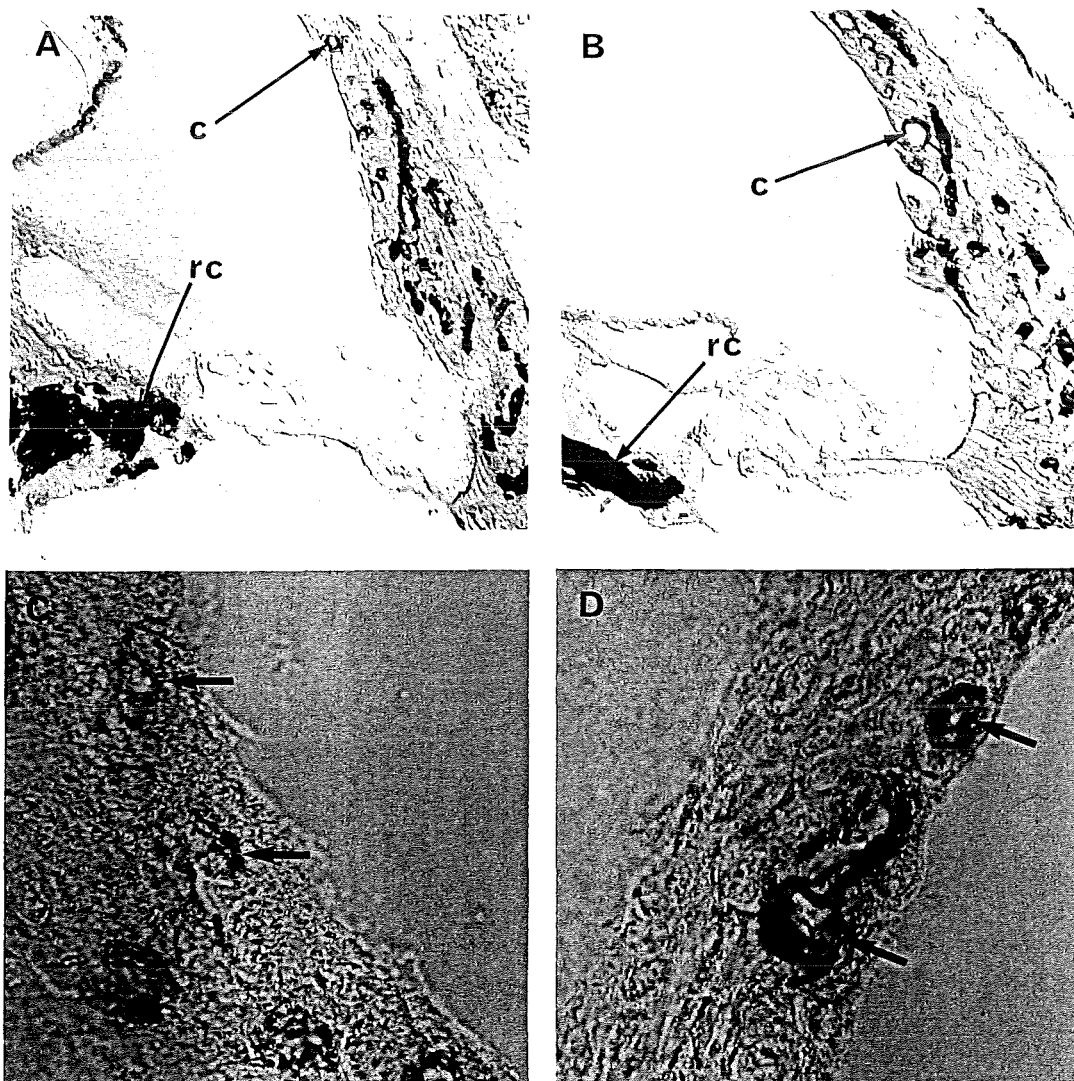


Abbildung 17: Kollagen IV $\alpha 1/\alpha 2$ im Innenohr von Mpv17-negativen und Kontrollmäusen

A, C Wildtyp; B, D Mpv17. C, D: Vergrößerung Striakapillaren
 Vergrößerung A, B : 100x, C, D: 400x.
 rc: Rosenthals Kanal, sg: Spiralganglion, c: Striakapillare

4.3.2. Keine Unterschiede in der Expression von Kollagen IV $\alpha 4$ und $\alpha 5$ zwischen Mpv17- und Wildtyp-Tieren

Da kein für IHC geeigneter Antikörpers gegen Kollagen IV $\alpha 3$ vorhanden war, wurde im weiteren die Expression von $\alpha 4$ (IV) und $\alpha 5$ (IV) untersucht. In den Nieren von jungen (<3Monate) Mpv17-negativen und von Kontrolltieren zeigt sich eine deutliche $\alpha 4$ (IV)-Expression in den *Glomeruli* und den meisten *Tubuli* (Abbildung 18).

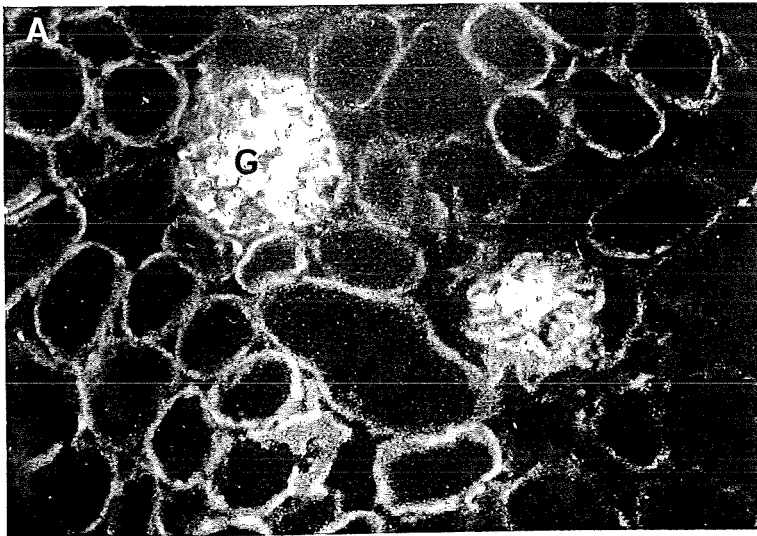
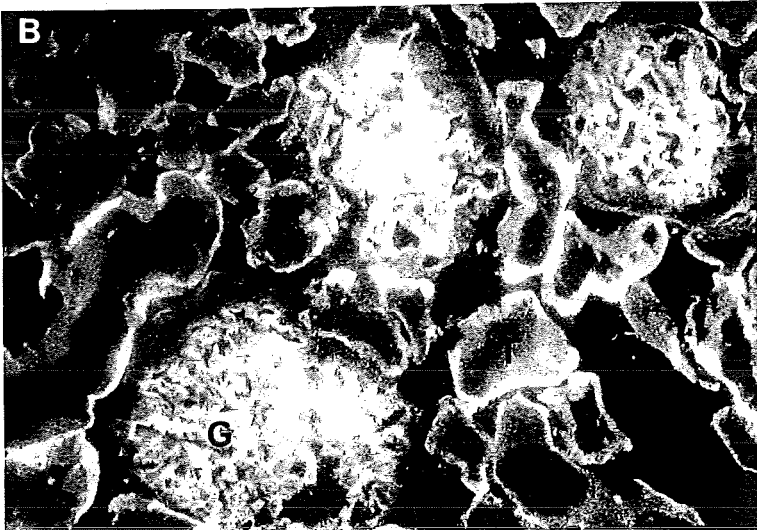


Abbildung 18: Kollagen IV $\alpha 4$ -Expression in der Niere.

A: Wildtyp, B: Mpv17.
 Präparation wie bei Abbildung 16. Die Detektion erfolgte durch einen fluoreszierenden Zweitantikörper. Die unregelmässige Form der *Tubuli* in Mpv17-negativen Nieren ist ein Fixationsartefakt. Vergrößerung 100x.
 G: *Glomerulus*, T: *Tubulus*



Zur Analyse der Expression in der *Cochlea* mussten Carnoy-fixierte Präparate verwendet werden, da PFA- und Bouin-Fixierung offenbar das von diesem Antikörper erkannte Epitop maskieren.

In der *Cochlea* konnte $\alpha 4(\text{IV})$ diffus im gesamten *Ligamentum spirale* mit einer häufig zu beobachtenden Konzentration im suprastrialen Teil des Ligaments und einer nur schwachen Färbung im basalen Teil nachgewiesen werden (Abbildung 19). Wie in der Niere war die Intensität der Färbung in allen untersuchten Fällen vergleichbar.

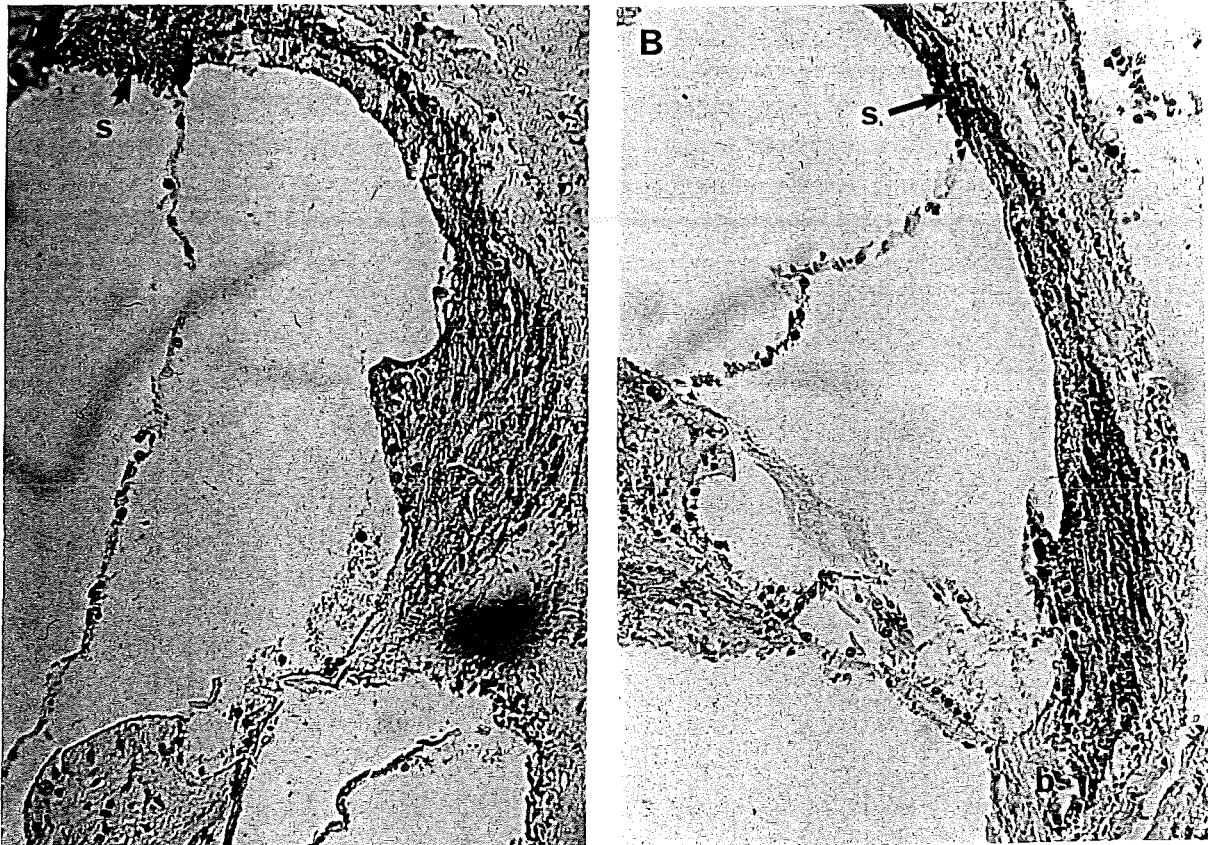


Abbildung 19: Expression von $\alpha 4(\text{IV})$ in der *Cochlea*

A: Wildtyp, B: Mpv17.

Präparation und Detektion wie in Abbildung 17.

Vergrößerung 100x.

s: suprastrialer Teil, b: basaler Teil des *Ligamentum spirale*

Die Expression von Kollagen IV $\alpha 5$ in der Niere war vergleichbar mit der $\alpha 4(\text{IV})$ -Expression. Sowohl in Wildtypen (Abbildung 20a) als auch in Mpv17-negativen Tieren (Abbildung 20b) war die Expression in den *Glomeruli* und einem Teil der *Tubuli* in vergleichbarem Ausmaß detektierbar. Insgesamt war die Intensität der Färbung sehr viel schwächer als bei der $\alpha 4(\text{IV})$ -Färbung, ob dies eine geringere Menge an Protein oder

eine geringere Affinität des Antikörpers bedeutet, konnte jedoch nicht festgestellt werden.

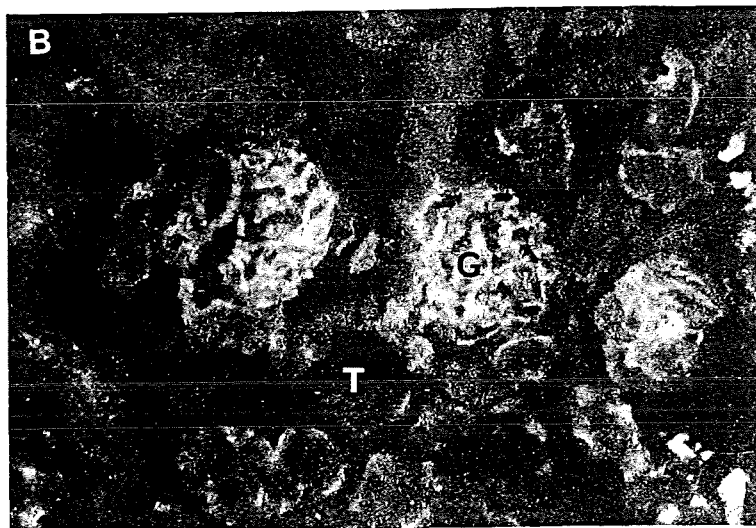
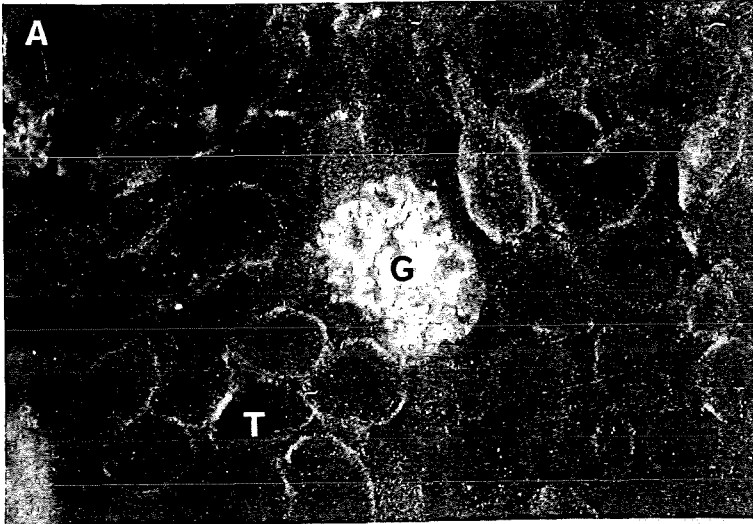


Abbildung 20:
Expression von Kollagen
IV α 5 in der Niere

A: Wildtyp, B: Mpv17
Präparation und Detektion wie
in Abbildung 18.
Vergrößerung 100x.
G: Glomerulus, T: Tubulus

Auch bei der Analyse der α 5(IV)-Expression in der *Cochlea* konnten nur Carnoy-fixierte Präparate verwendet werden. Im Gegensatz zur Niere, bei denen α 4 und α 5 kolokalisiert sind, zeigt sich in der *Cochlea* die Expression von α 5(IV) in oder um die äusseren Sulkus-Zellen, die Wurzelzellen des Spiralligaments, die Basilmembran und die Interdentalzellen (Abbildung 21). Da die Interdentalzellen und die Wurzelzellen von den umliegenden Zellen durch eine Basalmembran getrennt sind, ist anzunehmen, dass das α 5(IV) in dieser Basalmembran lokalisiert ist. Es ist nicht bekannt, ob die äusseren Sulkus-Zellen eine Basalmembran besitzen. In einigen Präparaten konnte zusätzlich eine schwache Expression im suprastrialen Teil des Spiralligaments nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass $\alpha 4(\text{IV})$ und $\alpha 5(\text{IV})$ in Mpv17-negativen Mäusen in normalem Ausmaß vorhanden ist, $\alpha 1/\alpha 2(\text{IV})$ zeigt im Innenohr eine leicht erhöhte Expression in den Striargefäßen und in der Niere eine stärkere Expression in den *Glomeruli* und *Tubuli*.

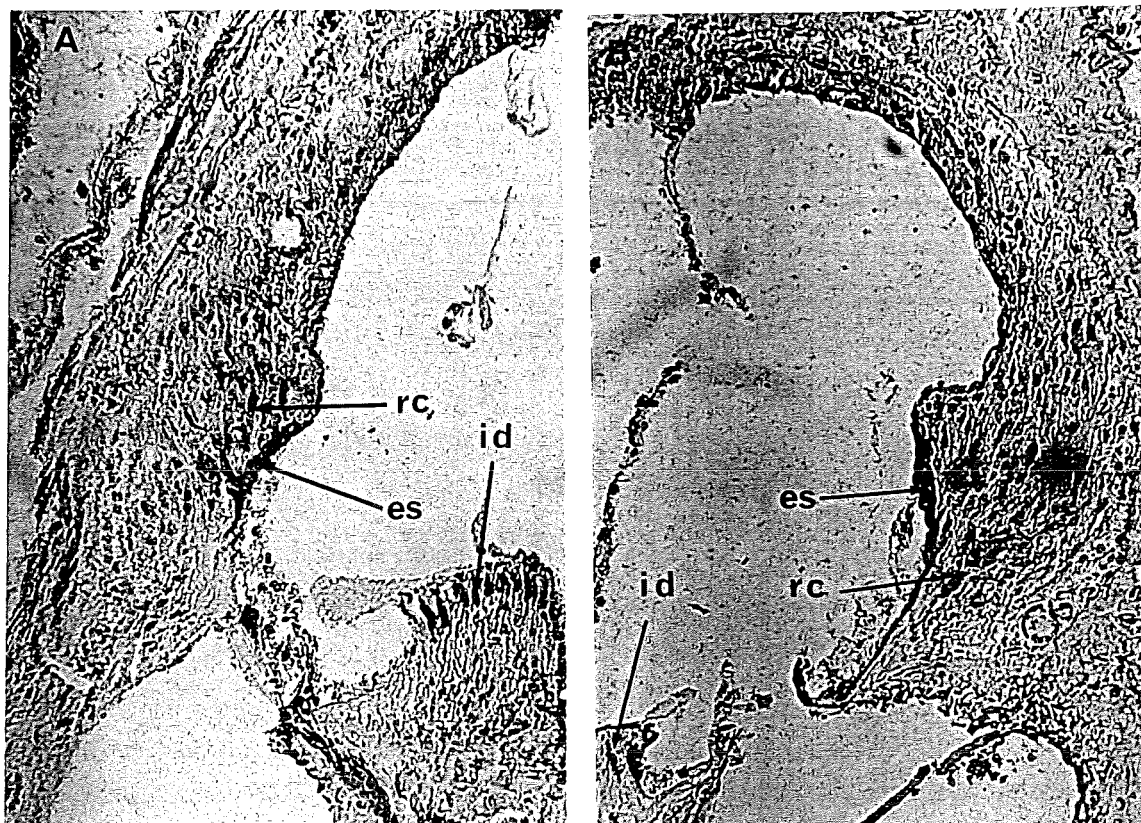


Abbildung 21: Expression von $\alpha 5(\text{IV})$ in der *Cochlea*

A: Wildtyp, B: Mpv17

Präparation und Detektion wie in Abbildung 19.

Vergrößerung 100x.

rc: Wurzelzellen, id: Interdentalzellen, es: externe Sulcus-Zellen.

Trotz der Ähnlichkeit des Phänotyps zu Alport-Syndrom, bei dem einzelne Kollagen IV-Ketten nicht mehr vorhanden sind, lassen sich also, soweit untersucht, die Kollagen IV-Ketten in Niere und Innenohr von Mpv17-negativen Tieren nachweisen. Da der Ausfall eines Basalmembranbestandteils wie Kollagen IV zu einem Phänotyp wie Alport-Syndrom führen kann, wäre es denkbar, dass der Ausfall eines anderen Basalmembranbestandteils zu einem ähnlichen Defekt führen könnte.

4.4. Untersuchung des Laminin-Status von Mpv17-Mäusen

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der glomerulären Basalmembran ist Laminin. Dieses Protein ist häufig mit Typ IV Kollagen assoziiert, zudem führt das Fehlen der Isoform $\beta 2$ in transgenen Mäusen zu einer Nephrose (Noakes *et al.*, 1995). Aus diesem Grund sollen die Basalmembranen der Mpv17-Mäuse nunmehr auf Veränderungen in ihrer Laminin-Zusammensetzung untersucht werden.

