

Ferda Cevikbas

**Glomerulosklerotische Veränderungen und
Kompensationsmechanismen in Syndecan-4-defizienten Mäusen
nach einer unilateralen Nephrektomie**

- 2006 -

Biologie

**Glomerulosklerotische Veränderungen und
Kompensationsmechanismen in Syndecan-4-defizienten Mäusen
nach einer unilateralen Nephrektomie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Ferda Cevikbas
aus Gelsenkirchen

– 2006 –

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Münster angefertigt.

Direktor: Prof. Dr. Peter Bruckner

Die Arbeit wurde betreut durch Prof. Dr. Walter Stöcker

Dekan: Prof. Dr. Norbert Sachser

1.Gutachter: Prof. Dr. Walter Stöcker

2.Gutachter: Prof. Dr. Peter Bruckner

Tag der mündlichen Prüfung:15.12.2006.....

Tag der Promotion:09.02.2007.....

Zusammenfassung

Syndecane sind membrangebundene Heparansulfat-Proteoglykane, die in einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden. Ihre gewebsspezifische und entwicklungsabhängige Expression wird von verschiedenen Faktoren reguliert. An ihrem *Core*-Protein befinden sich Heparansulfatketten, über die Syndecane befähigt sind, Bindungen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren einzugehen. Des Weiteren können sie mit Hilfe von Protein-Protein Interaktionen an einer Vielzahl von zellulären Signalprozessen teilnehmen, die Proliferation, Migration und Differenzierung betreffen. Im Gegensatz zu den anderen drei Mitgliedern der Syndecan-Familie ist Syndecan-4 in den meisten Zelltypen vorhanden. Die Defizienz des Syndecan-4-Gens führt jedoch zu keinem spontanen Phänotyp. Erst durch äußere Stress-Bedingungen werden die Syndecan-4-knockout-Mäuse herausgefordert und weisen Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen auf. In Wundheilungsstudien äußert sich die Syndecan-4-Defizienz in einer verzögerten Wundheilung mit einer gestörten Angiogenese (Echtermeyer et al., 2001). Im Modell einer obstruktiven Nephropathie nach Injektion von κ -Carrageenan weisen die Syndecan-4-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen größere tubuläre Schäden auf (Ishiguro et al., 2001b). Überdies äußert sich die Anfälligkeit der Syndecan-4-knockout-Mäuse gegenüber dieser obstruktiven Nephropathie durch eine um dreißig Prozent erhöhte Sterberate.

Die Fragestellung der eigenen Arbeit bezog sich darauf, ob die Syndecan-4-Defizienz Auswirkungen auf den Verlauf von zwei verschiedenen Nierenerkrankungsmodellen hat.

Der Schwerpunkt lag primär in der Charakterisierung eines renalen Phänotyps nach einer sechszigtägigen unilateralen Nephrektomie. Die unilaterale Nephrektomie (UNX), bei der eine Niere entfernt wird, schädigt primär die Glomeruli. Daten aus dem UNX-Modell an Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigten, dass männliche Syndecan-4-defiziente Mäuse glomerulosklerotische Veränderungen in ihren Nieren entwickelten, die in keiner weiteren Versuchsgruppe beobachtet werden konnte. Die sklerotischen Bereiche in den Nieren der Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen enthielten verschiedene Glykogene und Kollagene, die mit immunhistochemischen Anfärbungen teilweise als Kollagen Typ I und –IV sowie Fibronectin charakterisiert werden konnten. Überdies zeigten sie auf ultrastruktureller Ebene großflächige mesangiale Expansionen sowie Basalmembranverdickungen und –Einschnürungen, die zu einem Kapillarlumen-Kollaps führten. Die genaue Ätiologie dieser in Syndecan-4-defizienten Männchen beobachteten

Glomerulopathie ist unklar. Es konnten jedoch mit biochemischen Methoden erhöhte TGF- β 1 Proteinmengen in den männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen detektiert werden. Überdies induzierte die UNX in den Syndecan-4-knockout-Mäusen beiderlei Geschlechts im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Syndecan-2 Protein und mRNA Expression in den Glomeruli. Die sowohl durch Immunhistochemie wie Färbungen und in situ-Hybridisierungen als auch biochemisch durch *Real time* PCR und Western Blots detektierbare Syndecan-2 Expression wurde als Kompensation gedeutet. Arbeiten von *Chen et al.* (2004) lassen vermuten, dass in der diabetischen Niere eine Interaktion zwischen TGF- β 1 und Syndecan-2 besteht. In der diabetischen Niere ist die Expression von Syndecan-2 und TGF- β 1 erhöht (Chen et al., 2004). Diese erhöhten Expressionen führen zur Amplifizierung der fibrotischen Prozesse in der diabetischen Niere. Die oben beschriebene Interaktion zwischen TGF- β 1 und Syndecan-2 in der diabetischen Niere könnte auch für die beobachtete Glomerulopathie in Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen von Bedeutung sein.

Im dem zweiten angewandten Nierenerkrankungsmodell, der unilateralen Uretherobstruktion (UUO), wird der Urether einseitig abgeschnürt, wodurch eine tubulointerstitielle Fibrose ausgelöst wird. Zunächst konnten nach einer Obstruktionsdauer von drei sowie zwölf Tagen keine genotypisch bedingten histologischen und makroskopischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen festgestellt werden. Erst nach fünfzig tägiger Obstruktionsdauer reagierten Syndecan-4-defiziente Mäuse mit einer erhöhten *alpha smooth muscle* Aktin Expression sowie einer erhöhten Stressantwort, die mit erhöhten hsc70 (*heat shock cognate*) Proteinmengen korrelierte. Jedoch fehlten auch für diesen Zeitpunkt histologisch sichtbare Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Erforschung von möglichen kompensatorischen Proteinen in primären Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten. Die Hypothese einer putativen Kompensation bezog sich auf Beobachtungen aus Wundheilungsstudien, in denen Syndecan-4-knockout Mäuse Störungen aufweisen, die Wunden am Ende des Prozesses jedoch verheilen (Echtermeyer et al., 2001). Eigene Resultate mit primären Hautfibroblasten zeigen eine vermehrte Syndecan-1 Expression, die zudem durch Induktion mit TGF- β 1 gedrosselt wurde. Diese *in vitro* Daten sprechen für eine kompensatorische Expression von Syndecan-1 in Syndecan-4-defizienten Fibroblasten.

ZUSAMMENFASSUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Niere	1
1.2 Komponenten der glomerulären Basalmembran	5
1.2.1 Laminin.....	5
1.2.2 Kollagen IV	7
1.2.3 Perlecan	9
1.2.4 Nidogen	10
1.3 Nierenerkrankungen	11
1.3.1 Pathogenese der renalen Fibrose	12
1.3.1.1 Funktionen von TGF- β 1 bei Nierenfibrose	14
1.4 Nierenerkrankungsmodelle	14
1.4.1 Obstruktive Nephropathie	15
1.4.1.1 Unilaterale urethrale Obstruktion	15
1.4.2 Nephrektomien	15
1.4.2.1 UNX-Modell und Glomerulosklerose	
1.5 Heparansulfat-Proteoglykane	18
1.5.1 Zelloberflächen-HSPG	18
1.6 Syndecane	19
1.6.1 Proteinstruktur der Syndecane.....	19
1.7 Funktion der Syndecane	22
1.7.1 Syndecane und Signalprozesse.....	23
1.8 Syndecan-4	24
1.8.1 Rolle von Syndecan-4 bei Nephropathien.....	25
1.9 Zielsetzung der Arbeit und methodischer Ansatz	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Allgemeine Materialien und Geräte	27
2.1.1.1 Allgemeine Reagenzien.....	27
2.1.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur.....	28
2.1.1.3 Vektoren	28

2.1.1.4	Geräte	28
2.1.2	Antikörper.....	29
2.1.2.1	Primärantikörper.....	29
2.1.2.2	Sekundärantikörper für Immunhistochemie, Western Blots und FACS-Analyse	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	31
2.2.1.1	Kryokonservierung von Zellen.....	32
2.2.1.2	Herstellung von primären Hautfibroblasten	32
2.2.1.3	Aktivierung von Zellen mit TGF- β 1	33
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion und Amplifikation der Sondensequenzen	33
2.2.2.2	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	35
2.2.2.3	Genotypisierung der Mäuse.....	35
2.2.2.4	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.2.6	DNA-Sequenzierung	38
2.2.2.7	Transformation kompetenter Bakterien und Klonierung von DNA-Fragmenten	39
2.2.2.8	Kultivierung und Lagerung gentechnisch veränderter Bakterien.....	39
2.2.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA	40
2.2.2.10	Konzentrierung von Nukleinsäuren.....	40
2.2.2.11	Restriktionsverdau von DNA	40
2.2.2.12	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	41
2.2.2.13	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	41
2.2.2.14	Isolierung von Gesamt-RNA aus Nieren mit TRIzol	41
2.2.2.15	Reverse Transkription	42
2.2.2.16	Real time PCR	42
2.2.2.17	TOPO TA Klonierung	43
2.2.2.18	Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.2.2.19	Northern Blot.....	45
2.2.3	Hybridisierungstechniken.....	45
2.2.3.1	Radioaktive Markierung einer ssDNA Sonde	45

2.2.3.2	Hybridisierung und Detektion von Northern Blots	46
2.2.3.3	<i>Stripping</i> von Northern Blots	47
2.2.4	In situ-Hybridisierungen.....	47
2.2.4.1	Digoxigenin-Markierung von cRNA-Sonden	47
2.2.4.2	In situ-Hybridisierung mit DIG-markierten cRNA-Sonden.....	49
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	51
2.2.5.1	Extraktion von Gesamtproteinen aus Geweben.....	51
2.2.5.2	Quantitative Proteinbestimmung mit BCA	52
2.2.5.3	Methanol/ Chloroform Fällung.....	53
2.2.5.4	TCA-Fällung.....	53
2.2.5.5	Dialyse von Proteinen.....	53
2.2.5.6	SDS-PAGE	54
2.2.5.7	Coomassie-Blau Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen.....	55
2.2.5.8	Proteintransfer auf Blotmembranen.....	56
2.2.5.9	Western-(Immuno-) Blot	56
2.2.5.10	Entfernen von Antikörpern von der Membran („ <i>Strippen</i> “)	57
2.2.5.11	Amidoschwarzfärbung von Blotmembranen.....	57
2.2.5.12	Zymographie.....	58
2.2.5.13	Heparitinase I-und III-Verdau	58
2.2.6	Immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten der Niere.....	58
2.2.7	Durchflußzytometrie.....	60
2.2.8	Histochemische Routinefärbung	61
2.2.8.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung nach Mayer (Mayer, 1903)	61
2.2.8.2	PAS-Färbung	61
2.2.8.3	Masson-Trichrom-Färbung nach Goldner (Protokoll nach Goldner, 1938)	62
2.2.8.4	Kongorot-Färbung von Amyloiden	63
2.2.9	Elektronenmikroskopie.....	64
2.2.9.1	Transmissionselektronenmikroskopie.....	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Expression der Syndecane-1, -2 und -4 in der normalen Niere aus Wildtyp-Mäusen.....	65
3.1.1	Syndecan-4 Expression in Wildtyp- Nieren	66
3.1.2	Synthese von Syndecan-4 Proteinen in Wildtyp- Nieren	68

3.1.3	Expression von Syndecan-1 in Wildtyp-Nieren	69
3.1.4	Synthese von Syndecan-1 Protein in Wildtyp-Nieren.....	70
3.1.5	Syndecan-2 mRNA und Protein werden nicht in Wildtyp-Nieren exprimiert	71
3.2	Vergleichende Untersuchungen an unbehandelten Nieren aus Syndecan-4-defizienten und Wildtyp-Mäusen	71
3.2.1	Histomorphologische Untersuchungen	72
3.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	72
3.2.2.1	Syndecan-4-defiziente Mäusenieren zeigen keine ultrastrukturellen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.....	73
3.2.3	Expression der Syndecane-1 und -2 in Syndecan-4-/- Nieren.....	74
3.2.3.1	Syndecan-1 wird in der mesangialen Matrix von Syndecan-4-defizienten Nieren exprimiert.....	74
3.2.3.2	Syndecan-2 wird nicht redundant in Syndecan-4 -/- Nieren exprimiert.....	75
3.2.4	Quantitative Bestimmung der Syndecan-1 und -2 Expression in Syndecan-4-defizienten Nieren im Vergleich zu Wildtyp-Nieren mittels Real time PCR.....	76
3.2.5	Zusammenfassung	78
3.3	Das Modell der Nephrektomie zur Schädigung der Niere und Induktion einer möglichen renalen Pathogenese in Wildtyp- und Knockout-Mäusen	80
3.3.1	Diagnostik.....	80
3.3.1.1	Vergleichende Untersuchung des <i>kidney weight/body weight</i> Index von Wildtyp und Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen	80
3.3.1.2	UNX-Mäuse beider Genotypen zeigen keine Proteinurie nach einer unilateralen Nephrektomie	82
3.3.2	Histologische Untersuchungen an UNX-Nieren aus Wildtyp- sowie Syndecan-4-knockout Mäusen.....	83
3.3.2.1	UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen zeigen histologische Unterschiede im Lichtmikroskop	83
3.3.2.2	Sklerotische Bereiche in den UNX-Nieren der männlichen Syndecan-4-defizienten Mäuse enthalten Kollagen Typ I, -IV und Fibronectin	85
3.3.3	UNX-Nieren aus männlichen Syndecan-4 -/- Mäusen zeigen auf ultrastruktureller Ebene großflächige Matrixexpansionen	89
3.3.4	UNX-Nieren aus weiblichen Syndecan-4 +/+ und Syndecan-4 -/- Mäusen zeigen keine ultrastrukturellen Unterschiede.....	92

3.3.5	Biochemische Untersuchung der Glomerulopathie in Syndecan-4-defizienten Mäusen nach unilateraler Nephrektomie.....	94
3.3.5.1	UNX-Nieren aus männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigen im Vergleich zu männlichen Wildtyp-Mäusen erhöhte TGF- β 1 Proteinmengen.....	95
3.3.6	Verteilung der Syndecane in nephrektomierten Nieren	97
3.3.6.1	Syndecan-2 Proteine und mRNA sind in Glomeruli von Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen nachweisbar.....	98
3.3.6.2	Die Syndecan-2 Proteinexpression ist in UNX-Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen erhöht	101
3.3.6.3	Eine erhöhte Syndecan-2 Expression in UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen ist auf RNA-Ebene nachweisbar.....	103
3.3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse nach unilateraler Nephrektomie von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen	104
3.4	Unilaterale urethrale Obstruktion zur Erzeugung einer tubulointerstitiellen Fibrose in Wildtyp- und Syndecan-4 -/- Mäusen.....	105
3.4.1	Die UUO-Nieren aus Syndecan-4-defizienten und Wildtyp-Mäusen gleichen sich makroskopisch.....	106
3.4.2	Nieren aus Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigen nach der UUO eine ähnliche Histologie	108
3.4.3	Biochemische Untersuchungen der Nieren von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen nach drei, zwölf und fünfzig Tagen Obstruktion	111
3.4.3.1	α -SMA und hsc70 Proteinmengen sind in obstruierten Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen nach einer fünfzig-tägigen UUO erhöht.....	112
3.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse des UUO-Nierenerkrankungsmodells.....	115
3.5	Expression der Syndecane in primären Hautfibroblasten von Wildtyp und Syndecan-4-defizienten Mäusen.....	116
3.5.1	Die Syndecan-1 Expression ist in primären Hautfibroblasten aus Syndecan-4-defizienten Mäusen erhöht	117
3.5.2	TGF- β 1 reguliert die Syndecan-1 mRNA Expression in Hautfibroblasten aus Wildtyp- und Syndecan-4 -/- Mäusen	119
3.5.3	Zusammenfassung der Untersuchungen an primären Wildtyp und Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten.....	120

4	Diskussion.....	121
4.1	Syndecan-4-defiziente Mäuse zeigen keinen spontanen renalen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.....	122
4.2	Unilaterale Nephrektomie.....	127
4.2.1	Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigen eine erhöhte Zunahme des Nieren- zu Körpergewicht-Verhältnisses in Folge einer unilateralen Nephrektomie	128
4.2.2	Die unilaterale Nephrektomie verursacht keine Proteinurie in Syndecan-4-defizienten und Wildtyp-Mäusen	130
4.2.3	Nephrektomie an männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen führt zu einer Expandierung und fokalen Sklerosierung des Mesangiums	132
4.2.4	Die sklerotischen Segmente der Syndecan-4-defizienten Glomeruli enthalten Kollagen Typ I, -IV sowie Fibronectin	134
4.2.5	Glomeruläre Schäden in Syndecan-4-defizienten männlichen UNX-Mäusen variieren zwischen einer starken und milderer Form von Sklerose.....	136
4.2.6	Der TGF- β 1 Proteinspiegel in den UNX-Nieren aus männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen ist erhöht.....	138
4.2.7	Syndecan-2 mRNA und Proteine werden in Glomeruli der UNX-Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäusen exprimiert.....	141
4.3	Unilaterale urethrale Obstruktion als Nierenerkrankungsmodell einer tubulointerstitiellen Fibrose	144
4.3.1	Syndecan-4-defiziente Mäuse produzieren in den späteren Phasen der UUO vermehrt α -SMA und hsc70.....	144
4.4	Syndecan-4 Defizienz in primären Hautfibroblasten.....	149
4.4.1	Syndecan-1 mRNA und Proteine werden vermehrt in den Syndecan-4-defizienten dermalen Fibroblasten exprimiert.....	151
4.4.2	TGF- β 1 beeinflusst die Expression von Syndecan-1 mRNA in Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten.....	153
4.5	Ausblick	154
5	Literaturverzeichnis	157
	Lebenslauf	185
	Danksagung	186

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfofluorid
ANG II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
bmp	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COL	<i>Collagen</i>
CRG	<i>Compensatory Renal Growth</i>
CS	Chondroitinsulfat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Erythrozyt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Ef	Endothelzelle
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
et. al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAG	Glycosaminoglykan
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GH	<i>Growth Hormone</i>
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>

HS	Heparansulfat
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
Hsc70	<i>heat shock cognate</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IgA	Immunglobulin A
IGF	<i>Insulin Like Growth Factor</i>
IHC	Immunhistochemie
ISH	in situ-Hybridisierungen
kDa	Kilodalton
ko	Knockout
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliampère
MAP Kinase	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MEA	Mesangialzelle
MET	<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
min	Minute
MMP	Metalloproteinase
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
P	Podozyt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Perjodsäure-Schiffsche Reagenz
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RK	<i>remnant kidney</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sec	Sekunde
α -SMA	<i>alpha smooth muscle Actin</i>
Synd-4	Syndecan-4
Synd-2	Syndecan-2

Synd-1	Syndecan-1
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBM	Tubuläre Basalmembran
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurea
U/min	Umdrehungen pro Minute
UKM	Universitätsklinikum Münster
UNX	Unilaterale Nephrektomie
UUO	unilaterale urethrale Obstruktion
UV	Ultraviolett
ÜN	über Nacht
VT	Volumenteil
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
ZO-1	Zonula-Occludens Protein 1

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurden zwei Nierenerkrankungsmodelle an Syndecan-4-defizienten Mäusen angewandt, um pathologische Prozesse und Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu untersuchen. Daher werden zunächst der Aufbau und die Funktion der Niere im Organismus von Säugetieren beschrieben. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Erforschung der Pathogenese nach Schädigung der Nieren durch Nierenerkrankungsmodelle, so dass im Rahmen dieser Arbeit Nierenerkrankungen generell, glomerulosklerotische Entwicklungen im Speziellen, eine zentrale Bedeutung zukommt und daher genauer vorgestellt werden.

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

In der Klasse der Säugetiere ist die Niere ein paarig angelegtes Organ, das für die Ausscheidung von Stoffwechselabbauprodukten zuständig ist. Weitere Funktionen der Niere sind die Exkretion von harnpflichtigen Stoffen, wie Giftstoffen, der Ausgleich der Wasser-Elektrolytbilanz des Organismus und die Bildung von Hormonen wie Renin, Erythropoetin und Vitamin D (Eckert, R. (2002) *Tierphysiologie, 4. Auflage, Thieme Verlag*).

Die Niere ist in eine Nierenkapsel eingehüllt, die von einer schützenden Fettschicht umgeben ist (Eckert, R. (2002) *Tierphysiologie, 4. Auflage, Thieme Verlag*). Die Nierenrinde (*Cortex renalis*) enthält die Nierenkörperchen und die gewundenen Abschnitte der Harnkanälchen.

Eine funktionelle Einheit besteht aus einem Glomerulus, proximalem und distalem Tubulus und der Henleschen Schleife, einem haarnadelartigen Reabsorptionssystem (Müller W.A. (1998) *Human- und Tierphysiologie. Springer Heidelberg, Berlin*). Die im Glomerulus filtrierte Flüssigkeit fließt durch das Tubulussystem, das durch spezielle mit Mikrovilli ausgekleidete Zellen befähigt ist, verschiedene Salze, aber vor allem die Hauptmenge an Wasser zu resorbieren und wieder in das Blut zurückzuführen (Müller W.A. (1998) *Human- und Tierphysiologie. Springer Heidelberg, Berlin*).

Als Nierenkörperchen werden die Strukturen des Glomerulus und die Bowmansche Kapsel bezeichnet, die becherförmig den Glomerulus umgibt (Abbildung 1-1).

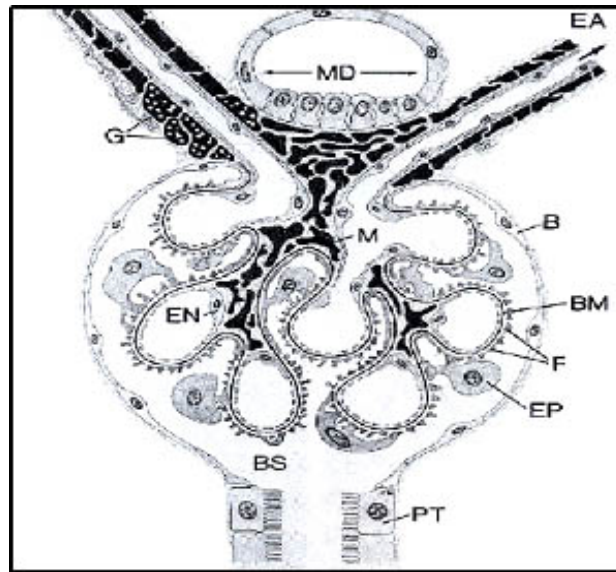


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau eines Glomerulus.

Dargestellt ist ein *Corpusculum renale* mit *Vas afferens* und *Vas efferens*. Die Bowmansche Kapsel (**B**) umhüllt das Kapillargeknäuel des Glomerulus. Darin befindet sich die glomeruläre Basalmembran (**BM**), die von den Endothelzellen (**EN**) der Kapillaren und der Podozyten (**EP**), die außen an den Kapillaren lokalisiert sind, umgeben ist. Die Füßchen der Podozyten (**F**) und die gefenesterten Endothelzellen bilden zusammen mit der glomerulären BM die Filtrationsbarriere der Niere. Die mesangiale Matrix (**M**) enthält kontraktile Mesangialzellen. Der Kapselraum (*Bowman's space* [**BS**]) wird auch Harnpol genannt. An dem gegenüberliegenden vaskulären Pol ist die *Macula densa* (**MD**) angeordnet, die eine zellreiche Region des distalen Tubulus darstellt. Juxtaglomeruläre (granuläre) Zellen (**G**) in den Wänden der afferenten Arteriole enthalten Renin. Am Harnpol befindet sich hingegen der proximale Tubulus (**PT**), der primäre für die Rückresorption von Flüssigkeit zuständig ist (verändert nach Kriz et al., 1998).

Man unterscheidet in der Bowmanschen Kapsel das äußere (parietale) und das innere (viszerale) Blatt, das durch den Kapselraum getrennt wird. Der dem Gefäßpol gegenüberliegende Bereich, auch als Harnpol bezeichnet, steht in direkter Verbindung mit dem Tubulussystem der Niere. Am Gefäßpol dringt eine afferente Arteriole in die Bowmansche Kapsel ein und verzweigt sich in mehrere Äste, die sich wiederum in ein dichtes Kapillarnetz auftrennen. Beim Verlassen des Glomerulus vereinigen sich die Verzweigungen wieder und bilden die efferente Arteriole. Ein nachgeschaltetes Kapillarnetz ermöglicht die Durchblutung des Tubulussystems. Im Kapselraum ist das Kapillarnetz vom Mesangium, bestehend aus Mesangialzellen und interstitieller Matrix, umgeben (Eckert, R. (2002) *Tierphysiologie*, 4. Auflage, Thieme Verlag.).

Die Mesangialzellen der glomerulären Matrix sind eine besondere Form von Fibroblasten. Sie besitzen zum einen kontraktile Fähigkeiten und zum anderen produzieren sie extrazelluläre Matrix (Dunlop und Larkins, 1990).

Die Filtrationseinheit der Niere ist aus drei speziellen Schichten aufgebaut (Akhtar und Al, 2004). Zu diesen Schichten gehören die gefensterten Endothelzellen, die glomeruläre Basalmembran und eine spezielle Schicht aus Epithelzellen, so genannten Podozyten. Sie stellen in ihrem Zusammenschluss ein hochselektives Filtersystem dar, das die Ausscheidung von Plasmamolekülen in Abhängigkeit ihrer Größe, Ladung und Form der Schlitzmembran einschränkt (Akhtar und Al, 2004; Oh et al., 2004; Pavenstadt et al., 2003; Zoja et al., 2006). Im Glomerulus eines Menschen werden im Durchschnitt täglich 180 l Primärharn produziert, der Proteine mit niedriger Molekülmasse enthält, die anschließend von den proximalen Tubulusepithelzellen resorbiert werden, wodurch ein weitgehend proteinfreies Ultrafiltrat von ungefähr 1,8 l entsteht (Khoshnoodi und Tryggvason, 2001). Eine wichtige Eigenschaft der gefensterten Endothelzellen ist die Ausbildung zahlreicher Poren, die nicht von einem Diaphragma bedeckt sind (Hallmann et al., 2005). Ihr Durchmesser (50-100 nm) ist groß genug, um den Durchtritt von Substanzen wie Wasser, Natrium, Harnstoff, Glukose und kleinen Proteinen zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu werden Blutzellen sowie größere Moleküle am Durchtritt gehindert. Da die Oberfläche der Endothelzellen durch Glykoproteine und anionische Heparansulfat-Proteoglykane negativ geladen ist, werden anionische Moleküle unabhängig ihrer Größe ebenfalls von der Passage abgehalten (Groffen et al., 1998; Groffen et al., 1999).

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist eine dynamische Struktur (Levidiotis und Power, 2005). Ihre Hauptkomponenten, Laminin $\alpha5\beta2\gamma1$, Kollagen IV, Nidogen sowie sulfatierte Proteoglykane, bilden eine netzwerkartige Struktur, die speziell an die Filterfunktion der Niere angepasst ist (Erickson und Couchman, 2000; Hallmann et al., 2005; Kanwar et al., 1984; Miner, 2005; Miner et al., 1997; Yurchenco und Schittny, 1990). Dabei werden durch die fußähnlichen Ausläufer der Podozyten die äußere Seite der GBM verdeckt (Pavenstadt et al., 2003). In Abbildung 1-2 ist eine Elektronenmikroskopie-Aufnahme dargestellt, die eine Übersicht der Hauptkomponenten der glomerulären Filtration bietet.

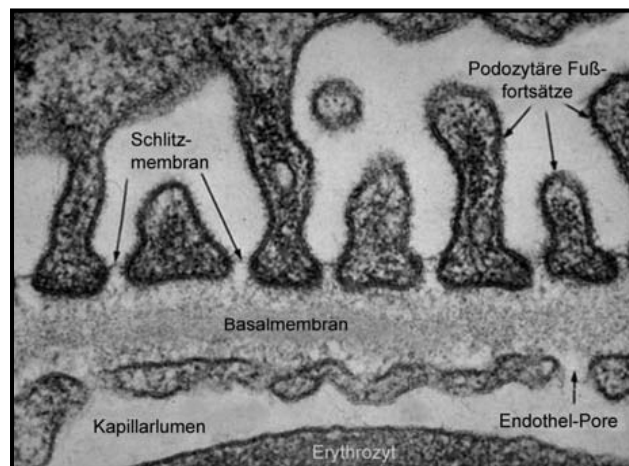


Abbildung 1-2: Aufbau einer Schlitzmembran.

Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahme des glomerulären Filters, der aus der **Schlitzmembran**, **Basalmembran** und dem gefensterten Endothel (**Endothel-Pore**) besteht. Subendothelial der Basalmembran befindet sich im **Kapillarlumen** ein **Erythrozyt** (Becker A und Boesken W.H., 2005).

Eine Schädigung der Podozyten bewirkt, dass sich die interzellulären Verbindungen und die Zytoskelettstruktur der Fußfortsätze verändern, so dass das geordnete reißverschlussartige Erscheinungsbild der Schlitzmembran verschwindet (Benzing, 2004; Holthofer et al., 1999; Huber et al., 2001; Huber et al., 2003b; Pavenstadt, 2000; Pavenstadt et al., 2003; Roselli et al., 2002). Als molekulare Komponente der Schlitzmembran wurde 1998 das Transmembranprotein Nephrin entdeckt, das die Fußfortsätze miteinander verknüpft (Holthofer et al., 1999; Khoshnoodi und Tryggvason, 2001; Pavenstadt, 2000; Pavenstadt et al., 2003; Roselli et al., 2002; Sellin et al., 2003; Tryggvason, 1999). Nephrin-Defizienz führt bei Menschen und Mäusen zu einer atypischen Struktur der Schlitzmembran sowie zu anormal geformten Podozyten (Khoshnoodi und Tryggvason, 2001; Ruotsalainen et al., 1999). Ein solcher Defekt hat eine massive Proteinurie zur Konsequenz (Kretzler et al., 1994; Tryggvason und Pettersson, 2003; Tryggvason und Wartiovaara, 2005). Beim Menschen sind Nephrin-Mutationen beispielsweise die Ursache für die kongenitale nephrotische Erkrankung des Finnischen Typs. Neben den Nephrinen 1-3 sind inzwischen auch andere Strukturproteine, die in der Schlitzmembran vorkommen, bekannt. Dazu zählen CD2AP (Shih et al., 2001), FAT (Inoue et al., 2001), ZO-1 (Balda und Anderson, 1993; Holthofer et al., 1999; Khoshnoodi und Tryggvason, 2001; Schnabel et al., 1990), P-Cadherin und Podocin (Roselli et al., 2002). Mutationen in einem der hierfür kodierenden Gene können ein

nephrotisches Syndrom hervorrufen, das in einem finalem Nierenversagen enden kann (Holthofer et al., 1999; Huber et al., 2003b; Khoshnoodi und Tryggvason, 2001; Pavenstadt et al., 2003; Ruotsalainen et al., 1999; Schnabel et al., 1990; Sellin et al., 2003; Tryggvason und Pettersson, 2003). Ein weiteres wichtiges Protein der Schlitzmembran ist α -Actinin-4, welches die Aktinfilamente in den Fußfortsätzen der Podozyten vernetzt und befestigt (Asanuma und Mundel, 2003; Kaplan et al., 2000). Bei Mutationen im entsprechenden Gen ACTN4 kommt es zur Sklerotisierung der Glomeruli und in Folge dessen zu einer Niereninsuffizienz (Kos et al., 2003). Inzwischen belegen zahlreiche Experimente, dass viele der Podozyten- und Schlitzmembran-spezifischen Strukturproteine unentbehrlich sowie an der Aufrechterhaltung der Integrität von Podozyten beteiligt sind (Akhtar und Al, 2004; Benzing, 2004; Kretzler, 2005; Liu et al., 2005). Sie können auch an verschiedenen Signalprozessen teilnehmen, deren Störung die Funktion der Podozyten maßgeblich beeinträchtigt (Huber et al., 2003a).

1.2 Komponenten der glomerulären Basalmembran

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein Geflecht sekretierter Makromoleküle, dessen Zusammensetzung stark zwischen unterschiedlichen Geweben variiert. Basalmembranen stellen eine spezialisierte Form der ECM dar. Zu ihren Hauptkomponenten zählen Laminin, Kollagen IV, Nidogen und Perlecan, welche das Grundgerüst der Basalmembranen bilden. Die Einlagerung weiterer ECM-Moleküle in unterschiedlichen Mengenanteilen und Isoformen erhöht die Variabilität zusätzlich (Erickson und Couchman, 2000).

1.2.1 Laminin

Laminine sind eine Familie von heterotrimeren Glykoproteinen und bilden die größte Familie unter den nicht-kollagenen Basalmembranekomponenten (Hansen und Abrass, 1999). Laminine sind Heterotrimere aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit (Aumailley et al., 2005; Burgeson et al., 1994; Hallmann et al., 2005; Miner und Yurchenco, 2004; Sorokin et al., 1997b; Sorokin et al., 1997a). Die drei Ketten assemblieren über ihre lange *coiled-coil* Domäne und bilden so ein Molekül mit einem langen und drei kurzen Armen. Die Untereinheiten sind in aufeinander folgende globuläre und stabförmige Domänen

strukturiert. Die α -Untereinheit erstreckt sich carboxyterminal über den *coiled-coil* Bereich hinaus und bildet die G-Domäne (Timpl et al., 2000). Von den 45 theoretisch möglichen Heterotrimeren wurden bis heute nur 15 identifiziert. Neben der gleichzeitigen Expression der Untereinheiten spielt möglicherweise auch die von ionischen Wechselwirkungen abhängige Stabilität der unterschiedlichen Trimere eine Rolle (Beck et al., 1993). Eine zusätzliche Untereinheit entsteht durch differentielles RNA-Spleißen der $\alpha 3$ -Kette. Außerdem werden einige der Ketten alternativ prozessiert, was zu einem weiteren Anstieg der Variabilität führt (Aumailley et al., 2003). In Abbildung 1-3 sind die Laminin-Isoformen schematisch dargestellt. Kürzlich wurde eine neue Laminin-Nomenklatur vorgeschlagen, in der alle Heterotrimere mit drei Ziffern entsprechend ihrer Untereinheiten bezeichnet werden (Aumailley et al., 2005). Diese Nomenklatur soll die bisherigen Namensgebungen nach *Burgeson et al.* mit Ziffern entsprechend der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung ersetzen (Burgeson et al., 1994).

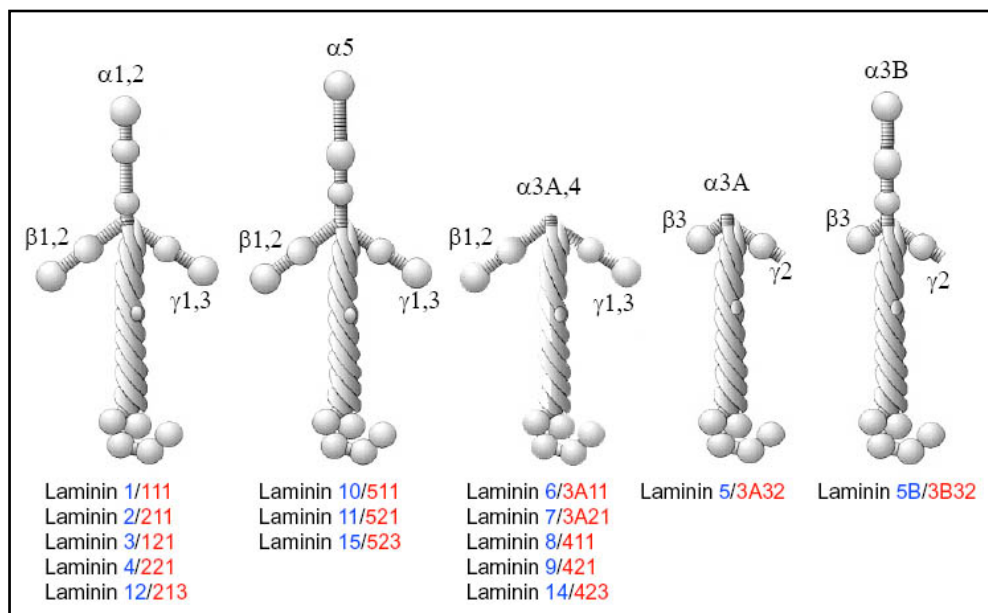


Abbildung 1-3: Laminin-Isoformen.

Die Nomenklatur nach Burgeson (Burgeson et al., 1994) ist in blau dargestellt, die neue Nomenklatur (Aumailley et al., 2005) ist rot hervorgehoben.

Die Polymerisation der Laminine und ihr Einbau in Netzwerke wird über ihre N-terminale Domäne in einer von Ca^{2+} abhängigen Interaktion vermittelt (Yurchenco und Cheng, 1993). Die G-Domänen der verschiedenen Laminine, die unprozessiert aus fünf LG-Modulen bestehen, vermitteln Interaktionen mit der Zelloberfläche (Talts et al., 1998; Talts

et al., 1999). Viele G-Domänen interagieren mit Heparin und Sulfatiden, zudem binden die meisten an $\alpha 6\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ - Integrin sowie einige an α -Dystroglykan (Miner, 2005). Laminin-11 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$) ist eine speziell in der GBM und der arteriellen Basalmembran vorkommende Form. Im Mesangium der Glomeruli kommen hingegen die Isoformen -1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), -2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), -4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) und -9 ($\alpha 4\beta 2\gamma 1$) vor (Hallmann et al., 2005). Mutationen der $\beta 2$ -Kette des Laminin-11 verursachen bei Mäusen eine massive Proteinurie und führen bereits innerhalb von sieben Tagen nach Geburt zum Tod (Miner und Li, 2000). Die GBM erscheint bei diesen Mäusen auf ultrastruktureller Ebene normal, jedoch konnte in manchen Fällen eine Fusion der Podozytenfortsätze beobachtet werden (Noakes et al., 1995).

1.2.2 Kollagen IV

Eine weitere Hauptkomponente der GBM ist Kollagen IV, das sich aus drei α -Ketten zusammensetzt und in Basalmembranen gefunden wird. Insgesamt sind sechs unterschiedliche Kollagen IV α -Ketten bekannt (Ball et al., 2003). Ihre Struktur lässt sich in eine N-terminale Domäne (7S), in einen langen kollagenen Abschnitt mit den für Kollagene typischen repetitiven Aminosäure-Triplets (Gly-X-Y) und in eine terminale nicht-kollagene (*Non Collagenous*, NC1) Domäne unterteilen (Abbildung 1-4). Über die NC1-Domäne assemblieren die α -Ketten zunächst in Heterotrimere, welche sich anschließend paarweise aneinanderlagern, während die 7S-Domäne an der kovalenten Zusammenlagerung von jeweils vier Heterotrimeren zu einer spinnenartigen Struktur beteiligt ist (Boutaud et al., 2000; Dolz et al., 1988). In der GBM liegen hauptsächlich die $\alpha 3$ (IV)-, $\alpha 4$ (IV)- und $\alpha 5$ (IV)-Ketten vor. Einige Erkrankungen, wie das Alport-Syndrom, werden auf Mutationen im Kollagen IV Gen zurückgeführt (Alexakis et al., 2006; Hudson et al., 2003; Kashtan, 2002; Yurchenco und Schittny, 1990). Das Alport-Syndrom wird X-chromosomal vererbt und die betroffenen Patienten leiden an einer Nephropathie, die von Hämaturie, interstitieller Nephritis und auch von Taubheit begleitet sein kann (Heikkila et al., 2000; Jais et al., 2000; Kashtan et al., 2001; Kashtan, 2002).

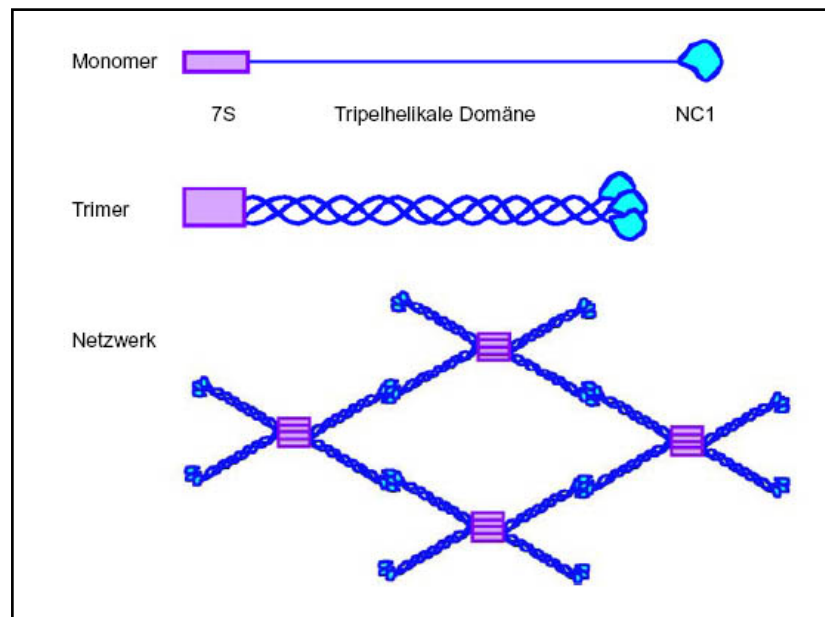


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des Kollagen IV-Netzwerkes.

Drei $\alpha 3$ -Ketten bilden eine Tripelhelix mit einer aminoterminalen 7S- und carboxyterminalen NC1-Domäne. Je vier Moleküle bilden über ihre 7S-Domänen spinnenartige Strukturen aus, überdies binden je zwei Trimere über die NC1-Domäne in Kopf-an-Kopf-Orientierung aneinander (Ortega und Werb, 2002).

In der Regel liegt eine Mutation der Gene *COL4 A3*, *COL4 A4* oder *COL4 A5* vor (Jais et al., 2000). Als Konsequenz des zu achtzig Prozent X-chromosomal vererbten Alport-Syndroms werden in der Niere *COL4 A1* oder *COL4 A2* substitutiv exprimiert (Peissel et al., 1995). Phänotypisch erscheint die GBM zunächst normal, verdickt sich aber mit zunehmendem Alter des Patienten und reißt schließlich ein. Dieser pathogenetische Ablauf endet in renalem Versagen. Die $\alpha 1(\text{IV})_2\text{-}\alpha 2(\text{IV})$ -Form des Kollagen IV, die sich über die NC1-Domäne zu Netzwerken zusammenlagert, wird normalerweise während der Embryonalentwicklung exprimiert und im Laufe der fötalen Entwicklung durch die Isoform $\alpha 3(\text{IV})\text{-}\alpha 4(\text{IV})\text{-}\alpha 5(\text{IV})$ substituiert. Diese Isoform weist eine stärkere Quervernetzung auf und ist dadurch wesentlich stabiler und gegenüber Endoproteolyse weniger anfällig (Hudson et al., 2003; Kashtan et al., 2001; Kashtan, 2002; Turner und Rees, 1996; White et al., 2005). Bei Alport-Patienten führt wahrscheinlich der Einbau der $\alpha 1(\text{IV})_2\text{-}\alpha 2(\text{IV})$ -Netzwerke zu Basalmembrandefekten, wodurch es zu Rissen in der GBM und somit zur Proteinurie kommt (Kalluri et al., 1997). Eine andere, mit Kollagen IV assoziierte Erkrankung, ist das Goodpasture-Syndrom (Saus et al., 1988). Hier führt eine Antikörperproduktion gegen die $\alpha 3(\text{IV})$ -NC1-Domäne (Autoantigen) zur Degeneration der

Niere. Da in der Basalmembran der Lungenalveolen ebenfalls diese $\alpha 3(\text{IV})\text{-NC1}$ -Domäne vorliegt, ist der respiratorische Trakt beim Goodpasture-Syndrom auch betroffen (Hudson et al., 2003; Kalluri et al., 1997; Turner und Rees, 1996). Die Aktivierung der Faktoren des Komplementsystems und verschiedener Proteasen zerstört die Filtrationsbarriere sowie die Bowmansche Kapsel (Hudson et al., 2003).

1.2.3 Perlecan

Perlecan ist ein Heparansulfat-Proteoglykan der extrazellulären Matrix, das ursprünglich als Basalmembran-Komponente entdeckt wurde (Kallunki und Tryggvason, 1992). Sein Proteinkern besitzt ein Molekulargewicht von 400 bis 470 kDa und kann in fünf Domänen unterteilt werden, von denen vier Homologien zu weiteren sekretierten Proteinmodulen aufweisen (Groffen et al., 1999). Die Glykosaminoglykan-Zuckerketten sind an der Domäne I angeheftet und machen ungefähr fünfzig Prozent des Molekulargewichts von Perlecan aus (Couchman et al., 1996). Perlecan dient aufgrund seiner anionischen Eigenschaft, zusätzlich zu seiner strukturellen Funktion in der GBM, auch als Filtrationsbarriere. Außerdem kann es als Signalmolekül fungieren. In der Niere wird Perlecan als Strukturkomponente der GBM, der Bowmanschen Kapsel und der tubulären Basalmembran (TBM) exprimiert. Bis vor kurzem wurde postuliert, dass die negativ geladenen Heparansulfatketten (HS) von Perlecan für die ladungsspezifische Barriere der GBM zuständig sind. Mäuse, bei denen zwei der drei HS-Ketten von Perlecan deletiert wurden, zeigten keine morphologischen Anomalitäten der GBM sowie Proteinurie (Groffen et al., 1999; Morita et al., 2005). Eine Proteinurie konnte jedoch erst bei Überbelastung der transgenen Mäuse mit erhöhten Proteinmengen an Rinderserumalbumin festgestellt werden. Als Erklärung für diesen, erst durch Stress erzeugten, nephrotischen Phänotyp wurden von *Morita et al.* eine mögliche Kompensation durch andere Moleküle oder eine Überexpression der Chondroitinsulfatketten von Perlecan angenommen. Diese Kompensation würde folglich den Verlust der Heparansulfatketten ausgleichen, aber in Stress-Situationen nicht ausreichend sein (Morita et al., 2005).

1.2.4 Nidogen

Die GBM-Komponente Nidogen ist ein 150 kDa großes Glykoprotein, das aus drei globulären Domänen besteht, die durch zwei lineare Segmente miteinander verbunden sind (Schymeinsky et al., 2002). Die Nidogen-Familie umfasst bei Säugetieren zwei Mitglieder, die während der Embryonalentwicklung in gleichen Gewebetypen exprimiert werden und ubiquitär als Basalmembrankomponenten vorkommen (Kvansakul et al., 2001). Nidogen bindet über eine C-terminale globuläre Domäne an Laminin (Mayer et al., 1993). Als Nidogen/Laminin-Komplex kann es wiederum an Kollagen IV binden (Groffen et al., 1999). In Abbildung 1-5 sind die Interaktionen der Basalmembrankomponenten untereinander schematisch dargestellt.

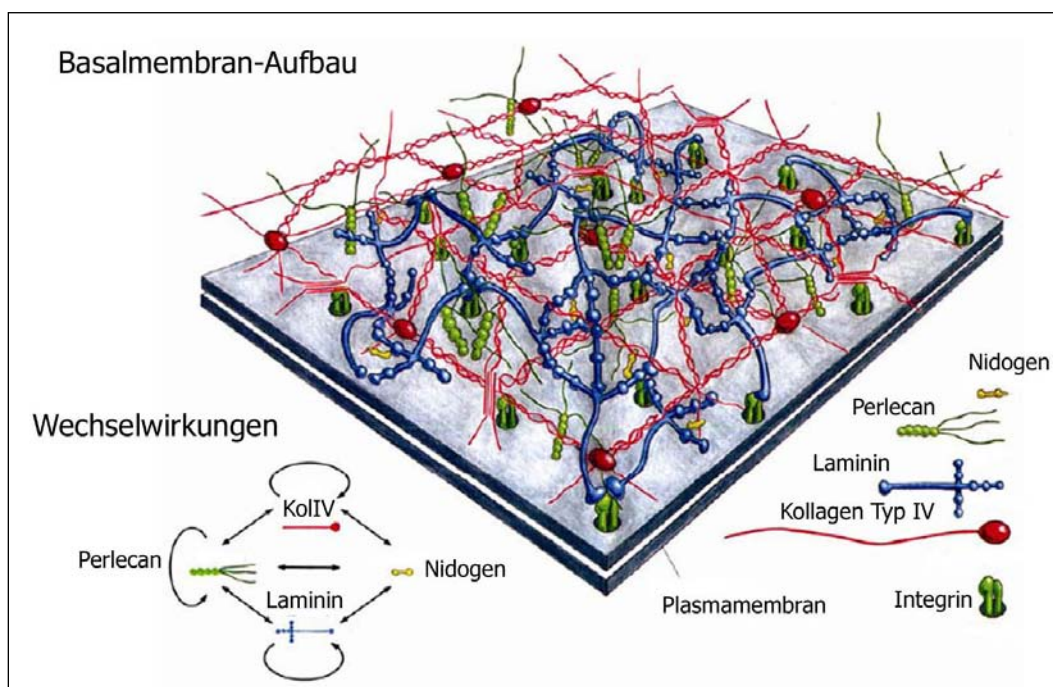


Abbildung 1-5: Modell der molekularen Zusammensetzung von Basalmembranen.

Die Kollagen IV- und Laminin-Netzwerke werden über Nidogen verknüpft. Perlecan bindet an Kollagen IV, Laminin, Nidogen und an sich selbst (verändert nach Yurchenco und Schittny, 1990).

Sowohl Nidogen 1 als auch Nidogen 2 Knockout-Mäuse sind lebensfähig. Eine Fehlentwicklung der Niere ist bisher nicht beschrieben worden. Im Falle von Nidogen 1 defizienten Mäusen wird Nidogen 2 vermehrt gebildet (Bader et al., 2005). Um diese redundante Funktion der Nidogene und eine mögliche Kompensation, auszuschließen wurden Tiere generiert, denen beide Nidogen-Gene fehlten (Bader et al., 2005; Groffen et

al., 1999). Anhand solcher Doppel-Knockout Mausstudien wurde verdeutlicht, dass die Nidogene redundante Funktionen ausüben können und der Ausfall beider Nidogene letal ist (Bader et al., 2005). Die Ursachen der Letalität wurden auf ein schwaches Myokardium zurückgeführt, deren Muskelwände postnatal für die Atmung und Kontraktion nicht ausreichend sind (Bader et al., 2005).

1.3 Nierenerkrankungen

Chronische Nierenerkrankungen führen längerfristig zu Nierenversagen (Niereninsuffizienz) (Chatziantoniou et al., 2004; Chatziantoniou und Dussaule, 2005; Chevalier, 2006; Eddy, 2000; Eddy, 2005; Harris, 2001; Iwano und Neilson, 2004). Diese kann aufgrund des progressiven Untergangs des Nierenparenchyms in eine irreversible Form übergehen. Die häufigsten Ursachen hierfür sind Erkrankungen durch Schädigung des Glomerulus (Glomerulopathien), tubulointerstitielle Nephritiden, in denen der tubulointerstitielle Raum der Niere betroffen ist, hereditäre Erkrankungen (Alport-Syndrom) sowie obstruktive und vaskuläre Nephropathien (Eddy, 2000; Klahr und Morrissey, 2002). Bei primärer Glomerulonephritis (GN) beschränkt sich die Erkrankung im Speziellen auf die Glomeruli. Bei der sekundären GN werden die Glomeruli im Rahmen einer Systemerkrankung, wie z.B. Diabetes, Lupus erythematodes und Bluthochdruck, beschädigt (Hricik et al., 1998). Obwohl es sich um verschiedene Erkrankungen handelt, ist das histologische Bild der GN und der tubulointerstitiellen Fibrose relativ einheitlich. Es ist durch eine fortschreitende Akkumulation von extrazellulärem Matrixgewebe, wie beispielsweise von Kollagenen (Kollagen I, -III, -IV), Laminin, Fibronectin sowie Proteoglykanen definiert (Eddy, 2000; Groffen et al., 1999; Harris, 2001; Iwano und Neilson, 2004; Klahr und Morrissey, 2002; Kriz et al., 1998; Lee et al., 2004; Liu, 2004). Da im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung der pathologischen Merkmale nach Anwendung der Nierenerkrankungsmodelle an Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen eine wichtige Aufgabe darstellte, werden in den nächsten Abschnitten die pathogenetischen Abläufe während Nephropathien beschrieben. Zudem werden die zwei angewandten Erkrankungsmodelle und ihre charakteristischen Merkmale vorgestellt.

1.3.1 Pathogenese der renalen Fibrose

Unter extrazellulären Matrixkomponenten kann zwischen residenten und transienten Molekülen unterschieden werden. Zu den residenten zählen fibrilläre Proteine wie Kollagen und Elastin, Adhäsionsproteine wie Laminin und Fibronectin sowie Proteoglykane (Lelongt und Ronco, 2003). Zu den transienten Faktoren der extrazellulären Matrix gehören Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die in die Matrix sequestriert werden und dort mit den residenten Komponenten interagieren können (Bascands und Schanstra, 2005; Bottinger und Bitzer, 2002; Boukhalfa et al., 1996). Nach initialer Schädigung der Niere werden residente Zellen aktiviert, die durch Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verschiedene Vorgänge wie Apoptose, Proliferation, Infiltration und epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) auslösen können (Kalluri und Neilson, 2003; Zeisberg et al., 2001b; Zeisberg et al., 2001a; Zeisberg und Kalluri, 2004b). In der darauf folgenden Reparaturphase werden vermehrt auch fibrotische ECM-Komponenten synthetisiert, deren Abbau durch MMPs nicht koordiniert erfolgt, da diese durch erhöhte TIMP-1 (*tissue inhibitor of metallo proteases*) Proteinsynthese inhibiert werden (Kalluri und Neilson, 2003; Kim et al., 2001; Lan, 2003; Liu, 2004; Mitani et al., 2004; Norman und Fine, 1999; Schaefer et al., 1997; Strutz und Muller, 1999; Zeisberg et al., 2001a; Zoja et al., 2006).

Die *de novo* Expression von alpha-Smooth Muscle (α -SMA) Aktin, ein kontraktiles Protein, das normalerweise von glatten Muskelzellen produziert wird, ist ein typisches Kennzeichen der fibrotischen Aktivierung von mesenchymalen Zellen und EMT (Yang und Liu, 2001; Yang und Liu, 2003).

TGF- β (*Transforming Growth factor*) spielt eine Schlüsselrolle als Mediator des fibrotischen Reaktionsweges, da TGF- β 1 maßgeblich den Verlauf der Fibrose beeinflusst (Bascands und Schanstra, 2005; Bottinger und Bitzer, 2002; Cheng und Grande, 2002). Bei einer obstruktiven Nephropathie wird die TGF- β Synthese von Angiotensin II (Ang II) induziert. Ang II nimmt eine Schlüsselposition in dem für Blutdruck und Wasserhaushalt zuständigen Renin-Angiotensin-Aldosteron System ein (Liu, 2006). In Abbildung 1-6 ist die Abfolge einzelner Schritte, die zur erhöhten ECM-Ablagerung führen, dargestellt.

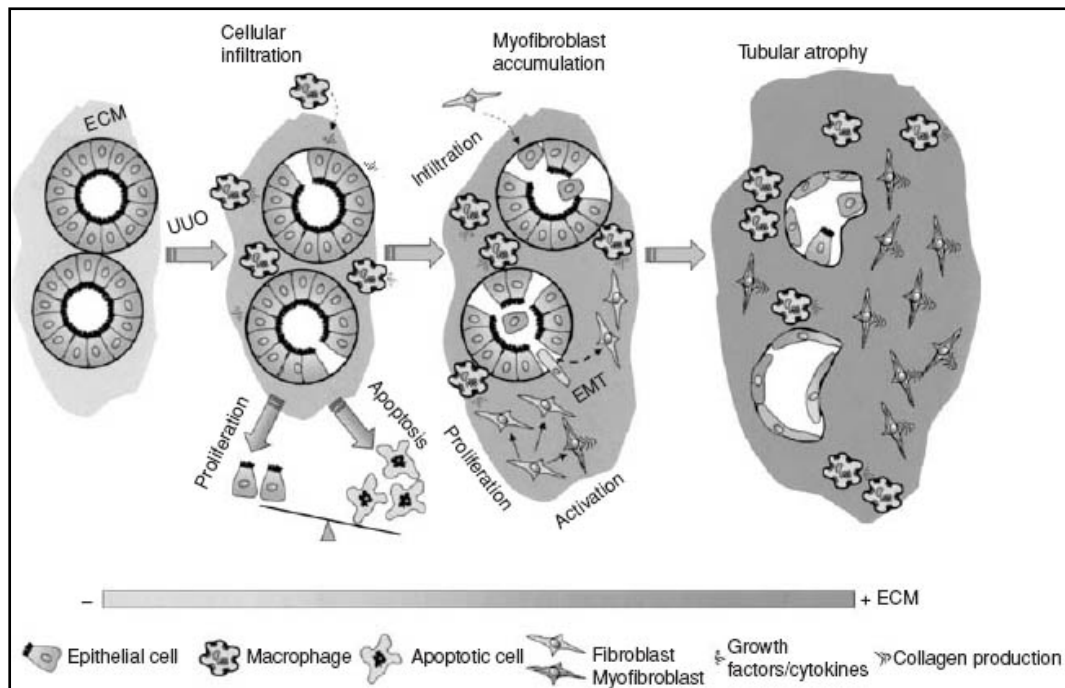


Abbildung 1-6: Modell der renalen Pathogenese.

Prozesse nach initialer Schädigung, die zu einer erhöhten ECM-Akkumulation führen und in tubulärer Atrophie kulminieren (Bascands und Schanstra, 2005).

Anti-inflammatorische Wirkungen konnten mit Wachstumsfaktoren wie beispielsweise BMP-7 (*Bone Morphogenetic Protein*) oder HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) erzielt werden, da diese den fibrotischen Funktionen von TGF- β 1 entgegensteuern können (Bascands und Schanstra, 2005; Bottinger und Bitzer, 2002; Klahr und Morrissey, 2002; Klahr und Morrissey, 2003a). BMP-7, einer von vielen sekretierten Signalmolekülen der TGF- β -Superfamilie, wirkt bei der Verzweigungsmorphogenese während der Nierenentwicklung mit. Später in der Entwicklung sorgt BMP-7 für die Aufrechterhaltung der Funktion des renalen Epitheliums. Als TGF- β Antagonist induziert BMP-7 die mesenchymal-epitheliale Transdifferenzierung (MET) und erreicht dadurch eine Reversion der tubulären Schädigung. Diese Effekte von BMP-7 stimmen mit seiner Funktion während der Embryonalentwicklung überein (Zeisberg et al., 2003; Zeisberg und Kalluri, 2004a).

1.3.1.1 Funktionen von TGF- β 1 bei Nierenfibrose

TGF- β 1 ist das am längsten bekannte Mitglied der TGF- β -Superfamilie, zu der auch die Isoformen TGF- β 2 und - β 3, BMP-2 bis BMP-7, Aktivin sowie Inhibin zählen (Bottinger und Bitzer, 2002; Liu, 2006). TGF- β -Signale werden intrazellulär über Smad-Proteine oder den Signalweg der Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) weitergeleitet (Masaki et al., 2003; Massague, 1998; Massague, 2000; Norman und Fine, 1999; Sato et al., 2003; Valcourt et al., 2005). TGF- β 1 mRNA wird in der normalen Niere in verschiedenen Segmenten der renalen Tubuli, vor allem aber in den distalen Abschnitten exprimiert. In den Glomeruli konnte TGF- β 1 in Mesangialzellen, viszeralen Epithelzellen und im parietalen Epithel der Bowmanschen Kapsel nachgewiesen werden (Fukuda et al., 2001). Seine pleiotrope Funktion übt TGF- β nach Bindung an hochaffine Transmembran-Kinase-Rezeptoren (TGF- β RI und -RII) aus, die ebenfalls in glomerulären und tubulären Zellen vorkommen (MacKay et al., 1989). Neben diesen Serin/Threonin Kinase-Rezeptoren reguliert das Zelloberflächen-Proteoglykan Betaglycan als Co-Rezeptor die Bindung an TGF- β RI und -RII. Betaglycan bindet TGF- β über seine Zuckerketten und rekrutiert die Liganden zu den eigentlichen Rezeptoren. In dieser Interaktion ist Syndecan-2 involviert, das TGF- β im Gegensatz zu anderen Heparansulfat-Proteoglykanen über Protein-Protein Interaktionen bindet (Chen et al., 2004). Anschließend wird über Translokation der Smad-Komplexe in den Nukleus die Transkription von Matrixmolekülen wie den Kollagenen (I, -III, -IV) sowie von α -SMA stimuliert.

1.4 Nierenerkrankungsmodelle

Zur Untersuchung unterschiedlichster Nephropathien sind in der Fachliteratur zahlreiche Tierversuchsmodelle beschrieben (Bascands und Schanstra, 2005; Breyer et al., 2005; Chevalier, 2006; Fleck et al., 2006; Kashtan, 2002; Kren und Hostetter, 1999; Lee et al., 1995; Zoja et al., 2006). In dieser Arbeit wurden zwei solcher Modelle angewandt, die im nächsten Abschnitt näher erklärt werden.

1.4.1 Obstruktive Nephropathie

Die obstruktive Nephropathie ist charakterisiert durch funktionelle, morphologische Nierenveränderungen aufgrund von chronischem Harnstau. Es entsteht zunächst eine akute tubulointerstitielle Fibrose, die kongenital bereits bei Neugeborenen auftreten oder bei Erwachsenen durch Hypertrophie der Prostata oder durch Nierensteine entstehen kann. Zur Erforschung der obstruktiven Nephropathien durch Nachahmung kann das Modell der unilateralen Uretherobstruktion (UUO) herangezogen werden, welches im nächsten Abschnitt vorgestellt wird.

1.4.1.1 Unilaterale urethrale Obstruktion

Im Modell der UUO werden in männlichen Mäusen oder Ratten die (linken) Urether ligiert, wodurch eine tubulointerstitielle Fibrose ausgelöst wird (Hirschberg und Wang, 2005; Iwano und Neilson, 2004; Strutz und Neilson, 2003). In diesem Krankheitsmodell ist vorwiegend das Interstitium betroffen, welches ungefähr neunzig Prozent des Nierenvolumens einnimmt. Nach initialer Schädigung, bei der es zu einer Infiltration von Makrophagen, Monozyten und Leukozyten kommt, werden residente Fibroblasten und tubuläre Epithelzellen aktiviert. Diese aktivierten Zellen sekretieren verstärkt ECM (Harris, 2001). Eine erhöhte Zellmotilität und der Verlust epithelialer Adhäsion ermöglichen die Infiltration durch transdifferenzierte Zellen (Iwano und Neilson, 2004). Insgesamt steigt die Anzahl interstitieller Fibroblasten an. Diese exprimieren unter anderem Fibronectin, Kollagene Typ I und -III, Laminine, verschiedene Proteoglykane, Zytokine und α -SMA (Zeisberg et al., 2001a; Zeisberg und Kalluri, 2004b). Dieses Modell der unilateralen Uretherobstruktion eignet sich besonders gut zur Untersuchung der tubulointerstitiellen Fibrose, da ohne Injektion eines Fremdkörpers eine obstruktive Nephropathie erzeugt wird.

