

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Einfluss der parietalen Epithelzellen auf die Bowman'sche Kapsel bei diabetischer Nephropathie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr. med. univ. Alexander Dominik Holderied

München

2014

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Helmut Schiffli

Priv. Doz. Dr. Oliver Schnell

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Dana Thomasova, PhD

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Dezember 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2012 bis Februar 2014 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Meiner lieben Großmutter Viktoria Holderied

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	VII
1. Einleitung.....	1
1.1. Aufbau und Struktur eines Glomerulus.....	1
1.2. Die parietale Epithelzelle.....	2
1.2.1. Rolle in der Embryogenese.....	2
1.2.2. Funktionen der parietalen Epithelzelle	4
1.2.3. Pathophysiologie bei Glomerulopathien	7
1.3. Die Bowman'sche Kapsel	10
1.3.1. Entstehung in der Embryogenese	10
1.3.2. Physiologische Funktion	10
1.3.3. Pathophysiologie bei Glomerulopathien	11
1.4. Diabetische Nephropathie	12
1.4.1. Definition und Epidemiologie.....	12
1.4.2. Klinische Aspekte der diabetischen Nephropathie	12
1.4.3. Pathophysiologie	15
1.5. Zielsetzung und Hypothese	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Geräte.....	19
2.1.2. Chemikalien, Puffer und Lösungen	21
2.1.3. Zelllinien	25
2.1.4. Stimulanzen (Zellkultur)	25
2.1.5. Oligonukleotid-Primer für die real-time PCR	26
2.1.6. Antikörper	26
2.2. Zellkultur und Stimulationsexperimente	27
2.2.1. Gefrieren und Auftauen der Zellen	28
2.2.2. Zellzählung.....	29
2.2.3. Stimulationsexperimente	29
2.3. Kolorimetrische Assays.....	30
2.3.1. Zellproliferationsassay	30
2.3.2. Zytotoxizitätsassay	31

2.4.	Immunologische Methoden	33
2.4.1.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	33
2.4.2.	Western-Blot	34
2.5.	Molekularbiologische Methoden	36
2.5.1.	RNA Gewinnung	36
2.5.2.	RNA Quantifizierung durch Spektrometrie.....	37
2.5.3.	Überprüfung der Reinheit der RNA durch Gel-Elektrophorese	37
2.5.4.	Reverse Transkription der mRNA zu cDNA	38
2.5.5.	Real-time PCR	38
2.6.	Histopathologische Untersuchungen	40
2.6.1.	Lichtmikroskopie	40
2.6.2.	Transmissionselektronenmikroskopie	40
2.7.	Retrospektive morphologische Analyse humaner Nierenbiopsien	42
2.8.	Statistische Methoden	44
3.	Ergebnisse.....	45
3.1.	Stimulation parietaler Epithelzellen.....	45
3.1.1.	Zytotoxizität muriner parietaler Epithelzellen	45
3.1.2.	Proliferation muriner parietaler Epithelzellen	47
3.1.3.	Aktivierung der parietalen Epithelzelle (CD44).....	48
3.1.4.	Einfluss von TGF- β 1 auf die parietale Epithelzelle	50
3.1.5.	Transkription von Genen der Bowman'schen Kapsel	55
3.1.6.	Semiquantitativer Nachweis von Kollagen IV in humanen parietalen Epithelzellen.....	59
3.2.	Nierenbiopsien von Patienten mit diabetischer Nephropathie.....	61
3.2.1.	Klassifizierung der diabetischen Nephropathie	62
3.2.2.	Aktivierung der parietalen Epithelzelle	67
3.2.3.	Morphometrische Untersuchungen der Bowman'schen Kapsel	73
4.	Diskussion	83
4.1.	Aktivierung der parietalen Epithelzelle bei der diabetischen Nephropathie	84
4.2.	Bildung von Kollagenen und Ablagerung in der Bowman'schen Kapsel.....	88
4.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	94
	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	102
	DANKSAGUNG	103

ZUSAMMENFASSUNG

Die diabetische Nephropathie ist derzeit weltweit der häufigste Grund für die terminale Niereninsuffizienz mit einem Anteil von einem Drittel aller Fälle. Im Verlauf der diabetischen Nephropathie kommt es zu einer zunehmenden Glomerulosklerose. Die Fähigkeit der parietalen Epithelzelle zur Ausbildung von extrazellulärer Matrix und ein möglicher Beitrag zur Glomerulosklerose ist bislang unklar. Daher sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die parietale Epithelzelle bei der diabetischen Nephropathie vermehrt extrazelluläre Matrix bildet und dadurch die Bowman'sche Kapsel verdickt. Diese Frage wurde unter Verwendung einer immortalisierten murinen parietalen Epithelzelllinie und einer primären humanen parietalen Epithelzelllinie im Zellversuch und Stimulation dieser Zellen mit hoher Glukosekonzentration (30mM), TGF- β 1 und „advanced glycation endproducts“ nachgegangen. Außerdem wurde retrospektiv die Bowman'sche Kapsel von sechs humanen Nierenbiopsien mit diabetischer Nephropathie per Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

Im ersten Schritt war die Aktivierung der parietalen Epithelzelle unter diabetischer Kondition Fokus der experimentellen Untersuchung. Hier lag ein zellspezifischer Effekt vor. Während für die humanen parietalen Epithelzellen keine funktionellen oder morphologischen Zeichen der Aktivierung gefunden werden konnte, zeigten murine parietale Epithelzellen eine Aktivierung nach Stimulation mit TGF- β 1. Der zweite Schritt bestand in der Untersuchung der Bildung von TGF- β 1 in parietalen Epithelzellen. Auch hier konnten unterschiedliche Stimulationseffekte bei den murinen und humanen parietalen Epithelzellen beobachtet werden. Während die humanen parietalen Epithelzellen weder auf Transkriptions-, noch auf Translationsebene eine geänderte Expression zeigten, exprimierten die murinen parietalen Epithelzellen in einem positiven Feedback-Mechanismus auf Transkriptionsebene verstärkt TGF- β 1 nach Stimulation mit TGF- β 1. Auf Translationsebene konnte eine verstärkte Bildung von TGF- β 1 nach Stimulation mit „advanced glycation endproducts“ und eine verminderte Bildung nach Stimulation mit Glukose beobachtet werden. Der dritte Schritt beinhaltete die Untersuchung der Kollagenbildung in den parietalen Epithelzellen und die Vermessung der Bowman'schen Kapsel. Während Glukose in keiner der Zelltypen zu einer Änderung der Kollagenexpression führte, induzierte TGF- β 1 in den humanen und murinen parietalen Epithelzellen eine Hochregulation der Genexpression verschiedener Ketten von Kollagen IV

und Kollagen I α 1. „Advanced glycation endproducts“ verstärkten die Transkription der Kollagene in den humanen parietalen Epithelzellen, wohingegen sie diese in murinen parietalen Epithelzellen herunterregulierten. In der retrospektiven histologischen Untersuchung von sechs Patienten mit diabetischer Nephropathie und sechs Vergleichspatienten wurde per Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie die Dicke der Bowman'schen Kapsel vermessen. In den lichtmikroskopischen Messungen zeigte sich für die Patienten mit diabetischer Nephropathie eine signifikant verdickte Bowman'schen Kapsel. Diese Verdickung konnte bei Patienten mit diabetischer Nephropathie in den transmissionselektronenmikroskopischen Messungen bestätigt werden. Letztlich ist die Lichtmikroskopie die geeignetere Messmethode, weil hier eine höhere Anzahl an Glomeruli gemessen werden kann und sie einen Selektionsbias ausschließt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die parietale Epithelzelle unter diabetischer Kondition verstärkt extrazelluläre Matrix bildet und diese basal ablagert. In den murinen parietalen Epithelzellen ergaben sich Hinweise auf den Mechanismus der Aktivierung und einen positiven Feedbackmechanismus von TGF- β 1 bei der diabetischen Nephropathie. Die Verdickung der Bowman'schen Kapsel ist von klinischer und diagnostischer Bedeutung, da die Ausbildung der parietalen Fibrose viele Funktionen der parietalen Epithelzellen und Bowman'schen Kapsel einschränkt und der Glomerulus letztlich sklerosiert bzw. verödet. Diagnostisch werden künftige Studien den Wert der Dickenmessung der Bowman'schen Kapsel als zusätzliches pathologisches Kriterium der Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie zeigen.

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Struktur eines Glomerulus

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ mit vielfältigen Ausscheidungs- und Regulationsmechanismen. Durch die Urinausscheidung eliminiert sie nicht nur sog. harnpflichtige Substanzen, sondern reguliert dadurch auch Blutvolumen und Blutdruck. Auch die Elektrolytzusammensetzung in Blut und Extrazellularraum und die Bildung von kreislaufaktiven Hormonen unterliegen einer Regulation durch die Niere.

In jeder Niere eines gesunden erwachsenen Menschen finden sich zwischen 6×10^5 und 1×10^6 Nephrone [1]. Diese Funktionseinheit der Niere gliedert sich funktionell und anatomisch in zwei Einheiten – dem Glomerulus und den Harnkanälchen.

Die Harnkanälchen bestehen aus dem proximalen-, intermediären- und distalen Tubulus, sowie dem Verbindungstubulus und dem Sammelrohr. Sie regulieren durch tubuläre Resorption und Sekretion den Endharn, welcher sich deutlich von dem Primärharn am Beginn des proximalen Tubulus unterscheidet [2].

Ein Glomerulus hat einen Durchmesser von ca. $200\mu\text{m}$ und besteht aus Kapillarschlingen, welche durch das Vas afferens gespeist werden, sich am Gefäßpol zum Vas efferens vereinigen und wieder aus dem Glomerulus austreten. Die Endothelzellen des Schlingenkonvolutes sind der glomerulären Basalmembran (GBM) luminal angelagert. Dieser liegen die Podozyten mit den Fußvorsätzen direkt auf. Zusammen bilden die gefensterten Endothelzellen, die GBM und die Podozyten mit ihren Fußfortsätzen die Blut-Harn-Schranke. Im axialen Zentrum der Glomerulusläppchen finden sich die Mesangialzellen, welche in die mesangiale Matrix eingebettet liegen und dadurch die Gefäßarchitektur und Podozyten stützen. Nach der Filtration des Primärharns durch die Blut-Harn-Schranke sammelt sich dieser im Bowman'schen Kapselraum. Dieser ist von dem parietalen Blatt der Bowman'schen Kapsel (BK) und den darauf aufliegenden parietalen Epithelzellen (PEC) umgeben [3, 4]. (Abbildung 1)

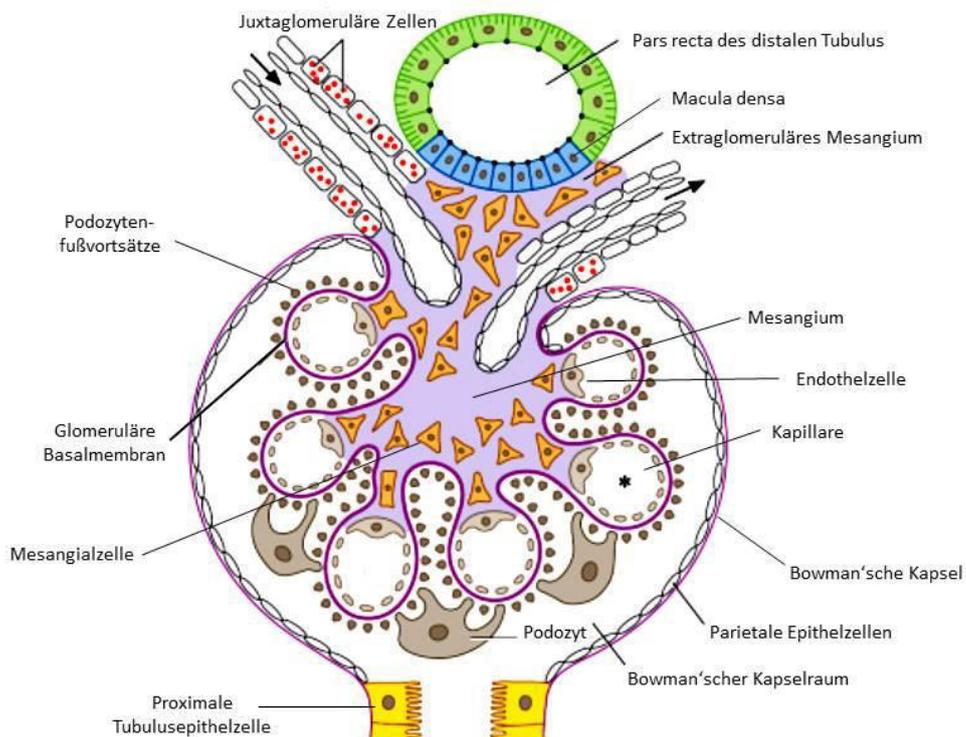


Abbildung 1: Schematische Abbildung eines Glomerulus. (geändert nach Taschenlehrbuch Histologie [5])

1.2. Die parietale Epithelzelle

1.2.1. Rolle in der Embryogenese

Alle Strukturen der Niere in der Embryogenese entstehen aus dem intermediären Mesoderm. Das erste und rudimentärste Organ ist das Pronephros, welches jedoch nur noch in bestimmten Fischen eine Funktion erhält. Das Pronephros wird dann von dem Mesonephros ersetzt, das sich in höher entwickelten Fischen und Amphibien findet. Im Menschen degeneriert auch das Mesonephros und wird dann vom Metanephros ersetzt [6]. Aus dem Metanephros entsteht später die Ureterknospe, welche vom Urnierengang zum metanephrogenem Blastem gezogen wird [7]. Hier legen sich mesenchymale Zellen um die Ureterknospe. Nun teilt sich das metanephrogene Blastem in einen Teil, welcher undifferenziert bleibt und den Anteil, der eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

vollzieht. Die entstandenen Epithelien bilden Nierenbläschen um die sich anschließend die Ureterknospe verzweigt. Die Verzweigungen der Ureterknospen bilden auch das Nierenbecken, den Nierenkelch und das Sammelrohrsystem. Aus den Nierenbläschen entsteht eine Komma- und letztlich S-förmige Struktur, welche an der proximalen Aufspaltung die Angiogenese fördern. Diese S-förmige Struktur entwickelt sich zu allen Bestandteilen eines Nephrons und schließt sich dann dem Sammelrohr an. (Abbildung 2)

Der spätere Glomerulus entsteht zunächst aus einem glomerulären Kelch, in den endotheliale und mesangiale Vorläuferzellen einwachsen. Die Herkunft dieser Vorläuferzellen ist derzeit nicht abschließend geklärt. Die Innenseite des glomerulären Kelches wird später das viszerale Blatt der BK auskleiden und besteht aus den späteren Podozyten. Auf der äußeren Seite hingegen wird sich das parietale Blatt der BK bilden. Hier entstehen aus den gleichen glomerulären Vorläuferzellen die späteren PECs [8].