Wie das Typ IV-Kollagen ist auch das Laminin ein Hauptbestandteil der Basalmembran, und ebenso existieren verschiedene Isoformen dieses Proteins, die eine unterschiedliche zeitliche und räumliche Verteilung zeigen (Noakes *et al.*, 1995, Miner *et al.*, 1994). Bisher wurden 7 Untereinheiten ($\alpha 1, \beta 1, \gamma 1, \alpha 2, \alpha 3, \beta 2$ und $\gamma 2$) identifiziert, welche hauptsächlich eine Familie von Heterotrimeren der Form $\gamma 2 + (\alpha 1 \text{ oder } \alpha 2) + (\beta 1 \text{ oder } \beta 2)$ bilden (Burgeson *et al.*, 1994, Engvall *et al.*, 1990, Green *et al.*, 1992). Die Tatsache, dass der Ausfall von Laminin $\beta 2$ in transgenen Mäusen zu einer Nephrose mit sehr früh einsetzender Proteinurie und Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten führt (Noakes *et al.*, 1995), macht dieses Gen zu einem Kandidaten für Untersuchungen auch in der Mpv17-Maus. Da bisher in Mäusen mit Mutationen im $\alpha 2$ -Gen (Sunada *et al.*, 1994, Hong *et al.*, 1994) und in Menschen mit defektem $\gamma 2$ -Gen (Pulkkinen *et al.*, 1994, Aberdam *et al.*, 1994) kein Nierendefekt beschrieben ist, wird sich diese Untersuchung auf die Laminin $\beta 1$ und $\beta 2$ -Ketten beschränken.

4.4.1. Expression von Laminin β 1 in Niere und Innenohr

Laminin β 1 ist in adulten Wildtyp-Mäusen in den tubulären Basalmembranen sowie im glomerulären *Mesangium* als schwaches, aber deutlich über dem Hintergrund liegendes Signal nachzuweisen (Abbildung 22a). In Mpv17-negativen Mäusen zeigt sich eine deutlich stärkere Expression im *Glomerulus*, während die *Tubuli* unverändert sind (Abbildung 22b).

Im Innenohr ist Laminin β 1 nicht detektierbar.

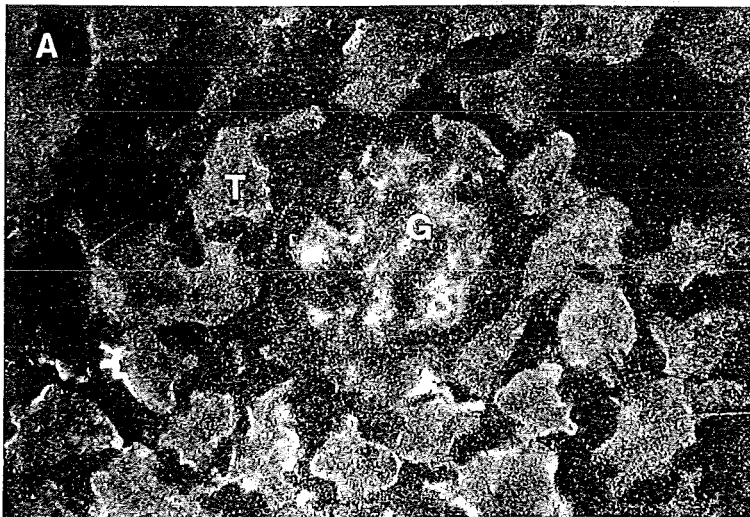
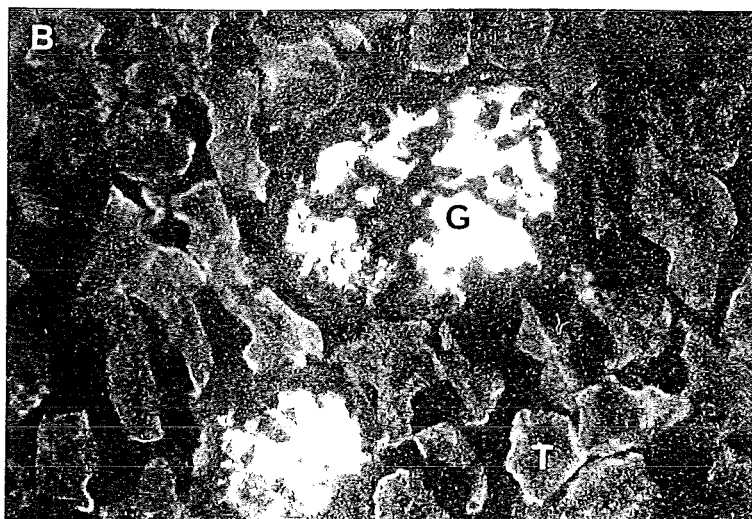


Abbildung 22: Expression von Laminin β 1 in Nieren von Wildtyp- und Mpv17-negativen Mäusen

A: Wildtyp, B: Mpv17
Präparation und Detektion wie in
Abbildung 20.
Vergrößerung 100x.
G: *Glomerulus*, T: *Tubulus*



4.4.2 Expression von Laminin $\beta 2$ in Niere und Innenohr

In den *Glomeruli* von adulten Mäusen ist Laminin $\beta 2$ schwach in den tubulären Basalmembranen und stark in den glomerulären Basalmembranen sowie in den Basalmembranen der Gefäße exprimiert (Abbildung 23). Es konnten keine Unterschiede zwischen Mpv17-negativen und Wildtyp-Mäusen detektiert werden. Wegen des starken Signals der glomerulären Basalmembranen konnte nicht festgestellt werden, ob auch das *Mesangium* Laminin $\beta 2$ exprimiert.

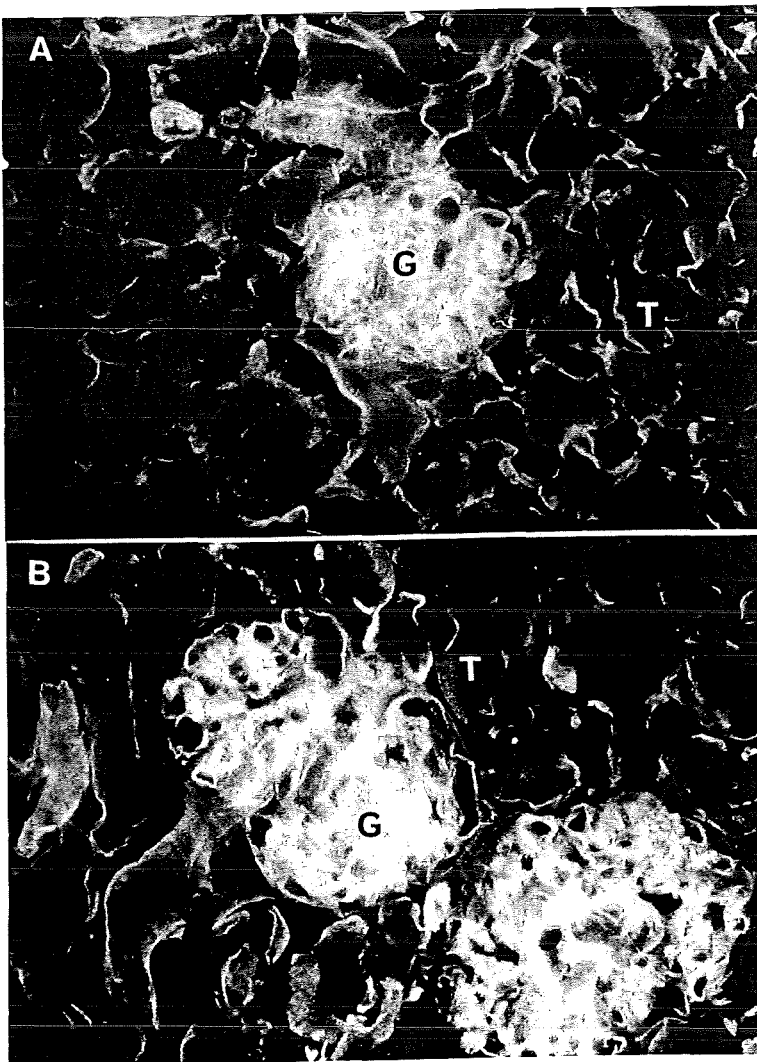


Abbildung 23: Expression von Laminin $\beta 2$ in der Niere

A: Wildtyp, B: Mpv17
 Präparation und Detektion wie in
 Abbildung 22.
 Vergrößerung 100x
 G *Glomerulus*, T *Tubulus*

Im Gegensatz zu Laminin $\beta 1$ wird Laminin $\beta 2$ in der *Cochlea* exprimiert. Eine relativ starke Expression ist in den Gefäßwänden der *Stria vascularis* sowie um die Nervenzellen in Rosenthals Kanal und im Spiralganglion zu sehen (Abbildung 24), während eine schwächere Färbung in den Gefäßwänden der Kapillaren des Spiralligaments und diffus im gesamten Spiralligament zu sehen ist. Vergleichbar mit $\alpha 1/\alpha 2(IV)$ zeigt sich auch hier eine stärkere Expression in den Striakapillaren von

Mpv17-negativen Mäusen verglichen mit Wildtyp-Kontrollen. Dies legt den Schluß nahe, dass die Verdickung der Basalmembran der Striakapillaren auf einer verstärkten Expression von $\alpha1/\alpha2(\text{IV})$ und Laminin $\beta1$ beruht. In einigen Präparaten konnte ebenfalls eine Verstärkung des eher diffusen Signals im Spiralligament von Mpv17-negativen Tieren beobachtet werden.

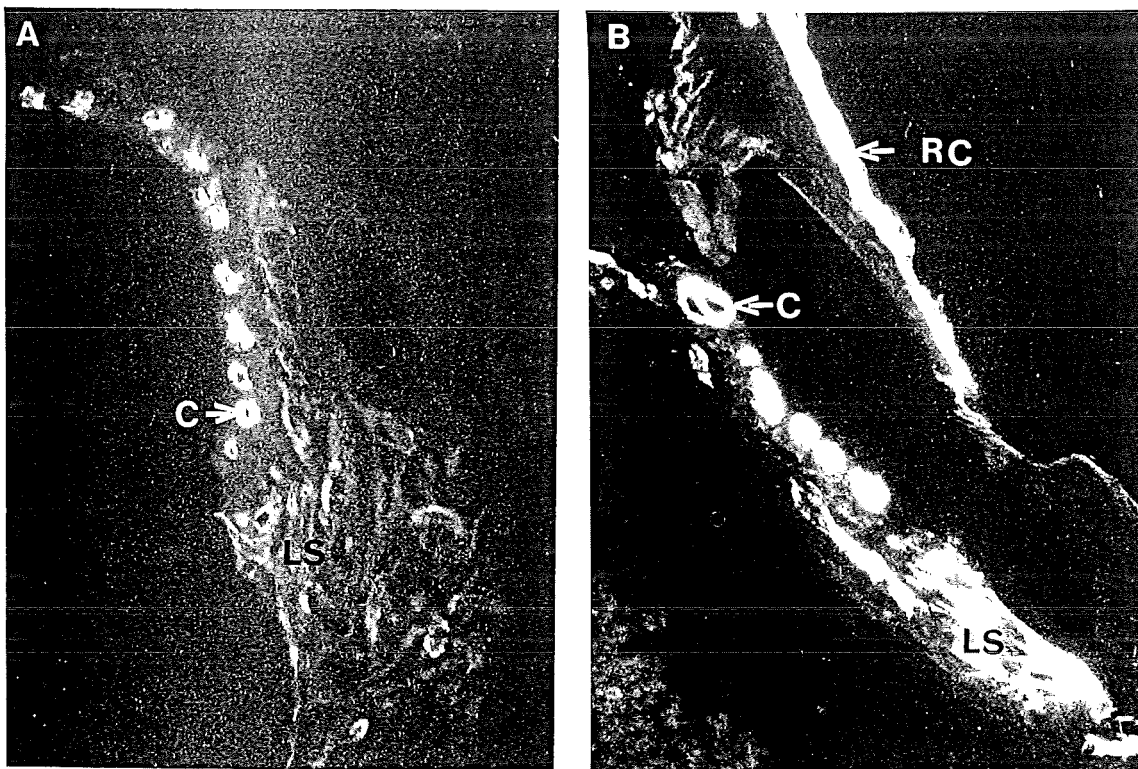


Abbildung 24: Expression von Laminin $\beta2$ in der Cochlea

A: Wildtyp, B: Mpv17

Präparation wie in Abbildung 21, die Detektion erfolgte mit einem fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper.

Vergößerung 100x.

c: Striakapillare, rc: Rosenthals Kanal, ls: *Ligamentum spirale*

In der Zusammenfassung sind die Daten der Abschnitte 4.3. und 4.4. zur Expression von ECM-Bestandteilen in der *Cochlea* noch einmal in Tabelle 2 dargestellt.

	Kollagen Typ IV						Laminin			
	$\alpha 1/\alpha$		$\alpha 4$		$\alpha 5$		$\beta 1$		$\beta 2$	
	Wt	Mpv	Wt	Mpv	Wt	Mpv	Wt	Mpv	Wt	Mpv
Stria Vascularis										
-Kapillaren	+	++	-	-	-	-	-	-	+	++
-allgemein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spiralligament										
-basaler Teil	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-
-zentraler Teil	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-	+/-
-suprastrialer Teil	-	-	++	++	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-
-Wurzelzellen	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
-Kapillaren	+	+	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
äußere Sulkuszellen	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Organ von Corti	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Interdentalzellen	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Spiralganglion	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++

Tabelle 2: Expression von Kollagen IV- und Laminin-Ketten im Innenohr von Wildtyp- und Mpv17-negativen Mäusen

Die Expression wurde in ihrer Intensität mit dem Auge abgeschätzt. ++ sehr stark, + stark, +/- schwach, - abwesend

Diese Ergebnisse sind im Wesentlichen in Übereinstimmung mit Daten, die während der Niederschrift dieser Arbeit von Cosgrove *et al.* (1996) zur Expression von ECM-Bestandteilen in der *Cochlea* der Maus veröffentlicht wurden. Da bei Cosgrove *et al.* (1996) jedoch nicht zwischen Laminin $\beta 1$ und $\beta 2$ unterschieden wurde, sind die hier präsentierten Daten genauer.

Zusammenfassend zeigen die in 4.3. und 4.4. gezeigten Daten, dass Typ IV-Kollagen und Laminin in Niere und Innenohr sowohl von Wildtyp- als auch von Mpv17-Tieren an spezifischen Stellen exprimiert werden. Sowohl in der Niere als auch in der *Stria vascularis* lässt sich eine verstärkte Expression von Kollagen IV $\alpha 1/2$ und Laminin nachweisen, wobei in der Niere Laminin $\beta 1$ und in der *Cochlea*, in der $\beta 1$ nicht vorkommt, Laminin $\beta 2$ verstärkt exprimiert wird. Ein vollständiger Ausfall einer

Matrixkomponente, wie dies in Alport-Syndrom oder der β 2-Knockout-Maus der Fall ist, liegt soweit untersucht nicht vor.

4.5. Expression von MMP-2 in Mpv17-negativen Mäusen

Wie oben gezeigt lässt sich in Mpv17-negativen Mäusen eine verstärkte Expression von Bestandteilen der extrazellulären Matrix in den Basalmembranen von *Glomerulus* und Striakapillaren nachweisen. Im Falle der Glomerulosklerose ist die verstärkte Expression von Typ IV Kollagen, Laminin und Heparansulfat-Proteoglykan in der Niere seit einiger Zeit bekannt (Nakamura *et al.*, 1991, Floege *et al.*, 1991). Diese verstärkte Expression ist jedoch wahrscheinlich nicht der auslösende Faktor für die Glomerulosklerose (Zwacka, 1995). Der Phänotyp von Alport-Patienten lässt darauf schließen, dass das Fehlen eines wichtigen Basalmembranbestandteils zu derart gravierenden Schäden der glomerulären Basalmembran führen kann, dass selbst Erythrozyten in das Filtrat gelangen können. Die verstärkte Expression von kollagenösen Fasern in der extrazellulären Matrix von sklerotischen *Glomeruli* und Striakapillaren ist demzufolge höchstwahrscheinlich die Folge des primären Basalmembrandefekts, möglicherweise ein kompensatorischer Mechanismus wie im Falle der verstärkten Expression von Laminin β 1 in der Niere der Laminin β 2-defizienten Maus (Noakes *et al.*, 1995).

Enzyme, welche am ständigen Auf- und Abbau der Basalmembran beteiligt sind, wären gute Kandidaten als Mediatoren der phänotypischen Veränderungen. Ein verstärkter Abbau einiger Matrixbestandteile zum Beispiel wäre ein denkbarer Mechanismus für einen solchen primären Defekt, die dann wiederum die kompensatorische Akkumulation anderer Matrixkomponenten bewirken würde.

Eine Schlüsselrolle beim Abbau extrazellulärer Matrix spielen die Matrix-Metalloproteinasen (MMP's), eine Gruppe von Zink-Endopeptidasen, welche von einer ganzen Reihe von Zellen als Proenzyme sezerniert werden. Ihre Aktivierung erfolgt durch Abspaltung des Propeptids durch andere Proteasen. Viele MMP's sind in der Lage, die Hauptbestandteile der glomerulären Basalmembran zu spalten, so auch MMP-2, auch Gelatinase A oder Kollagenase IV 72 kD genannt. Dieses Enzym wird in metastasierenden Tumorzellen exprimiert, was eine Rolle in der aktiven Matrixdegradation bei der Invasion der Tumorzellen nahelegt (Brown *et al.*, 1990). Weiterhin konnte eine erhöhte Expression von MMP-2 in der sogenannten Puromycin-

Aminonukleosid-Nephrose festgestellt werden (Nakamura *et al.*, 1994), einem Tiermodell für das Nephrotische Syndrom. In den sklerotischen *Glomeruli* von transgenen bGH-Mäusen war ebenfalls eine Erhöhung der MMP-2-Expression zu sehen (He *et al.*, 1995).

Aus diesen Gründen soll nun die Expression von MMP-2 in Nieren von Mpv17-negativen Mäusen untersucht werden.

Aus je 1 Niere von Wildtyp- und Mpv17-negativen Tieren wurde gesamt-RNA isoliert und die poly-A⁺-Fraktion angereichert. 5 µg der poly-A⁺-RNA wurden auf einem 0,9 % Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit entsprechenden DNA-Sonden bei 65 °C hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 zu sehen. Während in Nieren von Wildtyp-Mäusen (wt) fast keine MMP-2-Expression nachzuweisen ist, zeigt sich eine starke Expression in Nieren von Mpv17-negativen Mäusen (ho). Auch TIMP-2 („Tissue inhibitor of metalloproteinases“), ein Modulator der Aktivität von MMP-2 und anderer Metalloproteinasen, ist in vergleichbarem Ausmaß in Mpv17-negativen Nieren induziert. Es handelt sich hierbei aber nicht um einen generellen, alle exprimierten Gene betreffenden Effekt, da das Gen für Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) in Wildtyp wie in Mpv17-negativen Nieren in vergleichbarem Ausmaß exprimiert wird.

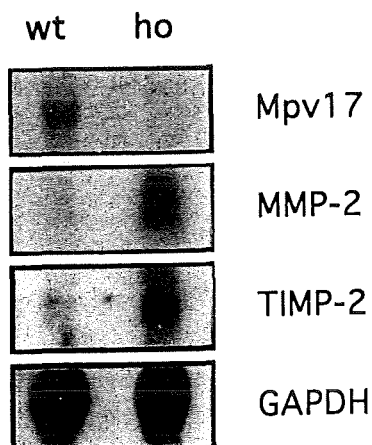


Abbildung 25: Expression von Mpv17, MMP-2, TIMP-2 und GAPDH in Nieren von Mpv17-negativen und Kontrolltieren

Poly-A⁺ RNA wurde aus Nieren von Wildtyp- (wt) und Mpv17-negativen Mäusen (ho) isoliert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Filter wurde sodann nacheinander mit den entsprechenden Sonden hybridisiert.

Auf Proteinebene wurde dies sowohl in der Niere als auch im Innenohr untersucht. Hierzu wurde Proteinextrakte von Nieren und häutigem Labyrinth (*Ductus cochlearis*) in 2x Lämmli-Puffer aufgenommen, homogenisiert, 10 min. aufgekocht und 100 µg über ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über einen

Maus-anti-MMP-2-Antikörper (Freundlicherweise von Dr. Matti Höythyä zur Verfügung gestellt).

Abbildung 26 zeigt, dass der Gehalt an MMP-2 sowohl in der Niere als auch in der *Cochlea* von Mpv17-negativen Tieren (ho) erhöht ist.