1.4.2 Nephrektomien

Mit Hilfe eines weiteren Erkrankungsmodells kann die Schädigung der Glomeruli induziert und der Verlauf der Glomerulopathie beobachtet werden. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell der unilateralen Nephrektomie gewählt. Hiermit ist die einseitige

Entfernung einer Niere gemeint. Die unilaterale Nephrektomie dient als Modell zur Untersuchung der funktionellen Kompensation durch die zurückbleibende Niere (Amann et al., 2006; Muchaneta-Kubara et al., 1995). Durch den Verlust einer Niere kann es zu strukturellen Veränderungen kommen, die einigen humanen Nierenerkrankungen ähneln (Amann et al., 2006; Hostetter, 1995; Hostetter et al., 2001). Die veränderten, funktionellen Bedingungen ziehen histologische Veränderungen nach sich, die durch eine mesangiale Expansion und dem dadurch hervorgerufenen Zusammenbruch der Kapillarlumina (Kapillarlumen-Kollaps) gekennzeichnet sind. Mit Hilfe der UNX konnte bisher lediglich bei neonatalen Ratten (Woods et al., 2001) eine Sklerose ausgelöst werden (Amann et al., 2006; Hostetter et al., 2001; Kren und Hostetter, 1999; Kriz et al., 1998). Da dieses pathologische Bild beim Menschen relativ selten nach Nephrektomien auftritt, bestand ein Widerspruch zwischen Resultaten mit Versuchstieren und pathologischen Befunden beim Menschen (Gonzalez et al., 2005). *Gonzales et al.* verglichen einerseits Patienten, die kongenital von einer Reduktion der renalen Masse betroffen waren, andererseits solche, denen operativ Nierengewebe entfernt wurde. Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass erst bei Korpulenz der untersuchten Patienten die gleichen glomerulären Schädigungen wie bei Versuchstieren auftreten können, die durch mesangiale Expansion bzw. Sklerotisierung charakterisiert sind (Gonzalez et al., 2005).

Die Zunahme der Nierenmasse nach Nephrektomie wird von verschiedenen Faktoren, z.B. Hormonen und Wachstumsfaktoren beeinflusst (Flyvbjerg et al., 2002; Mulroney und Pesce, 2000; Schena et al., 1999; Zeier et al., 1998). Pathophysiologisch betrachtet dient die renale Zunahme (Compensatory Renal Growth, CRG) der Aufrechterhaltung der Homöostase und trägt zu Veränderungen der glomerulären Filtrationsrate, des Blutdruckes und des renalen Blutflusses bei. Experimente mit juvenilen Ratten verdeutlichten, dass auch das Entwicklungsstadium ein entscheidendes Kriterium für den Verlauf der Nephropathie darstellt. Bei präpubertären Tieren ist der kompensatorische Nierenzuwachs vom Wachstumshormon (Growth Hormon, GH) unabhängig, hängt aber von dem Insulin-ähnlichen Wachstumshormon IGF-I (Insulin like Growth Hormone) ab (Mulroney et al., 1992). In juvenilen Tieren sowie in weiblichen Ratten liegt eine hyperplastische renale Zunahme vor, die zusätzlich durch eine intrarenale IGF-I Erhöhung gesteuert wird (Mulroney et al., 1999; Mulroney und Pesce, 2000; Sun et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigen männliche Ratten vorwiegend einen hypertrophen Verlauf in der CRG, der vom Testosteronspiegel beeinflusst wird (Antus et al., 2003; Mulroney et al., 1999). Östrogene

hingegen scheinen einen nephroprotektiven Einfluss auszuüben, weshalb weibliche Tiere mildere Ausprägungen von verschiedenen experimentellen renalen Erkrankungen aufweisen (Antus et al., 2003; Fleck et al., 2006; Flyvbjerg et al., 1999; Gafter et al., 1990; Gross et al., 2004; Gross et al., 2005; Mulrone y et al., 1999).

Da das Geschlecht der Versuchstiere offenbar eine Rolle spielt (Gafter et al., 1990), wurden weibliche Ratten nephrektomiert und der Verlauf der CRG im Zusammenhang mit den relevanten Hormonen GH und IGF-I beobachtet (Mulrone y und Pesce, 2000). Morphologisch zeigten die Weibchen nach sieben Tagen post Nephrektomie geringere CRG als die Männchen. Gleichzeitig war als Zeichen der UNX-induzierten Hyperplasie die Gesamtmenge an DNA in den Nieren bei den weiblichen Tieren gegenüber den Männchen deutlich erhöht. Zusätzlich wurde durch Hormonmessungen gezeigt, dass die renale Hyperplasie in Weibchen mit erhöhten IGF-I Konzentrationen assoziiert war. Daraus ist zu schließen, dass Östrogene im Zusammenspiel mit IGF-I eine Hyperplasie begünstigen (Mok et al., 2003; Mulrone y und Pesce, 2000). Testosteron hingegen fördert die hypertrophe UNX-induzierte CRG in männlichen Ratten, die durch Kastration bzw. GH-Antagonisten unterbunden werden kann (Gafter et al., 1990; Mulrone y et al., 1999).

1.4.2.1 UNX-Modell und Glomerulosklerose

Zahlreiche Publikationen verdeutlichen, dass eine subtotale Nephrektomie eine Sklerotisierung der Glomeruli in Rattennieren auslöst. Die subtotale Nephrektomie eignet sich auch zur Untersuchung der Sklerose-Prozesse in weiblichen Ratten, die im Gegensatz dazu bei UNX keine Glomerulosklerose entwickeln (Fleck et al., 2006).

Eine einseitige Nephrektomie hingegen ruft erst bei Bluthochdruck oder in Kombination mit nephrotoxischen Antikörpern sowie bei einer proteinreichen Diät eine Glomerulosklerose hervor (Dworkin et al., 1984; Dworkin und Feiner, 1986; Ma und Fogo, 2003; Schiller und Moran, 1997). *Sakai et al.* injizierten den Antikörper Anti-Thy1.1, der eine mesangioproliferative Glomerulopathie erzeugt, und beobachteten, dass schon nach einer einzigen Injektion eine Glomerulosklerose in UNX-Mäusen auftrat (Sakai et al., 2005). Bei diesen Mäusen konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Mesangialzellen und zugleich eine erhöhte Expression an TGF- β festgestellt werden, die jedoch am Tag dreißig nach Versuchsbeginn abklang. Zudem waren die sklerotischen Bereiche durch eine erhöhte Expression von Chondroitinsulfat-

und Heparansulfat-Proteoglykanen gekennzeichnet, die auch nach dreißig Tagen erhöht blieb (Sakai et al., 2005). Neben einer Anreicherung von ECM scheinen in dieser publizierten experimentellen Erkrankungsstudie Proteoglykane ebenfalls in einer Glomerulosklerose hoch reguliert zu sein. Daher werden im nächsten Abschnitt die Proteinklasse der Heparansulfat-Proteoglykane und die Syndecane als Proteinfamilie vorgestellt.

1.5 Heparansulfat-Proteoglykane

Proteoglykane sind weit verbreitete glykosylierte Makromoleküle, die strukturell enorm variieren. Der Proteinkern dieser Moleküle ist mit einer oder mehreren Glykosaminoglykanketten (GAG-Ketten) assoziiert, wobei Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat unterschieden werden. Sie erscheinen auf Zelloberflächen und in der extrazellulären Matrix. Die große Vielfalt der Proteoglykane und ihre vielfältigen Glykosylierungsformen ermöglichen eine große Bandbreite von Funktionsmöglichkeiten. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) kommen als Zelloberflächen-Proteoglykane oder in der extrazellulären Matrix vor (Park et al., 2000). Viele der HSPG gehören zu der Gruppe derjenigen modulären Proteine, die Struktur, Elastizität und Durchlässigkeit der extrazellulären Matrix regulieren (Ruoslahti und Yamaguchi, 1991).

1.5.1 Zelloberflächen-HSPG

Die Gruppe der Zelloberflächen-HSPG kann aufgrund unterschiedlicher Membranverankerungen in zwei Unterfamilien eingeteilt werden. Zum einen können sie in die Glypicane, die über einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker mit der Membran verbunden sind, zum anderen in die Syndecane, die Typ I-Transmembranproteine, eingeteilt werden. Neben den unterschiedlichen Verankerungsformen besteht der größte Unterschied zwischen Glypicanen und Syndecanen in ihrer dreidimensionalen Struktur. Die extrazelluläre Domäne der Glypicane ist eher globulär und wird durch Disulfidbrückenbindungen stabilisiert (Hacker et al., 2005). Im Gegensatz dazu nimmt der extrazelluläre Bereich der Syndecane eine eher lineare Konformation an. Zusätzlich unterscheiden sich diese zwei Gruppen dadurch, dass

die GAG-Anheftungssequenzen bei Glypicanen im Gegensatz zu den Syndecanen überwiegend proximal zur Plasmamembran lokalisiert sind (David, 1993; David et al., 1993).

1.6 Syndecane

Die Syndecan-Familie umfasst vier Mitglieder, deren Gene auf vier unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Diese Genstruktur deutet an, dass die vier Syndecane durch Genduplikation entstanden sind (Carey, 1997). In Säugetieren repräsentieren die Syndecane-1 und -3 sowie Syndecane-2 und -4 aufgrund von starken Sequenzhomologien zwei Unterfamilien. Ihre Expression wird gewebs- und entwicklungspezifisch reguliert (David et al., 1992; Kim et al., 1994). Im adulten Organismus ist Syndecan-1 (CD 138) das vorherrschende Syndecan der Epithelzellen, Syndecan-2 dagegen das der mesenchymalen Zellen. Die Syndecan-3 Expression beschränkt sich hauptsächlich auf neuronales Gewebe, kommt aber auch in Zellen des Hartgewebes vor. Syndecan-4 hingegen wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen, wie z.B. Nervenzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Fettzellen und Fibroblasten, exprimiert (Fisher et al., 2006; Kim et al., 1994). Während der Embryonalentwicklung, Organogenese und verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. Wundheilung, Nierenerkrankung oder Tumorentwicklung, wird die Expression der Syndecane reguliert.

1.6.1 Proteinstruktur der Syndecane

Alle Syndecane bestehen aus einem *Core*-Protein, an das GAG-Ketten angeheftet sind. Diese Zuckerketten sind unverzweigte Polysaccharidketten aus repetitiven Disaccharideinheiten (Carey, 1997). Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus unterschiedlichen Kohlenhydraten und ihrer unterschiedlichen Sulfatierung werden sie in Chondroitinsulfat-, Dermatansulfat-, Heparansulfat- und Keratansulfatketten eingeteilt. Syndecan-2 besitzt hauptsächlich Heparansulfatketten, während bei Syndecan-1 und -3 auch Chondroitinsulfatketten am *Core*-Protein verankert sein können. Bei Syndecan-4 konnten in Epithelzellen aus murinen Brustdrüsen auch Chondroitinsulfatketten detektiert werden (Deepa et al., 2004; Zako et al., 2003), obgleich es bisher nur als Heparansulfattragendes Protein bekannt war (Bernfield et al., 1999). Die Bedeutung und Funktion von

Syndecan-4 als Chondroitinsulfat-tragendes Proteoglycan in diesen Epithelzellen ist noch nicht geklärt. Die prinzipielle Struktur aller Syndecane ist in Abbildung 1-7 skizziert.

Die *Core*-Proteine der Syndecane sind in eine kurze zytoplasmatische, eine membrandurchspannende und eine lange, extrazelluläre Domäne unterteilt. An der extrazellulären Domäne befinden sich die konservierten Anheftungsstellen für Glykosaminoglykane. In ihren transmembranen und zytoplasmatischen Domänen weisen die Syndecane sehr starke Sequenzhomologien auf, wohingegen die Sequenzen in ihren extrazellulären Domänen weniger homolog sind.

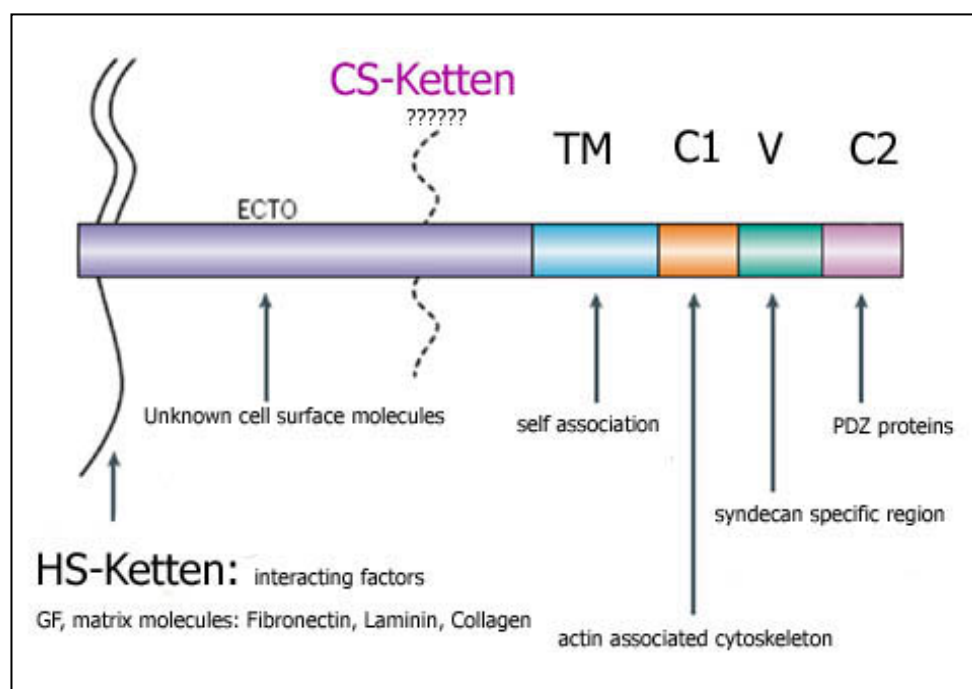


Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau der Syndecane.

Syndecane sind aus einer Ektodomäne (**ECTO**), transmembranen (**TM**) und zytoplasmatischen Domäne, bestehend aus **C1**, **V** und **C2**, aufgebaut. An Syndecanen befinden sich hauptsächlich Heparansulfatketten (**HS**). Außer für Syndecan-2, konnten in den übrigen Vertretern der Syndecan-Familie auch Chondroitinsulfatketten (**CS**) nachgewiesen werden. Für Syndecan-1 und -4 in einer gewebsspezifischen Form, deren Funktion (?????) bisher nicht geklärt ist (verändert nach Couchman, 2003).

Die Transmembrandomäne der Syndecane ist eine einzelne hydrophobe Helix, die die Oligomerisierung der Syndecane vermittelt (Choi et al., 2005; Zimmermann und David, 1999). Im Falle von Syndecan-2 und -4 konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung einen Einfluss auf Syndecan-vermittelte Signalwege ausübt. Beispielsweise interagiert nur die oligomere Form von Syndecan-4 mit Proteinkinase C (**PKC**). *Asundi und Carey*

konnten demonstrieren, dass durch Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne die Oligomerisierung unterbrochen wird (Asundi und Carey, 1995). Syndecan-4 ist das einzige Syndecan, das bisher in fokalen Kontakten nachgewiesen wurde. *In vitro* interagieren auf Fibronectin ausgesäte Zellen über Syndecan-4 *Cluster* mit Signalmolekülen wie PKC und PIP₂ und übertragen nachfolgende Signale zur Ausbildung so genannter fokaler Kontakte. Die zytoplasmatische Domäne der Syndecane besteht aus zwei homologen Subdomänen (C1 und C2), sowie einer, diese C-Bereiche verbindenden variablen Domäne (V), wie in Abbildung 1-7 dargestellt ist. Vermutlich trägt neben der extrazellulären Domäne die variable Region zu den spezifischen, individuellen Eigenschaften der Syndecane bei. Die Funktion der C1-Region ist bisher weitgehend unbekannt, scheint aber für Aktinzytoskelett-assoziierte Bindungen notwendig zu sein (Couchman, 2003). Ein Sequenzmotiv für die Bindung von PDZ-Domänen in der C2-Region liegt in allen Syndecanen konserviert vor. Es handelt sich dabei um eine Tetrapeptidsequenz (EFYA), die Syndecane befähigt, mit PDZ-Domänen, wie z.B. von Syndesmos und Synectin, zu interagieren (Abbildung 1-7). Damit fungieren Syndecane als molekulare Brücken zwischen verschiedenen Proteinbindungspartnern (Grootjans et al., 2000).

Mit der konservierten transmembranen und den zytoplasmatischen Domänen binden die einzelnen Syndecane vorwiegend an gleiche, mit der extrazellulären und variablen Domäne dagegen an individuelle, unterschiedliche Proteine (Bernfield et al., 1999). Alle Syndecan-Ektodomänen können durch proteolytische Spaltung von der Zelloberfläche, in der Nähe der Plasmamembran, abgetrennt werden (*shedding*). Dieser regulierte und durch verschiedene zelluläre Effektoren beschleunigte Prozess bietet weitere Möglichkeiten zur physiologischen Regulation und größeren Bandbreite an Interaktionen mit anderen (löslichen) Molekülen (Bernfield et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass Syndecane an Serin- und Tyrosinresten ihrer zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert werden können (Horowitz et al., 2002; Horowitz und Simons, 1998). Die reversible Phosphorylierung dient in den meisten Fällen zur Kontrolle der Proteinfunktion bzw. -Interaktion. Daher wird angenommen, dass die Syndecan-Phosphorylierung zur funktionellen Anpassung beitragen kann (Couchman, 2003; Horowitz und Simons, 1998; Koo et al., 2006).

1.7 Funktion der Syndecane

Bisher sind die genauen Funktionen der Syndecane nicht geklärt. Syndecane können als Co-Rezeptoren für verschiedene heparinbindende Wachstumsfaktoren (*Growth Factors*, GF) wirken, Zell-Zell oder Zell-Matrix Adhäsion vermitteln, bei der Aktivierung von Proteasen und ihren Inhibitoren mitwirken, als niederaffine Rezeptoren für Enzyme oder als Bindungsstellen für Viren und Bakterien fungieren (Alexander et al., 2000; Bobardt et al., 2003; Burbach et al., 2004; Charnaux et al., 2005; Choi et al., 2005; Couchman, 2003; David, 1993). Syndecane werden als Co-Rezeptoren bezeichnet, da sie als Zelloberflächen-Rezeptoren die Ligandenbindung beeinflussen und dadurch die Signalweiterleitung an die entsprechenden Signalrezeptoren regulieren können (Couchman, 2003).

Eine besondere Funktion üben die Syndecane bei der Wundheilung aus. In normaler, unverwundener humaner und muriner Haut werden Syndecan-1 und Syndecan-4 in Hautkeratinozyten sowie epithelialen Haarfollikelzellen exprimiert (Gallo et al., 1994; Lundqvist und Schmidtchen, 2001). Nach Verwundung der Haut konnte eine erhöhte, transiente Expression von Syndecan-1 in Endothelzellen der neugebildeten Blutgefäße im Granulationsgewebe der Wunden nachgewiesen werden. Syndecan-1 wird zudem verstärkt von proliferierenden und migrierenden Keratinozyten exprimiert. Auch Syndecan-4 wird nach Verwundung in basalen Keratinozyten der hyperproliferativen Epidermis vermehrt gebildet. Im Gegensatz zu Syndecan-1, das speziell in Endothelzellen des Granulationsgewebes induziert wird, konnte Syndecan-4 sowohl in Endothelzellen als auch in Fibroblasten der gesamten Dermis an den Wundrändern und im Granulationsgewebe nachgewiesen werden (Elenius und Jalkanen, 1994; Gallo et al., 1994). Außerdem wurde gezeigt, dass die Wundflüssigkeit die löslichen, *gesheddeten* Formen der Syndecane enthält (Baciu et al., 1994). *Gesheddete* Syndecane können anschließend als lösliche Mediatoren an Prozessen wie Inflammation sowie Zellproliferation involviert sein (Day et al., 2003; Elenius et al., 2004; Endo et al., 2003). In der Wundflüssigkeit modulieren sie vermutlich die proteolytische Aktivität verschiedener Proteasen und nehmen als lösliche Moleküle Einfluss auf das Gleichgewicht von Proteasen während der Wundheilung (Elenius et al., 2004; Kainulainen et al., 1998).

Zur genaueren Untersuchung der Funktionen von Syndecan-1 und -4 in der Wundheilung wurden entsprechende Knockout-Mäuse generiert (Echtermeyer et al., 2001; Kato et al., 1995; Stepp et al., 2002). In Wundheilungsstudien mit Syndecan-1- und Syndecan-4-

knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine verzögerte Heilung von kutanen Wunden aufweisen (Echtermeyer et al., 2001; Stepp et al., 2002). Syndecan-4-Defizienz bei Mäusen hat Wundheilungsstörungen zur Folge, bei welcher auch die angiogenetischen Prozesse in dem neugebildeten Gewebe verzögert sind und die Reepithelialisierung der Wunden verschlechtert ist (Echtermeyer et al., 2001). Die Kontraktion der Wunden und die Bildung des Granulationsgewebes verlaufen bei Syndecan-1-defizienten Mäusen im Gegensatz zu Syndecan-4-knockout Mäusen normal (Stepp et al., 2002).

1.7.1 Syndecane und Signalprozesse

Syndecane sind im unterschiedlichen Maße Co-Rezeptoren für FGF-1, FGF-2, TGF- β und andere Wachstumsfaktoren (Filla et al., 1998), indem sie die lokale Konzentration der Liganden auf der Zelloberfläche verändern und den jeweiligen Rezeptoren präsentieren. Diese Bindung verhindert unter anderem den Abbau der Liganden. Außerdem sind Syndecane in der Lage, die Dimerisierung der Wachstumsfaktoren zu initiieren oder ihre Interaktion mit deren Rezeptoren zu modifizieren. Syndecan-2 wurde eine regulatorische Funktion auf die TGF- β 1 vermittelte Matrixakkumulation in diabetischen Nieren zugesprochen, in welcher die Synthese im Vergleich zu anderen Syndecanen erhöht ist (Chen et al., 2004). Chen *et al.* vermuten, dass Syndecan-2 die TGF- β Effekte in der diabetischen Niere reguliert, indem es TGF- β über seine Ektodomäne ohne Mitwirkung der Heparansulfatketten bindet. Über die zytoplasmatische Domäne, welche mit Betaglycan assoziiert ist, beeinflusst Syndecan-2 die Rezeptorkonzentration von TGF- β RI und -RII. Bisher ist noch nicht geklärt, ob die Assoziation zwischen TGF- β und Syndecan-2 durch eine direkte Interaktion oder durch gemeinsame Bindungspartner erfolgt. In Abbildung 1-8 ist dargestellt, wie die Interaktion zwischen Betaglycan und Syndecan-2, sowie dieser beiden Proteine mit TGF- β ablaufen könnte.

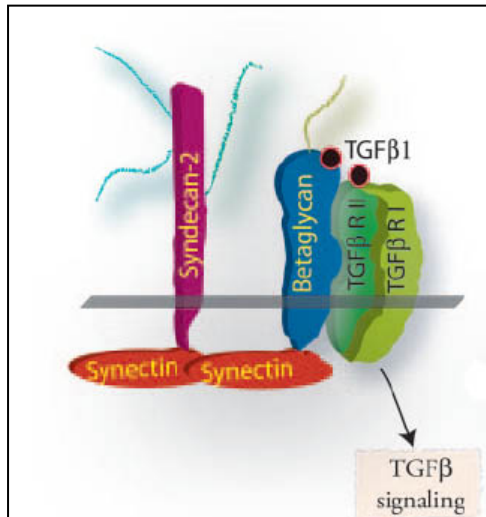


Abbildung 1-8: Syndecan-2 interagiert mit TGF- β und Betaglycan.

Syndecan-2 interagiert mit Betaglycan, vermutlich über Synectin, das an die PDZ-Bindungsmotive der zytosomatischen Domäne bindet. Der phosphorylierte, trimere Rezeptorkomplex bestehend aus Betaglycan, RI und -RII leitet die von TGF- β vermittelten Signale weiter (Tkachenko et al., 2006).

Syndecan-4 ist über seine zytosomatische Domäne an Signalvorgängen beteiligt, die durch FGF-2 verstärkt werden und durch die Phosphorylierung eines Serinrestes in der zytosomatischen Domäne blockiert werden können (Tkachenko et al., 2006). Durch eine Interaktion mit FGF-2 kann Syndecan-4 an PIP₂ binden. Diese Bindung ermöglicht die Oligomerisierung der Syndecan-4-PIP₂ Komplexe und induziert die Signalweiterleitung über PKC α . Eine Blockierung der durch Syndecan-4 aktivierten PKC α Signalweiterleitung wird durch Phosphorylierung der zytosomatischen Domäne erzielt. Die Phosphorylierung inhibiert die Oligomerisierung von Syndecan-4 aufgrund von Konformationsänderungen in seiner C2-Domäne, wodurch weitere Interaktionen mit den Bindungspartnern gestört werden (Koo et al., 2006).

1.8 Syndecan-4

Syndecan-4 besitzt ein *Core*-Protein mit einem Molekulargewicht von 30 kDa sowie drei GAG-Anheftungsstellen in der extrazellulären Domäne (Couchman, 2003; Oh und Couchman, 2004; Wilcox-Adelman et al., 2002; Woods et al., 1998; Woods und Couchman, 1994). Entdeckt wurde Syndecan-4 als ein Antithrombin-bindendes Molekül in mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte (Kojima et al., 1992a; Kojima et al., 1992b).

Die genauen physiologischen Funktionen von Syndecan-4 sind bisher unbekannt und stehen im Fokus verschiedener Forschungsarbeiten (Echtermeyer et al., 2001; Ishiguro et al., 2000; Ishiguro et al., 2001a; Ishiguro et al., 2001b). *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass Syndecan-4 bei pathophysiologischen Vorgängen in den betroffenen Geweben

verstärkt exprimiert wird, so beispielsweise bei der IgA-Nephropathie, beim Herzinfarkt oder bei der kutanen Wundheilung (Kojima et al., 2001; Yung et al., 2001). Darüber hinaus ist eine erhöhte Anfälligkeit der Syndecan-4-defizienten Mäuse für einen septischen Schock und für eine induzierte Nephropathie beschrieben worden (Ishiguro et al., 2002; Ishiguro et al., 2001a).

1.8.1 Rolle von Syndecan-4 bei Nephropathien

Heparansulfat-Proteoglykane sind in die Organogenese, wie beispielsweise in die Nephrogenese, involviert. In der adulten Niere sind sie im Speziellen in Strukturen wie der Basalmembran und im Glomerulus vorhanden. In der adulten Niere wird Syndecan-4 in den Sammelrohren, den renalen Tubuli des medullären und papillären Kortex exprimiert. Im Glomerulus wurde die Syndecan-4 Expression ausschließlich in Podozyten beschrieben (Pyke et al., 1997). Trotz dieses weit verbreiteten Expressionsmusters hat der Ausfall des Syndecan-4 Gens keine offensichtlichen Folgen auf die Nierenentwicklung und die Aufrechterhaltung renaler Funktionen (Ishiguro et al., 2001). Interessanterweise wird in einer mesangioproliferativen Nierenerkrankung (IgA-Nephropathie) die Expression von Syndecan-4 erhöht (Yung et al., 2001). Die IgA-Nephropathie zeichnet sich durch Antikörperablagerung im Mesangium der Glomeruli aus (Barratt und Feehally, 2005). Dies führt zu einer Entzündungsreaktion in der Niere, wodurch die Filtrationsfunktion der Niere enorm eingeschränkt wird, und es zur Anhäufung von Giftstoffen im Gewebe kommt, die wiederum zur Beschädigung der Niere führen. Bei der IgA-Nephropathie korreliert die erhöhte Synthese von Syndecan-4 auf mRNA- und Proteinebene mit dem Anstieg an α -Actinin, einem Aktin-assoziierten Protein. Charakteristisch für die IgA-Nephritis auf zellulärer Ebene sind die Proliferation von Mesangialzellen, erhöhte lokale Zytokinproduktion und eine verstärkte Ablagerung von extrazellulärem Matrixmaterial. *Yung et al.* vermuten, dass hier die Funktion von Syndecan-4 in der krankheitsbedingten Aktivierung von Fibroblasten und Mesangialzellen liegt (Yung et al., 2001). In der mit der Nephropathie einhergehenden strukturellen Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist Syndecan-4 möglicherweise insofern involviert, dass es Integrin-Signale moduliert und somit Zytoskelett-Umstrukturierungen koordiniert (Couchman, 2003; Couchman und Woods, 1999; Kusano et al., 2004; Oh und Couchman, 2004; Woods und Couchman, 2000). Diese Hypothesen gründen auf verschiedenen Arbeiten, die sich mit Syndecan-4

und Protein Kinase C Signalweiterleitung beschäftigten (Wilcox-Adelman et al., 2002). Dennoch ist der konkrete Zusammenhang zwischen Syndecan-4 und Nierenerkrankungen nicht aufgeklärt.

Eine Arbeit von *Ishiguro et al.* an Syndecan-4-knockout Mäusen suggerierte, dass die Syndecan-4-Defizienz Auswirkungen bei einer induzierten obstruktiven Nephropathie hat. Die unbehandelten Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäuse zeigten weder auffällige klinische, noch makroskopische Besonderheiten. Doch nach Injektion mit einer nierentoxischen Substanz (κ -Carrageenan), die eine obstruktive Nephropathie hervorruft, stellte sich heraus, dass Syndecan-4-knockout Mäuse dadurch im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen mit einer erhöhten Sterberate reagierten (Ishiguro et al., 2001b). Die Pathologie wurde begleitet von erhöhten Harnstoffkonzentrationen im Blut und einer erhöhten Ablagerung von κ -Carrageenan in den Nieren. Gleichzeitig waren tubuläre Schäden durch die Substanz in den betroffenen Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäuse größer als in Wildtyp-Kontrolltieren. Vermutlich lagerte sich bei den Syndecan-4-defizienten Mäusen die Substanz in den Sammelrohren ab und führte sekundär zum Tod dieser Mäuse. Aufgrund dieser Daten wurde von *Ishiguro et al.* postuliert, dass Syndecan-4 eine Funktion in der Niere ausüben könnte, die auf eine bisher ungeklärte Weise, der Schädigung durch κ -Carrageenan entgegenwirkt (Ishiguro et al., 2001b).

1.9 Zielsetzung der Arbeit und methodischer Ansatz

Die Fragestellung in dieser Arbeit bezog sich auf die Rolle von Syndecan-4 bei renalen Erkrankungen. Um mögliche Auswirkungen der Syndecan-4-Defizienz bei der renalen Pathogenese herauszuarbeiten, wurden zwei Modelle, die primär verschiedene funktionelle Einheiten der Niere schädigen, an Wildtyp- und Syndecan-4-knockout Mäusen untersucht. Die unilaterale Nephrektomie wurde als ein Modell zur Analyse von glomerulären Schäden herangezogen. Parallel wurde mit Hilfe einer unilateralen urethralen Obstruktion das Krankheitsbild einer tubulointerstitiellen Fibrose analysiert. Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildete dabei neben der anatomischen, die biochemische Charakterisierung des jeweiligen renalen Phänotyps. Dazu wurde das Expressionsprofil der Syndecane in ungeschädigten, murinen Nieren von Wildtyp-Mäusen mit dem von Knockout-Tieren verglichen.

Außerdem wurde an primären dermalen Fibroblastenkulturen untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Funktion von Syndecan-4 durch andere Mitglieder der Syndecan-Familie kompensiert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Materialien und Geräte

2.1.1.1 Allgemeine Reagenzien

Sämtliche Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert an entsprechender Stelle angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und ICN Biomedicals (Eschwege) bezogen.

2.1.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

FKS	Biochrom KG, Berlin
100x Antibiotikum/Antimykotikum	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	PAA Laboratories, Cölbe
<i>Fibroblast Growth Medium</i>	Promocell, Heidelberg
MEM nicht essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories, Cölbe
DMSO	Roth, Karlsruhe
6-Well Platten	Greiner, Frickenhausen
24-Well Platten	Greiner, Frickenhausen
1 ml Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Sterile 15 ml Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim

2.1.1.3 Vektoren

pCR II/TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
-------------	-----------------------

2.1.1.4 Geräte

Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Kryostat Microm HM560	Microm, Volketswil, Schweiz
Microtom Microm HM355	Microm, Volketswil, Schweiz
Ausschwingrotor Typ A-4-44	Eppendorf, Hamburg
Festwinkelrotor Typ FA-45-30-11	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Minischüttler	IKA Works Inc., Staufen
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte	Medax, Kiel
Techne Hybridiser HB-1D	Techne, Jahnsdorf
Hybridisierungs-ofen (Isotopenlabor)	Biometra, Göttingen
PCR-Cycler Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Kern 572	Kern, Balingen-Frommern
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Mikroskop Olympus BX60	Olympus, Hamburg
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Laser-Scan-Mikroskop PCM 2000	Nikon, Dresden
CO ₂ -Inkubator Modell 311	Forma Scientific (Thermo), Karlsruhe
ELISA Reader Dynatech MRX 1.12	Dynatech Laboratories, Virginia, USA

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

Spezifität	Typ	Eingesetzte Verdünnungen	Quelle
Kollagen Typ I	polyklonal, Kaninchen	1:250 IHC	Acris, Herford
Kollagen Typ IV	polyklonal, Kaninchen	1:500 IHC	Chemicon, Hampshire, UK
Fibronektin	polyklonal, Kaninchen	1:500 IHC	Santa Cruz, Heidelberg
Fibronektin	polyklonal, Kaninchen	1:250 IHC	Invitrogen, Karlsruhe
hsc70	monoklonal, Ratte	1:10.000 WB	Abcam, Cambridge, UK
Syndecan-1	monoklonal, Ratte	1:250 IHC, 1:500 WB	BD Biosciences, Heidelberg
Syndecan-2	polyklonal, Kaninchen	1:250 IHC, 1:500 WB	Santa Cruz, Heidelberg
Syndecan-4	monoklonal, Ratte	1:250 IHC, 1:500 WB	BD Biosciences, Heidelberg
<i>α-smooth muscle</i> Aktin	polyklonal, Kaninchen	1:500 WB	Abcam, Cambridge, UK
<i>α-smooth muscle</i> Aktin	monoklonal, Maus	1:5000 WB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\alpha 1\beta 2$ -Integrin	polyklonal, Kaninchen	1:500 FACS	Johannes Eble, UKM
$\alpha 5\beta 1$ -Integrin	polyklonal, Ratte	1:500 FACS	BD Biosciences, Heidelberg
TGF- $\beta 1$	monoklonal, Maus	1:500 WB	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

- IHC: Immunhistochemie, WB: Western Blot, FACS: Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Esel Anti-Kaninchen IgG	Peroxidase-konjugiert	1:10.000 WB, 1:500 IHC	Amersham Biosciences, München
Ziege Anti-Ratte IgG	Peroxidase-konjugiert	1: 5.000 WB, 1: 250 IHC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaninchen Anti-Ziege IgG	Peroxidase-konjugiert	1:5.000 WB, 1:500 IHC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege Anti-Maus IgG	Peroxidase-konjugiert	1:5.000 WB, 1: 250 IHC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege Anti-Ratte IgG	Alexa Fluor 488-konjugiert	1:1.000 FACS	Molecular Probes über Eubio, Wien, Österreich
Ziege Anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488-konjugiert	1:1.000 FACS	Molecular Probes über Eubio, Wien, Österreich

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurde als Basismedium *Dulbecco's* modifiziertes *Eagle* Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose (PAA Laboratories) verwendet. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle nicht kommerziell erworbenen sterilen Lösungen, darunter auch 1x PBS, wurden soweit nicht anders erwähnt, mit einfach entionisiertem Wasser angesetzt und zweimal autoklaviert.

Die verwendeten Fibroblasten wurden auf 10 cm Zellkulturschalen bei 37 °C im Begasungsbrutschrank bei 92,5 % rel. Luftfeuchte und 7,5 % CO₂ kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM mit 10 % FKS, MEM nicht essentielle Aminosäuren und einer Antibiotika-Antimykotika (PAA Laboratories) Lösung verwendet.

Zum Passagieren der Zellen wurden die Fibroblasten kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) versetzt und für ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml DMEM aufgenommen und in 1:3 Verdünnungen auf frische Kulturschalen überführt.

1x PBS, pH 7,4:

150 mM	NaCl
2 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄

2.2.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen, wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst, in ein Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1200 U/min, 10 °C, 10 min). Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem Einfriermedium (20 % FCS, 10 % DMSO in DMEM) resuspendiert und je 1 ml in Kryoröhrchen überführt, zunächst für ca. 10 min auf Eis gehalten und anschließend bei -80 °C tiefgefroren und kryokonserviert.

Um Zellen zu rekultivieren, wurde eine eingefrorene Zellsuspension bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in eine mit 10 ml Nährmedium vorbereitete 10 cm Schale überführt. Zur Vermeidung einer Schädigung der Zellen durch DMSO wurde das Medium an demselben Tag erneuert.

2.2.1.2 Herstellung von primären Hautfibroblasten

Die primären Hautfibroblasten wurden aus neugeborenen Mäusen isoliert, die von Syndecan-4-heterozygoten Eltern abstammen. Unter einer Sterilbank wurden mit einer Schere Kopf, Schwanz und Extremitäten der neugeborenen Maus vom Rumpf abgetrennt, wobei der Schwanz für eine spätere Genotypisierung der Maus bei -80 °C eingefroren wurde (2.2.2.3). Die Haut der Mäuse wurde mit einer Schere am Rücken aufgeschnitten und vorsichtig, möglichst unbeschädigt, abgelöst und in eine mit PBS gefüllte Kammer einer 6-Well-Platte überführt. Zwischen der Präparation der einzelnen Mäuse wurden Scheren und Pinzetten mit Ethanol desinfiziert. Nach dem Waschen in PBS wurde die Haut

mit der Dermis nach unten vollständig in einer neuen Kammer ausgebreitet, in die vorsichtig 3 ml 25 %iges Trypsin (in PBS) von PAA Laboratories gegeben wurde, so dass die Haut auf dem Trypsin schwamm. Nach Inkubation der Häute für 16 h bei 4 °C, wurden diese aus der Trypsin-Lösung genommen und in einer neuen Zellkulturschale mit der Dermis nach unten ausgebreitet. Anschließend wurde die Epidermis mit einer Pinzette vorsichtig von der Dermis abgezogen. Die Dermis wurde mit einem Skalpell in 5 bis 6 Stücke zerteilt und in ein Röhrchen mit 2 ml *Hanks' balanced salt solution* (HBSS) von PAA Laboratories, gegeben. Zu jedem Röhrchen wurde Kollagenase Typ 4 (PAA Laboratories) bis zu einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml zugegeben und bei Raumtemperatur 30–60 min auf einem Magnetrührer inkubiert, so dass sich die Dermis-Stückchen größtenteils auflösten. Die aufgelöste Dermis eines Tieres wurde, ohne vorheriges Zählen der Zellen, in eine vorbereitete 10 cm Zellkulturschale mit 15 ml Zellkulturmedium gegeben. Die nicht abgesetzten Gewebereste sowie das Medium wurden nach 16 h abgesaugt. Die adherierten Fibroblasten wurden mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Zellkulturmedium versorgt. Nach der ersten Passage wurden die primären Fibroblasten kryokonserviert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.3 Aktivierung von Zellen mit TGF- β 1

Zur Untersuchung des Einflusses von TGF- β 1 auf die Expression der Syndecane in Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen und aus Syndecan-4-defizienten Mäusen wurden Zellen (1×10^6 für eine Induktionsdauer von 12 h bzw. $[5-1] \times 10^5$ für 24 h bzw. 48 h) in Zellkulturschalen (10 cm Schalen) ausgesät und über Nacht in DMEM mit 10 % FKS kultiviert. Zur Reduzierung im Serum enthaltener Faktoren wurden die Zellen für eine weitere Nacht mit DMEM und 0,5 % FKS versorgt. Induziert wurden die Zellen anschließend mit 5 ng/ml rekombinantem TGF- β 1 (R&D Systems) in Minimalmedium mit 0,5 % FKS. Nach unterschiedlichen Induktionszeitpunkten (12 h, 24 h, 48 h) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zentrifugation bei $5.000 \times g$ für 5 min bei 10 °C geerntet, um daraus die RNA (2.2.2.13) zu isolieren.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion und Amplifikation der Sondensequenzen

Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wurde durch die Verwendung von zwei spezifischen Oligonukleotidprimern, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der Ziel-Sequenz sind, begrenzt.

Für die PCR-Reaktionen wurde entweder die Taq-DNA-Polymerase (NEB) oder die Deep-Vent-DNA-Polymerase (NEB) eingesetzt. Die Deep-Vent-DNA-Polymerase weist im Vergleich zur Taq-DNA Polymerase eine erheblich geringere Fehlerrate auf. Zur Herstellung der Sonden wurde zunächst Gesamt-RNA aus Fibroblasten gewonnen (2.2.2.13) und diese mit Hilfe einer Reversen Transkription (2.2.2.15) in cDNA umgeschrieben und anschließend der PCR-Amplifikation unterworfen.

Zur Herstellung der Sonden für die *in situ*-Hybridisierungstechnik (2.2.4) sowie Northern Blotting (2.2.2.19) wurden folgende Primerpaare verwendet:

Primer für die Herstellung der DIG cRNA-Sonden und radioaktiven Sonden

Gen	Spezies	verwendete Primersequenzen 5' → 3'	T _M °C	Amplikon bp
Syndecan-1	Maus	synd-1 <u>seq.</u> -agt tct ttc tcc ccc cac agc c-	64	548 bp
		synd-1 <u>rev.</u> -aat aag gtc tgc tgg ggc tct gaa c-	>64,6	
Syndecan-2	Maus	synd-2 <u>seq.</u> -cat ctc ccc ttg ctg tga ctg ac-	64,2	430 bp
		synd-2 <u>rev.</u> -agc ccc cta cct tcc ctc cta c-	>65,8	
Syndecan-4	Maus	synd-4 <u>seq.</u> -ggg ggc att cta agt cca gtg a-	60,3	509 bp
		synd-4 <u>rev.</u> -tat ccc gct atc ccc cta cat tat-		
GAPDH	Maus	GAPDH <u>seq.</u> -gaa ggt cgg agt caa cgg att tgg-	65,8	982 bp
		GAPDH <u>rev.</u> -cat gtg ggc cat gag gtc cac cac-		

- seq.: *forward* Primersequenz
- rev.: *reverse* Primersequenz
- GAPDH Sonde wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Hans Kresse, Physiologische Chemie und Pathobiochemie des UKM, zur Verfügung gestellt.

Folgende Reagenzien wurden für die PCR wie folgt zusammenpipettiert:

100 – 300 ng	DNA-Template
2,5 µl	10x ThermoPol-Puffer (NEB)
0,5 µl	dNTP-Mix (je 10 mM, Eppendorf)
1 µl	<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Taq-/DeepVent-Polymerase
ad 25 µl	ddH ₂ O

Alle PCR-Reaktionen wurden im „*PCR-Cycler Mastercycler personal*“ der Firma Eppendorf durchgeführt und der Erfolg der PCR anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.5) überprüft.

2.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Zur Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde genomische DNA aus dem Schwanz mittels der Phenol-Chloroform Methode isoliert. Dabei wurde zunächst das Gewebe mit Lysispuffer und Proteinase K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich) während 16 h bei 56 °C gelöst. Der Ansatz wurde mit 1 VT Phenol versetzt, gemischt und abzentrifugiert (10 min, 12.000 x g). Die Epiphase wurde mit 1 VT Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Danach wurde die Epiphase mit 0,1 VT Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 0,8 VT Isopropanol geschüttelt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut für 30 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde kurz mit vorgekühltem 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen, zentrifugiert (5 min, 12.000 x g, 4 °C), dann luftgetrocknet und schließlich in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lysepuffer:

50 mM	Tris-HCl pH 8,0
100 mM	NaCl
50 mM	EDTA
1 % (w/v)	SDS

TE-Puffer:

10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

2.2.2.3 Genotypisierung der Mäuse

Es wurden je zwei PCR-Reaktionen mit der isolierten genomischen DNA durchgeführt, wobei mit einem Primerpaar die Amplifikation der dem Wildtyp entsprechenden Sequenz erfolgte. Bei der zweiten PCR-Reaktion dagegen wurde ein Primerpaar verwendet, das die Sequenz der Neomycin-Kassette, welche rekombinant in das Genom der transgenen Mäuse integriert wurde, erkennt. Ist nur die erste PCR-Reaktion positiv, handelt es sich bei dieser Maus um eine Wildtyp-Maus. Eine Maus ist dagegen heterozygot, wenn beide Reaktionen positiv sind. Ist nur die zweite PCR- Reaktion positiv, ist die Maus homozygot.

Für die Genotypisierungs-PCR wurde die genomische DNA (2.2.2.2) 1:10 mit TE-Puffer verdünnt und 1 µl dieser Lösung für einen 25 µl PCR-Ansatz verwendet, dessen Pipettierschema wie folgt aussah:

1 µl	DNA-Template
2,5 µl	10x ThermoPol-Puffer (NEB)
0,5 µl	dNTP-Mix (je 10 mM) (Eppendorf)
1 µl	<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Taq-/DeepVent-Polymerase
ad 25 µl	ddH ₂ O

Folgende Primersequenzen dienten zur Amplifizierung der Zielgene und damit zur Genotypisierung der Mäuse:

Primer für die Genotypisierung der Mäuse

Gen	verwendete Primersequenzen 5' → 3'	T _M °C	Amplikon bp
Syndecan-4	E4 seq. -gtg cca cta gat aac cac atc cc-	45	250 bp
	E4 rev. -ctc agt tct ttc aaa aac gtt g-	>53	
Neomycin-Kassette	Neo seq. -gat ctc ctg tca tct cac ct-	46	300 bp
	Neo rev. -atg ggt cac gac gag atc ct-	>59	

- seq.: *forward* Primersequenz
- rev.: *reverse* Primersequenz

Die PCR wurde folgendem Standard- PCR Programm unterzogen:

Primäre Denaturierung:	5 min, 94 °C	} 35 Zyklen
Denaturierung :	30 sec, 94 °C	
<i>Annealing</i> :	30 sec, 58 °C	
Elongation:	30 min, 72 °C	
finale Elongation:	2 min, 72 °C	

Der Erfolg der PCR (2.2.2.1) wurde anhand einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.5) überprüft. Das Vorhandensein von positiven Signalen des Syndecan-4 Gens bzw. der Neomycin-Kassette im Agarose-Gel wurde zur Deutung des Genotyps herangezogen.

2.2.2.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur quantitativen DNA-/RNA-Bestimmung wurden die Proben in Wasser bzw. in DEPC-H₂O 1:20 -1:200 verdünnt und in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen Wasser als Leerwert gemessen.

Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Eine reine RNA-Lösung besitzt ein OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis von 2,0, eine reine DNA-Lösung dagegen 1,8 (Sambrook et al., 2001).

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten (2.2.2.11), präparativen Extraktion von Fragmenten (2.2.2.12), Konzentrationsabschätzung eluierter Fragmente und Qualitätsüberprüfung von PCR-Reaktionen (2.2.2.1) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde ein 1-1,5 %iges Agarose-Gel in TBE hergestellt, das 33 ng/ml Ethidiumbromid (ICN) enthielt. Die DNA-Proben wurden in 5x DNA-Probenpuffer aufgenommen, auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 90-100 Volt für 20-30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Konzentrationsabschätzung und Fragmentlängenbestimmung wurde ein DNA-Größenstandard bekannter Konzentration

und Fragmentlängen mitgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels eines UV-Transilluminator-Systems bei einer Wellenlänge von 302 nm, zur Gelextraktion bei 365 nm.

1x TBE-Puffer:

100 mM	Tris-HCl, pH 8,4
90 mM	Borat
1 mM	EDTA

5x DNA-Probenpuffer:

30 % (w/v)	Glycerin
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF

Agarose-Gel:

1-1,5 % (w/v) Seakem-Agarose
in TBE-Puffer

2.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung von DNA-Sequenzen nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) wurde das *AmpliTaq FS BigDye Terminator Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt) benutzt. 250 ng des zu sequenzierenden Plasmid bzw. 10-50 ng des PCR-Produkts wurden mit 2 µl Premix und 10 pmol des entsprechenden Primers versetzt und mit H₂O auf 10µl aufgefüllt. Die Probe wurde in einem Thermocycler folgender Amplifizierungsreaktion unterzogen:

Denaturierung:	30 sec, 96 °C	} 25 Zyklen
Primer- <i>Annealing</i> :	15 sec, 56 °C	
	4 min, 60 °C	

Überschüssige *BigDye*-Nukleotide wurden anschließend mittels des *DyeEx Spin Kits* (Qiagen, Hilden) entfernt und die gereinigte markierte DNA zur Kapillarelektrophorese in einem ABI Prism310 (Applied Biosystems, Darmstadt) eingesetzt. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den erwarteten Sequenzen wurde mittels der *Software* „*blast*“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) durchgeführt.

Die für die Sequenzierung verwendeten Primer richteten sich nach dem Plasmid, in dem das zu sequenzierende DNA-Stück inseriert war.

Es wurden folgende Primer benutzt:

M13 forward	5'-gtt ttc cca gtc acg acg-3'
M13 reverse	5'-ttc aca cag gaa aca gct atg acc-3'
T7	5'-gaa ttg taa tac gac tca cta tag-3'
Sp6	5'-gat tta ggt gac act ata gaa tac-3'

2.2.2.7 Transformation kompetenter Bakterien und Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Transformation der Bakterien (Mandel und Higa, 1970) erfolgte durch eine Hitzeschockbehandlung. Dazu wurde ein Aliquot des transformationskompetenten Bakterienstammes (*E. coli* TOP 10 F', Invitrogen) auf Eis aufgetaut, mit 10 ng des zu transformierenden Plasmids vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 45 sec bei 42 °C, wonach der Transformationsansatz für 5 min auf Eis abgekühlt wurde, um dann die Bakterien nach Zugabe von 250 µl SOC Medium (Gibco BRL, Eggenstein) für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (180 Upm) zu kultivieren. Der Transformationsansatz wurde auf eine LB-Agarplatte mit einem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht, bis einzelne Kolonien sichtbar wurden, inkubiert.

Die Antibiotika wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

Ampicillin: 100 µg/ml

Kanamycin: 25 µg/ml

Tetracyclin: 12,5 µg/ml

Durch Autoklavieren wurden im LB-Medium die entsprechende Menge Agar (1,5 % [w/v]) gelöst. Nach Abkühlen auf 50 °C und unter Zugabe des jeweiligen Antibiotikums in den oben angegebenen Konzentrationen wurden unter sterilen Bedingungen 20 ml LB-Medium in 60 mm-Petrischalen (Sarstedt) gegossen. Nach Aushärten wurden diese unter Lichtausschluß bei 4 °C gelagert.

2.2.2.8 Kultivierung und Lagerung gentechnisch veränderter Bakterien

Einzelne Kolonien transformierter Bakterien wurden auf selektiven LB-Nährböden ausgestrichen und bei 4 °C gelagert. Aus den einzelnen Klonen wurden nach Animpfen von 5 ml LB-Medium unter entsprechender Antibiotikaselektion Bakterienkulturen gewonnen, die zur Amplifizierung und Isolierung von Plasmid-DNA dienten.

Zur präparativen Isolierung ausgewählter Plasmide wurden größere Kulturvolumina durch Animpfen des Nährmediums mit einer frischen Übernachtskultur in einem Verhältnis von 2 % (v/v) angezogen. Zur Archivierung von Klonen wurden 500 µl Vorkultur für 2-3 h bei 37 °C und bei 180 Upm angezogen, anschließend mit Glycerollösung vermischt (Endkonzentration 15 % [v/v]) und in einem Einfrierröhrchen (Cryo-Tube, Nunc, Wiesbaden) bei -80 °C gelagert.

LB-Medium: 10 mg LB Broth Base (Gibco BRL) ad 500 ml mit H₂O, steril.

2.2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von DNA aus Plasmiden wurde das *QIAPrep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet, die auf der selektiven Bindung von DNA an Silika-Gel Membranen unter Verwendung eines speziellen Hochsalzpuffers beruht. Die Aufreinigung der DNA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Elution der gereinigten DNA mit 30 µl DEPC-H₂O erfolgte. Die Menge der isolierten Plasmid-DNA aus 5 ml Kulturen lag bei 20 µg. Größere Mengen von bis zu 500 µg Plasmid-DNA wurden mit dem *HiSpeed Plasmid Midi Kit* (Roche) aus einem Kulturvolumen von 50 ml gewonnen.

2.2.2.10 Konzentrierung von Nukleinsäuren

Die aufzukonzentrierende Lösung von DNA bzw. RNA wurde mit 0,1 VT 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 VT Ethanol (reinst) bei -20 °C für 16 h gefällt. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm für 20 min unter Kühlung wurde das Pellet mit 70 %igem (v/v) kaltem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA/RNA erneut für 5 min zentrifugiert, dann luftgetrocknet und schließlich in dem gewünschten Volumen in einem geeigneten Puffer resuspendiert.

2.2.2.11 Restriktionsverdau von DNA

Zur Überprüfung des Transformationserfolges (2.2.2.7), zur Isolierung von DNA-Fragmenten (2.2.2.12) und zur anschließenden Ligation in Plasmide wurden Restriktionsenzyme (Typ II) eingesetzt, die bestimmte palindrome Sequenzen der DNA erkennen und spalten. Für einen qualitativen Nachweis des Restriktionsverdaus wurden bis zu 100-600 ng Plasmid-DNA nach den vom Anbieter empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen mit dem jeweiligen Enzym (2-5 U) für 1-2 h inkubiert. In präparativen Ansätzen wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Ansatz von maximal 100 µl verdaut. Die eingesetzte Enzymmenge betrug 5 U pro µg DNA und die Inkubationszeit wurde auf 4-16 h verlängert. Die erhaltenen Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.5) nach ihrer Größe aufgetrennt und durch Vergleich mit einem externen Größenstandard identifiziert.

2.2.2.12 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente von bis zu 10 kb wurden in einem präparativen Maßstab mit dem *Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

Nukleotide und Enzyme wurden mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben von DNA-Fragmenten abgetrennt.

2.2.2.13 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Gesamt-RNA wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte abweichend davon mit 30 µl DEPC-Wasser.

2.2.2.14 Isolierung von Gesamt-RNA aus Nieren mit TRIzol

Präpariertes Nierengewebe wurde mit 1 ml TRIzol (Gibco BRL, Eggenstein) pro 50-100 mg mechanisch mit Hilfe eines Ultra-Turrax für 3x 30 sec auf Eis homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C). Zur Phasenpräparation wurden 0,2 VT Chloroform hinzupipettiert, 12 sec gevortext und 3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 15 min, 4 °C) wurde die Epiphase

abgenommen, erneut 0,2 VT Chloroform hinzupipettiert und zentrifugiert (12.000 x g, 15 min, 4 °C). Nach Trennung der Epiphase wurde mit 0,5 VT Isopropanol die RNA für 10 min bei RT gefällt. Das nach Zentrifugation (12.000 x g, 15 min, 4 °C) erhaltenen RNA-Pellet wurde mit 1 VT 75%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (7.500 x g, 5 min, 4 °C) und kurz an der Luft getrocknet und in DEPC-H₂O aufgenommen.

2.2.2.15 Reverse Transkription

Für eine nachfolgende PCR wurde Gesamt-RNA (2.2.2.13 und 2.2.2.14) durch Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA Polymerase, in eine komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wurde in einer nachfolgenden PCR zur Doppelstrang-DNA ergänzt. Der im *OneStep RT-PCR* (Qiagen) enthaltene Enzymmix aus einer Reversen Transkriptase und *HotStarTaq* DNA Polymerase ermöglicht Reverse Transkription und PCR Amplifikation in einem Schritt. Während der Reversen Transkription ist die Polymerase inaktiv und beeinträchtigt die Reaktion nicht. Nach der Reaktion wurden die Reaktionsansätze erhitzt (95 °C), so dass die *HotStarTaq* DNA Polymerase aktiviert und die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Diese Vorgehensweise verhinderte die Extension unspezifisch gebundener Primer sowie die Bindung von Primer-Dimeren während des ersten Zyklus, so dass eine hochspezifische und reproduzierbare nachfolgende PCR gewährleistet war. Die Durchführung der *One Step RT-PCR* erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2.16 Real time PCR

Die *Real time* PCR ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung von RNA. Zur Untersuchung der Syndecane in Nieren auf RNA-Ebene wurde isolierte Gesamt-RNA (2.2.2.13) mittels Reverser Transkription (2.2.2.15) in cDNA umgeschrieben. Für die PCR-Reaktion wurde 0,5 µl cDNA mit jeweils 1 µl 10 pmol Primerlösung (*forward/reverse*), 5,4 µl *2,5x RealMasterMix/20x SYBR Solution* (Eppendorf) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 12 µl gemischt. *SYBR Solution* ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich interkalierend in doppelsträngige DNA einlagert. Die Reagenzien wurden in eine 96-*Well* Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Analyse wurde die Platte in das ABI PRISM 7700 Detektionssystem überführt, welches über einen eingebauten Thermocycler verfügt.

Die PCR wurde für 2 min bei 95 °C initialisiert, danach folgte eine Denaturierung von 20 sec bei 95 °C, ein Annealing von 30 sec bei 58 °C und Elongation in einem Schritt für 45 sec bei 68 °C. Ausgenommen des Initialisierungsschrittes wurden vorhergehende Schritte in 40 Zyklen wiederholt. Es wurden für jedes Gen Doppelansätze und eine Wasserkontrolle mitgeführt. Für die Quantifizierung wurde die vergleichende CT (*cycle threshold*)-Methode ($\Delta\Delta$ CT) benutzt. CT bezeichnet die Zyklenzahl, bei welcher die Fluoreszenzintensität einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet. Bei der $\Delta\Delta$ CT-Methode (Livak und Schmittgen, 2001) wurde neben der Zielsequenz auch eine endogene Kontrolle mitamplifiziert (*housekeeping* Gen), die die Menge an Ziel-RNA ins Verhältnis zu der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA setzt.

Folgende Primersequenzen wurden in der Real time PCR verwendet:

Syndecan-1

MSDC1rt.seq.: 5'-tgt cga gga tgg aac tgc caa tca-3'

MSDC1rt rev.: 5'-aat gac acc tcc cag cac ttc ctt-3'

Syndecan-2

MSDC2rt seq.: 5'-ccc aaa gtg gaa acc atg acg ttg-3'

MSDC2rt rev.: 5'-ggc tgc tac aac ttc tgt ccg tt-3'

Syndecan-4

MSDC4rt seq.: 5'-ccc aag gaa ctg gaa gag aat gag gt-3'

MSDC4rt rev.: 5'-tac acc agc agc agg atc agg aaa-3'

Housekeeping Gen HPRT

HPRT1. seq.: 5'-tca ggc agt ata atc caa aga tgg-3'

HRPT1. rev.: 5'-agt ctg gct tat atc caa cac ttc-3'

2.2.2.17 TOPO TA Klonierung

Die Methode diente der effizienten Klonierung von PCR-Produkten (2.2.2.1), die mit Hilfe der Taq-Polymerase erzeugt wurden. Durch eine terminale Transferase-Aktivität von Taq-Polymerasen wurden einzelne Desoxyadenylat-Reste an das 3'-Ende von PCR-Produkten angehängt. Die pCR II-Klonierungsvektoren verfügen analog über überhängende Desoxythymiylatreste.

Bei der Ligation des aufgereinigten PCR-Produkts mit dem pCR II-TOPO-Vektor, katalysiert eine an den Vektor gebundene DNA-Topoisomerase I die Ausbildung kovalenter Bindungen, so dass eine Ligationsdauer von 5 min bei Raumtemperatur ausreichend ist.

2.2.2.18 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität aufgereinigter RNA (RNA-Testgel) als auch zur Durchführung von Northern Blots (2.2.2.19) wurde die RNA in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt. Zur Überprüfung der RNA waren 5 µg RNA ausreichend, wobei für einen Northern Blot 10-30 µg aufgetragen wurden. Das Volumen wurde durch Vakuumverdunstung mittels einer *SpeedVac* (Thermo-Savant, Erlangen) auf ein Endvolumen von 5 µl eingeeengt. Um mögliche störende Sekundärstrukturen zu lösen, wurde die RNA mit Denaturierungspuffer versetzt, für 10 min bei 65 °C und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. RNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 3 µl RNA-Probenpuffer und 1 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) versetzt.

Ein externer RNA Größenstandard (Roche, Mannheim) wurde ebenfalls mit Probenpuffer und Ethidiumbromid versetzt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung zur Qualitätsüberprüfung erfolgte in einem 6 cm-Gel bei 100 Volt für 30 min–1 h oder in einem 15 cm-Gel für 16 h bei 35 Volt für Northern Blot jeweils mit einem denaturierendem Laufpuffer bei 4 °C.

10x MOPS, pH 7:

200 mM	MOPS
50 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA

RNA-Denaturierungspuffer:

5 % (v/v)	Formamid, entionisiert
14,6 mM	Formaldehyd
1x	MOPS
in DEPC-H ₂ O	

RNA-Probenpuffer (6x):

500 µl	Formaldehyd, 37 % (w/v)
400 µl	Glycerol, 87 % (v/v)
50 µl	Bromphenolblau, 1 % (w/v)
50 µl	Xylencyanolblau 1% (w/v)

Denaturierender Laufpuffer:

1x	MOPS-Puffer
200 mM	Formaldehyd

RNA-Agarose-Gel:

1 % (w/v)	Seakem Agarose
	mit DEPC-H ₂ O
1x	MOPS-Puffer
2,2 M	Formaldehyd

2.2.2.19 Northern Blot

Zur Detektion von spezifischen Transkripten aus isolierter RNA (2.2.2.13) wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden gleiche RNA-Mengen auf einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihrer Größe separiert (2.2.2.18). Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences, Freiburg) geschah durch einen inversen *Wet-Blot* nach Standardvorschrift für 16 h bei 4 °C (Sambrook et al., 2001). Zunächst aber wurde das Agarose-Gel mittels eines UV-Transilluminators dokumentiert. Zur Entfernung von Ethidiumbromid und Formaldehyd wurde das Gel mit 10x SSC (3x 20 min) gewaschen.