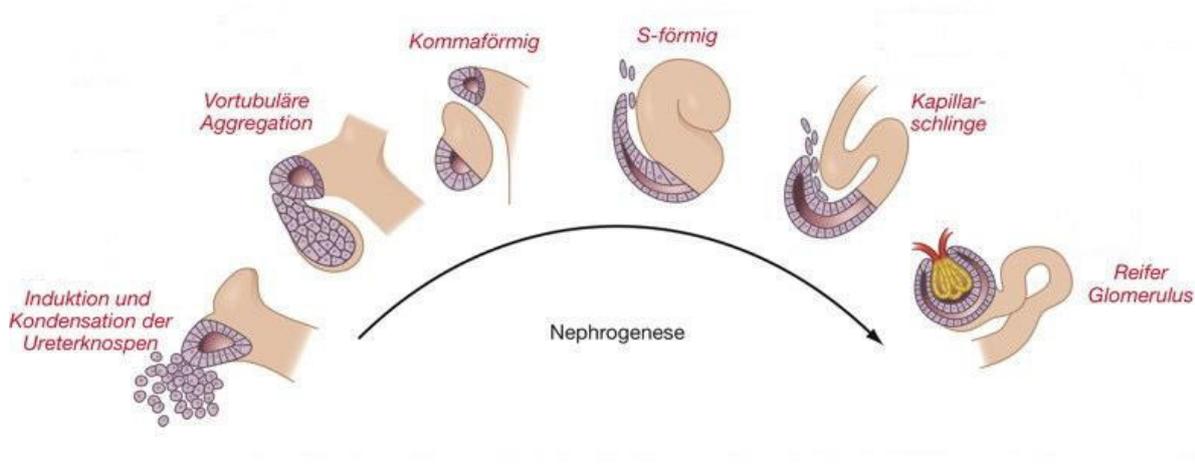


Abbildung 2: Stadien der Nephrogenese. (geändert nach Harrisons Innere Medizin [9])

PECs und Podozyten haben embryogenetisch die gleiche glomeruläre Vorläuferzelle. Wie bei allen embryogenetischen Prozessen, sind auch hier verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. β -catenin und wnt) notwendig, welche die korrekte Ausdifferenzierung in PECs oder Podozyten regulieren [10, 11].

1.2.2. Funktionen der parietalen Epithelzelle

Die parietale Epithelzelle (PEC) wurde bereits 1842 von Sir William Bowman in seiner Publikation „On the structure and use of the Malpighian Bodies of the kidney“ beschrieben [12]. Ihren Namen erhielt sie durch die anatomische Lage als wandseitige (= lat. parietalis) epitheliale Zelle, im Unterschied zur glomerulären Epithelzelle. Bis vor wenigen Jahren war vollkommen unbekannt, ob eine oder mehrere Zelltypen die Entität der parietalen Epithelzelle bilden. Ähnlich dazu waren auch die Funktionen dieser Zelle unbekannt, bzw. konnte bei vermuteten unterschiedlichen Funktionen nicht differenziert werden, welcher Zelltyp der parietal gelegenen Epithelzelle welche Funktion innehat. In den letzten 5 Jahren war die PEC zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen geraten, was eine Vielzahl an Erkenntnissen über die Funktionen und Zelltypen der parietal gelegenen Epithelzellen aufbrachte.

Barrierefunktion und Auskleidung der Bowman'schen Kapsel

Die früheste Erkenntnis über die PEC war ihre auskleidende Funktion des Bowman'schen Kapselraums. Zusammen mit der BK leiten die PECs den Primärharn vom Bowman'schen Kapselraum in den proximalen Tubulus. PECs sind durch interzelluläre Strukturen, wie Desmosomen, intermediate junctions und tight junctions mit ihren Nachbarzellen verbunden. Diese epithelialen Verbindungen ließen eine abdichtende Funktion vermuten. 2009 untersuchte Ohse et al. die Permeabilität der PECs für markierte Proteine der Größe 3kDa und 40kDa *in vivo*. Hier konnte gezeigt werden, dass PECs und Podozyten im Tierversuch nach Injektion von anti-GBM Antikörpern diese Proteine aufnahmen. Auch zwischen PECs und BK, sowie im periglomerulären Bereich wurden die markierten Proteine unter Erkrankungsbedingung gefunden. Die Autoren vermuten daher eine Funktion als zweite glomeruläre Barriere (nach der ersten Barriere bestehend aus Endothelzellen, GBM und Podozyten) [13].

Mechanosensation

Untersuchungen per Rasterelektronenmikroskop haben 1-2 Mikrovilli und Zilien pro Zelle auf der Oberfläche von PECs ergeben [14]. In renalen Tubuluszellen haben diese Zilien wichtige mechanosensitive Funktionen. Das Auffinden dieser Zilien und die Lokalisation der PEC als Zelle mit frühem Kontakt zu filtriertem Primärharn lässt eine mechanosensitive Funktion dieser Zelle vermuten [15].

Ausbildung einer epithelialen Heilungsnarbe

Immunhistochemische Färbungen mit CD44 und Ki67 an humanen Nierenbiopsien, sowie „lineage tracing“ von PECs bei experimenteller Halbmondglomerulonephritis zeigten die Beteiligung von PECs bei extrakapillär proliferativen Läsionen (siehe 1.2.3. Pathophysiologie bei Glomerulopathien). Derzeit ist keine primär von den PECs ausgehende Erkrankung bekannt. Die Fähigkeit der PECs zur Proliferation kann vielmehr als ihre Antwort auf glomeruläre Schädigung interpretiert werden [15]. Verschiedene Experimente konnten *in vitro* eine gesteigerte Expression von mesenchymalen Markern in PECs nach Stimulation mit Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) nachweisen. Dies wurde als EMT interpretiert [16, 17]. Auch konnte *in vitro* die gesteigerte Bildung von Kollagen IV α 1, α 3, Kollagen I α 1, Fibronectin und Laminin nach Stimulation mit TGF- β 1 in humanen PECs gezeigt werden [18]. Die Veränderungen der PEC im Sinne einer EMT und deren Fähigkeit zur Bildung von extrazellulärer Matrix und Proliferation ermöglichen die Ausbildung einer epithelialen Heilungsnarbe. Dabei handelt es sich um einen evolutionär hoch konservierten Mechanismus, der auf die Heilungsabläufe nach Hautverletzung zurück zu führen ist und das Überleben des Organismus sicherte [19]. Wenngleich die PEC demnach nicht die primäre Ursache der Schädigung darstellt, so führt diese Narbe im begrenzten glomerulären Raum doch zu einer Obliteration und Sklerosierung des Glomerulus.

Regeneration von Podozyten

Die zunehmende Erkenntnis über residente Stamm- oder Progenitorzellen in verschiedenen Organsystemen induzierte auch Untersuchungen der Niere auf diese Zelltypen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Zellpopulation am Harnpol der BK die Stammzellmarker CD24 und CD133 exprimieren [20, 21]. PECs, die sich in der Nähe des vaskulären Pols befinden, bilden zusätzlich den Podozytenmarker Podocalyxin (PDX) aus. Die graduelle Zunahme an podozytenspezifischen Markern in Richtung des vaskulären Pols der BK lässt auf eine Migration der PECs entlang der BK zur GBM mit Ersatz von Podozyten schließen [21, 22]. Kürzlich wurde auch die Ausbildung von Brücken zwischen den Kapillarschlingen verlängerter Podozyten und der BK als „Abkürzung“ für das Migrieren von PECs zu den Kapillarschlingen vorgeschlagen [23-25]. Auf den Kapillarschlingen verschwinden dann die Zelloberflächenmarker der renalen Progenitorzellen und es lassen sich nur noch podozytenspezifische Marker nachweisen [26].

Zusätzlich zu dem Nachweis auf PECs wurde eine Expression der Stammzellmarker CD24 und CD133 auch verstreut auf Tubulusepithelzellen gefunden. Dies erscheint logisch, da während der Nierenentwicklung aus den gleichen CD24+/CD133+ Vorläuferzellen aus dem metanephrogenen Blastem das glomeruläre und tubuläre Kompartiment des kortikalen Nephrons entsteht [27]. Diese Erkenntnisse haben zu einem Konzept der hierarchischen Aufteilung von renalen Progenitorzellen zu podozytären Progenitorzellen und tubulären Progenitorzellen geführt [28]. Die renalen Progenitorzellen liegen am Harnpol der BK. Diese besitzen die Kapazität, sowohl zu podozytären Progenitorzellen, wie auch zu tubulären Progenitorzellen zu differenzieren. Aus den podozytären Progenitorzellen entstehen letztlich Podozyten und die tubulären Progenitorzellen differenzieren schließlich zu Tubulusepithelzellen [29]. (Abbildung 3)

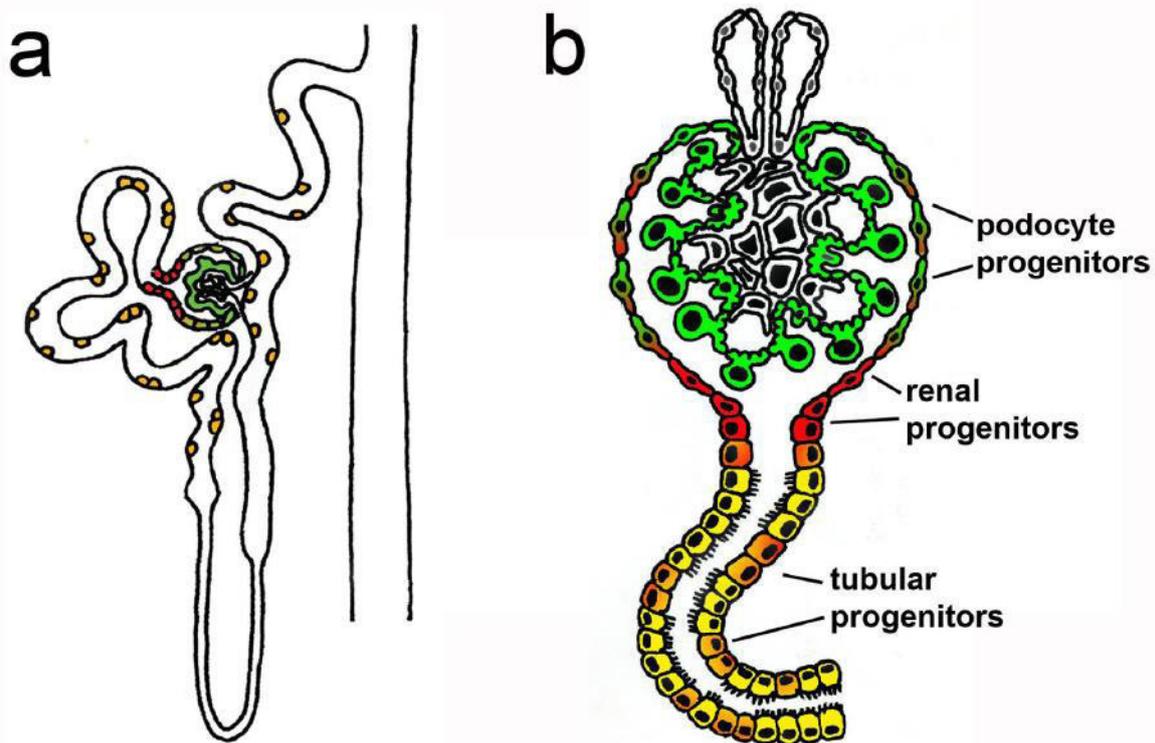


Abbildung 3: Das „renopoietische“ System in der ausgewachsenen Niere. b) Im ausgewachsenen Nephron befinden sich die renalen Progenitorzellen am Harnpol des Glomerulus (rote Zellen). In der hierarchischen Aufteilung werden diese zu podozytären Progenitorzellen (grün-rot) oder zu tubulären Progenitorzellen (orange). Gezeigt sind zusätzlich ausdifferenzierte Podozyten (grün) und ausdifferenzierte Tubulusepithelzellen (gelb). Die tubulären-Progenitorzellen (orange) liegen zusätzlich verstreut entlang des proximalen und distalen Tubulus, sowie des Verbindungssegments. (Abbildung aus Romagnani and Remuzzi [28])

1.2.3. Pathophysiologie bei Glomerulopathien

In anderen Organsystemen wie z.B. der Hämatopoese ist bekannt, dass eine Dysbalance zwischen der Proliferations- und Differenzierungskapazität von residenten Stammzellen zum Auftreten von Erkrankungen führt. Alle Formen der Leukämie basieren auf einer zu starken Bildung von Leukozyten und v.a. deren Vorläuferzellen.