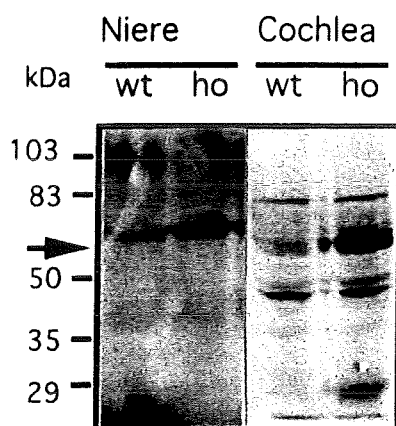


Abbildung 26: MMP-2 Protein in Niere und Cochlea

wt: Wildtyp, ho: Mpv17

Die Gewebe wurden in 2x Lämmli-Puffer aufgenommen, homogenisiert und auf einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Das MMP-2-Protein von 65 kD ist durch einen Pfeil markiert.

Zur genaueren Lokalisation des Ortes der MMP-2-Expression wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Ein Vergleich der MMP-2-Expression in Niere und Innenohr von Mpv17-negativen Tieren und Wildtyp-Kontrollen ist in Abbildung 27 zu sehen. Hierzu wurden nach Bouin fixierte Paraffinschnitte von Innenohren sowie formaldehydfixierte Paraffinschnitte von Nieren in einer Dicke von 10 μ m immunhistochemisch analysiert. Die Detektion erfolgte mit oben erwähntem Antikörper.

Die MMP-2-Expression ist in der Wildtyp-Niere auf die *Glomeruli* und die tubulären Basalmembranen beschränkt, während MMP-2 im Innenohr diffus in *Stria vascularis*, *Ligamentum spirale* und teilweise im *Cortischen Organ* lokalisiert. Die verstärkte Expression bei Mpv17-negativen Tieren ist in der Niere in den *Glomeruli* und in der *Cochlea* in *Stria vascularis*, *Ligamentum spirale* und in dem das Cortische Organ ersetzenden flachen Epithel zu sehen.

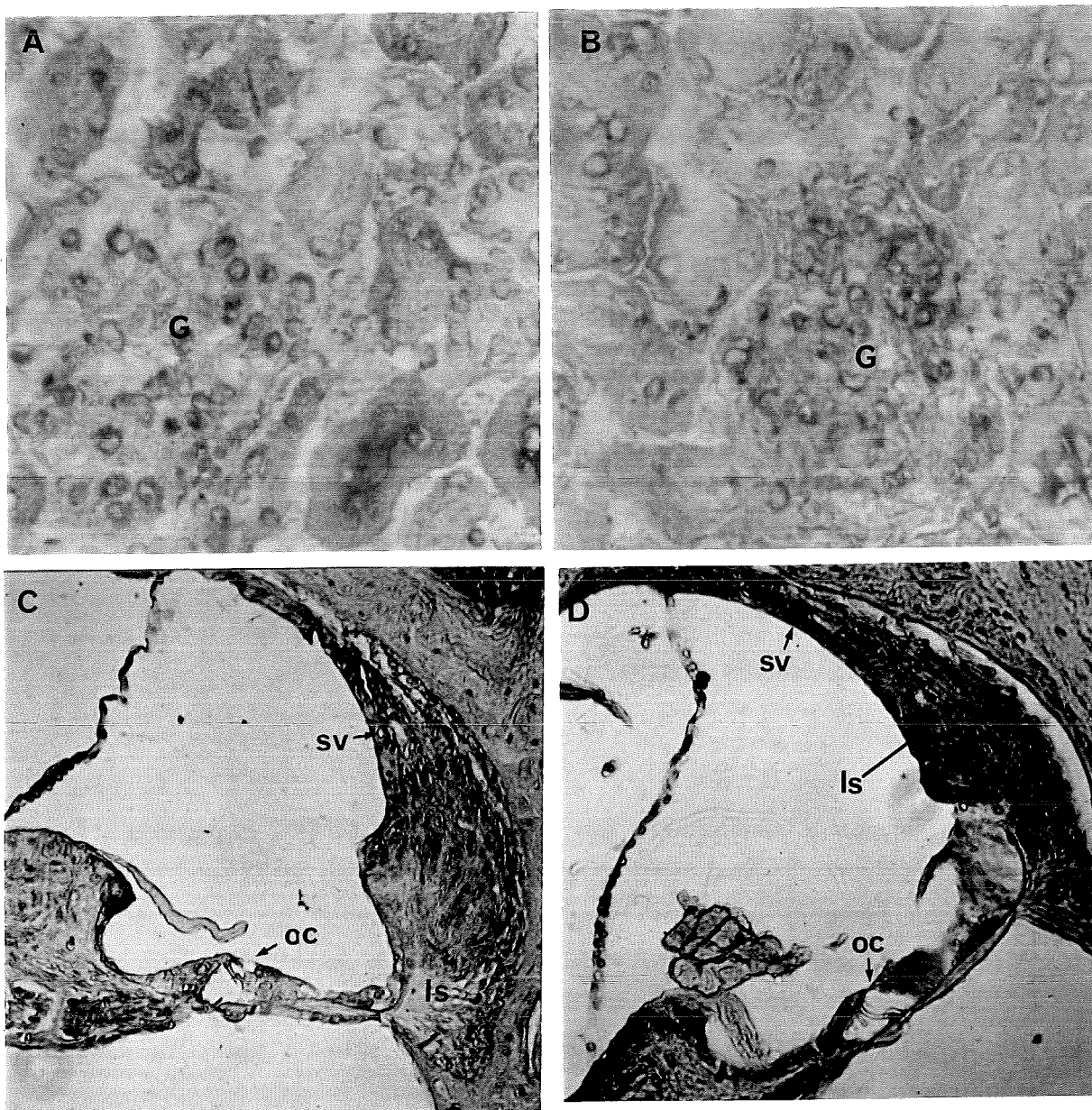


Abbildung 27: Immunhistochemische Analyse der MMP-2-Expression in Niere und Innenohr von Mpv17- und Wildtyp-Tieren

A,B: Niere, C,D: Innenohr. A, C: Wildtyp, B, D: Mpv17.

Der Nachweis von MMP-2 erfolgte auf Paraffinschnitten mit einer Dicke von 10 μ m. Die Detektion erfolgte durch einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper.

Vergrößerung 100x.

G: Glomerulus, sv: Stria vascularis, ls: Ligamentum spirale, oc: Organ von Corti

Auch in Gewebekulturzellen ist die negative Korrelation zwischen der Expression von Mpv17 und MMP-2 nachzuweisen. Zur Isolation von poly-A⁺-RNA wurden zwei Populationen NIH 3T3-Zellen, die sich in ihrem Ausmaß an Mpv17-Expression unterschieden, sowie RSV-7-Zellen (normale NIH 3T3-Zellen, welche das menschliche Mpv17-Gen unter der Kontrolle des RSV-Promotors überexprimieren) und SF4-Zellen (Hautfibroblasten von Mpv17-negativen Tieren) verwendet. Die RNA wurde auf einem 0,9 % Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den entsprechenden Sonden hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 zusammengefasst. Während RSV-7-Zellen eine starke Mpv17-Expression zeigen, ist bei ihnen keine MMP-2-Expression festzustellen, bei SF4-Zellen ohne Mpv17-Expression ist dagegen eine große Menge MMP-2-Transkript zu sehen. Die verschiedenen 3T3-Populationen zeigen mittelstarke Mpv17-Expression, wobei 3T3 1 eine schwächere Mpv17-Expression und eine etwas stärkere MMP-2-Expression zeigt als 3T3 2.

Die negative Korrelation zwischen MMP-2 und Mpv17-Expression ist jedoch nicht völlig spezifisch bzw. auf MMP-2 beschränkt, da z.B. early response-Gene wie cJun in ähnlicher Weise wie MMP-2 beeinflusst werden. Die Expression des Transkriptes für GAPDH zeigt keine derartigen Mpv17-abhängigen Unterschiede.

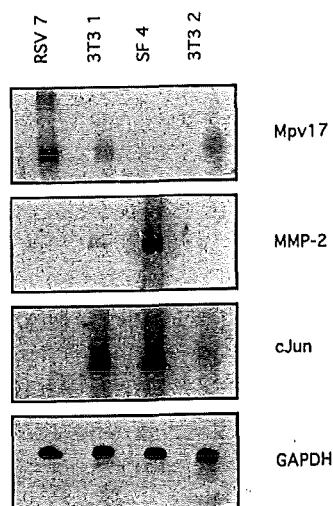


Abbildung 28: Expression von Mpv17, MMP-2, cJun und GAPDH in Fibroblasten

Aus Gewebekulturzellen wurde poly-A⁺-RNA isoliert, auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit den entsprechenden Sonden hybridisiert.

Diese Daten zeigen eine Überexpression von MMP-2 in Niere und Innenohr von Mpv17-negativen Tieren, mithin in den phänotypisch geschädigten Organen. Die

erhöhte Expression lässt sich auf RNA- und Proteinebene nachweisen und könnte damit ein wichtiger Teil des den Phänotyp verursachenden Pathomechanismus in der Mpv17-negativen Maus sein. Da die negative Korrelation zwischen Mpv17 und MMP-2 nicht nur auf die phänotypisch betroffenen Organe beschränkt ist, sondern auch in Zellkulturzellen nachgewiesen werden kann, könnte es sich dabei um einen weiter oben in der Abfolge der (zum Phänotyp führenden) Ereignisse liegenden Mechanismus handeln. Hierbei wird eine mögliche Funktion des Mpv17-Proteins in der Genregulation deutlich, bei der Mpv17 eine zentrale Rolle in der Regulation von MMP-2 einnimmt.

4.6 Untersuchungen zur Funktion des Mpv17-Proteins

Die Lokalisation des Mpv17-Proteins auf Peroxisomen (Zwacka *et al.*, 1994) und die Ähnlichkeit von Mpv17 mit PMP22, einem peroxisomalen Membranprotein (Kaldi *et al.*, 1993, Diestelkötter und Just, 1993) legt eine Funktion dieses Proteins in einem peroxisomalen Stoffwechselweg oder in der Peroxisomen-Biogenese nahe. Bei den bisher bekannten Biogenese-Defekten wie zum Beispiel Zellweger-Syndrom sind Peroxisomen vollständig abwesend (Roels 1991) oder als leere Hüllen („Ghosts“) in Ansätzen noch vorhanden (Santos *et al.*, 1988). Da in Mpv17-Tieren die Peroxisomen in normaler Größe und Anzahl nachzuweisen sind (Zwacka, 1995), ist eine wichtige Rolle des Mpv17-Proteins in der Peroxisomen-Biogenese äußerst unwahrscheinlich. Aus diesem Grunde wurden die in Peroxisomen hauptsächlich ablaufenden Stoffwechselreaktionen untersucht. Keine Unterschiede wurden gefunden im C26/C22-Verhältnis, was auf einen Defekt in der β -Oxidation der langkettigen Fettsäuren hingewiesen hätte (Roels, 1991), genausowenig wie die Menge der Etherlipide (Plasmalogene) verringert war, einem Zeichen von Zellweger-Syndrom und rhizomelischer *Chondrodysplasia punctata* (Schrakamp *et al.*, 1988). Die Katalase-Aktivität war in den Peroxisomen lokalisiert und die Synthese von Gallensäuren normal (Zwacka, 1994). Bisher nicht getestet sind der Plasmagehalt an Phytan- und Pristansäure. Deren Erhöhung wäre ein Zeichen von Refsum-Syndrom, einer Krankheit, die auf einer defekten Phytansäure-Oxidase beruht und die ebenfalls einen Innenohrdefekt aufweist (Hallpike, 1967).

4.6.1 Der Einfluss von Mpv17 auf den intrazellulären Redoxmetabolismus

Da Peroxisomen eine der Hauptstellen der Produktion und Entgiftung von Sauerstoffradikalen sind (Roels, 1991), wurde untersucht, inwieweit Mpv17 eine Rolle in den radikalproduzierenden oder -abbauenden Reaktionen spielt. Der Zusammenhang zwischen Nierendefekten und dem extra- bzw. intrazellulären Redoxstatus ist seit einiger Zeit bekannt (Wardle, 1992). Eine Verstärkung der ototoxischen Wirkung von Aminoglykosiden bei einer Verringerung des intrazellulären Glutathions (Hoffman *et al.*, 1988, Hoffman *et al.*, 1987), eines Radikalfängers, weisen auch im Innenohr auf einen Zusammenhang zwischen dem zellulären Redoxstatus und Schädigungen im Organ hin. Weitere Hinweise auf eine Verbindung zwischen radikal-induzierten Zellschädigungen und Nierenkrankheiten kommen von Untersuchungen an der Bcl-2-Knockout-Maus (Veis *et al.*, 1993). Das Bcl-2-Protein, ein Apoptose-Inhibitor, spielt eine Rolle bei dem zellulären Schutz vor H₂O₂ und Lipidperoxidation (Hockenberry *et al.*, 1993). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Bcl-2 Knockout-Maus einen Nierenphänotyp zeigt, und obwohl die pathologischen Befunde hier keine große Ähnlichkeit mit den Befunden bei Mpv17-negativen Tieren besitzen, weist dies darauf hin, dass zur korrekten Funktion dieses Organs eine genaue Regulation des Redoxmetabolismus notwendig ist.

Auch in vielen experimentellen Tiermodellen gibt es eine Reihe von Hinweisen auf eine Rolle von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROS, „reactive oxygen species“) bei der Entstehung von Nierenerkrankungen (zur Übersicht: Shah *et al.*, 1991). Diese beinhalten Nierendefekte bei Glyzerinbehandlung (Guidet und Shah, 1989), Gentamycin-Nephropathie (Walker und Shah, 1987) und bei Ischämie-Reperfusion (McCoy *et al.*, 1988). Substanzen, welche H₂O₂ zu Wasser reduzieren können -zum Beispiel Pyruvat-(Salahudeen *et al.*, 1991), oder Überexpression von H₂O₂-abbauenden Enzymen schützen die Niere bei oben erwähnten Behandlungen. Weiterhin wurde in den Nieren von PHN-Ratten, einem induzierten Tiermodell für Passive Heymann-Nephritis (Neale *et al.*, 1993) ein höherer Gehalt an H₂O₂ gemessen. Schließlich sei noch erwähnt, dass als Ort der H₂O₂-Produktion in der Niere der PHN-Ratten die viszerale Epithelzellen (Podozyten) identifiziert wurden (Neale *et al.*, 1993), genau der Zelltyp, der auch das Mpv17-Protein in der Niere am stärksten exprimiert (Zwacka, 1995) und der in Mpv17-negativen Tieren Schädigungen zeigt (Weiher *et al.*, 1990).

Aufgrund der Tatsache, dass ein deregulierter ROS-Stoffwechsel zu Nierenerkrankungen führen kann und dass der Ausfall von Mpv17, einem

peroxisomalen Protein, zu einer Nierenerkrankung führt, sollte nun untersucht werden, inwieweit das Mpv17-Protein eine Rolle im ROS-Metabolismus spielt.

Hierzu wurden primäre Fibroblasten von Mpv17-negativen und von Kontrolltieren für 10 min bei Raumtemperatur mit Hydroethidin (HE) gefärbt. Hydroethidin ist ein blau fluoreszierender Vitalfarbstoff, der in der Zelle von ROS und H-abspaltenden Enzymen deprotoniert wird. Das hierbei entstehende Ethidium wird aufgrund seiner Ladung in der Zelle zurückgehalten, wo es in die DNA des Zellkerns interkaliert und orange fluoresziert (Rothe und Valet, 1990). Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, schnell in Glyzeringelatine eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 zu sehen. Während in den Mpv17-negativen Zellen noch größere Mengen des nicht oxidierten (blau fluoreszierenden) Farbstoffs zu sehen sind, ist in Wildtyp-Zellen praktisch der gesamte Farbstoff bereits oxidiert (orange).

Weiterhin wurde die Färbung nun mittels FACS-Analyse quantifiziert. Während normale primäre Mausfibroblasten aus einer einzelnen Population orange fluoreszierender Zellen bestanden (Abbildung 30b), war bei den Mpv17-Fibroblasten zusätzlich eine zweite, sehr viel schwächer fluoreszierende Population vorhanden (Abbildung 30a). Dieses Ergebnis zeigt, dass zumindest in einer Subpopulation der Mpv17-negativen Zellen ein dramatischer Rückgang der Fähigkeit zur HE-Oxidation zu beobachten ist, während in der anderen Subpopulation möglicherweise andere HE-umsetzende Prozesse ablaufen.

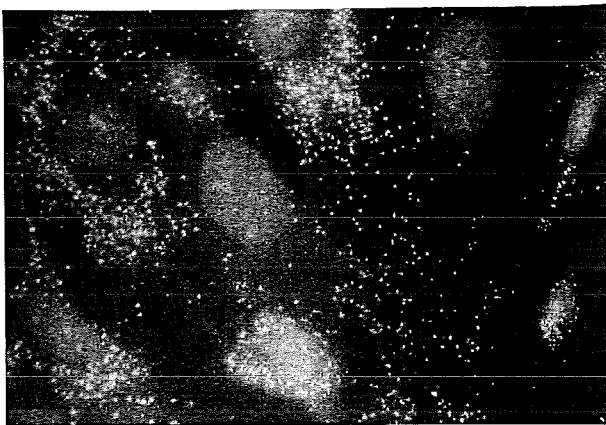
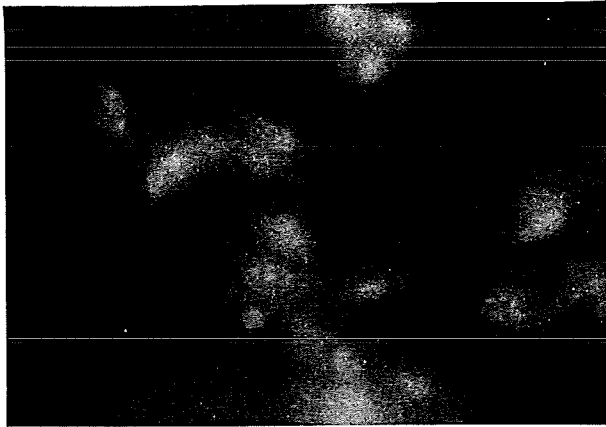


Abbildung 29:
Hydroethidinfärbung von
Wildtyp- und Mpv17-Zellen

A Wildtyp, B Mpv17-Zellen
Die Zellen wurden für 10 min. bei Raumtemperatur mit HE gefärbt, in Glyzeringelatine eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.
Vergrößerung 100x

Um festzustellen, ob der Mangel an Mpv17-Protein eine ROS-produzierende (oder zumindest HE-oxidierende) Reaktion beeinträchtigt oder aber Mpv17 selbst eine derartige Funktion besitzt, wurde die HE-Oxidation in Mpv17-überexprimierenden Zellen studiert. Hierzu wurden NIH 3T3-Zellen mit einem Konstrukt stabil transfiziert, welches das menschliche Mpv17-Gen unter der Kontrolle des Rous-Sarkoma-Virus-Promotors exprimiert (RSV1 und RSV7-Zellen, Zwacka *et al.*, 1994). Während untransfizierte 3T3-Zellen nur geringe Mengen von Mpv17-Protein produzieren und nach HE-Färbung nur eine Subpopulation eine starke Fluoreszenz zeigt (Abbildung 30c), konnten bei verschiedenen unabhängigen RSV Mpv17-Klonen nur eine, stark fluoreszierende Population festgestellt werden (Abbildung 30d). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Mpv17-Genprodukt selbst eine HE-oxidierende Funktion besitzt oder aber zumindest der limitierende Faktor einer HE-oxidierenden Reaktion ist.