In dem oben genannten inversen *Wet-Blot* System wurde die RNA durch Kapillarkräfte des nach oben gesogenen Transferpuffers (10x SSC) auf die Membran transportiert. Durch UV-Quervernetzung (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA) wurde die RNA auf der Membran fixiert und konnte für längere Zeit bis zur Hybridisierung unter RNase-freien Bedingungen bei -80 °C gelagert werden.

20x SSC, pH 7,6:

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat
in DEPC-H ₂ O	

2.2.3 Hybridisierungstechniken

2.2.3.1 Radioaktive Markierung einer ssDNA Sonde

Die Sonden wurden durch Amplifizierung einer gewünschten DNA-Sequenz (2.2.2.1) und ihrer Klonierung in den pCR II TOPO-Vektor hergestellt (2.2.2.17). Nach erfolgreicher Klonierung wurde die DNA für die Sonden sequenziert (2.2.2.6). Die sequenzverifizierte Sonden-DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus dem Vektor herausgeschnitten (2.2.2.11), per Gelextraktion isoliert (2.2.2.12) und mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.5) quantifiziert.

Zunächst wurden 30 ng der DNA in einem Endvolumen von 30 µl (mit DEPC-H₂O) im Heizblock bei 94 °C denaturiert und durch Abschrecken in Eis wurde eine Renaturierung verhindert. Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte mit dem *Prime-a-Gene Labeling Kit* (Promega, Heidelberg). Dazu wurde die einzelsträngig vorliegende DNA mit 20 µM dNTP Mix (ohne dCTP), 100 U/ml Klenow-Fragment, 400 µg/ml BSA und 50 µCi ³²P-dCTP in 1x *Labelling* Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei lagerten sich Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die einzelsträngige DNA an, die von dem Klenow-Fragment unter Einbau von ³²P-dCTP elongiert wurden. Die markierte DNA wurde von nicht inkorporierten ³²P-dCTP mittels des *PCR Purification Kits* (Qiagen) nach der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die Methode basiert auf der selektiven Bindung hochmolekularer Nukleinsäuren an ein Silikagel unter Hochsalzbedingungen. Durch Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer wurden die nicht eingebauten Radionukleotide entfernt und die gereinigte DNA mit zweimal 50 µl Elutionspuffer eluiert. Davon wurden 2 µl zur Messung der spezifischen Aktivität in einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckmann, München) abgenommen. Die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Sonde sollte mindestens 1x 10⁸ cpm/µg betragen, um sie für die Hybridisierung von Northern Blots (2.2.3.2) zu nutzen.

2.2.3.2 Hybridisierung und Detektion von Northern Blots

Die zuvor geblottete Nylonmembran wurde zunächst mit 5 ml vortemperierter *QuickHyb* Lösung (Stratagene) in einem Hybridisierungsröhrchen (Biometra) bei der sondenspezifischen Hybridisierungstemperatur mindestens 1 h prähybridisiert.

Für die Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde zusammen mit 50 µl *sheared salmon sperm* DNA (20 mg/ml) als Blockierungsreagenz für 10 min bei 95 °C denaturiert, für 2 min auf Eis abgeschreckt, in die Prähybridisierungslösung pipettiert und mit der Membran für 16 h bei der ausgewählten Hybridisierungstemperatur unter Rotation hybridisiert. Durch sukzessives Waschen bei zunehmender Stringenz mit 2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (30 min, 2-3 x 10 min), mit 1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (2x 10 min), 0,1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (3x 5 min) wurden unspezifisch gebundene Sonden-Moleküle entfernt.

Zur Detektion ihrer β -Strahlung wurde die noch feuchte Membran in eine Folie eingeschweißt und für 2-16 h auf einem *Phosphoimager-Screen* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

Die densitometrische Auswertung der *Phosphoimager-Screens* erfolgte mit der Software *ImageQuant* Version 5.0 (Amersham Biosciences).

2.2.3.3 *Stripping* von Northern Blots

Zur Entfernung von Sonden wurde die bereits hybridisierte Northern Blotmembran (2.2.2.19) bei 80 °C für 10 min in einem Wasserbad mit vortemperiertem *Stripping-Puffer* geschüttelt.

Stripping-Puffer:

0,1 % (w/v)	SDS
10 mM	Tris
1 mM	EDTA

Anschließend wurde die Nylonmembran bei Raumtemperatur mehrmals mit 2x SSC gewaschen. Die Effektivität des *Strippens* wurde durch Auflegen eines *Screens* überprüft.

2.2.4 In situ-Hybridisierungen

2.2.4.1 Digoxigenin-Markierung von cRNA-Sonden

Die zu transkribierende DNA-Sequenz wurde in den pCR II-TOPO-Vektor kloniert (2.2.2.17), welcher den T7- und Sp6-Promotor enthält. Zur Herstellung von *run off* Transkripten wurde der Vektor mit einem Restriktionsenzym, das 5'-überhängende oder glatte Enden erzeugt und keine Schnittstellen im *Insert* (klonierte DNA-Sequenz) erkennt, linearisiert (2.2.2.11). Die Linearisierung wurde in einem 50 µl Ansatz mit 10 µg Plasmid-DNA in den optimalen Pufferbedingungen der Restriktionsenzyme für 16 h bei 37 °C durchgeführt. Nach vollständiger Spaltung wurde der Ansatz mit Phenol-Chloroform gefällt. Zunächst wurde der Ansatz mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt und dann mit 300 µl Phenol-Chloroform (1:1 Mischung) gemischt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 VT Chloroform versetzt, erneut gemischt und zentrifugiert, um dann die obere wässrige Phase in ein neues Reagiergefäß zu überführen. Die in dieser Phase angesammelte DNA wurde dann, wie unter 2.2.2.10 beschrieben, einer Fällung unterzogen, wobei das Pellet in 15 µl DEPC-H₂O aufgenommen und die Konzentration der gefällten DNA photometrisch (2.2.2.4) ermittelt wurde. Die Markierung mit Digoxigenin wurde in einem *in vitro* Transkriptionsansatz, hierzu wurde das DIG cRNA *Labelling Kit* (Roche) verwendet, durchgeführt.

Markierungsreaktion:

1 µg	der linearisierten Plasmid-DNA ad 20 µl mit DEPC-H ₂ O
2 µl	10 x Transkriptionspuffer
2 µl	DIG RNA <i>Labelling Mix</i>
0,2 µl	RNase Inhibitor
2 µl	Sp6- bzw. T7-RNA Polymerase (10 U/µl)

Nach vorsichtigem Mischen auf Eis fand die Reaktion für 2 h unter Verwendung der T7-Polymerase bei 37 °C oder der Sp6-Polymerase bei 40 °C statt.

Um Reste von DNA zu entfernen, wurde der Ansatz mit DNase I (2 U) für 30 min bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt. Danach wurde die DIG-markierte cRNA mit 2,5 µl 4 M LiCl (pH 5,2) und

75 µl Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt und anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 20 min). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet vorsichtig mit eisgekühltem 70 % EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 5 min).

Nach Lufttrocknung des Pellets für 3 min bei Raumtemperatur wurde dieses in 100 µl DEPC-H₂O und 1 µl RNase-Inhibitor für 30 min bei 37 °C gelöst, in Eppendorf-Reagiergefäße aliquotiert und für in situ-Hybridisierungen auf Gewebeschnitten (2.2.4.2) verwendet. Die nicht unmittelbar gebrauchten DIG cRNA-Sonden wurden bei -80 °C gelagert. Zur Qualitätsüberprüfung der DIG cRNA-Sonden wurden 4 µl Sonde mit 4 µl DEPC-H₂O und 2 µl RNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 72 °C aufgekocht und elektrophoretisch auf einem Agarosegel (2.2.2.5) aufgetrennt.

2.2.4.2 In situ-Hybridisierung mit DIG-markierten cRNA-Sonden

Die Technik der in situ-Hybridisierung (ISH) erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) an Gewebeschnitten und hat, im Unterschied etwa zur PCR-Technik, den Vorteil, dass eine positive Reaktion in Bezug zur Gewebemorphologie gesetzt werden kann. Alle Prähybridsierungsschritte wurden in gebackenen Glaswaren, mit RNase-freien Plastikwaren und Chemikalien, unter strikten staub- und RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Die 5 µm dicken Paraffinschnitte wurden 30 min bei 50 °C erwärmt, um das Paraffin anschließend bei Raumtemperatur durch mehrmaliges Wechseln von Rotihistol (3x 10 min) zu lösen. Danach wurden die Schnitte mit einer absteigenden Ethanolreihe (2x 100 %, 1x 90 %, 1x 80 %, 1x 70 %, 2x 50 %) für jeweils 5 min rehydriert und anschließend in DEPC-H₂O (2x 5 min) geschüttelt. Nach einer Postfixierung der Schnitte bei 4 °C mit frisch angesetztem 4 %igem Formaldehyd für 20 min wurden die Schnitte mehrmals mit TBS gewaschen.

Die Denaturierung der Proteine wurde durch Inkubation mit 0,2 N HCl (10 min, RT) erreicht. Danach folgten Waschschrte mit TBS (3x 5 min). Um unspezifische Bindungen und den Hintergrund zu reduzieren, wurden die Schnitte in frisch angesetztem 0,5 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8, Sigma-Aldrich) für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer inkubiert und anschließend mit TBS gewaschen. Das Gewebe wurde mit Proteinase K (Roche) bei 37 °C für 20 min (Endkonzentration: 10 µg/ml in TBS) verdaut, um die Penetration der Sonden in das Gewebe zu erhöhen.

Anschließend wurden die Schnitte mehrmals kurz in TBS gewaschen, mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, kurz in Chloroform getaucht und dann luftgetrocknet. Vor der Hybridisierungsreaktion mit den Sonden wurden die Schnitte mit einem Dakopen (DakoCytomation) eingekreist, um mit minimalen Volumina zu arbeiten. Für die Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung 3 min bei 85 °C vorgewärmt, in der dann die DIG cRNA-Sonden (20-50 ng/ml) verdünnt wurden. Die Sonden wurden bei 85 °C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe der Sonden wurden die Schnitte 2-3 min auf eine 95 °C heiße Heizplatte platziert, um die Nukleinsäuren des Gewebes zu denaturieren. Danach wurden die Schnitte zusammen mit den Sonden in einer feuchten Kammer bei einer geeigneten Temperatur (46 °C für Synd-2 *sense/antisense*-Sonde, Synd-4 *sense/antisense*-Sonde bis 50 °C und Synd-1 *sense/antisense*-Sonde bis 52 °C) 16 h hybridisiert. Die darauf folgenden Posthybridisierungsschritte bereiteten das Gewebe auf die Detektion der DIG-cRNA vor. Zunächst wurden die Schnitte mit einer vorgewärmten (55 °C) 2x SSC-Lösung unter Wippen von restlicher Hybridisierungslösung gereinigt, daraufhin wurden sie für 20 min mit einer 50 %igen Formamid/ 2x SSC bei 55 °C gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte für 15 min mit 1x SSC und anschließend zwei fünfminütige mit TBS bei Raumtemperatur. Nach Äquilibrieren der Schnitte in Puffer 1 (5 min, RT) wurden sie für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer blockiert. Die Inkubation mit dem Anti DIG-Alkalische Phosphatase Antikörper (Roche, Mannheim) in Blockierlösung erfolgte für 1 h bei 37 °C oder 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte in TBS gewaschen und mit Puffer 3 äquilibriert (10 min, RT), um danach die Chromogene Nitroblau Tetrazolium (NBT, Roche) und Bromochloroindolyl-Phosphat (BCIP, Roche), die in P3 verdünnt wurden, auf die Schnitte zu geben. Gestoppt wurde die Farbreaktion, die unter Lichtausschluß in einer feuchten Kammer durchgeführt wurde, innerhalb von zwei Stunden mit TE-Puffer. Nach Dehydrierung der Schnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 2x 100 %) wurden sie mit Entellan (Merck) bedeckt, luftgetrocknet und mit dem *Soft Imaging Systems Analysis Programm* am Olympus BX60 Mikroskop dokumentiert.

TEA-Puffer, pH 8:

6.65 ml Triethanolamin

450 ml DEPC- H₂O

 ad 500 ml mit DEPC-H₂O
4% PFA, pH 7,2:

4 g PFA

80 ml DEPC-H₂O

unter Rühren bei 70 °C erwärmen,
mit 2 N NaOH zum Lösen bringen,
abkühlen lassen,

10 ml 10x PBSad 100 ml mit DEPC-H₂O**Hybridisierungslösung:**

2x SSC

50 % Formamid, deionisiert

10 mM Dithiothreitol

0,5 mg/ml Hefe tRNA

 1 mg/ml *salmon sperm* DNA
(denaturiert für 10 min bei 95 °C)
Puffer 1 (P1):

100 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

pH 7,5

Puffer 3 (P3):

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

pH 9,5

Blockierlösung0,5 % *blocking reagent* (Roche) in P1

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

Alle verwendeten Lösungen wurden, falls nicht anderweitig angegeben, mit einfach deionisiertem Wasser angesetzt. Zum Schutz der Proteine vor Proteasen wurden Proteaseinhibitoren, wenn nicht anders angegeben, von Roche (*Complete Mix, Mini Tablets*) zugesetzt.

2.2.5.1 Extraktion von Gesamtproteinen aus Geweben

Zur Extraktion von Proteinen aus murinem Nierengewebe wurde entweder frisch herauspräparierte Niere oder schockgefrorenenes Nierenmaterial, das bei -80 °C gelagert wurde, in 1 ml 1x TBS, das Proteaseinhibitoren enthielt, mit einem Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Stufe 5) für 3x 30 s auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat auf einem Drehrad extrahiert (ÜN, 4 °C) und dann bei 14.000 rpm für 15 min, 4 °C zentrifugiert. Von dem Überstand wurde der Proteingehalt nach der Methode von Bradford (2.2.5.2) bestimmt. Eine weitere Extraktionsmethode, im Speziellen von extrazellulären Matrixmolekülen, war das Mörsern von gefrorenem Gewebe in Gegenwart von flüssigem Stickstoff. Das gemörserte Gewebe wurde in einem so genannten Matrix-Extraktionspuffer aufgenommen und von Zellbeständen durch Zentrifugation (14.000 rpm für 15 min, 4 °C) befreit. Der Überstand wurde für eine Konzentrationsbestimmung (2.2.5.2) benutzt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Matrix-Extraktionspuffer, pH 7,4:

0,2 %	Nonidet P40	1 mM	Na ₃ VO ₄
150 mM	NaCl	1 mM	Na ₂ MoO ₄
3 mM	KCl	1 µg/ml	Leupeptin
6 mM	Na ₂ HPO ₄	1 µg/ml	Pepstatin A
0,5 mM	MgCl ₂	1 mM	AEBSF
1 mM	CaCl ₂		
50 mM	NaF		

2.2.5.2 Quantitative Proteinbestimmung mit BCA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode durchgeführt. Unter alkalischen Bedingungen können Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Bei Zusatz von BCA (Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure-Dinatriumsalz) wird Cu^+ komplexiert. Peptidbindungen sowie Aminosäure-Reste wie Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan sind in der Lage, Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren und ermöglichen somit die Farbreaktion mit BCA. Der entstehende Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann entsprechend photometrisch zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen herangezogen werden. Jeweils 5-10 μl der zu untersuchenden Proteinprobe und der als Standard dienenden BSA-Lösungen bekannter Konzentration (25-300 $\mu\text{g/ml}$) wurden mit H_2O ad 100 μl aufgefüllt, mit 1 ml BCA-Reagenz (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion der Proben und der Leewerte (H_2O und Probenpuffer) wurde in einem ELISA-Reader (Modell MRX, Dynatech Laboratories) bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Aus den Extinktionswerten einer BSA-Standard-Verdünnungsreihe wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, und mit Hilfe dieser wurde die Konzentration der Proben ermittelt.

BCA-Reagenz:

980 μl	BCA-Stammlösung
20 μl	CuSO_4 -Lösung (4 %)

2.2.5.3 Methanol/ Chloroform Fällung

Zur Proteinfällung wurde die Lösung mit 1 VT Methanol und 2/5 VT Chloroform vermischt und für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation sammelten sich die denaturierten Proteine in der Interphase an. Nach Entfernen der methanolischen Epiphase wurde erneut 1 VT Methanol hinzugegeben und zentrifugiert. Das nach Zentrifugation erhaltene Präzipitat wurde nach kurzer Trocknung entweder in einem geeigneten Puffer gelöst oder mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.5.6).

2.2.5.4 TCA-Fällung

Die zu fällende Proteinlösung wurde mit 15,5 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) und 0,14 % Triton-X-100 (w/v) versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Das nach Zentrifugation (20 min, 14.0000 rpm, 4 °C) erhaltene Präzipitat wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen, erneut unter identischen Bedingungen zentrifugiert und nach kurzer Trocknung in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

2.2.5.5 Dialyse von Proteinen

Zum Pufferaustausch wurden Proteinlösungen routinemäßig in Membranschläuchen (Serva) mit einer Ausschlußgröße von 12-14 kDa und einem Durchmesser von 1 cm dialysiert. Die Dialyse wurde unter Rühren bei 4 °C durchgeführt und erfolgte dreimal gegen ein Volumen, das mindestens dem 50-100 fachen des Probenvolumens entsprach.

2.2.5.6 SDS-PAGE

Zur Größenseparation von Proteingemischen wurde die von Laemmli eingeführte diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Die Proteinproben wurden entweder über ein diskontinuierliches Gradientengel mit einem Acrylamidgehalt von 5-15 % oder einem einfachen Gel mit einem Acrylamidgehalt von 12,5 % bzw. 15 % aufgetrennt.

Die SDS-PAGE wurde in einem Mini-PROTEAN 3 System der Firma Bio-Rad nach Angaben des Herstellers aufgebaut und durchgeführt. Alle Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min aufgeköcht und leicht anzentrifugiert. Die Auftrennung nach ihrer Größe erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V und 15-30 mA bei Raumtemperatur. Als Molekulargewichtstandards wurden der *Prestained Precision Protein Standard* oder der *Prestained Broad Range Standard* (Bio-Rad) eingesetzt. Nach Auftrennung wurden die Proteine entweder im Gel direkt durch Coomassie-Blau angefärbt oder zur Immundetektion auf eine Blotmembran transferiert.

Acrylamid-Stammlösung:

40 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Applichem)

Sammelgel	5 %
ddH ₂ O	6 ml
40 % Acrylamid-Lösung	1,25 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	10 µl

Trenngel	5 %	10 %	12,5 %	15 %
ddH ₂ O	6 ml	5 ml	4,4 ml	3,4 ml
40 % Acrylamid-Lösung	1,25 ml	2,4 ml	3 ml	3,75 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Probenpuffer (6x):

Tris-HCl, pH 6,8	0,2 M
Glycerol	50 %
SDS	4 %
DTT	0,2 M
Bromphenolblau	0,04 %

Elektrophorese-Puffer (1x):

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

2.2.5.7 Coomassie-Blau Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Fixierung der Proteine im Gel für 30 min bei Raumtemperatur durch die Entfärbelösung 1. Danach wurde das Gel mit der Coomassie-Färbelösung für 30 min gefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel in der Entfärbelösung 1 für 30 min und anschließend in der Entfärbelösung 2 für 1 h geschwenkt. Nach Waschen in der Entwässerungslösung wurde das Gel an der Luft zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet.

Coomassie-Färbelösung:

0,1 % (w/v)	Brillantblau R-250
10 % (v/v)	Essigsäure

Entfärbelösung 1:

50 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure
25 % (v/v)	Isopropanol

Entfärbelösung 2:

10 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

Entwässerungslösung:

25 % (v/v)	Ethanol
2 % (v/v)	Glycerol

2.2.5.8 Proteintransfer auf Blotmembranen

Zum Transfer gelelektrophoretisch getrennter Proteingemische auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Nitrocellulose-Membran der Firma Millipore wurde ein Tankblotverfahren eingesetzt. Dabei wurde das Gel in einem *Sandwich*-Aufbau zwischen zwei Schwämmen und zwei Whatman-Papieren auf die Membran gepresst. Der Transfer der Proteine erfolgte mit einem Mini Trans-Blot System der Firma Bio-Rad unter Kühlung mit einem integrierten Eisblock nach Angaben des Herstellers für 2-3 h bei 70 Volt und 35 mA.

Transferpuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin

1x TBS:

25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl

2.2.5.9 Western-(Immuno-) Blot

Nach dem Proteintransfer (2.2.5.8) wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz), 1 % (w/v) BSA (PAA Laboratories) in TBS/T bei Raumtemperatur für 1-2 h zur Absättigung unspezifischer

Proteinbindungsstellen blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (2.1.2.1) in verdünnter Blockierlösung (2,5 % [w/v] Magermilchpulver, 0,5 % [w/v] BSA in TBS/T) für 4 h bei Raumtemperatur oder für 16 h bei 4°C inkubiert.

Nach mehrmaligem Waschen mit TBS/T (4x 10 min) zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper folgte die Inkubation mit einem geeigneten Peroxidasegekoppelten Sekundäantikörper (2.1.2.2) in verdünnter Blockierlösung (1 h, RT). Das Waschen der Membran erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Peroxidasegekoppelten Sekundäantikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen damit eine Chemilumineszenz aus. Zur Detektion wurde die Membran für 5 min bei Raumtemperatur mit ECL (Amersham Biosciences) bedeckt. Die in der Nachweisreaktion erzeugte Chemilumineszenz wurde mittels eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham Biosciences oder CL Exposure Film, Pierce) und anschließender photographischer Entwicklung (Curix 60, Agfa) detektiert.

TBS/T:

TBS + 0,1 % (v/v) Tween-20

2.2.5.10 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)

Die gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugate wurden durch *Stripping* der Membran entfernt und die Membran konnte zur erneuten Detektion mit anderen Antikörpern oder für eine Amidoschwarzfärbung genutzt werden. Dies geschah durch 20 bis 30 minütiges Schütteln der Blotmembran mit einem *Strip*-Puffer (Restore Western Blot Stripping Buffer, Pierce) bei 37 °C und anschließendem Waschen (3x 5 min) mit TBS.

2.2.5.11 Amidoschwarzfärbung von Blotmembranen

Nach *Strippen* (2.2.5.10) der Blotmembran wurde diese zur Ladungskontrolle mit Amidoschwarz gefärbt. Die Färbung mit Amidoschwarz wurde anstelle eines β -Tubulin oder β -Aktin Abgleichs durchgeführt, wenn die zuvor detektierten Banden auf gleicher Höhe wie die Aktin- bzw. Tubulin-Banden liefen. Dazu wurde die Membran für 1-5 min mit der Amidoschwarzlösung bei RT gefärbt und anschließend entfärbt, bis alle Proteinbanden sichtbar wurden und der Hintergrund reduziert war.

Amidoschwarzlösung:

0,03 %	Amidoschwarz
50 %	Methanol
5 %	Essigsäure

Entfärbelösung:

50 %	Methanol
1 %	Essigsäure

2.2.5.12 Zymographie

Die Überprüfung der proteolytischen Aktivität in den renalen Proteinextrakten von Mäusen, die einem Obstruktions-Nierenkrankungsmodell (UUO) oder einer Nephrektomie (UNX) unterzogen wurden, erfolgte durch Gelatine-Zymographie.

Zur Trenngellösung eines Gradientengels (4,5 %-15 % Acryl/Bisacrylamid, 4,5 % Sammelgel) wurden 0,1 % Gelatine zu gegeben. Die Proteinlösung wurde mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 2 x 30 min in 2,5 % Triton X-100 gewaschen, 4 x 5 min in H₂O gespült und 16 h bei 37 °C in 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8 inkubiert, anschließend wurde es mit Coomassie (2.2.5.7) gefärbt.

Farblose Banden im Coomassie gefärbten Gel zeigten Gelatine-proteolytische Aktivität an. Die Durchführung der Zymographien erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Rita Dreier aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peter Bruckner, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des UKM.

2.2.5.13 Heparitinase I-und III-Verdau

Mit 50 mU Heparitinase I (Seikagaku Cooperation, Tokyo, Japan) und Heparitinase III (Sigma-Aldrich) wurden durch zweistündige Inkubation bei 37 °C Heparansulfatketten des Proteoglykans abgebaut.

Heparitinase Puffer:

100 mM	Natriumacetat
10 mM	Calciumacetat
pH 8,0	

2.2.6 Immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten der Niere

Immunhistochemische Färbungen wurden zur Detektion von Proteinen auf lichtmikroskopischer Ebene an Nierenschnitten von Wildtyp- und Syndecan-4-knockout-Mäusen angewendet.

Präpariertes murines Gewebe aus der Niere wurde mit 4 %igem Formaldehyd ÜN bei 4 °C fixiert. Anschließend konnte das fixierte Gewebe mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils für 2-4 h in 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 %) entwässert werden. Darauf folgte schließlich eine Inkubation in Isopropanol (reinst) für 6 h bei 4 °C. Das nun entwässerte Gewebe konnte zunächst in weiches Paraffin (Applichem, Darmstadt) mit einer Schmelztemperatur bei 56 °C (ÜN), überführt und daraufhin in hartem Paraffin (Applichem), mit einer Schmelztemperatur bei 60 °C, inkubiert (ÜN) werden. Anschließend wurden die Gewebestücke in einem Paraffinblock eingebettet (Rotiplast, Roth) und mit einem Microtom (HM 355, Microm, Walldorf) wurden von diesen 5 µm dünne Schnitte angefertigt.

Die Entparaffinierung dieser Gewebeschnitte erfolgte durch Inkubation in Rotihistol (Roth, Karlsruhe), für 2x 15 min, dann in einer Rotihistol/95 % Ethanol Mischung für 15 min und für 10 min in 95 %igem Ethanol. Als letzter Schritt erfolgte die Rehydrierung in Leitungswasser für 30 min.

Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und durch nachgeschaltete enzymatische Verdau vorbehandelt, um das zu detektierende Antigen im Gewebe zu demaskieren. Die Vorbehandlung der Schnitte für Färbungen der Kollagene erfolgte durch Verdau mit Protease XXIV (Sigma-Aldrich) für 10 min bei 37 °C gefolgt von Waschsritten mit PBS. Abschließend wurde ein Verdau mit 0,1 %iger Hyaluronidase ([w/v] Sigma-Aldrich) in 0,1 M Natriumacetat pH 6 für 60 min bei 37 °C durchgeführt. Für die Detektion von Syndecanen hingegen wurde das Gewebe mit Heparitinase I und III verdaut (2.2.5.13). Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Die Blockierung der endogenen Peroxidase des Gewebes erfolgte mit 0,6 %igem H₂O₂ in Methanol für 10 min

bei RT. Nach Waschschritten mit PBS wurde mit einer Blockierlösung (2 % [w/v] BSA, 10 % [v/v] normales Ziegenerum/Kaninchenserum in PBS) für 2 h bei RT unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (2.1.2.1) in Blockierlösung ohne normales Serum erfolgte für 16 h bei 4 °C. Durch PBS-Waschschritte (3x 5 min) wurden nicht gebundene Antikörper entfernt, um dann das Gewebe mit dem geeigneten Sekundärantikörper (2.1.2.2) für 2 h bei Raumtemperatur zu inkubieren. Die Substratlösung (DAB Substrate Staining Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wurde nach Waschen mit PBS (3x 5 min) auf die Gewebeschnitte gegeben. Die Farbreaktion erfolgte maximal bis 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß und wurde durch mehrmaliges Waschen mit H₂O gestoppt. Eine Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin (Vector Laboratories, Burlingame) durchgeführt. Zur Dokumentation der Färbung wurde der Schnitt mit H₂O gewaschen, luftgetrocknet und mit Entellan (Merck) eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX 60, Olympus) und der *Soft Imaging-Software* dokumentiert.

2.2.7 Durchflußzytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist eine Antigen-Antikörper Reaktion, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wurde. Die Untersuchung der Syndecan-Proteinexpression auf Zelloberflächen von Wildtyp- und Syndecan-4-knockout-Fibroblasten wurde mittels der Durchflußzytometrie durchgeführt. Zunächst wurden Zellkulturschalen mit Fibronectin (Chemicon) beschichtet. Dafür wurden 4 ml der Fibronectin-Lösung (5 µg/ml in PBS) zur Benetzung der Schalenoberfläche für 1 h bei 37 °C auf die Schalen gegeben. Anschließend wurde überschüssiges Fibronectin abgenommen und die Schalen 2x mit PBS gewaschen. Für die Messung der Oberflächenproteinexpression wurden 4×10^6 Zellen auf Fibronectin beschichtete Platten ausgesät und den Zellen über Nacht bei 37 °C (2.2.1) die Anheftung ermöglicht. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, dann in 6 ml eiskaltem PBS für 10 min auf Eis inkubiert, mit einem Zellschaber vorsichtig von der Schale abgekratzt und schließlich in ein 15 ml Falcon Tube überführt. Eine alternative, wesentlich mildere Methode zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale erfolgte durch Zugabe von 3 ml Accutase (PAA Laboratories). Nach 5 min Einwirkzeit wurden die Zellen durch leichtes

Auf- und Abpipetieren von der Zellkulturschale gelöst. Die in Falcon Tubes gesammelten Zellen wurden zentrifugiert, und das erhaltene Zellpellet in 1 ml FACS-PBS (1 % Humanes Serumalbumin [HSA] in PBS) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Blockierlösung (5 % HSA in PBS) fand die Blockierung für 30 min auf Eis statt. Pro Messung wurden 200 µl der Zellsuspension benötigt, die nach Zentrifugation (1.200 rpm, 4 °C, 5 min) mit den in 50 µl FACS-PBS verdünnten Primärantikörpern vermischt wurden. Die Inkubation auf Eis dauerte 1 h. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit 200 µl FACS-PBS und erneuter Zentrifugation (1.200 rpm, 5 min, 4 °C). Analog den Schritten zu Primärantikörper-Inkubation wurde mit den Sekundärantikörpern verfahren. Das aus der letzten Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 500 µl FACS-PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen (Falcon) überführt. Erst kurz vor der Messung an einem Analysegerät (FACScalibur, BD Biosciences) wurden 50 µl Propidiumjodid (50 µg/ml) hinzugegeben.

2.2.8 Histochemische Routinefärbung

Um die Architektur des Gewebes und pathologische Veränderungen beurteilen zu können, helfen verschiedene Färbemethoden. Es gibt Färbungen, die z.B. speziell geeignet sind, um Fasern darzustellen. Andere wiederum sind für die Darstellung von Knochen oder Knochenmarkszellen vorteilhaft.

2.2.8.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung nach Mayer (Mayer, 1903)

Die in der Routine-Histologie durchgeführte Färbung ist die HE-Färbung. Sie dient zur Darstellung des Gewebes, wobei Zellkerne blauviolett und das Zytoplasma rosa erscheinen. Entparaffinierte Schnitte wurden für 5 min in Mayer's Hämatoxylin getaucht und anschließend dreimal mit Wasser gewaschen. Daraufhin erfolgte die Färbung für fünf Minuten in Eosin. Um überschüssige Farbe zu entfernen, wurde mit Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 2-5 min in 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 %) und nachfolgender Inkubation in Isopropanol (2x 5 min, RT) dehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 min bei Raumtemperatur in Rotihistol inkubiert, kurz abgetupft und mit Entellan (Merck) als Eindeckmedium bedeckt.

2.2.8.2 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung ist eine histochemische Färbung, bei der kohlenhydrathaltige Komponenten, zum Beispiel Glykoproteine, Muzine und Glykogene, durch Oxidation mit Perjodsäure und einer Schiffbase nachgewiesen werden können. Durch die im PAS-Reagenz enthaltene Perjodsäure werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Carbonylgruppen oxidiert, die dann mit der im Schiffreagenz enthaltenen Fuchsin-schwefelige Säure rot-violette Komplexe bilden.

Die entparaffinierten Schnitte wurden rehydriert, anschließend oxidierten diese für 5 min in 0,5 % PAS-Reagenz. Danach wurden sie in destilliertes Wasser getaucht und für 15 min im Schiff-Reagenz inkubiert, wodurch die Schnitte eine leicht pinke Färbung bekommen. Nach Waschschritten in Leitungswasser (2x 5 min) wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 %) dehydriert und in Entellan eingedeckelt.

2.2.8.3 Masson-Trichrom-Färbung nach Goldner (Protokoll nach Goldner, 1938)

Die Masson-Trichrom-Färbung ermöglicht die Differenzierung zwischen Kollagenfasern bzw. kollagenhaltigem Material, das blau gefärbt wird, Muskeln, Zytoplasma, Keratine (rote Färbung) und Zellkerne (schwarze Färbung). Hierzu wurden die entparaffinierten Schnitte für 5 min in Wasser getaucht. Mit frisch angesetzttem Eisenhämatoxylin wurden die Schnitte für 2 min gefärbt, kurz in Aqua dest. und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 15 min bis zu einem Farbumschlag ins Blaue gespült. Daraufhin wurden die Präparate für 3 min in Aqua dest. gewaschen, für 5 min mit Ponceau-Säurefuchsin und dreimal für 5 min mit 1 %iger Essigsäure behandelt. Diesen Schritten folgte eine zehnminütige Inkubation der Präparate mit einem Phosphorwolframsäure-Orange-G-Gemisch und 1 %iger Essigsäure (3x 5 min). Nach Färbung mit Lichtgrün für 5 min wurden die Schnitte mit 1 %iger Essigsäure ausgewaschen, dehydriert (3x 3 min, 100 % Isopropanol), in Rotihistol getaucht und eingedeckelt.

Eisenhämatoxylin nach Weigert (Protokoll nach Carl Weigert, 1885)Lösung A: 1 g Hämatoxylin in 100 ml EthanolLösung B: 4 ml 29 % wässrige Eisen(III)-chloridlösung

1 ml 25 %ige Salzsäure

95 ml aqua dest.

Beide Lösungen werden kurz vor Gebrauch zu gleichen Anteilen gemischt.

Ponceau S:

Ponceau 2 R	0,2 g
Säurefuchsin	0,1 g
Eisessig	0,6 ml
H ₂ O	300 ml

Phosphorwolframsäure-Orange-G-**Gemisch:**

Phosphorwolframsäure	4 g
Orange-G	2 g
H ₂ O	10 ml

Lichtgrün:

Lichtgrün SF	0,2 g
Eisessig	0,2 ml
H ₂ O	100 ml

2.2.8.4 Kongorot-Färbung von Amyloid

Kongorot-Färbung wird in der Pathologie zur Darstellung von Amyloid genutzt.

Die Kongorot-Färbung funktioniert auf Grundlage von Wasserstoffbrückenbindungen an die Carbohydratkomponente des Substrates. Amyloid, das durch Kongorot gefärbt ist, zeigt eine auffällige Dichromasie im polarisierten Licht, die Ablagerungen zeigen leuchtend grüne Bereiche auf dunklem Hintergrund, während andere Materialien, wie Kollagene, die auch von Kongorot gefärbt werden, diesen Effekt nicht zeigen. Für den Färbungsprozess wurden die entparaffinierten Schnitte für 5 min in Wasser getaucht. Danach erfolgte eine Kernfärbung in Mayer's Hämatoxylin für 5 min. Nach Waschen der Schnitte in destilliertem H₂O, wurden die Schnitte für 10 min in Leitungswasser oder 0,25 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung blau gefärbt. Einer Inkubation der

entparaffinierten Schnitte in frisch zubereiteter alkalischer Kochsalzlösung (20 min, RT) folgte die Färbung in Kongorot für 50 min. Danach wurden die Schnitte für jeweils 2 sec dreimal in Isopropanol (reinst) entwässert, um sie anschließend durch Rotihistol zu führen. Nach kurzer Lufttrocknung der Präparate wurden diese mit Entellan eingedeckelt.

Kongorot-Stammlösung: 0,2 g Kongorot werden in 100 ml gesättigter NaCl Lösung (in 80 % igem Ethanol) gelöst und anschließend filtriert.

Kongorot-Lösung: 100 ml der Kongorot-Stammlösung werden mit 1 ml einer 1 %igen Natronlauge gemischt und innerhalb der nächsten 15 min verwendet.

Alkalische Kochsalzlösung: zu 100 ml einer gesättigten NaCl Lösung in 80 % igem Ethanol werden 1 ml einer 1 %igen Natronlauge gegeben.

2.2.9 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie eignet sich besonders bei diagnostischen Fragestellungen, um pathologisch relevante Läsionen und subzelluläre strukturelle Veränderungen zu erfassen. Nierenkrankheiten stellen beispielsweise die größte Gruppe der mit Elektronenmikroskopie untersuchten Krankheiten dar. In Ergänzung zur Lichtmikroskopie können verschiedene strukturelle Veränderungen elektronenoptisch genauer lokalisiert und charakterisiert werden.

2.2.9.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Ultradünnschnitte wurden im Leibniz-Institut für Arteriosklerose-Forschung des Universitätsklinikums Münster unter der Anleitung von Herrn Prof. Horst Robenek von Frau Karin Schlattmann angefertigt.

Das verwendete Gewebe wurde direkt nach Präparation aus der Maus in Stücke von 1 mm Kantenlänge geschnitten. Bei der Präparation der Niere wurden die Proben so zugeschnitten, dass diese die Kortexregion beinhalteten, um gewährleisten zu können, dass Glomeruli mit angeschnitten wurden. Die Fixierung der Proben erfolgte mit 2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für 1 h bei 4 °C. Die Proben wurden für eine halbe

Stunde mit Wasser gewaschen, mit 0,5 % OsO₄ in Cacodylatpuffer für 45 min inkubiert und anschließend für jeweils 5 min mit Ethanol-Lösungen dehydriert (75 %, 100 %, 100 %). Nach den Entwässerungsschritten wurden die Proben in Propylenoxid für 5 min und in einer Epon/Propylenoxid Mischung (1:1) für 30 min geschüttelt. Zum Einbetten wurden die Proben zunächst für 15 min in reines Epon gegeben und anschließend für eine Dauer von 24-48 h bei 60 °C ausgehärtet. Die Blöckchen wurden am Ultramikrotom mit dreieckigen Glasmessern ultradünn (90-110 nm) geschnitten, auf Kupfernetze aufgezogen und mit 2 %igem Uranylacetat kontrastiert. Die Präparate wurden in einem TEM (Philips EM410, 60 kV) mikroskopiert. Zur Dokumentation dienten wieder verwendbare Filmplatten, die in einem Filmscanner (Micron Imaging Plate Scanner, Ditabis, Pforzheim, 6000x5000 Pixel) eingelesen wurden.

Die Eponherstellung wurde mit dem *Epoxy Embedding Kit* von Fluka durchgeführt.

Lösung A:

Epoxy Einbettmedium	5 ml
DDSA	8 ml
DDSA: Dodecylbernsteinsäureanhydrid	

Lösung B:

Epon Einbettmedium	8 ml
NMA	7 ml
NMA: Nadimethylanhydrid	

Lösung A und B wurden zu gleichen Anteilen auf einem Rührer für 20 min vermischt, kurz vor Gebrauch wurde der Polymerisationsinitiator DMP-30 (2,4,6-Tris[dimethylaminomethyl]phenol) zugegeben.

3 Ergebnisse

Teil I: Vergleichende Untersuchungen zur Syndecan- Expression in den Nieren aus Wildtyp- sowie Syndecan-4-defizienten Mäusen

3.1 Expression der Syndecane-1, -2 und -4 in der normalen Niere aus Wildtyp-Mäusen

Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression verschiedener Syndecane im Nierengewebe von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen wurden in situ-Hybridisierungen durchgeführt. Dafür mussten geeignete *antisense*- sowie *sense*-Sonden für Kontrollhybridisierungen hergestellt werden. Die Sequenzen der Sonden für Syndecan-1, -2 und -4 wurden aus dem 3'-untranslatierten Bereich gewählt, da dort die geringste Homologie besteht (2.2.4). Die DIG-markierten cRNA-Sonden wurden mittels Northern Blot-Analysen auf Kreuzreaktionen untereinander getestet. Zur Herstellung der Sonden wurde, wie unter 2.2.2.13 beschrieben, die aus Fibroblasten isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, die dann einer PCR-Reaktion (2.2.2.1) zur Amplifizierung der Zielsequenz unterzogen wurde. Nach Überprüfung der Integrität der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.5) und Aufreinigung der Fragmente aus dem Agarose-Gel (2.2.2.5) wurden diese in den pCR II TOPO-Klonierungsvektor (2.2.2.17) kloniert. Diese Klonierung in den pCR II TOPO-Klonierungsvektor wurde zur DNA-Sequenzierung der Sondensequenzen genutzt. Nach Verifizierung der gewünschten Sequenzen wurden die jeweiligen positiven Plasmide mit den Zielsequenzen in einem Restriktionsansatz mit *XhoI* oder *SpeI* linearisiert (2.2.2.11). Für Syndecan-2 sowie Syndecan-4 wurde die *XhoI*-Restriktion für die *antisense*-, die *SpeI* hingegen für die *sense*- *in vitro* Transkription genutzt (2.2.4.1). Bei Syndecan-1 konnte nach der *SpeI*-Restriktion die *antisense*- *in vitro* Transkription, nach dem *XhoI*-Verdau hingegen die *sense*- *in vitro* Transkription erfolgen. Anschließend wurden die DIG-markierten cRNA-Sonden gefällt (2.2.4.1), um das Pellet in DEPC-H₂O aufzunehmen. Zur Qualitätsüberprüfung der DIG cRNA-Sonden wurden 4 µl Sonde mit 4 µl DEPC-H₂O und 2 µl RNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 72 °C aufgekocht und elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt.

3.1.1 Syndecan-4 Expression in Wildtyp- Nieren

Die in situ-Hybridisierungen mit den *antisense*- sowie *sense*-cRNA Sonden für Syndecan-4 wurden, wie unter 2.2.4.2 beschrieben, bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C für 16 h durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse der in situ-Hybridisierungen zeigen Syndecan-4 Signale in verschiedenen Strukturen der Niere. Syndecan-4 mRNA wurde in Kapillarknäueln und der Bowmanschen Kapsel der Glomeruli des renalen Kortex detektiert (Abbildung 3-1, A). Innerhalb der Glomeruli zeigen insbesondere die glomerulären Mesangialzellen (Abbildung 3-1, A, Pfeile), parietale Epithelzellen (Abbildung 3-1, A, Richtungspfeile) und Podozyten (Abbildung 3-1, A, Blockpfeile) eine deutliche Markierung. Innerhalb der Tubuli (Abbildung 3-1, B, Pfeile) zeigen verschiedene Epithelzellen eine positive Syndecan-4 mRNA Anfärbung. Auch Zellen der Sammelrohre (Abbildung 3-1, C, Pfeile) enthalten Syndecan-4 mRNA Transkripte. Größenmaßstab jeweils 20 µm.

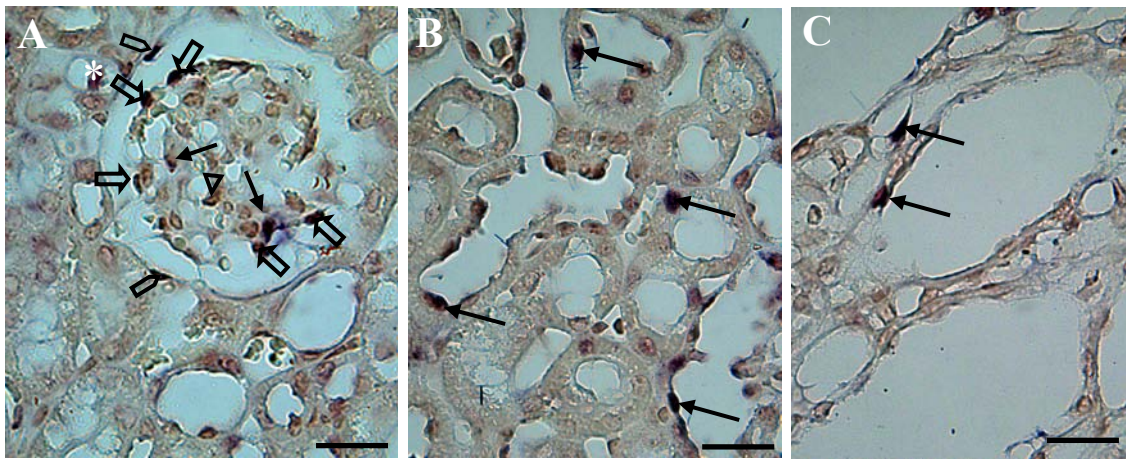


Abbildung 3-1: Syndecan-4 mRNA Expression in Wildtyp-Nieren.

A) In situ-Hybridisierungen mit einer Syndecan-4 *antisense*-Sonde in einer murinen Wildtyp-Niere zeigen Anfärbungen in Glomeruli, in denen die Mesangialzellen (Pfeile), Endothelzellen (Dreieck) sowie Podozyten (Blockpfeile) positiv markiert sind. Die parietalen Epithelzellen (Richtungspfeile) der Bowmanschen Kapsel und die Kapillarendothelzellen (*) außerhalb der Kapillarknäueln des Glomerulus sind ebenfalls angefärbt. B) Verschiedene Epithelzellen der Tubuli (Pfeile) zeigen eine positive Syndecan-4 mRNA Anfärbung. C) Auch Zellen der Sammelrohre (Pfeile) enthalten Syndecan-4 mRNA Transkripte. Größenmaßstab jeweils 20 µm.

In proximalen und distalen tubulären Strukturen sind die Epithelzellen der Tubuli angefärbt. Außerdem sind vaskuläre Strukturen wie die Endothelzellen der Kapillaren Syndecan-4 positiv gefärbt. Deutliche Anfärbungen sind auch in den medullären Sammelrohren (Abbildung 3-1, C) sichtbar, wobei insbesondere Syndecan-4 Transkripte in den Epithelzellen der inneren Segmente vorkommen. Syndecan-4 mRNA ist folglich in viszeralen Zellen der Glomeruli sowie parietalen Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel vorhanden. Innerhalb der Glomeruli exprimieren sowohl Mesangialzellen als auch

Podozyten und Endothelzellen Syndecan-4. Zudem ist Syndecan-4 mRNA in Endothelzellen der Kapillaren nachweisbar. Außerdem sind eine Reihe von Epithelzellen wie die der Sammelrohre in den inneren renalen Segmenten und der Tubuli (Abbildung 3-1, A) positiv angefärbt. Diese in situ-Hybridisierungen zeigen erstmalig, dass neben Podozyten auch andere glomeruläre Zellen, wie z.B. Mesangialzellen sowie Endothelzellen Syndecan-4 mRNA exprimieren, und ergänzen damit bisherige Beschreibungen der Syndecan-4 Expression in der Niere (Pyke et al., 1997). Außerdem ist Syndecan-4 mRNA in parietalen Epithelzellen vorhanden, die diesbezüglich bisher nicht untersucht worden sind.

3.1.2 Synthese von Syndecan-4 Proteinen in Wildtyp-Nieren

Die Synthese von Syndecan-4 und seine Lokalisation in der Niere wurde mittels Immunhistochemie an Paraffinschnitten untersucht.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass Syndecan-4 in den Glomeruli lokalisiert ist (Abbildung 3-2). Innerhalb der Glomeruli wird Syndecan-4 in den Mesangialzellen, in der mesangialen Matrix, den Endothelzellen und den Podozyten detektiert. Die Außenflächen der Kapillarschlingen in den Glomeruli zeigen ebenfalls Syndecan-4 Anfärbungen (Abbildung 3-2, B, Pfeile). Im Gegensatz dazu sind außerhalb der Glomeruli die Kapillarendothelzellen nicht positiv angefärbt. Hierin unterscheidet sich das immunhistochemische Verteilungsmuster von Syndecan-4 zu den Ergebnissen der in situ-Hybridisierungen. Dieser Unterschied zeigte sich in der Anfärbung einiger Kapillarendothelzellen außerhalb der Glomeruli auf RNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene. Innerhalb der Glomeruli sind hingegen die äußeren Bereiche von Kapillarschlingen positiv angefärbt. Ein weiterer Unterschied besteht in der Expression von Syndecan-4 in tubulären Strukturen. Im Gegensatz zu in situ-Hybridisierungsdaten produzieren nur einzelne Epithelzellen der Tubuli Syndecan-4 Proteine (Abbildung 3-2, A), wohingegen sehr viel mehr Tubulusepithelzellen Syndecan-4 mRNA aufweisen (Abbildung 3-1, B). Entsprechend der in situ-Hybridisierungsergebnissen sind Syndecan-4 Proteine in mehreren Mesangialzellen, Podozyten sowie den Endothelzellen lokalisiert. Ergänzend dazu sind Syndecan-4 Proteine in der mesangialen Matrix der Glomeruli vorhanden (Abbildung 3-2, B).

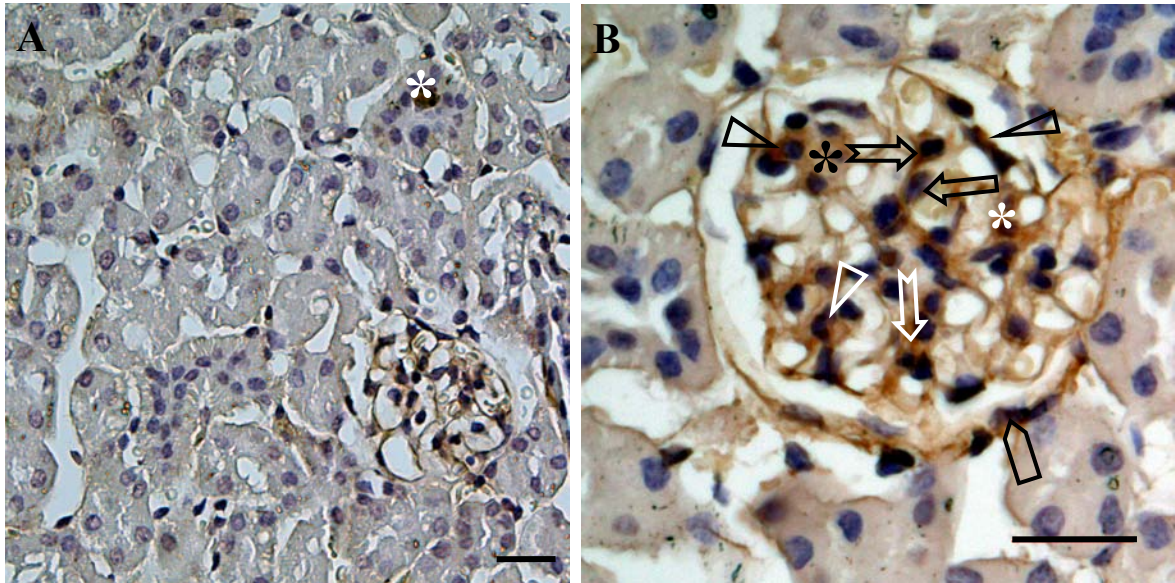


Abbildung 3-2: Syndecan-4 Verteilung im Gewebe einer Wildtyp-Niere.

Lokalisation von Syndecan-4 Proteinen in murinen Wildtyp-Nieren mittels Immunhistochemie mit einem Syndecan-4 Antikörper (monoklonal, Ratte anti-Maus) von BD Biosciences und Diaminobenzidin-Färbung (braun). Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). A) In der kortikalen Region sind nur einzelne Tubuli (*) für Syndecan-4 Proteine angefärbt. B) Die Glomeruli zeigen für Syndecan-4 Proteine im Mesangium (*), in Mesangialzellen (eingekerbter Pfeil), in Endothelzellen (Blockpfeil) und Podozyten (Dreiecke) positive Anfärbungen. Außerhalb der Kapillarknäuel sind die parietalen Epithelzellen (Richtungspfeil) der Bowmanschen Kapsel positiv für Syndecan-4 Proteine angefärbt. Größenmaßstab jeweils 20µm.

3.1.3 Expression von Syndecan-1 in Wildtyp-Nieren

Bisherige Beschreibungen der Syndecan-1 Expression in renalen Zellen beziehen sich vorwiegend auf *in vitro* Untersuchungen. Es ist aber bekannt, dass Syndecan-1 während der Nephrogenese exprimiert wird (Vainio et al., 1989). In dieser Entwicklungsphase wird die Expression von Syndecan-1 durch mesenchymal-epitheliale Interaktionen in der sich entwickelnden Niere induziert. Pyke et al. konnten mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen keine Expression für Syndecan-1 in der adulten Niere feststellen (Pyke et al., 1997).

Die in der eigenen Arbeit durch *in situ*-Hybridisierungen bestimmte Gewebeverteilung von Syndecan-1 mRNA in Nierenschnitten von Wildtyp-Mäusen ist nahezu deckungsgleich mit der von Syndecan-4 mRNA (s. Abbildung 3-1 und Abbildung 3-3).

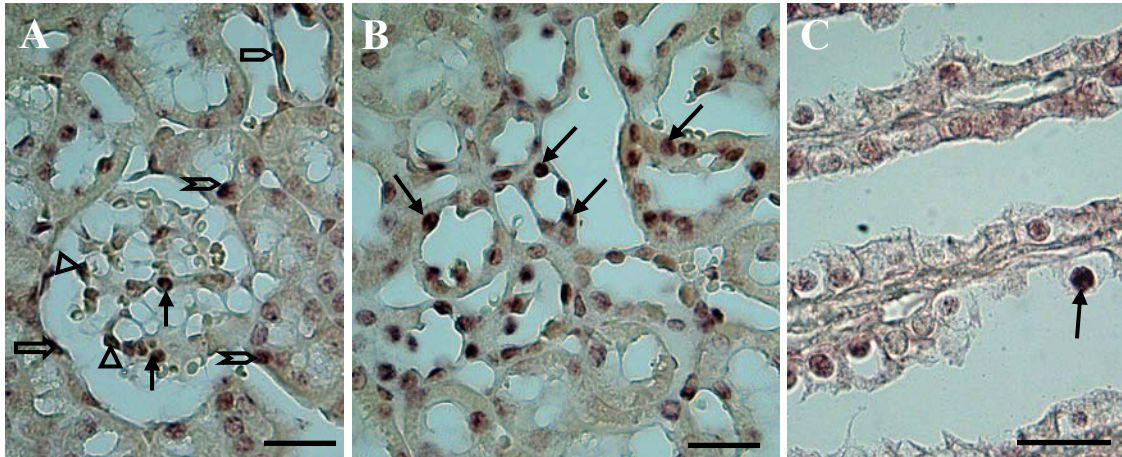


Abbildung 3-3: Syndecan-1 mRNA Expression in Wildtyp-Nieren.

In situ-Hybridisierungen mit Syndecan-1 *antisense*-Sonde. A) In normalen, murinen Wildtyp-Nieren zeigen Glomeruli Anfärbungen für Syndecan-1 mRNA. Innerhalb der Glomeruli sind die Mesangialzellen (Pfeile) und die Podozyten (Dreiecke) angefärbt. Die parietalen Epithelzellen (Blockpfeil) der Bowmanschen Kapsel zeigen ebenfalls positive Anfärbungen für Syndecan-1 mRNA. Außerhalb der Glomeruli sind die Kapillarendothelzellen (Richtungspfeil) und Tubulusepithelzellen (eingekerbter Richtungspfeil) positiv markiert. B) Verschiedene tubuläre Epithelzellen (Pfeile) enthalten Syndecan-1 mRNA. C) In den Sammelrohren sind einzelne Zellen (Pfeil) positiv für Syndecan-1 markiert. Größenmaßstab jeweils 20 μ m.

Syndecan-1 mRNA lässt sich in verschiedenen Tubulusepithelzellen (Abbildung 3-3, B, Pfeile) sowie in Kapillarendothelzellen nachweisen (Abbildung 3-3, A, Richtungspfeil). Innerhalb des Glomerulus sind Mesangialzellen und Podozyten positiv angefärbt (Abbildung 3-3, A, Pfeile). Zusätzlich enthalten die parietalen Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel (Abbildung 3-3, A, Blockpfeil) sowie verschiedene, einzelne Epithelzellen der Sammelrohre Syndecan-1 mRNA (Abbildung 3-3, C, Pfeil).

Diese in situ-Hybridisierungsergebnisse zeigen, dass Syndecan-1 mRNA in epithelialen Zellen, wie z.B. Podozyten, parietalen Epithelzellen sowie Epithelzellen der Tubuli und der Sammelrohre lokalisiert ist. Zusätzlich wird Syndecan-1 mRNA in verschiedenen glomerulären Mesangialzellen sowie Kapillarendothelzellen außerhalb der Glomeruli synthetisiert.

3.1.4 Synthese von Syndecan-1 Protein in Wildtyp-Nieren

Analog der Vorgehensweise für die Lokalisation für die Syndecan-4 Expression in Wildtyp-Nieren, wurden auch für die Untersuchung der Syndecan-1 Synthese immunhistochemische Färbungen mit einem monoklonalen Antikörper (281-1, BD Biosciences) durchgeführt.

Syndecan-1 Proteine sind sowohl in Glomeruli als auch in tubulären Epithelzellen lokalisiert. Die glomeruläre Expression beschränkt sich vorwiegend auf einzelne Podozyten. Eine schwache Färbung für Syndecan-1 Proteine ist in den äußeren Bereichen der Kapillarschlingen sichtbar (Abbildung 3-4, B). Die mesangiale Matrix hingegen ist nur geringfügig positiv markiert. In diesen Strukturen enthält das Zytoplasma der Mesangialzellen nur punktuell positive Signale (Abbildung 3-4, B, Dreiecke). Die Zelloberfläche von Mesangialzellen wie auch der Endothelzellen zeigt schwache Signale (Abbildung 3-4, B, Richtungspfeil). Im Gegensatz zu Syndecan-1 mRNA (Abbildung 3-3) ist die Proteinexpression auf wenige glomeruläre Zellen beschränkt. Das Zytoplasma einiger tubulärer Epithelzellen zeigt jedoch Syndecan-1 positive Signale, die eine sehr dezente Intensität aufweisen (Abbildung 3-4, A, Pfeile). Folglich unterscheidet sich die Verteilung der Syndecan-1 Proteine von der Verteilung der mRNA Transkripte, die in zahlreichen Zellen innerhalb sowie außerhalb der Glomeruli beschrieben werden konnten (Abbildung 3-3).

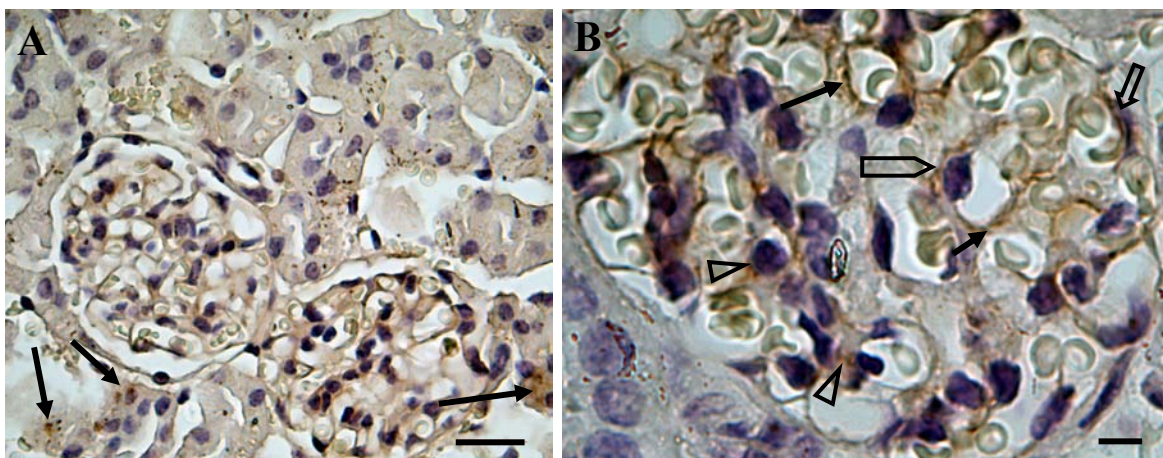


Abbildung 3-4: Syndecan-1 Verteilung im Gewebe einer Wildtyp-Niere.

A) Lokalisation von Syndecan-1 Proteinen in murinen Wildtyp-Nieren mittels Immunhistochemie mit einem Syndecan-1 Antikörper (monoklonal, Ratte anti-Maus) von BD Biosciences und Diaminobenzidin-Färbung (braun). Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). A) Es enthalten einzelne tubuläre Strukturen (Pfeile) Syndecan-1 Proteine. B) Innerhalb der Glomeruli sind die Kapillarschlingen (Pfeil), mesangiale Strukturen (Dreiecke), Endothelzellen (Richtungspfeil) und Podozyten (Blockpfeil) positiv für Syndecan-1 Proteine angefärbt. Größenmaßstab in A) 20 µm, in B) 5 µm.

3.1.5 Syndecan-2 mRNA und Protein werden nicht in Wildtyp-Nieren exprimiert

Mit Hilfe von in situ-Hybridisierungen konnte in Nieren von adulten Wildtyp-Mäusen keine Syndecan-2 mRNA detektiert werden. Diesen Negativbefund unterstützend, gelang auch kein immunhistochemischer Nachweis von Syndecan-2 Proteinen.

3.2 Vergleichende Untersuchungen an unbehandelten Nieren aus Syndecan-4-defizienten und Wildtyp-Mäusen

Syndecan-4-defiziente Mäuse erscheinen äußerlich normal und sind reproduktionsfähig. Erst verschiedene Stressbedingungen rufen einen Phänotyp hervor, der in der Defizienz dieses Genes begründet wird (Ishiguro et al., 2001a; Ishiguro et al., 2001b). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp und Syndecan-4-defizienten Nieren existieren. Zusätzlich dazu sollte überprüft werden, ob sich das Verteilungsprofil der anderen Syndecan-Familienmitglieder ändert. Die Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen wurden makroskopisch nach Größenunterschieden sowie dem äußeren Erscheinungsbild mit Nieren aus Wildtyp-Mäusen verglichen. Lichtmikroskopisch wurden die Nieren an histologischen Routinefärbungen wie Hämatoxylin-Eosin und PAS betrachtet und auf Unterschiede im Aufbau der Nierenstruktur wie Glomerulusgröße und -Form, Tubulusstruktur, Infiltration von Makrophagen und Zellanzahl untersucht.

3.2.1 Histomorphologische Untersuchungen

Es konnten auf lichtmikroskopischer Ebene keine histologischen Unterschiede zwischen den Nieren aus neonatalen sowie adulten Syndecan-4 $+/+$ und Syndecan-4 $-/-$ Mäusen festgestellt werden. Die Morphologie der Nieren ist in beiden Genotypen und Entwicklungsstadien gut erhalten. Die Defizienz von Syndecan-4 hat folglich keine morphologischen Ausprägungen zur Konsequenz, die lichtmikroskopisch erkennbar sind. Diese Befunde korrelieren mit publizierten Daten von *Ishiguro et al.* (2001b).