Ein ähnlicher Effekt könnte durch übermäßige Proliferation von PECs zu einem Progress verschiedener glomerulärer Erkrankungen führen. Die Obliteration des Bowman'schen Kapselraums durch extrazelluläre Zellproliferation bei der Halbmondglomerulonephritis erfolgt durch glomeruläre Epithelzellen, welche die Stammzellmarker CD133 und CD24 exprimieren [18]. Nicht nur per immunhistochemischer Färbung, sondern auch in „lineage-tracing“ Experimenten der Erkrankungsmodelle für die Halbmondglomerulonephritis

(nephrotoxische Serum-Nephritis) und der kollabierenden Variante der FSGS (transgenes Thy-1.1 Mausmodell) konnte die Beteiligung der PECs an extrakapillär proliferativen Läsionen nachgewiesen werden [24]. Die Ausbildung der Sklerose an einer bestimmten (segmentalen) Stelle im Glomerulus ist durch das Vorhandensein von Zellbrücken zwischen glomerulärer Kapillare mit geschädigten Podozyten und PEC determiniert [30]. Der Durchtritt von Plasmabestandteilen durch die geschädigte glomeruläre Blut-Harn Schranke führt zur Proliferation und dem Verlust der Polarität der PECs [31]. Auch bei der diabetischen Nephropathie (DN) können sog. „Tip lesions“, d.h. hyperplastische intraglomeruläre Läsionen am Harnpol auftreten. Diese sind durch Adhäsionen und eine segmentale Glomerulosklerose zwischen den Kapillarschlingen und dem Harnpol der BK charakterisiert [28].

In experimentellen Modellen der Induktion von glomerulären, extrakapillären Läsionen zeigten sich distinkte morphologische Merkmale der Zellaktivierung an den beteiligten PECs (gesteigertes zelluläres Volumen, erhöhte Dichte an Zellen). Außerdem wiesen lediglich die aktivierten Zellen die Expression des Oberflächenmarkers CD44 auf. Diese CD44-positiven PECs produzierten vermehrt eine für die BK spezifische extrazelluläre Matrix (nachgewiesen durch den Antikörper LKIV69) [31]. (Abbildung 4) Zusätzlich bilden geschädigte Podozyten TGF- β , welches in PECs die vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix anregt und dadurch zur Ausbildung der extrakapillären Läsionen beiträgt [32]. Im Endstadium der Halbmondglomerulonephritis werden die PECs und der Bowman'sche Kapselraum von verschiedenen Entzündungszellen und Fibroblasten infiltriert, welche letztlich eine Ruptur der BK induzieren [33, 34]. Die einzige systematische histologische Untersuchung zu Veränderungen des parietalen Epithels bei verschiedenen nephrologischen Erkrankungen wurde 1981 bei durchschnittlich 6 Patienten/Diagnose durchgeführt. Hier wurden graduiert morphologische Veränderungen der PECs (runder und hyperchromatiner Nucleus oder vesikulärer Nucleus und teilweises Auftreten von Halbmonden) beschrieben. Das so definierte prominente parietale Epithel trat in allen fünf Fällen der DN, sowie bei membranoproliferativer Glomerulonephritis, akuter Glomerulonephritis, FSGS und diffuser proliferativer Lupus Nephritis auf [35].

Zusätzlich spielen pathologische Veränderungen an der glomerulotubulären Verbindung, wie das Auftreten von atubulären Glomeruli eine Rolle im Progress des Funktionsverlustes bei der DN [36]. Zu den pathologischen Veränderungen bei DN gehören also nicht nur die bereits beschriebenen „tip lesions“, sondern auch das Auftreten von atrophen proximalen Tubuli und letztlich der Verlust der Verbindung zwischen proximalem Tubulus und Glomerulus [28].

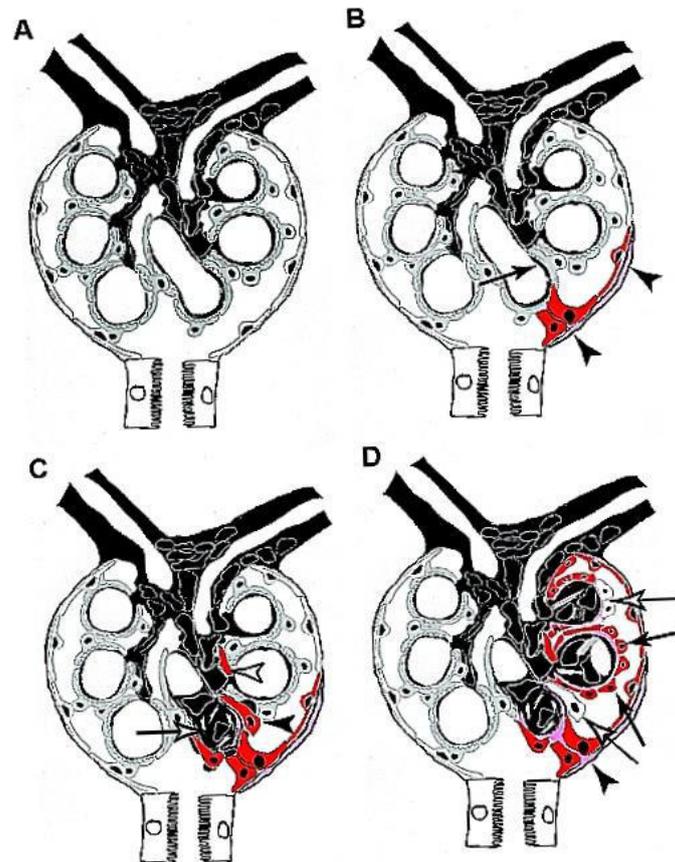


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Rolle der PEC bei der Glomerulosklerose. A) Dargestellt sind PECs in weiß, Podozyten auf der GBM in grau und die Kapillaren und Mesangialzellen in schwarz. B) Fokale Aktivierung der PECs (schwarze Pfeilspitze, rote PECs) und Bildung einer Adhäsion mit den Kapillarschlingen (bei der FSGS). Fokal aktivierte PECs produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix und verdicken die BK. C) Die aktivierten PECs dringen in das interkapilläre Kompartiment ein und bilden vermehrt extrazelluläre Matrix. (schwarze Pfeilspitze) Der weiße Pfeil zeigt die Bildung von extrazellulärer Matrix des Mesangiums an. D) Fortgeschrittene sklerotische Läsionen: Die PECs sitzen den Kapillarschlingen auf (schwarze Pfeile) und bilden weiterhin extrazelluläre Matrix (pink). Diese PECs exprimieren teils keine Aktivierungsmarker mehr (weiße Pfeile). (Abbildung aus Smeets, Kuppe [31])

Die Veröffentlichung von E.F. Gaffney [35] gab den Hinweis darauf, dass auch ein diabetisches Milieu in Glomeruli eine Aktivierung der PECs induzieren kann und diese – ähnlich zu der FSGS – vermehrt extrazelluläre Matrix bilden. In einer Untersuchung einer db/db Mauslinie konnten erhöhte Kollagen IV Werte im Urin festgestellt werden [37]. Dieses Kollagen IV könnte durch Sekretion der PECs in den Bowman'schen Kapselraum und in der Folge in den Urin gelangt sein. Somit trügen die PECs zu einer Verdickung der BK, sowie zu einer Verstärkung der Glomerulosklerose bei.

1.3. Die Bowman'sche Kapsel

1.3.1. Entstehung in der Embryogenese

Bereits aus dem nephrogenem Blastem teilen sich im Stadium der S-förmigen Struktur die Zellen in das parietale und viszerale Blatt der BK. Das viszerale Blatt ist von Podozyten bedeckt und legt sich über die Endothelzellen des Glomerulus. Diese drei Einheiten bilden später die glomeruläre Filtrationsbarriere. Das parietale Blatt ist innenseitig mit den PECs bedeckt, welche den Bowman'schen Kapselraum auskleiden und den Glomerulus nach außen hin abgrenzen. Die anatomische Lokalisation der PECs lässt vermuten, dass diese die BK bilden, jedoch konnte dies bisher nicht bewiesen werden [15]. Die mikroskopische Entdeckung der BK gelang durch Sir William Bowman (20.07.1816 – 29.03.1892), welcher deshalb auch Namensgeber der BK ist. Zusätzlich sind weitere anatomische Strukturen wie die Bowman-Drüsen und die Bowman-Membran der Hornhaut des Auges nach ihm benannt [12].

1.3.2. Physiologische Funktion

Eine ultrastrukturelle, sowie immunhistochemische Untersuchung zeigte die Abgrenzungsfunktion der BK zusammen mit den PECs nach außen als zweite glomeruläre Barriere [13]. Dies gelingt zum einen durch abdichtende Zell-Zell Verbindungen der PECs wie Desmosomen, intermediate junctions und tight junctions [38], zum anderen jedoch auch durch einen mehrschichtigen, filamentösen Aufbau der BK. Ultrastrukturelle Untersuchungen in der Ratte zeigten diesen mehrschichtigen Aufbau mit dem Vorhandensein von dichteren Schichten, die durch filamentöse Schichten verbunden sind. Diese Filamente wurden 5 – 15 nm dick und 1 – 2 µm lang beschrieben, welche sich zu Bündeln der Dicke von bis zu 100 nm formieren. Die Verbindung der PECs zur BK gelingt durch spiralartige, anastomosierende Bündel, den sog. Mikroligamenten, die sich mit intrazellulären Aktin-Filamenten verbinden [39]. Die Aktinfilamente der PECs folgen einer gleichgerichteten Anordnung. Die Richtungen dieser Filamente unterscheiden sich interzellulär jedoch deutlich. Hier ist von einer Anordnung auszugehen, welche eine größtmögliche strukturelle Integrität der PECs zur Auskleidung der BK ermöglicht [40]. Die Zusammensetzung der Proteine der BK wurde bereits mehrfach unter Verwendung

spezifischer Antikörper untersucht. Hier ergab sich eine primäre Zusammensetzung der BK aus den verschiedenen Untereinheiten von Kollagen IV. Die α -Ketten 1,2,5 und 6 von Kollagen IV sind in der BK stärker vorhanden, als die α -Ketten 3 und 4 [41]. Die Verteilung der Untereinheiten von Kollagen IV im Glomerulus unterscheidet sich vor allem durch das ausschließliche Vorkommen von Kollagen IV α 6 in der BK, jedoch nicht in der GBM [42]. Zusätzlich konnten die Proteine Laminin-1 und -10, Entactin/Nidogen, Perlecan und Bamacan in geringerem Ausmaß in der BK nachgewiesen werden [43].

1.3.3. Pathophysiologie bei Glomerulopathien

Während Veränderungen der GBM wegen der Bedeutung als glomeruläre Filtrationsbarriere ausreichend untersucht wurden, waren die Pathologien der BK deutlich seltener im Fokus wissenschaftlichen Interesses. In einem Rattenmodell der hypertensiven Nephropathie konnte per Lasermikrodissektion und in situ Hybridisierung gezeigt werden, dass die Bildung von PAI-1 und Kollagen I α 1 vor allem von der BK und nicht von den glomerulären Kapillarschlingen ausgeht [41]. Ebenso konnte in mehreren Erkrankungsmodellen der FSGS (MWF Ratte; Thy1.1. Modell, 5/6 Nephrektomie und DOCA-Salz in der Maus) die Assoziation zwischen der Aktivierung von PECs und Verdickung der BK gezeigt werden [31].

Über die pathologischen Veränderungen der BK bei DN ist bisher nur wenig bekannt. Die diesbezüglich wichtigste Studie wurde von E.F. Gaffney 1982 an 57 Patienten durchgeführt [35]. Er definierte ein „prominentes parietales Epithel“ als das Auftreten von zehn oder mehr vergrößerten PECs mit runden oder ovalen hyperchromatischen Nuclei in mindestens zwei Glomeruli pro Nierenbiopsie. So stellte er ein prominentes parietales Epithel bei allen fünf untersuchten Nierenbiopsien mit DN fest. Zudem zeigte sich eine fokale Verdickung der BK bei 44 der 57 untersuchten Glomeruli mit prominentem parietalem Epithel. In Nierenbiopsien mit unauffälligem parietalen Epithel war lediglich die BK von 5 der 20 Glomeruli verdickt [35]. Dies ließ zum einen auf eine Assoziation zwischen Diabetes mellitus (DM) und einer Aktivierung von PECs schließen. Zum anderen waren dadurch Hinweise auf die Assoziation zwischen einer Aktivierung von PECs und der Verdickung der BK gegeben.

1.4. Diabetische Nephropathie

1.4.1. Definition und Epidemiologie

Die DN wird definiert als das Auftreten von Proteinurie >500mg/24h oder Albuminurie >300mg/24h assoziiert mit DM [44, 45]. Assoziationsstudien haben eine hohe Prädiktion des Auftretens von DN bei Patienten mit DM bereits bei einer Albumin Exkretionsrate von 30-300mg/24h gefunden, was die frühzeitige Diagnosestellung einer DN ermöglicht [46-48]. Klinisch ist die DN zusätzlich charakterisiert durch eine eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate (GFR), eine arterielle Hypertension, sowie einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

Die DN ist heute weltweit der häufigste Grund für die terminale Niereninsuffizienz mit einem Anteil von einem Drittel aller Fälle. Folglich stellt es auch die häufigste Ursache für eine Nierenersatztherapie dar [49]. Wiederum ein Drittel der Patienten mit DM Typ I und Typ II entwickeln innerhalb eines 10 bis 30 jährigen Krankheitsverlaufes eine DN [44]. Das deutlich erhöhte kardiovaskuläre Risiko verschuldet die Hälfte der Todesursachen von an DN erkrankten Patienten [50]. Die weltweite Gesamtprävalenz von DM liegt derzeit bei 6,4% der Bevölkerung (285 Millionen Menschen). Schätzungen ergeben, dass diese auf 7,7% (439 Millionen Menschen) bis 2030 steigen wird, wobei den Großteil dessen Patienten aus entwickelten Ländern ausmachen werden [51, 52]. 90% dieser Patienten werden unter DM Typ II leiden [52]. Die Prävalenz des Auftretens von Mikroalbuminurie liegt bei 39% aller Patienten mit DM [53].