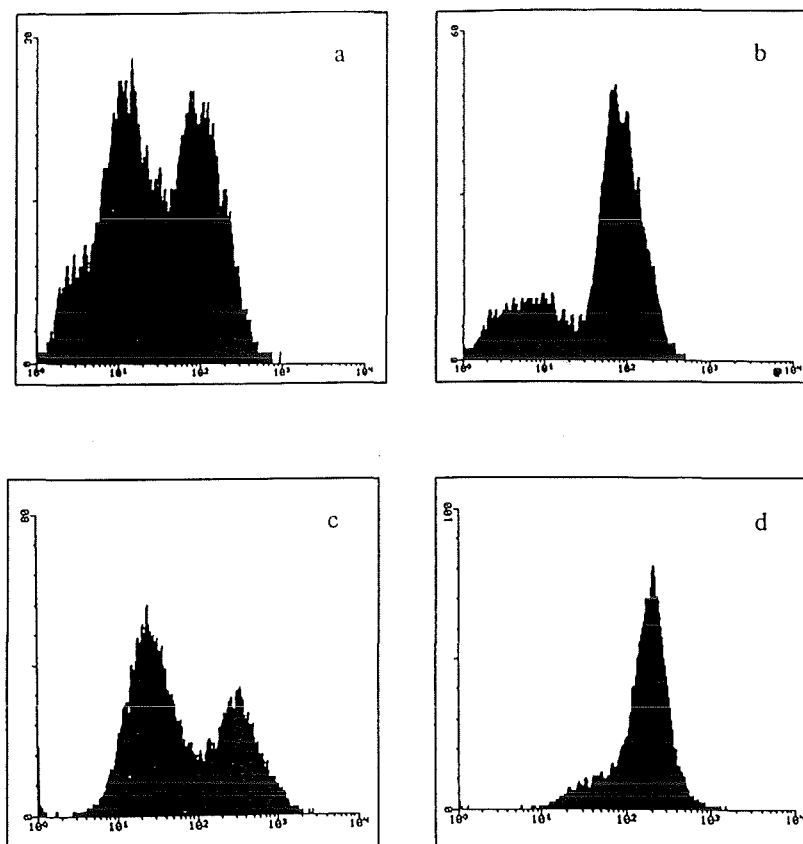


Abbildung 30: FACS-Analyse von HE-gefärbten Mpv17-negativen und Kontrollzellen

A: primäre Mpv17-negative Fibroblasten, B: primäre Wildtyp-Fibroblasten, C: NIH 3T3-Zellen, D: RSV-7 Zellen (NIH 3T3 transfiziert mit hMpv17 unter der Kontrolle des RSV-Promotors)

Die Färbung erfolgte wie in Abbildung 29 beschrieben. Sodann wurden die Zellen trypsinisiert und mit dem FACS ausgewertet. Jedes Histogramm repräsentiert 10000 HE-gefärbte Zellen. X-Achse: Relative Fluoreszenzintensität. Y-Achse: Relative Zellzahl.

Wegen der geringen Spezifität von Hydroethidin kann aus diesen Ergebnissen zwar geschlossen werden, dass sich Mpv17-negative und Wildtyp-Zellen in ihrem Redoxstatus unterscheiden, über die genaue Natur dieses Unterschieds können jedoch mit dieser Technik keine näheren Angaben gemacht werden. Insgesamt lässt sich jedoch daraus ersehen, dass in Mpv17-negativen Tieren das zelluläre Redoxpotential auf die reduzierte Seite hin verschoben ist, also weniger ROS oder HE-dehydrogenierende

Enzyme vorhanden sind. Die Transfektion von Zellen mit einem Mpv17-Expressionskonstrukt verschiebt deren Redoxpotential hin zur oxidierten Seite.

Anschließend wurde der zelluläre Glutathionstoffwechsel untersucht. Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglyzin, GSH) ist ein ubiquitäres Tripeptid, welches bei Säugern in allen Geweben in millimolaren Konzentrationen vorhanden ist und die Hauptrolle bei der Detoxifikation elektrophiler Substanzen (Biaglow *et al.*, 1983) und ROS spielt, mithin als Radikalfänger der Zelle agiert. Dies ist besonders wichtig in Zellen und Geweben mit einer hohen Rate an aerober Oxidation wie zum Beispiel der *Cochlea*, da eine hohe Rate aerober Oxidation wahrscheinlich mit einer hohen ROS-Produktion verbunden ist (Hoffman *et al.*, 1988). Abbildung 31 zeigt die wichtigsten Reaktionen des GSH-Stoffwechsels und die dabei beteiligten Enzyme.

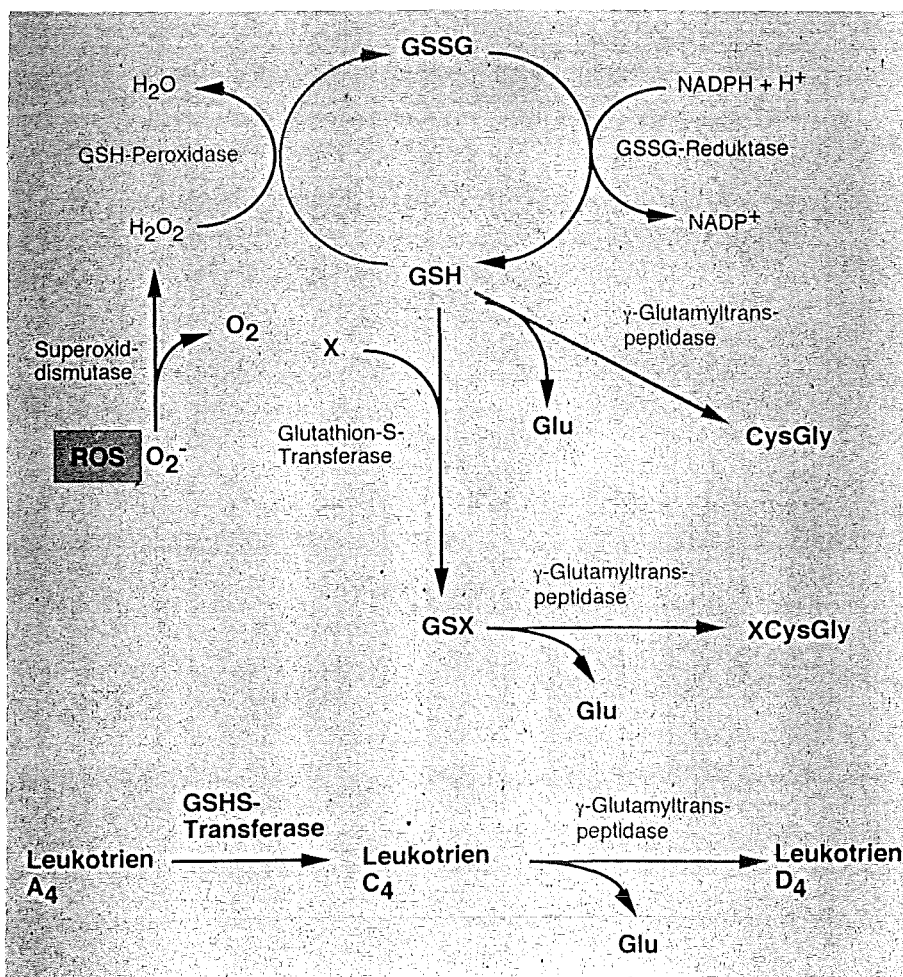


Abbildung 31 : Der Glutathion-Stoffwechsel in Mpv17-Tieren

Die Aktivität der grün markierten Enzyme war in Mpv17-negativen-Tieren erhöht, die der rot markierten Enzyme niedriger.

Das freie GSH wird hierbei mit H_2O_2 zu GSSG und H_2O umgesetzt. Das GSSG wird dann wieder von der GSSG-Reduktase regeneriert. Ausgehend von der Annahme, dass sich eine Störung im Redoxstatus der Zelle ebenfalls in Unterschieden im GSH-Stoffwechsel manifestieren müsste, wurde die Aktivität der gekennzeichneten Enzyme untersucht.

Das Ergebnis der Enzymaktivitätsmessungen (Durchgeführt von Dr. G. Wagner, Düsseldorf) ist in Abbildung 32 zusammengefasst. Wie deutlich zu sehen ist, sind GSH-Peroxidase und γ -Glutamyl-Transpeptidase in ihrer Aktivität in Mpv17-negativen Nieren signifikant unterschiedlich von Wildtyp-Nieren. Während die GSH-Peroxidase, also jenes Enzym, das die Detoxifikation von Wasserstoffperoxid zu Wasser katalysiert, in ihrer Aktivität gehemmt ist, zeigt die γ -Glutamyl-Transpeptidase eine Aktivitätserhöhung auf 200 % des Wildtyps.

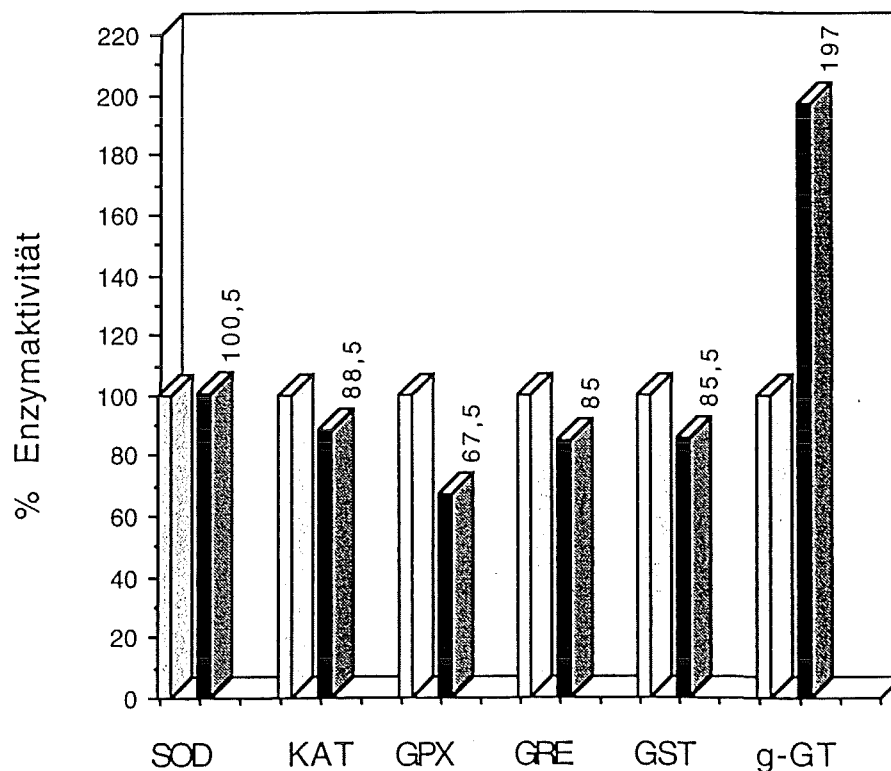


Abbildung 32 : Aktivität der Enzyme des Glutathion-Stoffwechsels in Mpv17-negativen Mäusen

SOD: Superoxid-Dismutase, KAT: Katalase, GPX: Glutathion-Peroxidase, GRE: Glutathion-Reduktase, GST: Glutathion-S-Transferase, g-GT: Gamma-Glutamyltranspeptidase.

Der helle Balken entspricht dem Wildtyp-Wert (100%), der dunkle dem Wert bei Mpv17-negativen Tieren.

Auch die Katalase, ein weiteres H_2O_2 -abbauendes Enzym, ist wie die GSH-Peroxidase in ihrer Aktivität vermindert. Dies deutet, ebenso wie die Ergebnisse der HE-Färbung, auf eine geringere Belastung der Zelle mit ROS hin, da beide ROS-abbauenden Enzyme (Katalase und GSH-Peroxidase) geringere Aktivität zeigen.

Andererseits ist die Aktivität der γ -Glutamyl-Transpeptidase stark erhöht, dieses Enzym leitet durch Abspaltung von Glutaminsäureresten den Abbau von GSH beziehungsweise GSH-Konjugaten ein. Die Erhöhung der Aktivität dieses Enzyms führt zu einem erhöhten GSH-Abbau, möglicherweise ein kompensatorischer Mechanismus, der eine zu starke Akkumulation des nicht mehr durch GSH-Peroxidase verbrauchten GSH verhindern soll.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ROS zusätzlich zu den seit längerem bekannten zellschädigenden Effekten auch positive, für die Funktion der Zelle wichtige Funktionen besitzen müssen. Im Gegensatz zu den direkten schädigenden Effekten, welche ROS zum Beispiel auf die extrazelluläre Matrix haben können, wäre als positiver Effekt von ROS eine Funktion in der Genregulation, möglicherweise als „second messenger“, denkbar.

4.6.2. Der Einfluß von Mpv17 auf die Genregulation

Wie in Abschnitt 4.5. und 4.6.1. gezeigt, spielt das Mpv17-Protein eine Rolle in der Produktion von ROS und das Fehlen von Mpv17 führt zu einer Veränderung des intrazellulären Redoxpotentials. Weiterhin konnte ein Einfluß von Mpv17 auf die Expression von MMP-2 und cJun gezeigt werden, was eine Rolle von Mpv17 in der Genregulation nahelegt. Aus diesem Grunde sollte nun untersucht werden, inwieweit Mpv17 die Expression anderer Gene über eine Veränderung des intrazellulären Redoxpotentials beeinflusst.

Zu diesem Zweck wurden Hautfibroblasten von Mpv17-negativen Mäusen bis zur Semikonfluenz gezogen und für 30 Minuten mit $100 \mu M H_2O_2$ behandelt (Keyse und Tyrell, 1989). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Medium bis zur RNA-Präparation weitergezogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 zu sehen. Während die nur mit PBS behandelten Kontrollzellen eine starke MMP-2-Expression zeigen, konnte 6 Stunden nach der Behandlung mit H_2O_2 eine Reduktion der MMP-2-Transkriptmenge festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass

es möglich ist, die regulatorische Funktion von Mpv17 durch Gabe von externen Oxidantien zu simulieren.

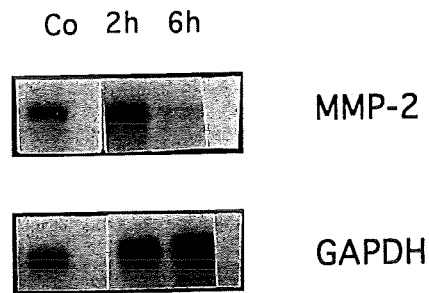


Abbildung 33: MMP-2-Expression nach H₂O₂-Behandlung

Die Mpv17-negativen Fibroblasten wurden mit 100 μ M H₂O₂ für 30 min behandelt und nach der angegebenen Zeit zur RNA-Präparation eingesetzt. Co: mit PBS behandelte Kontrolle, 2 + 6: 2 bzw. 6 Stunden nach der H₂O₂-Behandlung geerntete Zellen

Als Mediatoren einer solchen Regulation böten sich die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 an, welche seit einiger Zeit dafür bekannt sind, eine Rolle bei der Redox-abhängigen Genregulation zu spielen (Schreck *et al.*, 1991, Stein *et al.*, 1989, Devary *et al.*, 1991). So wird NF- κ B durch Behandlung mit H₂O₂ aktiviert (Schreck *et al.*, 1991) und diese Aktivierung lässt sich durch Antioxidantien inhibieren (Schenk *et al.*, 1994, Staal *et al.*, 1990).

Zudem verstärkt eine Verminderung des intrazellulären Glutathions die Wirkung von ionisierender Strahlung (zur Übersicht: Biaglow *et al.*, 1983) und cytotoxischen Substanzen (Russo *et al.*, 1985, Kramer *et al.*, 1988) auf Zellen, Reaktionen, die genauso wie die direkte Behandlung mit Wasserstoffperoxid (Lautier *et al.*, 1992) über ROS wirken sollen.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wiederum, der sich aus Homodimeren des Typs Jun/Jun oder Heterodimeren des Typs Jun/Fos zusammensetzt, wird ebenfalls unter einer Reihe von prooxidativen Bedingungen wie nach Behandlung mit H₂O₂ oder UV-Bestrahlung aktiviert (Stein *et al.*, 1989, Devary *et al.*, 1991).

Für eine mögliche Rolle von AP-1 spräche, dass in Abbildung 28 ein Einfluss der Expression von Mpv17 auf die Expression von cJun, der einen Hälfte des Heterodimers AP-1, zu sehen ist. Jedoch wird AP-1 durch prooxidative Bedingungen aktiviert (Stein *et al.*, 1989, Devary *et al.*, 1991), in Mpv17-negativen Zellen ist dagegen das Redoxgleichgewicht zur reduzierten Seite hin verschoben.

Zudem spricht das MMP-2-Gen auf Stimulation durch Phorbolester (TPA) und Lymphokine nur sehr schwach an (Collier *et al.*, 1988), was darauf schliessen lässt, dass eine mögliche AP-1-abhängige Aktivierung von MMP-2 zumindest nicht TPA-abhängig ist. Es wurde auch keine AP-1-Bindungsstelle im bisher untersuchten Promotorbereich identifiziert (Brown *et al.*, 1990, Huhtala *et al.*, 1990).

Aus diesen Gründen wurde im weiteren nur auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B eingegangen, obwohl auch hier im bisher bekannten Teil des MMP-2-Promotors keine Bindestelle gefunden wurde.

Zu diesem Zweck wurde der Reportervektor NF- κ B-TATA-CAT, der das Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen unter der Kontrolle einer NF- κ B-Bindestelle und einer TATA-Box besitzt, in 3T3-Zellen sowie RSV-7-Zellen (3T3-Zellen, die das humane Mpv17-Gen unter der Kontrolle des RSV-Promotors überexprimieren) transfiziert und die CAT-Aktivität gemessen. Zusätzlich wurden Doppeltransfektionen des Reporterkonstrukts zum einen mit einem RSV-Leervektor und zum anderen mit dem RSV-Mpv17-Konstrukt in 3T3-Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 zu sehen. Mit dieser Methode konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der CAT-Aktivität und damit kein Hinweis auf eine mögliche Rolle von NF- κ B in der Mpv17-abhängigen Genregulation festgestellt werden.

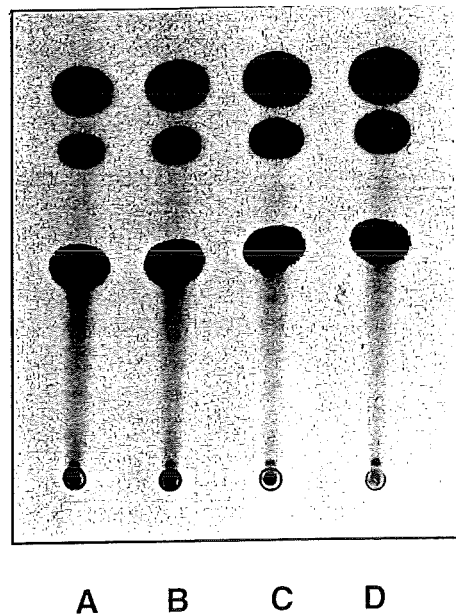


Abbildung 34: CAT-Aktivität eines NF- κ B-abhängigen Expressionskonstruktes in Zellen, die in ihrem Mpv17-Gehalt variieren.

A: NF- κ B TATA CAT in 3T3-Zellen, B: NF- κ B TATA CAT in RSV-7-Zellen, C: NF- κ B TATA CAT + RSV-0 in 3T3-Zellen, D: NF- κ B TATA CAT + RSV-Mpv17 in 3T3-Zellen. Die Zellen wurden mittels Kalziumphosphatpräzipitation transfiziert und 36 h nach der Transfektion geerntet.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass das Mpv17-Protein aktiv an der Regulation des MMP-2-Gens beteiligt ist. Weitere Experimente, bei denen das Mpv17-Gen in Mpv17-homozygote Zellen transfiziert wurde, zeigen eine Herunterregulation der MMP-2-mRNA und eine verringerte MMP-2-Aktivität in Mpv17-exprimierenden Klonen (Nestl, 1996). Aus der Tatsache, dass durch Behandlung mit H_2O_2 derselbe Effekt auf die MMP-2-mRNA erzielt werden konnte, kann der Schluss gezogen werden, dass die Regulation höchstwahrscheinlich über ROS funktioniert. Eine Beteiligung der beiden bisher bekannten ROS-abhängigen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Die durch retrovirale Insertionsmutagenese erzeugte Mauslinie Mpv17 ist defizient für das Mpv17-Protein (Weiher et al., 1990), einem Protein von etwa 20 kD mit peroxisomaler Lokalisation (Zwacka et al., 1994). Der Ausfall dieses Gens in homozygoten Mpv17-Mäusen führt zu einem erhöhten Blutdruck (Clozel et al., zur Veröffentlichung eingereicht), erhöhten Cholesterinspiegel, einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose und schließlich zu Proteinurie und nephrotischem Syndrom (Weiher et al. 1990). Das menschliche Homolog konnte auf Chromosom 2p21-23 lokalisiert werden (Karasawa et al., 1993) und ist evolutionär hochkonserviert (92 % Identität der cDNA-Sequenzen von Maus und Mensch). Es scheint somit Träger einer wichtigen Funktion zu sein. Durch Einbringen des menschlichen Mpv17-Gens in Mpv17-homozygote Mäuse mittels Transgenese konnte der Kausalzusammenhang zwischen dem Fehlen der Mpv17-Expression und dem Phänotyp (Glomerulosklerose) bewiesen werden, ebenso wie die funktionelle Konservierung zwischen Maus und Mensch (Schenkel et al., 1995).

Die Expression dieses Gens in der Maus ist relativ schwach und in vielen Geweben nachzuweisen mit etwas stärkerer Expression in Herz, Niere und Gehirn. Auch einige Zelllinien wie NIH 3T3, GM 637, 293 oder Hep G2 zeigen Expression.