3.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Ergänzend zur Analyse im Lichtmikroskop wurde transmissionselektronenmikroskopisch untersucht, ob eine Syndecan-4-Defizienz möglicherweise Auswirkungen auf die ultrastrukturelle Morphologie der Niere hat. Dazu wurden Ultradünnschnitte von Syndecan-4 $+/+$ und Syndecan-4 $-/-$ Nieren aus adulten Mäusen miteinander verglichen. Die Elektronenmikroskopie wurde an Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen beider Geschlechter sowie unterschiedlichen Altersgruppen durchgeführt. Die dazu ausgewählten Tiere waren alle älter als zwei und jünger als acht Monate.

3.2.2.1 Syndecan-4-defiziente Mäusenieren zeigen keine ultrastrukturellen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Nieren-Ultradünnschnitten der Wildtyp- und Syndecan-4 $-/-$ Mäuse gleichen Geschlechts und Alters wurden Glomeruli hinsichtlich ihrer Podozyten, Podozytenfüßchen, gefensterten Endothelzellen, Schlitzmembranen, mesangialen Matrices und Mesangialzellen verglichen (Abbildung 3-5). Bei sehr gut erhaltener Zellmorphologie der Präparate sind keine ultrastrukturellen Unterschiede zu finden. Alle untersuchten Glomeruli von Syndecan-4-defizienten Mäusen (Abbildung 3-5, B und D) sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abbildung 3-5, A und C) normal strukturiert. In Glomeruli beider Genotypen sind die Mesangialzellen (Abbildung 3-5, A und B, Mea) gleichermaßen in der mesangialen Matrix (Abbildung 3-5, A und B,*) eingebettet. Die Podozyten (Abbildung 3-5, A-D, P) sind gleich groß und an den Außenflächen der Kapillaren (Abbildung 3-5, A und B, Pfeile) lokalisiert. Bei höheren Vergrößerungen (Abbildung 3-5, C und D) sind die subendothelialen, gefensterten Endothelzellen (Abbildung 3-5, C und D, Blockpfeile) deutlich sichtbar. Gemeinsam mit der glomerulären Basalmembran (Abbildung 3-5, C und D, eingekerbte Richtungspfeile), den Podozytenfüßchen (Abbildung 3-5, C und D, Pfeile) und der Schlitzmembran (Abbildung 3-5, C und D, Dreiecke) bilden sie die renale Filtrationsbarriere (Abbildung 3-5, C und D, Kästen). Sowohl die Podozytenfüßchen als auch die glomeruläre Basalmembran erscheinen bei den Syndecan-4-defizienten Mäusen normal (Abbildung 3-5, C und D). Die Anordnung des reißverschlussartig erscheinenden gefensterten Endothels (Abbildung 3-5, C und D, Blockpfeile) unterscheidet sich in den Glomeruli der Syndecan-

4-knockout Mäuse nicht von der Anordnung der Wildtyp-Mäuse. Zusammengefasst zeigen die Nieren von Syndecan-4 ^{-/-} Mäusen keinen histologisch oder ultrastrukturell erfassbaren Phänotyp.

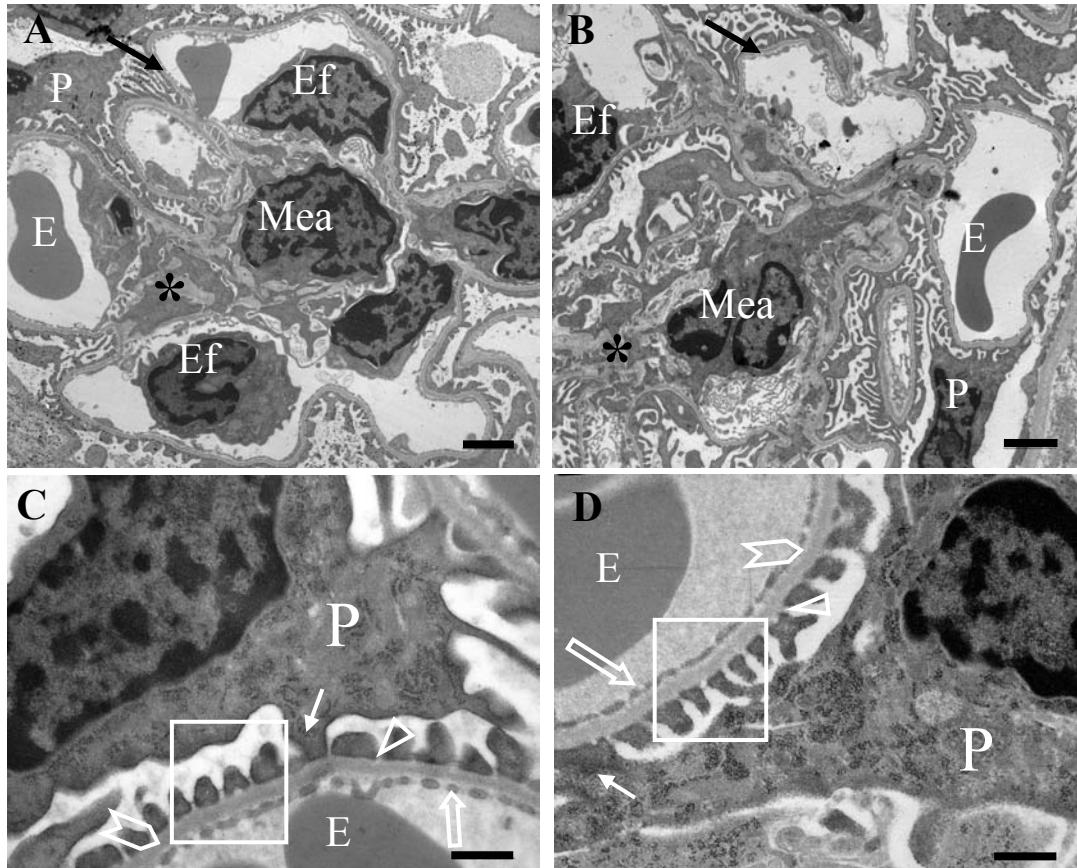


Abbildung 3-5: TEM-Aufnahmen von Wildtyp- und Syndecan-4 ^{-/-} Mäusenieren.

Wildtyp-Nieren (A) und Syndecan-4-defiziente Nieren (B) zeigen die typische glomeruläre Struktur. Mesangialzellen (Mea) sind in das Mesangium eingebettet (*). Erythrozyten (E) befinden sich in den Kapillaren (Pfeil), Endothelzellen (Ef) sind ebenfalls innerhalb der Kapillaren sichtbar. Die Podozyten (P) sitzen an den Außenflächen der Kapillaren. C und D) Die Podozyten-Fußfortsätze (Pfeile) bilden die Schlitzmembran (Dreiecke). GBM (eingekerbter Richtungspfeil), Schlitzmembran und reißverschlussartig angeordnetes, gefensteretes Endothel (Blockpfeile) bauen die renale Filtrationsbarriere (Kasten) auf. Größenmaßstab in (A) und (B) jeweils 2 µm, in (C) und (D) jeweils 500 nm.

3.2.3 Expression der Syndecane-1 und -2 in Syndecan-4 ^{-/-} Nieren

Zusätzlich zu den histologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen des Aufbaus der Syndecan-4-defizienten Nieren, wurde die gewebsspezifische Expression der Syndecane in Syndecan-4-defizienten Nieren untersucht und mit denen der Wildtyp-Nieren verglichen. Die Verteilung der Syndecan-1 mRNA in Syndecan-4-defizienten Nieren unterscheidet

sich nicht von der in Wildtyp-Nieren (3.1.3). Für Syndecan-2 konnten mit Hilfe der in situ-Hybridisierung auch in der Syndecan-4-defizienten Niere keine positiven Signale erhalten werden.

3.2.3.1 Syndecan-1 wird in der mesangialen Matrix von Syndecan-4-defizienten Nieren exprimiert

Um zu untersuchen, inwiefern die Syndecan-4-Defizienz die Lokalisation der Syndecan-1 Proteine in der Niere beeinflusst, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Syndecan-4-defiziente Nieren zeigen vor allem innerhalb der Glomeruli positive Anfärbungen für Syndecan-1, wobei hier jedes zweite Glomerulus deutlich angefärbt ist (Abbildung 3-6, A). Die Plasmamembranen der Podozyten sind besonders deutlich markiert. Zusätzlich wurde an Außenflächen der Kapillarschlingen, wie auch den Oberflächen einiger Endothelzellen (Abbildung 3-6, B) Syndecan-1 detektiert. Zudem enthält die mesangiale Matrix und die in ihr eingebetteten Mesangialzellen Syndecan-1 Proteine. Außerhalb der glomerulären Kapillarknäuel sind parietale Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel (Abbildung 3-6, B) positiv für Syndecan-1 markiert.

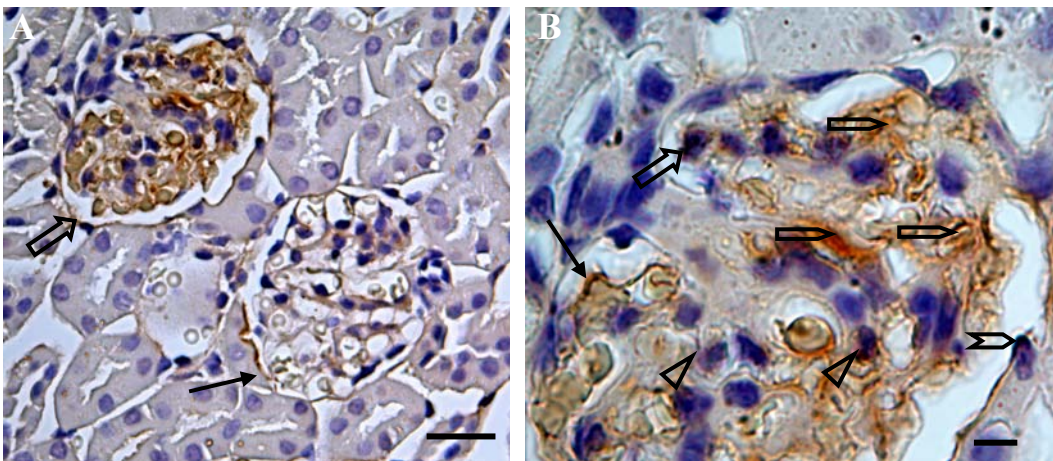


Abbildung 3-6: Syndecan-1 Verteilung im Gewebe einer Syndecan-4-defizienten Niere.

Lokalisation von Syndecan-1 Proteinen in Syndecan-4-defizienten Nieren mittels Immunhistochemie mit einem Syndecan-1 Antikörper (monoklonal, Ratte anti-Maus) von BD Biosciences und Diaminobenzidin-Färbung (braun). Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). A) Jedes zweite Glomerulus ist intensiv markiert (Blockpfeil) und liegt benachbart zu einem weniger stark angefärbten Glomerulus (Pfeil). B) In den kräftig angefärbten Glomeruli sind Podozyten (Blockpfeil), Mesangialzellen (Dreiecke), mesangiale Matrix (Richtungspfeile) sowie Kapillarschlingen (Pfeil) positiv für Syndecan-1 Proteine gefärbt. Zusätzlich dazu enthalten parietale Epithelzellen (eingekerbter Richtungspfeil) der Bowmanschen Kapsel Syndecan-1. Größenmaßstab in (A) 20 µm, in (B) 5 µm.

Im Gegensatz zur Lokalisation für Syndecan-1 in Wildtyp-Nieren, ist eine deutliche Anfärbung der mesangialen Matrix für Syndecan-1 (Abbildung 3-6, B, Richtungspfeile) in Syndecan-4-defizienten Mäusen erkennbar.

3.2.3.2 Syndecan-2 wird nicht redundant in Syndecan-4 ^{-/-} Nieren exprimiert

In den Syndecan-4-defizienten Nieren zeigen weder die Glomeruli noch andere Strukturen eine Syndecan-2 Expression (Abbildung 3-7, A und B). Die eigenen Resultate sprechen dafür, dass Syndecan-2 nicht in Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Nieren exprimiert wird (3.1.5).

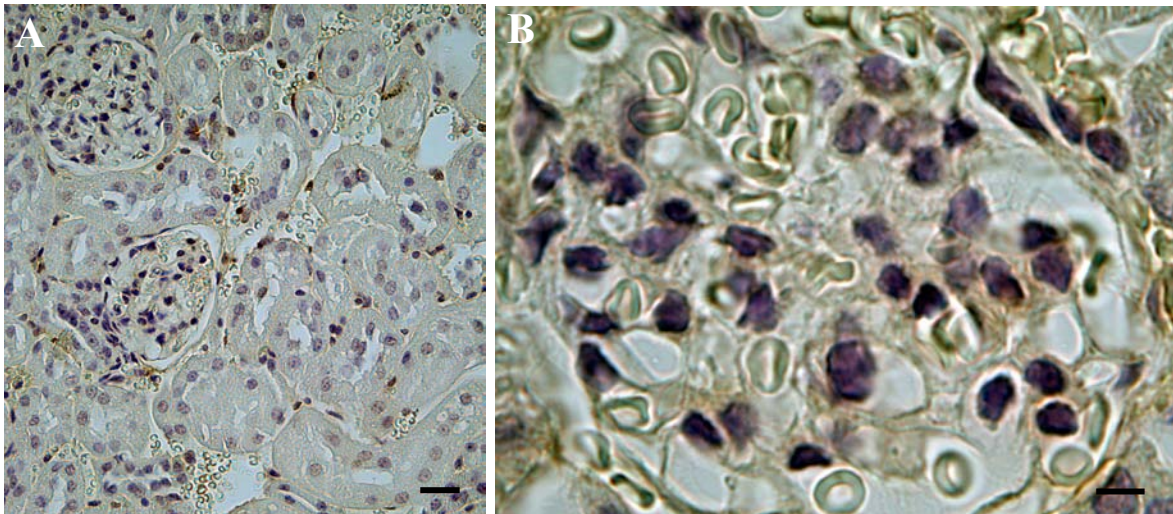


Abbildung 3-7: Syndecan-2 Verteilung im Nierengewebe von Syndecan-4-defizienten Mäusen.

A) Lokalisation von Syndecan-2 Proteinen in Syndecan-4-defizienten Nieren mittels Immunhistochemie mit einem Syndecan-2 Antikörper (polyklonal, Kaninchen anti-Maus) von Santa Cruz und Diaminobenzidin-Färbung (braun). Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). A) Die Glomeruli der Syndecan-4-defizienten Nieren enthalten keine Syndecan-2 Proteine. B) Bei höheren Vergrößerungen wird deutlich, dass Syndecan-2 in keiner glomerulären Zelle vorkommt. Größenmaßstab in (A) entspricht 20 µm, in (B) 5 µm.

3.2.4 Quantitative Bestimmung der Syndecan-1 und -2 Expression in Syndecan-4-defizienten Nieren im Vergleich zu Wildtyp-Nieren mittels Real time PCR

Um die bisherigen Befunde quantitativ zu untermauern, wurde Gesamt-RNA aus den Nieren von Wildtyp- sowie Syndecan-4 ^{-/-} Mäusen isoliert und revers transkribiert. Die so erhaltene cDNA von Syndecan-1, Syndecan-2 und Syndecan-4 wurde mit Hilfe von

spezifischen Primern (2.2.2.16) in einer *Real time* PCR im Verhältnis zu einem *housekeeping* Gen, dem HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase), quantifiziert. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Bei dieser Quantifizierung wird das Verhältnis der Menge an eingesetzter RNA/cDNA in der Probe 1 zu der Menge an eingesetzter RNA/cDNA in einer Probe 2 bestimmt. Die Amplifizierung eines *housekeeping* Gens setzt die Menge an Ziel-RNA zu der insgesamt in der Probe enthaltenen RNA ins Verhältnis. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{C}_{\text{Tx}} - \Delta\text{C}_{\text{T HPRT}}$$

C_{Tx} ist der normalisierte CT Wert für das Zielgen

$\Delta\text{C}_{\text{T HPRT}}$ ist der normalisierte CT Wert für HPRT

Geht man von einer Verdopplung der Kopienzahl pro Zyklus aus, so gilt folgende Gleichung:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Die errechneten Werte sind demnach Angaben der exponentiellen Expression. Die Expression von Syndecan-4 in Wildtyp-Nieren wurde willkürlich 1 gesetzt (Abbildung 3-8, A). In Relation zur Syndecan-4 Expression (weißer Balken) ist die Syndecan-1 Expression (Abbildung 3-8, A, schwarzer Balken) am geringsten. Die Syndecan-2 Expression (grauer Balken) ist unwesentlich höher (Abbildung 3-8, A). Syndecan-4-defiziente Nieren zeigen demgegenüber eine fünfmal höhere Expression von Syndecan-1, während die Expression von Syndecan-2 unverändert ist (Abbildung 3-8, B).

Mit Hilfe der *Real time* PCR konnte im Gegensatz zu vorherigen Methoden (siehe 3.1.5) Syndecan-2 mRNA in Wildtyp- als auch in Syndecan-4-defizienten Nieren detektiert werden. In Syndecan-4-defizienten Nieren liegt keine Erhöhung der Syndecan-2 Expression vor, wohingegen Syndecan-1 mRNA deutlich ansteigt.

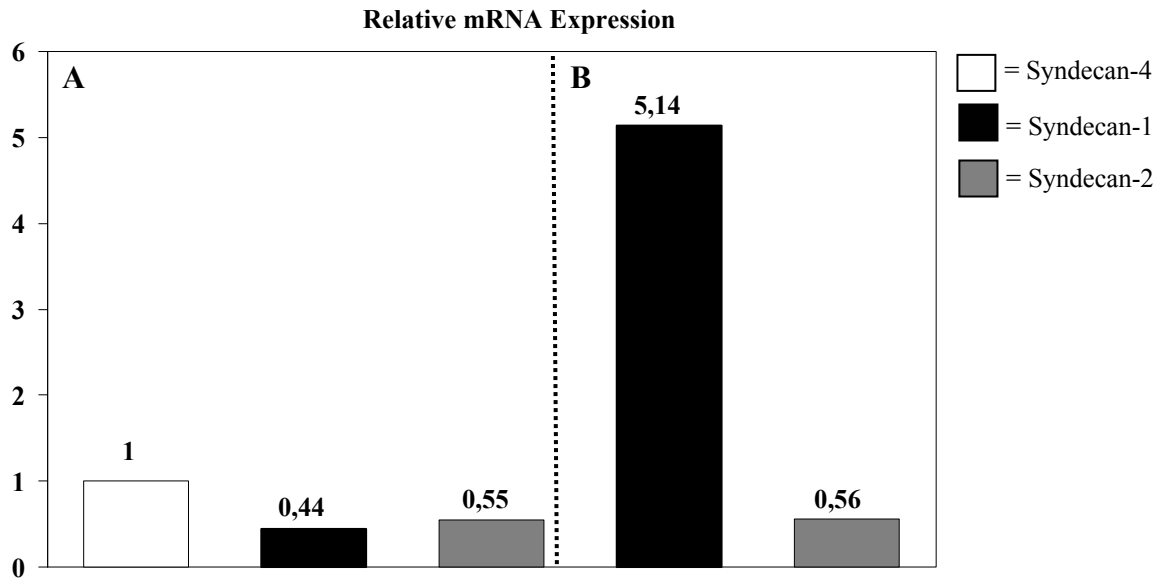


Abbildung 3-8: Real time PCR Daten zur Expression der Syndecane in Wildtyp- und Syndecan-4 defizienten Nieren.

A) *Real time* PCR-Daten verdeutlichen, dass die Expression für Syndecan-4 (weißer Balken) in der normalen **Wildtyp-Niere** am höchsten ist, gefolgt von der Syndecan-2 mRNA (graue Balken) Expression, deren Expressionspiegel nur die Hälfte beträgt. Die Syndecan-1 mRNA (schwarze Balken) Expression hat den niedrigsten Expressionswert in der Wildtyp-Niere. B) In **Syndecan-4 -/- Nieren** ist die mRNA Expression für Syndecan-1 fünffach erhöht. Für Syndecan-2 mRNA liegt keine Veränderung vor.

3.2.5 Zusammenfassung

- Eine mRNA Expression für Syndecan-4 konnte in Mesangialzellen, Podozyten, parietalen Epithelzellen und Endothelzellen im Glomerulus detektiert werden. Außerdem exprimieren Epithelzellen der Sammelrohre und der Tubuli Syndecan-4 mRNA. Es sind auch einige Kapillarendothelzellen positiv angefärbt.
- Syndecan-4 Proteine werden hingegen primär auf der zellulären Oberfläche von Mesangialzellen und Podozyten, im Mesangium sowie an Kapillarschlingen exprimiert.
- Syndecan-1 mRNA zeigt eine nahezu Syndecan-4-kongruente Expressions-Verteilung in der Niere.
- Syndecan-1 Proteine werden vorwiegend auf der zellulären Oberfläche der Podozyten und Kapillarschlingen exprimiert.

- Die Defizienz des Syndecan-4-Gens hat keinen spontanen Phänotyp zur Folge. Die Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen sind histologisch normal. Auch ultrastrukturell konnten keine Unterschiede festgestellt werden.
- In Syndecan-4-defizienten Nieren konnte Syndecan-1 Protein auch im Mesangium detektiert werden.
- Eine Syndecan-2 Expression lag in Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Nieren immunhistochemischen Färbungen und in situ-Hybridisierungen zufolge nicht vor. Jedoch konnte mit Hilfe der *Real time* PCR Syndecan-2 mRNA in den Nieren beider Genotypen zu geringen Mengen detektiert werden.

Teil II: Untersuchungen der renalen Pathologie an Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen nach einer unilateralen Nephrektomie

Die Operationen an Syndecan-4 $+/+$ und Syndecan-4 $-/-$ Mäusen im Zeitraum vom Dezember 2003 bis Februar 2005 wurden unter Anweisungen von Frau Prof. Liliana Schäfer und ihren Mitarbeitern in der Medizinischen Poliklinik des Universitätsklinikums in Münster (UKM) durchgeführt. Im Januar 2006 wurden vier männliche Syndecan-4 $+/+$ und vier männliche Syndecan-4 $-/-$ Mäuse unter der Anleitung von Herrn Dr. Gregor Theilmeier im Institut für Anatomie des UKM nephrektomiert. Die Pflege und Versorgung aller nephrektomierten Tiere über eine Dauer von sechzig Tagen sowie die Präparation der Nieren erfolgten im Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des UKM.

3.3 Das Modell der Nephrektomie zur Schädigung der Niere und Induktion einer renalen Pathogenese in Wildtyp- und Knockout-Mäusen

Die unilaterale Nephrektomie (UNX) wurde als Nierenerkrankungsmodell gewählt, um zu überprüfen, ob in der Ausprägung klinischer bzw. histologischer Veränderungen der zurückbleibenden Niere (*remnant kidney*, RK) nach einer UNX Unterschiede zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen erkennbar sind. Die UNX-Mäuse wurden nach sechzig Tagen für Untersuchungen getötet. Nach Präparation der RK wurde diese in mehrere gleichgroße Stücke zerteilt, um biochemische, histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchzuführen. Zu Beginn der Arbeiten mit dem UNX-Nierenerkrankungsmodell diente die in Formaldehyd fixierte RK für histologische Untersuchungen wie in situ-Hybridisierungen, Immunhistochemie und Standardfärbungen (HE, PAS). Bei späteren UNX-Experimenten (2005/2006) hingegen wurde in regelmäßigen Abständen auch Spontanurin der Mäuse gesammelt. Die herauspräparierten RK wurde wie oben beschrieben in mehrere, gleichgroße Stücke zerteilt. Diese Nierenstücke dienten verschiedenen Untersuchungen wie Protein- und RNA-Isolierung, Elektronenmikroskopie, in situ-Hybridisierungen und Immunhistochemie.

Die Anzahl der untersuchten nephrektomierten Mäuse im Rahmen dieser Arbeit betrug insgesamt 36. Davon waren 18 Wildtyp-Mäuse und 18 Knockout-Mäuse. Unter diesen 18 Mäusen waren sechs männliche und zwölf weibliche Tiere.

3.3.1 Diagnostik

3.3.1.1 Vergleichende Untersuchung des *kidney weight/body weight* Index von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen

Die Änderung im Quotienten aus dem Gewicht der linken bzw. rechten Niere geteilt durch das Körpergewicht vor und nach der Operation kann als diagnostischer Parameter für eine pathologische Entwicklung in den RK herangezogen werden (*kidney weight/body weight index*). Der Verlust renaler Masse durch eine Nephrektomie hat Auswirkungen auf die glomeruläre Filtration sowie auf die Volumenzunahme der zurückbleibenden Niere (RK). Im Allgemeinen wird in der Nephrologie der Begriff einer kompensatorischen renalen Zunahme (CRG) verwendet, deren Stärke von der Art der Nephrektomie abhängt. Hierbei wird in der Literatur zusätzlich darauf verwiesen, dass geschlechts- und altersabhängige Mechanismen in diesem Prozess involviert sind und daher die Art sowie das Ausmaß des kompensatorischen renalen Wachstums variieren kann (Mulroney et al., 1999; Mulroney und Pesce, 2000).

Um die renale Zunahme post Nephrektomie zu erfassen, wird das Gewicht der Niere in Relation zu dem Körpergewicht gesetzt und mit dem Verhältnis *kw/bw* prä-UNX verglichen. Nach Berechnung der Indices wurden die Syndecan-4 -/- Mäuse mit Wildtyp-Mäusen, unter Einbeziehung des Geschlechts, miteinander verglichen. Dazu wurden die Mäuse vor der Operation sowie anschließend die exzidierte Niere gewogen. Nach einer sechzig-tägigen UNX wurde vor Präparation die Maus gewogen und anschließend die herauspräparierte RK. Aus diesen Werten der Nieren- und Körpergewichte vor und nach UNX wurden die *kw/bw* Indices berechnet.

Die *kw/bw* Indices x100 sind als Säulendiagramme dargestellt, in welchem die Geschlechter der UNX-Mäuse sowie die *kw/bw* vor (prä) als auch nach (post) UNX berücksichtigt sind (Abbildung 3-9). Die weiblichen Wildtyp UNX-Mäuse zeigen die geringste Zunahme. Ihre Differenz zwischen prä = 0,55 und post = 0,56 beträgt 0,01. Die Werte für Syndecan-4-defiziente UNX-Weibchen sind höher (prä = 0,83 und post = 0,87)

als für Wildtyp UNX-Weibchen. Die deutlichsten Unterschiede der $kw/bw \times 100$ vor und nach UNX treten in männlichen Mäusen auf, wobei die Zunahme in Syndecan-4-defizienten Männchen am höchsten ist. Ihre Differenz zwischen prä = 0,74 und post = 0,91 beträgt 0,17. Die männlichen zeigen im Vergleich zu weiblichen Mäusen eine deutlichere Zunahme ihrer kw/bw Indices post UNX. Die stärkste Zunahme liegt bei männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen vor. Jedoch sind die hohen kw/bw Werte der Syndecan-4-defizienten UNX-Weibchen auffällig. Die weiblichen Knockout-Mäuse besitzen bereits sehr hohe $kw/bw \times 100$ Werte prä-UNX (0,83), die höher als die der weiblichen (prä-UNX = 0,55) und auch männlichen (prä-UNX = 0,57) Wildtyp-Mäuse sind. Sie liegen sogar höher als die $kw/bw \times 100$ Werte der männlichen Syndecan-4-defizienten UNX-Mäuse (prä-UNX = 0,74). Zwar ist die Differenz zwischen prä-UNX (0,83) und post-UNX (0,88) nicht so groß, dennoch ragte dieser hohe Wert zwischen den anderen prä-UNX Werten deutlich heraus.

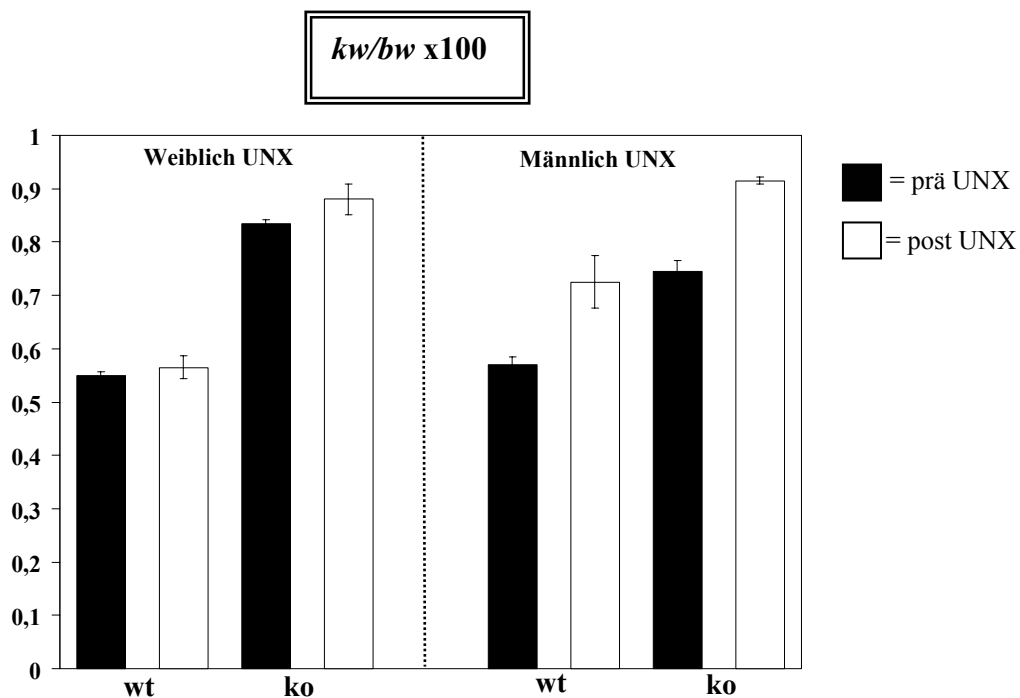


Abbildung 3-9: kw/bw Indices der weiblichen und männlichen Mäuse beider Genotypen prä und post UNX.

Wildtyp-Mäuse weiblichen Geschlechts zeigen vor (schwarze Balken) und post UNX (weiße Balken) kaum eine Zunahme der renalen Masse. Auch die weiblichen Syndecan-4-defizienten Mäuse (schwarze Balken) nehmen nur geringfügig in ihrem kw/bw nach UNX (weiße Balken) zu. Im Gegensatz dazu ist die Zunahme bei männlichen Wildtyp-Mäusen (schwarze Balken) nach UNX (weiße Balken) deutlich. Bei Syndecan-4-defizienten Männchen ist die Zunahme am höchsten. Besonders auffällig ist der hohe prä-UNX Wert bei den weiblichen Syndecan-4-defizienten Mäusen.

3.3.1.2 UNX-Mäuse beider Genotypen zeigen keine Proteinurie nach einer unilateralen Nephrektomie

Zur Ermittlung einer möglichen Proteinurie bei den nephrektomierten Mäusen beider Geschlechter sowie Genotypen wurden gesammelte Urinproben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die im Urin enthaltenen Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbt. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen unter Berücksichtigung der Geschlechter beobachtet werden. Zusätzlich dazu wurden die im Urin auftauchenden Proteine mit solchen aus normalen Mäusen verglichen. Auch dieser Vergleich stellte keine einheitlichen Unterschiede, die auf die Nephrektomie sowie auf Geschlecht und Genotypen basieren könnten, heraus.

3.3.2 Histologische Untersuchungen an UNX-Nieren aus Wildtyp- sowie Syndecan-4-knockout Mäusen

Die histologischen Untersuchungen an Paraffinschnitten der UNX-Nieren im Vergleich zu normalen Nieren als Kontrollen, schließen Routinefärbungen wie Hämatoxylin-Eosin-(HE-), Perjodsäure-Schiffsche Reagenz- (PAS-), Masson-Trichrom und Kongorot-Färbung ein.

3.3.2.1 UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen zeigen histologische Unterschiede im Lichtmikroskop

Mit Hilfe einer PAS-Färbung stellten sich Unterschiede zwischen UNX-Nieren der Syndecan-4 $+/+$ und $-/-$ Mäuse heraus. Sowohl in den UNX-Nieren der Wildtyp- als auch Syndecan-4-defizienten Mäuse sind glomeruläre Komponenten PAS-positiv (Magenta-Ton) angefärbt. Die TBM ist in ihrer apikalen Seite ebenfalls PAS-positiv (Abbildung 3-10, A und B). In den Glomeruli der Wildtyp UNX-Nieren sind in der mesangialen Matrix und in der GBM (Abbildung 3-10, A) der PAS-Färbung zufolge kohlenhydratreiche Strukturen enthalten. Ebenso ist die Bowmansche Kapsel und die interstitielle Matrix, die laut zahlreichen Publikationen verschiedene Proteoglykane und Glykoproteine enthalten, magentafarben hervorgehoben (Couchman et al., 1996; Erickson und Couchman, 2000; Groffen et al., 1998; Groffen et al., 1999; Miner, 2005; Miosge et al., 2003; Yurchenco und

Schittny, 1990). Syndecan-4-defiziente männliche UNX-Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp UNX-Mäusen großflächige, zellkernfreie Bereiche in ihren Glomeruli auf, die deutlich PAS-positiv angefärbt sind. Es handelt sich dabei primär um mesangiale Bereiche mit angereichertem, extrazellulärem Material, die Charakteristika einer Glomerulosklerose aufweisen (Abbildung 3-10, B). Die Kapillarlumina der betroffenen Glomeruli sind im Vergleich zu Glomeruli aus Wildtyp UNX-Nieren komprimiert. Zusätzlich dazu lassen sich die sklerotischen Segmente von benachbarten Segmenten, die wesentlich blasser gefärbt sind, farblich abgrenzen. Bei einer Glomerulosklerose ist die Zelldichte innerhalb der Glomeruli deutlich reduziert. Den PAS-Färbungen zufolge weisen die sklerotischen, vernarbten glomerulären Bereiche der mesangialen Matrix eine Akkumulierung von glykogenem Material auf. Weder Wildtyp-Männchen noch -Weibchen zeigen nach UNX sklerotisierte Glomeruli wie sie für die Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen beschrieben werden konnten. Ebenso entsprechen die UNX-Nieren von Syndecan-4 -/- Weibchen dem Erscheinungsbild von Wildtyp UNX-Nieren und zeigen keine besonderen Auffälligkeiten. Dieses pathologische Bild sklerotisierter Glomeruli in Syndecan-4-defizienten Mäusen tritt ausschließlich beim männlichen Geschlecht auf.

Mit weiteren Färbungen wie der Masson-Trichrom Färbung wurde eine nähere Charakterisierung der sklerotischen Bereiche in den Glomeruli der Syndecan-4-defizienten Männchen durchgeführt. In den UNX-Wildtyp Männchen ist die mesangiale Matrix, die Bowmansche Kapsel um die Glomeruli und die TBM außerhalb der Glomeruli grün-bläulich gefärbt und demnach kollagenhaltig (Abbildung 3-10, C). Die in den Kapillarlumina angereicherten Erythrozyten sind in einem intensiven Rotton sichtbar, wohingegen die Kerne der glomerulären Zellen schwarz erscheinen. Im Vergleich dazu zeigen die Glomeruli der Syndecan-4 -/- Männchen eine deutliche grün-bläuliche Anfärbung für Kollagene in den sklerotischen Bereichen, in denen sich keine schwarzen Zellkerne befinden (Abbildung 3-10, D). Ähnlich den Wildtyp-Glomeruli sind auch die TBM in UNX-Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen und das Interstitium grün-bläulich gefärbt und damit als kollagenhaltig charakterisiert. Das Zytoplasma der Tubuli und die zellkernreicheren Regionen innerhalb der Glomeruli sind rötlich gefärbt.

Zur Überprüfung, ob Amyloide in diesen sklerotisierten Glomeruli aus Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen abgelagert sind, wurden Kongorot-Färbungen an UNX-Nieren aus Wildtyp- und Knockout-Männchen durchgeführt. In den UNX-Nieren der Wildtyp- und Knockout-Männchen sind jedoch keine kongoroten und damit stark amyloiden

Anfärbungen erkennbar (Abbildung 3-10, E und F). Die sklerotischen Bereiche der Glomeruli aus Syndecan-4 ^{-/-} Männchen enthalten somit keine amyloide Ablagerungen (Abbildung 3-10, F).

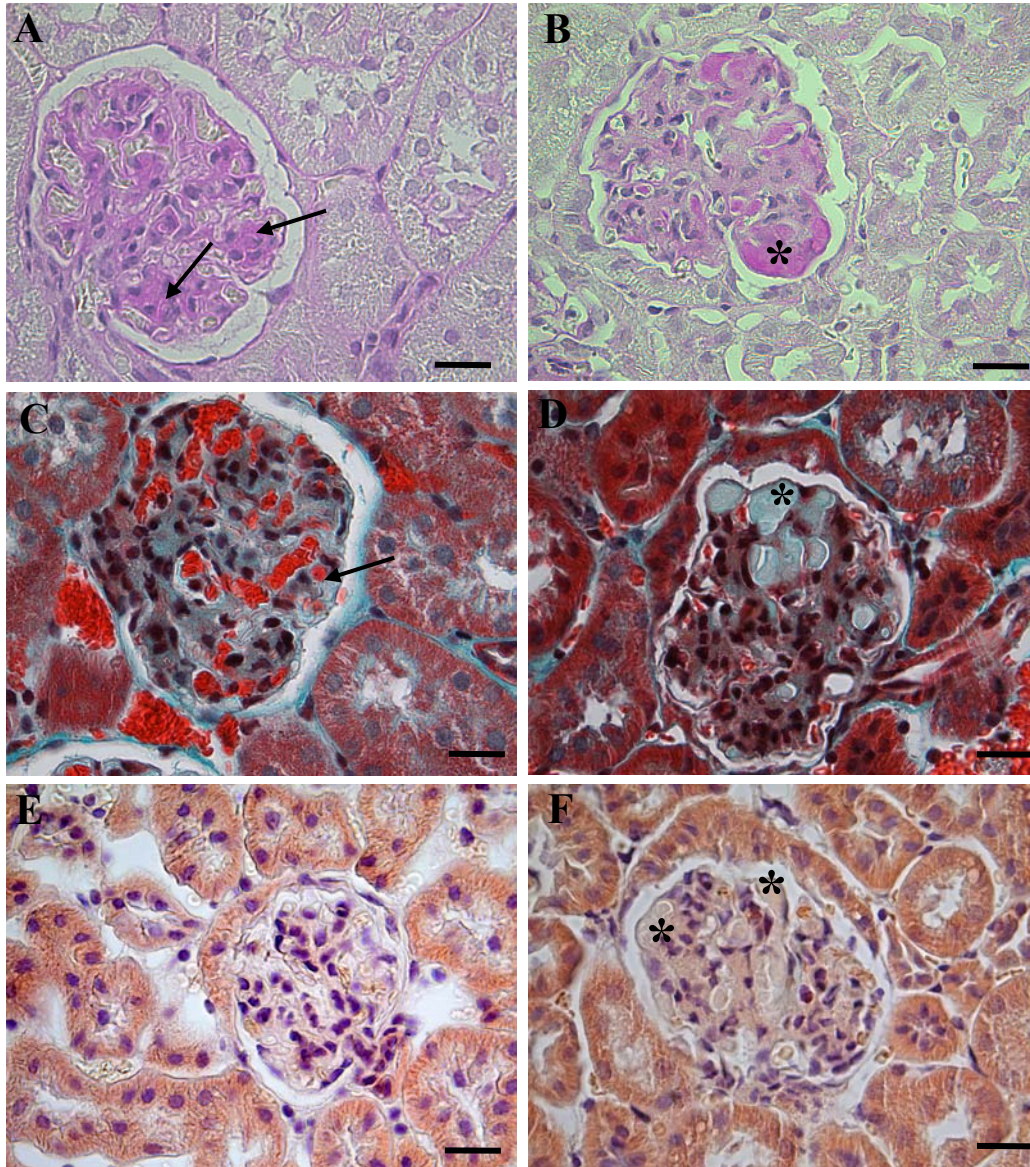


Abbildung 3-10: UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen entwickeln Glomerulosklerose.

PAS-Färbungen von Wildtyp (A) und Knockout UNX-Nieren (B) verdeutlichen, dass innerhalb der Glomeruli (*) von Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen eine mesangiale Akkumulation in zellkernfreien, großflächigen Bereichen vorkommt. Wildtyp UNX-Nieren enthalten in ihrem Mesangium (A, Pfeile) ebenfalls PAS-positives Material.

Die sklerotisierten Glomeruli von Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen (D, *) sind der Masson-Trichrom Färbung zufolge im Vergleich zu UNX-Nieren aus männlichen Wildtyp-Mäusen (C, Pfeil) stark kollagenhaltig. Nach Kongorot-Färbungen konnten weder in UNX-Nieren aus männlichen Wildtyp-Mäusen (E) noch in männlichen Knockout-Mäusen (F, *) Amyloidablagerungen beobachtet werden. Größenmaßstab jeweils 20 µm.

Derartige Strukturen mit knotig vernarbten, sklerotischen Bereichen innerhalb der Glomeruli werden oftmals in diabetischen Nieren beobachtet und als noduläre Strukturen bezeichnet. Die PAS-positiven nodulären Bereiche in Syndecan-4-defizienten UNX-Nieren enthalten folglich Glykoproteine und Kollagene, aber kein Amyloid.

3.3.2.2 Sklerotische Bereiche in den UNX-Nieren der männlichen Syndecan-4-defizienten Mäuse enthalten Kollagen Typ I, -IV und Fibronektin

Zur weiteren Charakterisierung der nodulären und sklerotischen Strukturen in den Glomeruli der UNX-Nieren von Syndecan-4-defizienten Männchen wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen unterschiedliche extrazelluläre Matrixproteine durchgeführt. Kollagen Typ I,- IV sowie Fibronektin, die bei verschiedenen pathologischen Nierenerkrankungen vermehrt in der extrazellulären Matrix abgelagert werden, wurden als fibrotische Marker gewählt (El-Aouni et al., 2006; Kawamura et al., 1999; Oudit et al., 2006; Yang et al., 2001).

Kollagen Typ I ist in den Glomeruli der UNX Wildtyp-Männchen in der Bowmanschen Kapsel vorhanden (Abbildung 3-11, A). Die glomeruläre, extrazelluläre Matrix sowie die Kapillarschlingen sind ebenfalls leicht für Kollagen Typ I angefärbt. Die Anfärbung für Kollagen Typ I in Glomeruli der nephrektomierten Syndecan-4-defizienten Mäuse ist hingegen deutlich intensiver. Insbesondere die nodulären, sklerotischen Bereiche der Glomeruli kennzeichnen sich durch eine intensive, konzentrierte Braunfärbung für Kollagen Typ I (Abbildung 3-11, B) aus. Sowohl in den Wildtyp als auch in den Knockout UNX-Nieren ist der interstitielle Zwischenraum (Abbildung 3-11, A und B) gefärbt. Zusätzlich dazu sind verschiedene Zellen im Interstitium oder in tubulären Gefäßen für Kollagen Typ I gefärbt (Abbildung 3-11, B). Die Bowmansche Kapsel und die tubuläre Basalmembran enthalten ebenfalls Kollagen Typ IV (Abbildung 3- 11, C und D). Bei den sklerotischen Glomeruli der UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Tieren sind deutliche Anfärbungen in den vernarbten Bereichen innerhalb der Glomeruli sichtbar, die in jedem der nodulären Strukturen intensiv gefärbt sind (Abbildung 3-11, D, *).

Somit enthalten die sklerotischen Segmente sowohl Kollagen Typ I als auch Kollagen Typ IV. In Übereinstimmung mit Literaturdaten zeichnen sich diese Bereiche durch Akkumulation eines fibrillären Kollagens (Typ I) sowie eines als Basalmembran-Komponente bekannten Kollagens (Typ IV) aus (Alexakis et al., 2006; Bergijk et al., 1998;

Couchman et al., 1996; Dixon et al., 1980; Eddy, 2000; Groffen et al., 1998; Groffen et al., 1999; Kim et al., 1991a; Kim et al., 1991b). Gleichzeitig ist eine Anfärbung der glomerulären Mesangien in UNX-Nieren aus Wildtyp- als auch aus Knockout-Mäusen für Kollagen Typ IV erkennbar. Darin unterscheidet sich die Kollagen Typ IV-Lokalisation von der Kollagen Typ I-Lokalisation. Diese mesangiale Anfärbung tritt auch in normalen Nieren auf (Abbildung 3-11, G und H). Erwartungsgemäß enthalten die glomerulären Basalmembranen aus normalen Syndecan-4 $+/+$ und $-/-$ Mäusen Kollagen Typ IV (Abbildung 3-11, G und H). Der Unterschied gegenüber Wildtyp-Nieren besteht in einer großflächigeren Anfärbung für Kollagen Typ I in den UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen. Dies ist vorwiegend in Bereichen, die durch komprimierte Kapillarlumina (Abbildung 3-11, D, Pfeile) gekennzeichnet sind, der Fall. In diesen komprimierten Bereichen der Glomeruli aus Knockout-Mäusen scheint zusätzlich eine Akkumulierung von Kollagen Typ IV zu erfolgen, welche ausgeprägter erscheint als in den Glomeruli aus Wildtyp UNX-Nieren sowie normalen Nieren.

Fibronektin konnte ebenfalls in den Glomeruli der UNX-Nieren beider Genotypen (Abbildung 3-11, E und F) detektiert werden. In UNX-Nieren der Wildtyp-Mäuse ist Fibronektin in den glomerulären Mesangialzellen und der umgebenden mesangialen Matrix, um einige Endothelzellen sowie den glomerulären Kapillaren (Abbildung 3-11, E, Kreise) immunhistologisch nachweisbar. Dagegen befindet sich Fibronektin in den UNX-Glomeruli der Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen, besonders in sklerotischen, nodulären Bereichen (Abbildung 3- 11, F). Ähnlich den immunhistologischen Nachweisen für Kollagene Typ I und -IV ist Fibronektin in der mesangialen Matrix der nicht sklerotisierten Segmente lokalisiert. Jedoch ist seine Lokalisation in vernarbten Abschnitten der Glomeruli besonders auffällig, obgleich schwächer im Vergleich zu Kollagen Typ IV.

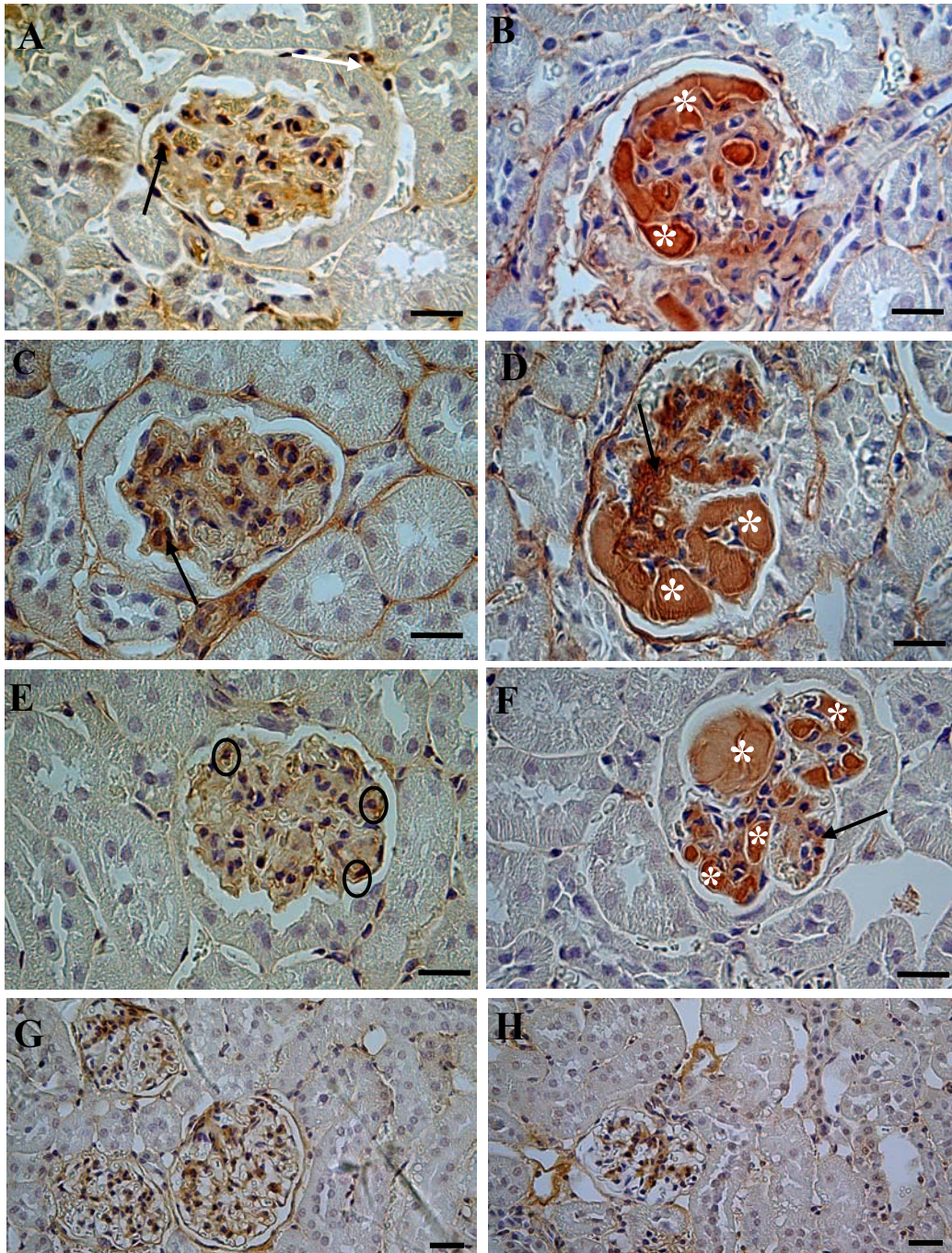


Abbildung 3-11: Lokalisation von Kollagen I, -IV und Fibronektin in UNX-Nieren.

Kollagen I ist in UNX-Nieren von Wildtyp- (A, Pfeil) und Syndecan-4-defizienten Mäusen (B, *) vorhanden. Kollagen IV wird in Wildtyp-Nieren (C, Pfeil) und verstärkt in mesangialen Strukturen der UNX-Nieren aus Syndecan-4 defizienten Mäusen synthetisiert (D, Pfeil). Fibronektin konnte in Nieren von wt- (E) und ko- Mäusen (F, *) nachgewiesen werden. In wt UNX-Nieren konnte Fibronektin um einzelnen Zellen (E, Kreise) detektiert werden. Syndecan-4 defiziente UNX-Nieren zeigen Bereiche innerhalb des Glomerulus, in welchen die Fibronektin-Proteine weniger stark akkumuliert und verteilter wirken (F, Pfeil). In Nieren ohne UNX aus Wildtyp (G) und Syndecan-4 -/- Mäusen (H) sind Kollagen IV Proteine ebenfalls im Mesangium lokalisiert. Größenmaßstab jeweils 20 µm. wt = Wildtyp, ko = Knockout.

Insgesamt konnte mit Hilfe histochemischer Färbemethoden sowie Immunfärbungen mit fibrotischen Markern dargestellt werden, dass UNX in Wildtyp-Männchen zu einer geringeren Akkumulierung fibrotischer Marker als in Syndecan-4-defizienten Männchen führt. Die Glomeruli der Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen sind durch eine deutliche Akkumulierung von Kollagen Typ I, -IV sowie Fibronektin gekennzeichnet. Insgesamt ist die Akkumulierung durch ein sklerotisches Erscheinungsbild geprägt. Die Syndecan-4-defizienten weiblichen Mäuse ähneln bezüglich ihrem histologischen Erscheinungsbild und der Verteilung fibrotischer Marker wie Kollagen Typ I, -IV und Fibronektin den männlichen Wildtyp-Mäusen (Abbildung 3-11, A, C, E).

Aus diesen Beobachtungen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass alle Syndecan-4-defizienten Männchen eine wesentlich stärkere Schädigung der Glomeruli als Folge der UNX vorweisen als dies für Wildtyp-Männchen sowie für Weibchen beider Genotypen der Fall ist. Die Schädigung ist durch eine Sklerosierung kompletter Segmente innerhalb der Glomeruli charakterisiert und stellt ein Endstadium der Erkrankung dar.

Jedoch konnten auch schwächere, aber offensichtlich sklerotische Entwicklungsformen beobachtet werden, deren Differenzierung durch lichtmikroskopische Untersuchungen nicht optimal möglich war. Zur besseren Charakterisierung sowie genaueren Unterscheidung der Pathologie von Wildtyp und Syndecan-4-defiziente Mäusen wurden UNX-Nieren männlicher Mäuse auf elektronenmikroskopischer Ebene analysiert. Zum besseren Vergleich wurden auch UNX-Nieren aus weiblichen Mäusen beider Genotypen elektronenmikroskopisch untersucht.

3.3.3 UNX-Nieren aus männlichen Syndecan-4 -/- Mäusen zeigen auf ultrastruktureller Ebene großflächige Matrixexpansionen

Auf ultrastruktureller Ebene sind in Nieren aus männlichen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen unterschiedliche pathologische Veränderungen als Folge einer unilateralen Nephrektomie erkennbar (Abbildung 3-12, A-H). In Abbildung 3-12 (A, C und E) sind die Aufnahmen der Glomeruli aus Wildtyp-Mäusen nach Nephrektomie dargestellt, die charakteristische, mesangiale Matrixablagerungen aufweisen (Abbildung 3-12, A, Rechteck). Solche Matrixablagerungen konnten in normalen Nieren nicht beobachtet werden (3.2.2). Die mesangiale Matrix erscheint hier deutlich vergrößert zu sein (Abbildung 3-12, C und E) und ist von elektronendichtem Material durchbrochen

(Abbildung 3-12, E, Pfeile). Dadurch ist an diesen Stellen die physiologische Glomerulusstruktur, bei der die Kapillarlumina durch matrixarmes Mesangium mit Mesangialzellen verbunden sind, geringfügig gestört.

Wesentlich stärker ausgeprägt ist das Bild einer mesangialen Expansion in UNX-Nieren aus Syndecan-4 -/- Mäusen (Abbildung 3-12, B, D und F). Ihre UNX-Nieren zeichnen sich durch den starken Verlust der Kapillarlumina und einer vergrößerten Mesangialfläche aus (Abbildung 3-12, B, Rechtecke). Dieser Verlust geht mit einer Ansammlung von zellfreiem, strukturlosem und gleichmäßig elektronendichtem Material einher. Dadurch ist an diesen Stellen die physiologische Glomerulusstruktur stark beeinträchtigt. Es liegt eine Ungleichverteilung von Zellen vor, die an die mesangialen Randzonen gedrängt worden sind (Abbildung 3-12, D, Pfeile). Diese Auflösung wird durch Verdickungen und Verdopplungen der Basalmembran begleitet, die sich lamelliert und eingeschnürt innerhalb des Mesangiums anhäufen (Abbildung 3-12, D). Die glomeruläre Fläche erscheint dadurch homogen und an vielen, großflächigen Stellen des Glomerulus stark verdickt (Abbildung 3-12, D und F). Dies führt in Verbindung mit GBM-Verdickungen zur Obstruktion der Kapillarlumina. Die an der GBM entstehenden Verdickungen bilden großflächige Erweiterungen, die sich schlingenartig in die extrazelluläre Matrix erstrecken. Sie sind nodulär um die wenig vorhandenen Mesangialzellen angeordnet (Abbildung 3-12, F). Diese verdickten Flächen enthalten keine Kollagenfibrillen (Abbildung 3-12, F), die bei höheren Vergrößerungen erkennbar sind (Abbildung 3-12, G). Im Gegensatz zu den Bereichen der expandierten Matrices in UNX-Glomeruli aus Wildtyp-Männchen, sind diese extrem stark verdickten und sehr großflächigen Bereiche (Abbildung 3-12, F) weniger durch das Auftreten von elektronendichtem Material durchbrochen (Abbildung 3-12, E, Pfeile). Demnach ist als einzige Gemeinsamkeit von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen nach Nephrektomie eine mesangiale Expansion festzustellen. Diese ist jedoch in UNX-Glomeruli von Syndecan-4-defizienten Mäusen deutlich großflächiger, homogener und nicht durch Einlagerungen von elektronendichtem Material unterbrochen. Außerdem ist dieses pathologische Bild durch einen stark invasiven Charakter gekennzeichnet. Dadurch werden die Kapillarlumina komprimiert und nahezu verdrängt. Dies führt zu einer großflächigen Beschädigung der Glomerulusstruktur und Aufhebung der Glomerulus-Integrität. In beiden Genotypen sind im Bereich der expandierten Matrix Verschmelzungen der Podozytenfüßchen sowie die Zunahme der Füßchen-Durchmesser sichtbar (Abbildung 3-12, E und F Blockpfeile). Insgesamt scheint

die UNX-Niere der Syndecan-4-defizienten Mäuse wesentlich stärker von der unilateralen Nephrektomie betroffen zu sein. Die Akkumulierungen in den Glomeruli aus Syndecan-4-defizienten Mäusen sind wesentlich großflächiger. Außerdem sind die Glomeruli durch die komprimierten Kapillaren und die strukturellen Auflösungen extrem beschädigt.

Aus einer Wildtyp-Maus wurde eine hydronephrotische Niere exzidiert. Die RK war wahrscheinlich bereits vorbelastet und wurde dennoch als so genannte Doppelt-Negativkontrolle gleichermaßen untersucht. In keiner der durchgeführten Untersuchungen konnten in der renalen Pathologie nach Nephrektomie Ähnlichkeiten zwischen dieser Wildtyp-Maus und den Syndecan-4-defizienten Mäusen entdeckt werden. Das ultrastrukturelle Erscheinungsbild dieser vorbelasteten UNX-Niere aus der Wildtyp-Maus entsprach bezüglich der oben dargestellten Charakteristika genau dem der anderen Wildtyp-Mäuse.

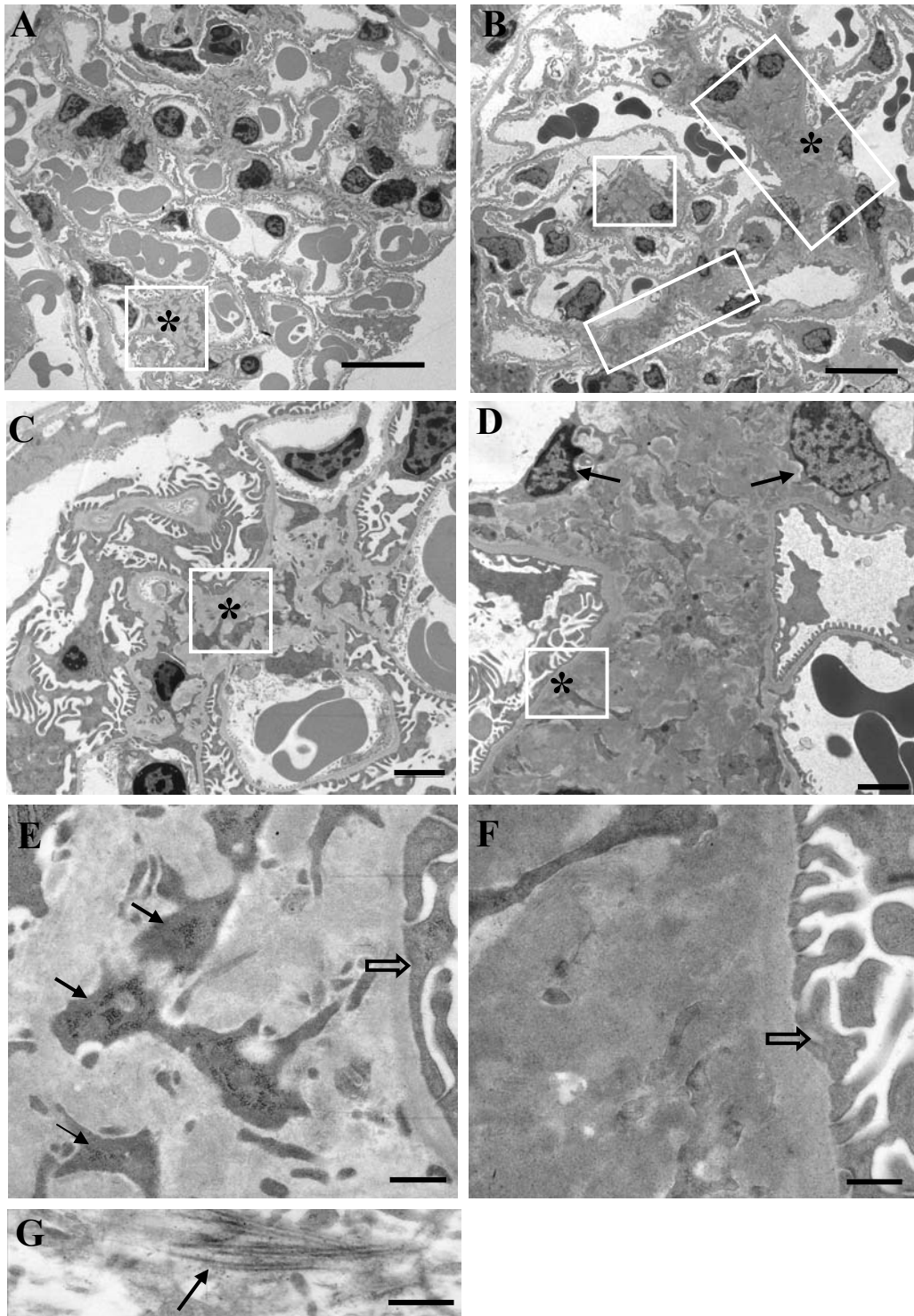


Abbildung 3-12: Syndecan-4 ^{-/-} UNX-Nieren weisen starke mesangiale Expansionen auf.

Wildtyp UNX-Nieren zeigen eine leichte Akkumulation von Matrixmaterial (A, Rechteck), wodurch in diesem Bereich die normale Struktur der Glomeruli geringfügig gestört ist (C,*). In diesen Matrixexpansionen ist elektronendichtes Material eingelagert (E, Pfeile). Außerdem zeigen die Podozytenfüßchen Verschmelzungen (E und F, Blockpfeile). UNX-Nieren aus Syndecan-4 ^{-/-} Mäusen sind durch eine extrem großflächige Akkumulation von homogenem Material (B, Rechtecke) gekennzeichnet, in denen die Zellen an die Randzonen gedrängt wurden (D, Pfeile). Diese verdickten, nodulären Regionen enthalten keine Kollagenfibrillen (F), welche bei gleichen Vergrößerungen erkennbar sind (G, Pfeil). Größenmaßstab in (A) und (B) jeweils 10 µm, in (C) und (D) jeweils 2 µm und in (E), (F) und (G) jeweils 500 nm. Kästen mit * zeigen die ausgewählten Bereiche für die Vergrößerungen.