1.4.2. Klinische Aspekte der diabetischen Nephropathie

Eine noch heute gültige Einteilung der DN wurde von C. E. Mogensen 1983 veröffentlicht [54]. Diese galt primär dem Auftreten von DN bei Patienten mit DM Typ I, jedoch kann klinisch die Einteilung ebenso für Patienten mit DM Typ II angewandt werden, da diese glomerulär identische Veränderungen aufweisen. Lediglich der Verlauf gestaltet sich bei Patienten mit DM Typ II variabler und makrovaskuläre Komplikationen, sowie unspezifische interstitielle und vaskuläre Veränderungen in den Nierenbiopsien finden sich bei Patienten mit DM Typ II häufiger [55]. Mogensen teilte den Ablauf der DN in fünf Stadien ein [54]. (Abbildung 5)

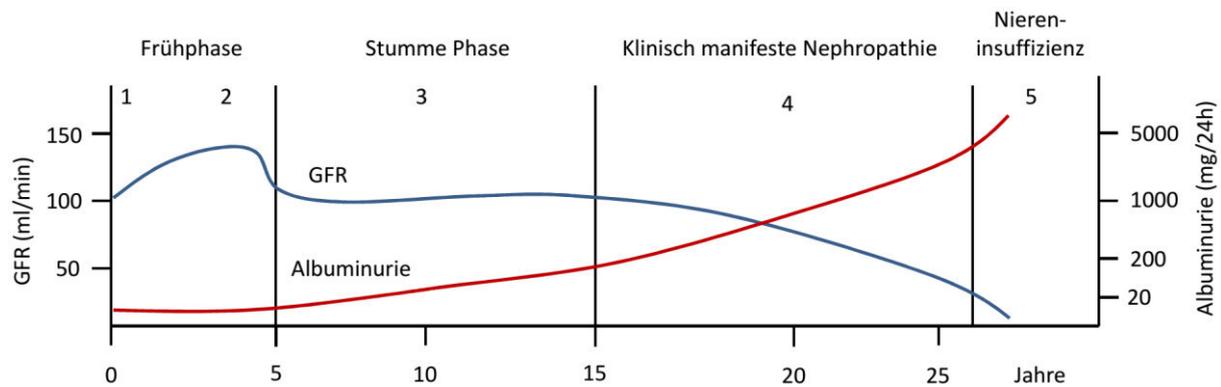


Abbildung 5: Stadieneinteilung der DN nach Mogensen. Natürlicher Verlauf der DN bei Diabetikern. Stadium 1 und 2 kennzeichnen die Frühphase. Stadium 3 entspricht der stummen Phase, während Stadium 4 durch eine klinisch manifeste Nephropathie definiert ist und Stadium 5 durch das Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz [54].

Im **Stadium eins** wird eine Nierenhypertrophie und Hyperfunktion der glomerulären Filtration beschrieben. Die Blutdruckwerte bleiben normotensiv und eine Mikroalbuminurie tritt v.a. bei körperlicher Anstrengung bei Patienten mit DM Typ II auf. Das **Stadium zwei** kennzeichnet sich durch eine langjährige Latenzphase mit klinischer Unauffälligkeit, jedoch bereits vorhandenen histopathologischen Veränderungen aus. Die GFR bleibt leichtgradig erhöht oder sinkt auf den Ausgangswert und interindividuell unterschiedlich kommt es zu einer messbaren Erhöhung der Mikroalbuminurie (v.a. bei körperlicher Anstrengung und Patienten mit DM Typ II). Im **Stadium drei** manifestiert sich die Mikroalbuminurie zwischen 30 und 300mg/24h. Außerdem sinkt die GFR nun etwas und v.a. bei Patienten mit DM Typ II kommt es zum Auftreten oder Verschlechterung einer arteriellen Hypertonie. Im **Stadium vier** zeigt sich die DN nun auch klinisch manifest. Hier entwickelt sich eine Makroalbuminurie mit persistierender Proteinurie >500mg/24h. Unbehandelt wird sich die Proteinurie um ca. 20 – 40% pro Jahr verschlechtern. Außerdem sinkt die GFR um bis zu 1ml/min pro Monat. Das **Stadium fünf** entspricht einer ausgeprägten Niereninsuffizienz mit Entwicklung einer Urämie. Hier entsteht häufig ein nephrotisches Syndrom. Mogensen beschreibt dieses Stadium bereits als „end-stage renal disease“. Durch die stadiendefinierenden Beschreibungen der DN ist es klinisch gerechtfertigt bei Vorhandensein einer langjährigen (>10 Jahre) bestehende DM Erkrankung den Symptomkomplex aus Proteinurie, arterieller Hypertonie, nephrotischem Syndrom und Abnahme der GFR auf eine DN zurückzuführen. Die Untersuchung auf das Vorhandensein von Mikroalbuminurie ist derzeit der einzige nicht-invasive Test für die frühzeitige Diagnose einer DN [56].

Ein gesteigertes Verständnis der Pathogenese der DN in den letzten Jahren führte auch zur Diskussion neuer Biomarker für die frühzeitige nicht-invasive Diagnose der DN. So reguliert der profibrotische Faktor TGF- β eine Vielzahl an mikro-RNAs [57]. In einer kleinen Kohortenstudie an 56 Patienten wurde das Auftreten von DN mit reduzierten mikro-RNA-15 Spiegeln im Urin assoziiert [58]. Eine weitere Studie konnte signifikante Unterschiede in der Expression von 27 verschiedenen mikro-RNAs in unterschiedlichen Stadien der DN feststellen [59]. Auch wenn verschiedene Expressionslevel einzelner mikro-RNAs bei DN gefunden werden konnten, so ist derzeit keiner dieser mikro-RNAs spezifisch für die DN. Auch werden Studien mit großen Fallzahlen die Korrelation des gesteigerten oder verminderten Auftretens der mikro-RNAs in Blut und Urin zeigen müssen [57].

Die Indikationen zur Durchführung einer Nierenbiopsie bei Verdachtsdiagnose einer DN sind derzeit nur insuffizient beschrieben. Empfohlen wird die Durchführung einer Nierenbiopsie bei rapider Progression einer Proteinurie, Hämaturie, aktivem Urinsediment, rapider Nierenfunktionsverschlechterung, dem Verdacht auf eine begleitende Nierenerkrankung und der Absenz von diabetischer Retinopathie [60, 61]. Das begleitende Auftreten von diabetischer Retinopathie als diagnostischer Marker einer DN wird kontrovers diskutiert [62-65]. Erst die Durchführung einer Nierenbiopsie klärt letztlich mit großer Sicherheit die Unterscheidung zwischen DN, nicht-diabetischer Nephropathie und begleitender nicht-diabetischer Nephropathie zusätzlich zu einer DN [56].

Die derzeit etablierte Therapie der DN beschränkt sich - neben der lifestyle Modifikation zur Reduktion der Risikofaktoren - weitgehend auf eine Progressionsreduktion durch optimierte Blutdruckkontrolle, Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), Korrektur der Hyperlipidämie und optimierter Blutzuckerkontrolle [45]. Daneben fanden nur sehr wenige experimentelle Therapien aus Tierversuchen beim Menschen Anwendung, so wie die Behandlung mit dem Glykosaminoglykan Sulodexiden zur Reduktion der Albuminurie [66] und einem zweit-Generation Inhibitor von AGEs Pimagedine [67]. Eine Phase III Arzneimittelstudie mit Bardoxolone, einem Aktivator des Nrf2 Signalweges, wurde 2013 abgebrochen, da es zu einem vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Nebenwirkungen kam. Auch wurde der Endpunkt des reduzierten Risikos für das Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz nicht erreicht [68].

1.4.3. Pathophysiologie

Die Pathogenese der DN beinhaltet mehrere Mechanismen, welche in den verschiedenen Phasen der Erkrankung unterschiedlich ablaufen. Die Gewichtung der verschiedenen Mechanismen wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Als erster Mechanismus und die DN initierend muss die Hyperglykämie genannt werden. Sie führt zu einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix durch Mesangialzellen [69, 70] und gehäufte Mesangialzellapoptose [71, 72]. Ursächlich hierfür könnte eine erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration in Mesangialzellen sein, was durch Überexpression von Glukosetransportern (GLUT1 und GLUT4) in Mesangialzellen gezeigt werden konnte [70]. Zudem führt die Hyperglykämie zu einer Hochregulation der VEGF-Expression in Podozyten, was die vaskuläre Permeabilität erhöht [73].

Eine Hyperglykämie resultiert auch in einem erhöhten oxidativen Stress durch die Produktion von reaktiven Oxidationsprodukten (ROS) in Mitochondrien, welche zur Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und verstärkter Apoptose führen kann [74]. Zusätzlich haben histologische Analysen von humanen Nierenbiopsien auch glykoxidierte Produkte (kombinierte Produkte der Glykierung und Oxidation von Proteinen) und Lipoxidation in der mesangialen Matrix ergeben, welche deutlich häufiger bei Patienten mit DN im Vergleich zum Normalkollektiv auftraten [75, 76].

Ein weiterer Mechanismus, der zum Teil auch von ROS abhängt und durch die Hyperglykämie bedingt wird, ist die Bildung von „advanced glycation endproducts“ (AGE) durch nicht-enzymatische Glykosylierung. Dieser anfangs noch reversible Effekt führt zu einer beeinträchtigten Matrix-Matrix, sowie Zell-Matrix Interaktion. Zu einer Exazerbation der Glomerulosklerose trägt auch die unlösliche Bindung von interzellulären Plasmaproteinen (z.B. Lipoprotein) durch AGEs auf Matrixbestandteilen bei [77]. Außerdem stören AGEs den Abbau von Proteinen durch Metalloproteinasen, was auch in einer Verdickung der GBM und mesangialen Expansion endet [78, 79]. Die Ablagerung von AGEs, welche teils auch mit Kollagen eine Verbindung eingehen, trägt wesentlich zu den damit assoziierten renalen und mikrovaskulären Veränderungen bei [80]. Des Weiteren aktivieren AGEs Smad direkt über den Rezeptor der AGEs (RAGE) und die ERK/p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) und indirekt über eine verstärkte Expression von TGF- β [81]. Es wurde außerdem beschrieben, dass AGEs über den gleichen Signalweg unabhängig von TGF- β die EMT von Tubulusepithelzellen induziert [82]. Das Auftreten von Transdifferenzierung ist derzeit umstritten, jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei der Fibrogenese renaler epithelialer Zellen Signalwege ähnlich zu Signalwegen der EMT auftreten [57]. Das Vorhandensein von AGEs wurde bei DN aus humanen Nierenbiopsien in der mesangialen

Nische der Glomeruli gezeigt und korrelierte mit dem Ausmaß der diabetischen Glomerulosklerose [83]. Auch konnte aus dem Urin von Patienten mit DM Typ I AGEs nachgewiesen werden, was das Vorhandensein von AGEs in dem Bowman'schem Kapselraum bestätigt [84].

Die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) ist ein weiterer Mechanismus, der durch die Hyperglykämie und ROS induziert wird. Diese Signalkinase führt auch zu einer endothelialen Dysfunktion mit verminderter Produktion von Stickstoffmonoxid und verstärkter Expression von Endothelin-1 und vascular endothelial growth factor (VEGF) [85]. Außerdem führt die Aktivierung dieses Enzymes auch zu einer vermehrten Sekretion von vasodilatatorischen Prostanoiden, sowie zu einer Aktivierung von TGF- β , welches wiederum die Bildung von extrazellulärer Matrix durch Mesangialzellen anregt [86].

Verringerte Widerstände im Vas efferens und v.a. im Vas afferens des Glomerulus führen zu glomerulärer Hyperperfusion und Hyperfiltration [87]. Diese hämodynamischen Mechanismen der Pathogenese der DN werden in Verbindung mit Prostanoiden, Stickstoffmonoxid, VEGF, TGF- β und v.a. Angiotensin II des RAAS beschrieben. Die Wirkung von Angiotensin II bei der DN ist durch einen progressionsverzögernden Effekt durch Blockade des RAAS bei der DN belegt. Diese Blockade führt zu einer verminderten Stimulation der Bildung von TGF- β 1 durch Angiotensin II, was im Tierversuch gezeigt werden konnte [88, 89].

Zusätzlich zu VEGF, Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-18 und Tumor-Necrosis-Factor ist TGF- β das bedeutendste Zytokin, welches von Podozyten, Mesangialzellen und proximalen Tubuluszellen durch Hyperglykämie verstärkt exprimiert wird [90, 91]. TGF- β regt den connective tissue growth factor und Hitzeshockproteine zur Synthese an, welche fibrogene Effekte vermitteln [87]. Außerdem konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die Administration eines Antikörper gegen TGF- β [92] in Ratten und des hepatocyte growth factors (welcher die profibrotische Wirkung von TGF- β 1 blockiert) in Mäusen zu einer deutlichen Besserung der Proteinurie und Glomerulosklerose der DN führt. Auch TGF- β nutzt den SMAD und MAPK Signalweg zur Verstärkung von renaler Fibrose. Die direkte Intervention an TGF- β ist jedoch wegen seiner großen Bedeutung in der Immunregulation umstritten. „Downstream“ von TGF- β konnten eine Vielzahl von mikro-RNAs identifiziert werden, die eine fibrogenetische Bedeutung bei diabetischer und nicht-diabetischer Nephropathie haben und durch TGF- β reguliert werden. (Abbildung 6) Die klinische Bedeutung dieser mikro-RNAs könnte sowohl in der Diagnostik als Biomarker, als auch in der Therapie der DN als therapeutische Angriffspunkte liegen [57].

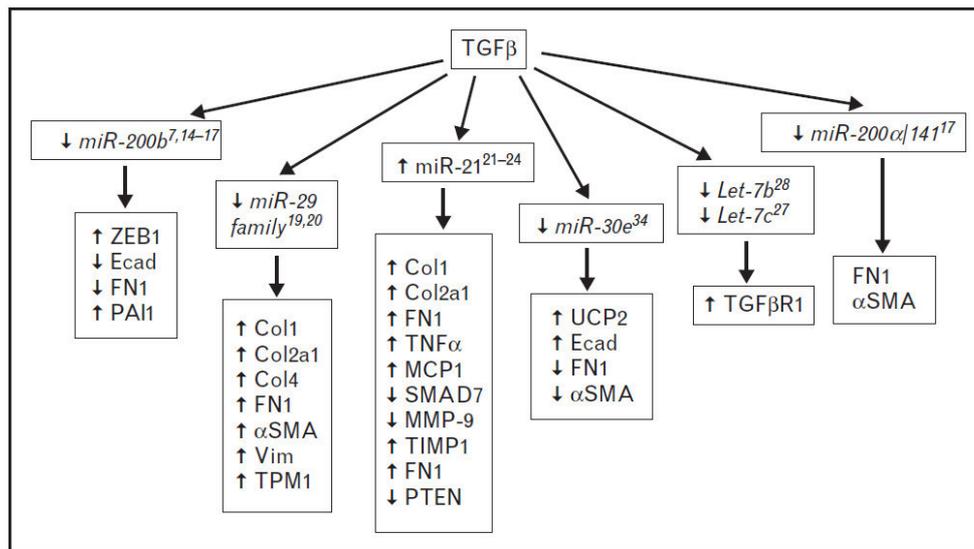


Abbildung 6: Beschriebene mikro-RNAs und deren Zielgene bei der diabetischen Nephropathie. (McClelland, Hagiwara [57])

Zu den weiteren Mechanismen die in der Pathogenese der DN diskutiert werden, gehören die Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) Aktivierung, der Aldose Reduktase Signalweg, die Bedeutung von Prorenin, Nephrin, Lipidmediatoren und nuclear factor-kappaB u.v.m.. Außerdem scheint die genetische Suszeptibilität eine große Rolle bei der Entwicklung der DN zu spielen [87, 93].