Histologisch als auch physiologisch zeigen sich starke Ähnlichkeiten zu menschlichen Nierenleiden wie zum Beispiel hereditären Nephropathien, weshalb durch das Studium der Mpv17-Mausmutante möglicherweise wichtige Erkenntnisse über den genetischen Hintergrund ebendieser Erkrankungen gewonnen werden können. Die menschliche Erbkrankheit mit der grössten Ähnlichkeit zu dem mutanten Phänotyp ist das Kongenitale Nephrotische Syndrom vom finnischen Typus (CNS-F), eine autosomal rezessive Nierenkrankheit, welche möglicherweise auf einem Defekt in der glomerulären Basalmembran beruht (Nash et al., 1992, Olson 1992). Jedoch konnte das CNS-F-Gen kürzlich auf Chromosom 19 kartiert werden (Kestilä et al., 1994) und somit scheidet CNS-F als Kandidat für eine menschliche, auf einem Defekt des Mpv17-Gens beruhende Krankheit aus.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb zunächst eine weitere Charakterisierung der Mausmutante vorgenommen werden, um zusätzliche Hinweise auf die Natur einer möglichen menschlichen Entsprechung des mutanten Phänotyps zu gewinnen. Dabei sollte wegen der häufig zu beobachtenden Gemeinsamkeiten zwischen Niere und Innenohr besonderen Wert auf Veränderungen in der Cochlea gelegt werden.

Ausgehend von den dadurch gewonnenen Daten und der peroxisomalen Lokalisation des Mpv17-Proteins sollten sodann Untersuchungen zur Funktion dieses Gens vorgenommen werden, um einen Einblick in den molekularen Pathomechanismus von erblichen Nierenkrankheiten zu bekommen.

5.1 Mpv17 und die Cochlea

Unter den menschlichen Nierenkrankheiten gibt es nicht wenige, die mit Innenohrdefekten assoziiert sind. Hierzu gehören unter anderem das Alport Syndrom (erbliche progressive Glomerulonephritis mit sensorineuraler Taubheit), Refsum-Syndrom und die Nephropathie beim Diabetes mellitus. Ähnliche Funktionen der Epithelien in Niere und Innenohr wie zum Beispiel die Aufrechterhaltung und Regulation der ionalen Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit, gleiche toxische Reaktionen auf diverse Pharmazeutika (Begg und Barclay, 1995) und eine ähnliche Antigenizität (Quick et al., 1973, Arnold et al., 1976) und dadurch Zusammensetzung von Basalmembran und Epithelzellen vervollständigen das Bild der Gemeinsamkeiten beider Organe.

Während eine ganze Reihe von Tiermutanten mit einem Glomerulosklerose-Phänotyp existieren, fehlen jedoch bei praktisch all diesen Mutanten Untersuchungen am Innenohr. Zum Beispiel zeigen Mäuse, die das SV40 large T-Antigen unter der Kontrolle des eigenen Promotors exprimieren, zystische Erweiterungen der Tubuli und Glomerulosklerose mit Proteinurie, bevor sie an Gehirntumoren sterben (MacKay et al., 1987). Transgene Ratten, die das Maus-Renin-Gen überexprimieren, zeigten starken Bluthochdruck und entwickelten eine Glomerulosklerose (Bachmann et al., 1992). Überexpression von c-Myc in renalen Tubulizellen (Trudel et al., 1991) führte ebenso wie der Ausfall von Laminin $\beta 2$ (Noakes et al., 1995) in Mäusen zu Glomerulosklerose. Genauere Untersuchungen am Innenohr dieser Tiere wurden jedoch, vermutlich aufgrund der Schwierigkeit der Präparation, bisher nicht durchgeführt.

Aus diesen Gründen wurden die Innenohren von Mpv17-Tieren licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Die hierbei entdeckten schweren Läsionen umfassten eine Degeneration der Stria vascularis, Verdickung und longitudinale Aufspaltung der Basalmembran der Striakapillaren in mehrere Schichten und eine Verdickung der Epithelzellschicht der Striakapillaren. Weiterhin zeigte sich eine

Degeneration des Corti'schen Organs und eine Verringerung der Nervenzellen im Spiralganglion.

5.1.1 Degeneration der Stria vascularis

Die Stria scheint einer starken Desorganisation zu unterliegen. Lichtmikroskopisch ist die Stria deutlich dünner als in Kontrolltieren und die Striagesfäße zeigen PAS-positive Verdickungen der Basalmembran (Meyer z. Gottesberge, persönliche Mitteilung), wie dies auch in Biopsien von Alport-Patienten (Alport, 1927) und Patienten mit Diabetes mellitus (Jorgensen, 1961) zu sehen ist. Zwar sind in der Stria vascularis alle drei Zelltypen (Marginalzellen, Intermediärzellen und Basalzellen) vorhanden, im Gegensatz zur „white spotting“-Mausmutante, bei der ein ähnlicher Phänotyp durch das Fehlen der Intermediärzellen (Melanozyten) bedingt ist (Steel et al., 1987, Schrott und Spöndlin, 1987). Jedoch fehlen an einigen Stellen die Marginalzellen, die normalerweise als durchgängige Zellschicht die Stria vom endolymphatischen Raum abgrenzen, so dass die Intermediärzellen und möglicherweise auch die Basalzellen mit der Endolymphe in Kontakt kommen können (Meyer zum Gottesberge et al., 1996).

Die Stria ist normalerweise Teil einer epithelalen Schicht, welche die Endolymphe von der sie umgebenden Perilymphe isoliert. Die sensorischen Zellen, die unterstützenden Zellen und alle anderen die Scala media auskleidenden oder begrenzenden Zellen sind deshalb asymmetrisch in ihrer Form, funktionell polarisiert und an ihren apikalen Enden durch „tight junctions“ verbunden, um eine Durchmischung von Endolymphe und Perilymphe zu verhindern.

Dies ist besonders wichtig, da sich Endolymphe und Perilymphe in ihrer ionalen Zusammensetzung stark unterscheiden. Während die Perilymphe in ihrer Zusammensetzung den anderen extrazellulären Flüssigkeiten wie zum Beispiel der Cerebrospinalflüssigkeit ähnelt (hoher Na-, geringer K-Gehalt), ist die Endolymphe einzig unter den extrazellulären Körperflüssigkeiten (geringer Na-, hoher K-Gehalt). Zusätzlich ist die Scala media elektrisch polarisiert. Die Potentialdifferenz von +70 bis +90 mV bildet das endocochleäre Potential (EP). Die Aufrechterhaltung dieses EPs erfordert aktive Ionentransportmechanismen, welche hauptsächlich in der Stria vascularis lokalisiert sind (Tasaki und Spyropoulos, 1959). In der Tat sind die Marginalzellen durch die enorme Oberflächenvergrößerung, welche durch die basalen

Membranfaltungen bedingt ist, ideal für eine aktive Ionentransportfunktion geeignet und es kann in der Stria eine große Menge Na,K-ATPase nachgewiesen werden (Ross et al., 1982).

Die hier beobachteten Läsionen lassen erwarten, dass zum einen aufgrund der nun nicht mehr vollständigen Abgrenzung von Endolymphe und Perilymphe möglicherweise K-Ionen in die Perilymphe bzw. die extrazelluläre Flüssigkeit gelangen können.

Zum anderen ist es wahrscheinlich, dass die Stria aufgrund der Oberflächenverkleinerung, welche durch die Reduktion der Basalfortsätze der Marginalzellen bedingt ist, ihre Funktion (Erzeugung des EP) nicht mehr vollständig erfüllen kann. Diese Folgerung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass in der Stria von Mpv17-Tieren die α 1-Untereinheit der Na,K-ATPase, im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle, praktisch nicht nachweisbar ist, und auch die β 2- und β 1-Untereinheiten sind teilweise vermindert (K. Nolting, persönliche Mitteilung). Hierbei ist zu erwähnen, dass die α 1-Untereinheit auch in der Niere vorkommt (Feraille et al., 1995), bisher wurde deren Vorkommen in Nieren von Mpv17-Tieren jedoch noch nicht untersucht.

Eine derartige Veränderung in der Zusammensetzung der Endolymphe kann weitreichende Folgen haben. Das endocochleäre Potential von etwa +80 mV ist für den Hörprozess sehr wichtig. In Serienschaltung mit dem Ruhepotential der Haarsinneszellen von etwa -70 mV (äußere Haarsinneszellen) beziehungsweise -45 mV (innere Haarsinneszellen) ergibt dieses Potential eine gesamt-elektromotorische Kraft von 120 bis 140 mV an der Rezeptormembran, die für die Bewegung positiver Ladungsträger durch Transduktionskanäle in den Stereocilien (Russell, 1983) verantwortlich ist.

Dieser stetige Einfluß vermutlich von K-Ionen wird durch die Scherung der Stereocilien verändert und erzeugt dadurch Änderungen im Membranpotential, d.h. ein Rezeptorpotential wird generiert. Bewegung der Stereocilien in Richtung des grössten Stereociliums erzeugt dabei einen verstärkten Einstrom und damit eine Depolarisation des zellulären Membranpotentials, Scherung in die entgegengesetzte Richtung reduziert den Einstrom und erzeugt eine Hyperpolarisation (Hudspeth et al., 1977, Übersichtsartikel: Flock et al., 1983).

Es ist nun leicht verständlich, dass eine Änderung der ionalen Zusammensetzung der Endolymphe einen Einfluß auf die Erregbarkeit und damit die Funktion der Haarsinneszellen und der Nervenzellen haben muss (Corey und Hudspeth, 1979), und ein K-Ausfluß aus der Endolymphe in die Perilymphe könnte zu einer K-Vergiftung

der Haarsinneszellen führen (Legouix und Pierson, 1977), deren Zellkörper im Nuel-Raum von Perilymphe umgeben sind. So wird das Menière-Syndrom, charakterisiert durch Tinnitus, fluktuierenden Hörverlust und plötzlich einsetzende Schwindelanfälle, vermutlich durch eine Störung der Ca-Homöostase in der Endolymphe verursacht (Meyer z. Gottesberge, FFF). Auch zeigen Patienten mit perilymphatischen Fisteln, welche zu einer Verletzung des häutigen Labyrinths und damit zu einer Durchmischung von Perilymphe und Endolymphe führen, ähnliche Symptome (Zenner et al., 1994), und experimentelle Zerstörung der Lamina reticularis führt im Meerschweinchen zu Hörverlust (Geyer et al., 1978). Schlußendlich sei noch erwähnt, dass in einigen Patienten mit Diabetes mellitus Erythrocyten in der Endolymphe gefunden wurden (Kovar, 1973), was auf ein Eindringen von Blut in den endolymphatischen Raum schliessen lässt. Dies könnte auch hier für die beobachteten Symptome wie plötzlich einsetzende Taubheit (Übersichtsartikel Kovar, 1973) und Menière-ähnliche Schwindelanfälle (Jorgensen, 1961) verantwortlich sein.

5.1.2 Degeneration des Corti'schen Organs und Atrophie des Spiralganglions

Licht- wie elektronenmikroskopisch ist bei Mpv17-Tieren eine Degeneration des Corti'schen Organs festzustellen. Häufig fehlen die äusseren Haarsinneszellen, bisweilen auch die inneren, die dann durch wenig differenzierte Epithelzellen ersetzt sind. Hierdurch fehlt auch der äussere und innere Tunnel von Corti sowie der Nuel-Raum, also jene Hohlräume, welche die basalen Teile der Haarsinneszellen umgeben und mit Cortilymphe (=Perilymphe) gefüllt sind.

Da die strukturellen Veränderungen sowohl in alten wie auch in jungen Tieren beobachtet wurden, wenngleich in älteren Tieren die Veränderungen stärker waren, ist es nicht möglich, mit Sicherheit zu bestimmen, ob Stria vascularis und Organ von Corti parallel oder nacheinander geschädigt werden. Jedoch lässt sich aus weniger betroffenen Tieren die Tendenz ableiten, dass die Schädigungen in der Stria vascularis vermutlich vor denen des Corti'schen Organs und des Spiralganglions eintreten, da Änderungen in der Struktur des Corti'schen Organs fast ausschließlich in Präparaten beobachtet wurden, bei denen die Stria erhebliche Schäden aufweist. Demzufolge wäre eine Erklärung für die beobachtete radiale Progression der Läsionen, dass die veränderte Zusammensetzung der Endolymphe die Funktion der Haarsinneszellen

beeinträchtigt und dadurch die Schädigungen des Corti'schen Organs verursacht. Ein derartiger Kausalzusammenhang zwischen Veränderung der ionalen Zusammensetzung der Endolymphe durch Verletzungen der Lamina reticularis und Taubheit konnte kürzlich bewiesen werden (Zenner et al., 1994).

Die Atrophie des Spiralganglions wäre schlussendlich dann die Folge der verminderten Anzahl von Haarsinneszellen. Dies ist in Übereinstimmung mit älteren Beobachtungen, nach denen eine Degeneration der Zellen des Spiralganglions nach Schädigung des Corti'schen Organs festgestellt wurde (Ylikoski et al., 1974, Webster und Webster, 1978, Terayama et al., 1977).

Die adulten Tiere zeigten einen deutlichen Gradienten in der Struktur des Corti'schen Organs entlang des Cochleaganges. Während an der Basis an Stelle des Corti'schen Organs häufig nur noch ein undifferenziertes Epithel vorhanden war, konnten am Apex der Cochlea alle Zellen des Corti'schen Organs identifiziert werden, wenngleich auch hier die Rezeptorzellen teilweise geschädigt waren.

Auf der Basis der hier gemachten Beobachtungen kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich bei dem mutanten Phänotyp um einen degenerativen Defekt oder aber um eine Störung in der Entwicklung der Cochlea handelt, wenngleich dieser basal nach apical-Gradient in Übereinstimmung ist mit den Veränderungen, die generell in degenerativen Mutanten gefunden werden (Webster, 1985). Weiterführende Studien an Mäuseembryonen und postnatalen Stadien sind derzeit in Vorbereitung, um diese Frage zu klären.

Aus all diesen Läsionen und besonders aus der Abwesenheit der Haarsinneszellen in weiten Bereichen der Cochlea kann deshalb geschlossen werden, dass das Hörvermögen der Mpv17-Mäuse zumindest eingeschränkt sein muss, vermutlich vorwiegend im hohen Frequenzbereich. Um genaue Aussagen hierüber treffen zu können, muss jedoch ein Hörtest bei Mpv17-Mäusen durchgeführt werden. Dieser ist bereits in Planung, so dass in naher Zukunft diese Daten zur Verfügung stehen werden.

5.1.3 Alport-Syndrom, Refsum-Syndrom und Mpv17

Die hier beschriebenen Veränderungen entsprechen genau den licht- und elektronenmikroskopischen Befunden der Innenohrveränderungen bei Alport Syndrom (Weidauer und Arnold, 1976, Arnold und Friedmann, 1992), einer erblichen Nierenkrankheit verbunden mit sensorineuraler Taubheit. Lichtmikroskopisch wurden hierbei eine Degeneration der Stria vascularis, Atrophie des Spiralganglions und des Hörnerven, Verlust von Haarsinneszellen und Veränderungen der unterstützenden Zellen (Arnold und Friedmann, 1992, Schuknecht, 1973).

Elektronenmikroskopisch ist hier besonders die Verdickung, Verdünnung und longitudinale Aufspaltung der Basalmembranen im Glomerulus sowie in den Striagesfäßen zu bemerken (Rumpelt et al., 1974, Weidauer und Arnold, 1976).

Auch der von basal nach apikal abnehmende Gradient der Schädigung des Corti'schen Organs ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei Alport-Syndrom, da hier das Hörvermögen zunächst im Bereich der hohen Töne beeinträchtigt wird (Alport, 1927), die Perzeption der hohen Töne erfolgt jedoch im basalen Bereich der Cochlea.

Weiterhin hebt die Tatsache, dass ein hoher Prozentsatz der Alport-Patienten unter Bluthochdruck leidet (Govan, 1983), die Ähnlichkeit mit der Mpv17-Mausmutante hervor, die ebenfalls einen erhöhten Blutdruck zeigt (Clozel, persönliche Mitteilung).

Beim Alport-Syndrom sind zusätzlich zu den Nieren- und Cochleadefekten in einigen Fällen auch Abnormalitäten der Augen beschrieben. Diese umfassen Lenticonus (Nielsen, 1978, Govan, 1983), eine charakteristische Formveränderung der Augenlinse, bei der der anteriore Pol der Linse eine konische Deformation aufweist sowie Netzhautveränderungen (Unger und Rother, 1964, Zylberman et al., 1980). Vorläufige Untersuchungen an den Augen von Mpv17-Mäusen zeigten bisher keine Veränderungen, die über die normalen Augenläsionen albinotischer Mäuse hinausgingen (Eckmiller, persönliche Mitteilung).

Eine weitere menschliche Erbkrankheit, deren Phänotyp Ähnlichkeiten zu Mpv17-Tieren aufweist, ist das Refsum-Syndrom (Roels, 1991), eine hereditäre Neuropathie. Es handelt sich hierbei um eine seltene autosomal rezessive Erbkrankheit, die durch periphere Neuropathie, Retinitis Pigmentosa, Taubheit und Herzanomalien gekennzeichnet ist. Weiterhin ist eine diffuse Verdickung der peripheren Nerven in Form konzentrischer Lamellen um einzelne Axone zu beobachten, die auf eine Verdickung des Bindegewebes zurückzuführen ist. Häufig zeigt sich ein kompletter Verlust der Myelinscheide und der Nerv besteht nur noch aus Nervenfasern und

Kollagenfasern. Im Innenohr lassen sich ein Kollaps der Reissnerschen Membran, eine Desorganisation des Corti'schen Organs, eine Degeneration der Stria vascularis und die Atrophie des Spiralganglions feststellen (Hallpike, 1967). Der Nierenphänotyp besteht aus Lipidablagerungen im proximalen und distalen Tubulus (Pabico et al., 1981), Lipidurie, minimaler Proteinurie und leichter mesangialer Sklerose. Mikroskopisch zeigen sich eine Vakuolisierung von tubulären Epithelzellen und Podozyten sowie Veränderungen der Mitochondrien in den tubulären Epithelzellen. Molekular konnte ein Defekt der Phytansäureoxidase als Ursache von Refsum-Syndrom identifiziert werden (Roels, 1991). Der Verlust dieses peroxisomalen Enzyms führt zu einer Akkumulation von Phytansäure in Serum und Urin.

Die Ähnlichkeit zu Mpv17 betrifft nicht nur die peroxisomale Lokalisation der Phytansäureoxidase und des Mpv17-Proteins, auch die Innenohrphänotypen sind bis auf die kollabierte Reissnersche Membran sehr ähnlich. Vorläufigen elektronenoptischen Untersuchungen zufolge zeigen sich im Spiralganglion zwischen Nervenfasern und der (vorhandenen) Myelinscheide eine Schicht faseriger Substanz, welche in Kontrolltieren nicht aufzufinden war (H. Felix, persönliche Mitteilung). Dies könnte als eine milde Form der oben erwähnten Änderungen bei der Myelinisierung und Ersetzung durch Kollagen bei Refsum-Syndrom interpretiert werden.

In der Niere ist die Ähnlichkeit beider Phänotypen nicht sehr ausgeprägt, da in Mpv17-Tieren bisher weder Lipidablagerungen noch eine Vakuolisierung von tubulären Epithelzellen und Podozyten festgestellt wurde, Proteinurie und Glomerulosklerose sind jedoch ebenfalls vorhanden.

Eine Klärung der Frage, ob Mpv17 und Refsum-Syndrom auf einer gemeinsamen biochemischen Grundlage beruhen, also auf einer Akkumulation von Phytansäure, liesse sich nur durch eine Messung der Plasmaphytansäurewerte bei Mpv17-Tieren klären.

Insgesamt zeigt sich die größte Ähnlichkeit zwischen Mpv17 und Alport-Syndrom. Da in Mpv17-Mäusen die glomeruläre Basalmembran zwar verdickt, nicht jedoch longitudinal in mehrere Schichten aufgesplittet ist, sind die Phänotypen nicht vollständig identisch, jedoch sind sie ähnlich genug, um einen ähnlichen Pathomechanismus, also einen Defekt im Aufbau der Basalmembranen, zu postulieren.

5.1.3 Mpv17-Expression im Innenohr

Die oben erwähnten Daten werfen nun die Frage auf, ob es sich bei den in der Cochlea beobachteten Läsionen um primäre Defekte handelt, oder aber ob es nur sekundäre Auswirkungen eines an anderer Stelle liegenden Defekts sind.

So wäre es denkbar, dass die Glomerulosklerose eine Folge des erhöhten Blutdrucks ist, da Hypertonie und Glomerulosklerose häufig gemeinsam auftreten (ZZZ). Der Innenohrdefekt könnte möglicherweise als Folge des in Mpv17-Mäusen auftretenden erhöhten Cholesterinspiegels auftreten, wenn zum Beispiel durch Arteriosklerose die intensive Durchblutung der Cochlea beeinträchtigt wäre. Gegen diese Hypothesen spricht, dass die Hypertonie nicht vor der Glomerulosklerose festzustellen ist (Clozel, persönliche Mitteilung) und dass auch keine sklerotischen Gefäße in der Cochlea gefunden wurden (Meyer z. Gottesberge, persönliche Mitteilung).