3.3.4 UNX-Nieren aus weiblichen Syndecan-4 +/+ und Syndecan-4 -/- Mäusen zeigen keine ultrastrukturellen Unterschiede

Die ultrastrukturelle Analyse von UNX-Nieren aus weiblichen Wildtyp sowie Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigt bei guter Strukturierung der Glomeruli keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Abbildung 3-13, A und B). Es gibt keine Indizien für eine erhöhte Matrixexpansion (Abbildung 3-13, C und D). Bei höheren Vergrößerungen sind mesangiale Strukturen zu erkennen, welche von elektronendichtem Material durchbrochen werden (Abbildung 3-13, C und D, Pfeile). Insgesamt wirken diese geringfügigen Veränderungen nicht pathologisch (Abbildung 3-13, E und F). Gegenüber männlichen UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen liegen hier die Zellen im Mesangium zueinander eng benachbart. Eine genauere Untersuchung der Podozytenfüßchen weist ebenfalls keine anormalen Kennzeichen auf. Folglich hatte die unilaterale Nephrektomie die Integrität der Glomeruli weiblicher Mäusenieren beider Genotypen nicht beschädigt.

Zusammengefasst zeigen die UNX-Nieren aus weiblichen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen keine signifikanten histomorphologischen Unterschiede und unterscheiden sich auch ultrastrukturell nicht voneinander. Im Gegensatz zu UNX-Nieren Syndecan-4-defizienter männlicher Mäuse sind kaum expandierte Matrixablagerungen und keine GBM-Verdickungen zu erkennen.

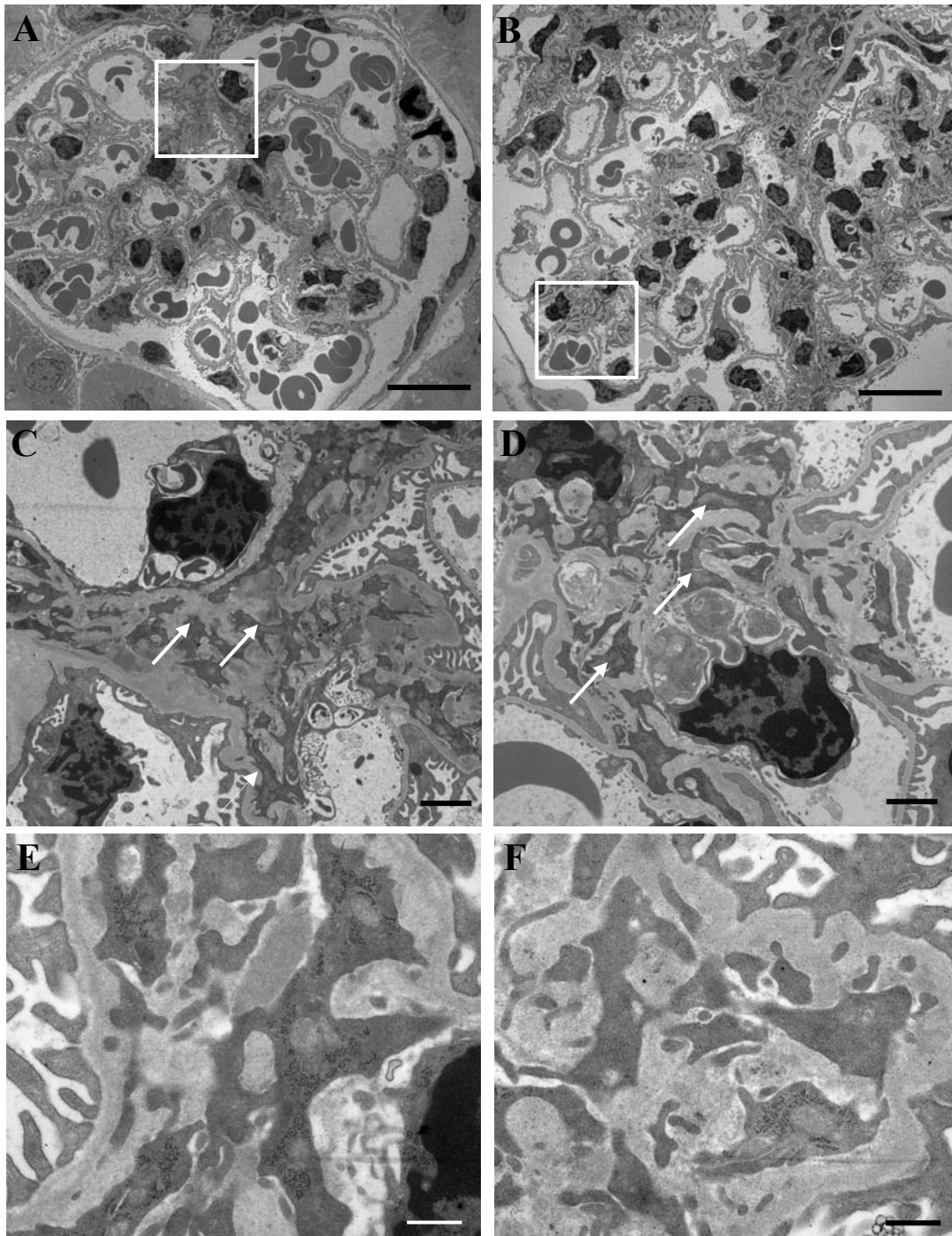


Abbildung 3-13: UNX-Nieren aus weiblichen Wildtyp und Syndecan-4-knockout Mäusen weisen keine ultrastrukturellen Unterschiede auf.

UNX-Nieren aus weiblichen Wildtyp- (A und C) sowie Syndecan-4-defizienten Mäusen (B und D) zeigen keine markanten Veränderungen in Folge der Nephrektomie. Bei höheren Vergrößerungen sind mesangiale Matrixbereiche sowohl aus Wildtyp- (C, Pfeile) als auch aus Syndecan-4 defizienten Mäusen (D, Pfeile) durch Einlagerungen von elektronendichtem Material gekennzeichnet. E) und F) zeigen eine starke Durchsetzung des Mesangiums mit elektronendichtem Material. Größenmaßstab in (A) und (B) jeweils 10 μ m, in (C) und (D) jeweils 2 μ m und in (E) und (F) jeweils 500 nm. Kästen zeigen die ausgewählten Bereiche für die Vergrößerungen.

Die mesangialen Bereiche entsprechen in ihrem Erscheinungsbild hingegen denen der Wildtyp-Männchen und sind von elektronendichtem Material durchbrochen. Signifikante Veränderungen der Glomerulusstruktur sowie Schädigungen der UNX-Nieren konnten ausschließlich bei männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen beobachtet werden.

3.3.5 Biochemische Untersuchung der Glomerulopathie in Syndecan-4-defizienten Mäusen nach unilateraler Nephrektomie

In vielen Nierenerkrankungen sowie inflammatorischen Vorgängen spielt *alpha smooth muscle* (α -SMA) Aktin eine wichtige Rolle. Dessen Expression wird durch den profibrotischen Mediator TGF- β 1 beeinflusst und ist in vielen renalen Erkrankungen erhöht. TGF- β 1 induziert die Bildung verschiedener fibrotischer Markerproteine wie Kollagen Typ I, -II, -IV, Fibronektin und α -SMA. Da TGF- β 1 eine Schlüsselstellung einnimmt und seine anhaltende, erhöhte Expression den fibrotischen Verlauf einer Nephropathie maßgeblich beeinflusst, wurden TGF- β 2 sowie TGF- β 3, deren Funktion in dem Krankheitsbild der Nephrektomie nicht geklärt ist, nicht untersucht (Yu et al., 2003).

3.3.5.1 UNX-Nieren aus männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigen im Vergleich zu männlichen Wildtyp-Mäusen erhöhte TGF- β 1 Proteinmengen

Zur Überprüfung, ob eine UNX die Expression von TGF- β 1 und α -SMA beeinflusst, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. α -SMA Protein läuft bei einer Bandenhöhe von 42 kDa. TGF- β 1 wird als Homodimer bei 25 kDa detektiert. Als Vorläuferform läuft TGF- β 1 bei ~40 kDa. Die Analyse der Proteinexpression von TGF- β 1 und α -SMA in UNX-Nieren wurden herangezogen, um eine mögliche Ätiologie der ultrastrukturellen Veränderungen heraus zu finden. Die Erhöhung der beiden Markerproteine könnte einen möglichen Signalweg über TGF- β 1, der in den UNX-Nieren der männlichen Syndecan-4-defizienten Mäuse beeinträchtigt sein könnte, implizieren. Die Western Blot Ergebnisse für TGF- β 1 zeigen in allen Proteinextrakten eine spezifische Bande bei 25 kDa. (Abbildung 3-14, A). Für eine densitometrische Auswertung der TGF- β 1 Banden für die einzelnen Proben wurden die einzelnen Bandenintensitäten gemessen. Analog wurden die Signalstärken aller Proteinbanden nach einer Amidoschwarzfärbung der Blotmembran

quantifiziert. Aus den ermittelten Werten wurde der Quotient aus Signalstärken und Proteinbanden errechnet. Anschließend wurden sowohl für Wildtyp- als auch Syndecan-4-defiziente Mäuse jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Quotienten gebildet und einem zweiseitigen T-Test unterzogen. UNX-Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäuse haben höhere Expressionswerte für TGF- β 1 (Abbildung 3-14) als die UNX-Nieren der Wildtyp-Mäuse. Sechzig Tage nach Nephrektomie zeigen die UNX-Syndecan-4-knockout Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen eine 1,4-fach höhere Menge des Zytokins TGF- β 1 ($p=0,04$, Abbildung 3-14).

Die α -SMA Protein wurde in den UNX-Nieren beider Genotypen gleich stark produziert (Abbildung 3-14). Eine UNX-Wildtyp Maus hatte eine deutlich höhere Signalstärke (Abbildung 3-14, B, *) für die α -SMA Expression als alle übrigen untersuchten UNX-Mäuse. Aus dieser Maus wurde eine hydronephrotische Niere entfernt, die RK wurde als doppelte Negativkontrolle bei allen Experimenten mitgeführt. Diese Niere zeigte in keiner zuvor durchgeführten Untersuchung Auffälligkeiten, die sich von den anderen Wildtyp-Mäusen unterschieden. Im Immuno-Blot für die α -SMA Expression liegt der densitometrisch ermittelte Wert für die Signalstärke im Verhältnis zu Gesamtproteinmenge bei 0,53. Dieser Wert wurde in die Berechnung der Mittelwerte für die Expressionsstärken mit einbezogen. Laut densitometrischer Auswertung liegt zwischen den Syndecan-4-defizienten und Wildtyp-Nieren bezüglich der α -SMA Expression kein signifikanter Unterschied ($p=0,8$) vor.

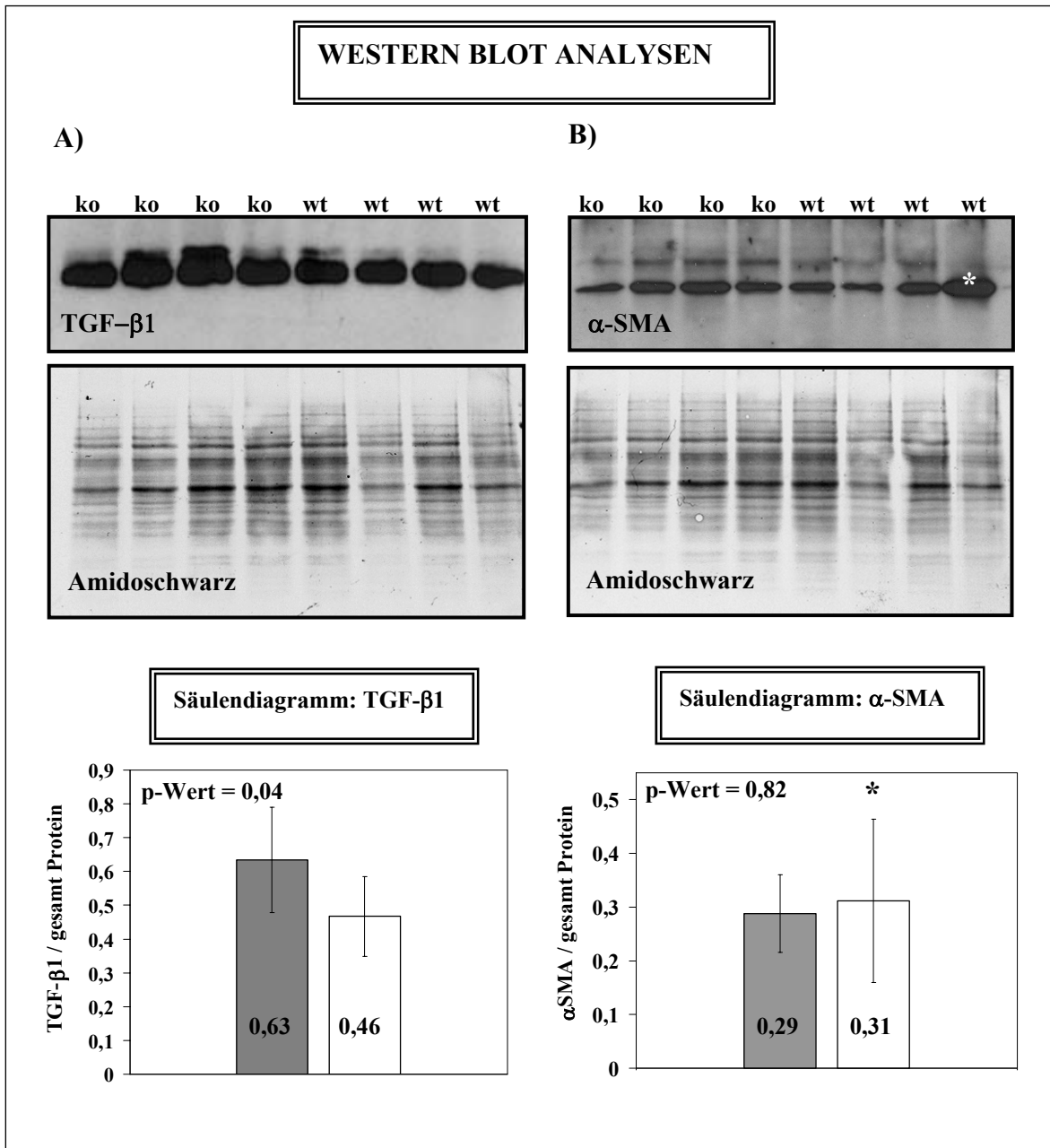


Abbildung 3-14: TGF-β1 ist in UNX-Nieren aus Syndecan-4-/- erhöht, α-SMA hingegen unverändert.

Proteinextrakte wurde mittels Elektrophorese in 12,5 %igen SDS-Gelen aufgetrennt.

A) TGF-β1(R&D Systems, monoklonal Maus anti-Maus) wird in allen UNX-Nieren exprimiert. Amidoschwarzfärbung der Blotmembran diente zur Ladungskontrolle.

B) α-SMA (Sigma, monoklonal, Maus anti-Maus) wird ebenfalls in allen Proben detektiert.

TGF-β1 wird in Syndecan-4-defizienten UNX-Nieren (graue Balken) im Vergleich zu Wildtyp-Nieren (weiße Balken) 1,4 fach (p-Wert = 0,04) mehr gebildet (A, Säulendiagramm). Die α-SMA Expression zeigt hingegen keinen signifikanten Unterschied (p-Wert = 0,8). Die höchste Expression ist für eine Wildtyp-Maus (*) detektierbar (0,53), aus welcher eine hydronephrotische Niere exzidiert wurde. wt = Wildtyp, ko = Knockout.

3.3.6 Verteilung der Syndecane in nephrektomierten Nieren

Zur Untersuchung der Expression und Funktion von Syndecanen in nephrektomierten Nieren aus Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen wurden immunhistochemische Färbungen, in situ-Hybridisierungen sowie biochemische Methoden wie Western Blotting und *Real time* PCR durchgeführt. Bisherige Hinweise aus der Literatur zur Expression der Syndecane in renalen Erkrankungen beschränken sich auf Untersuchungen von *Yung et al.* sowie *Ishiguro et al.* (Ishiguro et al., 2001b; Yung et al., 2001). In der proliferativen IgA-Erkrankung konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Syndecan-4 mRNA und Protein vorliegt (Yung et al., 2001), die vorwiegend im glomerulärem Mesangium detektiert wurde.

Bei einer durch ein Nephrotoxin verursachten, obstruktiven Nephropathie stellte sich heraus, dass Syndecan-4-defiziente Mäusen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der nephrotoxischen Substanz zeigten (Ishiguro et al., 2001b). Eigene Untersuchungen an nephrektomierten Syndecan-4-defizienten Mäusen (s. Kapitel 3.3.1-3.3.5) verdeutlichen, dass Syndecan-4-defiziente Mäuse auf die mit der Nephrektomie einhergehenden klinischen, zellulären und proteinbiochemischen Veränderungen mit einem pathologischen Phänotyp reagieren. Wohingegen nach unilateraler Nephrektomie nicht dasselbe pathologische Bild für Wildtyp-Mäuse beobachtet wurde. Bisher ist keine Publikation vorhanden, die zeigte, inwiefern die Expression der anderen Syndecan-Familienmitglieder von einer Nephropathie in Syndecan-4-defizienten Mäusen betroffen sind.

3.3.6.1 Syndecan-2 Proteine und mRNA sind in Glomeruli von Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen nachweisbar

Nach unilateraler Nephrektomie konnte mittels immunhistochemischer Färbungen mit Diaminobenzidin ausschließlich in Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen, insbesondere in einer akkumulierten Form in den sklerotischen Glomeruli der männlichen Syndecan-4-defizienten Mäuse, eine verstärkte Syndecan-2 Expression auf Proteinebene detektiert werden. Im Gegensatz zu Syndecan-4-defizienten Mäusen enthielten die Glomeruli der Wildtyp-Mäuse nach Nephrektomie keine Syndecan-2 Proteine (Abbildung 3-15, A und B, Blockpfeile). Alle bisher untersuchten Glomeruli aus Wildtyp-Mäusen nach unilateraler Nephrektomie zeigten Syndecan-2 Proteine in tubulären, jedoch nicht in

glomerulären Strukturen (Abbildung 3-15, B, Pfeil). Syndecan-2 ist hingegen sowohl in glomerulären als auch in tubulären Strukturen der UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen lokalisiert. Die Anfärbung für Syndecan-2 ist in den Glomeruli besonders deutlich (Abbildung 3-15, C-E). In den Glomeruli der Syndecan-4^{-/-} Männchen zeigen insbesondere die nodulären, sklerotischen Bereiche eine intensive Färbung für Syndecan-2 Proteine. Daher erscheint Syndecan-2 in diesen sklerotischen Nodi akkumuliert zu sein. Anschließend wurde überprüft, ob ein Teil dieser akkumulierten Syndecan-2 Proteine von der Plasmamembran proteolytisch abgespalten sein könnte. Durch die als *Shedding* bezeichnete Abspaltung des extrazellulären Anteils des Moleküls wird ein Syndecan-2-Neoepitop bestehend aus der extrazellulären Domäne erzeugt, das mit einem entsprechenden, von Guido David (University of Leuven, Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellten, Antikörper detektiert werden kann. Eine immunhistochemische Untersuchung mit diesem Antikörper gegen Syndecan-2 bestätigte, dass Syndecan-2 in den Glomeruli vorhanden ist (Abbildung 3-15, E). Anfärbungen mit diesem Antikörper gegen die Ektodomäne von Syndecan-2 zeigen eine punktuelle Verteilung der positiven Signale in den sklerotischen Nodi von Syndecan-4-defizienten Glomeruli (Abbildung 3-15, E).

Zusammenfassend sprechen die Färbungsergebnisse für eine Syndecan-2 Lokalisation in den Glomeruli der Syndecan-4-defizienten Mäuse. Diese ist in den sklerotischen Bereichen der Glomeruli von Syndecan-4-defizienten Männchen besonders intensiv. Im Gegensatz dazu zeigen die Wildtyp UNX-Nieren keine erhöhte Expression für Syndecan-2 nach Nephrektomie. In allen untersuchten UNX-Nieren von Wildtyp-Mäusen beider Geschlechter ist Syndecan-2 jedoch in einzelnen tubulären Strukturen erkennbar.

Gleichzeitig wurde mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung untersucht, ob Syndecan-2 mRNA in UNX-Nieren von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen vorhanden ist. *In situ*-Hybridisierungen sprechen für eine Syndecan-2 Expression in UNX-Nieren von Knockout-Mäusen (Abbildung 3-15, F). In den sklerotischen Nieren sind in verschiedenen Zellen Syndecan-2 Transkripte erkennbar (Abbildung 3-15, F, Pfeile). Aufgrund der großflächig zerstörten Struktur dieser sklerotischen Glomeruli ist eine eindeutige Benennung der Zellen nicht möglich. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um Mesangialzellen.

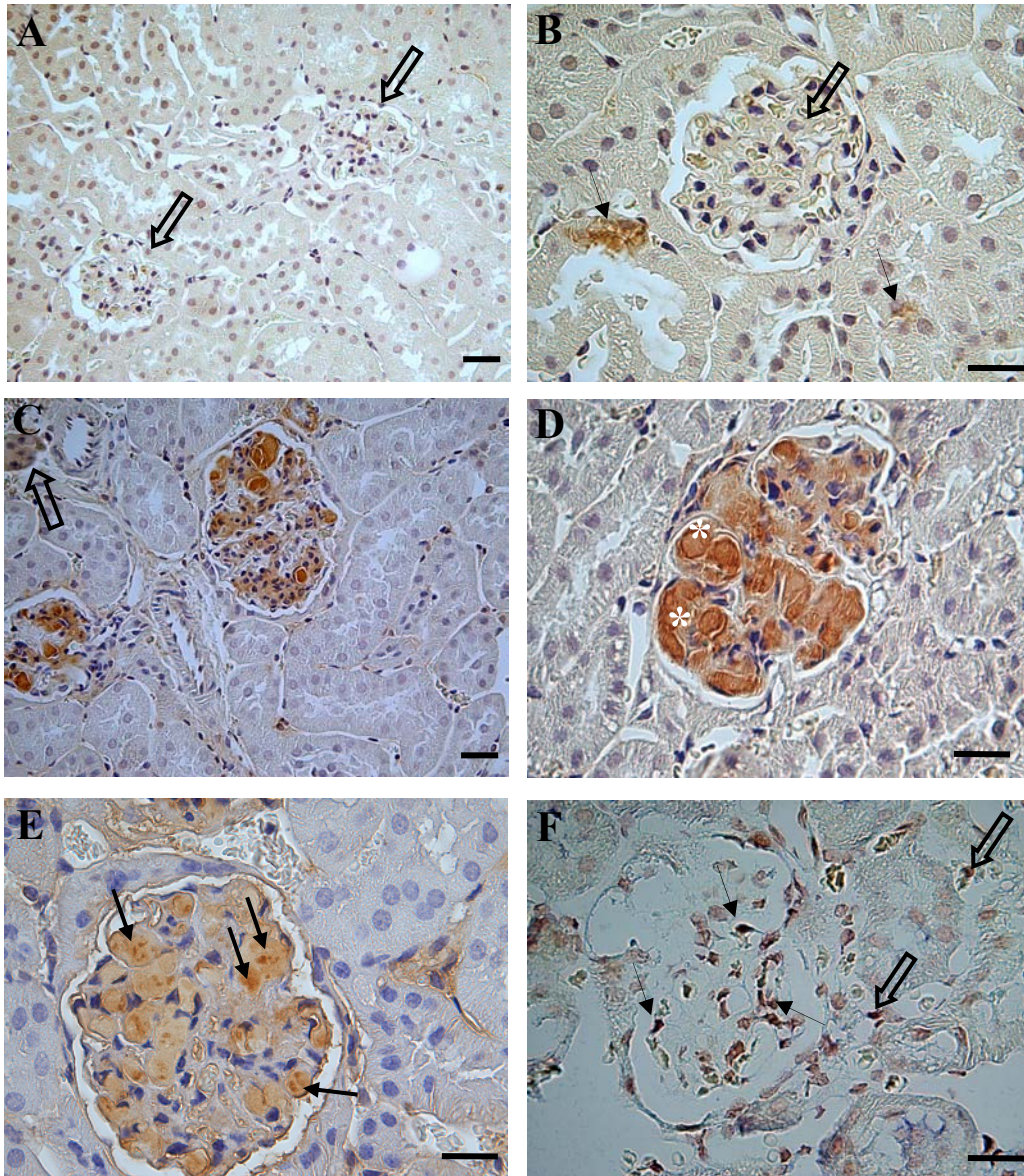


Abbildung 3-15: Syndecan-2 wird in den Glomeruli der UNX-Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen detektiert.

UNX-Wildtyp Nieren aus männlichen Mäusen zeigen keine glomeruläre Anfärbung für Syndecan-2 Proteine (A, Blockpfeile). In Tubuli der UNX-Nieren aus Wildtyp-Männchen ist dagegen das Zytoplasma positiv angefärbt (B, Pfeil). In den Glomeruli der UNX-Knockout Männchen (C und D) sind besonders intensive Anfärbungen in den sklerotischen Nodi (D,*) sichtbar. Auch einzelne Tubuli sind positiv für Syndecan-2 Proteine markiert (C, Blockpfeil). Anfärbungen mit einem monoklonalen Syndecan-2 (AK von Guido David) Antikörper gegen die *gshedde* Ektodomäne bestätigten vorherige Befunde und zeigten eine eher punktuelle Anfärbung in den Glomeruli (E, Pfeile). F) In situ-Hybridisierungen mit DIG cRNA *antisense*-Sonde für Syndecan-2 in Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen. Positive Signale (rötliche Kernfärbungen) für Syndecan-2 mRNA sind in Zellen um diese Nodi (F, Pfeile) sowie in interstitiellen Zellen (Blockpfeile) vorhanden. Größenmaßstab jeweils 20 µm.

In Abbildung 3-16 sind immunhistochemische Färbungen an weiblichen UNX-Mäusen dargestellt. Die Syndecan-4-defizienten weiblichen Mäuse zeigen deutliche Anfärbungen für Syndecan-2 Proteine in ihren Glomeruli (Abbildung 3-16, B) nach einer unilateralen Nephrektomie. Im Gegensatz dazu sind keine Anfärbungen in den UNX-Nieren aus weiblichen Wildtyp-Mäusen sichtbar (Abbildung 3-16, A). Da weibliche Syndecan-4-defiziente Mäuse keine Glomerulopathie als Folge einer UNX entwickeln, ist eine Differenzierung der Zellen, die positiv für Syndecan-2 Proteine angefärbt sind, möglich. In weiblichen Syndecan-4-defizienten Mäusen ist das Mesangium positiv für Syndecan-2 Protein (Abbildung 3-16, B, Pfeile) angefärbt. Außerdem sind auf der Zelloberfläche von Mesangialzellen positive Signale für Syndecan-2 Proteine sichtbar (Abbildung 3-16, B, Blockpfeile).

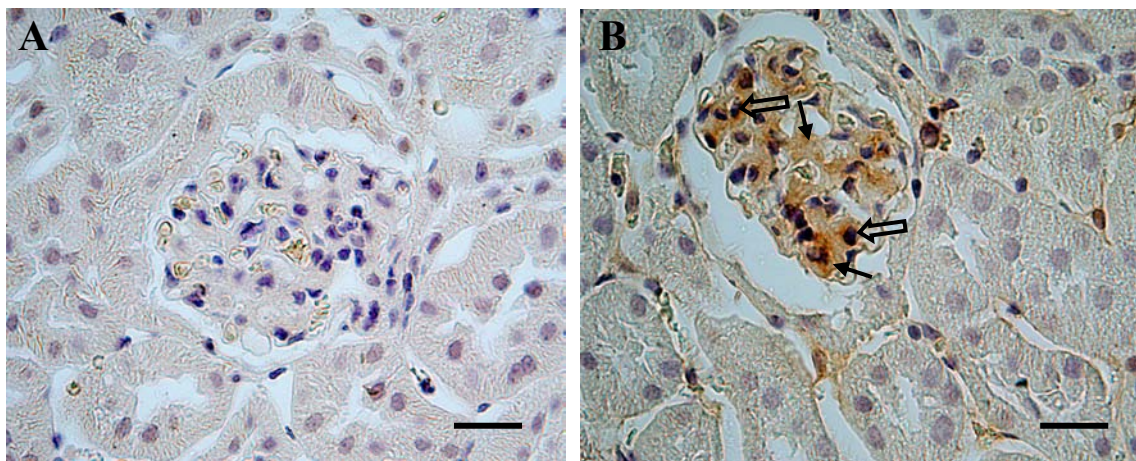


Abbildung 3-16: Glomeruläre Syndecan-2 Proteinexpression in der weiblichen UNX-Niere aus Knockout-Mäusen.

Immunhistochemische Färbung der UNX-Nieren aus weiblichen Wildtyp- (A) und Knockout-Mäusen (B) mit einem Syndecan-2 Antikörper (Santa Cruz). Färbung mit Diaminobenzidin (braun). Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). UNX-Nieren aus weiblichen Wildtyp-Mäusen zeigen keine glomeruläre Expression für Syndecan-2 Proteine (A). Im Gegensatz dazu sind die Nieren weiblicher Syndecan-4-defizienter Mäuser im glomerulären Mesangium (B, Pfeile) angefärbt. Überdies sind die Zelloberflächen der Mesangialzellen positiv für Syndecan-2 markiert (B, Blockpfeile). Größenmaßstab jeweils 20 µm.

Insgesamt zeigen diese Resultate, dass die Synthese von Syndecan-2 in UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen beider Geschlechter sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte.

3.3.6.2 Die Syndecan-2 Proteinexpression ist in UNX-Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen erhöht

Für Western Blot Untersuchungen der Syndecan-2 Expression wurden jeweils 1 mm große Nierenstücke der UNX-Mäusen in einem 1x TBS-Puffer mit 0,1 % BSA und Proteaseinhibitoren (Roche Complete) homogenisiert. Dieser Puffer sollte lediglich die löslichen Anteile der Syndecan-2 Proteine extrahieren. Zur Überprüfung der Expression von Syndecan-2 in seiner *geshreddeten* Form wurden Proteinextrakte aus UNX-Nieren beider Genotypen elektrophoretisch in einem SDS-Gradientengel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Anschließend wurden die Blotmembranen mit einem monoklonalen Syndecan-2 Antikörper (Guido David), der gegen die *geshreddete* Ektodomäne gerichtet ist und bereits in der Immunhistochemie benutzt werden konnte (Abbildung 3-15, E), inkubiert. In allen aufgetragenen Proteinproben der UNX-Nieren aus Wildtyp- und Knockout-Mäusen erkennt der Antikörper eine Bande bei 200 kDa. Unterschiede in der Expressionsstärke sind deutlich zu erkennen. Zur Ladungskontrolle wurden parallel zwei Gradientengele durchgeführt, die mit gleichen Proteinmengen beladen waren. Ein Gradientengel wurde für die Immuno-Blot Analyse zur Detektion der löslichen Syndecan-2 (*geshreddeten*) Ektodomänen (Abbildung 3-17, A), das zweite hingegen für eine Coomassie-Brilliant Blau Färbung (Abbildung 3-17, B), die als Ladungskontrolle herangezogen wurde, genutzt. Nach densitometrischer Auswertung der Signalstärken der Syndecan-2 Banden im Western Blot und der Proteinbanden im Coomassie-Gel, wurde jeweils der Quotient aus deren Verhältnis gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert dieser Quotienten ermittelt, um danach im zweiseitigen T-Test den p-Wert zu berechnen. Die ermittelten Werte wurden als Säulendiagramm (Abbildung 3-17, C) zusammengefasst und verdeutlichen eine bis zu zweifach erhöhte Syndecan-2 Proteinmenge in löslichen Fraktionen aus Syndecan-4-defizienten UNX-Nieren im Vergleich zu Wildtyp-Nieren (p-Wert = 0,019).

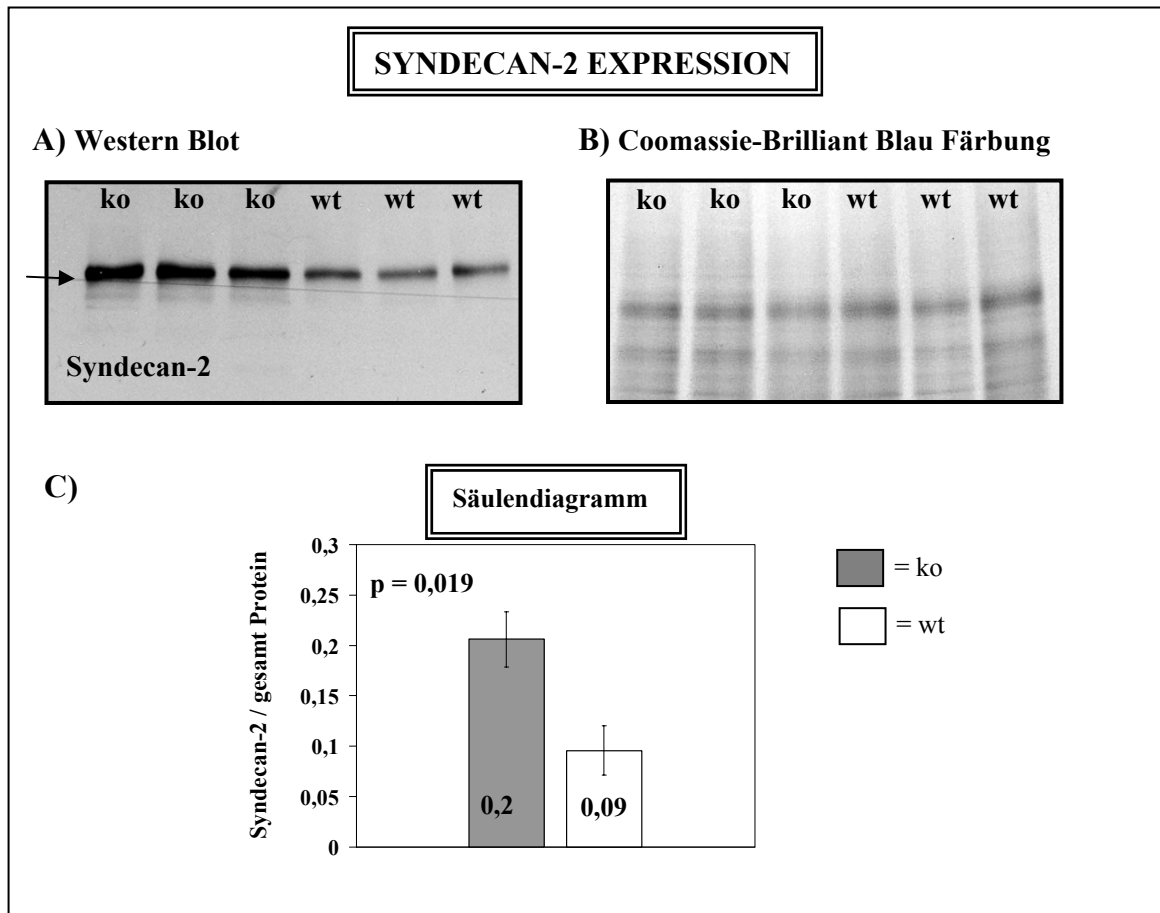


Abbildung 3-17: Syndecan-2 Proteinmengen sind in UNX-Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen erhöht.

A) Western Blot Analyse zur Detektion der Syndecan-2 Expression in seiner *gesheddeten* Form. Gradientengel (5-15 %) zur Auftrennung der Proteinextrakte (AK: Guido David, monoklonal Maus anti-Maus, 1:5.000).

B) Coomassie-Gel mit gleichen Proteinmengen zur Ladungskontrolle.

C) Säulendiagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede für lösliche Syndecan-2 Proteine in UNX-Nieren aus Wildtyp- (weißer Balken) und Knockout-Mäusen (grauer Balken). Syndecan-2 Proteine werden um ein Zweifaches mehr in Syndecan-4-defizienten UNX-Nieren (p-Wert = 0,019) als in Wildtyp UNX-Nieren exprimiert. wt = Wildtyp, ko = Knockout-Maus.

3.3.6.3 Eine erhöhte Syndecan-2 Expression in UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen ist auf RNA-Ebene nachweisbar

Die Quantifizierung von Syndecan-2 mRNA erfolgte mit Hilfe einer *Real time* PCR (s. 3.2.4). Die Werte für die Wildtyp-Nieren wurden gleich 1 gesetzt. Anschließend wurden alle weiteren Werte aus der *Real time* PCR darauf normiert. Abbildung 3-18 zeigt, dass die Expression für Syndecan-2 mRNA variiert. Die Expression ist in UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen (Abbildung 3-18, B und C, graue Balken) im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen (Abbildung 3-18, B und C, weiße Balken) deutlich erhöht. Die Expression in den Wildtyp UNX-Nieren von weiblichen und männlichen Mäusen (Abbildung 3-18, B und C, weiße Balken) ist im Vergleich zu normalen (unbehandelten) Nieren leicht reduziert. In weiblichen Wildtyp-Mäusen ist Syndecan-2 mRNA um fünfzig Prozent, in männlichen Wildtyp Mäusen hingegen um zwanzig Prozent als Folge der Nephrektomie erniedrigt. Im Gegensatz dazu zeigen die Syndecan-4-defizienten Mäuse beiderlei Geschlechts eine wesentlich höhere Syndecan-2 Expression.

Den höchsten Wert für Syndecan-2 mRNA erhält man für Syndecan-4-defiziente UNX-Männchen. Unilateral nephrektomierte Syndecan-4-defiziente Männchen zeigen eine 6,8fach höhere Expression (Abbildung 3-18, B, graue Balken) in Relation zum Normwert (Abbildung 3-18, weißer Balken). Gleichzeitig sind die Syndecan-2 mRNA-Mengen auch in weiblichen Syndecan-4-defizienten Mäusen (Abbildung 3-18, C, grauer Balken) 4,6fach höher als der Normwert (Abbildung 3-18, A, weißer Balken). Die *Real time* PCR Daten korrelieren mit der durchgeführten Immunhistochemie für Syndecan-2 (Abbildung 3-15) sowie mit den Western Blot Ergebnissen (Abbildung 3-17) und implizieren eine erhöhte Expression für Syndecan-2 in Syndecan-4-defizienten Mäusen nach einer unilateraler Nephrektomie.

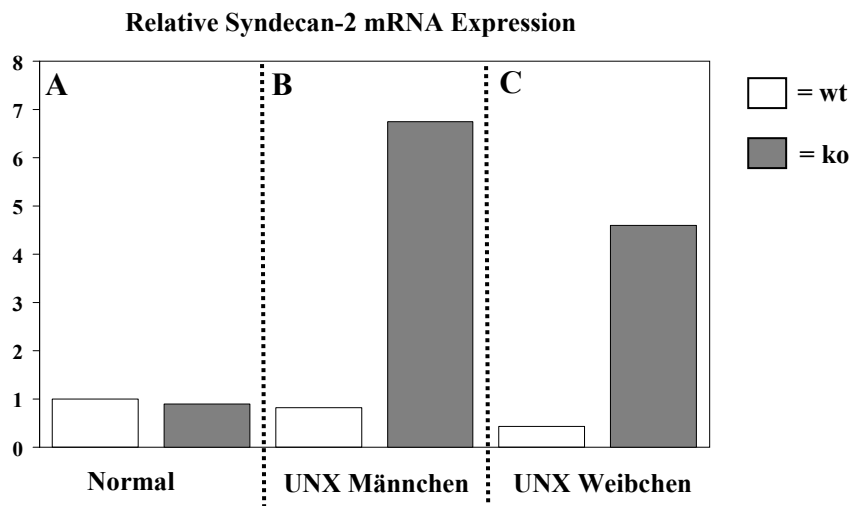


Abbildung 3-18: Syndecan-2 RNA wird in UNX-Nieren von Syndecan-4 -/- Mäusen erhöht exprimiert.

Real time PCR Daten mit spezifischen Syndecan-2 Primern. Syndecan-4 defiziente UNX-Mäuse haben erhöhte Syndecan-2 mRNA-Mengen (B und C, graue Balken). In weiblichen Syndecan-4 defizienten Mäusen ist die Menge 4,6fach (C, grauer Balken), in männlichen Mäusen hingegen 6,8fach erhöht (B, grauer Balken). Wildtyp UNX-Weibchen (C, weißer Balken) haben eine 50 % reduzierte, Männchen hingegen eine 20 % reduzierte mRNA-Menge für Syndecan-2.

Wt = Wildtyp, ko = Knockout-Maus. Der Wert für die Syndecan-2 mRNA Expression in Wildtyp-Mäusen (A, weißer Balken) wurde als Normwert gewählt.

3.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse nach unilateraler Nephrektomie von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen

- Die Anwendung der unilateralen Nephrektomie in Syndecan-4-defizienten sowie Wildtyp-Mäusen als Kontrolle führte zu einem stressbedingten renalen Phänotyp in Syndecan-4-defizienten Mäusen.
- Nach unilateraler Nephrektomie konnten sklerotische Veränderungen in den Glomeruli von Syndecan-4-defizienten Männchen beobachtet werden.
- Die auf männliche Syndecan-4-defiziente Mäuse beschränkte Glomerulopathie wurde sowohl mit Markerproteinen wie Kollagen Typ I, -IV und Fibronektin als auch ultrastrukturell untersucht.
- Zusätzlich zu diesen durch Nephrektomie bedingten Veränderungen konnte in weiblichen wie auch in männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen eine erhöhte Syndecan-2 Expression detektiert werden.
- Syndecan-2 mRNA und Proteine sind in sklerotischen Knötchen der Syndecan-4-defizienten Männchen lokalisiert.
- Diese Ergebnisse sprechen für einen genotypisch bedingten, pathologischen Phänotyp sowie eine redundante Expression von Syndecan-2 in Syndecan-4-defizienten Mäusen, die durch unilaterale Nephrektomie ausgelöst wurde.
- Ein Teil der kompensatorisch exprimierten Syndecan-2 Proteine in Syndecan-4-defizienten UNX-Nieren konnte als *gsheddetes* Syndecan-2 nachgewiesen werden.

Teil III: Anwendung der unilateralen urethralen Obstruktion an Wildtyp- sowie Syndecan-4-defizienten Mäusen

3.4 Unilaterale urethrale Obstruktion zur Erzeugung einer tubulointerstitiellen Fibrose in Wildtyp- und Syndecan-4 -/- Mäusen

In dieser Arbeit wurde zusätzlich zur unilateralen Nephrektomie ein weiteres Nierenerkrankungsmodell angewandt. Anhand dieses Modells sollte überprüft werden, ob die Syndecan-4-Defizienz einen möglichen Einfluss auf den Verlauf einer fibrotischen Nephropathie haben könnte. Dazu wurden männlichen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen, die zwei Monate alt waren, der linke Urether abgeschnürt (unilaterale urethrale Obstruktion, UUO). Diese Operationen wurden im Labor von Prof. Dr. Liliana Schäfer durchgeführt.

Nach drei, zwölf und fünfzig Tagen UUO wurden beide Nieren herauspräpariert. Die Versuchstiere wurden am Tag der Obstruktion sowie am Tag der Präparation gewogen. Das Gewicht der herauspräparierten contralateralen, nicht obstruierten Kontrollnieren, sowie der obstruierten Nieren wurde ebenfalls festgehalten. Beide Nieren wurden für histologische sowie biochemische Analysen prozessiert und auf die Entwicklung einer Fibrose hin untersucht.

In Tabelle 3-1 ist die Anzahl der Versuchstiere für die im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit durchgeführte obstruktive Nephropathie zusammengefasst.

Dauer der UUO	Wildtyp-Mäuse	Syndecan-4 -/- Mäuse
3 Tage	6	6
12 Tage	6	6
50 Tage	2	2

Tabelle 3-1: Anzahl der obstruierten Mäuse für drei, zwölf und fünfzig Tagen.

3.4.1 Die UUO-Nieren aus Syndecan-4-defizienten und Wildtyp-Mäusen gleichen sich makroskopisch

Bereits nach drei Tagen waren die obstruierten Nieren beider Genotypen mit Flüssigkeit gefüllt (Abbildung 3-19, A). Die contralateralen Nieren der Wildtyp- und Knockout-Mäuse (Abbildung 3-19, A und D) wirkten gesund und zeigten weder nach zwölf noch nach fünfzig Tagen fibrotische Merkmale. Im Gegensatz dazu war in den UUO-Nieren eine deutliche Größenzunahme sichtbar, die fünfzig Tage nach Obstruktion besonders auffällig war (Abbildung 3-19, C und F). Die obstruierten Nieren hatten mit zunehmender Obstruktionsdauer eine gelbliche Färbung angenommen und wirkten deformiert. Insgesamt jedoch waren keine makroskopischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Nieren (contralateral/obstruiert) sichtbar.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die contralateralen sowie obstruierten Nieren mit der in ihr angesammelten Flüssigkeit gewogen. Aus diesen Daten wurden unter Einbeziehung des Körpergewichts die kw/bw Indices (3.3.1.1) ermittelt. Nach der Obstruktion hatten die Mäuse mehr Gewicht in der mit Flüssigkeit gefüllten, dilatierten Niere als in der contralateralen Niere. Nach zwölf Tagen UUO war das Gewicht in den obstruierten Nieren doppelt so hoch (Abbildung 3-19). Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede der kw/bw Indices zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen festgestellt werden.

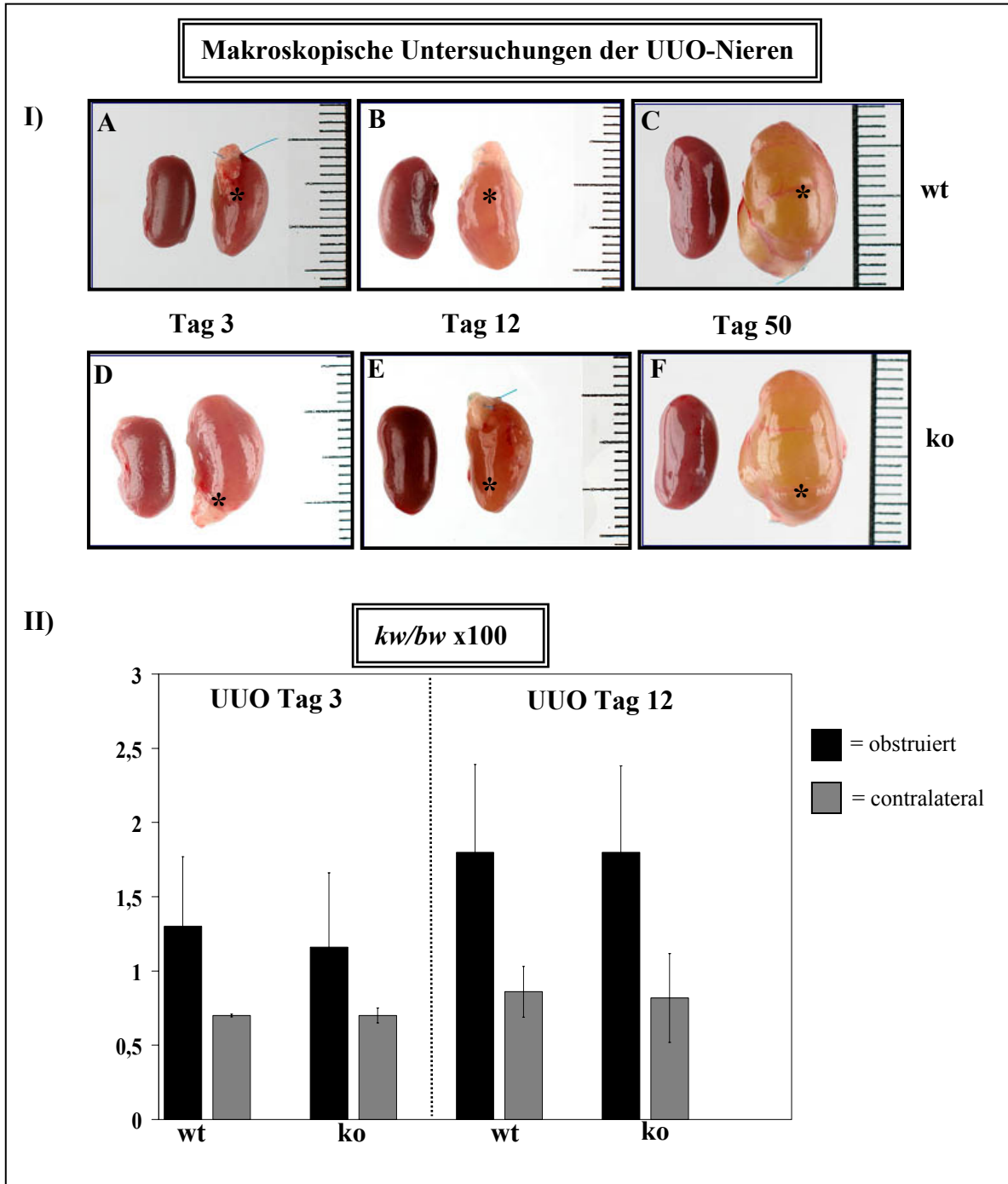


Abbildung 3-19: Contralaterale und obstruierte Nieren nach drei, zwölf und fünfzig Tagen UUO.

I) Die contralateralen Nieren von Wildtyp- (A-C) sowie Syndecan-4 defizienten Mäusen (D-E) unterscheiden sich makroskopisch nicht voneinander. Die obstruierten Nieren zeigen eine Hydronephrose (*, A-F).

II) $kw/bw \times 100$ Indices. Mittelwerte (n=6) für jeweils obstruierte (schwarze Balken) und contralaterale (graue Balken) Nieren von Wildtyp (wt) und Syndecan-4 defizienten Mäusen (ko) 3 bzw. 12 Tage post UUO. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der renalen Zunahme post UUO zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen.

3.4.2 Nieren aus Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigen nach der UUO eine ähnliche Histologie

Die unilaterale Obstruktion eines Urethers erzeugt eine tubulointerstitielle Fibrose in der obstruierten Niere (Chevalier, 2006; Eddy, 2005; Klahr und Morrissey, 2003b). Zu den charakteristischen Merkmalen einer tubulointerstitiellen Fibrose gehören die Infiltration von mononuklearen Zellen, die den inflammatorischen Prozess durch Zytokinfreisetzung verstärken, sowie die Proliferation von Fibroblasten, die auf parakrine und autokrine Faktoren reagieren und profibrotisch wirken. Des Weiteren ist die Atrophierung der Tubuli, deren äußere Form dilatiert aussieht, ein besonders auffälliges histologisches Merkmal im Lichtmikroskop obstruierter Nieren. Dies ist auf eine erhöhte Apoptose von tubulären Zellen sowie der epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung der Epithelzellen in Myofibroblasten, die in das Interstitium gelangen, zurückzuführen (Eddy, 2000; Iwano et al., 2002; Iwano und Neilson, 2004; Kalluri und Neilson, 2003; Kim et al., 2001; MacKay et al., 1989; Masszi et al., 2004).

Um Auswirkungen der Syndecan-4-Defizienz auf die tubulointerstitielle Fibrose zu untersuchen, wurden die UUO-Nieren aus Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen hinsichtlich der Zunahme an interstitiellem Volumen, atrophierender Tubuli, Infiltrationsarealen sowie einer möglichen, sekundär hervorgerufenen, Sklerotisierung der Glomeruli miteinander verglichen. Gleichzeitig wurden auch die Veränderungen in den contralateralen Nieren untersucht. Bereits drei Tage nach einer unilateralen urethralen Obstruktion sind Veränderungen in der obstruierten Niere zu erkennen, die nach zwölf Tagen noch deutlicher ausgeprägt sind (Abbildung 3-20). Die Infiltrationsherde im Interstitium sind markante inflammatorische Merkmale. In den Syndecan-4-defizienten Mäusen erscheinen die inflammatorischen Areale teilweise größer als die der Wildtyp-Mäuse (Abbildung 3-20, B). Die obstruierten Nieren aus Syndecan-4 $+/+$ und $-/-$ Mäusen zeigen eine Dilatation der Tubuli, deren Zellintegrität zusätzlich gestört ist (Abbildung 3-20, A-D), wodurch die Innenflächen der Tubuli Hohlräume aufweisen. Zugleich ist in contralateralen Nieren (Abbildung 3-20, E und F) die normale Tubulusstruktur intakt geblieben. Das Auftreten atrophierter Tubuli, deren Durchmesser fast um die Hälfte reduziert sind, ist ein weiteres Kennzeichen einer tubulointerstitiellen Fibrose. Durch diese Ereignisse der tubulointerstitiellen Fibrose sind sekundär die Glomeruli betroffen, die entweder eine Sklerose oder eine Hyperzellularität zeigen können. In einigen Fällen,

insbesondere nach einer Obstruktionsdauer von fünfzig Tagen (Abbildung 3-20, G und H) weisen die obstruierten Nieren eine verdickte Bowmansche Kapsel auf (Abbildung 3-20, H). Ein weiteres Indiz für eine tubulointerstitielle Fibrose ist die Zunahme des Bowmanschen Raums am Harn- sowie am vaskulären Pol (Abbildung 3-20, G). Das Parenchym der Nieren ist weitgehend zerstört. Tubulus-Segmente sind kaum noch differenzierbar (Abbildung 3-20, G und H). Die Tubuli enthalten fünfzig Tage post UUO glykogenhaltige bzw. glykoproteinhaltige Materialablagerungen (Abbildung 3-20, G,*). Es existieren jedoch keine auffälligen, histologischen Unterschiede in der Ausprägung der durch UUO erzeugten Fibrose zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen. Dies trifft für alle experimentell festgelegten Zeiten von drei, zwölf und fünfzig Tagen, sowohl für die obstruierte als auch contralaterale Niere zu. Eine Ausnahme stellt die Ausprägung der vergrößerten Filtrationsareale von mononuklearen Zellen dar (Abbildung 3-20, B). Diese Ausprägung variierte sowohl innerhalb der untersuchten Syndecan-4-defizienten als auch der Wildtyp-Mäuse.

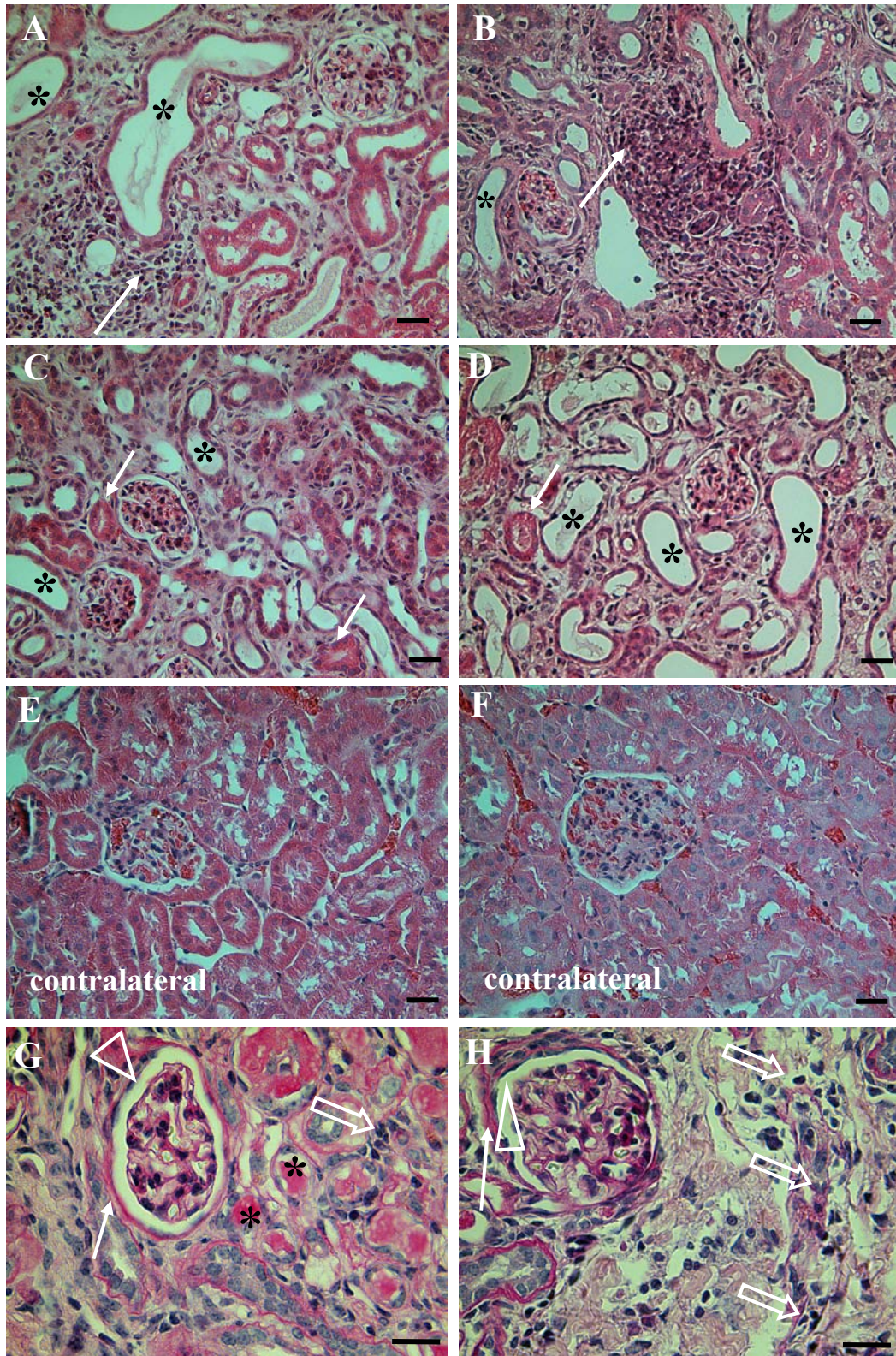


Abbildung 3-20: HE- und PAS-Färbungen von UO-Nieren.

Die obstruierten Nieren nach 3 (A und B) 12 Tagen UO (C-D) zeigen Infiltrationsherde (A und B, Pfeile) und dilatierte (A-D,*) bzw. atrophierte Tubuli (C und D, Pfeile). Die Glomerulosklerose nach 50 Tagen UO ist durch eine Verdickung der Bowmanschen Kapsel (G und H, Pfeile) oder Zunahme des Bowmanschen Raumes (G und H, Dreieck) oder dem Verlust von Tubulus-Segmenten und einer Zerstörung (Blockpfeile) des Parenchyms bestimmt. In den contralateralen Nieren aus Syndecan-4-defizienten (F) und Wildtyp-Mäusen (E) ist die Struktur der Tubuli und Glomeruli intakt. A-F: HE-Färbungen. G und H: PAS-Färbungen. Größenmaßstab jeweils 20 µm. A, C, E und G: Wt-Nieren. B, D, F und H: Ko-Nieren.

3.4.3 Biochemische Untersuchungen der Nieren von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen nach drei, zwölf und fünfzig Tagen Obstruktion

In einer renalen Fibrose ist die Differenzierung gewebeständiger Fibroblasten in Myofibroblasten, sowie die Transdifferenzierung von tubulären Epithelzellen in mesenchymalen Zellen durch den Verlust des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin und der Neoexpression von *alpha-Smooth Muscle* (α -SMA) Aktin als Markerprotein für Myofibroblastendifferenzierung und Fibrose gekennzeichnet (Kalluri et al., 1997; Klahr und Morrissey, 2002). Daher wurde in obstruierten sowie contralateralen Nieren die Expression von α -SMA Proteinen überprüft. Da der oxidative Stress in den obstruierten Nieren ansteigt und ebenfalls ein Parameter für die fibrotische Reaktion in der obstruierten Niere ist, wurde auch die Expression des hsc70 (*heat shock cognate*) Proteins untersucht (Valles et al., 2003).

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die MMP-Expression in den obstruierten Nieren der Wildtyp-Mäuse von denen der Syndecan-4-defizienten Mäuse unterscheidet. Die MMP-Expression ist in pathologischen Prozessen, wie z.B. in obstruktiver Nephropathie, durch die erhöhte Expression von TIMP-1 Proteinen blockiert. Während einer Fibrose wird vermehrt ECM, darunter insbesondere fibrilläres Kollagen Typ I und -III sowie Kollagen Typ IV, synthetisiert. Gleichzeitig entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Matrixproduktion und -degradation, da MMP-2 und MMP-9 inhibiert und daher proteolytisch nicht aktiv sind. Letztendlich führt dieses Ungleichgewicht zu einer Akkumulierung und Ablagerung von Kollagenen.

3.4.3.1 α -SMA und hsc70 Proteinmengen sind in obstruierten Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen nach einer fünfzig-tägigen UUO erhöht

Aus den obstruierten sowie contralateralen Nieren der UUO-Mäuse (3, 12 und 50 Tage) wurden Proteine extrahiert. Diese Extrakte wurden für Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen α -SMA und hsc70 sowie für Gelatine-Zymogramme zum Nachweis von MMP-2 und MMP-9 verwendet. Das Expressionsmuster für α -SMA (42 kDa) unterscheidet sich zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Nieren nach UUO von drei und zwölf Tagen nicht voneinander (Abbildung 3-21, I). Nach einer

Obstruktionsdauer von zwölf Tagen fehlt in contralateralen Nieren beider Genotypen die α -SMA-Bande. Sie ist hingegen in den contralateralen Nieren nach drei Tagen UUO noch zu erkennen. Auch in den contralateralen Proben der UUO-Nieren nach Tag fünfzig fehlt die α -SMA Bande. Die Obstruktion einer Niere führt in Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen daher nicht zu einer genotypisch bedingten, unterschiedlichen Expression von α -SMA nach drei und zwölf Tagen UUO. Im Gegensatz zu diesen Befunden ist fünfzig Tage post UUO die α -SMA Expression in obstruierten Nieren von Syndecan-4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen um das 5,6fache erhöht (Abbildung 3-21, II A). Dies gilt auch für das Hitzeschockprotein hsc70, das in den obstruierten Syndecan-4-defizienten Nieren 5,5fach erhöht vorkommt (Abbildung 3-21, II B). In den obstruierten Nieren fünfzig Tage post UUO ist das Auftreten einer α -SMA Doppelbande zu erkennen (Abbildung 3-21, II A).