In Kenntnis der Pathophysiologie wurden zur Simulation von diabetischer Kondition *in vitro* Glukose, AGEs und TGF-β1 verwendet.

1.5. Zielsetzung und Hypothese

Untersuchungen der letzten Jahre haben zusätzliche Funktionen der PECs, sowie das Vorhandensein mehrerer Zelltypen in der Region der PECs ergeben. Zu diesen Funktionen gehört auch die verstärkte Bildung von extrazellulärer Matrix nach Stimulation mit TGF- β 1 [18], welches bei der DN durch verschiedene Mechanismen verstärkt in den Bowman'schen Kapselraum sezerniert wird (siehe 1.4.3. Pathophysiologie). Bei der FSGS konnte bereits der Zusammenhang zwischen Aktivierung der PEC und einer Verdickung der BK gezeigt werden [31]. Morphologisch konnte dies auch durch das deutlich gehäufte Auftreten einer verdickten BK in Glomeruli mit prominentem parietalem Epithel beobachtet werden [35].

Aufgrund dieser Erkenntnisse vermuten wir, dass die PEC unter diabetischer Kondition verstärkt extrazelluläre Matrix bildet, was letztlich zu einer Verdickung der BK führt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Pipetten

Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	BD, Heidelberg, D
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA
Multikanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe Pipetus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Pipettenspitzen 1 - 1000 µl TypGilson	Peske, Aindling-Arnhofen, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, D

Waagen

BP 110 S	Sartorius, Göttingen, D
Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH

ELISA

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
ELISA Micoplate Strip Washer ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall, D

Zentrifugen

Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	VWR Internation, Darmstadt, D
Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5418 C	Eppendorf, Hamburg, D
Universal 16	Hettich, Bäch, CH

Real-time PCR

Nano drop	PEQLAB Biotechnology, Erlangen D
LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
Klebefolie	Roche, Basel, CH
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, CH

Western-Blot

Gel-Elektrophorese-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Semi-Dry Blotting System	BioRad, München, D
Chemiluminescence system	Amersham, Buckinghamshire, UK

Mikroskope

Lichtmikroskop Leitz DM IL	Leica Microsysteme, Solms, D
Libra 120	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D
CCD-Kamera	Tröndle, Moorenwies, D
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D
Axiocam HR	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D

Zellkultur

Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, München, D
Steril Card Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
UV-Licht	Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen, D
12-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden, D
6-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden, D
24-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden, D
Primaria 100mm Standard Cell Culture Dish	Corning B.V., Amsterdam, NL
Zellkulturschale 96 x 21mm	TPP, Trasadingen, CH
T75 flask, 75cm ²	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zellschaber 24cm	TPP, Trasadingen, CH
Wasserbad HI 1210	Leica Microsysteme, Wetzlar, D
Kryovials	A Laboratories, Eastleigh, UK
CoolCell Einfrierboxen	Biocision, Larkspur, USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D

Sonstiges

Einwegküvetten 1,5ml Plastibrand	Brand, Gießen, D
Eppendorf-Gefäße 1,5ml	TPP, Trasadingen, CH
Falcons 15ml, 50ml	BD, Heidelberg, D
Immobilon PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach, D
Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg, D

Ultracut	Leica Microsysteme, Wetzlar, D
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Sicherheitswerkbank Microflow	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Veco-Träger	Science Seviles, München, D

2.1.2. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Zellkultur

DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fetales bovines Serum (FBS)	Summit Biotechnology, Fort Collins, USA
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Collagen I, Bovine, Gibco	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Trypsine/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EBM Basal Medium 500ml	Lonza Group Ltd, Basel, Ch
EGM-MV BulletKit	Lonza Group Ltd, Basel, Ch
HyClone Fetal Bovine Serum	Thermo Scientific, Rockford, USA
Interferon-gamma (IFN- γ)	Roche, Indianapolis, USA
HEPES, 1M buffer solution	Invitrogen, Karlsruhe, D
Sodium pyruvate	Irvine Scientific, Santa Ana, USA
Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

RNA-Isolation, cDNA-Synthese und real-time PCR

Ethanol	Merck, Darmstadt, D
PureLink RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt, D
RNasin (40 U/ μ l)	Promega, Mannheim, D
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, USA
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt, D

DTT (0,1M)	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTPs (25mM)	GE Healthcare, München, D
Hexanucleotide	Roche, Mannheim, D
5x First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
10x Taq Puffer without detergent	Fermentas, St. Leon-Rot, D
SYBR Green Dye detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten, D
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
RNA loading buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
10x MOBS – Puffer	83,7g MOPS (MW 209,3g/mol) 13,6g Na-Acetat (MW 136,1 g/mol) 3,7g EDTA (MW 372,24 g/mol) in 1l Wasser gelöst, pH auf 7 eingestellt
Mastermix für real-time PCR (10ml)	Tag Puffer 10x without detergent (2ml) dNTP 25mM (150µl) BioStab PCR optimizer (4ml) Bovines Serumalbumin, 20mg/ml (200µl) SYBR GreenI (40µl) MgCl ₂ 25mM (2,4ml) H ₂ O (1210µl)

Western-Blot

Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Hydrogenchlorid (HCL)	Merck, Darmstadt, D
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, D
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	BioRad, München, D
Tween 20	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, D
10% Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München, D
30% Acrylamide (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe, D

Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München, D
Blockierlösung Western Blocking Reagent	Roche, Mannheim, D
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Enhanced Chemoluminescence ECL	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
TEMED	BioRad, München, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer (5X)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tris Buffered Saline (TBS)	50mM Tris 150 mM NaCl mit HCl auf pH 7,6 eingestellt
Tris Buffered Saline Tween-20 (TBS-T)	0,1% Tween-20 in TBS
Laufpuffer	3g Tris 14,4g Glycine 0,5g SDS mit ddH ₂ O auf 1000ml (pH 8,3) auffüllen
Transferpuffer	1,5g Tris Glycine 7,2g mit ddH ₂ O auf 500ml auffüllen
Trennpuffer	18,2g Tris (1,5mM) 0,4g SDS mit ddH ₂ O auf 100ml (pH 8,8) auffüllen
Sammelpuffer	6,05g Tris (0,5mM) 0,4g SDS mit ddH ₂ O auf 100ml (pH 6,8) auffüllen
<i>ELISA</i>	
Mouse TGF-β1 DuoSet	R&D Systems, Abingdon, UK
Human TGF-β1 DuoSet	R&D Systems, Abingdon, UK
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
di-Hydrogensulfat (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe, D

Zellproliferationsassay

Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Promega, Madison, USA

Zytotoxizitätsassay

Cytotoxicity Detection Kit (LDH) Roche, Mannheim, D

Histopathologische Methoden

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München, D
PAS	Bio-Optica, Mailand, I
Xylol	Merck, Darmstadt, D
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt, D
Pertex	Medite, Burgdorf, D
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Uranylacetat (CH ₃ COO) ₂ UO ₂ x2H ₂ O	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Blei(II)-nitrat	Merck, Darmstadt, D
Azure II	Merck, Darmstadt, D
Methylenblau	Merck, Darmstadt, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
2-Dodeceny succinic acid anhydride (DDSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Glycid Ether 100 (EPON 812)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Methylnadic anhydride (MNA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (MDP 30)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Glutaraldehyd Grade I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EPON Lösung (50ml)	9,26ml DDSA 24,26ml EPON 812 (Glycid Ether 100) 16,48ml MNA 0,75ml DMP 30
Sörensen – Phosphatpuffer (1000ml)	7,335g KH ₂ PO ₄ 2,281g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O

Glutaraldehydlösung 6,25%	1000ml dest. Wasser 250ml Glutaraldehyd 25% 750ml Sörensen – Phosphatpuffer
---------------------------	---

2.1.3. Zelllinien

Konditionell immortalisierte PECs	S.J. Shankland, Seattle, USA [94]
Humane primärisolierte PECs	P. Romagani, Florenz, IT [20]

2.1.4. Stimulanzen (Zellkultur)

Muriner Tumor-growth-factor- β 1 (TGF- β 1)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Humaner Tumor-growth-factor- β 1 (TGF- β 1)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Advanced glycation endproduct (AGE)	Calbiochem (Merck), Darmstadt, D
Glukose 5%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

2.1.5. Oligonukleotid-Primer für die real-time PCR

Tabelle 1: Verwendete real-time PCR Primer zur Analyse der Expression relevanter Gene.

Gen	Linke Sequenz	Rechte Sequenz
Murines CD44	CAAGTTTTGGTGGCACACAG	AGCGGCAGGTTACATTCAAA
Murines TGF- β 1	ACCAGAGGAAGATCTGCGG	ATTTGAGAGCGGAAGAGCTG
Murines Col 1a1	ACATGTTTCAGCTTTGTGG	TAGGCCATTGTGTATGCA
Murines Col 4a1	GTCTGGCTTCTGCTGCTC	CACATTTTCCACAGCCAG
Murines Col 4a2	CCAGTGCTACCCGGAGAA	GCCCTGTAGTCTGGGAA
Murines Col 4a3	TACCCTGCTGCTACTCCT	GAACCAGGAACCCCTTTC
Murines Col 4a4	TGTCTGCCAGTGTTCCTG	CTGGAATCCCAATAGGTCCC
Murines Col 4a5	TGGTCTTACTGGCCCTGTG	TTCTAAACCTGGAAACCCCC
Murines Col 4a6	TGACCAAAGAACTGGCAG	CCCTCTTGCTCCTTCTC
Humanes CD44	GACAAGTTTTGGTGGCAGC	CACGTGGAATACACCTGCAA
Humanes TGF- β 1	CCCTGGACACCAACTATTGC	CTTCCAGCCGAGGTCCTT
Humanes Col 1a1	AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG	CACACGTCTCGGTCATGGTA
Humanes Col 4a1	CTCCACGAGGAGCACAGC	CCTTTTGTCCCTTCACTCCA
Humanes Col 4a2	GCCAGTGCTACCCTGAGAAA	CGGGGAATCCTTGTAACTCT
Humanes Col 4a3	CAGGTGCTCCTGCTGCC	GCACTGGCCTTTGTCTTTACA
Humanes Col 4a4	TGTGTTCCCTGAAAAGGGGTC	CCTTTCTCTCCTGAAAGCCC
Humanes Col 4a5	TACTGGCCCTGAGTCTTTGG	TTTCCCCTTTTATGCCACTG
Humanes Col 4a6	CTGCTCCTGGTTACGTTGTG	GGAAAACACTGACAGCTCCC
18s	GCAATTATCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC

2.1.6. Antikörper

ELISA

Maus Anti-TGF- β 1	R&D Systems, Abingdon, UK
Biotinylated chicken Anti-TGF- β 1	R&D Systems, Abingdon, UK
Human Anti-TGF- β 1	R&D Systems, Abingdon, UK
Biotinylated chicken Anti-TGF- β 1	R&D Systems, Abingdon, UK

Western-Blot

Human Collagen IV	Novus Biologicals, Cambridge, UK
Chicken anti-rabbit IgG (HRP)	Novus Biologicals, Cambridge, UK
β -Actin rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Boston, USA

2.2. Zellkultur und Stimulationsexperimente

Es kamen zwei verschiedene Zelllinien bei diesen Arbeiten zur Anwendung. Die murine, immortalisierte Zelllinie der PECs wurde uns freundlicherweise von Prof. Stuart. J. Shankland zur Verfügung gestellt. Er beschrieb diese Zelllinie bereits 2008. Der zugehörigen Veröffentlichung konnten auch die optimierten Kultivierungsbedingungen entnommen werden [94]. Bei Verwendung dieser Zelllinie wurden alle Experimente zwischen der 21. und 26. Passage und auf mit Kollagen I beschichteten Zellkulturschalen durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Protokoll von Prof. Shankland zunächst in RPMI 1640 Medium versetzt mit 5% FBS, Penicillin (100U/ml), Streptomycin (100mg/ml), Natrium pyruvate (1mmol/l), HEPES puffer (10mmol/l) und Natrium bicarbonate (0,075%) in einem Inkubator bei 33°C und 5% CO₂ kultiviert. Zusätzlich wurden 50 U/ml IFN- γ zugegeben. Bei Erreichen einer 70% Konfluenz in den genannten Zellkulturschalen wurden die Zellen mit 1x PBS dreifach gewaschen und unter Verwendung von 1x Trypsin für ca. 10min in 37°C vom Schalenboden gelöst. Danach konnten die Zellen im Rahmen der Experimente stimuliert oder in dem oben genannten Medium rekultiviert werden. Kam es zu einer Verwendung für Stimulationsexperimente, so wurden die Zellen in dem genannten Medium **ohne** IFN- γ für die Zeitdauer von 2 Wochen bei 37°C und 5% CO₂ zur Ausdifferenzierung kultiviert. (Abbildung 7) Nach zwei Wochen konnten die Zellen direkt für die Stimulationsexperimente verwendet werden. Zur Synchronisierung des Zellzyklus wurden bei Stimulationsexperimenten für die Genexpressionsanalysen bestimmter Gene die Zellen 24h vor Experimentbeginn in Medium mit nur 0,5% FBS kultiviert.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden des Weiteren humane PECs aus dem Labor von Prof. Romagnani untersucht [20]. Diese Zellen werden in EBM versetzt mit dem EGM-MV BulletKit (ohne Penicillin) und 20% HyClone Fetal Bovine Serum kultiviert. Bei Erreichen von 90% Konfluenz wurden diese Zellen mit 1x Trypsin vom Zellkulturboden gelöst und in die entsprechenden Kultivierungsschalen in der von den Experimenten abhängigen Zellzahl verteilt. Für die Stimulationsexperimente erfolgte die Kultivierung der humanen PECs in EBM mit 5% HyClone FBS.