Wenn auch der Beweis für einen direkten Effekt von Mpv17 auf die Cochlea nicht zu führen ist, können doch die Voraussetzungen dafür getestet werden. Als notwendige, wenngleich nicht hinreichende Bedingung für einen direkten Effekt muss die Expression von Mpv17 in den bei homozygoten Tieren betroffenen Geweben postuliert werden.

Über die Expression von Mpv17 in der Maus sind bisher nur wenige Daten verfügbar. So lässt sich Mpv17-mRNA zwar in Herz, Hirn, Niere, Hoden, Leber und Milz nachweisen, aber einzig für die Niere sind die Zellen bekannt, die Mpv17 produzieren. So konnte in der Niere Mpv17-Expression in den Podozyten nachgewiesen werden (Zwacka, 1995), also genau in den Zellen, die in Mpv17-negativen Tieren geschädigt sind.

In Ermangelung eines in Immunhistochemie funktionierenden Antikörpers konnte nun mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierungstechnik Mpv17-Expression in der Cochlea von 4 Tage alten Mäusen nachgewiesen werden. Insbesondere konnte das Transkript verstärkt im Spiralganglion und der Stria vascularis nachgewiesen werden, wiederum den Geweben, die phänotypisch Läsionen zeigen. Keine stärkere Expression wurde im Organ von Corti festgestellt. Dies könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass das Corti'sche Organ zu diesem Zeitpunkt seiner Entwicklung Mpv17 noch nicht exprimiert. Andererseits würde dies die Hypothese unterstützen, dass die Schädigung des Corti'schen Organs ein sekundärer Effekt ist, der auf der veränderten Endolymphzusammensetzung beruht.

5.2 Die extrazelluläre Matrix in Mpv17-Mäusen

Als molekulare Ursache für Alport-Syndrom konnten Mutationen in den Genen für die $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ -Untereinheiten des Typ IV-Kollagens identifiziert werden (Mochizuki et al., 1994, Barker et al., 1990). Typ IV-Kollagen ist, häufig assoziiert mit Laminin, ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (ECM). Diese ECM ist für die morphologische Stabilität von Geweben und Organen verantwortlich und kann in verschiedenen Formen auftreten, zum Beispiel als spezialisierte Strukturen wie Knorpel oder Sehnen oder aber als Basalmembran und damit als Unterlage für epitheliale Zellen (Übersichtsartikel: Lin und Bissell, 1993, Stetler-Stevenson et al., 1993). Die Matrixbestandteile werden von mesenchymalen und epithelialen Zellen synthetisiert und in den extrazellulären Raum sezerniert. Den größten Anteil der Matrixproteine stellen die Kollagene dar, die 50% des gesamten Proteingehalts des Körpers ausmachen (Übersichtsartikel: Darnell et al., 1994).

Sie teilen sich in mindestens 16 Kollagentypen auf, die in Struktur und Vorkommen verschieden sind (Übersichtsartikel: Darnell et al., 1994). So sind die Typen I, III, V und VI Hauptbestandteile der Bindegewebs-, Sehnen- und Knochenmatrix. Typ II und Typ IX kommt in der Knorpelmatrix vor, während Typ IV Hauptbestandteil der Basalmembranen ist.

Typ IV-Kollagen ist eine Unterfamilie aus bisher 6 Untereinheiten oder Ketten, die sich in ihrer räumlichen und zeitlichen Expression unterscheiden und dadurch vermutlich die funktionelle Vielfalt der Basalmembranen ermöglichen (Übersichtsartikel: Hudson et al., 1993). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Basalmembran ist Laminin, wie Typ IV-Kollagen ein Heterotrimer und ebenso eine Genfamilie, bestehend aus bisher identifizierten 7 Untereinheiten.

Diverse Erbkrankheiten und Phänotypen von Tiermutanten sind bekannt, die auf Mutationen in den Kollagen- und Laminin-Genen beruhen. Tabelle 3 gibt einen kurzen Überblick über die bisher gefundenen Korrelationen zwischen defekten ECM-Genen und Erbkrankheiten.

Mutation/Defekt	Phänotyp	Referenz	Niere	Innenohr
Coll I α 1	Osteogenesis imperfecta, Osteoporose, EDS VIIA	Kuivaniemi et al., 1991		*
Coll I α 2	EDS VIIB, Osteogenesis imperfecta, Marfan Syndrom	Kuivaniemi et al., 1991, Phillips et al., 1990, Weil et al., 1988		*
Coll II	Stickler Syndrom, Chondrodysplasie, Achondrogenese	Ahmad et al., 1990, Lee et al., 1989, Vissing et al., 1989		*
Coll III	EDS IV, Aneurisma	Superti-Furga et al., 1989, Kontusaari et al., 1990.		
Coll IV α 3	Alport Syndrom	Hudson et al., 1993	*	*
Coll IV α 4	Alport Syndrom	Hudson et al., 1993	*	*
Coll IV α 5	Alport Syndrom	Barker et al., 1990	*	*
Lam β 2	Glomerulosklerose	Noakes et al., 1995	*	n.d.

Tabelle 3: Mutationen in ECM-Bestandteilen und die daraus folgenden Phänotypen

EDS Ehlers-Danlos-Syndrom,

Die meisten dieser Phänotypen resultieren aus dem Ausfall beziehungsweise der Synthese von strukturell defekten Untereinheiten von ECM-Bestandteilen, was zu teilweise schweren Schäden in Knochen und Knorpel oder auch zu generalisierten Phänotypen wie Osteoporose führen kann. Einige der Mutationen haben Phänotypen in Niere und/oder Innenohr zur Folge, weshalb eine Untersuchung der ECM-Bestandteile in Mpv17-Mäusen angeraten schien. Der Innenohrphänotyp der Mpv17-Maus zeigt weitreichende Ähnlichkeiten mit Alport-Syndrom, wenngleich die Phänotypen nicht völlig identisch sind. Aus diesem Grund wurden die Mpv17-Mäuse auf Vorkommen und Verteilung von Kollagen IV- und Laminin- Untereinheiten untersucht.

Sowohl in der Niere als auch im Innenohr waren alle untersuchten ECM-Bestandteile in Mpv17-Mäusen an denselben Orten vorhanden wie in Wildtyp-Mäusen, es handelt

sich bei dieser Mutante also nicht um den vollständigen Ausfall eines ECM-Bestandteils. In der Niere konnte das (verstärkt vorhandene) sklerotische Material in Mpv17-Tieren als Kollagen IV $\alpha 1/2$ und Laminin $\beta 1$ identifiziert werden.

Im Innenohr zeigten die Kollagen- und Laminin-Ketten ein spezifisches Expressionsmuster. Kollagen IV $\alpha 1/2$ war deutlich in den Kapillaren von Stria vascularis und Spiralligament sowie im Spiralganglion vorhanden. In Mpv17-Tieren war die Menge in den Striakapillaren deutlich erhöht, während in den Kapillaren des Spiralligaments und im Spiralganglion keine erhöhte Expression festgestellt werden konnte. Wegen der sehr starken Färbung im Spiralganglion könnten kleinere Unterschiede hier möglicherweise nicht sichtbar sein, da sich ein Sättigungseffekt bei der Färbung einstellen könnte. Von Nachteil war, dass es nicht bekannt ist, welche der beiden Ketten ($\alpha 1$ oder $\alpha 2$ oder beide) der verwendete Antikörper spezifisch erkennt. So wäre es durchaus möglich, dass die andere, möglicherweise nicht nachweisbare Kette fehlt oder zumindest Änderungen zeigt. Eine Klärung dieser Frage wird erst mit der Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern gegen die einzelnen Ketten möglich sein. Ähnlich verhält es sich mit den $\alpha 3$ - und $\alpha 6$ -Untereinheiten, für die ebenfalls keine in der IHC funktionierenden Antikörper zur Verfügung standen. Gerade die $\alpha 3$ -Untereinheit, die bei Alport-Patienten mutiert sein kann, wäre ein wichtiger Kandidat für Veränderungen auch in der Mpv17-Maus.

Die $\alpha 4$ -Untereinheit des Typ IV-Kollagens zeigt ein diffuses Vorkommen im Spiralligament, wobei eine verstärkte Färbung im suprastrialen Teil festgestellt wurde. In der Niere ist sie in den Glomeruli sowie in einem Teil der tubulären Basalmembranen nachzuweisen. Wie auch bei der $\alpha 5$ -Untereinheit, die spezifisch in oder um die äusseren Sulkuszellen, Wurzelzellen und Interdentalzellen sowie in der Niere in Glomeruli und schwach in einem Teil der tubulären Basalmembranen vorkommt, waren auch hier weder in Niere noch in der Cochlea Unterschiede zwischen Mpv17- und Wildtyp-Tieren festzustellen.

Laminin $\beta 1$ konnte bei Wildtypen schwach in Glomerulus und Tubuli sowie verstärkt in den Glomeruli von Mpv17-Tieren nachgewiesen werden. Im Innenohr zeigte sich keine Expression.

Laminin $\beta 2$ war in der Niere im Glomerulus und schwächer in den tubulären Basalmembranen festzustellen. Dies steht teilweise im Gegensatz zu den Ergebnissen von Noakes et al., die Laminin $\beta 2$ nur im Glomerulus und in den Basalmembranen von Blutgefässen, nicht jedoch in tubulären Basalmembranen nachweisen konnten. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse wäre im Alter der untersuchten Tiere zu suchen, da Noakes et al. Tiere im Alter von 12-20 Tagen untersuchte,

während die untersuchten Mpv17- und Wildtyp-Tiere ein Alter von 3-12 Monaten besaßen. So wäre eine Akkumulation geringer Mengen von Laminin β 2 im Laufe der Zeit eine Möglichkeit, das Signal zu erklären. Eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers mit den tubulären Basalmembranen konnte nicht nachgewiesen werden.

5.3 MMP-2 und Mpv17

Wie bereits in Kapitel 4.5 dargelegt, ist die Überexpression von Matrixbestandteilen bei Glomerulosklerose seit einiger Zeit bekannt (Nakamura et al., 1991, Floege et al., 1991). Aller Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei jedoch eher um die Folge eines primären Defekts der Basalmembran, möglicherweise ein kompensatorischer Mechanismus, der die fehlenden oder nicht funktionellen Basalmembranbestandteile durch Überexpression verwandter Proteine auszugleichen sucht. Ein derartiger Mechanismus ist für die Laminin β 2-Knockout-Maus (Noakes et al., 1995) beschrieben. In Wildtypen enthalten noch nicht voll entwickelte Glomeruli Laminin β 1, welches dann im Laufe der Entwicklung durch β 2 ersetzt wird. Wird nun das β 2-Gen durch Transgenese zerstört, so wird dies molekular kompensiert durch die weitere Expression von Laminin β 1 auch in voll entwickelten Glomeruli. Funktionell ist diese Kompensation jedoch unvollständig, da die Mausmutanten eine massive Proteinurie entwickeln. Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten sowie eine Verdickung und longitudinale Aufspaltung der glomerulären Basalmembran (Noakes et al., 1995). Untersuchungen an den Innenohren dieser Mäuse wurden bisher nicht durchgeführt.

Eine Erklärung für diesen Phänotyp wäre, dass die molekularen Eigenschaften von Laminin β 1 leicht verschieden von β 2 sind und deshalb keine vollständige Komplementation erreicht wird. Die Basalmembran wäre dann übermäßig durchlässig. Alternativ könnte nicht das Fehlen von Laminin β 2, sondern die Anwesenheit von β 1 im Glomerulus die Struktur der GBM zum Beispiel durch Bildung abnormer Heterotrimere stören. Im letzten Falle könnte auch der Mpv17-Phänotyp auf die (normalerweise zu diesem Zeitpunkt nicht vorhandene) Einlagerung von Laminin β 1 im Glomerulus zurückzuführen sein.

Es sind jedoch auch andere Möglichkeiten für die Entstehung von Basalmembranschädigungen als die Abwesenheit eines Bestandteils denkbar.

Eine solche andere Möglichkeit eines Grundes für einen Defekt in der Struktur der GBM wären Fehler im Auf- und Abbau der GBM. Da sich die GBM in einem Fließgleichgewicht befindet und daher einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt (Übersichtsartikel: Birkedal-Hansen et al., 1993), sind die ECM-abbauenden Enzyme gute Kandidaten als Ursache für Defekte in der Integrität der Basalmembranen.

Der Abbau der Matrix wird von einer Reihe proteolytischer Enzyme ausgeführt (Übersichtsartikel: Birkedal-Hansen et al., 1993). Eine besondere Rolle kommt hierbei den Matrixmetalloproteinasen zu, da sie am Beginn des ECM-Abbaus stehen und synergistisch die höhermolekularen Komponenten der ECM degradieren. Die Untergruppe der Kollagenasen enthält dabei die einzigen Enzyme, die in der Lage sind, die tripelhelikalen Abschnitte der Kollagene zu spalten, und unter diesen sind es die Typ IV-Kollagenasen (MMP-2 und MMP-9), welche hauptsächlich das Typ IV-Kollagen der Basalmembranen spalten. MMP-2 wird hauptsächlich von Bindegewebszellen produziert (Seltzer et al., 1981), während MMP-9 vorwiegend von Makrophagen und polymorphonukleären Leukozyten produziert wird (Murphy et al., 1989).

Da zudem eine erhöhte MMP-2-Expression in den Nieren von Tieren mit Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (Nakamura et al., 1994) und von transgenen bGH-Mäusen (He et al., 1995) festgestellt wurde, beides Tiermodelle für Nierendefekte, wurde die Expression dieses Enzyms auch in Mpv17-Tieren untersucht. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene konnte in Nieren und Cochlea von Mpv17-Tieren eine erhöhte Expression von MMP-2 festgestellt werden. In der Niere war die Expression auf die Glomeruli beschränkt, während im Innenohr MMP-2 in Stria vascularis und Spiralligament nachzuweisen war. Auch in Fibroblasten konnte diese negative Korrelation zwischen Mpv17 und MMP-2 festgestellt werden. Weiterhin führt die Überexpression von Mpv17 in Fibroblasten von Mpv17-homozygoten Mäusen zu einer reduzierten MMP-2-Expression (Nestl, 1996). Diese Daten unterstützen die obige Hypothese, nachdem ein verstärkter Abbau von ECM-Bestandteilen die primäre Läsion in Mpv17-Tieren darstellt.

Jedoch muss eine größere Menge nachweisbaren MMP-2-Proteins nicht zwangsweise eine Erhöhung der Aktivität von MMP-2 zur Folge haben, da dieses Enzym auch posttranskriptionell reguliert wird (Übersichtsartikel: Birkedal-Hansen et al., 1993). MMP-2 wird als Propeptid sezerniert und durch eine Protease in die aktive Form überführt (Woessner, 1991). Schlussendlich kann vor Ort noch die Inhibition des prozessierten Enzyms hauptsächlich durch Bindung an TIMP-2 („tissue inhibitor of metalloproteinase“) erfolgen (Howard und Banda, 1991). In der Tat ist in der Niere von Mpv17-negativen Tieren die Menge an TIMP-2-Transkript erhöht. Ein Anstieg

der TIMP-2-Expression parallel zur MMP-2-Expression wurde auch bei der sogenannten zerstörerischen Nephropathie festgestellt (Sharma et al., 1995), bei der eine interstitielle Fibrose der Niere durch unilaterale Ureterzerstörung hervorgerufen wird. Dies unterstreicht die enorme Bedeutung, die eine genaue Regulation des ECM-Metabolismus für die korrekte Funktion der Niere besitzt.

Im Gegensatz hierzu konnte in der Zellkultur in Fibroblasten von Mpv17-Tieren keine Erhöhung von TIMP-2 nachgewiesen werden (Nestl, 1996). Diese Unterschiede zwischen Organ und Zellkultur könnten zum einen auf das doch sehr artifizielle System der Zellkultur oder zum anderen auf eine sekundäre kompensatorische Reaktion im System der Niere zurückzuführen sein. Schlussendlich wäre eine Produktion von TIMP-2 in der Niere durch andere Zelltypen als Fibroblasten möglich.

Da für TIMP-2 ebenfalls eine Rolle in der Bindung des proMMP-2/TIMP-2-Komplexes an die Zellmembran (Emmert-Buck et al., 1995) diskutiert wird, wo das proMMP-2 vermutlich durch eine membranständige Protease aktiviert wird, muss ein erhöhter TIMP-2-Gehalt nicht zwangsweise mit einer generellen Inhibition der MMP-2-Aktivität verbunden sein. Es könnte sich zum einen um einen Mechanismus handeln, welcher für die Lokalisation von MMP-2 an der Zelloberfläche verantwortlich ist, da zum Beispiel Fibroblasten des Stromas MMP-2 zwar produzieren, aber das Proteinprodukt *in vivo* in der Nähe von Epithelzellen lokalisiert ist (Poulsom et al., 1992, Polette et al., 1994, Polette et al., 1993). Dies würde auch die erhöhte TIMP-2-Expression in der Niere, nicht aber in isolierten Fibroblasten erklären. Zum anderen wäre auch die Notwendigkeit einer erhöhten TIMP-Konzentration um die Zellen denkbar, um einen zu starken proteolytischen Angriff auf Zelloberflächenmoleküle zu verhindern.

Durch Substratgelanalyse (Zymogramm) konnte zumindest bei Fibroblasten gezeigt werden, dass die erhöhte Menge nachweisbaren MMP-2s von Mpv17-Fibroblasten auch in einer größeren Menge prozessierten und damit aktivierten Proteins resultiert (Nestl, 1996).

5.4 Die Funktion des Mpv17-Proteins

Da das Mpv17-Genprodukt in Peroxisomen lokalisiert ist (Zwacka et al., 1994) und starke Ähnlichkeit mit PMP22, einem peroxisomalen Membranprotein von 22 kD (Kaldi et al., 1993) mit vermutlich porenbildender Funktion (Diestelkötter und Just, 1993) besitzt, waren natürlich Untersuchungen zum Einfluß von Mpv17 auf Funktion und Biogenese von Peroxisomen interessant.

Peroxisomen sind von einer Membran umgebene, kugelförmige Organellen mit einem Durchmesser von 0,1 bis 1 μm (De Duve und Baudhuin, 1966), die in praktisch allen eukaryontischen Zellen vorkommen. Sie sind charakterisiert durch ihren Gehalt an Katalase, wenngleich noch viele andere Stoffwechselreaktionen ganz oder teilweise in Peroxisomen ablaufen. Die wichtigsten hiervon sind:

- β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren
- Etherlipid (Plasmalogen)-Synthese
- Cholesterinsynthese
- Abbau von Cholesterin zu Gallensäuren
- Bildung von H_2O_2 aus Superoxid und Abbau durch Katalase
- Phytansäureabbau

Seit einiger Zeit sind auch eine ganze Reihe von Erbkrankheiten bekannt, die auf dem Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselwegs beruhen. Hier zu nennen wäre das Zellweger-Syndrom (Roels, 1991), das auf einer generellen Defizienz an Peroxisomen beruht sowie die etwas milderen Formen Neonatale Adrenoleukodystrophie (Moser et al., 1995) und das infantile Refsum-Syndrom, die zwar Peroxisomen besitzen, aber Defizient für mehrere peroxisomale Funktionen sind. Weiterhin sind Krankheiten bekannt, die auf Ausfällen einzelner Enzyme beruhen, so zum Beispiel die Defizienz der Phytansäureoxidase, die zu (normalem) Refsum-Syndrom führt oder die peroxisomale Thiolase-Defizienz (führt zu Pseudo-Zellweger-Syndrom). Eine Defizienz in der Etherlipidsynthese führt zur rhizomelischen Chondrodysplasia punctata, und das Fehlen der Acyl-CoA-Oxidase zu Pseudo-Neonataler Adrenoleukodystrophie (Roels, 1991).

Bisherige Untersuchungen ergaben, dass in Mpv17-Tieren Peroxisomen in normaler Größe, Form und Anzahl vorhanden sind und partikelgebundene Katalase vorhanden ist (Zwacka, 1995).

Ein erhöhtes Verhältnis von C26/C22 wäre ein Hinweis für einen Defekt in der β -Oxidation der langkettigen Fettsäuren (Lazarow und Moser, 1989), da die

peroxisomalen Enzyme präferentiell Fettsäuren mit einer Länge von 24 oder mehr C-Atomen abbauen. Das C26/C22-Verhältnis im Serum war jedoch in Mpv17-Tieren unverändert (Zwacka, 1995), genau wie die Menge an Plasmalogen unverändert war. Weiterhin war die Synthese von Gallensäuren in Mpv17-Tieren unverändert im Vergleich mit Wildtypen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Innenohrphänotypen von Mpv17-Mäusen und Refsum-Patienten Ähnlichkeiten aufweisen, wäre eine Untersuchung des Phytansäurestoffwechsels in Mpv17-Tieren sehr interessant. Eine entsprechende Analyse ist derzeit in Vorbereitung.