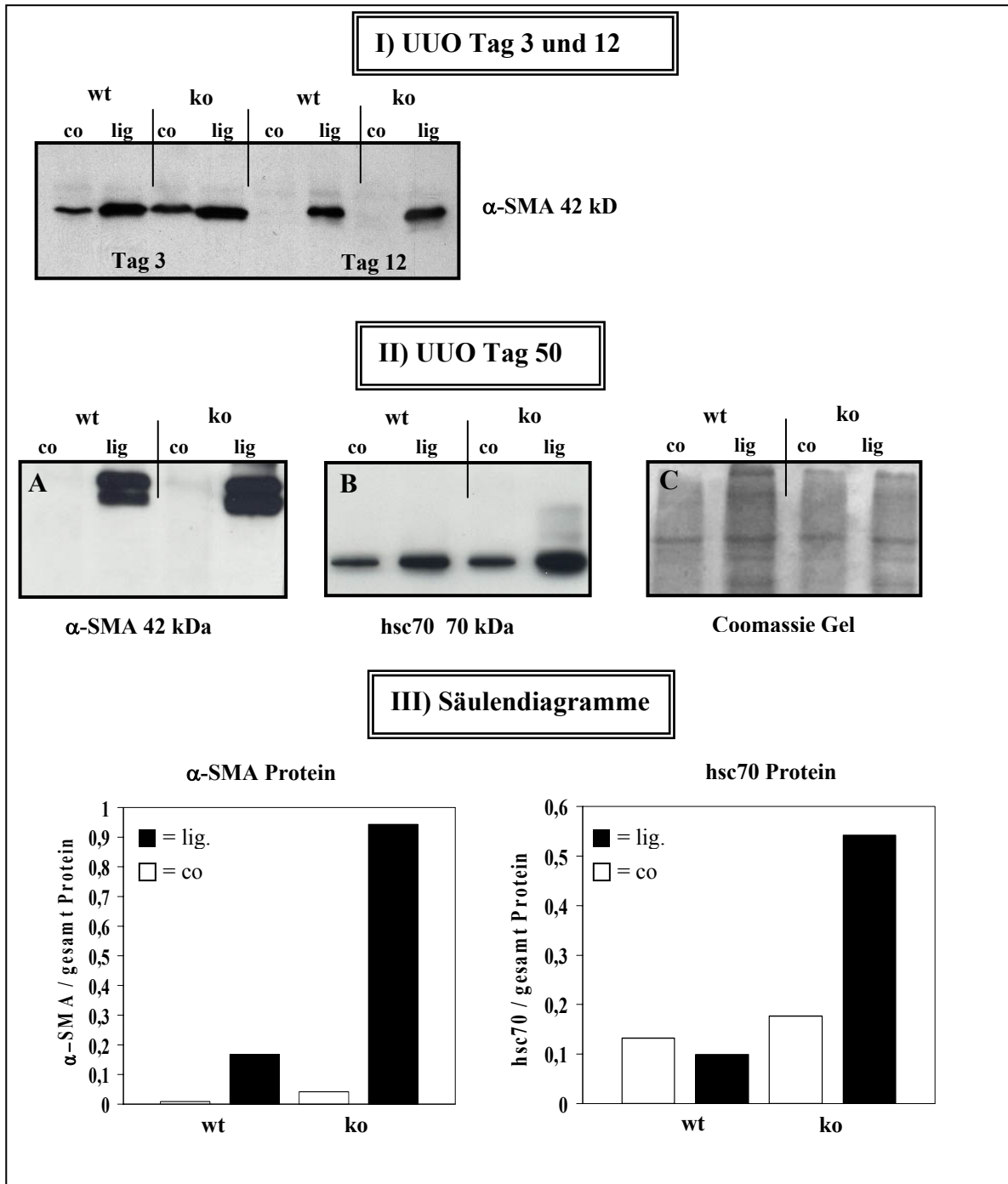


Abbildung 3-21: α -SMA und hsc70 Western Blots Analysen an UUO-Nieren.

I) α -SMA Western Blot mit Proteinextrakten 3 sowie 12 Tage post UUO. 12,5 % SDS-Gel.

AK: Abcam, polyklonal, Kaninchen anti-Maus, 1: 500.

II A) α -SMA Western Blot mit Proteinextrakten 50 Tage post UUO. 12,5 % SDS-Gel. AK: Abcam, polyklonal, Kaninchen anti-Maus, 1: 500. Es sind Doppelbanden für α -SMA vorhanden.

B) hsc70 Western Blot mit Proteinextrakten 50 Tage post UUO. 12,5 % SDS-Gel. AK: Abcam Ratte anti-Maus, 1:5000. C) Coomassie-Brilliant Blau gefärbtes SDS-Gel als Ladungskontrolle.

III) Säulendiagramme zur Darstellung der relativen Proteinexpression für α -SMA und hsc70.

wt = Wildtyp, ko = Knockout, co = contralateral, lig. = ligiert.

Die Expression der Metalloproteinasen steigt in obstruierten Nieren beider Genotypen nach drei, zwölf und fünfzig Tagen UUO an (Abbildung 3-22, I und II). Die Zymogramme zeigen, dass die Expression für MMPs in den obstruierten stärker als in den contralateralen Nieren ist. Nach drei und zwölf Tagen UUO ist ein Triplettbandenmuster in Zymogrammen zu erkennen. Die höchste Bande ist pro-MMP-2 (66 kDa). Die darauf folgende Bande bei 59 kDa entspricht MMP-2, während pro-MMP-1 bei 56 kDa läuft. Fünfzig Tage post UUO tritt ein verändertes Expressionsprofil der MMPs auf. Hier ist eine einzige Bande auf einer Höhe von 66 kDa sichtbar, die pro-MMP-2 entspricht. Somit liegt MMP-2 hier nicht aktiviert vor. Die Zymogramme reflektieren ein verändertes Expressionsprofil nach unterschiedlichen Obstruktionszeiten. Es waren jedoch keine genotypisch bedingten Variationen der MMP-Expressionen erkennbar. Eine MMP-9 Expression konnte weder in den Proteinextrakten aus den obstruierten noch aus den contralateralen Nieren nachgewiesen werden.

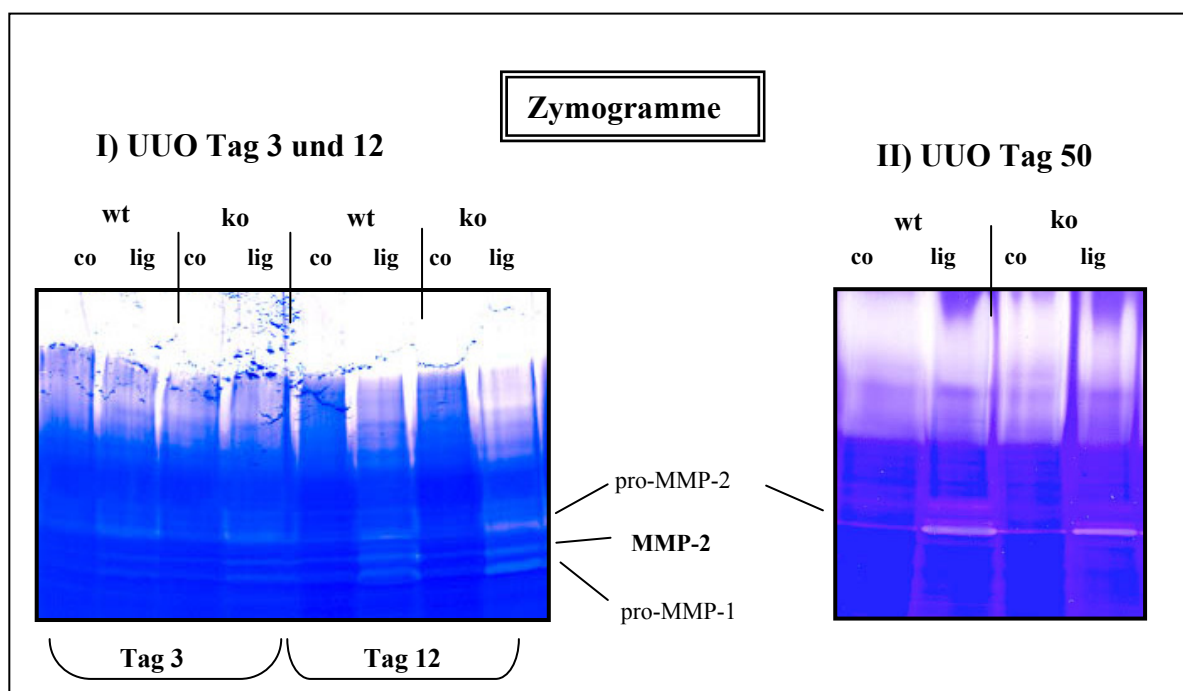


Abbildung 3-22: Zymogramme mit UUO-Nieren.

I) Zymogramm mit UUO-Nieren 3 und 12 Tage post Obstruktion. MMP-2 ist in den ligierten Nieren in seiner aktiven Form vorhanden. Obstruierte Nieren exprimieren auch eine pro-MMP-1 und eine pro-MMP-2 Bande. Es sind keine genotypischen Unterschiede sichtbar.

II) Zymogramm mit UUO-Nieren 50 Tage post Obstruktion. In den contralateralen sowie obstruierten Nieren sind die pro-MMP-2 Banden sichtbar. Wt = Wildtyp, ko = Knockout, co = contralateral, lig. = ligiert. Die Zymographien wurden freundlicherweise von Frau Dr. Rita Dreier durchgeführt.

3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des UUO-Nierenerkrankungsmodells

- Eine unilaterale Obstruktion zur Induktion einer tubulointerstitiellen Fibrose verursacht keine makroskopisch und histologisch signifikanten Unterschiede zwischen Syndecan-4 $+/+$ sowie Syndecan-4 $-/-$ Mäusen.
- Fünfzig Tage nach UUO konnte durch eine vermehrte Bildung von α -SMA in obstruierten Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäuse ein Unterschied in der fibrotischen Reaktion festgestellt werden.
- Parallel dazu konnte eine erhöhte Expression von hsc70 in den obstruierten Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäuse nachgewiesen werden.
- Im Gegensatz zu diesen Befunden konnten für die MMP-Expression auch nach 50 Tagen UUO kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen detektiert werden.

Teil IV: Kompensationsmechanismen in Syndecan-4 -/- Hautfibroblasten

3.5 Expression der Syndecane in primären Hautfibroblasten von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen

Syndecan-4-defiziente Mäuse weisen eine deutlich verzögerte Wundheilung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. Die Wundheilungsprobleme äußern sich in einer fehlenden Akkumulation von Granulationsgewebe sowie einer reduzierten Wundkontraktion. Diese Defekte in den Syndecan-4 -/- Mäusen sind an den ersten Tagen des Wundheilungsprozesses besonders markant. Dennoch sind am Ende des Wundheilungsprozesses die Wunden der Syndecan-4-knockout Mäuse gut verheilt und weisen keine Unterschiede zu denen der Wildtypen auf (Echtermeyer et al., 2001). Diese Beobachtung wurde mit einer möglichen Kompensation durch die anderen Mitglieder der Syndecan-Familie erklärt. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht werden, welches der Syndecane für die Defizienz von Syndecan-4 kompensieren könnte.

3.5.1 Die Syndecan-1 Expression ist in primären Hautfibroblasten aus Syndecan-4-defizienten Mäusen erhöht

Zunächst wurde die Expression der Syndecane in Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten auf RNA-Ebene analysiert. Diese Northern Blot Analysen zeigten unterschiedliche Syndecan-1 mRNA-Spiegel in Syndecan-4-defizienten Fibroblasten gegenüber Wildtyp-Fibroblasten (Abbildung 3-23, I A). In allen Spuren konnten die spezifischen Syndecan-1 Transkripte bei einer Bandenhöhe von 3,4 kb und 2,6 kb detektiert werden (Abbildung 3-23, A). GAPDH Transkripte hingegen lagen bei 1,3 kb (Abbildung 3-23, B). Nach Ausgleich der Ladungsdifferenzen mittels GAPDH stellte sich heraus, dass Syndecan-1 mRNA in den Syndecan-4 +/- sowie Syndecan-4 -/- Hautfibroblasten stärker exprimiert wird als in den Wildtyp Hautfibroblasten. Der Unterschied beträgt in den Syndecan-4 heterozygoten Hautfibroblasten fünfzig Prozent und in Syndecan-4 -/- primären Hautfibroblasten hingegen sechzig Prozent (Abbildung 3-23, C).

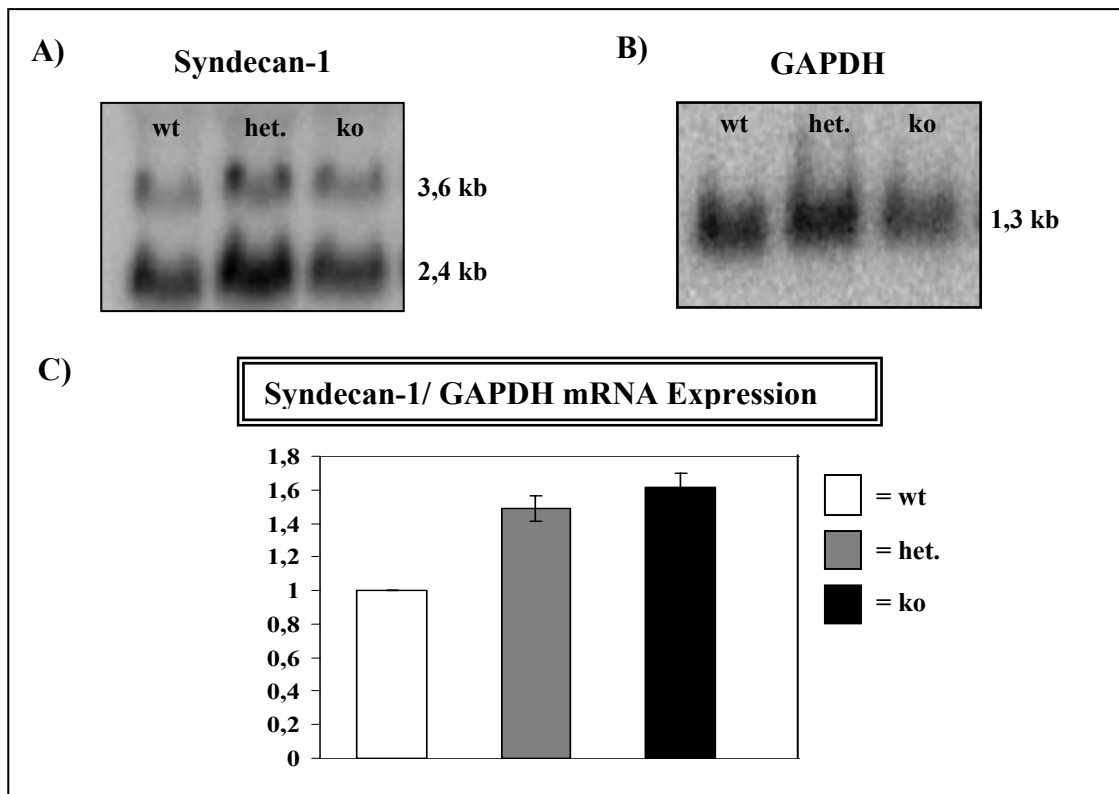


Abbildung 3-23: Syndecan-1 mRNA ist in Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten erhöht.

A) Syndecan-1 Northern Blot. B) GAPDH diente als interne Ladungskontrolle.
 C) Säulendiagramm zur Darstellung der relativen Syndecan-1 mRNA Expression in Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Fibroblasten. wt = Wildtyp, het. = Heterozygot, ko = Knockout.

Syndecan-2 wurde von dermalen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Fibroblasten nicht differentiell exprimiert. Anschließend wurde mittels Durchflußzytometrie (FACS) geprüft, ob die in Syndecan-4-defizienten Fibroblasten vermehrte Syndecan-1 mRNA auch einen erhöhten Syndecan-1 Protein-Level bewirkt. Die FACS-Analyse von primären Syndecan-4 $-/-$ Hautfibroblasten zeigte einen dem Wildtypzellen um bis zu fünfzig Prozent erhöhte Syndecan-1 Oberflächenexpression (Abbildung 3-24, A). Dagegen blieb der Syndecan-2-Spiegel in Hautfibroblasten trotz Syndecan-4-Defizienz unverändert (Abbildung 3-24, B). Die zur Kontrolle gemessenen Zelloberflächen-Rezeptoren $\alpha 2\beta 1$ -Integrin und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zeigten, wie erwartet, keine signifikanten durch die Syndecan-4-Defizienz bedingten Expressionsunterschiede (Abbildung 3-24, C und D). Diese Ergebnisse bestätigen die Northern Blot Daten und zeigen, dass der Syndecan-1 Spiegel nicht nur auf mRNA, sondern auch auf Proteinebene in Syndecan-4-defizienten Fibroblasten erhöht ist.

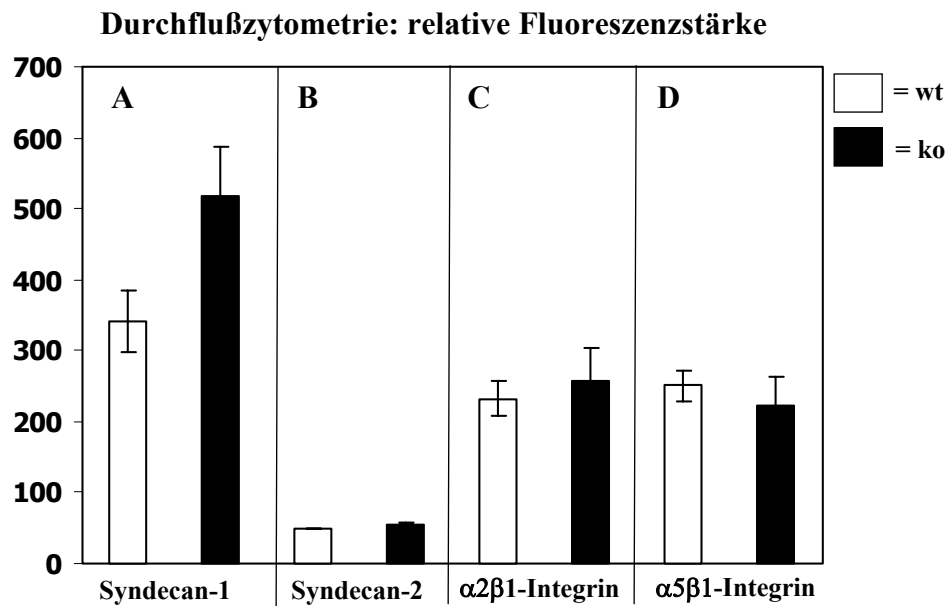


Abbildung 3-24: Syndecan-1 Proteinmengen sind in Syndecan-4 -/- Hautfibroblasten erhöht.

A) Syndecan-1 Zelloberflächen Proteinexpression. Syndecan-4-/- Fibroblasten (schwarze Balken) zeigen eine um 50 % erhöhte Proteinexpression für Syndecan-1 im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten (weiße Balken). B) Syndecan-2 Zelloberflächen-Proteinexpression. C) $\alpha 2\beta 1$ -Integrin Zelloberflächen Proteinexpression. D) $\alpha 5\beta 1$ -Integrin Zelloberflächen Proteinexpression. B-C) Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Syndecan-2, $\alpha 2\beta 1$ -Integrin und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zu erkennen. wt = Wildtyp, ko = Knockout-Maus.

3.5.2 TGF- $\beta 1$ reguliert die Syndecan-1 mRNA Expression in Hautfibroblasten aus Wildtyp- und Syndecan-4 -/- Mäusen

Zur Analyse, ob rekombinantes TGF- $\beta 1$ einen möglichen Einfluss auf die Expression von Syndecan-1 haben könnte, wurden Wildtyp- sowie Syndecan-4-defiziente Fibroblasten über Nacht in einem Minimalmedium mit 0,5 % FCS gehalten und am darauf folgenden Tag für unterschiedliche Zeitpunkte (12 h, 24 h und 48 h) mit TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) stimuliert. Aus diesen stimulierten Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und Northern Blot Analysen mit Syndecan-1-Sonden (Abbildung 3-25, A) durchgeführt. Die Ladungsdifferenzen wurden mit GAPDH (Abbildung 3-25, B) als interne Kontrolle abgeglichen. Es zeigte sich, dass die Syndecan-1 mRNA nach 48 h TGF- $\beta 1$ Stimulation in den Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten gegenüber Wildtypzellen um vierzig Prozent niedriger ist. Die Induktion für 12 h sowie 24 h bewirkte hingegen einen geringen

Expressionsunterschied zwischen Wildtyp und Knockout Hautfibroblasten (Abbildung 3-25, C).

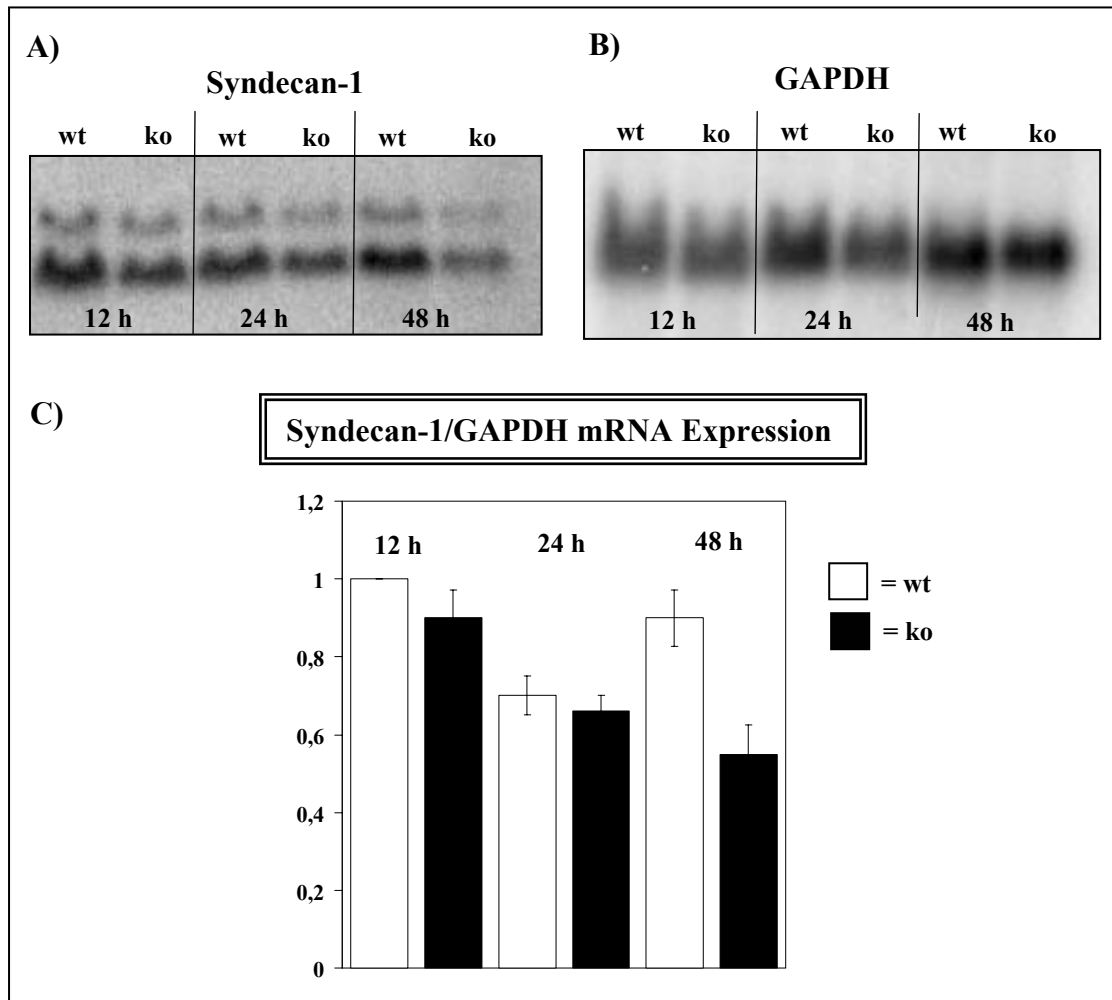


Abbildung 3-25: TGF-β1 Stimulation reguliert Syndecan-1 mRNA Expression in Hautfibroblasten.

A) Syndecan-1 Northern Blot. Induktion von Wildtyp- (wt) und Knockout- (ko) Fibroblasten für 12, 24 und 48 h mit TGF-β (5 ng/ml).

B) GAPDH Northern Blot als interne Ladungskontrolle.

C) Säulendiagramm zur Darstellung der relativen Syndecan-1 mRNA Expression nach TGF-β Stimulation. wt = Wildtyp, ko = Knockout.

3.5.3 Zusammenfassung der Untersuchungen an primären Wildtyp und Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten

- In primären Hautfibroblasten aus Syndecan-4-defizienten Mäusen ist Syndecan-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gegenüber Wildtypzellen erhöht.
- Die Spiegel von Syndecan-2 mRNA und Protein sind hingegen unverändert.
- Die Syndecan-1 mRNA-Spiegel sind in primären Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten gegenüber Wildtypzellen nach einer TGF- β 1 Stimulation von 48 h um vierzig Prozent reduziert.
- TGF- β 1 drosselt die Syndecan-1 mRNA-Synthese in Syndecan-4-defizienten Fibroblastenkulturen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Syndecan-4-Defizienz, einem membrangebundenen Heparansulfat-Proteoglykan, in der Niere anhand von zwei Nierenerkrankungsmodellen erforscht. Syndecan-4 konnte bisher in Podozyten von normalen Wildtyp-Nieren nachgewiesen werden (Pyke et al., 1997). Podozyten bilden zusammen mit der Schlitzmembran die Filtrationsbarriere in der Niere. Von den anionischen Ladungen der Heparansulfatketten an den Proteoglykanen, die in Podozyten vorkommen, wird angenommen, dass sie für die Permselectivität notwendig sind.

Aufgrund dieser Hinweise bezüglich einer putativen Rolle von Heparansulfat-Proteoglykanen in der Niere stand die Erforschung eines renalen Phänotyps der Syndecan-4-defizienten Mäuse im Fokus dieser Arbeit. Den Schwerpunkt bildete die Erforschung eines renalen Krankheitsbildes in Syndecan-4-defizienten Mäusen, welche durch unilaterale Nephrektomie induziert wurde.

Zusätzlich zur unilateralen Nephrektomie, welche primär die Glomeruli schädigt, wurde die unilaterale urethrale Obstruktion als ein Modell der tubulointerstitiellen Fibrose gewählt. Die Untersuchungen zeigten, dass nach unilateraler Nephrektomie ein renaler Phänotyp, der sich durch Sklerotisierung der Glomeruli definiert, in Syndecan-4-defizienten Männchen hervorgerufen wird. Dieser Zusammenhang wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

4.1 Syndecan-4-defiziente Mäuse zeigen keinen spontanen renalen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels in situ-Hybridisierung und Immunlokalisation die Expression von Syndecan-4 mRNA sowie des Proteins in der murinen Niere untersucht. In Übereinstimmung mit Untersuchungsergebnissen von *Pyke et al.* wurden Syndecan-4 Signale in Podozyten detektiert (Pyke et al., 1997). Abweichend von den bisher publizierten Ergebnissen (Pyke et al., 1997) konnte in der vorliegenden Arbeit eine Syndecan-4 RNA-Synthese auch in Mesangialzellen sowie parietalen Epithelzellen innerhalb des Glomerulus nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-1 und 3-2). Zusätzlich zur Detektion in glomerulären Zellen, konnte Syndecan-4 mRNA in tubulären Epithelzellen sowie in einigen Kapillarendothelzellen detektiert werden. Eigene in situ-

Hybridisierungen in normalen Wildtyp-Nieren zeigten zudem auch Anfärbungen für Syndecan-4 mRNA in den Epithelzellen der Sammelrohre. Zur Bestätigung der eigenen in situ-Hybridisierungsdaten wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Syndecan-4 Antikörper (monoklonal, Ratte anti-Maus, BD Biosciences) durchgeführt. Syndecan-4 Proteine konnten jedoch nur teilweise kongruent zu den in situ-Hybridisierungsdaten detektiert werden. Die Immunhistochemie zeigte positive Signale auf der Zelloberfläche von Podozyten, Mesangialzellen sowie Endothelzellen. Ebenso deutlich waren Anfärbungen für Syndecan-4 Proteine an Kapillarschlingen innerhalb der Glomeruli zu finden. Jedoch fehlten die Signale für Syndecan-4 Proteine in tubulären Epithelzellen sowie Kapillarendothelzellen außerhalb der Glomeruli. Somit spiegelten die immunhistochemische Färbungsergebnisse nicht komplett die in situ-Hybridisierungsergebnisse wider. Eine ähnliche Lokalisation wie für Syndecan-4 mRNA konnte für Syndecan-1 mRNA festgestellt werden. In der Literatur wurde erst kürzlich beschrieben, dass Syndecan-1 mRNA in Podozyten vorhanden ist (Bjornson et al., 2005). *Messenger*-RNA für Syndecan-1 konnte in der eigenen Arbeit besonders deutlich in Podozyten, überdies in parietalen Epithelzellen sowie Mesangialzellen nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu konnte Syndecan-1 mRNA in tubulären Epithelzellen sowie Epithelzellen der Sammelrohre lokalisiert werden. Gemäß den eigenen Daten auf RNA-Ebene konnten Syndecan-1 Proteine mit Hilfe der Immunhistochemie in Podozyten, auf der Zelloberfläche von glomerulären Endothelzellen sowie parietalen Epithelzellen nachgewiesen werden. Im Widerspruch zu eigenen in situ-Hybridisierungsdaten fehlten jedoch Signale für die Syndecan-1 Proteinsynthese in glomerulären Mesangialzellen sowie in den tubulären Zellen. Folglich konnten mit den eigenen Daten von in situ-Hybridisierungen bisherige Literaturangaben (Bjornson et al., 2005; Ishiguro et al., 2001b; Pyke et al., 1997) erweitert werden. Mit Hilfe der angewandten Färbungsmethoden konnte Syndecan-2 weder auf RNA noch auf Protein-Niveau in der Wildtyp-Niere detektiert werden. Die beschriebene Diskrepanz zwischen der Expression von Syndecan-1 sowie -4 auf Protein- und RNA-Ebene könnte, wie es in der Literatur für die Syndecane bereits diskutiert wurde (Carey, 1997; Gallo et al., 1994; Hayashida et al., 2006), auf eine posttranskriptionale Regulation der Syndecan-Synthese hindeuten. Für die Syndecane wurde eine gewebsspezifische sowie vom Entwicklungsstadium abhängige Expressionsregulation, die unter anderem durch FGF-2 beeinflussbar ist, beschrieben (Bernfield et al., 1993; Hinkes et al., 1993; Jaakkola und Jalkanen, 1999; Tsuzuki et al.,

1997; Zhang et al., 2005; Bortoff und Wagner, 2005; Kojima et al., 2001; Zhang et al., 1999).

In Syndecan-4-defizienten Mäusen hingegen ist das Expressionsmuster für Syndecan-1 zwar auf Proteinebene, nicht jedoch auf der Ebene der Transkription im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verändert. In Syndecan-4-defizienten Mäusen ist Syndecan-1 Protein anstelle von Syndecan-4 in der mesangialen Matrix lokalisiert. Dies könnte ein Hinweis auf eine kompensatorische Funktion von Syndecan-1 bei der Syndecan-4-Defizienz sein, was das Fehlen einer phänotypischen Konsequenz erklären würde. Unklar bleibt jedoch, wieso sich keine Veränderungen im Expressionsprofil für Syndecan-1 mRNA zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-knockout Mäuse auf RNA-Ebene nachweisen lässt.

Real time PCR Daten zeigen eine geringere Expression von Syndecan-1 als von Syndecan-4 in Wildtyp-Nieren (Ishiguro et al., 2001b; Pyke et al., 1997). Die Ergebnisse der eigenen *in situ*-Hybridisierungen weichen von diesen Resultaten ab. Möglicherweise ist diese Diskrepanz auf methodische Ungenauigkeiten der *Real time* PCR zurückzuführen. Zum Beispiel könnte es sein, dass in den eigenen Experimenten bei der Reversen Transkription zu wenig cDNA umgeschrieben wurde und daher die Amplifizierung in der nachgeschalteten *Real time* PCR nicht in allen Proben exponentiell erfolgte (Ahn et al., 2006). Jedoch zeigen die Daten der *Real time* PCR, dass die Syndecan-1 RNA-Level bei Syndecan-4-Defizienz ansteigen und korrelieren in diesem Punkt mit den immunhistochemischen Anfärbungen. Eine falsche Positivität der *in situ*-Hybridisierungen kann insofern ausgeschlossen werden, da die hergestellten DIG-markierten cRNA Sonden hinsichtlich ihrer Spezifität mittels Northern Blot getestet wurden. Gleichzeitig wurde immer parallel zu der eigentlichen Hybridisierungsreaktion eine *sense*-Hybridisierung als Negativkontrolle durchgeführt.

Die eigenen Ergebnisse der *Real time* PCR zur Untersuchung der Syndecan-2 Expression standen zu den Daten aus den *in situ*-Hybridisierungen ebenfalls im Widerspruch. Mittels *in situ*-Hybridisierung sowie Immunhistochemie konnte keine Syndecan-2 Synthese in unbehandelten Nieren von Wildtyp- sowie Syndecan-4-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Die *Real time* PCR Daten zeigten für die Syndecan-2 Expression in Wildtyp- sowie Syndecan-4-defizienten Nieren ähnliche Werte. Eine Erklärung für die unterschiedliche Detektion ist sicherlich in der methodischen Sensitivität der *Real time* PCR zu finden. Möglicherweise hängen die histologischen Negativbefunde im Bezug auf die Syndecan-2 Expression sehr stark von Vorbehandlungsschritten und der

Zugänglichkeit des Gewebes für Sonden oder Antikörper ab (Ezaki, 2000). Da aber die Reproduzierbarkeit der *in situ*-Hybridisierungsergebnisse mit den Syndecan-1 und -4 Sonden und auch die starke Reaktivität des hier verwendeten Syndecan-2 M-140 (Santa Cruz) Antikörpers gegen diese Hypothese sprechen, wäre es auch möglich, dass Syndecan-2 im renalen Gewebe nicht exprimiert wird. Dies würde jedoch nicht mit den Ergebnissen von Clayton *et al.* (2001) übereinstimmen. Diese Arbeitsgruppe konnte mittels *Real time* PCR zeigen, dass Syndecan-2 in renalen Fibroblasten exprimiert und vermutlich für die Interaktion mit FGF-2 von Bedeutung ist (Clayton *et al.*, 2001). Die Autoren verwendeten allerdings an Stelle von primären Fibroblasten eine immortalisierte Zelllinie. Die Übertragbarkeit zu *in vivo* Verhältnissen wurden hingegen nicht beachtet (Dodson und Schaeffer, 2000). Die in dieser Arbeit vorgelegten Resultate bezüglich der Syndecan-2 Expression stimmen allerdings mit der Aussage von Rops *et al.* (2004) überein. Lediglich Syndecan-1 sowie Syndecan-4 wurden in der Niere exprimiert und Syndecan-2 hingegen nicht (Rops *et al.*, 2004). Dennoch ist es auffällig, wie kontrovers die Angaben in der Literatur diesbezüglich sind. Kürzlich wurde gezeigt, dass durch Losartan, das in das Renin-Angiotensin System der Niere eingreift, die renale Syndecan-2 Expression in neonatalen Ratten herab reguliert wird (Chen *et al.*, 2004). Folglich kann Syndecan-2 neonatal und *in vivo* in Nierenzellen detektiert werden. In den Studien von Chen *et al.* (2004) wurde ebenfalls der M-140 Antikörper, wie in der vorliegenden Arbeit, benutzt. Auch die Vorbehandlung der Gewebeschnitte erfolgte auf gleiche die Weise. Dies spricht für eine Expression von Syndecan-2 in der neonatalen Niere, wohingegen in der adulten Niere kein Syndecan-2 synthetisiert wird. Eine andere Arbeitsgruppe analysierte die Syndecan-2 Proteinspiegel in der diabetischen Niere und stellte im Verhältnis zu einer nicht erkrankten Niere einen Anstieg fest (Chen *et al.*, 2004). In diesen Arbeiten wurden Syndecan-2 Proteine mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Technik in Glomeruli der normalen Niere detektiert. Die Diskrepanz der unterschiedlichen Angaben in der Literatur könnte in der Diversität der verwendeten Methoden begründet sein.

Das Fehlen eines spontanen renalen Phänotyps nach einem des Syndecan-4 Gen Knockout in Mäusen überrascht insofern nicht, da diese fertil und lebensfähig sind und nur durch extern erzeugte Stressbedingungen gefordert werden. Nach Verwundung der Haut von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen stellte sich zum Beispiel heraus, dass Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verzögerte Wundheilung

aufweisen (Echtermeyer et al., 2001). Des Weiteren ist von Syndecan-4-defizienten Mäusen bekannt, dass diese durch Injektion von κ -Carrageenan tubuläre Schäden entwickeln und eine größere Sepsis-Anfälligkeit zeigen, die sich in einer höheren Sterberate manifestiert (Ishiguro et al., 2001b). Die Konsequenzen einer Stress-Situation in der Niere wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Nierenerkrankungsmodellen untersucht und werden in den Abschnitten 4.2 bis 4.3 diskutiert.

Um einen möglichen Ausfallphänotyp zu generieren, könnten Doppel-Knockout-Studien hilfreich sein, in denen Syndecan-2/-4 bzw. Syndecan-1/-4 Doppel-Knockout Mutanten generiert werden (Echtermeyer et al., 2001; Forsberg und Kjellen, 2001; Stepp et al., 2002). In Doppel-Knockout-Studien könnte eine mögliche Kompensation durch das jeweils andere Syndecan unterbunden werden. Dennoch ist rein hypothetisch eine Kompensierung der deletierten Gene durch andere Heparansulfat-Proteoglykane nicht auszuschließen. Dies würde damit die Entwicklung eines spontanen Phänotyps verhindern. Im Falle von Syndecan-1/-4 Doppel-Knockout-Mäusen wäre denkbar, dass Syndecan-3, welches vorwiegend in neuronalen Geweben vorkommt (Kim et al., 1994), ektopisch in der Niere exprimiert wird und dadurch einen Ausfallphänotyp unterbindet. Das Fehlen eines Phänotyps ist daher meist auf redundante Expression von nah verwandten und funktionell ähnlichen Proteinen zurückzuführen. Einige Literaturhinweise deuten darauf hin, dass die zuvor als essentiell angesehenen Proteine bzw. Heparansulfatketten der Proteoglykane in der Niere bei ihrem Ausfall nicht den erwarteten Effekt auslösen (Groffen et al., 1999; Mates et al., 2004). In diesem Bezug sind Untersuchungen zu Perlecan interessant. Von Perlecan wurde bisher angenommen, dass es als ein Basalmembran-Proteoglykan für die Filtrationsbarriere in der Niere essentiell ist (Morita et al., 2005; Zhou et al., 2004). Eine Perlecan-Defizienz ist aufgrund von auftretenden Herzfehlern bereits embryonal (E10-12,5) letal. Perlecan-defiziente Mäuse, die das Embryonalstadium überstehen, sterben perinatal und zeigen Exenzephalie oder andere Gehirnschäden (Irikawa-Hirasawa et al., 1999). Perlecan ist für die korrekte Assemblierung von Basalmembranen essentiell (Costell et al., 2002; Henry et al., 2001). Sein *Core*-Protein interagiert mit Kollagen Typ IV und Nidogen (Hopf et al., 1999; Ries et al., 2001; Schymeinsky et al., 2002). Über seine Heparansulfatketten bindet es an Laminin sowie an verschiedene Wachstumsfaktoren (Forsberg und Kjellen, 2001; Ruoslahti und Yamaguchi, 1991). Die Perlecan-Defizienz führt zu nicht ausreichend starken Bindungen der extrazellulären Matrixkomponenten und dadurch zu destabilisierten Basalmembranen. Bei

einer Deletion der Heparansulfatketten, denen eine entscheidende Funktion in der renalen Filtration beigemessen wurde, kommt es nicht zu Proteinurie (Morita et al., 2005). Erst durch Überbelastung solcher Mäuse mit einer albuminreichen Ernährung konnte ein nephrotisches Syndrom ausgelöst werden. In Mäusen, denen die Mehrzahl an Heparansulfatketten von Perlecan fehlte, bewirkte eine erhöhte Expression an Chondroitinsulfatketten einen kompensatorischen Ausgleich (Morita et al., 2005). Die Tatsache, dass durch verstärkte äußere Anforderung bei solchen Mäusen phänotypische Auswirkungen auftreten, ist auch von Syndecan-4-defizienten Mäusen bekannt. Wie bereits oben erwähnt, weisen diese bei Wundheilungsstudien (Echtermeyer et al., 2001) bzw. toxisch induzierter Nephropathie mit κ -Carrageenan, Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen auf (Ishiguro et al., 2001b).

Um einen möglichen Einfluss der Syndecan-4-Defizienz auf den Verlauf einer renalen Pathogenese zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei in der Literatur vielfach beschriebene Modelle der Nierenerkrankung gewählt. Es handelt sich hierbei einerseits um die unilaterale Nephrektomie, die primär glomeruläre Schäden in der Niere hervorruft (Kren und Hostetter, 1999). Das zweite Modell ist die unilaterale urethrale Obstruktion, die primär zur einer tubulointerstitiellen Fibrose und sekundär zu einer Glomerulosklerose führt (Klahr und Morrissey, 2002; Klahr und Morrissey, 2003; Ophascharoensuk et al., 1999).

4.2 Unilaterale Nephrektomie

In dieser Arbeit wurden Syndecan-4-defiziente Mäuse, die keinen spontanen renalen Phänotyp zeigten (4.1), durch eine einseitige Entfernung der Niere gestresst. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass nach unilateraler Nephrektomie eine Bedingung geschaffen wird, die Syndecan-4-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stärker herausfordert. Nephrektomierte Wildtyp- und Knockout-Mäuse, die nach einer Dauer von 60 Tagen getötet und deren UNX-Nieren (oder RK) für die Experimente unterschiedlich prozessiert wurden, sollten in der Ausprägung eines möglichen Phänotyps miteinander verglichen werden. In der Literatur ist die UNX-Erkrankungsstudie als ein Modell beschrieben, die unter bestimmten Prädispositionen der Versuchstieren, wie z.B. Bluthochdruck, eine Glomerulosklerose in der nephrektomierten Niere induziert

(Adamczak et al., 2003; Fleck et al., 2006; Gafter et al., 1990; Hricik et al., 1998; Jacobi et al., 2006; Kriz und LeHir, 2005; Ophascharoensuk et al., 1999).

4.2.1 Syndecan-4-defizienten Mäusen zeigen eine erhöhte Zunahme des Nieren- zu Körpergewicht- Verhältnisses in Folge einer unilateralen Nephrektomie

Der kw/bw Index wird in vielen Nierenerkrankungsmodellen als diagnostischer Parameter herangezogen, um einen Unterschied zwischen Versuchstiergruppen in der adaptiven Antwort auf die Nephropathie zu erfassen. Das kompensatorische Wachstum der nephrektomierten Niere kann sich aufgrund eines hypertrophen oder hyperplastischen Verlaufs beispielsweise zwischen weiblichen und männlichen Ratten unterscheiden. Unter dem Begriff Hypertrophie ist in der Nephrologie die Zunahme an renaler Masse durch Zellvergrößerung gemeint, Hyperplasie bedeutet hingegen die Zunahme durch Zellvermehrung (Liu und Preisig, 2002; Norman et al., 1988). Laut Angaben in der Literatur nehmen weibliche Versuchstiere weniger an renaler Masse zu als männliche Versuchstiere (Mulroney et al., 1999; Mulroney und Pesce, 2000).

In der eigenen Arbeit wurden folgende Unterschiede in den kw/bw -Indices von Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen nach unilateraler Nephrektomie beobachtet: In männlichen Wildtyp-Mäusen ist der Index, übereinstimmend mit Literaturdaten, tendenziell höher als in weiblichen Wildtyp-Mäusen. Die renale Zunahme der männlichen Syndecan-4-defizienten Mäuse nach UNX ist im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen am höchsten. Außerdem zeigten weibliche Syndecan-4-defiziente Mäuse eine ebenfalls stärkere Zunahme ihres Nierengewichts im Vergleich zu den weiblichen Wildtyp-Mäusen nach UNX. Die eigenen Daten hinsichtlich der kompensatorischen renalen Zunahme in der nephrektomierten Niere stehen in Übereinstimmung mit den Literaturangaben. Männliche Wildtyp- und Syndecan-4 defiziente Mäuse zeichneten sich im Vergleich zu weiblichen Versuchstieren durch höhere Werte der kw/bw Indices post UNX aus. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass auch weibliche Syndecan-4-defiziente Mäuse nach unilateraler Nephrektomie mehr an renaler Masse zugenommen haben als ihre wildtypischen Geschlechtsgenossen. Außerdem ist die Beobachtung, dass weibliche Syndecan-4-defiziente Mäuse bereits prä-UNX sehr hohe Werte ihres kw/bw Index aufweisen, interessant. Diese Beobachtung wirft die Annahme

auf, dass die Syndecan-4-Defizienz auf eine bisher ungeklärte Weise das kompensatorische Wachstum der nephrektomierten Niere beeinflusst und dass weibliche Syndecan-4-defiziente Mäuse bereits einen hohen Index vor dem UNX-Eingriff haben. Diese hohen prä UNX-Werte des Nieren- und Körpergewicht-Indices könnten ebenfalls einen nephroprotektiven Effekt haben, wie es in der Literatur gemutmaßt wird (Mulroney et al., 1999). Für die beobachteten Unterschiede in der renalen Zunahme zwischen den Geschlechtern wurden bisher vor allem die Geschlechtshormone verantwortlich gemacht. Daher wurden zahlreiche Untersuchungen, die den Einfluss des Geschlechts auf den pathophysiologischen Verlauf nach einer Nephrektomie betrachten, anvisiert. Die Untersuchungen zeigten, dass weibliche Ratten eine hyperplastische Zunahme aufweisen, die hormonell über Östrogene reguliert wird. Hingegen tendieren männliche Ratten zu einer hypertrophen Zunahme (Mulroney et al., 1999; Mulroney und Pesce, 2000; Schena et al., 1999). Außerdem ist die Art der renalen Zunahme, d.h. Hypertrophie bzw. Hyperplasie, vom angewandten Nierenerkrankungsmodell abhängig. Hierbei wird zwischen Folgendem unterschieden: die UNX verursacht eine Hypertrophie der RK (Terzi et al., 1995), die subtotale Nephrektomie wird von einer hyperplastischen Komponente der CRG begleitet. Neben einer renoprotektiven Rolle der Östrogene bei weiblichen Tieren scheinen verschiedene weitere Faktoren, wie beispielsweise GH oder IGH, die entwicklungspezifisch wirken, einen Einfluss auf hämodynamische, adaptive Prozesse post Nephrektomie auszuüben (Mok et al., 2003; Mulroney et al., 1999; Mulroney und Pesce, 2000; Schrijvers et al., 2005) und erklären die geschlechtsbedingten Unterschiede zwischen den Versuchstieren. Diese verschiedenen hormonellen Aspekte und Einflüsse wurden in den eigenen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit außer Acht gelassen. Lediglich Geschlechter-abhängige Differenzen der adaptiven Antwort in Form von renaler Zunahme wurden zur Kenntnis genommen.

Verschiedene Studien belegen, dass die Hypertrophie unter anderem im Zusammenhang mit VEGF, dem vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor steht (Flyvbjerg et al., 1999; Flyvbjerg et al., 2002; Kang et al., 2001; Kang et al., 2004; Kelly et al., 2003; Kelly et al., 2004). VEGF ist für die Integrität der glomerulären sowie peritubulären Kapillarsysteme von Bedeutung. Des Weiteren wird VEGF während der Nephrogenese in Podozyten und tubulären Epithelzellen exprimiert, wohingegen seine Rezeptoren präglomerulär, glomerulär sowie peritubulär auf Endothelzellen verteilt sind. VEGF verschlimmert die Pathogenese einer diabetischen Nephropathie. In experimentellen Nephrektomien jedoch

schützt VEGF anscheinend vor Sklerotisierung (Hara et al., 2006). Seine Inhibition ist mit einer glomerulären Sklerose sowie einer tubulointerstitiellen Fibrose assoziiert. Der Zusammenhang zwischen den VEGF-initiierten, angiogenetischen Stimuli und der geschlechtsspezifischen sowie hormonell bedingten Hypertrophie ist in der vasoaktiven Eigenschaft von Östrogenen begründet (Schrijvers et al., 2005). Östrogene haben multiple biologische Funktionen, wie z.B. antioxidative und vasodilatatorische, die einen mildernden Effekt auf die Pathophysiologie ausüben können (Gross et al., 2004; Gross et al., 2005; Mulrone et al., 1999). Damit übereinstimmend zeigen in den eigenen Experimenten die männlichen UNX-Mäuse beider Genotypen eine höhere Zunahme der renalen Masse. Dennoch ist eine Prädisposition zur Hypertrophie in Folge der durchgeführten unilateralen Nephrektomie bei männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen auffällig. Damit scheint die Syndecan-4-Defizienz diesen hormonell bedingten, hypertrophen Verlauf der renalen Zunahme bei männlichen Mäusen zu steigern. Inwiefern und über welche molekularen Mechanismen dies erfolgt, bleibt jedoch ungeklärt und muss auf regulatorischer Ebene genauer untersucht werden.

4.2.2 Die unilaterale Nephrektomie verursacht keine Proteinurie in Syndecan-4-defizienten und Wildtyp-Mäusen

Eine Beschädigung der Filtrationsbarriere in verschiedenen renalen Erkrankungen führt zu einem nephrotischen Syndrom (Groffen et al., 1998; Levidiotis und Power, 2005). Die Passage durch die Filtrationsbarriere von Plasmaproteinen, deren Molekulargewicht größer als 70 kDa ist, wird normalerweise durch die ladungs- sowie größenspezifische Filtrationsbarriere der Niere unterbunden. Durch eine Störung können größere Plasmaproteine ungehindert passieren und im Urin nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist die Überprüfung von Urin auf darin enthaltene Plasmaproteine ein hilfreiches Indiz für eine beeinträchtigte renale Filtration (Tryggvason, 1999; Tryggvason und Pettersson, 2003; Tryggvason und Wartiovaara, 2005). Bisherigen Annahmen zur größenselektiven und ladungsspezifischen Filtration messen den anionischen Ladungen verschiedener Proteoglykane in der Niere eine besondere Bedeutung bei.

Die aus den Carboxylat- und Sulfatgruppen der Glykosaminoglykanketten resultierende negative Ladung von Syndecan-4 (Bernfield et al., 1999) und dessen Expressionsnachweis in glomerulären Zellen, wie Podozyten, parietalen Epithelzellen und Mesangialzellen

könnten ein Indiz für eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der renalen Homöostase sein. Bisher fehlen aber konkrete Hinweise, die diese Annahme unterstützen, zumal die Syndecan-4-defizienten Mäuse keinen spontanen renalen Ausfallphänotyp aufweisen (siehe 3.2). Anhand der UNX-Experimentreihe an Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen sollte analysiert werden, ob der Ausfall der anionischen Ladungen in Syndecan-4-defizienten Mäusen zu einem nephrotischen Syndrom führen könnte.

Die eigenen Daten veranschaulichten jedoch, dass die unilaterale Nephrektomie weder in Wildtyp- noch in Knockout-Mäusen beider Geschlechter eine Proteinurie verursachte. Eine fehlende Proteinurie in beiden Genotypen könnte auf das ausgewählte Erkrankungsmodell der unilateralen Nephrektomie zurückzuführen sein. Dieses ist im Vergleich zur subtotalen Ablation, in welcher nur noch ein Drittel des gesamten renalen Gewebes zurückbleibt, eine mildere Variante der renalen Ablation (Fleck et al., 2006; Kren und Hostetter, 1999).

Einige Untersuchungen an Mäusen verschiedener Stämme zeigen, dass Mäuse als Versuchstiere insgesamt weniger anfällig auf eine Nephrektomie reagieren und keine Proteinurie entwickeln. Die Begründung für die fehlende Proteinurie bezieht sich auf verschiedene Aspekte, die bisher noch kontrovers diskutiert werden. In vorherigen Arbeiten mit Ratten (Adamczak et al., 2003; Dworkin und Feiner, 1986; Fleck et al., 2006; Gafter et al., 1990; Hostetter, 1995; Hostetter et al., 2001), stellte sich heraus, dass bestimmte Voraussetzungen wie Bluthochdruck oder eine diesbezügliche Disposition ein nephrotisches Syndrom auslösen bzw. verstärken (Adamczak et al., 2003; Bidani et al., 1994; Bidani et al., 1990; Griffin et al., 2004; Schwartz et al., 1994). Auf dieser Argumentation aufbauend, könnte das Ausbleiben eines nephrotischen Syndroms in den eigenen UNX-Experimenten der Wildtyp- sowie Syndecan-4-knockout-Mäuse durch eine Resistenz gegen Bluthochdruck der verwendeten Mäuse des C57BL/6 Stammes begründet sein. Der genetische Hintergrund der Mausstämme scheint eine entscheidende Rolle in diesem Nierenerkrankungsmodell zu spielen (Ishola et al., 2005; Ma und Fogo, 2003). Erst kürzlich wurde dieser Zusammenhang für den C57BL/6 Mausstamm dokumentiert. Es stellte sich heraus, dass Mäuse dieses Stammes weniger hypertensiv reagieren als die von anderen Stämmen (Hartner et al., 2003). Charakteristisch für das UNX-Erkrankungsmodell ist eine progressive Schädigung der Niere, die aus einer präglomerulären Vasodilatation resultiert, welche wiederum durch intraglomerulären Druck verursacht wird. Aus diesem Grund kann in diesem System eine Prädisposition für Bluthochdruck eine Schädigung verstärken (Hostetter, 1995; Hostetter et al., 2001). Der konkrete Zusammenhang dieser,

höchstwahrscheinlich genetisch bedingten Resistenz gegenüber hohem Blutdruck und geringer Störanfälligkeit bei C57BL/6 Mäusen ist noch nicht geklärt.

Eine weitere Erklärung für die fehlende Proteinurie könnte sein, dass in manchen renalen Erkrankungen die Proteinurie nicht vordergründig ist (Perrin et al., 2006). Zu diesen Erkrankungen zählt beispielsweise die IgA-Nephropathie (Barratt und Feehally, 2005). Sie bleibt in einigen Untersuchungen oft unentdeckt, da keine Proteine im Urin detektiert werden können. Daher erfordert ihre Diagnose meist eine renale Biopsie, die zur immunhistochemischen Analyse herangezogen werden kann (Barratt und Feehally, 2005; Floege und Feehally, 2000).

4.2.3 Nephrektomie an männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen führt zu einer Expandierung und fokalen Sklerosierung des Mesangiums

Es wurden renale Biopsien mit Hilfe von verschiedenen Routinefärbungen wie PAS-, Masson-Trichrom und Kongorot-Färbung durchgeführt, um Unterschiede zwischen den UNX-Versuchstieren beider Genotypen sowie zu unbehandelten Mäusen zu erfassen.

In dem Abschnitt 4.2.1 wurden die durch die CRG induzierten adaptiven Prozesse in Wildtyp- sowie Syndecan-4-defizienten Mäusen diskutiert. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Pathogenese und den Geschlechtern der Tiere wurde im Rahmen dieser Arbeit zuerst nicht berücksichtigt. Für UNX-Experimente wurden zunächst weibliche Mäuse ausgewählt, die nach zahlreichen Untersuchungen jedoch keine genotypisch-relevanten pathologischen Befunde aufwiesen. Erst Hinweise aus der Untersuchung weniger verwendeter männlicher Syndecan-4-defizienter Mäuse, die auffällig auf die unilaterale Nephrektomie reagierten, gaben Anlass den experimentellen Ansatz zu modifizieren. In den Mesangien der nephrektomierten Nieren aus männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen wurden Anreicherungen von Material beobachtet. Dieses als mesangiale Expansion definierte Bild, das lichtmikroskopisch durch Anfärbung mit PAS erkennbar ist, war ausschließlich in Syndecan-4-defizienten Mäusen vorzufinden.

Mit Hilfe der Masson-Trichrom-Färbung konnten diese mesangialen Bereiche in den Syndecan-4-defizienten Mäusen als kollagenhaltig identifiziert werden. Gleichzeitig waren nach Anfärbungen noduläre Strukturen deutlich sichtbar. Derartige noduläre Strukturen wurden vorher zumeist in diabetischen Nieren beschrieben und werden als Kimmelstiel-Wilson Nodi bezeichnet (Westall et al., 2004). Die betroffenen Glomeruli waren deutlich

degeneriert und sklerotisch. Wildtyp-Männchen und interessanterweise auch alle weiblichen Versuchstiere zeigten diese pathologischen Veränderungen nicht. Sklerose ist ein allgemeiner Begriff, der als Synonym für Vernarbung oder Fibrose von Gewebe gebraucht wird. Demnach definiert der Begriff Sklerose einen Endzustand eines (längeren) pathologischen Prozesses (Trojanov et al., 2005). In der Nephropathologie wird der Begriff in einem weiteren sinngemäßen Spektrum benutzt, der auch vorhergehende Stadien der Prozesse involviert, wie beispielsweise die Faltenbildung und Retraktion der glomerulären Basalmembran und die Akkumulation von extrazellulärer Matrix (Kriz et al., 1998).

Es existieren die unterschiedlichsten Hypothesen über die initialen Schritte einer Glomerulosklerose. *Kriz et al.* sehen die Podozyten und ihre Schädigung als kritische Ursache für eine Sklerotisierung (Kretzler et al., 1994; Kretzler, 2005; Kriz et al., 1998; Kriz et al., 2003; Kriz und LeHir, 2005; Pavenstadt, 2000). Andere Wissenschaftler arbeiten mit der Hypothese, dass die glomerulären Mesangialzellen einen entscheidenden Einfluss auf die Progression der Glomerulopathien haben. Insbesondere bei Erkrankungen, wie beispielsweise der mesangioproliferativen Nephropathie, wird die initiale Schädigung der Mesangialzellen diskutiert (Ingram et al., 2004; Qiu et al., 2004; Zheng et al., 2003). Welche glomerulären Zellen in Syndecan-4-defizienten Mäusen aufgrund der unilateralen Nephrektomie die Entwicklung der Glomerulosklerose initiieren, ist bisher unklar.

Syndecan-4 Proteine werden auf der Oberfläche von Podozyten, Mesangialzellen und Kapillarschlingen exprimiert. Die Defizienz könnte daher, korrelierend mit beiden oben genannten hypothetischen Ansätzen, eine Sklerotisierung hervorrufen. Interessanterweise sind ausschließlich männliche Syndecan-4-defiziente UNX-Mäuse durch eine Sklerose ihrer Glomeruli charakterisiert. Diese Beobachtung spricht somit für einen geschlechtsspezifischen Phänotyp, der durch die Syndecan-4-Defizienz verstärkt wird.

Nicht in jedem Fall löst die Defizienz eines relevanten, für die renale Funktion als wichtig erkannten Gens einen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante aus. In ApoE $-/-$ Mäusen beispielsweise konnte nach subtotaler sowie unilateraler Nephrektomie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine erhöhte glomeruläre Sklerose festgestellt werden (Buzello et al., 2004). Allerdings belegen zahlreiche Literaturhinweise, dass eine Dysregulation des Lipidstoffwechsels einen negativen Einfluss auf den Verlauf einer Sklerotisierung post UNX ausübt. Dabei haben *Buzello et al.* in ihren Nephrektomie-Experimenten ausschließlich gleichaltrige und ausschließlich männliche Mäuse verwendet.

Des Weiteren ist bekannt, dass die unilaterale Nephrektomie im Gegensatz zu der mit einem Infarkt kombinierten subtotalen Ablation lediglich in ganz jungen bzw. neonatalen Mäusen eine glomeruläre Degeneration auslöst (Nagata et al., 1992). Verschiedene kombinatorische Ansätze wurden daher benutzt, um Sklerose und ihren pathologischen Mechanismus zu untersuchen (Sakai et al., 2005). Dazu gehört auch die Injektion eines Antikörpers (Anti-Thy1.1), der Mesangialzellen erkennt und blockiert, wodurch die so genannte Anti-Thy1.1-Nephritis ihren Namen hat (Hartner et al., 1999). Anti-Thy1.1-Nephritis ist durch eine aktivierte Mesangialzellpopulation gekennzeichnet, die vermehrt extrazelluläre Matrix produzieren. Das pathologische Bild gleicht dem von Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen beobachtet wurde. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Mesangialzellen in den Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen einen entscheidenden Beitrag zu den glomerulosklerotischen Veränderungen leisten. Elektronenmikroskopische Ergebnisse, welche unter 4.2.5 diskutiert werden, verdeutlichen, dass die Podozyten nicht degeneriert sind. Konkretere Aussagen erfordern jedoch genauere Untersuchungen mit Hilfe von speziellen Markerproteinen, die Mesangialzellen (Thy1.1-Antikörper) bzw. Podozyten (WT1-Antikörper) erkennen.

4.2.4 Die sklerotischen Segmente der Syndecan-4-defizienten Glomeruli enthalten Kollagen Typ I, -IV sowie Fibronektin

Zur weiteren Charakterisierung der sklerotischen Segmente in den Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Matrixakkumulation als ein markantes Kennzeichen der Fibrose wird durch verschiedene Faktoren stimuliert. Zu diesen Faktoren zählt Angiotensin II, das im Signalweg der fibrotischen Pathogenese *upstream* seinen Platz einnimmt, und neben TGF- β auch andere Faktoren gezielt aktivieren kann (Klahr und Morrissey, 2002). Diese Mediatoren induzieren die Expression zahlreicher Matrixmoleküle, die das Bild einer Sklerose entscheidend prägen. Daher können verschiedene Markerproteine gezielt untersucht werden, um die Erkrankung in der Niere näher zu bestimmen (Uguz et al., 2005). Mit Antikörpern gegen spezielle Isoformen oder Untereinheiten sind weitere Eingrenzungen möglich, wie es beispielsweise für das Alport-Syndrom (Hudson et al., 2003; Jais et al., 2000; Kalluri et al., 1997; Kashtan, 2002) bekannt ist. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen verschiedene Untereinheiten des Kollagens Typ IV wird die Diagnose und eine

Differenzierung zwischen Krankheiten mit ähnlicher Histologie ermöglicht. *Bergijk et al.* (1998) konnten für das experimentelle Modell einer Lupus-Nephritis im Gegensatz zu einer membranösen Glomerulonephritis eine erhöhte Akkumulation von $\alpha 1(\text{IV})$ -Ketten im glomerulären Mesangium feststellen (Bergijk et al., 1998). In der membranösen Nephritis hingegen werden $\alpha 1(\text{IV})$ - und $\alpha 2(\text{IV})$ -Ketten subendothelial in der glomerulären Basalmembran exprimiert (Kim et al., 1994a). Die oben aufgezählte Verteilung des Kollagens Typ IV deutet an, dass die unterschiedlichen Untereinheiten des Kollagens Typ IV je nach Erkrankungstyp mesangial oder Basalmembran-gebunden exprimiert werden können. In den eigenen Experimenten wurden Antikörper gegen Kollagen Typ I und -IV sowie Fibronectin verwendet. Resultate mit diesen Antikörpern bestätigten, dass die sklerotischen Bereiche in den Syndecan-4-defizienten Männchen (4.2.3) diese typischen extrazellulären Matrixproteine enthalten. Da jedoch Pan-Antikörper eingesetzt wurden, konnte nicht erfasst werden, ob Expressionsunterschiede für einzelne Untereinheiten von Kollagenen bestehen. Durch Untersuchungen zu unterschiedlichen experimentellen Zeitpunkten post Nephrektomie könnte man überprüfen, ob Verlagerungen in der Expression der einzelnen Untereinheiten bzw. so genannte Expressionsmaxima auftreten. In den eigenen Experimenten wäre eine solche Detektion für Kollagen Typ IV aufschlussreich gewesen, da die pathologische Auswirkung der Syndecan-4-Defizienz in dem Modell der UNX bisher nicht beschrieben wurde und ein genaues Verteilungsprofil der Kollagen Typ IV Untereinheiten zur näheren Charakterisierung geführt hätte.