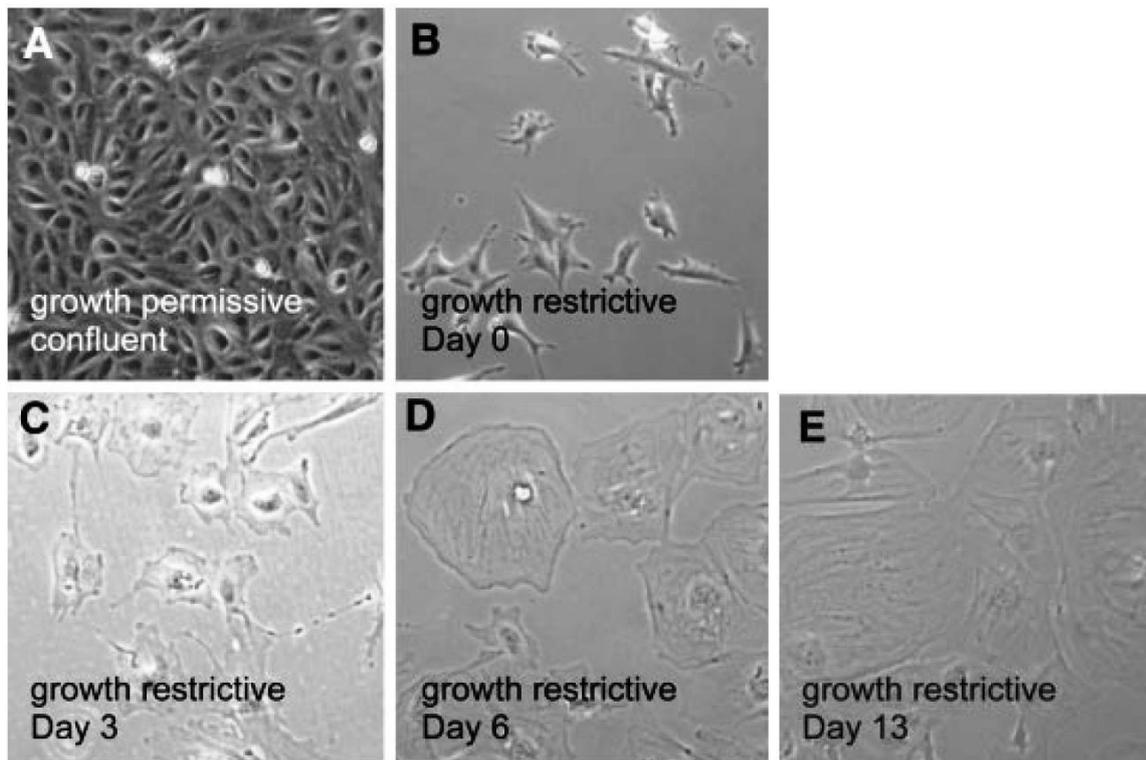


Abbildung 7: Morphologische Veränderungen bei der Differenzierung von parietalen Epithelzellen *in vitro*. Abgebildet ist die Differenzierung der parietalen Epithelzellen bei 37°C und ohne Zugabe von IFN- γ („growth restrictive“ Bedingungen). Diese Abbildungen sind der Publikation von Ohse, Pippin [94] entnommen und entsprechen den beobachteten morphologischen Veränderungen dieser Arbeit.

2.2.1. Gefrieren und Auftauen der Zellen

Zellen, die nicht unmittelbar für die Durchführung von Experimenten verwendet wurden, wurden für den späteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die murine PEC Zelllinie wurde bei Erreichen von 70% Konfluenz in der Zellkulturschale und die humane PEC Zelllinie bei 90% Konfluenz dreifach mit 1x PBS gewaschen und unter Verwendung von 1x Trypsin vom Zellkulturboden gelöst. Unter sterilen Bedingungen wurde die Zellsuspension dann bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig unter Verwendung von Pasteur Pipetten abgesaugt. Unmittelbar anschließend wurde der Zellpellet in 4°C kaltem FBS bei der murinen PEC Zelllinie und HyClone Fetal Bovine Serum bei der humanen PEC Zelllinie versetzt mit 10% DMSO durch vorsichtiges resuspendieren gelöst. Die Zellsuspensionen wurden anschließend in Kryovials aliquotiert und in Einfrierboxen bei -80°C übernacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff transferiert.

Das Auftauen von Zellen erfolgte zunächst durch das Einlegen der Kryovials in ein 37°C Wasserbad. Die Zellen wurden danach in ausreichend Zellkulturmedium (je nach Zellkulturschale zwischen 6 ml und 14 ml) suspendiert. Bei der murinen PEC Zelllinie konnte bereits am Folgetag das komplette Medium ausgetauscht werden. Den humanen PECs wurde in den nächsten 3 Tagen täglich ca. 3 ml frisches, 37°C warmes Medium zugegeben. Am 4. Tag konnte auch hier das komplette Medium ausgetauscht werden.

2.2.2. Zellzählung

Sowohl für die Durchführung der verschiedenen Experimente, als auch zum Einfrieren der Zellen war es notwendig vorab die Zellzahl zu ermitteln. Dafür wurde die Zellsuspension zunächst mit 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in 1 ml Standardmedium durch vorsichtiges Resuspendieren aufgelöst. 50µl der Zellsuspension wurden entnommen und mit 50µl PBS vermischt. Hiervon konnten erneut 50µl entnommen und mit 50µl Trypanblau versetzt werden. 10µl dieser Lösung wurden in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter einem Lichtmikroskop konnten dann helle (vitale) Zellen von den avitalen Zellen unterschieden und in acht Großquadranten mäanderförmig ausgezählt werden. Gemäß folgender Formel konnte so die Zellzahl berechnet werden (Formel 1:

Formel 1: Formel zur Berechnung der Zellzahl viabler Zellen.

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Vitale Zellen}/8) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.3. Stimulationsexperimente

Zur Stimulation der beiden Zelllinien kamen verschiedene Stimulantien zur Anwendung welche diabetische Konditionen simulieren und dafür bereits fachübergreifend durch viele Arbeitsgruppen etabliert wurden [95-99]. Außer bei den Stimationsversuchen für die Genexpressionsanalysen der murinen PEC Zelllinie auf Transkriptionsniveau, in welchen Medium versetzt mit 0,5% FBS für die Kultivierung während der Experimente verwendet wurde, wurden alle Versuche in den Standardkultivierungsmedien beider Zelltypen durchgeführt. Hier wurden die murinen PECs in RPMI 1640 Medium versetzt mit 5% FBS,

Penicillin (100U/ml), Streptomycin (100mg/ml), Natriumpyruvat (1mmol/l), HEPES Puffer (10mmol/l) und Natriumbikarbonate (0,075%) kultiviert. Die humanen PECs wurden bei allen Versuchen in EBM versetzt mit 5% HyClone FBS kultiviert. Je nach Experimentenplan wurde den Medien 30mM oder 5mM Glukose, 100µg/ml AGE oder 5ng/ml TGF-β1 für die Zeitdauer von 6h, 24h, 48h oder 72h zugegeben. Um die zusätzliche Glykierung von weiteren Proteinen in der Zellkultur zu verhindern, kamen keine Zeitpunkte länger als 72h zur Anwendung.

2.3. Kolorimetrische Assays

2.3.1. Zellproliferationsassay

Zur Messung des proliferativen Effekts der Stimuli auf die Zellen wurde der *CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* herangezogen. Dieser wurde den Herstellerangaben folgend durchgeführt und von Mosmann 1983 erstmalig beschrieben [100]. Er beruht auf einer zellulären Umsetzung eines Tetrazoliumsalses durch die metabolisch entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und NADPH der aktiven Zellen zu Formazan, welches per Photospektrometer durch Farbumschlag gemessen werden kann [101]. (Abbildung 8)

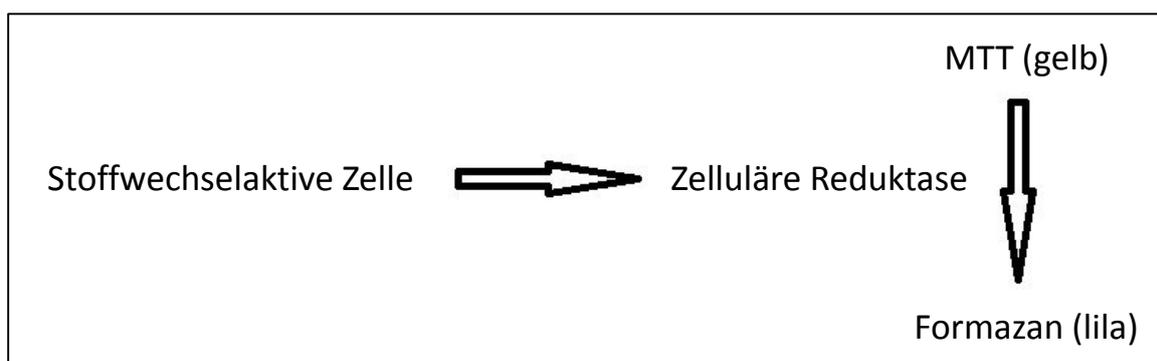


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Reaktionsabläufe bei Durchführung des CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay [101].

Zunächst wurden 5000 viable Zellen/50µl Kulturmedium/well auf 96-well Platten in den für die Zellen üblichen Zellkulturbedingungen für 24h, 48h und 72h kultiviert. Anschließend wurden den Zellen dann 15µl des mitgelieferten 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) zugegeben. Nach Inkubation für 4h bei 37°C wurden in jedes well der 96-well Platte 100µl der Solubilization Solution (100µl von 0.04M Salzsäure in Isopropanol) zugegeben. Nach Inkubation für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur konnte das Zellkulturmedium mit den zugegebenen Reagenzien durch Resuspendieren mit einer Pipette gut vermischt und der Farbumschlag bei 570 nm mit einem Photospektrometer gemessen werden. Die Hintergrundabsorption des Zellkulturmediums nach Zugabe der Stimuli wurde per „Leermessung“ desselbigen ohne Zellen bestimmt. Dieser Wert wurde von den jeweiligen Absorptionswerten der Stimulationsgruppen mit Zellen subtrahiert.

2.3.2. Zytotoxizitätsassay

Das *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* kam zum Ausschluss eines zytotoxischen Effekts durch die zugegebenen Stimuli zur Anwendung. Es basiert auf der Messung von beim Zelltod freigegebener Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellüberstand. Dieses katalysiert Laktat zu Pyruvat, wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Bei der durch Diaphorase katalysierten Reaktion von Tetrazolium zu Formazan wird NADH/H^+ wieder zu NAD^+ oxidiert. (Abbildung 9) Diese Reaktion ist kolorimetrisch per Photospektrometer messbar und lässt auf die Quantität von LDH schließen.

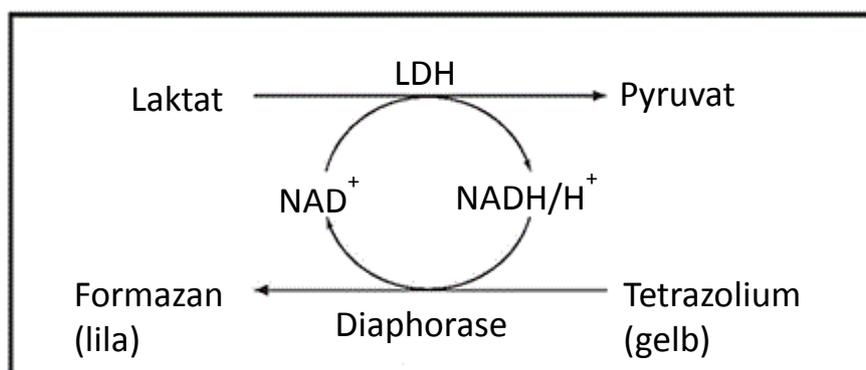


Abbildung 9: Schematisch Darstellung der Reaktionsabläufe des Cytotoxicity Detection Kits nach Zugabe von Diaphorase, NAD^+ , Laktat und Tetrazolium.

Das *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* wurde nach den Herstellerangaben von Roche durchgeführt. Nach Behandlung von 5000 Zellen/100µl Standardzellmedium/well in einer 96-well Platte wurde die Platte für 10min bei 250g zentrifugiert, um schwimmende Zellen zu pelletieren und somit aus dem Überstand zu entfernen. Vorsichtig wurde per Multiwellpipette der Zellüberstand in eine weitere 96-well Platte transferiert. Diesem wurde dann 100µl der gemischten Reaktionslösung (250µl der Diaphorase/NAD⁺ Lösung mit Iodotetrazoliumchlorid/Natriumlaktat vermischt) zugegeben und für 30min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend konnte per Photospektrometer bei 490nm die Absorption gemessen werden. Als Positivkontrolle wurde den Zellen 1% Triton X-100 in Zellkulturmedium zugegeben. Die Hintergrundabsorption des Zellkulturmediums zusammen mit den Stimuli wurde per Messung desselbigen ohne Zellen bestimmt. Dieser Wert wurde von den jeweiligen Absorptionswerten mit Zellen subtrahiert.

Die Berechnung der relativen Zytotoxizität der verschiedenen Zellkulturbedingungen erfolgte nach folgender Rechnung, wobei „Messung“ dem Wert der Absorption für den jeweiligen Stimulus, „Leermessung“ dem Wert der Absorption des Zellmediums mit Stimuli ohne Zellen und „Obere Kontrolle“ dem Wert der Absorption der behandelten Zellen mit 1% Triton X - 100 Lösung entspricht (Formel 2):

Formel 2: Formel zur Berechnung der relativen Zytotoxizität gemessen an der Positivkontrolle (1% Triton X-100).