Da nun, wie in Abschnitt 4.6.1 bereits ausgeführt, einige Hinweise darauf existieren, dass ROS eine Rolle bei der Entstehung einer Reihe von Nierendefekten spielen (Übersichtsartikel: Shah et al, 1989), die Entstehung und Entgiftung eines großen Teils der ROS im Peroxisom abläuft (Masters und Crane, 1996) und Mpv17 im Peroxisom lokalisiert ist, sollte nun der Einfluss von Mpv17 auf den zellulären Redoxmechanismus studiert werden.

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Hydroethidin (Rothe und Valet, 1990), einem blau fluoreszierenden Lebendfarbstoff, der in der Zelle von ROS und wasserstoffabspaltenden Enzymen zu der rot fluoreszierenden Substanz Ethidium umgesetzt wird, konnte nun eine Verschiebung des zellulären Redoxstatus von Mpv17-Fibroblasten auf die reduzierte Seite festgestellt werden. Dies war dahingehend unerwartet, da bisher hauptsächlich schädigende Effekte von ROS auf die Niere und die ECM bekannt sind.

So spielen, wie bereits erwähnt, ROS eine Rolle bei verschiedenen Tiermodellen für Nierenkrankheiten wie Glyzerinbehandlung (Guidet und Shah, 1989), Ischämie-Reperfusion (McCoy et al., 1988), Gentamicin-Nephropathie (Walker und Shah, 1987) und bei der neutrophil-abhängigen Glomerulusschädigung (Shah et al., 1987) eine Rolle. Ausserdem führen ROS zu Lipidperoxidation (Wardle 1992, Wardle 1993) und diese wiederum führt zu einer Stimulation der Kollagensynthese in Zellen (Chandrakasan, 1991, Chojkier et al., 1989). In der passiven Heymann Nephritis, einem Tiermodell für menschliche membranöse Nephropathie (Couser et al., 1978) mit Proteinurie, das durch Injektion von Antikörpern gegen ungereinigte Fraktionen des Nierencortex in Ratten hervorgerufen wird, konnten in glomerulären Epithelzellen stark erhöhte ROS nachgewiesen werden (Neale et al., 1993). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung von glomerulären Basalmembranen mit H₂O₂ diese leichter von Proteasen angreifbar macht (Fligiel et al., 1984, Vissers und Winterbourn, 1986). Schlussendlich ist die Synthese von Prostaglandinen und

Thromboxanen von isolierten Glomeruli in Gegenwart von ROS erhöht (Baud et al., 1981), da diese Eicosanoide einen großen Einfluss auf die glomeruläre Hämodynamik haben können, könnte die verstärkte Produktion ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese spielen (Schlöndorff und Ardaillou, 1986). Über die Rolle von ROS bei Innenohrdefekten ist bisher nichts bekannt.

Vor diesem Hintergrund war unsere erste Hypothese, dass der der Ausfall von Mpv17 zu einer erhöhten Produktion von ROS führt. Die ROS wiederum hätten dann die Basalmembran zum einen direkt schädigen können und zum anderen zu einer direkten Aktivierung der proMMP-2 führen können (Birkedal-Hansen et al., 1993). Mit dem genau umgekehrten Ergebnis, dass der Ausfall von Mp17 zu einer Reduktion von ROS und damit zu einer Verschiebung auf die reduzierte Seite des Redoxgleichgewichts führt, konnte diese Hypothese jedoch nicht aufrechterhalten werden.

Jedoch passt die Beobachtung der veränderten Aktivität zweier Enzyme des GSH-Stoffwechsels gut zu den obigen Beobachtungen. So konnte eine Reduktion der Aktivität der GSH-Peroxidase in Nieren von Mpv17-Tieren gemessen werden. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von H_2O_2 und GSH zu H_2O und GSSG. Sind nun in Zellen von Mpv17-Tieren weniger ROS vorhanden, so muss auch weniger H_2O_2 entgiftet werden, und demzufolge wird weniger GSH-Peroxidase benötigt.

Die Verschiebung zur reduzierten Seite des zellulären Redoxgleichgewichts könnte dann zu einer Akkumulation von GSH führen, die dann durch die erhöhte Aktivität der γ -Glutamyl-Transpeptidase vermindert wird. Interessant hierbei ist noch, dass die γ -Glutamyl-Transpeptidase ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Synthese von Leukotrien D4 spielt. Die Leukotriene gehören, ebenso wie Prostaglandine und Thromboxane, zu den Eicosanoiden. Ihre biologischen Wirkungen sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch wirken sie als Mediatoren bei Entzündungsreaktionen und steigern die Permeabilität der Kapillaren (Mayatepek und Hoffmann, 1995). Weiterhin sind eine konstriktorische Wirkung auf die Bronchialmuskulatur und eine Erhöhung des Wassereinstroms in die Bronchialmukosa beschrieben (Miyata et al., 1995, Bochnowicz und Underwood, 1995). Eine mögliche erhöhte Menge an Leukotrienen könnte, wie auch im Falle der oben erwähnten Prostaglandine und Thromboxane, ebenfalls einen Einfluß auf die glomeruläre Hämodynamik und den Wasser- und Metabolitentransport der Epithelien haben (Nassar und Badr, 1995). Hier müssten in Zukunft die Nieren und möglicherweise auch die Innenohren auf Veränderungen in ihrem Eicosanoid-Gehalt untersucht werden.

Infolgedessen konzentrierte ich die Untersuchungen in Richtung einer möglichen Rolle von Mpv17 in der Genregulation.

5.5 Mpv17 und Genregulation

Der Einfluss von Mpv17 auf die Expression von MMP-2, cJun und (möglicherweise indirekt) TIMP-2 lieferte bereits einige Hinweise, dass Mpv17 eine Rolle bei der Genregulation spielt. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Behandlung von Ratten mit Tetrachlorkohlenstoff zu einer Verschiebung des zellulären Redoxpotentials auf die reduzierte Seite sowie einer erhöhten Kollagensynthese führt (Hernandez-Munoz et al., 1994). Ausserdem führt die Behandlung von mesangialen Zellkulturzellen mit N-Acetylcystein, einer Substanz, die den zellulären Glutathionspiegel erhöht, zu einem Anstieg der mRNA von Kollagen I und Kollagen IV, während Buthioninsulfoximin, ein Hemmer der GSH-Synthese, diese Erhöhung verhindert (Shan et al., 1994).

Dies führte mich zu der Hypothese, dass Mpv17 über eine Beeinflussung des zellulären Redoxstatus` die Expression von nachgeordneten Genen wie zum Beispiel MMP-2 steuern könnte. Wenn dies so wäre, müsste Mpv17 in denjenigen Zellen exprimiert werden, die hauptsächlich für den Auf- und Abbau der ECM verantwortlich sind. Tatsächlich wird Mpv17 in der Niere von den Podozyten exprimiert (Zwacka , 1995), und in Innenohr kann eine Expression in den Zellen der Stria und des Spiralligaments nachgewiesen werden. Weiterhin sollte sich die Wirkung von Mpv17 durch Prooxidantien simulieren lassen, und in der Tat kann in Mpv17-Zellen, welche eine hohe endogene MMP-2-Expression zeigen, durch Behandlung mit H₂O₂ die Menge an MMP-2-Transkript vermindert werden, während andere Transkripte wie zum Beispiel GAPDH nicht verändert sind. Durch Transfektion von Mpv17 in Mpv17-homozygote Zellen, die daraufhin eine reduzierte MMP-2-Expression zeigten (Nestl, 1996), konnte gezeigt werden, dass Mpv17 eine Schlüsselrolle bei der Regulation von MMP-2 spielt oder zumindest für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer MMP-2-aktivierenden Reaktion verantwortlich ist.

In dieser Arbeit konnte dabei nicht geklärt werden, über welche Transkriptionsfaktoren die erhöhte Expression von MMP-2 erfolgt. Bisher bekannterweise durch den zellulären Redoxstatus aktivierte Transkriptionsfaktoren sind AP-1 (Abate et al., 1990) und NF-κB (Schreck et al., 1991). Zwar soll AP-1 durch Antioxidantien aktiviert werden (Meyer et al., 1993, Schenk et al., 1994), was zu der Beobachtung der erhöhten cJun-mRNA in Mpv17-negativen Zellen passt, jedoch existieren auch gegenteilige Beobachtungen, nach denen AP-1 durch prooxidative Bedingungen aktiviert werden soll (Devary et al., 1991). Da ausserdem AP-1 von sehr vielen Zelltypen auf eine Vielzahl von Stimuli hin exprimiert wird (Angel und Karin, 1991, Herrlich et al., 1992) und daher vermutlich nicht alleine für die Zellspezifität der MMP-

2 Expression verantwortlich sein kann, beschränkten sich die weiteren Untersuchungen auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Auch hier konnte jedoch mit Hilfe von Promotoranalysen kein Einfluss von Mpv17 auf die Transaktivierungsaktivität von NF- κ B festgestellt werden (Abbildung 34).

Eine andere denkbare Möglichkeit wäre auch, dass die Regulation von MMP-2 abhängig von der Kollagensynthese erfolgt. Demzufolge würde in Mpv17-Mäusen aufgrund der Verschiebung des Redoxstatus eine verstärkte Kollagensynthese erfolgen, was dann wiederum als Signal für eine verstärkte Produktion von MMP-2 dienen könnte.

Diese Möglichkeit erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, da auch in Zellkulturzellen der Effekt von Mpv17 auf MMP-2 beobachtet werden konnte, obwohl diese Zellen keinen Kontakt zu einer ECM haben und Kollagene nur in das Medium sezernieren. Zukünftige Untersuchungen müssen hier die Frage nach der Folge der Ereignisse beziehungsweise der Kausalität klären. Eine Möglichkeit hierzu wären MMP-2-transgene Mäuse.

Auch die Beantwortung der Frage, wie genau das Mpv17-Protein Einfluss auf den zellulären Redoxmechanismus nimmt, wird in zukünftigen Arbeiten geklärt werden müssen. Als peroxisomales Protein mit einer starken Ähnlichkeit zu einem anderen, vermutlich porenbildenden peroxisomalen Membranprotein böte sich hier eine Funktion in der Regulation der Membranpermeabilität an. Da im Peroxisom eine ganze Reihe von oxidativen Reaktionen ablaufen, welche als Nebenprodukte freie Radikale und ROS produzieren, ist die Erhöhung der zellulären ROS-Konzentration durch Öffnung von Membranporen im Peroxisom denkbar, wenngleich auch eine direkte, enzymatische Produktion von ROS durch Mpv17 nicht ausgeschlossen werden kann.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden, dass das Mpv17-Protein über Veränderungen des Redoxstatus der Zelle Einfluß auf die Expression zumindest von MMP-2 nimmt. Durch Verlagerung des Redoxstatus auf die reduzierte Seite hin erfolgt eine verstärkte Expression von MMP-2, die vermutlich die Ursache für Schädigungen der Basalmembranen des Glomerulus und der Striakapillaren ist. In der Niere könnte diese Schädigung dann zu kompensatorischen Reaktionen anderer Basalmembranbestandteile führen, welche zu den sklerotischen Ablagerungen führen, alternativ hierzu wäre eine direkte Erhöhung der Kollagenexpression über den veränderten Redoxstatus (Shan et al., 1994) denkbar. Im Innenohr führt die Schädigung der Striakapillaren durch Überexpression von MMP-2 zu einer degenerativen Schädigung oder beeinträchtigten Entwicklung der Stria vascularis, was

vermutlich sekundär zur Schädigung des Corti'schen Organs und des Spiralganglions führt.

Hierbei kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich bei dem Einfluss von Mpv17 auf die Genregulation um die einzige Funktion dieses Proteins handelt.

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die Zusammenhänge zwischen einer Deregulation des Redoxmetabolismus und Schädigungen der Niere und der Cochlea auf. Sie bilden somit die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur redox-abhängigen Genregulation sowie zur Pathogenese diverser Ohrenleiden, insbesondere bei Alport-Syndrom, Refsum-Syndrom, *Diabetes mellitus* und der Altersschwerhörigkeit. Die Mpv17-Mausmutante kann somit in Zukunft als Tiermodell nicht nur für Glomerulosklerose, sondern auch für Ohrenschäden herangezogen werden und wird die weitere Erforschung deren Pathogenese ermöglichen.

5. Literatur

Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J. und Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249: 1157-1161.

Aberdam, D., Galliano, M.F., Vailly, J., Pulkkinen, L., Bonifas, J., Christiano, A.M., Tryggvason, K., Uitto, J., Epstein, E.H. und Ortonne, J.P. (1994). Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is linked to mutations in the gene (*lanc2*) for the g2 subunit of nicein/kalinin (laminin5). *Nature Genet.* 6: 299-304.

Ahmad, N.N., Ala-Kokko, L., Knowlton, R.G., Weaver, E.J., Maguire, J.I., Tasman, W. und Prockop, D.J. (1990). A stop codon in the gene for type II procollagen (*COL2A1*) causes one variant of arthro-ophthalmopathy (the Stickler syndrome). *Am. J. Hum. Genet.* 47: A206

Alport, A.C. (1927). Hereditary familial congenital hemoragic nephritis. *BMJ* 1: 504-506.

Angel, P. und Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072: 129-157.

Arnold, W., Weidauer, H. und Seelig, H.P. (1976). Experimenteller Beweis einer gemeinsamen Antigenizität zwischen Innenohr und Niere. *Arch. Otorhinolaryngol.* 212: 99-117.

Arnold, W. und Friedmann, I. (1992). *Pathology of the inner ear.* Churchill Livingstone, London.

Bachmann, S., Peters, J., Engler, E., Ganten, D. und Mullins, J. (1992). Transgenic rats overexpressing the mouse renin gene. Morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int.* 41: 24-36

Barker, D.F., Hostikka, S.L., Zhou, J., Chow, L.T., Oliphant, A.R., Gerken, S.C., Gregory, M.C., Skolnick, M.H., Atkin, C.L. und Tryggvason, K. (1990). Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 248: 1224-1227.

Baud, L., Nivez, M.P., Chansel, D. und Ardaillou, R. (1981). Stimulation by oxygen radicals of prostaglandin production by rat renal glomeruli. *Kidney Int.* 20: 332-339.

Biaglow, J.E., Varnes, M.E., Clark, E.P. und Epp, E.R. (1983). The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. *Radiat. Res.* 95: 437-455.

Bochnowicz, S. und Underwood, D.C. (1995). Dose-dependent mediation of leukotriene D4-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction in the guinea pig. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52: 403-411.

Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., De Carlo, A. und Engler, J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4: 197-250.

Brown, P.D., Levy, A.T., Margulies, I.M.K., Liotta, L.A. und Stetler-Stevenson, W.G. (1990). Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.* 50: 6184-6191.

Burgeson, R.E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ikbom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G.R., Ortonne, J.-P., Paulsson, M., Sanes, J.R., Timpl, R., und Tryggvason, K. (1994). A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* 14: 209-211.

Chaib, H., Place, C., Salem, N., Chardenoux, C., Vincent, C., Weissenbach, J., El-Zir, E., Loiselet, J. und Petit, C. (1996). A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum. Mol. Genet.* 5: 155-158.

Chandrakasan, G. (1991). Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by superoxide. *Cell. Mol. Biol.* 37: 751-755.

Chen, C. und Okayama, H. (1987). High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2745-2752.

Chojkier, M., Houglum, K., Solis-Herruzo, J. und Brenner, O.A. (1989). Stimulation of collagen gene expression by lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 264: 16957-16962.

Collier, I.E., Smith, J., Kronberger, A., Bauer, E.A., Wilhelm, S.M., Eisen, A.Z. und Goldberg, G.I. (1988). The structure of the human skin fibroblast collagenase gene. *J. Biol. Chem.* 263: 10711-10713.

Corey, D.P. und Hudspeth, A.J. (1979). Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature* 281: 675-677.

Cosgrove, D., Samuelson, G. und Pinnt, J. (1996). Immunohistochemical localization of basement membrane collagens and associated proteins in the murine cochlea. *Hearing Res.* 97: 54-65

Couser, W.G., Steinmüller, D.R., Stilmant, M.M., Salant, D.J. und Löwenstein, L.M. (1978). Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney. *J. Ckin. Invest.* 62: 1275-1287.

Darnell, J., Lodish, H. und Baltimore, D. (1994). *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter. Berlin, New York.

Davis, H. (1958). A mechano-electrical theory of cochlear action. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 87: 789

De Duve, C. und Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (Microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-357.

Devary, Y., Gottlieb, R.A., Lau, L.F. und Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2804-2811.

Diestelkötter, P. und Just, W.W. (1993). In vitro insertion of the 22-kDa peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J. Cell. Biol.* 123: 1717-1725.

Emmert-Buck, M., Emonard, H.P., Corcoran, M.L., Krutzsch, H.C., Foidart, J.M. und Stetler-Stevenson, W.G. (1995). Cell surface binding of TIMP-2 and pro-MMP-2/TIMP-2 complex. *FEBS Letters* 364: 28-32.

Engvall, E., Earwicker, D., Haaparanta, T., Ruoslahti, E. und Sanes, J.R. (1990). Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul.* 1: 731-740.

Feraille, E., Barlet-Bas, C., Cheval, L., Rousselot, M., Carranza, M.L., Dreher, D., Arystarkhova, E., Doucet, A. und Favre, H. (1995). Presence of two isoforms of Na.K-ATPase with different pharmacological and immunological properties in the rat kidney. *Pflugers Arch.* 430: 205-212.

Fligiel, S.E., Lee, E.C., McCoy, J.P., Johnson, K.J. und Varani, J. (1984). Protein degradation following treatment with hydrogen peroxide. *Am. J. Pathol.* 115: 418-425.

Flock, A. und Orman, S. (1983). Micromechanical properties of sensory hairs on receptor cells of the inner ear. *Hear. Res.* 11: 249-260.

Floege, J., Johnson, R.J., Gordon, K., Iida, H., Pritzl, P., Yoshimura, A., Campbell, C., Alpers, C.E. und Couser, W.G. (1991). Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int.* 40: 477-488.

Geyer, G., Biedermann, M. und Schmidt, H.P. (1978). Endolymphatic leakage in case of acute loss of cochlear microphonics. *Experientia* 34: 363-364.

Govan, J.A.A. (1983). Ocular manifestations of Alport`s syndrome: a hereditary disorder of basement membranes ? *Br. J. Ophthalmol.* 67: 493-503.

Green, T.L., Hunter, D.D., Chan, W., Merlie, J.P. und Sanes, J.R. (1992). Synthesis and assembly of the synaptic cleft protein s-laminin by culture cells. *J. Biol. Chem.* 267: 2014-2022.

Gridley, T., Soriano, P. und Jaenisch, R. (1987). Insertional mutagenesis in mice. *TIG* 3: 162-166.

Guidet, B. und Shah, S.V. (1989). Enhanced in vivo H₂O₂ generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure. *Am. J. Physiol.* 257: F440-F445.

Hallpike, C.S. (1967). Observations on the structural basis of two rare varieties of hereditary deafness in myotactic, kinesthetic and vestibular mechanisms. *Ciba Foundation Symposium. de Reuck, A.V.S. und Knight, J. (Editoren). Churchill, London, 285.*

Harvey, J.M., Howie, A.J., Lee, S.J., Newbold, K.M., Adu, D., Michael, J. und Beevers, D.G. (1992). Renal biopsy findings in hypertensive patients with proteinuria. *Lancet* 340: 1435-1436.

He, C.J., Yang, C.W., Peten, E.P., Liu, Z.H., Patel, A., Striker, L.J. und Striker, G.E. (1995). Collagen and collagenase mRNAs in normal and sclerotic glomeruli: predictors of progression and response to therapy. *Kidney Int. Suppl.* 49: S39-S43.

Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M. und Chagoya de Sanchez, V. (1994). Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1200: 93-99.

Herrlich, P., Ponta, H., und Rahmsdorf, H.J. (1992). DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 119: 187-223.

Hockenberry, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. und Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.

Hoffmann, D.W., Whitworth, C.A., Jones, K.L. und Rybak, L.P. (1987). Nutritional status, glutathione levels, and ototoxicity of loop diuretics and aminoglycoside antibiotics. *Hear Res.* 31: 217-222.

Hoffmann, D.W., Whitworth, C.A., Jones-King, K.L. und Rybak, L.P. (1988). Potentiation of ototoxicity by glutathione depletion. *Ann. Otol Rhinol. Laryngol.* 97: 36-41.

Hong, X., Wu, X.-R., Wewer, U.M. und Engvall, E. (1994). Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin $\alpha 2$ (Lama2) gene. *Nature Genet.* 8: 297-302.

Howard, E.W. und Banda, M.J. (1991). Binding of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *J. Biol. Chem.* 266: 17972-17977.

Hudson, B.G., Reeders, S.T. und Tryggvason, K. (1993). Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Biol. Chem.* 268: 26033-26036.

Hudspeth, A.J. und Corey, D.P. (1977). Sensitivity, polarity and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2407-2411.

Huhtala, P., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B. und Tryggvason, K. (1990). Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16. *Genomics* 6: 554-559.