Für Kollagen Typ IV konnten *Bergijk et al.* belegen, dass es innerhalb einer experimentellen Glomerulonephritis differentiell exprimiert wird (Bergijk et al., 1998). Zu dem Zeitpunkt, an dem die glomeruläre Expansion eintritt, wird die $\alpha 1(\text{IV})$ -Untereinheit in der mesangialen Matrix exprimiert. Die $\alpha 2(\text{IV})$ -Untereinheit wird dagegen in der glomerulären Basalmembran (GBM) exprimiert. Nach einer Dauer von zehn Wochen steigt die Expression der $\alpha 2(\text{IV})$ -Untereinheit in der GBM stark an, wohingegen die $\alpha 1(\text{IV})$ -Untereinheit verstärkt in dem Übergangsbereich zwischen mesangialer Matrix und GBM synthetisiert wird. Diese Untereinheiten des Kollagens Typ IV werden in dieser Glomerulonephritis nicht ko-exprimiert. Gleichzeitig nimmt jedoch im Verlauf der renalen Erkrankung die Expression für die $\alpha 3$ - bis $\alpha 5$ -Untereinheiten des Kollagen Typ IV, die insbesondere in den verdickten Bereichen der GBM auftreten, zu. Diese Darstellung der

differentiellen Expression verdeutlicht, wie komplex die Synthese der ECM-Proteine auf zeitlicher und räumlicher Ebene reguliert wird. Sie unterscheidet sich zudem von einem Krankheitsmodell zum anderen (Bergijk et al., 1998; Kim et al., 1991b; Kim et al., 1991a; Yagame et al., 1995).

Die apoptotisch wirkenden, zellkernfreien sowie nodulären Strukturen (Kimmelstiel-Wilson Nodi) aus Syndecan-4-defizienten Männchen (siehe 3.3.2.2) ähneln denen in diabetischer Nephropathie. Die oftmals dokumentierten sklerotischen Nodi enthalten Fibronektin, Kollagen Typ I und -IV (Pauksakon et al., 2002; Westall et al., 2004). Inwiefern sich die pathologischen Mechanismen, die zu demselben histologischen Bild nodulärer Strukturen führen, ähneln und welche zellulären Prozesse der UNX im Falle der Syndecan-4-Defizienz zu Grunde liegen, muss noch im Detail geklärt werden. Auffällig ist jedoch, dass sich unabhängig von den initialen Schritten der Schädigung bei einer Nephritis, wie z.B. bei der unilateralen Nephrektomie von Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen, der Anti-Thy1.1-Nephritis sowie der diabetischen Niere, die histomorphologischen Erscheinungen in den fortgeschrittenen Stadien der Glomerulosklerose sich ähneln.

4.2.5 Glomeruläre Schäden in Syndecan-4-defizienten männlichen UNX-Mäusen variieren zwischen einer starken und milderer Form von Sklerose

Die elektronenmikroskopische Analyse wurde zur weiteren Differenzierung der beobachteten Veränderungen in Syndecan-4-defizienten Mäusen als Folge der unilateralen Nephrektomie herangezogen (siehe 3.3.3). Für einen besseren Vergleich wurden auch weibliche Mäuse beider Genotypen auf ultrastruktureller Ebene untersucht und mit männlichen Wildtyp- sowie Knockout-Mäusen verglichen. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte in den Wildtyp-Mäusen sowie den weiblichen Syndecan-4-defizienten Mäusen eine geringfügige Expansion der mesangialen Matrix festgestellt werden. In den männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen hingegen war eine großflächige Mesangiumexpansion sichtbar. Gleichzeitig wurde dieses Bild einer mesangialen Expansion von komprimierten Kapillarlumina begleitet. Des Weiteren konnten verdickte Basalmembranbereiche beobachtet werden, die in verschiedenen Abschnitten entlang der Basalmembran Einschnürungen aufwiesen, so dass das

Gesamtbild der Glomeruli pathologisch wirkte. In keiner der untersuchten Wildtyp-Mäuse sowie keiner Syndecan-4-defizienten weiblichen Maus konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Interessanterweise konnte der in Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen beobachtete Glomerulopathie keine eindeutige Bezeichnung zugewiesen werden. Ultrastrukturell ähnelt das Bild der mesangialen Expansion zum einen einer IgA-Nephropathie (McPhaul, Jr., 1977). Diese ist jedoch im Gegensatz zu UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Männchen durch elektronendichte Material-Einlagerungen gekennzeichnet. Zum anderen bestehen gewisse ultrastrukturelle Ähnlichkeiten zu einer membranproliferativen Glomerulonephritis des Typ I. Bei dieser Form einer Glomerulonephritis sind ebenfalls Erweiterungen des mesangialen Bereichs zu beobachten. Gleichzeitig sind Verdickungen und Einschnürungen der Basalmembran charakteristische Merkmale dieser Erkrankungsform. Bei der membranproliferativen Nephritis führen subendotheliale Protein-Ablagerungen dazu, dass Mesangialzellen verdrängt werden (Ferrario und Rastaldi, 2004; Zhang und Lee, 1997). Diese betroffenen Mesangialzellen bewirken die Spaltung und Verdopplung der Basalmembran, die anschließend lamelliert und sich oberhalb der Mesangialzelle ansammelt (Ferrario und Rastaldi, 2004). Subendothelial vorkommende elektronendichte Materialien sind jedoch auch bei dieser Glomerulonephritis charakteristische Merkmale. Bei den meisten Erkrankungen sind in der Literatur elektronendichte Ablagerungen innerhalb der Matrix bzw. der Basalmembran beschrieben (Bagheri et al., 2005; Barratt und Feehally, 2005; Ferrario und Rastaldi, 2004; Joh et al., 1998; Westall et al., 2004; Zhang und Lee, 1997). Aus diesem Grund konnten keine genauen Übereinstimmungen zu den eigenen ultrastrukturellen Befunden ausgemacht werden.

Außerdem stellte sich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie heraus, dass innerhalb der glomerulär erkrankten Syndecan-4-defizienten Mäuse eine Variabilität des Erkrankungsgrades auftrat. Die glomerulären Beschädigungen in Syndecan-4-defizienten Mäusen betrafen bei einigen Mäusen komplette Glomeruli und bei anderen nur einzelne großflächige Segmente innerhalb der Glomeruli. Die Veränderungen in allen betroffenen Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen unterschieden sich jedoch nicht in ihrem ultrastrukturellen Erscheinungsbild. In einigen Fällen schien die glomerulosklerotische Entwicklung fortgeschrittener zu sein.

Von einer Variabilität glomerulärer Beschädigungen nach der Induktion einer Nephritis (*interanimal variability*) wurde bereits in der Literatur berichtet (Kriz et al., 2003). In

dieser Studie von *Kriz et al.* wurden gleichaltrige sowie ausschließlich männliche Wistar-Ratten gewählt, die durch Injektion des Anti-Thy1.1- Antikörpers eine mesangioproliferative Degeneration in ihren Glomeruli entwickelten. Interessanterweise stellten *Kriz et al.* fest, dass die untersuchten und gleich behandelten Ratten innerhalb einer Untersuchungsgruppe mit einer Varianz der Degeneration reagierten. Diese Varianz reichte von geringen glomerulären Beschädigungen bis hin zum Verlust von dreißig Prozent der Nephrone. Möglicherweise reflektieren die unterschiedlichen Stufen der beobachteten Schäden die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Glomerulosklerose. Nach dieser Theorie schreitet die renale Erkrankung in verschiedenen Individuen mit einem unterschiedlichen Tempo voran und ergibt dennoch ein relativ einheitliches, histomorphologisches bzw. ultrastrukturelles Bild (Stout et al., 1986).

Dieses oben beschriebene einheitliche Bild der Glomerulopathie in den eigenen Daten wird zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, dass weder Wildtyp-Mäuse beider Geschlechter noch weibliche Syndecan-4-defizienten Mäuse auf ultrastruktureller Ebene vergleichbare Veränderungen nach unilateraler Nephrektomie aufweisen (siehe 3.3.3 und 3.3.4). Diese Variabilität in den eigenen Versuchsreihen ist möglicherweise auf geringe individuelle Schwankungen, wie z.B. Gewichtsschwankungen der männlichen Syndecan-4-defizienten Mäuse, zurückzuführen. Literaturhinweise betonen, dass das Körpergewicht auf den Verlauf der renalen Erkrankung Einfluss nehmen kann (Gonzalez et al., 2005; Kren und Hostetter, 1999). *Gonzalez et al.* fanden heraus, dass ein hoher *body mass Index* (BMI) zu Proteinurie und hohem Blutdruck in nephrektomierten Mäusen führt. Folglich war aufgrund dieser ungünstigen Konstellation die glomeruläre Schädigung in den Versuchstieren mit hohem BMI größer als in solchen mit normalen BMI (Gonzalez et al., 2005).

4.2.6 Der TGF- β 1 Proteinspiegel in den UNX-Nieren aus männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen ist erhöht

TGF- β 1 ist ein pleiotroper Wachstumsfaktor, der in verschiedene inflammatorischen und fibrotische Prozesse involviert ist und diese maßgeblich beeinflussen kann (Klahr und Morrissey, 1998; Okada et al., 2005). Unabhängig von ihrer Ätiologie sind progressive renale Erkrankungen unter anderem durch eine erhöhte Expression von TGF- β 1

gekennzeichnet. Als Wachstumsfaktor ist TGF- β 1 multifunktionell und kann sowohl profibrotisch als auch anti-fibrotisch wirken. Seine jeweilige Funktion ist von den multiplen Reservoirs anderer Wachstumsfaktoren, von Hormonen, sowie vom jeweiligen Gewebe abhängig (Cheng und Grande, 2002). Eine chronische Überexpression von TGF- β 1 führt zu einer progressiv fortschreitenden, mesangialen Expansion und zur Akkumulation von Immuneinlagerungen von Antikörpern sowie Matrixprodukten (Bottinger und Bitzer, 2002; Cheng und Grande, 2002; Liu, 2006).

In den eigenen Experimenten konnte gezeigt werden (siehe 3.3.5), dass in den Syndecan-4-defizienten Mäusen in Folge einer unilateralen Nephrektomie eine höhere TGF- β 1 Proteinsynthese als bei nephrektomierten Wildtyp-Mäusen vorlag. Ein entscheidendes Kriterium für die genotypisch bedingte Überexpression von TGF- β 1 war das Geschlecht. Die erhöhten TGF- β 1 Werte konnten mittels Western Blot ausschließlich in den männlichen Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen detektiert werden. Dieser Befund unterstützt die Hypothese einer geschlechtsgebundenen Nephropathie in den Syndecan-4-defizienten Mäusen, und verweist auf eine Korrelation zwischen der beobachteten Nephropathie in Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen und der TGF- β 1 Proteinmenge.

Bei der diabetischen Nephropathie, als eine der am weitesten verbreiteten Nierenerkrankungen in den Vereinigten Staaten von Amerika und in Europa, konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen dem Anstieg der TGF- β 1 Expression und dem Erkrankungsgrad aufgedeckt werden. Im Zusammenhang mit diabetischen Erkrankungen konnte dargestellt werden, dass erhöhte Glukosekonzentrationen *in vitro* die TGF- β 1 Expression in Mesangialzellen induzieren (Hoffman et al., 1998) und dadurch die Pathogenese initiieren. In weiteren Untersuchungen zu diesem Sachverhalt konnte gezeigt werden, dass der TGF- β 1 *Level* in nephrektomierten Versuchstieren ansteigt (Lee et al., 1995) und seine Inhibition zur Regression der fibrotischen Ereignisse führt (Chatziantoniou und Dussaule, 2005; Heeg et al., 2005; Wang et al., 2003; Wang et al., 2005; Zeisberg et al., 2003). Folglich ist der *Level* der TGF- β 1 Proteinexpression ein Indiz für den Grad der Nephropathie und kann zur Analyse sowie zur weiteren Aufklärung der Ätiologie herangezogen werden. Die eigenen Befunde an Syndecan-4-defizienten männlichen UNX-Mäusen untermauern die oben genannte Hypothese.

Im Gegensatz zu TGF- β 1 konnten in UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen keine erhöhte Expression von α -SMA Protein festgestellt werden (siehe 3.3.5). Die Synthese von α -SMA ist ein Kennzeichen der Myofibroblastendifferenzierung in einer Vielzahl von Erkrankungen sowie inflammatorischen Prozessen (siehe 1.3.1). α -SMA kann daher als Fibrosemarker betrachtet werden. Es wird allgemein angenommen, dass neben anderen Mediatoren auch TGF- β 1 die α -SMA Produktion anregt, wodurch Myofibroblasten, die in die akut fibrotischen Bereiche einwandern, ihre kontraktile Fähigkeiten erhalten. Eine fehlende Zunahme der α -SMA Proteinexpression könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass bei fortgeschrittener Sklerose keine Erhöhung für α -SMA Protein nachweisbar ist. Dieser Sachverhalt wurde von *Boukhalfa et al.* untersucht (Boukhalfa et al., 1996), die an Biopsien humaner Nieren zeigen konnten, dass α -SMA zwar im proliferierenden Mesangium, nicht mehr jedoch bei fortgeschrittener Glomerulosklerose synthetisiert wird. Aufgrund dieser Resultate wurde angenommen, dass die α -SMA Expression den Grad einer interstitiellen Fibrose, jedoch nicht unbedingt den Grad einer Glomerulosklerose reflektiert.

In der eigenen Arbeit wurde die höchste α -SMA Proteinmenge in einer UNX-Niere aus einer männlichen Wildtyp-Maus detektiert, die sich makroskopisch nicht von den anderen präparierten UNX-Nieren unterschied. Es stellte sich anschließend heraus, dass aus dieser Wildtyp-Maus eine hydronephrotische Niere exzidiert wurde. Dennoch wurde die UNX-Niere, die möglicherweise bereits kongenital durch die kontralaterale hydronephrotische Niere gestresst war, als Doppelt-Negativkontrolle mitgeführt. Sie unterschied sich sonst in keinem der untersuchten Parameter von den übrigen UNX-Mäusen. Ebenso konnten keine ultrastrukturellen Anomalitäten beobachtet werden, die diese Wildtyp-Maus aus der Gruppe der untersuchten nephrektomierten Mäuse gesondert auszeichnete. Es wurden auch keine pathologischen Beobachtungen auf lichtmikroskopischer Ebene dokumentiert, wie sie für Syndecan-4-defiziente männliche UNX-Mäuse charakteristisch waren. Zudem waren die TGF- β 1 Proteinmengen nicht erhöht, womit sie sich deutlich von den UNX-Nieren aus männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen unterschied. Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, dass diese, vermutlich kongenital gestresste Wildtyp-Niere in Folge der Nephrektomie nicht demselben pathologischen Mechanismus unterworfen war, der bei Syndecan-4-defizienten Männchen für pathologische Ausprägungen verantwortlich ist.

Welche konkreten Signalmechanismen über TGF- β 1 laufen und welche Signalpartner diesen Prozess der renalen Erkrankung von Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen beeinflussen könnten, ist bisher unklar. Die eigenen Befunde skizzieren interessanterweise einen Zusammenhang zwischen der TGF- β 1 Proteinmenge und der Syndecan-4-Defizienz in männlichen UNX-Mäusen, der unabhängig von der α -SMA Expression ist. Es könnte aufbauend auf den eigenen Daten überprüft werden, ob die TGF- β 1 Signale nach Bindung an seine Rezeptoren ausschließlich über die Smad-Proteine weitergeleitet werden oder ein möglicher *Crosstalk* zwischen den Smads und MAPK besteht (siehe 1.3.1.1).

Es ist inzwischen bekannt, dass Zelloberflächen-HSPGs wie beispielsweise Betaglykan (Rops et al., 2004) und Syndecan-2 (Chen et al., 2004a) die Bindung von TGF- β 1 an seine spezifischen Rezeptoren regulieren können. Die Überexpression von TGF- β 1 und Syndecan-2 (4.2.7) sprechen für eine starke fibrotische Reaktion in nephrektomierten Nieren von Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen.

4.2.7 Syndecan-2 mRNA und Proteine werden in Glomeruli der UNX-Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäusen exprimiert

Eine unilaterale Nephrektomie induzierte in den Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäusen die Expression von Syndecan-2 (siehe 3.3.6.1). Die Expression konnte in den Glomeruli sowohl von weiblichen als auch männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Interessant war dieser Befund im Rückblick auf bisherige Untersuchungen zur Syndecan-2 Expression (4.1) in der Niere. Im Gegensatz zu normalen Wildtyp- und Knockout-Nieren sowie Wildtyp UNX-Mäusen konnte die Syndecan-2 Expression mit Hilfe verschiedener Methoden ausschließlich in den UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Mäusen nachgewiesen werden.

Sowohl die *Real time* PCR als auch die Western Blot Analysen legen eine deutlich erhöhte Expression für Syndecan-2 dar. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen wurden in den UNX-Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäuse doppelt so hohe Syndecan-2 Protein-*Level* ermittelt. Auf RNA-Ebene waren die *Level* für Syndecan-2 in weiblichen Syndecan-4-defizienten Mäusen fast um das Fünffache, in männlichen Syndecan-4-knockout-Mäusen sogar um das Siebenfache erhöht. In Anfärbungen mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper (M-140, polyklonal Kaninchen anti-Maus, Santa Cruz) (4.2.1), und einem

monoklonalen Syndecan-2 Antikörper gegen die *geshreddete* Ektodomäne (monoklonal Maus anti-Maus, Guido David), konnten Syndecan-2 Proteine in den UNX-Nieren aus Syndecan-4 defizienten UNX-Mäusen lokalisiert werden. Die Verteilung von Syndecan-2 Proteinen in den sklerotischen Glomeruli defizienter UNX-Mäuse suggerierte, dass die Expressionsstärke von der Glomerulopathie abhängen könnte. Die sklerotischen Bereiche in den Glomeruli der männlichen Syndecan-4-defizienten UNX-Mäuse zeichneten sich durch eine sehr starke Anfärbung für Syndecan-2 Proteine aus. Interessant war dieser Befund im Zusammenhang mit den Ergebnissen für Wildtyp-Nieren, die keine glomeruläre Anfärbung für Syndecan-2 zeigten. In den UNX-Nieren der Wildtyp-Mäuse waren lediglich Tubuli positiv für Syndecan-2 Proteine angefärbt. Der Anstieg der Syndecan-2 Synthese in Folge der unilateralen Nephrektomie suggeriert eine mögliche Kompensierung der Syndecan-4-Defizienz. In vielen renalen Erkrankungen ist die Hochregulation eines Heparansulfat-Proteoglykans von Bedeutung. Verschiedene Autoren befassten sich mit der Expression von HSPGs in renalen Erkrankungen und skizzierten einen möglichen Zusammenhang zwischen der Akkumulation der Proteoglykane und der renalen Erkrankungsform (Bjornson et al., 2006; Groffen et al., 1999; Okuda et al., 1990; Sakai et al., 2005). *Yung et al.* haben in ihren Arbeiten herausgefunden, dass Syndecan-4 in der proliferativen IgA-Nephropathie erhöht exprimiert wird. Als Zytoskelettkomponente wird parallel dazu auch α -Actinin in der mesangioproliferativen IgA-Nephropathie überexprimiert (Yung et al., 2001). *Yung et al.* begründen die Hochregulation von Syndecan-4 in der mesangioproliferativen Erkrankung damit, dass es als Signalmolekül bei der durch die IgA-Nephropathie bedingten Zytoskelett-Umstrukturierungen in Mesangialzellen mitwirkt. Daher vermuten die Autoren, dass Syndecan-4 in der Proliferationsphase der IgA-Nephropathie für die zytoskeletalen Umgestaltungen notwendig ist. Gleichzeitig konnten *Yung et al.* belegen, dass Syndecan-4 in Mesangialzellen mit dem Zytoskelett-assoziierten Protein α -Actinin co-immunpräzipitiert. Da sowohl α -Actinin als auch Syndecan-4 auf Protein- und RNA-Level hochreguliert werden, scheint diese Protein-Interaktion im Verlauf der IgA-Nephropathie eine entscheidende Rolle zu spielen (Yung et al., 2001).

Syndecan-2 hingegen wird vermehrt in der diabetischen Niere des Diabetes Typ II exprimiert, in welchem die erhöhten Syndecan-2 Protein-Level mit erhöhten TGF- β RI und -RII assoziiert sind (Chen et al., 2004a). Außerdem suggerieren *in vitro* Daten mit papillären Fibroblasten, dass Syndecan-2 die TGF- β vermittelte Synthese von

extrazellulären Matrixproteinen reguliert. Beispielsweise führte die Überexpression von Syndecan-2 in den papillären Fibroblasten zu einer erhöhten Fibronectin-Ablagerung. Gleichzeitig konnte verzeichnet werden, dass nach Syndecan-2 Überexpression vielmehr TGF- β Proteine an der Zelloberfläche gebunden wurden. Die Stimulation der Syndecan-2 überexprimierenden Zellen mit rekombinanten TGF- β hatte einen Verstärkereffekt der beobachteten Matrixdeposition zur Folge (Chen et al., 2004a). *Chen et al.* konnten jedoch keinen Anstieg der Syndecan-2 Expression in Folge einer TGF- β Stimulation feststellen (Chen et al., 2004a), obwohl in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass TGF- β eine Erhöhung der Syndecan-2 *Level* in verschiedenen Zellen, wie z.B. Leberzellen, induzierte (Sebestyen et al., 2000; Worapamorn et al., 2001). Zusätzlich zu den oben genannten Befunden konnten *Chen et al.* herausfinden, dass ein Zusammenhang zwischen der Syndecan-2 und Betaglykan Expression besteht. Betaglykan ist ein Typ III TGF- β -Rezeptor. Syndecan-2 scheint den Abbau von Betaglykan zu fördern, so dass die Zelloberflächenverteilung dieses Rezeptors abnimmt. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht aufgeklärt. Diese Daten von *Chen et al.* sprechen jedoch für eine mögliche fibrotische Funktion von Syndecan-2. Damit stimmen die oben genannten Daten mit den eigenen Beobachtungen überein. In den eigenen Untersuchungen konnte in den UNX-Nieren aus Syndecan-4 defizienten männlichen Mäusen parallel zur Syndecan-2 Expression auch eine vermehrte TGF- β Proteinsynthese beobachtet werden. Zusätzlich wird das Bild einer profibrotischen Interaktion zwischen Syndecan-2 und TGF- β durch die histologischen sowie ultrastrukturellen Befunde einer Glomerulopathie verstärkt. Die Tatsache, dass Syndecan-2 ausschließlich in Syndecan-4-defizienten Mäusen überexprimiert wird und dabei lediglich die Männchen ein pathologisches Bild zeigen, lässt erneut auf eine geschlechtsgebundene sowie hormonell bedingten Prädisposition für Glomerulopathien nach einer unilateralen Nephrektomie schließen. In den weiblichen Syndecan-4-defizienten UNX-Mäusen konnte keine erhöhte Expression für TGF- β detektiert werden, so dass sich möglicherweise deshalb eine Syndecan-2 Kompensation nicht nachteilig auswirkt.

Zur genauen Deutung der Ursache für die in Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen auftretende Glomerulosklerose wären weitere Experimente notwendig. Zunächst müsste aufbauend auf den vorliegenden Daten festgestellt werden, ob in den nephrektomierten Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen eine direkte Interaktion zwischen Syndecan-2

und TGF- β vorliegt. Dies könnte mit Hilfe von Immunpräzipitationen sowie immunhistochemischen Färbungen realisiert werden. Falls eine direkte Interaktion existieren sollte, könnten Untersuchungen angestrebt werden, die die nachfolgenden Mediatoren, die zur Fibrose beitragen, aufzufindig machen. Mit Hilfe von Western Blots könnte analysiert werden, wie die Expressions-Level der Smads sowie MAPK in den UNX-Nieren von Syndecan-4-defizienten männlichen Mäusen sich von denen der anderen Versuchsmäuse unterscheiden. In diesem Kontext wäre auch von Bedeutung, welche TGF- β Rezeptoren eine Rolle bei der Signalübertragung spielen und ob die Betaglykan Proteinmenge, ähnlich der Studie von *Chen et al.* (Chen et al., 2004a), ebenfalls herunter reguliert wird.

4.3 Unilaterale urethrale Obstruktion als Nierenerkrankungsmodell einer tubulointerstitiellen Fibrose

Die unilaterale urethrale Obstruktion ist ein Modell, das sich besonders gut zur Erzeugung einer hydronephrotischen Niere eignet. Charakteristische Merkmale dieser hydronephrotischen Niere sind infiltrierte, inflammatorische Zellen, die durch Sekretion von Chemokinen und verschiedenen Zytokinen, die Fibrosereaktion in der Niere verstärken (Becker und Hewitson, 2000). Ein weiteres besonders markantes Kennzeichen ist die tubuläre Atrophie, deren Ursache in der Transdifferenzierung der tubulären Epithelzellen zu Myofibroblasten gesehen wird (Chevalier, 2006). Durch Apoptose der Epithelzellen wird dieses pathologische Bild der Tubulus-Atrophie in obstruierten Nieren verstärkt. Gleichzeitig korreliert die Transdifferenzierung in Myofibroblasten mit einem Verlust des Adhäsionsproteins E-Cadherin und einem Anstieg der α -SMA Expression. Weitere charakteristische Merkmale sind eine Akkumulierung von extrazellulärer Matrix, die von Metalloproteinasen nicht degradiert werden kann. Daher entsteht ein Ungleichgewicht, das längerfristig zu einer renalen Insuffizienz führt (Chevalier, 2006; Zeisberg et al., 2001b; Zeisberg et al., 2001a; Zoja et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die UUO als Erkrankungsmodell an Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen angewandt, um mögliche Unterschiede im Verlauf der Pathogenese zwischen den Genotypen heraus zu finden.

4.3.1 Syndecan-4-defiziente Mäuse produzieren in den späteren Phasen der UUU vermehrt α -SMA und hsc70

Die UUU wurde ausschließlich an männlichen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen, die älter als zwei Monate waren, durchgeführt, so dass geschlechtsbedingte Differenzen ausgeschlossen werden konnten. Als Erkrankungsmodell wird die UUU präferentiell an männlichen Versuchsmäusen durchgeführt, da weibliche Mäuse unbeabsichtigt anstelle einer Obstruktion ovariectomiert werden können. Um den Verlauf einer tubulointerstitiellen Fibrose in Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen vergleichend zu untersuchen, wurden für die UUU unterschiedliche Zeitpunkte gewählt. Nach drei, zwölf und fünfzig Tagen post UUU wurden die kontralateralen sowie obstruierten Nieren aus den Mäusen herauspräpariert und für unterschiedliche Versuche prozessiert. Zu diesen Untersuchungen zählten lichtmikroskopische, immunhistochemische sowie proteinbiochemische Analysen. Histologische Anfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin sowie PAS verdeutlichten, dass die obstruierten Nieren bereits nach einer Dauer von drei Tagen Schäden einer tubulointerstitiellen Fibrose zeigten. Die beobachteten Schäden in den obstruierten Nieren sind durch Ereignisse wie Infiltration von mononuklearen Zellen, atrophierende Tubuli sowie Ansammlung von extrazellulärer Matrix definiert.

Diese charakteristischen Merkmale konnten sowohl an obstruierten Nieren aus Wildtyp- als auch aus Syndecan-4 $-/-$ Mäusen ohne auffällige Unterschiede beobachtet werden (siehe 3.4.2). Die Arbeitshypothese, dass die Syndecan-4-Defizienz eine Veränderung der fibrotischen Pathogenese im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hervorrufen würde, wurde dadurch nicht bestätigt. Die Syndecan-4 Expression wird in einer Vielzahl von Prozessen, wie der Heilung von Hautwunden, reguliert (Lundqvist und Schmidtchen, 2001). Außerdem wird Syndecan-4 in verschiedenen Immunzellen exprimiert. Dennoch hat die Defizienz des Syndecan-4 Gens in dem UUU-Modell gegenüber dem Wildtyp keine Nachteile gezeigt (Gallo et al., 1994; Kojima et al., 2001; Li et al., 2002; Post et al., 2006). Syndecan-4 wird beispielsweise auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten sowie neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert (Gotte, 2003; Kaneider et al., 2001). Syndecan-4-defiziente Mäuse zeigen eine größere Anfälligkeit auf einen durch Lipopolysaccharide erzeugten septischen Schock (Ishiguro et al., 2001a). Aufgrund dieser Befunde wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Defizienz des Syndecan-4 Gens zu einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion der Niere führen würde.

Als fibrotisches Markerprotein wurde das Myofibroblasten-spezifische α -SMA Protein gewählt, um dessen Expression mittels Western Blot in den ligierten sowie contralateralen Nieren nach drei, zwölf und fünfzig Tagen post UUO zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen zu vergleichen (siehe 3.4.3). Interessanterweise fehlten Signale für α -SMA Protein in den contralateralen Nieren beider Genotypen nach zwölf und fünfzig Tagen UUO. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Expression von α -SMA Protein in den ligierten Nieren der Syndecan-4-defizienten Mäuse fünfzig Tage post Obstruktion festgestellt werden. Der Anstieg von α -SMA Protein in den obstruierten Nieren ist ein Indiz für die tubulointerstitielle Fibrose, die durch vermehrte Myofibroblastendifferenzierung verschlimmert wird. Dadurch steigt mit anhaltender Obstruktion die α -SMA Synthese an (Nagatoya et al., 2002). Die fehlenden Signale in den contralateralen Nieren sind widersprüchlich, zumal α -SMA drei Tage post UUO in diesen detektiert wurde. Diese Ergebnisse sprechen für eine negative Regulation des α -SMA Proteins, so dass die Synthese in den contralateralen Nieren bei andauernder Fibrose gedrosselt wird. Da dies aber in Wildtyp- und auch in Syndecan-4-defizienten Mäusen beobachtet werden konnte, scheint die Expression für α -SMA generell gedrosselt zu werden, was letztlich für die kompensatorische Funktion der contralateralen Niere wichtig ist. Für Endothelin konnte nach experimenteller obstruktiver Nephropathie dieselbe Beobachtung gemacht werden (Hegarty et al., 2003). Endothelin erfüllt in der Niere eine gefäßverengende Wirkung (Vasokonstriktor), und kann daher auf Blutdruckverhältnisse regulierend einwirken (Chatziantoniou et al., 2004; Chatziantoniou und Dussaule, 2005). Zudem scheint Endothelin in verschiedenen vaskulären und renalen Erkrankungen erhöht synthetisiert zu werden. Therapieansätze mit Antagonisten gegen Endothelin-spezifische Rezeptoren verhalfen zu einer Regeneration des renalen bzw. vaskulären Gewebes. Bei einer obstruktiven Nephropathie war in contralateralen Nieren der Endothelin-Spiegel reduziert. Eine verminderte Endothelin-Expression in der contralateralen Niere wurde als Anpassung an die hämodynamischen Veränderungen in Folge der Obstruktion gedeutet. In den eigenen Untersuchungen könnte ein ähnlicher Sachverhalt der Grund für die veränderte α -SMA Expression in der contralateralen Niere sein.

Die gesteigerte Produktion von α -SMA in den obstruierten Nieren aus Syndecan-4-knockout Mäusen fünfzig Tage post UUO stellt einen deutlichen Kontrast zu den Verhältnissen in Wildtyp-Mäusen dar. Erst nach einer verlängerten Obstruktion kommt es

zu einem phänotypischen Merkmal in den Syndecan-4-defizienten Mäusen. Sie zeigen eine erhöhte Myofibroblastendifferenzierung, die mit Hilfe des Markerproteins α -SMA erfasst werden konnte. Interessant ist, dass diese phänotypische Ausprägung zu einem sehr späten Zeitpunkt auftritt. Möglicherweise konnte die Defizienz des Syndecan-4 Gens in den früheren Phasen post Obstruktion (Tag 3 und 12) kompensiert werden. In Folge der progressiven Erkrankung ist eine Kompensierung wahrscheinlich zu späteren Phasen nicht mehr möglich.

Parallel zu α -SMA ist auch eine erhöhte hsc70 Expression erkennbar. Hitzeschockproteine dienen als molekulare Chaperone und können als Stressantwortelemente aktiviert werden (Chan et al., 2001; Valles et al., 2003; Williams et al., 1993). *Chan et al.* haben in ihren Arbeiten zur Regression einer obstruktiven Nephropathie gezeigt, dass die hsc70 Proteinmengen in obstruierten Nieren ansteigen (Chan et al., 2001). Während der unilateralen urethralen Obstruktion schützen hsc70 Proteine möglicherweise vor oxidativem Stress. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress nach UUO auftritt (Chevalier et al., 1999; Kawada et al., 1999; Manucha et al., 2005; Saborio et al., 2000). Eventuell ist der oxidative Stress in Syndecan-4-defizienten Mäusen fünfzig Tage nach einer UUO höher als in Wildtyp-Mäusen zum gleichen Zeitpunkt und führt so zu einer erhöhten hsc70 Expression. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste man den oxidativen Stress messen. Dies ist mit verschiedenen Methoden möglich. Dazu zählt unter anderem die Detektion von Markerproteinen wie die Hämoxxygenase HO-1 (Annuk, 2004; Boaz et al., 2005; Garcon et al., 2004; Lucchi et al., 2005; scamps-Latscha et al., 2004). HO-1 ist ein Enzym, das den Häm-Abbau katalysiert, dabei entstehen als Reaktionsprodukte freies Eisen und Kohlenmonoxid. In UUO-Experimenten ist die Expression von HO-1 in den obstruierten Nieren höher als in den Kontrollnieren (Pat et al., 2005). Trotz der Annahme, dass oxidativer Stress eine initiale Form der inflammatorischen Reaktion auf die UUO ist, scheint die Expression von HO-1 sieben Tage post UUO nicht zu sinken. Die eigenen Ergebnisse können ein Hinweis darauf sein, dass der oxidative Stress auch nach längerer Persistenz der Obstruktion bestehen bleibt und so die Expression der Hitzeschockproteine weiter induziert. Weitere Experimente, die die Messung reaktiver Sauerstoffspezies einbeziehen und unterschiedliche Zeitpunkte anvisieren, könnten zur weiteren Aufklärung der erhöhten hsc70 Proteinmenge in den Syndecan-4-defizienten Mäusen beitragen.

Um den Hinweis zu überprüfen, ob ein phänotypischer Unterschied zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-defizienten Mäusen erst nach fünfzig tägiger UUO auftritt, könnten längere Obstruktionszeiten (75, 90 Tage) durchgeführt werden. Die Aufklärung über die Kausalität zwischen erhöhten α -SMA sowie hsc70 Proteinmengen und der Syndecan-4-Defizienz gekoppelt mit einer längeren Obstruktionsdauer (50 Tage) bedarf weiterer Untersuchungen. Von Interesse wäre, zu untersuchen, über welche Mediatoren die fibrotische Reaktion (α -SMA und hsc70 Expression) kontrolliert und aktiviert wird. Oxidativer Stress kann über Angiotensin II und auch über den Inhibitor des Plasminogenaktivators ausgelöst werden, die auch die Pathogenese einer renalen Fibrose fördern können (Amann et al., 2006; Javeshghani et al., 2006; Theuer et al., 2002; Whaley-Connell et al., 2006; Yamamoto et al., 2005). Eine Verknüpfung zwischen Angiotensin und Syndecan-2 diskutieren *Chen et al.* (2004a). Eine Blockierung der Angiotensin AT₁-Rezeptoren mit dem Antagonisten Losartan resultierte in einer reduzierten Expression von Syndecan-2 sowie in einer Relokalisation von α 3- und α 6-Integrinen in der neonatalen Niere (Chen et al., 2004b). Diese Beobachtungen implizieren, so die Autoren, dass die über Syndecane und Integrine ablaufenden Zell-ECM Interaktionen und nachträglich die ECM-vermittelten zellulären Funktionen gestört sind. In Korrelation dazu konnten die Autoren eine durch Losartan ausgelöste Inhibition der Zellproliferation in neonatalen Rattennieren beobachten.

In einer älteren Arbeit mit vaskulären Muskelzellen konnte nach Stimulation mit Angiotensin II eine erhöhte Syndecan-Expression beobachtet werden (Cizmeci-Smith et al., 1993). Des Weiteren zeigten kürzlich publizierte Daten, dass die hsc70 Expression durch eine Losartan-Behandlung von UUO-Mäusen rasch ansteigt (Manucha et al., 2005). Diesen Befunden zu Folge könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen einer verminderten oder fehlenden Syndecan-Expression und einer hohen hsc70-Proteinmengen herrschen.

Ein weiteres Kriterium zur Untersuchung der tubulointerstitiellen Fibrose war die Expression der MMP. Ihre Expression ist in verschiedenen fibrotischen Nierenerkrankungen herunter reguliert. Bezüglich der MMP-Expression in obstruierten Nieren konnten jedoch auch zu späteren Phasen der UUO keine genotypisch bedingten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Syndecan-4-knockout Mäusen detektiert werden. In Wildtyp und Syndecan-4-defizienten Mäusen liegt laut der Gelatine-Zymogramme das gleiche Expressionsmuster der MMPs vor. Das zeitliche Expressionsprofil der MMPs

variierte im Verlauf der UUO. Jedoch waren die Variationen in beiden Genotypen gleichermaßen ausgeprägt. In den frühen Phasen der UUO zeichneten sich zunächst die inaktive pro-MMP-2 sowie aktive MMP-2-Bande und die (inaktive) pro-MMP-1 Bande ab. Mit anhaltender Obstruktion hingegen konnte in den obstruierten Nieren beider Genotypen lediglich eine Bande detektiert werden, die sich als pro-MMP-2 erwies. Diese Befunde zeigen, dass MMP-2 zu früheren Zeitpunkten der Obstruktion (3 und 12 Tage) in seiner aktiven Form vorlag und später nicht mehr aktiviert wurde. Solche Änderungen im Expressionsprofil wurden auch in der Literatur beschrieben (Tomita et al., 2004). Nicht aktiviertes MMP-2 könnte mit einer stagnierenden ECM-Umbildungsphase zusammenhängen, so dass eine Aktivierung dieser Protease nicht notwendig ist. Möglich ist aber auch eine gezielte Inhibition von MMP-2. Experimentelle Studien zu MMPs im Zusammenhang mit UUO veranschaulichten, dass TIMP-1 zur Inhibition von MMP-9 führt, und dass die TIMP-1 Expression biphasisch verläuft (Duymelinck et al., 2000; Kim et al., 2001). Die Inhibition der MMPs durch TIMP-1 wäre demnach nicht kontinuierlich und würde die beobachtete Veränderung im MMP-Expressionsprofil erklären.

Die oben genannten Hinweise verdeutlichen, dass die Anforderungen an Proteasen bzw. an ihre Inhibitoren im Verlauf der experimentellen Obstruktion variieren. Dies spiegelt sich in den Daten der eigenen Arbeit wider. Die fehlende Aktivierung von MMP-2 könnte mit der Inhibition durch TIMPs zusammenhängen. MMP-2 kann Kollagen Typ IV, -V, -VII, -X, -XI und ebenso andere Matrixkomponenten wie Laminin und Fibronectin proteolytisch degradieren (Liu et al., 2005; Ma et al., 2004; Schaefer et al., 1997). Eine MMP-Inhibition führt zu einem verminderten Abbau und somit zur Akkumulierung entsprechender ECM-Proteine, was ein charakteristisches Merkmal der renalen Fibrose darstellt. Möglicherweise werden aber auch vermehrt ECM-Proteine gebildet, die nicht von MMP-2 abgebaut werden. Diese Annahme stimmt mit Beobachtungen überein, die eine Änderung der Matrixsynthese im Verlauf der tubulointerstitiellen Fibrose aufzeigen (Douthwaite et al., 1999; Johnson et al., 2002).

4.4 Syndecan-4-Defizienz in primären Hautfibroblasten

Eine weitere Fragestellung war eine mögliche Kompensation der Syndecan-4-Defizienz durch andere Syndecane in primären Hautfibroblasten. Die aufgestellte Arbeitshypothese bezog sich auf Beobachtungen aus Wundheilungsstudien an Syndecan-4-defizienten Mäusen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigen diese eine verzögerte Wundheilung mit einer reduzierten Kontraktionsfläche und vermindertem Granulationsgewebe. Die Wundheilungsstörungen sind gleichzeitig mit einer gestörten Angiogenese verknüpft. Dennoch sind am Ende der Wundheilung die Wunden bei beiden Genotypen gleichermaßen verheilt (Echtermeyer et al., 2001).

Vorherige Arbeiten (Dissertation Kerstin Brands) deuten auf eine reduzierte Migrationsfähigkeit der dermalen Fibroblasten aus Syndecan-4-defizienten Mäusen, die eine reduzierte Bildung von Granulationsgewebe erklären könnten. Eine Studie mit Vimentin-knockout-Mäusen zeigte vergleichbare Wundheilungs- sowie Migrationsdefizite wie es für Syndecan-4-defiziente Mäuse beschrieben wurde (Eckes et al., 1998). Vimentin ist ein Protein, welches neben Paxillin in fokalen Kontakten, den Adhäsionspunkten einer Zelle auf (geeigneten) Matrices, vorkommt. Das Fehlen ähnlicher funktioneller Proteine wie Vimentin und Syndecan-4 verursacht offensichtlich aufgrund einer reduzierten Migration dieselben Wundheilungsstörungen. *Eckes et al.* stellten eine reduzierte Transdifferenzierung von Vimentin-defizienten Fibroblasten in Myofibroblasten fest (Eckes et al., 1998). Diese reduzierte Transdifferenzierung, die sich in der Expression von α -SMA äußert, konnte auch für Syndecan-4-defiziente Fibroblasten beobachtet werden (Dissertation Kerstin Brands).

Die Anwesenheit von Syndecan-4 wurde in fokalen Kontakten mittels *in vitro* Untersuchungen mehrfach bestätigt (Carey, 1997; Couchman und Woods, 1999; Echtermeyer et al., 1999; Saoncella et al., 1999; Simons und Horowitz, 2001; Tkachenko et al., 2006; Wilcox-Adelman et al., 2002a; Woods et al., 2000; Woods und Couchman, 1994). Für Syndecan-4-defiziente dermale Fibroblasten wurde eine Umstrukturierung der fokalen Kontakte beschrieben. In Syndecan-4-defizienten Fibroblasten sind die fokalen Kontakte nicht an den Außenflächen verteilt, sondern vielmehr in der Zellmitte lokalisiert. Außerdem weisen diese fokalen Kontakte weniger komplexe Proteinbindungen auf als sie üblicherweise beobachtet werden (Zamir und Geiger, 2001). Diese strukturellen Unterschiede wurden als ein möglicher Grund der reduzierten Wanderungsfähigkeit

gedeutet (Wilcox-Adelman et al., 2002b; Woods et al., 1998; Woods und Couchman, 1994). Die *in vitro* analysierten fokalen Kontakte sind vermutlich für verschiedene zelluläre Vorgänge, wie z.B. für die Zellmigration, essentiell. Da das Fehlen von Syndecan-4 eine Umstrukturierung von fokalen Kontakten bewirkt, könnte die Wundheilung vermutlich aufgrund einer beeinträchtigten Signalvermittlung in den umstrukturierten fokalen Kontakten gestört sein.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob eine mögliche Relokalisation anderer Syndecan-Familienmitglieder in Fibroblasten die kompensatorischen Anforderungen erfüllen und zu einer am Ende erfolgreichen Wundheilung beitragen könnte.

4.4.1 Syndecan-1 mRNA und Proteine werden vermehrt in den Syndecan-4-defizienten dermalen Fibroblasten exprimiert

In den eigenen Untersuchungen konnte eine Hochregulation der Syndecan-1 Expression in Syndecan-4-defizienten Fibroblasten festgestellt werden (3.6.1). Im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten konnte eine um fünfzig Prozent erhöhte Syndecan-1 RNA- und Proteinmenge detektiert werden. Aufgrund dieser erhöhten Syndecan-1 Expression könnte eine Kompensation der Syndecan-4-Defizienz in Fibroblasten erreicht werden. Die eigenen Ergebnisse sind jedoch konträr zu der bisherigen Annahme, dass Syndecan-2 aufgrund seiner größeren Homologien zu Syndecan-4 diese Kompensationsfunktion einnehmen würde (Couchman, 2003; Oh und Couchman, 2004). Interessant sind diese Ergebnisse zusätzlich unter dem Aspekt, dass Syndecan-1 primär ein Protein der epithelialen Zellen darstellt (Bernfield et al., 1993; Bernfield et al., 1999). Dennoch sprechen die erhaltenen Resultate für eine Überexpression von Syndecan-1 auf Protein- und RNA-Level, die um fünfzig Prozent höher lag als bei Wildtyp-Fibroblasten. Ob dies auch *in vivo* der Fall ist, muss noch anhand von Wundheilungsstudien an Syndecan-4-defizienten Mäusen überprüft werden.

Syndecan-1 ist in verschiedenen Zelltypen an migratorischen Prozessen beteiligt (Chakravarti et al., 2005). Insofern ist die Annahme, dass Syndecan-1 die Defizienz von Syndecan-4 ersetzen und funktionell ausgleichen könnte, nicht unrealistisch. Für Wechselwirkungen mit Wachstumsfaktoren könnten die GAG-Ketten an der Syndecan-1 Ektodomäne, die ebenfalls zur Konzentrierung von Wachstumsfaktoren an der

Zelloberfläche dienen, ausreichen (Beauvais und Rapraeger, 2003; Carey, 1997; Couchman, 2003; Elenius und Jalkanen, 1994). Inwiefern die funktionelle Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von Syndecan-4 durch die Überexpression von Syndecan-1 ersetzt werden kann, ist bisher noch ungeklärt. Syndecan-4 kann über seine zytoplasmatische Domäne mit verschiedenen Proteinen, wie Synectin, Syndesmos und α -Actinin, die an einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind, interagieren (Couchman, 2003; Echtermeyer et al., 1999; Horowitz und Simons, 1998; Koo et al., 2006; Kusano et al., 2004). Eine weitere besondere Eigenschaft von Syndecan-4 ist die Aktivierung von Protein Kinase C α nach der Phosphorylierung eines bestimmten Serinrestes in seiner zytoplasmatischen Domäne (Horowitz und Simons, 1998). Des Weiteren ist erst kürzlich die Vermutung belegt worden, dass über die Interaktion von Syndecan-4 und PKC, RhoA aktiviert wird (Dovas et al., 2006). Syndecan-4 wurde anhand dieser Experimente eine ganz spezifische Rolle in der Signaltransduktion der Rho-GTPasen zugesprochen, die bisher für keines der anderen Syndecan-Mitglieder beschrieben wurde. Im Falle der Kompensation einer Syndecan-4-Defizienz durch die Überexpression von Syndecan-1 in dermalen Fibroblasten stellt sich die Frage, inwiefern Syndecan-1 zur Übernahme dieser RhoA-Aktivierung fähig ist. *McQuade und Rapraeger* haben zeigen können, dass für die Lamellipodienbildung in Raji-Zellen die zytoplasmatische Region von Syndecan-1 nicht gebraucht wird, sondern eine Kombination der extrazellulären Region für die dynamische Reorganisation und der transmembranen Domäne für die initiale Ausbreitung der Zellen benötigt wird (McQuade und Rapraeger, 2003). In einer weiteren Studie wurde in Deletionsexperimenten andererseits gezeigt, dass die zytoplasmatische Domäne und insbesondere deren variable Domäne für die Lamellipodienbildung und die Migration von verschiedenen Zelltypen, wie auch von Tumorzellen, notwendig ist (Chakravarti et al., 2005).

Analog zu Syndecan-4 scheint die zytoplasmatische Domäne von Syndecan-1 eine spezifische Rolle bei der Zellmigration auszuüben. Im Gegensatz zu Syndecan-4 ist Syndecan-1 an der Lamellipodienbildung während der Zellwanderung beteiligt. Es existieren jedoch Unterschiede zwischen der Assemblierung von fokalen Kontakten und der lamellipodialen Strukturen zur Zellbewegung. Als fokale Kontakte werden feste Adhäsionspunkte der Zellen mit der darunter liegenden extrazellulären Matrix bezeichnet, die Signaltransduktions-Mikrodomänen darstellen (Couchman, 2003; Echtermeyer et al., 1999). Im Vergleich dazu gelten Lamellipodien als Fascin-reiche Strukturen am Rande

einer motilen Zelle. In Mausfibroblasten scheint Syndecan-1 die $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Signale zu regulieren und damit zur Zell-ECM Interaktion beizutragen (McQuade et al., 2006). Ähnlich wie bei Syndecan-4, welches ebenfalls mit Integrinen interagiert, ist die Ektodomäne von Syndecan-1 hierfür essentiell (Humphries et al., 2005; Stepp et al., 2002). Die Ektodomänen von Syndecan-1 und -4 sind zwar etwas unterschiedlich aufgebaut, möglicherweise können sie aber unter entsprechenden Voraussetzungen durch Aktivierung alternativer Signalwege die gleichen zellulären Prozesse regulieren. Beispielsweise wurde an Trabekelwerk-Zellen gezeigt, dass fokale Adhäsionen auf einer immobilisierten Fibronectin-Matrix über $\alpha_4\beta_1$ -Integrin vermittelt und ohne Beteiligung von Syndecan-4 gebildet werden (Peterson et al., 2005). In Fibroblasten wird dieser Prozess dagegen über $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelt und benötigt außerdem Syndecan-4 (Humphries et al., 2005; Thodeti et al., 2003; Woods et al., 2000; Woods und Couchman, 1994; Woods und Couchman, 2001; Zimmermann und David, 1999).

4.4.2 TGF- β 1 beeinflusst die Expression von Syndecan-1 mRNA in Syndecan-4-defizienten Hautfibroblasten

Durch exogene Zugabe von TGF- β 1 konnte in primären Hautfibroblasten aus Syndecan-4-defizienten Mäusen die Syndecan-1 Expression gedrosselt werden. Dieser Einfluss durch die TGF- β 1 Zugabe war nach 48 h Stimulation am deutlichsten zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine vierzigprozentige Reduktion der Syndecan-1 mRNA gegenüber Wildtypzellen beobachtet. Offenbar hat TGF- β 1 einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von Syndecanen in dermalen Fibroblasten. Eine ähnliche Wirkung von TGF- β 1 wurde in der Literatur bereits für verschiedene Zelltypen beschrieben. In periodontalen Osteoblasten und Fibroblasten wird die Syndecan-1 Transkription durch die Inkubation mit TGF- β 1 ebenfalls gedrosselt (Worapamorn et al., 2001). Eine weitere Studie zur Differenzierung von Myoblasten zeigt einen ähnlichen regulatorischen Einfluss von TGF- β 1 auf die Syndecan-1 Expression (Larrain et al., 1997). Während dieser entwicklungsphysiologischen Veränderungen spielen TGF- β 1 und verschiedene andere Faktoren eine wichtige Rolle. Sie steuern über die Regulation der Syndecan-1 Expression den Differenzierungszustand der Zelle oder beeinflussen die Zellbewegung. Erst kürzlich wurde eine Arbeit mit Epithelzellen publiziert, in denen TGF- β 1 die Syndecan-1

Expression erhöht (Hayashida et al., 2006). Die dort beschriebene dosis- und zeitabhängige Induktion von Syndecan-1 nach Stimulation mit TGF- β 1 konnte durch die Blockierung von PKC α gestört werden. Diese Befunde suggerieren einen Zusammenhang zwischen TGF- β 1 und PKC α im Bezug auf die Syndecan-1 Expression. Die Mutation eines Serinrestes in der zytoplasmatischen Domäne von Syndecan-1 ließ diese Wirkung aufheben (Hayashida et al., 2006). Es scheint, als ob die Phosphorylierung des Serinrestes von Syndecan-1 durch PKC α zu einer Erhöhung der Syndecan-1 Oberflächenexpression führt, und diese von TGF- β 1 direkt kontrolliert wird. Eine Regulation findet demnach auf posttranslationaler Ebene statt. In Leberzellen scheint TGF- β 1 sowohl einen aktivierenden als auch einen inhibierenden Effekt auf die Expression von Syndecan-1 auszuüben (Sebestyen et al., 2000).

All diese Arbeiten liefern Indizien dafür, dass eine direkte Regulation der Syndecan-1 Expression durch TGF- β möglich ist. Dies spricht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Welche Faktoren eine Erniedrigung der Synthese des potentiell kompensatorisch wirkenden Proteins bewirken, ist zurzeit noch unklar. Höchstwahrscheinlich reflektiert die verringerte Synthese entweder eine pathophysiologische oder eine entwicklungsphysiologische Situation.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in Syndecan-4-defizienten Mäusen in Folge einer unilateralen Nephrektomie Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hervorgerufen werden. Darunter ist die Syndecan-2 Expression, die ausschließlich in den Glomeruli der Syndecan-4-defizienten UNX-Mäuse beider Geschlechter detektiert wurde, zu nennen. Außerdem entwickelten ausschließlich männliche Syndecan-4-defiziente Mäuse einen pathologischen Phänotyp, der sich durch großflächige Expansion des glomerulären Mesangiums und Einschnürungen der Basalmembran sowie dem Verlust der Kapillarlumen auszeichnete. Die unilaterale urethrale Obstruktion hingegen zeigte keine sichtbaren histologischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Erst nach einer fünfzig-tägigen Obstruktion konnten erhöhte α -SMA und hsc70 Proteinmengen in Syndecan-4-knockout Mäusen detektiert werden. Diese Befunde aus zwei unterschiedlichen Erkrankungsmodellen veranschaulichen, dass im Falle der UNX die

Syndecan-4-Defizienz einen pathologischen Phänotyp, der geschlechtsgebunden ist, hervorruft. Es wird deutlich, dass die Syndecan-4-Defizienz den Verlauf einer renalen Erkrankung Geschlechter-abhängig beeinflusst. Daher ist es von Interesse, die genauen Zusammenhänge aufzuklären. Zunächst sollte geklärt werden, durch welche Bedingungen sich in männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen eine Glomerulopathie entwickelt. Da Testosterone in renalen Erkrankungen einen negativen Einfluss ausüben und das Krankheitsbild verschlimmern können, sollte überprüft werden, ob sich der Testosteronspiegel der Syndecan-4-defizienten Männchen vor und nach der Behandlung von dem der Wildtyp-Männchen unterscheidet.

Eine weitere Fragestellung bezieht sich auf die Regulation der Syndecan-2 Expression in Syndecan-4-defizienten Mäusen. Hier sollte geklärt werden, ob Hormone die Syndecan-2 Expressions-*Level* regulieren können und ob dadurch der Verlauf der Glomerulopathie beeinflusst wird. Zur Überprüfung könnte man weiblichen Syndecan-4-defizienten Mäusen Testosterone, den männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen hingegen Östrogene verabreichen. Und anschließend könnten die Expressions-*Level* von Syndecan-2 in den Versuchsgruppen miteinander verglichen werden. In diesem Kontext sollte der TGF- β 1 Proteinspiegel ebenfalls analysiert werden. Da eigene Resultate eine erhöhte TGF- β 1 Proteinmenge in Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen zeigen, wäre interessant zu erfahren, ob sich durch hormonelle Einflüsse die Expression von TGF- β 1 verändert.

Bezüglich der TGF- β 1 Expression in den männlichen Syndecan-4-defizienten Mäusen sollte untersucht werden, über welchen Signalweg die TGF- β 1 Signale weitergeleitet werden. In der Literatur werden die Smad-Proteine als direkte Mediatoren der TGF- β Signale betrachtet. Jedoch ist ein *Cross-Talk* zwischen MAP Kinasen und den Smad-Proteinen möglich. Daher sollte überprüft werden, wie die Expression der MAPK und Smads in den Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen sich von denen der Syndecan-4-defizienten UNX-Weibchen und Wildtyp UNX-Mäusen unterscheiden.

Des Weiteren sollte herausgefunden werden, ob in Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen eine direkte Interaktion zwischen Syndecan-2 und TGF- β 1, wie es bereits für die diabetische Niere beschrieben wurde (Chen et al. 2004), besteht. Mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie könnte eine mögliche Ko-Lokalisation von Syndecan-2 und TGF- β 1 in den Syndecan-4-defizienten UNX-Männchen auffindig gemacht werden. Untersuchungen mit Hilfe von Immunpräzipitationen könnten darüber hinaus aufklären, ob

eine Bindung zwischen TGF- β 1 und Syndecan-2 Proteinen in UNX-Nieren aus Syndecan-4-defizienten Männchen existiert. Möglicherweise würden diese Untersuchungen weitere Einblicke in die komplexen Zusammenhänge der Glomerulopathie und der an ihr beteiligten Proteine geben.

5 Literaturverzeichnis

1. Adamczak, M., Gross, M. L., Krtil, J., Koch, A., Tyralla, K., Amann, K., und Ritz, E. (2003). Reversal of glomerulosclerosis after high-dose enalapril treatment in subtotaly nephrectomized rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14** (11), 2833-2842.
2. Ahn, J. M., Rayamajhi, N., Gyun, Kang S., und Sang, Yoo H. (2006). Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* .
3. Akhtar, M. und Al, Mana H. (2004). Molecular basis of proteinuria. *Adv. Anat. Pathol.* **11** (6), 304-309.
4. Alexakis, C., Maxwell, P., und Bou-Gharios, G. (2006). Organ-specific collagen expression: implications for renal disease. *Nephron Exp. Nephrol.* **102** (3-4), e71-e75.
5. Alexander, C. M., Reichsman, F., Hinkes, M. T., Lincecum, J., Becker, K. A., Cumberland, S., und Bernfield, M. (2000). Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat. Genet.* **25** (3), 329-332.
6. Amann, K., Wanner, C., und Ritz, E. (2006). Cross-Talk between the Kidney and the Cardiovascular System. *J. Am. Soc. Nephrol.* .
7. Annuk, M. (2004). Which marker is informative in characterizing the level of oxidative stress in ESRD patients? *Nephron Clin. Pract.* **98** (1), c1-c2.
8. Antus, B., Hamar, P., Kokeny, G., Szollosi, Z., Mucsi, I., Nemes, Z., und Rosivall, L. (2003). Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18** (1), 54-61.
9. Asanuma, K. und Mundel, P. (2003). The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin. Exp. Nephrol.* **7** (4), 255-259.
10. Asundi, V. K. und Carey, D. J. (1995). Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J. Biol. Chem.* **270** (44), 26404-26410.
11. Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., Kleinman, H. K., Marinkovich, M. P., Martin, G. R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J. H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J. R., Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L. M., Talts, J. F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der, Mark K., Wewer, U. M., Yamada, Y., und Yurchenco, P. D. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24** (5), 326-332.
12. Aumailley, M., El, Khal A., Knoss, N., und Tunggal, L. (2003). Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol.* **22** (1), 49-54.

13. Baciú, P. C., Acaster, C., und Goetinck, P. F. (1994). Molecular cloning and genomic organization of chicken syndecan-4. *J. Biol. Chem.* **269** (1), 696-703.
14. Bader, B. L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkaapati, S., Murshed, M., und Nischt, R. (2005). Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol. Cell Biol.* **25** (15), 6846-6856.
15. Bagheri, N., Pepple, D. A., Hassan, M. O., Harding, C. V., und Emancipator, S. N. (2005). Development of immune-complex glomerulonephritis in athymic mice: T cells are not required for the genesis of glomerular injury. *Lab Invest.* **85** (3), 354-363.
16. Balda, M. S. und Anderson, J. M. (1993). Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am. J. Physiol.* **264** (4 Pt 1), C918-C924.
17. Ball, S., Bella, J., Kielty, C., und Shuttleworth, A. (2003). Structural basis of type VI collagen dimer formation. *J. Biol. Chem.* **278** (17), 15326-15332.
18. Barratt, J. und Feehally, J. (2005). IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (7), 2088-2097.
19. Bascands, J. L. und Schanstra, J. P. (2005). Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* **68** (3), 925-937.
20. Beauvais, D. M. und Rapraeger, A. C. (2003). Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by alpha5beta3 integrins in human breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **286** (2), 219-232.
21. Beck, K., Dixon, T. W., Engel, J., und Parry, D. A. (1993). Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J. Mol. Biol.* **231** (2), 311-323.
22. Becker A und Boesken W.H. (2005). Differentialdiagnose renaler Erkrankungen mit der Urinprotein-Elektrophorese. *J. Lab. Med* **29**(5), 317-324.
23. Becker, G. J. und Hewitson, T. D. (2000). The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **9** (2), 133-138.
24. Benzing, T. (2004). Signaling at the slit diaphragm. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15** (6), 1382-1391.
25. Bergijk, E. C., Van, Alderwegen, I, Baelde, H. J., De, Heer E., Funabiki, K., Miyai, H., Killen, P. D., Kalluri, R. K., und Bruijn, J. A. (1998). Differential expression of collagen IV isoforms in experimental glomerulosclerosis. *J. Pathol.* **184** (3), 307-315.
26. Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., und Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:729-77., 729-777.