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Messung} - \text{Leermessung}}{\text{Obere Kontrolle} - \text{Leermessung}} \times 100$$

2.4. Immunologische Methoden

2.4.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Analyse der Proteine in den Zellüberständen kam ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Anwendung. Der ELISA stellt ein immunologisches Nachweisverfahren dar, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht [102, 103]. Der Nachweis eines bestimmten Antigens gelingt hierbei durch ein Enzym, das an den Antikörper gekoppelt ist. Dieser bindet wiederum an das nachzuweisende Antigen. Dieses Enzym katalysiert einen Substratumsatz, welcher durch Farbumschlag quantitativ messbar ist.

Das in dieser Studie verwendete Verfahren entspricht einem Sandwich-ELISA. Hierbei bindet das Antigen an einen Antikörper (capture-Antikörper), der auf eine 96-well Platte aufgetragen wurde. Nach dem Auswaschen aller ungebundenen Proteinanteile von der 96-well Platte, erfolgt die Zugabe eines zweiten Antikörpers (detection-Antikörpers), an welchen das Enzym Merrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Bevor das Chromogen (TMB) zugegeben wird, erfolgt ein weiterer Waschvorgang. Das Enzym HRP setzt nun das Substrat TMB um und führt dadurch zu einem Farbumschlag. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure (H_2SO_4) beendet. Das Ausmaß des Farbumschlages kann photometrisch und im Vergleich mit einer Standardreihe gemessen werden und entspricht der Antigenkonzentration.

Muriner TGF- β 1 ELISA

Dieser ELISA wurde den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Zunächst wurden die Proben in die immunoreaktive Form gebracht. Hierzu wurde zu 0,5ml des zu untersuchenden Zellkulturüberstandes 0,1ml HCl (1M) zugegeben. Nach 10min Inkubationszeit wurde diese Lösung mit 0,1ml NaOH (1,2M)/HEPES (0,5M) neutralisiert. Der Capture-Antikörper des ELISA Kits wurde mit PBS auf eine Konzentration von 4,0 μ g/ml verdünnt und 0,1ml davon in die wells der 96-well Platte gebracht. Nach Inkubation bei Raumtemperatur Übernacht erfolgten drei Waschvorgänge mit Wash Buffer (0,05% Tween 20 in PBS). Anschließend wurde die Platte durch Aufbringen von 300 μ l Block Buffer per well und einstündiger Inkubation „geblockt“. Nach einem erneuten Waschvorgang (wie oben beschrieben)

konnten 0,1ml der „aktivierten“ Proben sowie der Standard an rekombinatem TGF- β 1 in einer Reihenverdünnung aufgetragen werden. Diese Platte wurde erneut versiegelt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie einem erneuten Waschvorgang unterzogen wurde. Danach wurden 0,1ml des Detection-Antikörpers aufgebracht und für zwei Stunden inkubiert. Es folgte ein vierter Waschvorgang und anschließendes Aufbringen von 0,1ml Streptavidin-HRP in die wells. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 0,1ml einer Lösung gleicher Anteile Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Tetramethylbenzidine (TMB) aufgebracht. Die nachfolgende Inkubation für 20min erfolgte in Dunkelheit und wurde terminiert durch Aufbringen von 50 μ l Stop Solution (2M H_2SO_4). Nun konnte das Ausmaß der Färbung per Photospektrometer bei 450nm gemessen werden. Zum Ausgleich von Messartefakten wurde eine weitere Messung bei 540nm von dem Messwert bei 450nm subtrahiert. Durch Vergleich mit den Reihenverdünnungen und Rückrechnung des Verdünnungsfaktors von 1,4 konnte auf die absolute Menge an TGF- β 1 in dem Zellüberstand geschlossen werden.

Humaner TGF- β 1 ELISA

Da der humane TGF- β 1 ELISA ebenso von R&D Systems bezogen wurde, glich sich das Versuchsprotokoll des humanen TGF- β 1 ELISAs mit dem des murinen TGF- β 1 ELISAs. In Bezug auf die verwendeten Substanzen unterschieden sie sich lediglich in dem Capture- und Detection-Antikörper.

2.4.2. Western-Blot

Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurde den Zellen in den 10cm Kulturschalen 300 μ l RIPA Puffer vermischt mit 12 μ l Protease-Inhibitor-Lösung zugegeben. Nach Inkubationszeit von 5min auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß transferiert. Dieses wurde für 10min bei 4°C und 8000g zentrifugiert und der Zellüberstand in ein weiteres Gefäß gegeben. Zur Proteinmessung wurde ein Bradford's assay durchgeführt.

Western-Blot

Der Western-Blot ist eine semiquantitative Proteinnachweistechnik, welche erstmals 1981 von Neal Burnette beschrieben wurde. [104] Sie entspricht einer Abwandlung der Southern-Blot Technik, welche dem Nachweis von DNA-Fragmenten dient und 1975 von Edwin Southern als Methode veröffentlicht wurde [105]. Bei beiden Methoden ging es um die Verwendung eines Löschpapiers, mit Hilfe dessen ein Abdruck der zuvor aufgetrennten DNA oder Proteine angefertigt wird. Diese können dann unter Verwendung verschiedener Methoden nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit kam ein Immunoblot zur Anwendung. Hierbei werden die Proteine zunächst per Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Danach wird ein primär-Antikörper zugegeben, welcher an das nachzuweisende Protein bindet. Ein sekundär-Antikörper, an welchen ein Enzym gekoppelt ist, bindet nach Zugabe im nächsten Schritt an das Fc-Fragment des primären-Antikörpers. Dieses Enzym katalysiert eine Farb- oder Chemolumineszenzreaktion, wodurch das Protein detektiert werden kann. Die Stärke der Proteinbande entspricht semiquantitativ der Menge des nachgewiesenen Proteins.

Nach der Messung der Proteinkonzentration wurden 50µg des Proteingemisches mit 4x SDS Ladepuffer vermischt. Dies wurde für 5min auf 95°C erhitzt bevor die Proteine in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF) übertragen wurde. Unspezifische Bindung wurde für zwei Stunden mit 5% Magermilchpulver in Tris-buffered saline (TBS) geblockt. Übernacht wurde die Membran bei 4°C nach Zugabe des primär-Antikörpers inkubiert. Nach dreimaliger Waschung am Folgetag mit TBS-T wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-konjugierten sekundär-Antikörper in TBS inkubiert. Nun wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend konnte die Membran mit einem „enhanced chemiluminescence system“ visualisiert werden. Zur Ladekontrolle wurde ein weiterer Blot desselben Gels angefertigt und mit einem β -Aktin Antikörper inkubiert. Das weitere Prozedere entsprach dem oben Beschriebenen.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. RNA Gewinnung

Die Ribonukleinsäure (RNA) Isolation wurde mittels *PureLink RNA Mini Kit* von Ambion nach dem Protokoll des Herstellers an einem RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt. Die murinen PECs wurden in - mit Kollagen beschichteten - 10cm Zellkulturschalen kultiviert; die humanen PECs hingegen in unbehandelten 6-well Platten. Nach Abschluss des Stimulationsexperimentes wurde das Zellkulturmedium entfernt und die adhärennten Zellen 3x mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurde den murinen PECs 600µl, den humanen PECs 300µl des im Kit mitgelieferten Lyse Puffer, versetzt mit 1% 2-Mercaptoethanol, zugegeben. Die adhärennten Zellen wurden dann mit einem Zellschaber vom Kulturschalenboden abgelöst und durch mehrfaches Resuspendieren mit einer Pipette lysiert bevor diese Suspension bei -80°C eingefroren oder direkt weiter prozessiert wurde. Im nächsten Schritt wurde den murinen PECs 600µl, den humanen PECs 300µl von 70% Ethanollösung (im Verhältnis 1:1 zu dem Lyse Puffer) zugegeben und das Zelllysate bei höchster Stufe für 30s auf einem Vortex vermischt. Anschließend wurde das gesamte Zelllysate auf die Filtrier-Säulen gebracht und für 30s bei 12000g zentrifugiert. Danach wurde zunächst 700µl des mitgelieferten RW1-Puffer auf die Säulen gebracht und bei 12000g für 30s zentrifugiert. Der gleiche Schritt wurde zweifach mit 500µl des mitgelieferten RW2-Puffers wiederholt. Das Filtrat aus jedem Schritt wurde in einem Mikroreaktionsgefäß gesammelt und nach jedem Schritt verworfen. Eine erneute Zentrifugation bei 12000g für 2 min erfolgte um die Filtrier-Säule zu trocknen. Danach wurde 30µl RNase freies Wasser auf die Filtrier-Säule aufgebracht und für eine Minute inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die Auslösung der RNA aus der Säule durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 12000g. Nun konnte die isolierte RNA bei -80°C gelagert oder direkt weiterbehandelt werden.

2.5.2. RNA Quantifizierung durch Spektrometrie

Um die Konzentration an RNA nach der RNA Isolation zu bestimmen, wurde die optische Dichte per Spektrometrie gemessen. Hierzu wurde 1 μ l der isolierten RNA Probe direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Durch die gemessene Ratio von 260nm zu 280nm konnte die Reinheit der RNA bestimmt werden. Es wurden lediglich Proben mit Werten zwischen 1,8 und 2,2 für die weitere Auswertung herangezogen. Aus der ermittelten Konzentration konnte später das Volumen der RNA Lösung berechnet werden, das zu 2 μ g komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben wurde.

2.5.3. Überprüfung der Reinheit der RNA durch Gel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten RNA wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 2 μ l der RNA in Lösung mit 5 μ l RNA-Laufpuffer vermischt und 15min bei 65°C und anschließend 2min auf Eis inkubiert. Der Laufpuffer wurde auf 2% Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und für 30min wurde eine Spannung von 90V angelegt. Anschließend konnten in einer Dunkelkammer unter UV-Licht die Banden dokumentiert werden. Deutliche, voneinander abgrenzbare Banden zeigen eine reine RNA an. (Abbildung 10)

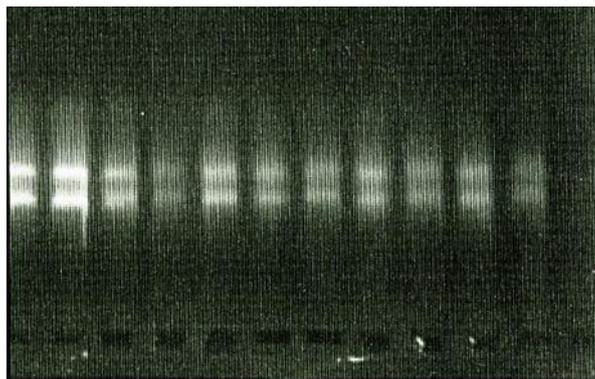


Abbildung 10: Gelelektrophorese der RNA Produkte. Zu sehen sind deutlich voneinander abgrenzbare Banden, welche eine reine RNA anzeigen.

2.5.4. Reverse Transkription der mRNA zu cDNA

Bereits durch die spektrometrische Messung und anschließende Berechnung war bestimmt worden, welches Volumen der RNA Lösung 2µg RNA enthält. Dieses wurde mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 13,2 µl aufgefüllt. Diese verdünnte RNA-Lösung wurde zunächst bei 65°C für 5min und anschließend für 5min auf Eis inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden zwei Reagenzmischungen angesetzt. Beide enthielten für eine Gesamtmenge von 6,8µl: 4µl Fc Puffer 5x, 0,4µl dNTPs 25mM, 1µl DTT, 0,25µl LinAcril (15µg/ml), 0,215µl Hexanucleotide und 0,5µl RNAsin. In der Gruppe der cDNA RT+ (reverse Transkriptase) wurde noch 0,435µl Superscript II zugegeben, während in der Gruppe der cDNA RT- die gleiche Menge RNase freies Wasser zugegeben wurde. Danach konnten für jede der beiden Gruppen 6,8µl der Reagenzmischung mit 13,2µl der RNA-Lösung (mit 2µg RNA) vermischt und für 90min bei 42°C und danach für 5min bei 85°C inkubiert werden. Die synthetisierte cDNA wurde direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.5.5. Real-time PCR

Die real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) ist eine sehr häufig angewandte Labormethode, welche auf der Polymerase Kettenreaktion beruht. Diese wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt, wofür er 1993 den Nobelpreis erhielt [106]. Bei der Polymerase Kettenreaktion geht es um eine Vervielfältigung von DNA in den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Amplifikation. Bei der Denaturierung (ca. 95°C) wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Bei dem Annealing (ca. 60°C) lagern sich Primer an die komplementären Einzelstränge von wo aus bei der Extension (ca. 72°C) die hitzeinsensitive DNA Polymerase mit der Synthese eines komplementären Stranges beginnt.

Die real-time PCR ist eine quantitative und qualitative Messmethode, welche während der Amplifikationsvorgänge in Echtzeit (= realtime) eine Quantifizierung der amplifizierten DNA erlaubt. Hierzu wurde bei dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet, welcher sich als interkalierender Farbstoff in die doppelsträngige DNA einlagert. Durch Bindung an die DNA steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes deutlich an, weshalb direkt proportional die gesteigerte Fluoreszenzintensität auf eine gesteigerte Anzahl an DNA

Doppelsträngen schließen lässt. Entscheidend für die Quantifizierung ist der „Threshold Wert“, bei welchem sich die Fluoreszenzintensität deutlich von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Für jede Probe wird der CT-Wert (Cycle Threshold) aufgezeichnet. Dieser entspricht der Anzahl an Zyklen, die benötigt werden um diesen Grenzwert zu überschreiten. Es wurden nur CT-Werte bis 35 für die Analyse herangezogen. Zur relativen Quantifizierung wurde das Housekeeping Gen 18s rRNA als endogenes Referenzgen, das in allen Proben gleichermaßen enthalten ist, herangezogen.

Nach 40 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hier werden die Proben langsam von 65°C bis zu 95°C erhitzt. Bei einer für die DNA Doppelstrangfragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang wodurch eine Änderung der Fluoreszenzintensität detektiert werden kann. Folglich kann mit Hilfe der Temperatur, bei welcher die Denaturierung gemessen wird auf das DNA Fragment rückgeschlossen werden, wodurch die Spezifität der Primerbindungen überprüft werden kann.