Jorgensen, M.B. (1961). The inner ear in diabetes mellitus. *Arch. Otolaryng.* 74: 373-381.

Jorgensen, M.B. (1960). Sudden loss of inner ear function in the course of longstanding diabetes mellitus. *Acta oto-laryng.* 51: 579-584.

Kafalides, N.A. (1971). Isolation of collagen from basement membranes containing three identical α chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 226-234.

Kaldi, K., Diestelkötter, P., Stenbeck, G., Auerbach, S., Jäkle, U., Mägert, H.J., Wieland, F.T. und Just, W.W. (1993). Membrane topology of the 22 kD integral peroxisomal membrane protein. *FEBS Letters* 315: 217-222.

Karasawa, M., Zwacka, R.M., Reuter, A., Fink, T., Hsieh, C.L., Lichter, P., Francke, U. und Weiher, H. (1993). The human homolog of the glomerulosclerosis gene Mpv17: structure and genomic organization. *Human Molecular Genetics* 2: 1829-1834.

Keithley, E.M., Horowitz, S. und Ruckenstein, M.J. (1995). Na,K-ATPase in the cochlear lateral wall of human temporal bones with endolymphatic hydrops. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 104: 858-863.

Kestilä, M., Mannikko, M., Holmberg, C., Gyapay, G., Weissenbach, J., Savolainen, E.R., Peltonen, L. und Tryggvason, K. (1994). Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type maps to the long arm of chromosome 19. *Am. J. hum. Genet.* 54: 757-764.

Keyse, S.M. und Tyrell, R.M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Biochemistry* 86: 99-103.

Kleppel, M.M., Santi, P.A., Cameron, J.D. Wieslander, J. und Michael, A.F. (1989). Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am. J. Pathol.* 134: 813-825.

Knippers, R. (1985). *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Kontusaari, S., Tromp, G., Kuivaniemi, H., Romanic, A. und Prockop, D.J. (1990). A mutation in the gene for type III procollagen (COL3A1) in a family with aortic aneurisms. *J. Clin. Invest.* 86: 1465-1473.

Kovar, M. (1973). The inner ear in Diabetes Mellitus. *ORL* 35: 42-51.

Kramer, R.A., Zakher, J. und Kim, G. (1988). Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance. *Science* 241: 694-697.

Kuivaniemi, H., Tromp, G. und Prockop, D.J. (1991). Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J.* 5: 2052-2060.

-
- Lautier, D., Luscher, P. und Tyrell, R.M. (1992). Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation /hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 13: 227-232.
- Lazarow, P.B. und Moser, H.W. (1989). Peroxisomes. In: *The metabolic basis of inherited diseases*. Editoren Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. und Valle, D.). McGraw Hill, New York: 1479-1509.
- Lee, B., Vissing, H., Ramirez, F., Rogers, D. und Rimoin, D. (1989). Identification of the molecular defect in a family with spondyloepithyseal dysplasia. *Science* 244: 978-980.
- Leguix, J.P. und Pierson, A. (1977). Increased fatigue of cochlear potentials after injection of Kcl solution in the perilymph. *Audiology* 16: 453-461.
- Leitch, I.J. und Heslop-Harrison, J.S. (1994). Detection of digoxigenin-labeled DNA probes hybridized to plant chromosomes in situ. *Methods Mol. Biol.* 28: 177-185.
- Lin, C.Q. und Bissell, M.J. (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 7: 737-743.
- MacKay, K., Striker, L.J., Pinkert, C.A., Brinster, R.L. und Striker, G.E. (1987). Glomerulosclerosis and renal cysts in mice transgenic for the early region of SV40. *Kidney Int.* 32: 827-837
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York.
- Masters, C. und Crane, D. (1996). Recent developments in peroxisome biology. *Endeavour* 20: 68-73.

Matrisian, L.M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet.* 6: 121-125.

Mayatepek, E. und Hoffmann, G.F. (1995). Leukotrienes: biosynthesis, metabolism and pathophysiologic significance. *Pediatr. Res.* 37: 1-9.

McCoy, R.N., Hill, K.E., Avon, M.A., Stein, J.H. und Gurk, R.F. (1988). Oxidant stress following renal ischemia: changes in the glutathione redox ratio. *Kidney Int.* 33: 812-817.

McGuirt, J.P. und Schulte, B.A. (1994). Distribution of immunoreactive α - and β -subunit isoforms of Na,K-ATPase in the gerbil inner ear. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 843-853.

Meyer zum Gottesberge, A.-M., Reuter, A. und Weiher, H. (1996). Inner ear defect similar to Alport's syndrome in the glomerulosclerosis mouse model Mpv17. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 253: 470-474.

Meyer zum Gottesberge, A.M. , Gagelmann, M. und Forssmann, W.G.(1991). Atrial natriuretic peptide-like immunoreactive cells in the guinea pig inner ear. *Hearing Res.* 56: 86-92.

Meyer zum Gottesberge, A.M. und Ninoyu, O. (1987). A new aspect in pathogenesis of experimental hydrops: role of calcium. *Aviat. Space Environ. Med.* 58: A240-A246.

Miner, J.H. und Sanes, J.R. (1994). Collagen IV $\alpha 3, \alpha 4$ and $\alpha 5$ chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J. Cell Biol.* 127: 879-891.

Miyata, K., Kamato, T., Nishida, A., Takizawa, K. und Takeda, M. (1995). Gastric mucosal protection by YM638, a novel leukotriene D4 receptor antagonist in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 276: 165-175.

Mochizuki, T., Lemmink, H.H., Mariyama, M., Antignac, C., Gubler, M-C., Pirson, Y., Verellen-Dumoulin, C., Chan, B., Schröder, C.H., Smeets, H.J. und Reeders, S.T. (1994). Identification of mutations in the $\alpha 3(\text{IV})$ and $\alpha 4(\text{IV})$ collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nature Genet.* 8: 77-82.

Moser, A.B., Rasmussen, M., Naidu, S., Watkins, P.A., McGuinness, M., Hajra, A.K., Chen, G., Raymond, G., Liu, A. und Gordon, D. (1995). Phenotype of patients with peroxisomal disorders subdivided into sixteen complementation groups. *J. Pediatr.* 127: 13-22.

Murphy, G., Ward, R., Hembry, R.M., Reynolds, J.J., Kuhn, K. und Tryggvason, K. (1989). Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem. J.* 258: 463-472.

Nakazawa, K., Spicer, S.S. und Schulte, B.A. (1995). Ultrastructural localization of Na,K-ATPase in the gerbil cochlea. *J. Histochem, Cytochem.* 43: 981-991.

Nash, M..A., Edelman, J.C.M., Bernstein, J. und Barnett, H.L. (1992). The nephrotic syndrome. In *Pediatric kidney disease* (Editor: Edelman, J.C.M.) 1247-1251. Little, Brown and Company, Boston.

Nassar, G.M. und Badr, K.F. (1995). Role of leukotrienes and lipoxygenases in glomerular injury. *Miner Electrolyte Metab.* 21: 262-270.

Nakamura, T., Ebihara, I., Shirato, I., Tomino, Y. und Koide, H. (1991). Modulation of basement membrane component gene expression in glomeruli of aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* 64: 640-647.

Neale, T.J., Ullrich, R., Ojha, P., Poczewski, H., Verhoeven, A.J. und Kerjaschki, D. (1993). Reactive oxygen species and neutrophil respiratory burst cytochrome b558 are produced by kidney glomerular cells in passive Heymann nephritis. PNAS 90: 3645-3649.

Nestl, A. (1996). Auswirkung der Expression des rezessiven Glomerulosklerose-Gens Mpv17 auf die Expression und Aktivität der Matrixmetalloproteinase MMP-2. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.

Nielsen, C.E. (1978). Lenticonus anterior and Alport's syndrome. Acta Ophthalmol. (Kbh) 56: 518-530.

Ninomiya, Y., Kagawa, M., Iyama, K., Naito, I., Kishiro, Y., Seyer, J.M., Sugimoto, M., Oohashi, T. und Sado, Y. (1995). Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. J. Cell. Biol. 139: 1219-1229.

Noakes, P.G., Miner, J.H., Gautam, M., Cunningham, J.M., Sanes, J.R. und Merlie, J.P. (1995). The renal glomerulus of mice lacking α -laminin/laminin β 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin β 1. Nature Genet. 10: 400-406.

Nolting, K., Meyer zum Gottesberge, A.M., Reuter, A. und Weiher, H. (1996). The effect of Mpv17 glomerulosclerosis gene on the stria vascularis. Abstracts of oral and poster presentations on the 33rd workshop on inner ear biology, Utrecht.

Ogborn, M.R., Sareen, S., Tomobe, K., Takahashi, H. und Crocker, J.F. (1995). Renal tubule Na,K-ATPase polarity in different animal models of polycystic kidney disease. J. Histochem. Cytochem. 43: 785-790.

Olson, J.L. (1992). The nephrotic syndrome. In Pathology of the kidney (Editor Heptinstall, R.H.) 779-869. Little, Brown and Company, Boston.

Pabico, R.C., Gruebel, B.J., McKenna, B.A., Griggs, R.C., Hollander, J., Nusbacher, J. und Panner, B.J. (1981). Renal involvement in Refsum`s disease. *Am. J. Med.* 70: 1136-1143.

Phillips, C.L., Shrago-Howe, A.W., Pinnell, S.R. und Wenstrup, R.J. (1990). A substitution at a non-glycine position in the triple-helical domain of pro alpha 2(I) collagen chains present in an individual with a variant of the Marfan syndrome. *J. Clin. Invest.* 86: 1723-1728.

Piepenhagen, P.A., Peters, L.L., Lux, S.E, und Nelson, W.J. (1995). Differential expression of Na,K-ATPase, ankyrin, fodrin and E-cadherin along the kidney nephron. *Am. J. Physiol.* 269: C1417-C1432.

Polette, M., Clavel, C., Cockett, M., Girod de Bentzmann, S., Murphy, G. und Birembaut, P. (1993). Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion Metastasis* 13: 31-37.

Polette, M., Gilbert, N., Stas, I., Nawrocki, B., Noel, A., Remacle, A., Stetler-Stevenson, W.G., Birembaut, P. und Foidart, M. (1994). Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch.* 424: 641-645.

Poulsom, R., Pignatelli, M., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Wright, P.A., Jeffery, R.E., Longcroft, J.M., Rogers, L. und Stamp, G.W. (1992). Stromal expression of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am. J. Pathol.* 141: 389-396.

Pulkkinen, L., Christiano, A.M., Airene, T., Haakana, H., Tryggvason, K. und Uitto, J. (1994). Mutations in the $\gamma 2$ chain gene (Lamc2) of kalinin/laminin5 in the junctional forms of epidermolysis bullosa. *Nature Genet.* 6: 293-298.

Quick, C.A., Fish, A. und Brown, C. (1973). The relationship between cochlea and kidney. *Laryngoscope* 83: 1469-1482.

Refsum, S. (1946). Heredopathia atactica polyneuritiformis: a familial syndrome not hitherto described. A contribution to the clinical study of hereditary disorders of the nervous system. *Acta Psychiatrica Scandinavica Suppl.* 38: 1-303.

Roels, F. (1991). Peroxisomes-a personal account. VUB-Press, Brüssel.

Ross, M.D., Ernst, S.A, und Kerr, T.P. (1982). Possible functional roles of Na⁺, K⁺-ATPase in the inner ear and their relevance to Meniere`s disease. *Am. J. Otolaryngol.* 3: 353-360.

Rumpelt, H.J., Langer, K.H., Schärer, K., Straub, E. und Thoenes, W. (1974). Split and extremely thin glomerular basement membranes in hereditary nephropathy (Alports Syndrome). *Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol.* 364: 225-233.

Russell, I.J. (1983). Origin of receptor potential in inner hair cells of the mammalian cochlea-evidence for Davis` theory. *Nature* 301: 334-336.

Russo, A. und Mitchell, J.B. (1985). Potentiation and protection of doxorubicin cytotoxicity by cellular glutathione modulation. *Cancer Treat. Rep.* 69: 1293-1296.

Ryan, A.F. und Watts, A.G. (1991). Expression of mRNAs encoding α and β subunit isoforms of the Na,K-ATPase in the rat cochlea. *Mol. Cell. Neurosci.* 2: 179

Salahudeen, A.K., Clark, E.C. und Nath, K.A. (1991). Hydrogen peroxide-induced renal injury. *J. Clin. Invest.* 88: 1886-1893.

Santos, M.J., Imanaka, T., Shio, H., Small, G.M. und Lazarow, P.B. (1988). Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome-aberrant organelle assembly. *Science* 239: 1536-1538.

Schacht, J. (1993). Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 26: 845-856

Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W. und Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1672-1676.

Schenkel, J., Zwacka, R.M., Rutenberg, C., Reuter, A., Waldherr, R. und Weiher, H. (1995). Functional rescue of the glomerulosclerosis phenotype in Mpv17 mice by transgenesis with the human Mpv17 homologue. *Kidney International* XXXXX

Schenkel, J. (1995). *Transgene Tiere*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Schlondorff, D. und Ardaillou, R. (1986). Prostaglandins and other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney Int.* 29: 108-119.

Schrakamp, G., Schalkwijk, C.G., Schutgens, R.B., Wanders, R.J., Tager, J.M. und van den Bosch, H. (1988). Plasmalogen biosynthesis in peroxisomal disorders: fatty alcohol versus alkylglycerol. *J. Lipid. Res.* 29: 325-334.

Schreck, R., Grassmann, R., Fleckenstein, B. und Baeuerle, P.A. (1991). Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *J. Virol.* 66: 6288-6293.

Schrott, A. und Spoendlin, H. (1987). Pigment anomaly associated inner ear deafness. *Acta Otolaryngol.* 103: 451-457.

Schuknecht, H.F. (1973). *Pathology of the ear.* Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Seliger, B., Kollek, R., Stocking, C., Franz, T. und Ostertag, W. (1986). Viral transfer, transcription and rescue of a selectable myeloproliferative sarcoma virus in embryonal cell lines: expression of the *mos* oncogene. *Mol Cell. Biol.* 6: 286-293.

Seltzer, J.L., Adams, S.A., Grant, G.A. und Eisen, A.Z. (1981). Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J. Biol. Chem.* 256: 4662-4668.

Shah, S.V., Baricos, W.H. und Basci, A. (1987). Degradation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils: activation of a metalloproteinase(s) by reactive oxygen metabolites. *J. Clin. Invest.* 79: 25-31.

Shah, S.V. (1989). Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int.* 35: 1093-1106.

Shan, Z., Tan, D., Satriano, J., Silbiger, S. und Schlondorff, D. (1994). Intracellular glutathione influences collagen generation by mesangial cells. *Kidney Int.* 46: 388-395.

Shapiro, J.A. (1983). *Mobile Genetic Elements.* Academic Press.

Sharma, A.K., Mauer, S.M., Kim, Y. und Michael, A.F. (1995). Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP, and TIMP-2 in obstructive nephropathy. *J. Lab. Clin. Med.* 125: 754-761.

Smith, R.J.H. und Kimberling, W.J. (1996). Branchio-oto-renal syndrome. In Genetics and Hearing Impairment. Editoren Martini, A., Read, A. und Stephens, D. Whurr publishers.

Staal, F.J., Roederer, M., Herzenberg, L.A. und Herzenberg, L.A. (1990). Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9943-9947.

Steel, K.P., Barkway, C. und Bock, G.R. (1987). Strial dysfunction in mice with cochleo-saccular abnormalities. Hear Res. 27: 11-26.

Stella, P., Cusi, D., Duzzi, L. und Bianchi, G. (1991). Relations between hypertension and glomerulosclerosis in first-generation hybrid rats of the Milan strains. Child Nephrol. Urol. 11: 6-9.

Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A. und Kleiner, D.E. (1993). Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. FASEB J. 7: 1434-1441.

Stein, B., Rahmsdorf, H.J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus typ1 1, collagenase, c-fos and metallothionein. Mol. Cell. Biol. 9: 5169-5181.

Steinman, H.M. (1994). The Bcl-2 oncogene functions as a prooxidant. J. Biol. Chem. 270: 3487-3490.

Sunada, Y., Bernier, S.M., Kozak, C.A., Yamada, Y. und Campbell, K.P. (1994). Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain to dy locus. J. Biol. Chem. 269: 13729-13732.

Superti-Furga, A., Steinmann, B., Ramirez, F. und Byers, P.H. (1989). Molecular defects of type III procollagen in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Hum. Genet.* 82: 104-108.

Templeton, N.S. und Stetler-Stevenson, W.G. (1991). Identification of a basal promoter for the human Mr 72,000 type IV collagenase gene and enhanced expression in a highly metastatic cell line. *Cancer Res.* 51: 6190-6193.

Terayama, Y., Kaneko, Y., Kawamoto, K. und Sakai, N. (1977). Ultrastructural changes of the nerve elements following disruption of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* 83: 291-302.

Tokahashi, M. und Hokunan, K. (1992). Localization of type IV collagen and laminin in the guinea pig inner ear. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 101: 58-62.

Trudel, M., D'Agati, V. und Constantini, F. (1991). C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int.* 39: 665-671.

Unger, H.H. und Rother, K. (1964). Netzhautveränderungen beim Alportsyndrom (erbliche Nephropathie mit Innenohrschwerhörigkeit). *Ber. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* 65: 293-298

Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R. und Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell* 75: 229-240.

Vissers, M.C. und Winterbourn, C.C. (1986). Gelatinase contributes to the degradation of glomerular basement membrane collagen by human neutrophils. *Coll. Relat. Res.* 8: 113-122.

Vissing, H., D'Alessio, M., Lee, B., Ramirez, F., Godfrey, M. und Hollister, D.W. (1989). Glycine to serine substitution in the triple helical domain of pro α 1(II) collagen results in a lethal perinatal form of short-limbed dwarfism. *J. Biol. Chem.* 264: 18265-18267.

Walker, P.D. und Shah. S.V. (1987). Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am. J. Physiol.* 253: C495-C499.

Wardle, E.N. (1992). Cellular biology of glomerulosclerosis. *Nephron* 62: 125-128.

Wardle, E.N. (1993). Glomerulosclerosis and lipid peroxidation. *Nephron* 64: 487

Webster, D.B. und Webster, M. (1978). Cochlear nerve projections following organ of corti destruction. *Otolaryngology* 86: 342-353.

Webster, D.B. (1985). The spiral ganglion and cochlear nuclei of deafness mice. *Hear Res.* 18: 19-27.

Weidauer, H. und Arnold, W. (1976). Strukturelle Veränderungen am Hörorgan beim Alport-Syndrom. *Laryng. Rhinol.* 55: 6-16.

Weiher, H., Noda, T., Gray, D.A., Sharpe, A.H. und Jaenisch, R. (1990). Transgenic mouse model of kidney disease: insertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome. *Cell* 62: 425-434.

Weil, D., Bernard, M., Combates, N., Wirtz, M.K., Hollister, D.W., Steinmann, B. und Ramirez, F. (1988). Identification of a mutation that causes exon skipping during collagen pre-mRNA splicing in an Ehlers-Danlos syndrome variant. *J. Biol. Chem.* 263: 8561-

Wilkinson, D.G. und Green, J. (1990). In situ hybridisation and three-dimensional reconstruction of serial sections. In: Postimplantation Mammalian Embryos. A practical approach. (Copp, A.J., Cockcroft, Editoren). IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 155-171.

Wittmaack, K. (1906). Weitere Beiträge zur Kenntnis der degenerativen Neuritis und Atrophie des Hörnerven. Z. Ohrenheilk. 53: 1-36.

Woessner, J.F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J. 5: 2145-2154.

Yamada, Y. und Yurchenco, P.D. (1994). A new nomenclature for laminins. Matrix Biol. 14: 209-211.

Ylikoski, J., Wersall, J. und Bjorkroth, B. (1974). Degeneration of neural elements in the cochlea of the guinea pig after damage to the organ of corti by ototoxic antibiotics. Acta Otolaryngol. Suppl. 326: 23-41.

Zenner, H.P., Reuter, G., Zimmermann, U., Gitter, A.H., Fermin, C. und Le Page, E.L. (1994). Transitory endolymph leakage induced hearing loss and tinnitus: depolarization, biphasic shortening and loss of electromotility of outer hair cells. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 251: 143-153.

Zwacka, R.M., Reuter, A., Pfaff, E., Moll, J., Gorgas, K., Karasawa, M. und Weiher, H. (1994). The glomerulosclerosis gene Mpv17 encodes a peroxisomal protein producing reactive oxygen species. The EMBO J. 12: 5129-5134.

Zwacka, R.M. (1995). The human homologue of the murine glomerulosclerosis-gene Mpv17. Wissenschaftliche Berichte FZKA 5621 B, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH.

Zylberman, R., Silverstone, B.Z., Brandes, E. und Druker, A. (1980). Retinal lesions in Alport`s syndrome. J. Pediatr. Ophthalmol. 17: 255-260.