27. Bernfield, M., Hinkes, M. T., und Gallo, R. L. (1993). Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation. *Dev. Suppl.* :**205-12.**, 205-212.
28. Bidani, A. K., Griffin, K. A., Plott, W., und Schwartz, M. M. (1994). Renal ablation acutely transforms 'benign' hypertension to 'malignant' nephrosclerosis in hypertensive rats. *Hypertension.* **24** (3), 309-316.
29. Bidani, A. K., Mitchell, K. D., Schwartz, M. M., Navar, L. G., und Lewis, E. J. (1990). Absence of glomerular injury or nephron loss in a normotensive rat remnant kidney model. *Kidney Int.* **38** (1), 28-38.
30. Bjornson, A., Moses, J., Ingemansson, A., Haraldsson, B., und Sorensson, J. (2005). Primary human glomerular endothelial cells produce proteoglycans, and puromycin affects their posttranslational modification. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **288** (4), F748-F756.
31. Bjornson, Granqvist A., Ebefors, K., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Haraldsson, B., und Sorensson, Nystrom J. (2006). Podocyte proteoglycan synthesis is involved in the development of nephrotic syndrome. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* .
32. Boaz, M., Iuliano, L., Himmelfarb, J., Matas, Z., Micheletta, F., McMonagle, E., Friedman, V., Natoli, S., Gvirtz, G., Biro, A., Smetana, S., Sabo, G., Gafter, U., und Weinstein, T. (2005). Baseline oxysterols and other markers of oxidative stress, inflammation and malnutrition in the vitamin e and intima media thickness progression in end-stage renal disease (VIPER) cohort. *Nephron Clin. Pract.* **100** (4), c111-c119.
33. Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., van der, Schueren B., Zhang, Z., David, G., und Gallay, P. A. (2003). Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity.* **18** (1), 27-39.
34. Bortoff, K. D. und Wagner, W. D. (2005). Reduced syndecan-4 expression in arterial smooth muscle cells with enhanced proliferation. *Exp. Mol. Pathol.* **78** (1), 10-16.
35. Bottinger, E. P. und Bitzer, M. (2002). TGF-beta signaling in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13** (10), 2600-2610.
36. Boukhalfa, G., Desmouliere, A., Rondeau, E., Gabbiani, G., und Sraer, J. D. (1996). Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Exp. Nephrol.* **4** (4), 241-247.
37. Boutaud, A., Borza, D. B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K. O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M. E., und Hudson, B. G. (2000). Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.* **275** (39), 30716-30724.
38. Breyer, M. D., Bottinger, E., Brosius, F. C., III, Coffman, T. M., Harris, R. C., Heilig, C. W., und Sharma, K. (2005). Mouse models of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (1), 27-45.

39. Burbach, B. J., Ji, Y., und Rapraeger, A. C. (2004). Syndecan-1 ectodomain regulates matrix-dependent signaling in human breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **300** (1), 234-247.
40. Burgeson, R. E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G. R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J., und . (1994). A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* **14** (3), 209-211.
41. Buzello, M., Haas, C. S., Hauptmann, F., Gross, M. L., Faulhaber, J., Schultze-Mosgau, S., Ehmke, H., Ritz, E., und Amann, K. (2004). No aggravation of renal injury in apolipoprotein E knockout mice (ApoE^{-/-}) after subtotal nephrectomy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19** (3), 566-573.
42. Carey, D. J. (1997). Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* **327** (Pt 1), 1-16.
43. Chakravarti, R., Sapountzi, V., und Adams, J. C. (2005). Functional role of syndecan-1 cytoplasmic V region in lamellipodial spreading, actin bundling, and cell migration. *Mol. Biol. Cell.* **16** (8), 3678-3691.
44. Chan, W., Krieg, R. J., Jr., Ward, K., Santos, F., Jr., Lin, K. C., und Chan, J. C. (2001). Progression after release of obstructive nephropathy. *Pediatr. Nephrol.* **16** (3), 238-244.
45. Charnaux, N., Brule, S., Hamon, M., Chaigneau, T., Saffar, L., Prost, C., Lievre, N., und Gattegno, L. (2005). Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/ CXCL12. *FEBS J.* **272** (8), 1937-1951.
46. Chatziantoniou, C., Boffa, J. J., Tharaux, P. L., Flamant, M., Ronco, P., und Dussaule, J. C. (2004). Progression and regression in renal vascular and glomerular fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* **85** (1), 1-11.
47. Chatziantoniou, C. und Dussaule, J. C. (2005). Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression? *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **289** (2), F227-F234.
48. Chen, L., Klass, C., und Woods, A. (2004a). Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **279** (16), 15715-15718.
49. Chen, Y., Lasaitiene, D., Gabrielsson, B. G., Carlsson, L. M., Billig, H., Carlsson, B., Marcussen, N., Sun, X. F., und Friberg, P. (2004b). Neonatal losartan treatment suppresses renal expression of molecules involved in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15** (5), 1232-1243.
50. Cheng, J. und Grande, J. P. (2002). Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)*. **227** (11), 943-956.
51. Chevalier, R. L. (2006). Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr. Opin. Pediatr.* **18** (2), 153-160.

52. Chevalier, R. L., Thornhill, B. A., und Wolstenholme, J. T. (1999). Renal cellular response to ureteral obstruction: role of maturation and angiotensin II. *Am. J. Physiol.* **277** (1 Pt 2), F41-F47.
53. Choi, S., Lee, E., Kwon, S., Park, H., Yi, J. Y., Kim, S., Han, I. O., Yun, Y., und Oh, E. S. (2005). Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4. *J. Biol. Chem.* **280** (52), 42573-42579.
54. Cizmeci-Smith, G., Stahl, R. C., Showalter, L. J., und Carey, D. J. (1993). Differential expression of transmembrane proteoglycans in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **268** (25), 18740-18747.
55. Clayton, A., Thomas, J., Thomas, G. J., Davies, M., und Steadman, R. (2001). Cell surface heparan sulfate proteoglycans control the response of renal interstitial fibroblasts to fibroblast growth factor-2. *Kidney Int.* **59** (6), 2084-2094.
56. Costell, M., Carmona, R., Gustafsson, E., Gonzalez-Iriarte, M., Fassler, R., und Munoz-Chapuli, R. (2002). Hyperplastic conotruncal endocardial cushions and transposition of great arteries in perlecan-null mice. *Circ. Res.* **91** (2), 158-164.
57. Couchman, J. R. (2003). Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4** (12), 926-937.
58. Couchman, J. R., Kapoor, R., Sthanam, M., und Wu, R. R. (1996). Perlecan and basement membrane-chondroitin sulfate proteoglycan (bamacan) are two basement membrane chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans in the Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix. *J. Biol. Chem.* **271** (16), 9595-9602.
59. Couchman, J. R. und Woods, A. (1999). Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J. Cell Sci.* **112**, 3415-3420.
60. David, G. (1993). Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J.* **7** (11), 1023-1030.
61. David, G., Bai, X. M., van der, Schueren B., Marynen, P., Cassiman, J. J., und van den, Berghe H. (1993). Spatial and temporal changes in the expression of fibroglycan (syndecan-2) during mouse embryonic development. *Development.* **119** (3), 841-854.
62. David, G., van der, Schueren B., Marynen, P., Cassiman, J. J., und van den, Berghe H. (1992). Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. *J. Cell Biol.* **118** (4), 961-969.
63. Day, R. M., Mitchell, T. J., Knight, S. C., und Forbes, A. (2003). Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine.* **21** (5), 224-233.
64. Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O., und Sugahara, K. (2004). Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and

- cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* **279** (36), 37368-37376.
65. Dixon, A. J., Burns, J., Dunnill, M. S., und McGee, J. O. (1980). Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. *J. Clin. Pathol.* **33** (11), 1021-1028.
 66. Dodson, M. V. und Schaeffer, W. I. (2000). Generation of useful cell culture data. *Methods Cell Sci.* **22** (1), 27-28.
 67. Dolz, R., Engel, J., und Kuhn, K. (1988). Folding of collagen IV. *Eur. J. Biochem.* **178** (2), 357-366.
 68. Douthwaite, J. A., Johnson, T. S., Haylor, J. L., Watson, P., und el Nahas, A. M. (1999). Effects of transforming growth factor-beta1 on renal extracellular matrix components and their regulating proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10** (10), 2109-2119.
 69. Dovas, A., Yoneda, A., und Couchman, J. R. (2006). PKC{beta}-dependent activation of RhoA by syndecan-4 during focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* **119** (Pt 13), 2837-2846.
 70. Dunlop, M. E. und Larkins, R. G. (1990). Insulin-dependent contractility of glomerular mesangial cells in response to angiotensin II, platelet-activating factor and endothelin is attenuated by prostaglandin E2. *Biochem. J.* **272** (3), 561-568.
 71. Duymelinck, C., Dauwe, S. E., De Greef, K. E., Ysebaert, D. K., Verpooten, G. A., und De Broe, M. E. (2000). TIMP-1 gene expression and PAI-1 antigen after unilateral ureteral obstruction in the adult male rat. *Kidney Int.* **58** (3), 1186-1201.
 72. Dworkin, L. D. und Feiner, H. D. (1986). Glomerular injury in uninephrectomized spontaneously hypertensive rats. A consequence of glomerular capillary hypertension. *J. Clin. Invest.* **77** (3), 797-809.
 73. Dworkin, L. D., Hostetter, T. H., Rennke, H. G., und Brenner, B. M. (1984). Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension. *J. Clin. Invest.* **73** (5), 1448-1461.
 74. Echtermeyer, F., Baciuc, P. C., Saoncella, S., Ge, Y., und Goetinck, P. F. (1999). Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J. Cell Sci.* **112** (20), 3433-3441.
 75. Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M., und Goetinck, P. (2001). Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J. Clin. Invest.* **107** (2), R9-R14.
 76. Eckert, R. (2002) *Tierphysiologie, 4. Auflage, Thieme Verlag*
 77. Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delouvee, A., Koteliansky, V., Babinet,

- C., und Krieg, T. (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell Sci.* **111** (Pt 13), 1897-1907.
78. Eddy, A. A. (2000). Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr. Nephrol.* **15** (3-4), 290-301.
79. Eddy, A. A. (2005). Can renal fibrosis be reversed? *Pediatr. Nephrol.* **20** (10), 1369-1375.
80. El-Aouni, C., Herbach, N., Blattner, S. M., Henger, A., Rastaldi, M. P., Jarad, G., Miner, J. H., Moeller, M. J., St-Arnaud, R., Dedhar, S., Holzman, L. B., Wanke, R., und Kretzler, M. (2006). Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17** (5), 1334-1344.
81. Elenius, K. und Jalkanen, M. (1994). Function of the syndecans--a family of cell surface proteoglycans. *J. Cell Sci.* **107** (Pt 11), 2975-2982.
82. Elenius, V., Gotte, M., Reizes, O., Elenius, K., und Bernfield, M. (2004). Inhibition by the soluble syndecan-1 ectodomains delays wound repair in mice overexpressing syndecan-1. *J. Biol. Chem.* **279** (40), 41928-41935.
83. Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., und Sato, H. (2003). Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J. Biol. Chem.* **278** (42), 40764-40770.
84. Erickson, A. C. und Couchman, J. R. (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem.* **48** (10), 1291-1306.
85. Ezaki, T. (2000). Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron.* **31** (6), 639-649.
86. Ferrario, F. und Rastaldi, M. P. (2004). Histopathological atlas of renal diseases. Membranoproliferative glomerulonephritis. *J. Nephrol.* **17** (4), 483-486.
87. Filla, M. S., Dam, P., und Rapraeger, A. C. (1998). The cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates fibroblast growth factor-2 binding and activity. *J. Cell Physiol.* **174** (3), 310-321.
88. Fisher, M. C., Li, Y., Seghatoleslami, M. R., Dealy, C. N., und Kosher, R. A. (2006). Heparan sulfate proteoglycans including syndecan-3 modulate BMP activity during limb cartilage differentiation. *Matrix Biol.* **25** (1), 27-39.
89. Fleck, C., Appenroth, D., Jonas, P., Koch, M., Kundt, G., Nizze, H., und Stein, G. (2006). Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats--influence of sex, strain, and surgical procedure. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57** (3), 195-205.

90. Floege, J. und Feehally, J. (2000). IgA nephropathy: recent developments. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11** (12), 2395-2403.
91. Flyvbjerg, A., Bennett, W. F., Rasch, R., van Neck, J. W., Groffen, C. A., Kopchick, J. J., und Scarlett, J. A. (1999). Compensatory renal growth in uninephrectomized adult mice is growth hormone dependent. *Kidney Int.* **56** (6), 2048-2054.
92. Flyvbjerg, A., Schrijvers, B. F., De Vriese, A. S., Tilton, R. G., und Rasch, R. (2002). Compensatory glomerular growth after unilateral nephrectomy is VEGF dependent. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* **283** (2), E362-E366.
93. Forsberg, E. und Kjellen, L. (2001). Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *J. Clin. Invest.* **108** (2), 175-180.
94. Fukuda, K., Yoshitomi, K., Yanagida, T., Tokumoto, M., und Hirakata, H. (2001). Quantification of TGF-beta1 mRNA along rat nephron in obstructive nephropathy. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **281** (3), F513-F521.
95. Gafter, U., Ben-Bassat, M., und Levi, J. (1990). Castration inhibits glomerular hypertrophy and proteinuria in uninephrectomized male rats. *Eur. J. Clin. Invest.* **20** (4), 360-365.
96. Gallo, R. L., Ono, M., Povsic, T., Page, C., Eriksson, E., Klagsbrun, M., und Bernfield, M. (1994). Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (23), 11035-11039.
97. Garcon, G., Leleu, B., Zerimech, F., Marez, T., Haguenoer, J. M., Furon, D., und Shirali, P. (2004). Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *J. Occup. Environ. Med.* **46** (11), 1180-1186.
98. Gonzalez, E., Gutierrez, E., Morales, E., Hernandez, E., Andres, A., Bello, I., az-Gonzalez, R., Leiva, O., und Praga, M. (2005). Factors influencing the progression of renal damage in patients with unilateral renal agenesis and remnant kidney. *Kidney Int.* **68** (1), 263-270.
99. Gotte, M. (2003). Syndecans in inflammation. *FASEB J.* **17** (6), 575-591.
100. Griffin, K. A., Picken, M. M., und Bidani, A. K. (2004). Blood pressure lability and glomerulosclerosis after normotensive 5/6 renal mass reduction in the rat. *Kidney Int.* **65** (1), 209-218.
101. Groffen, A. J., Ruegg, M. A., Dijkman, H., van, de, V, Buskens, C. A., van den, Born J., Assmann, K. J., Monnens, L. A., Veerkamp, J. H., und van den Heuvel, L. P. (1998). Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *J. Histochem. Cytochem.* **46** (1), 19-27.
102. Groffen, A. J., Veerkamp, J. H., Monnens, L. A., und van den Heuvel, L. P. (1999). Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in

- the human glomerular basement membrane. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14** (9), 2119-2129.
103. Grootjans, J. J., Reekmans, G., Ceulemans, H., und David, G. (2000). Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *J. Biol. Chem.* **275** (26), 19933-19941.
 104. Gross, M. L., Adamczak, M., Rabe, T., Harbi, N. A., Krtil, J., Koch, A., Hamar, P., Amann, K., und Ritz, E. (2004). Beneficial Effects of Estrogens on Indices of Renal Damage in Uninephrectomized SHRsp Rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15** (2), 348-358.
 105. Gross, M. L., Ritz, E., Korsch, M., Adamczak, M., Weckbach, M., Mall, G., Berger, I., Hansen, A., und Amann, K. (2005). Effects of estrogens on cardiovascular structure in uninephrectomized SHRsp rats. *Kidney Int.* **67** (3), 849-857.
 106. Hacker, U., Nybakken, K., und Perrimon, N. (2005). Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6** (7), 530-541.
 107. Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., und Sorokin, L. M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* **85** (3), 979-1000.
 108. Hansen, K. und Abrass, C. K. (1999). Role of laminin isoforms in glomerular structure. *Pathobiology.* **67** (2), 84-91.
 109. Hara, A., Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Kawachi, H., Shimizu, F., Shibuya, M., Matsushima, K., Yokoyama, H., Egashira, K., und Kaneko, S. (2006). Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **69** (11), 1986-1995.
 110. Harris, D. C. (2001). Tubulointerstitial renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **10** (3), 303-313.
 111. Hartner, A., Cordasic, N., Klanke, B., Veelken, R., und Hilgers, K. F. (2003). Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18** (10), 1999-2004.
 112. Hartner, A., Schocklmann, H., Prols, F., Muller, U., und Sterzel, R. B. (1999). Alpha8 integrin in glomerular mesangial cells and in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* **56** (4), 1468-1480.
 113. Hayashida, K., Johnston, D. R., Goldberger, O., und Park, P. W. (2006). Syndecan-1 expression in epithelial cells is induced by TGFbeta through a PKA-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* .
 114. Heeg, M. H., Koziolk, M. J., Vasko, R., Schaefer, L., Sharma, K., Muller, G. A., und Strutz, F. (2005). The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts

- are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int.* **68** (1), 96-109.
115. Hegarty, N. J., Young, L. S., O'Neill, A. J., Watson, R. W., und Fitzpatrick, J. M. (2003). Endothelin in unilateral ureteral obstruction: vascular and cellular effects. *J. Urol.* **169** (2), 740-744.
116. Heikkila, P., Tryggvason, K., und Thorner, P. (2000). Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy. *Exp. Nephrol.* **8** (1), 1-7.
117. Henry, M. D., Satz, J. S., Brakebusch, C., Costell, M., Gustafsson, E., Fassler, R., und Campbell, K. P. (2001). Distinct roles for dystroglycan, beta1 integrin and perlecan in cell surface laminin organization. *J. Cell Sci.* **114** (Pt 6), 1137-1144.
118. Hinkes, M. T., Goldberger, O. A., Neumann, P. E., Kokenyesi, R., und Bernfield, M. (1993). Organization and promoter activity of the mouse syndecan-1 gene. *J. Biol. Chem.* **268** (15), 11440-11448.
119. Hirschberg, R. und Wang, S. (2005). Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14** (1), 43-52.
120. Hoffman, B. B., Sharma, K., Zhu, Y., und Ziyadeh, F. N. (1998). Transcriptional activation of transforming growth factor-beta1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. *Kidney Int.* **54** (4), 1107-1116.
121. Holthofer, H., Ahola, H., Solin, M. L., Wang, S., Palmen, T., Luimula, P., Miettinen, A., und Kerjaschki, D. (1999). Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am. J. Pathol.* **155** (5), 1681-1687.
122. Hopf, M., Gohring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., und Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur. J. Biochem.* **259** (3), 917-925.
123. Horowitz, A. und Simons, M. (1998). Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. *J. Biol. Chem.* **273** (40), 25548-25551.
124. Horowitz, A., Tkachenko, E., und Simons, M. (2002). Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J. Cell Biol.* **157** (4), 715-725.
125. Hostetter, T. H. (1995). Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* **57:263-78.**, 263-278.
126. Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A., und Brenner, B. M. (2001). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12** (6), 1315-1325.

127. Hricik, D. E., Chung-Park, M., und Sedor, J. R. (1998). Glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* **339** (13), 888-899.
128. Huber, T. B., Hartleben, B., Kim, J., Schmidts, M., Schermer, B., Keil, A., Egger, L., Lecha, R. L., Borner, C., Pavenstadt, H., Shaw, A. S., Walz, G., und Benzing, T. (2003a). Nephric and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol. Cell Biol.* **23** (14), 4917-4928.
129. Huber, T. B., Kottgen, M., Schilling, B., Walz, G., und Benzing, T. (2001). Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J. Biol. Chem.* **276** (45), 41543-41546.
130. Huber, T. B., Simons, M., Hartleben, B., Sernetz, L., Schmidts, M., Gundlach, E., Saleem, M. A., Walz, G., und Benzing, T. (2003b). Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum. Mol. Genet.* **12** (24), 3397-3405.
131. Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., und Neilson, E. G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N. Engl. J. Med.* **19;348** (25), 2543-2556.
132. Humphries, M. J., Mostafavi-Pour, Z., Morgan, M. R., Deakin, N. O., Messent, A. J., und Bass, M. D. (2005). Integrin-syndecan cooperation governs the assembly of signalling complexes during cell spreading. *Novartis. Found. Symp.* **269:178-88; discussion 188-92, 223-30.**, 178-188.
133. Ingram, A. J., Krepinsky, J. C., James, L., Austin, R. C., Tang, D., Salapatek, A. M., Thai, K., und Scholey, J. W. (2004). Activation of mesangial cell MAPK in response to homocysteine. *Kidney Int.* **66** (2), 733-745.
134. Inoue, T., Yaoita, E., Kurihara, H., Shimizu, F., Sakai, T., Kobayashi, T., Ohshiro, K., Kawachi, H., Okada, H., Suzuki, H., Kihara, I., und Yamamoto, T. (2001). FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int.* **59** (3), 1003-1012.
135. Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Iwase, M., Yoshikai, Y., Yanada, M., Yamamoto, K., Matsushita, T., Nishimura, M., Kusugami, K., Saito, H., und Muramatsu, T. (2001a). Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J. Biol. Chem.* **276** (50), 47483-47488.
136. Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Matsuo, S., Kusugami, K., Saito, H., und Muramatsu, T. (2001b). Syndecan-4 deficiency increases susceptibility to kappa-carrageenan-induced renal damage. *Lab Invest.* **81** (4), 509-516.
137. Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Nakamura, E., Ito, M., Nagasaka, T., Kobayashi, H., Kusugami, K., Saito, H., und Muramatsu, T. (2000). Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Dev. Dyn.* **219** (4), 539-544.
138. Ishiguro, K., Kojima, T., und Muramatsu, T. (2002). Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconj. J.* **19** (4-5), 315-318.

139. Ishola, D. A., van der Giezen, D. M., Hahnel, B., Goldschmeding, R., Kriz, W., Koomans, H. A., und Joles, J. A. (2005). In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent. *Nephrol. Dial. Transplant.* .
140. Iwano, M. und Neilson, E. G. (2004). Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13** (3), 279-284.
141. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H., und Neilson, E. G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110** (3), 341-350.
142. Jaakkola, P. und Jalkanen, M. (1999). Transcriptional regulation of Syndecan-1 expression by growth factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **63:109-38.**, 109-138.
143. Jacobi, J., Porst, M., Cordasic, N., Namer, B., Schmieder, R. E., Eckardt, K. U., und Hilgers, K. F. (2006). Subtotal nephrectomy impairs ischemia-induced angiogenesis and hindlimb re-perfusion in rats. *Kidney Int.* **69** (11), 2013-2021.
144. Jais, J. P., Knebelmann, B., Giatras, I., De, Marchi M., Rizzoni, G., Renieri, A., Weber, M., Gross, O., Netzer, K. O., Flinter, F., Pirson, Y., Verellen, C., Wieslander, J., Persson, U., Tryggvason, K., Martin, P., Hertz, J. M., Schroder, C., Sanak, M., Krejcova, S., Carvalho, M. F., Saus, J., Antignac, C., Smeets, H., und Gubler, M. C. (2000). X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11** (4), 649-657.
145. Javeshghani, D., Sairam, M. R., Neves, M. F., Schiffrin, E. L., und Touyz, R. M. (2006). Angiotensin II induces vascular dysfunction without exacerbating blood pressure elevation in a mouse model of menopause-associated hypertension. *J. Hypertens.* **24** (7), 1365-1373.
146. Joh, K., Matsuyama, N., Kanetsuna, Y., Usui, N., Hattori, M., Yumura, W., und Aizawa, S. (1998). Nephrotic syndrome associated with diffuse mesangial hypercellularity: is it a heterogeneous disease entity? *Am. J. Nephrol.* **18** (3), 214-220.
147. Johnson, T. S., Haylor, J. L., Thomas, G. L., Fisher, M., und el Nahas, A. M. (2002). Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp. Nephrol.* **10** (3), 182-195.
148. Kainulainen, V., Wang, H., Schick, C., und Bernfield, M. (1998). Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J. Biol. Chem.* **273** (19), 11563-11569.
149. Kallunki, P. und Tryggvason, K. (1992). Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* **116** (2), 559-571.

150. Kalluri, R., Danoff, T. M., Okada, H., and Neilson, E. G. (1997a). Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice. *J. Clin. Invest.* **100** (9), 2263-2275.
151. Kalluri, R. and Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112** (12), 1776-1784.
152. Kalluri, R., Shield, C. F., Todd, P., Hudson, B. G., and Neilson, E. G. (1997b). Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J. Clin. Invest.* **99** (10), 2470-2478.
153. Kaneider, N. C., Egger, P., Dunzendorfer, S., and Wiedermann, C. J. (2001). Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287** (1), 42-46.
154. Kang, D. H., Joly, A. H., Oh, S. W., Hugo, C., Kerjaschki, D., Gordon, K. L., Mazzali, M., Jefferson, J. A., Hughes, J., Madsen, K. M., Schreiner, G. F., and Johnson, R. J. (2001). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12** (7), 1434-1447.
155. Kang, D. H., Yu, E. S., Yoon, K. I., and Johnson, R. (2004). The impact of gender on progression of renal disease: potential role of estrogen-mediated vascular endothelial growth factor regulation and vascular protection. *Am. J. Pathol.* **164** (2), 679-688.
156. Kanwar, Y. S., Veis, A., Kimura, J. H., and Jakubowski, M. L. (1984). Characterization of heparan sulfate-proteoglycan of glomerular basement membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81** (3), 762-766.
157. Kaplan, J. M., Kim, S. H., North, K. N., Rennke, H., Correia, L. A., Tong, H. Q., Mathis, B. J., Rodriguez-Perez, J. C., Allen, P. G., Beggs, A. H., and Pollak, M. R. (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* **24** (3), 251-256.
158. Kashtan, C. E. (2002). Animal models of Alport syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17** (8), 1359-1362.
159. Kashtan, C. E., Kim, Y., Lees, G. E., Thorner, P. S., Virtanen, I., and Miner, J. H. (2001). Abnormal glomerular basement membrane laminins in murine, canine, and human Alport syndrome: aberrant laminin alpha2 deposition is species independent. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12** (2), 252-260.
160. Kato, M., Saunders, S., Nguyen, H., and Bernfield, M. (1995). Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Mol. Biol. Cell.* **6** (5), 559-576.

161. Kawada, N., Moriyama, T., Ando, A., Fukunaga, M., Miyata, T., Kurokawa, K., Imai, E., und Hori, M. (1999). Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* **56** (3), 1004-1013.
162. Kawamura, T., Muso, E., Kamata, T., Suyama, K., Oyama, A., Ono, T., Yoshida, H., Miyawaki, S., und Sasayama, S. (1999). Ultrastructural localization of dominantly increased fibronectin in the markedly thickened glomerular basement membrane in a selectively mated murine high IgA strain (HIGA mice). *Nephron.* **83** (2), 146-153.
163. Kelly, D. J., Hepper, C., Wu, L. L., Cox, A. J., und Gilbert, R. E. (2003). Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18** (7), 1286-1292.
164. Kelly, D. J., Zhang, Y., Gow, R., und Gilbert, R. E. (2004). Tranilast attenuates structural and functional aspects of renal injury in the remnant kidney model. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15** (10), 2619-2629.
165. Khoshnoodi, J. und Tryggvason, K. (2001). Unraveling the molecular make-up of the glomerular podocyte slit diaphragm. *Exp. Nephrol.* **9** (6), 355-359.
166. Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L., und Bernfield, M. (1994). Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell.* **5** (7), 797-805.
167. Kim, H., Oda, T., Lopez-Guisa, J., Wing, D., Edwards, D. R., Soloway, P. D., und Eddy, A. A. (2001). TIMP-1 deficiency does not attenuate interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12** (4), 736-748.
168. Kim, Y., Butkowski, R., Burke, B., Kleppel, M. M., Crosson, J., Katz, A., und Michael, A. F. (1991a). Differential expression of basement membrane collagen in membranous nephropathy. *Am. J. Pathol.* **139** (6), 1381-1388.
169. Kim, Y., Kleppel, M. M., Butkowski, R., Mauer, S. M., Wieslander, J., und Michael, A. F. (1991b). Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol.* **138** (2), 413-420.
170. Klahr, S. und Morrissey, J. (2003b). Progression of chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* **41** (3 Suppl 1), S3-S7.
171. Klahr, S. und Morrissey, J. (2003a). Obstructive nephropathy and renal fibrosis: The role of bone morphogenic protein-7 and hepatocyte growth factor. *Kidney Int. Suppl* (87), S105-S112.
172. Klahr, S. und Morrissey, J. (2002). Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **283** (5), F861-F875.
173. Klahr, S. und Morrissey, J. J. (1998). The role of growth factors, cytokines, and vasoactive compounds in obstructive nephropathy. *Semin. Nephrol.* **18** (6), 622-632.

174. Kojima, T., Leone, C. W., Marchildon, G. A., Marcum, J. A., und Rosenberg, R. D. (1992a). Isolation and characterization of heparan sulfate proteoglycans produced by cloned rat microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **267** (7), 4859-4869.
175. Kojima, T., Shworak, N. W., und Rosenberg, R. D. (1992b). Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. *J. Biol. Chem.* **267** (7), 4870-4877.
176. Kojima, T., Takagi, A., Maeda, M., Segawa, T., Shimizu, A., Yamamoto, K., Matsushita, T., und Saito, H. (2001). Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* **85** (5), 793-799.
177. Koo, B. K., Jung, Y. S., Shin, J., Han, I., Mortier, E., Zimmermann, P., Whiteford, J. R., Couchman, J. R., Oh, E. S., und Lee, W. (2006). Structural basis of syndecan-4 phosphorylation as a molecular switch to regulate signaling. *J. Mol. Biol.* **355** (4), 651-663.
178. Kos, C. H., Le, T. C., Sinha, S., Henderson, J. M., Kim, S. H., Sugimoto, H., Kalluri, R., Gerszten, R. E., und Pollak, M. R. (2003). Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J. Clin. Invest.* **111** (11), 1683-1690.
179. Kren, S. und Hostetter, T. H. (1999). The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int.* **56** (1), 333-337.
180. Kretzler, M. (2005). Role of podocytes in focal sclerosis: defining the point of no return. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (10), 2830-2832.
181. Kretzler, M., Koeppen-Hagemann, I., und Kriz, W. (1994). Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Arch.* **425** (2), 181-193.
182. Kriz, W., Hahnel, B., Hosser, H., Ostendorf, T., Gaertner, S., Kranzlin, B., Gretz, N., Shimizu, F., und Floege, J. (2003). Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14** (7), 1904-1926.
183. Kriz, W., Hosser, H., Hahnel, B., Gretz, N., und Provoost, A. P. (1998). From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13** (11), 2781-2798.
184. Kriz, W. und LeHir, M. (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int.* **67** (2), 404-419.
185. Kusano, Y., Yoshitomi, Y., Munesue, S., Okayama, M., und Oguri, K. (2004). Cooperation of syndecan-2 and syndecan-4 among cell surface heparan sulfate proteoglycans in the actin cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma cells. *J. Biochem. (Tokyo)*. **135** (1), 129-137.

186. Kvensakul, M., Hopf, M., Ries, A., Timpl, R., und Hohenester, E. (2001). Structural basis for the high-affinity interaction of nidogen-1 with immunoglobulin-like domain 3 of perlecan. *EMBO J.* **20** (19), 5342-5346.
187. Lan, H. Y. (2003). Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **12** (1), 25-29.
188. Larrain, J., Cizmeci-Smith, G., Troncoso, V., Stahl, R. C., Carey, D. J., und Brandan, E. (1997). Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. Modulation by growth factors and retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **272** (29), 18418-18424.
189. Lee, L. K., Meyer, T. W., Pollock, A. S., und Lovett, D. H. (1995). Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *J. Clin. Invest.* **96** (2), 953-964.
190. Lee, P. H., Trowbridge, J. M., Taylor, K. R., Morhenn, V. B., und Gallo, R. L. (2004). Dermatan sulfate proteoglycan and glycosaminoglycan synthesis is induced in fibroblasts by transfer to a three-dimensional extracellular environment. *J. Biol. Chem.* **19;279** (47), 48640-48646.
191. Lelongt, B. und Ronco, P. (2003). Role of extracellular matrix in kidney development and repair. *Pediatr. Nephrol.* **18** (8), 731-742.
192. Levidiotis, V. und Power, D. A. (2005). New insights into the molecular biology of the glomerular filtration barrier and associated disease. *Nephrology. (Carlton.)* **10** (2), 157-166.
193. Li, J., Partovian, C., Li, J., Hampton, T. G., Metais, C., Tkachenko, E., Sellke, F. W., und Simons, M. (2002). Modulation of microvascular signaling by heparan sulfate matrix: studies in syndecan-4 transgenic mice. *Microvasc. Res.* **64** (1), 38-46.
194. Liu, B. und Preisig, P. A. (2002). Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism. *Kidney Int.* **62** (5), 1650-1658.
195. Liu, S., Liang, Y., Huang, H., Wang, L., Li, Y., Li, J., Li, X., und Wang, H. (2005a). ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem.* **16** (4-6), 207-216.
196. Liu, X. L., Kilpelainen, P., Hellman, U., Sun, Y., Wartiovaara, J., Morgunova, E., Pikkarainen, T., Yan, K., Jonsson, A. P., und Tryggvason, K. (2005b). Characterization of the interactions of the nephrin intracellular domain. *FEBS J.* **272** (1), 228-243.
197. Liu, Y. (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15** (1), 1-12.

198. Liu, Y. (2006). Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* **69** (2), 213-217.
199. Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25** (4), 402-408.
200. Lucchi, L., Iannone, A., Bergamini, S., Stipo, L., Perrone, S., Uggeri, S., Gatti, V., Ferrari, F., Tomasi, A., und Albertazzi, A. (2005). Comparison between hydroperoxides and malondialdehyde as markers of acute oxidative injury during hemodialysis. *Artif. Organs.* **29** (10), 832-837.
201. Lundqvist, K. und Schmidtchen, A. (2001). Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers. *Br. J. Dermatol.* **144** (2), 254-259.
202. Ma, L. J. und Fogo, A. B. (2003). Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int.* **64** (1), 350-355.
203. Ma, L. J., Jha, S., Ling, H., Pozzi, A., Ledbetter, S., und Fogo, A. B. (2004). Divergent effects of low versus high dose anti-TGF-beta antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Kidney Int.* **65** (1), 106-115.
204. MacKay, K., Striker, L. J., Stauffer, J. W., Doi, T., Agodoa, L. Y., und Striker, G. E. (1989). Transforming growth factor-beta. Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. *J. Clin. Invest.* **83** (4), 1160-1167.
205. Manucha, W., Carrizo, L., Ruete, C., Molina, H., und Valles, P. (2005). Angiotensin II type I antagonist on oxidative stress and heat shock protein 70 (HSP 70) expression in obstructive nephropathy. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand).* **51** (6), 547-555.
206. Masaki, T., Foti, R., Hill, P. A., Ikezumi, Y., Atkins, R. C., und Nikolic-Paterson, D. J. (2003). Activation of the ERK pathway precedes tubular proliferation in the obstructed rat kidney. *Kidney Int.* **63** (4), 1256-1264.
207. Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67:753-91.**, 753-791.
208. Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1** (3), 169-178.
209. Masszi, A., Fan, L., Rosivall, L., McCulloch, C. A., Rotstein, O. D., Mucsi, I., und Kapus, A. (2004). Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *Am. J. Pathol.* **165** (6), 1955-1967.
210. Mates, L., Nicolae, C., Morgelin, M., Deak, F., Kiss, I., und Aszodi, A. (2004). Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. *Matrix Biol.* **23** (3), 195-204.

211. Mayer, U., Nischt, R., Poschl, E., Mann, K., Fukuda, K., Gerl, M., Yamada, Y., und Timpl, R. (1993). A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J.* **12** (5), 1879-1885.
212. McPhaul, J. J., Jr. (1977). IgA-associated glomerulonephritis. *Annu. Rev. Med.* **28:37-42.**, 37-42.
213. McQuade, K. J., Beauvais, D. M., Burbach, B. J., und Rapraeger, A. C. (2006). Syndecan-1 regulates $\alpha_5\beta_1$ integrin activity in B82L fibroblasts. *J. Cell Sci.* **119** (Pt 12), 2445-2456.
214. McQuade, K. J. und Rapraeger, A. C. (2003). Syndecan-1 transmembrane and extracellular domains have unique and distinct roles in cell spreading. *J. Biol. Chem.* **278** (47), 46607-46615.
215. Miner, J. H. (2005). Building the glomerulus: a matricentric view. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (4), 857-861.
216. Miner, J. H. und Li, C. (2000). Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev. Biol.* **217** (2), 278-289.
217. Miner, J. H., Patton, B. L., Lentz, S. I., Gilbert, D. J., Snider, W. D., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., und Sanes, J. R. (1997). The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J. Cell Biol.* **137** (3), 685-701.
218. Miner, J. H. und Yurchenco, P. D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20:255-84.**, 255-284.
219. Miosge, N., Simniok, T., Sprysch, P., und Herken, R. (2003). The collagen type XVIII endostatin domain is co-localized with perlecan in basement membranes in vivo. *J. Histochem. Cytochem.* **51** (3), 285-296.
220. Mitani, O., Katoh, M., und Shigematsu, H. (2004). Participation of the matrix metalloproteinase inhibitor in Thy-1 nephritis. *Pathol. Int.* **54** (4), 241-250.
221. Mok, K. Y., Sandberg, K., Sweeny, J. M., Zheng, W., Lee, S., und Mulrone, S. E. (2003). Growth hormone regulation of glomerular AT1 angiotensin receptors in adult uninephrectomized male rats. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **285** (6), F1085-F1091.
222. Morita, H., Yoshimura, A., Inui, K., Ideura, T., Watanabe, H., Wang, L., Soininen, R., und Tryggvason, K. (2005). Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (6), 1703-1710.
223. Muchaneta-Kubara, E. C., Sayed-Ahmed, N., und el Nahas, A. M. (1995). Subtotal nephrectomy: a mosaic of growth factors. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10** (3), 320-327.

224. Müller W.A. (1998) *Human- und Tierphysiologie*. Springer Heidelberg, Berlin
225. Mulrone, S. E., Lumpkin, M. D., Roberts, C. T., Jr., LeRoith, D., und Haramati, A. (1992). Effect of a growth hormone-releasing factor antagonist on compensatory renal growth, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptor gene expression after unilateral nephrectomy in immature rats. *Endocrinology*. **130** (5), 2697-2702.
226. Mulrone, S. E. und Pesce, C. (2000). Early hyperplastic renal growth after uninephrectomy in adult female rats. *Endocrinology*. **141** (3), 932-937.
227. Mulrone, S. E., Woda, C., Johnson, M., und Pesce, C. (1999). Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney Int.* **56** (3), 944-953.
228. Nagata, M., Scharer, K., und Kriz, W. (1992). Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. I. Hypertrophy and distortion of capillary architecture. *Kidney Int.* **42** (1), 136-147.
229. Nagatoya, K., Moriyama, T., Kawada, N., Takeji, M., Oseto, S., Murozono, T., Ando, A., Imai, E., und Hori, M. (2002). Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* **61** (5), 1684-1695.
230. 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 beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat. Genet.* **10** (4), 400-406.
231. Norman, J. T., Bohman, R. E., Fischmann, G., Bowen, J. W., McDonough, A., Slamon, D., und Fine, L. G. (1988). Patterns of mRNA expression during early cell growth differ in kidney epithelial cells destined to undergo compensatory hypertrophy versus regenerative hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85** (18), 6768-6772.
232. Norman, J. T. und Fine, L. G. (1999). Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins. *Exp. Nephrol.* **7** (2), 167-177.
233. Oh, E. S. und Couchman, J. R. (2004). Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol. Cells.* **17** (2), 181-187.
234. Oh, J., Reiser, J., und Mundel, P. (2004). Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **19** (2), 130-137.
235. Okada, H., Kikuta, T., Kobayashi, T., Inoue, T., Kanno, Y., Takigawa, M., Sugaya, T., Kopp, J. B., und Suzuki, H. (2005). Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (1), 133-143.
236. Okuda, S., Languino, L. R., Ruoslahti, E., und Border, W. A. (1990). Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in

- experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* **86** (2), 453-462.
237. Ophascharoensuk, V., Giachelli, C. M., Gordon, K., Hughes, J., Pichler, R., Brown, P., Liaw, L., Schmidt, R., Shankland, S. J., Alpers, C. E., Couser, W. G., and Johnson, R. J. (1999). Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int.* **56** (2), 571-580.
238. Ortega, N. und Werb, Z. (2002). New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* **115** (Pt 22), 4201-4214.
239. Oudit, G. Y., Herzenberg, A. M., Kassiri, Z., Wong, D., Reich, H., Khokha, R., Crackower, M. A., Backx, P. H., Penninger, J. M., und Scholey, J. W. (2006). Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am. J. Pathol.* **168** (6), 1808-1820.
240. Park, P. W., Reizes, O., und Bernfield, M. (2000). Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J. Biol. Chem.* **275** (39), 29923-29926.
241. Pat, B., Yang, T., Kong, C., Watters, D., Johnson, D. W., und Gobe, G. (2005). Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants. *Kidney Int.* **67** (3), 931-943.
242. Paueksakon, P., Revelo, M. P., Ma, L. J., Marcantoni, C., und Fogo, A. B. (2002). Microangiopathic injury and augmented PAI-1 in human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **61** (6), 2142-2148.
243. Pavenstadt, H. (2000). Roles of the podocyte in glomerular function. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **278** (2), F173-F179.
244. Pavenstadt, H., Kriz, W., und Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* **83** (1), 253-307.
245. Peissel, B., Geng, L., Kalluri, R., Kashtan, C., Rennke, H. G., Gallo, G. R., Yoshioka, K., Sun, M. J., Hudson, B. G., Neilson, E. G., und . (1995). Comparative distribution of the alpha 1(IV), alpha 5(IV), and alpha 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients. *J. Clin. Invest.* **96** (4), 1948-1957.
246. Perrin, N. E., Torbjornsdotter, T. B., Jaremko, G. A., und Berg, U. B. (2006). The course of diabetic glomerulopathy in patients with type I diabetes: a 6-year follow-up with serial biopsies. *Kidney Int.* **69** (4), 699-705.
247. Peterson, J. A., Sheibani, N., David, G., Garcia-Pardo, A., und Peters, D. M. (2005). Heparin II domain of fibronectin uses alpha4beta1 integrin to control focal adhesion and stress fiber formation, independent of syndecan-4. *J. Biol. Chem.* **280** (8), 6915-6922.
248. Post, M. J., Sato, K., Murakami, M., Bao, J., Tirziu, D., Pearlman, J. D., und Simons, M. (2006). Adenoviral PR39 improves blood flow and myocardial function

- in a pig model of chronic myocardial ischemia by enhancing collateral formation. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* **290** (3), R494-R500.
249. Pyke, C., Kristensen, P., Ostergaard, P. B., Oturai, P. S., und Romer, J. (1997). Proteoglycan expression in the normal rat kidney. *Nephron.* **77** (4), 461-470.
250. Qiu, L. Q., Sinniah, R., und Hsu, S. I. (2004). Role of differential and cell type-specific expression of cell cycle regulatory proteins in mediating progressive glomerular injury in human IgA nephropathy. *Lab Invest.* **84** (9), 1112-1125.
251. Ries, A., Gohring, W., Fox, J. W., Timpl, R., und Sasaki, T. (2001). Recombinant domains of mouse nidogen-1 and their binding to basement membrane proteins and monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* **268** (19), 5119-5128.
252. rikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J. R., und Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* **23** (3), 354-358.
253. Rops, A. L., van, der, V, Lensen, J. F., Wijnhoven, T. J., van den Heuvel, L. P., van Kuppevelt, T. H., und Berden, J. H. (2004). Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation. *Kidney Int.* **65** (3), 768-785.
254. Roselli, S., Gribouval, O., Boute, N., Sich, M., Benessy, F., Attie, T., Gubler, M. C., und Antignac, C. (2002). Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am. J. Pathol.* **160** (1), 131-139.
255. Ruoslahti, E. und Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell.* **64** (5), 867-869.
256. Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkeri, U., Kestila, M., Jalanko, H., Holmberg, C., und Tryggvason, K. (1999). Nephlin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (14), 7962-7967.
257. Saborio, P., Krieg, R. J., Jr., Kuemmerle, N. B., Norkus, E. P., Schwartz, C. C., und Chan, J. C. (2000). Alpha-tocopherol modulates lipoprotein cytotoxicity in obstructive nephropathy. *Pediatr. Nephrol.* **14** (8-9), 740-746.
258. Sakai, N., Iseki, K., Suzuki, S., Mori, T., Hagino, S., Zhang, Y., Yokoya, S., Kawasaki, Y., Suzuki, J., Isome, M., Wada, I., Homma, Y., und Suzuki, H. (2005). Uninephrectomy induces progressive glomerulosclerosis and apoptosis in anti-Thy1 glomerulonephritis. *Pathol. Int.* **55** (1), 19-26.
259. Sambrook, J. et al. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*
260. Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J. K., Mosher, D. F., Robinson, S. D., Hynes, R. O., und Goetinck, P. F. (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (6), 2805-2810.

261. Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A. B., und Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest* **112** (10), 1486-1494.
262. Saus, J., Wieslander, J., Langeveld, J. P., Quinones, S., und Hudson, B. G. (1988). Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J. Biol. Chem.* **263** (26), 13374-13380.
263. scamps-Latscha, B., Witko-Sarsat, V., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Gausson, V., Mothu, N., Cardoso, C., Noel, L. H., Guerin, A. P., London, G. M., und Jungers, P. (2004). Early prediction of IgA nephropathy progression: proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. *Kidney Int.* **66** (4), 1606-1612.
264. Schaefer, L., Han, X., August, C., Matzkies, F., Lorenz, T., und Schaefer, R. M. (1997). Differential regulation of glomerular gelatinase B (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in obese Zucker rats. *Diabetologia.* **40** (9), 1035-1043.
265. Schena, F. P., Strippoli, G. F., und Wankelmuth, P. (1999). Renal growth factors: past, present and future. *Am. J. Nephrol.* **19** (2), 308-312.
266. Schiller, B. und Moran, J. (1997). Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model--an inflammatory disease mediated by cytokines. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12** (3), 430-437.
267. Schnabel, E., Anderson, J. M., und Farquhar, M. G. (1990). The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J. Cell Biol.* **111** (3), 1255-1263.
268. Schrijvers, B. F., Flyvbjerg, A., Tilton, R. G., Rasch, R., Lameire, N. H., und De Vriese, A. S. (2005). Pathophysiological role of vascular endothelial growth factor in the remnant kidney. *Nephron Exp. Nephrol.* **101** (1), e9-15.
269. Schwartz, M. M., Evans, J., und Bidani, A. K. (1994). The mesangium in the long-term remnant kidney model. *J. Lab Clin. Med.* **124** (5), 644-651.
270. Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Poschl, E., Rao, C., Beier, D. R., Skarnes, W. C., Timpl, R., und Bader, B. L. (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol. Cell Biol.* **22** (19), 6820-6830.
271. Sebestyen, A., Gallai, M., Knittel, T., Ambrust, T., Ramadori, G., und Kovalszky, I. (2000). Cytokine regulation of syndecan expression in cells of liver origin. *Cytokine.* **12** (10), 1557-1560.
272. Sellin, L., Huber, T. B., Gerke, P., Quack, I., Pavenstadt, H., und Walz, G. (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J.* **17** (1), 115-117.

273. Shih, N. Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J. H., und Shaw, A. S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am. J. Pathol.* **159** (6), 2303-2308.
274. Simons, M. und Horowitz, A. (2001). Syndecan-4-mediated signalling. *Cell Signal.* **13** (12), 855-862.
275. Sorokin, L. M., Pausch, F., Durbeej, M., und Ekblom, P. (1997a). Differential expression of five laminin alpha (1-5) chains in developing and adult mouse kidney. *Dev. Dyn.* **210** (4), 446-462.
276. Sorokin, L. M., Pausch, F., Frieser, M., Kroger, S., Ohage, E., und Deutzmann, R. (1997b). Developmental regulation of the laminin alpha5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev. Biol.* **189** (2), 285-300.
277. Stepp, M. A., Gibson, H. E., Gala, P. H., Iglesia, D. D., Pajooohesh-Ganji, A., Pal-Ghosh, S., Brown, M., Aquino, C., Schwartz, A. M., Goldberger, O., Hinkes, M. T., und Bernfield, M. (2002). Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J. Cell Sci.* **115** (Pt 23), 4517-4531.
278. Stout, L. C., Folse, D. S., Meier, J., Crosby, W. M., Kling, R., Williams, G. R., Price, W. E., Geyer, J. R., Padula, R., Whorton, E., und . (1986). Quantitative glomerular morphology of the normal and diabetic baboon kidney. *Diabetologia.* **29** (10), 734-740.
279. Strutz, F. und Muller, G. A. (1999). Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res.* **22** (1-2), 71-80.
280. Strutz, F. und Neilson, E. G. (2003). New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin. Immunopathol.* **24** (4), 459-476.
281. Sun, J., Langer, W. J., Devish, K., und Lane, P. H. (2006). Compensatory kidney growth in estrogen receptor-alpha null mice. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **290** (2), F319-F323.
282. Talts, J. F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A., und Timpl, R. (1999). Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* **18** (4), 863-870.
283. Talts, J. F., Mann, K., Yamada, Y., und Timpl, R. (1998). Structural analysis and proteolytic processing of recombinant G domain of mouse laminin alpha2 chain. *FEBS Lett.* **426** (1), 71-76.
284. Terzi, F., Ticozzi, C., Burtin, M., Motel, V., Beaufils, H., Laouari, D., Assael, B. M., und Kleinknecht, C. (1995). Subtotal but not unilateral nephrectomy induces hyperplasia and protooncogene expression. *Am. J. Physiol.* **268** (5 Pt 2), F793-F801.
285. Theuer, J., Dechend, R., Muller, D. N., Park, J. K., Fiebeler, A., Barta, P., Ganten, D., Haller, H., Dietz, R., und Luft, F. C. (2002). Angiotensin II induced

- inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2:3**. Epub;2002 Jan 18., 3.
286. Thodeti, C. K., Albrechtsen, R., Grauslund, M., Asmar, M., Larsson, C., Takada, Y., Mercurio, A. M., Couchman, J. R., und Wewer, U. M. (2003). ADAM12/syndecan-4 signaling promotes beta 1 integrin-dependent cell spreading through protein kinase Calpha and RhoA. *J. Biol. Chem.* **278** (11), 9576-9584.
287. Timpl, R., Tisi, D., Talts, J. F., Andac, Z., Sasaki, T., und Hohenester, E. (2000). Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol.* **19** (4), 309-317.
288. Tkachenko, E., Elfenbein, A., Tirziu, D., und Simons, M. (2006). Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ. Res.* **98** (11), 1398-1404.
289. Tomita, M., Koike, H., Han, G. D., Shimizu, F., und Kawachi, H. (2004). Decreased collagen-degrading activity could be a marker of prolonged mesangial matrix expansion. *Clin. Exp. Nephrol.* **8** (1), 17-26.
290. Troyanov, S., Wall, C. A., Miller, J. A., Scholey, J. W., und Cattran, D. C. (2005). Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (4), 1061-1068.
291. Tryggvason, K. (1999). Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10** (11), 2440-2445.
292. Tryggvason, K. und Pettersson, E. (2003). Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J. Intern. Med.* **254** (3), 216-224.
293. Tryggvason, K. und Wartiovaara, J. (2005). How does the kidney filter plasma? *Physiology. (Bethesda.)*. **20:96-101.**, 96-101.
294. Tsuzuki, S., Kojima, T., Katsumi, A., Yamazaki, T., Sugiura, I., und Saito, H. (1997). Molecular cloning, genomic organization, promoter activity, and tissue-specific expression of the mouse ryudocan gene. *J. Biochem. (Tokyo)*. **122** (1), 17-24.
295. Turner, A. N. und Rees, A. J. (1996). Goodpasture's disease and Alport's syndromes. *Annu. Rev. Med.* **47:377-86.**, 377-386.
296. Uguz, A., Gonlusen, G., Ergin, M., und Tuncer, I. (2005). Expression of Fas, Bcl-2 and p53 molecules in glomerulonephritis and their correlations with clinical and laboratory findings. *Nephrology. (Carlton.)*. **10** (3), 311-316.
297. Vainio, S., Lehtonen, E., Jalkanen, M., Bernfield, M., und Saxen, L. (1989). Epithelial-mesenchymal interactions regulate the stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, syndecan, in the developing kidney. *Dev. Biol.* **134** (2), 382-391.

298. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C. H., und Moustakas, A. (2005). TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol. Biol. Cell.* **16** (4), 1987-2002.
299. Valles, P., Jorro, F., Carrizo, L., Manucha, W., Oliva, J., Cuello-Carrion, F. D., und Ciocca, D. R. (2003). Heat shock proteins HSP27 and HSP70 in unilateral obstructed kidneys. *Pediatr. Nephrol.* **18** (6), 527-535.
300. Wang, S., Chen, Q., Simon, T. C., Strebeck, F., Chaudhary, L., Morrissey, J., Liapis, H., Klahr, S., und Hruska, K. A. (2003). Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **63** (6), 2037-2049.
301. Wang, W., Huang, X. R., Li, A. G., Liu, F., Li, J. H., Truong, L. D., Wang, X. J., und Lan, H. Y. (2005). Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16** (5), 1371-1383.
302. Westall, G. P., Binder, J., Kotsimbos, T., Topliss, D., Thomson, N., Dowling, J., und Wilson, J. W. (2004). Nodular glomerulosclerosis in cystic fibrosis mimics diabetic nephropathy. *Nephron Clin. Pract.* **96** (3), c70-c75.
303. Whaley-Connell, A., Chowdhury, N., Hayden, M. R., Stump, C. S., Habibi, J., Wiedmeyer, C. E., Gallagher, P. E., Tallant, E. A., Cooper, S. A., Link, C. D., Ferrario, C. M., und Sowers, J. R. (2006). OXIDATIVE STRESS AND GLOMERULAR FILTRATION BARRIER INJURY: ROLE OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN THE REN2 TRANSGENIC RAT. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* **in Print**
304. White, R. H., Raafat, F., Milford, D. V., Komianou, F., und Moghal, N. E. (2005). The Alport nephropathy: clinicopathological correlations. *Pediatr. Nephrol.* **20** (7), 897-903.
305. Wilcox-Adelman, S. A., Denhez, F., und Goetinck, P. F. (2002a). Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277** (36), 32970-32977.
306. Wilcox-Adelman, S. A., Denhez, F., Iwabuchi, T., Saoncella, S., Calautti, E., und Goetinck, P. F. (2002b). Syndecan-4: dispensable or indispensable? *Glycoconj. J.* **19** (4-5), 305-313.
307. Williams, R. S., Thomas, J. A., Fina, M., German, Z., und Benjamin, I. J. (1993). Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. *J. Clin. Invest.* **92** (1), 503-508.
308. Woods, A. und Couchman, J. R. (2000). Integrin modulation by lateral association. *J. Biol. Chem.* **275** (32), 24233-24236.
309. Woods, A. und Couchman, J. R. (1994). Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol. Biol. Cell.* **5** (2), 183-192.

310. Woods, A. und Couchman, J. R. (2001). Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13** (5), 578-583.
311. Woods, A., Longley, R. L., Tumova, S., und Couchman, J. R. (2000). Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **374** (1), 66-72.
312. Woods, A., Oh, E. S., und Couchman, J. R. (1998). Syndecan proteoglycans and cell adhesion. *Matrix Biol.* **17** (7), 477-483.
313. Woods, L. L., Weeks, D. A., und Rasch, R. (2001). Hypertension after neonatal uninephrectomy in rats precedes glomerular damage. *Hypertension.* **38** (3), 337-342.
314. Worapamorn, W., Haase, H. R., Li, H., und Bartold, P. M. (2001). Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *J. Cell Physiol* **186** (3), 448-456.
315. Yagame, M., Kim, Y., Zhu, D., Suzuki, D., Eguchi, K., Nomoto, Y., Sakai, H., Groppoli, T., Steffes, M. W., und Mauer, S. M. (1995). Differential distribution of type IV collagen chains in patients with diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephron.* **70** (1), 42-48.
316. Yamamoto, K., Takeshita, K., Kojima, T., Takamatsu, J., und Saito, H. (2005). Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc. Res.* **66** (2), 276-285.
317. Yang, J. und Liu, Y. (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am. J. Pathol.* **159** (4), 1465-1475.
318. Yang, J. und Liu, Y. (2003). Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **284** (2), F349-F357.
319. Yang, Y., Zhang, S. Y., Sich, M., Beziau, A., van den Heuvel, L. P., und Gubler, M. C. (2001). Glomerular extracellular matrix and growth factors in diffuse mesangial sclerosis. *Pediatr. Nephrol.* **16** (5), 429-438.
320. Yu, L., Border, W. A., Huang, Y., und Noble, N. A. (2003). TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int.* **64** (3), 844-856.
321. Yung, S., Woods, A., Chan, T. M., Davies, M., Williams, J. D., und Couchman, J. R. (2001). Syndecan-4 up-regulation in proliferative renal disease is related to microfilament organization. *FASEB J.* **15** (9), 1631-1633.
322. Yurchenco, P. D. und Cheng, Y. S. (1993). Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J. Biol. Chem.* **268** (23), 17286-17299.

323. Yurchenco, P. D. und Schittny, J. C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* **4** (6), 1577-1590.
324. Zako, M., Dong, J., Goldberger, O., Bernfield, M., Gallagher, J. T., und Deakin, J. A. (2003). Syndecan-1 and -4 synthesized simultaneously by mouse mammary gland epithelial cells bear heparan sulfate chains that are apparently structurally indistinguishable. *J. Biol. Chem.* **278** (15), 13561-13569.
325. Zamir, E. und Geiger, B. (2001). Components of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **114** (Pt 20), 3577-3579.
326. Zeier, M., Schonherr, R., Amann, K., und Ritz, E. (1998). Effects of testosterone on glomerular growth after uninephrectomy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13** (9), 2234-2240.
327. Zeisberg, M., Bonner, G., Maeshima, Y., Colorado, P., Muller, G. A., Strutz, F., und Kalluri, R. (2001a). Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am. J. Pathol.* **159** (4), 1313-1321.
328. Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., und Kalluri, R. (2003). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* **9** (7), 964-968.
329. Zeisberg, M. und Kalluri, R. (2004a). Experimental strategies to reverse chronic renal disease. *Blood Purif.* **22** (5), 440-445.
330. Zeisberg, M. und Kalluri, R. (2004b). The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J. Mol. Med.* **82** (3), 175-181.
331. Zeisberg, M., Strutz, F., und Muller, G. A. (2001b). Renal fibrosis: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **10** (3), 315-320.
332. Zhang, W., Swanson, R., Izaguirre, G., Xiong, Y., Lau, L. F., und Olson, S. T. (2005). The heparin-binding site of antithrombin is crucial for antiangiogenic activity. *Blood.* **106** (5), 1621-1628.
333. Zhang, Y., Pasparakis, M., Kollias, G., und Simons, M. (1999). Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF-alpha. *J. Biol. Chem.* **274** (21), 14786-14790.
334. Zhang, Y. Z. und Lee, H. S. (1997). Quantitative changes in the glomerular basement membrane components in human membranous nephropathy. *J. Pathol.* **183** (1), 8-15.
335. Zheng, F., Plati, A. R., Potier, M., Schulman, Y., Berho, M., Banerjee, A., Leclercq, B., Zisman, A., Striker, L. J., und Striker, G. E. (2003). Resistance to glomerulosclerosis in B6 mice disappears after menopause. *Am. J. Pathol.* **162** (4), 1339-1348.

-
336. Zhou, Z., Wang, J., Cao, R., Morita, H., Soininen, R., Chan, K. M., Liu, B., Cao, Y., und Tryggvason, K. (2004). Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in perlecan heparan sulfate-deficient mice. *Cancer Res.* **64** (14), 4699-4702.
337. Zimmermann, P. und David, G. (1999). The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.* **13 Suppl:S91-S100.**, S91-S100.
338. Zoja, C., Abbate, M., und Remuzzi, G. (2006). Progression of chronic kidney disease: insights from animal models. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **15** (3), 250-257.

Lebenslauf

- Name:** Ferda Cevikbas
- geboren:** am 27.08.1976 in Herten-Westerholt
- Familienstand:** ledig
- Eltern:** Sevket Cevikbas
Feride Cevikbas, geb. Verimoglu
- Schulbildung:** Grundschule: von August 1983 bis Juli 1987
in Gelsenkirchen-Hassel
Gymnasium: von August 1987 bis Juni 1996
in Gelsenkirchen-Buer
- Hochschulreife:** am 14.06.1996, Leibniz-Gymnasium, Gelsenkirchen-Buer
- Studium:** Oktober 1996 bis Juni 2002, Diplom Biologie an der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Promotionsstudiengang:** Biologie an der WWU Münster
- Prüfungen**
- Vordiplom:** am 15.09.1998 im Fach Biologie an der WWU Münster
- Diplom:** am 10.07.2002 im Fach Biologie an der WWU Münster
- Tätigkeiten:** *wissenschaftliche Mitarbeiterin:*
Juni 2002, am Institut für Physiologische Chemie und
Pathobiochemie des Universitätsklinikums Münster
- Beginn der Dissertation:** Juni 2002, Institut für Physiologische Chemie und
Pathobiochemie, Universitätsklinikum Münster

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Frank Echtermeyer für das sehr interessante Projekt bedanken.

Mein sehr sehr großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Bruckner. Seine witzig-kritische, diskussionsfreudige, augenöffnende und jederzeit tatkräftig hilfsbereite Betrachtung meines Projektes hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Walter Stöcker danke ich für die externe Betreuung trotz riesiger Entfernung aus Mainz.

Frau Prof. Dr. Lydia Sorokin möchte ich für die großzügige finanzielle Unterstützung, die mich vor dem Hungern bewahrt hat, herzlich danken.

Frau Prof. Dr. Liliana Schäfer und Herr Dr. Gregor Theilmeyer danke ich für die Durchführung der Mäuse-OPs.

Für die unglaublich gute Kommunikation und Ausleihstellen für Chemikalien & Co möchte ich mich kunterbunt bei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Ehemaligen des Instituts ganz herzlich bedanken.

Den Korrekturlesern Stephan Niland (in Lichtgeschwindigkeit), Herrn Rupert Hallmann, Martin Götte, Sandra & Jens, Claus, Heike, Jörg, Maggi und dem lieben Mauchen danke ich für die Zeit, die sie wegen mir geopfert haben.

Jürgen Wansch danke ich für die Rolle als Komplize bei den Mäusen.

Anne Forsberg danke ich für die Durchführung meiner Extrawünsche in der Histologie. Svenja Hubrich war bei der Durchführung der *Real time* PCR eine absolute Hilfe.

Karin Schlattmann und Kristina Köppler danke ich für die zügige Fertigstellung der EM-Schnitte.

Philipp möchte ich vom ganzen Herzen für ALLES danken: Zunächst einmal für seine Korrekturlesearbeit der Erstversionen aller Abschnitte (eher keine Lichtgeschwindigkeit). Und das Ausmerzen aller Artikelfehler sowie Anflüge schlechter Laune. Seine Hilfe in allen Gebieten inklusive Elektronenmikroskopie-Benutzungs-Crashkurs und seinem TAG und NACHT Ambulanzdienst gegen alle kleinen Sorgen und Wehwehchen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre unglaubliche Unterstützung bedanken. Ihre Bereitschaft (und auch die meiner Schwestern), sich stundenlang nicht verständliche Sachen anzuhören und mich immer mit türkischer Küche zu erfreuen, hat mir sehr viel geholfen.