In dieser Arbeit wurde der Lightcycler 480 von Roche für die Durchführung der real-time PCR verwendet. Beide Gruppen der umgeschriebenen mRNA zu cDNA (RT+ und RT-) wurden zunächst 1:10 mit Diethyldicarbonat-behandeltem (DEPC) Wasser verdünnt. In jedes well der 96-well Platte wurde dann 10µl Mastermix mit SYBR Green I, 0,6µl des rechten und 0,6µl des linken Primers, 0,16µl der Taq Polymerase, 2µl der verdünnten cDNA RT+ oder cDNA RT- und 6,64µl DEPC-behandeltes Wasser zugegeben. Zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA wurde destilliertes Wasser als Negativprobe verwendet. Es wurden ausschließlich Proben mit negativem Ergebnis in der Negativkontrolle (destilliertes Wasser und cDNA RT-) zur Bewertung herangezogen. Anschließend wurde die Platte mit Abdeckfolie versiegelt und für zwei Minuten bei 4°C und 280g zentrifugiert. Die real-time PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt. (Tabelle 2)

Tabelle 2: Parameter des Lightcycler 480 bei der Durchführung der real-time PCR.

	Dauer	Temperatur (°C)	
Vorabdenaturierung	5min	95	
Denaturierung	15s	95	40x Wiederholung
Annealing	45s	60	
Extension	30s	72	
Schmelzkurve	5s	95	
	10min	schrittweise Steigerung von 65 -> 95	

2.6. Histopathologische Untersuchungen

2.6.1. Lichtmikroskopie

Nach Eingang der Proben wurde zunächst ein Teil des kortexnahen Endes der Gewebeprobe für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung entfernt. Das übrige Gewebe wird per Perjodsäure Schiff (PAS) Färbung aufbereitet. Zunächst wurden in dieser Arbeit die PAS gefärbten Gewebeproben lichtmikroskopisch untersucht.

Perjodsäure Schiff Färbung

Im ersten Schritt wurden die Proben hier für 5min in Perjodsäure Lösung (200ml destilliertes Wasser + 4g Perjodsäure) oxidiert. Anschließend wurden diese mit destilliertem Wasser gewaschen und darauffolgend für die Zeitdauer von 20min in Schiff-Reagenz inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang mit handwarmem Wasser wurde für 2min mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Objektträger für 5min ausgewaschen bevor sie unter Verwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in synthetischem Eindeckmedium (Pertex) eingedeckt wurden.

2.6.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein mikroskopisches Verfahren, das bereits 1932 beschrieben wurde [107]. Es stellt eine Betriebsart der Elektronenmikroskopie dar, die eine direkte Abbildung von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen ermöglicht.

Zunächst wurde zur Beurteilung per TEM nach Eingang des Biopsiematerials von dem Nierenbiopsischen Stanzylinder der kortexnahe Anteil des Zylinders (ca. 2mm) entfernt, bei 4°C in 6,25% Glutaraldehyd fixiert und bis zur weiteren Aufbereitung für die TEM gelagert.

Eponeinbettung

Nach dem Waschen mit Saccharosepuffer und destilliertem Wasser wurden die Proben für 2 Stunden in 2%iger Osmiumlösung inkubiert und im Anschluss mit 50% Aceton gespült. Danach wurden sie über eine aufsteigende Acetonreihe (70%, 90% und 100% Aceton) einer Aceton/EPON Lösung (gleiche Mengen 100% Aceton und EPON Lösung) zugeführt. Schließlich wurden die Proben in pure EPON-Lösung eingelegt bevor sie in der EPON Lösung in Gelatinekapseln eingebracht wurden und dort für 45min bei 42°C inkubierten. Als letzter Schritt erfolgte die Auspolymerisierung bei 80°C Übernacht.

Anfertigung der Semidünnschnitte

Als Voraussetzung für das Anfertigen der Ultradünnschnitte mussten zur Lokalisation der Glomeruli aus dem zu begutachtenden Gewebeareal Semidünnschnitte angefertigt werden. Hierfür wurde mit einem Skalpell aus dem Eponblock eine pyramidenförmige Probe (ca. 3mm x 3mm x 1mm) herausgeschnitten. Aus dieser Probe wurden wiederum per Mikrotom 1 µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend auf die Objektträger aufgebracht wurden.

Methylenblau-Azur II Färbung der Semidünnschnitte

Die am Objektträger angetrockneten Schnitte wurden bei 60°C für 2min in eine wässrige Methylenblau-, Borax- und Azur II-Lösung (zu jeweils 1%) eingelegt. Nachfolgend wurden sie mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und zur Begutachtung in Pertex eingedeckt.

Anfertigung und Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Per Ultramikrotom wurden von den fertigen EPON Blöcken etwa 40nm dicke Schnitte angefertigt und auf Kupfer-Grids aufgezogen. Danach wurden die Grids für 20min in einer gesättigten Uranylacetat-/Methanollösung (70%) inkubiert, bevor sie mit destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet wurden. Anschließend erfolgte für 5min eine Kontrastierung mit Bleicitratlösung. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser und der Lufttrocknung konnten die Proben im TEM begutachtet werden.

2.7. Retrospektive morphologische Analyse humaner Nierenbiopsien

Für die morphologische Analyse von humanem Biopsiematerial konnte auf das umfangreiche Archiv des pathologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität zugegriffen werden.

Nach folgenden Kriterien wurden Patienten in die Studie eingeschlossen:

- Alter: > 18 Jahre
- Außer einer arteriellen Hypertonie keine bekannte Systemerkrankung, mit nephrologischen Komplikationen
- DM Typ I oder Typ II, Diagnosestellung vor über fünf Jahren
- Einzige glomeruläre nephropathologische Auffälligkeit in Zusammenschau aller Befunde nach der Nierenbiopsie: DN
- Primärfixation in 6,25% Glutaraldehyd für TEM

Zur Datenbankrecherche wurden folgende Begriffe verwendet:

- Diabetes mellitus
- Diabetisch
- Eigenniere

Als Vergleichsgruppe wurde ebenso Nierengewebe erwachsener Patienten verwendet. Hierfür mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

- Alter: > 18 Jahre
- Nierengewebe aus gesunden Nierenbereichen von tumornephrektomierten Patienten
- Nierengewebe von Transplantatnieren ohne nephropathologische glomeruläre Auffälligkeiten

Zur Datenbankrecherche wurden hierfür folgende Begriffe verwendet:

- Tumor
- Tumornephrektomie
- Nephrektomie
- Transplantatniere

Die Anonymisierung entsprach den Empfehlungen der Ethikkommission der LMU.

Histopathologische Kriterien

Die Nierenbiopsie von Patienten mit DN wurden nach der Klassifikation von Thijs W. Cohen Tervaert beurteilt [108]. (Tabelle 3)

Tabelle 3: Pathologische Klassifikation der diabetischen Nephropathie nach Tervaert [108].

Klasse	Beschreibung	Einschlusskriterien
I	Geringgradige oder unspezifische lichtmikroskopische Veränderungen und verdickte GBM in der Transmissionselektronenmikroskopie	Biopsie erfüllt keine der Kriterien der Klassen II bis IV; GBM > 395nm bei weiblichen Patienten; GBM > 430nm bei männlichen Patienten; (wenn Patientenalter > 9 Jahre)
IIa	Leichtgradige mesangiale Expansion	Biopsie erfüllt nicht die Kriterien für die Klassen III oder IV, leichtgradige mesangiale Expansion in >25% des beurteilbaren Mesangiums
IIb	Ausgeprägte mesangiale Expansion	Biopsie erfüllt nicht die Kriterien für die Klassen III oder IV, starke mesangiale Expansion in >25% des beurteilbaren Mesangiums
III	Noduläre Sklerose (Kimmelstiel-Wilson Läsionen)	Biopsie erfüllt nicht die Kriterien für die Klasse IV, zumindest eine sichere Kimmelstiel-Wilson Läsion
IV	Fortgeschrittene diabetische Glomerulosklerose	Globale Glomerulosklerose in > 50% der Glomeruli + Läsionen der Klasse I und III

2.8. Statistische Methoden

Die Daten werden graphisch angezeigt als Mittelwerte. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um *standard errors of the mean* (SEM), welcher den Quotienten aus Standardabweichung und Quadratwurzel der Anzahl der Proben darstellt. Um einzelne Gruppen zu vergleichen wurde bei den Zellversuchen der gepaarte Student's t-test, im Vergleich der humanen Biopsien der ungepaarte Student's t-test angewandt. Waren die Gruppengrößen bei statistischem Vergleich im Faktor >1,5 unterschiedlich groß, so erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen durch Anwendung des approximativen Zweistichproben-Gaußtest mit vorherigem Levene-test zur Varianzanalyse. Bei den lichtmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Messungen wurde zur Bereinigung der Werte eine Boxplot-Berechnung durchgeführt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant bezeichnet. Es werden drei Abstufungen der statistischen Überprüfungen auf das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes angeben, welche durch Sterne markiert sind (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Dieser darf auch als solcher angenommen werden, wenn im Fließtext ein „signifikanter Unterschied“ genannt wird.

3. Ergebnisse

3.1. Stimulation parietaler Epithelzellen

Zunächst war es notwendig, den Einfluss der gewählten Stimuli auf die Proliferation und Zytotoxizität zu untersuchen. Für Mesangialzellen konnte z.B. ein proliferierender Effekt durch hyperglykämische Bedingungen in der Zellkultur nachgewiesen werden [109]. Auch für AGEs konnten bei anderen Zelltypen stimulierende Effekte auf die Proliferation nachgewiesen werden [110]. Letztlich wurde bisher jedoch kein Effekt der in dieser Arbeit verwendeten Stimuli (Glukose, AGEs und TGF- β 1) auf PECs beschrieben, so dass zunächst per Zytotoxizitätsassay ein zytotoxischer- und per Zellproliferationsassay ein proliferativer Effekt dieser Stimuli auf die PECs untersucht werden musste.

3.1.1. Zytotoxizität muriner parietaler Epithelzellen

Die murinen PECs wurden zunächst, wie unter Material und Methoden beschrieben, 14 Tage bei 37° C zur Differenzierung kultiviert. Danach wurden jeweils Triplikate der Zellen in acht verschiedene Gruppen eingeteilt und per Wechsel des Mediums für 48h oder 72h in Medium ohne FBS, Medium mit 0,5% FBS, Medium mit 5% FBS oder Medium mit 5% FBS und 5mM Glukose, 30mM Glukose, 100 μ g/ml AGE, 5ng/ml TGF- β 1 oder 1% Triton X-100 kultiviert. Triton X-100 diente als Positivkontrolle. Die einzelnen Behandlungsgruppen wurden mit dem Wert der Zytotoxizität der Zellen in Medium mit 5% FBS verglichen. Auf die Darstellung kürzerer Zeiträume konnte verzichtet werden, da es sich bei LDH um ein stabiles Enzym handelt, welches im Falle unterschiedlicher Toxizität der einzelnen Stimuli im Medium akkumuliert und dann nach 48h nachweisbar ist.

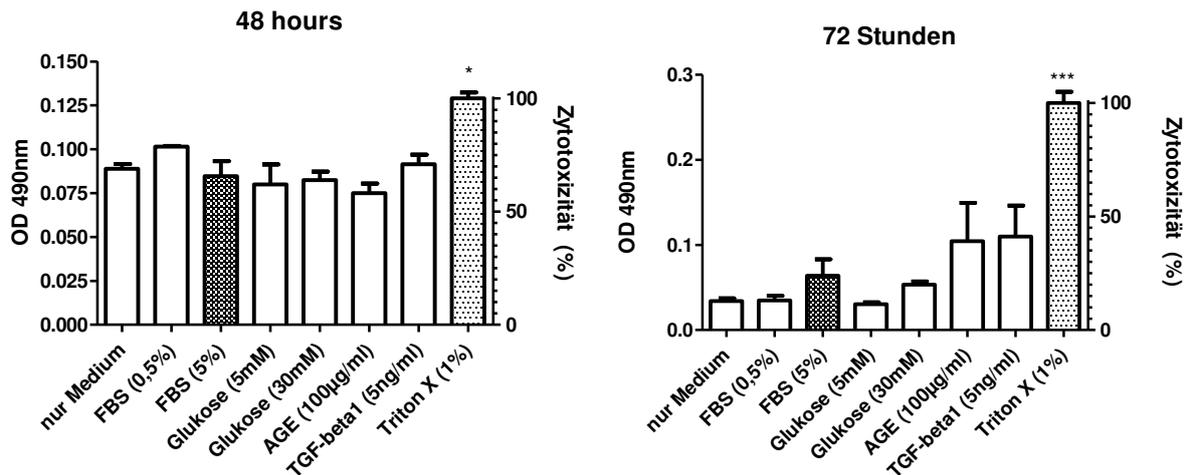


Abbildung 11: Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays. Optische Dichte des Zytotoxizitätsassays (LDH) nach Stimulation der murinen parietalen Epithelzelle mit den abgebildeten Stimulanzien in 5% FBS Medium (ausgenommen der Stimulation in Medium ohne FBS oder 0,5 % FBS) nach 48h und 72h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Medium mit 5% FBS.

Lediglich nach Behandlung mit 1% Triton X-100 konnte nach 48h und verstärkt nach 72h signifikant erhöhte LDH-Spiegel nachgewiesen werden. Im Vergleich der anderen Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe (Medium mit 5% FBS) ergab sich kein signifikanter Unterschied in der LDH Konzentration (Abbildung 11) oder berechneten Zytotoxizität nach 48h oder 72h. (Tabelle 4)

Tabelle 4: Berechnung der Zytotoxizität in Prozent (siehe Material und Methoden) nach Anwendung des Zytotoxizitätsassays (LDH) und Messung der optischen Dichte nach Stimulation für 48h und 72h.

Zytotoxizität nach 48h (%)		Zytotoxizität nach 72h (%)	
Nur Medium	68,9	Nur Medium	12,8
FBS (0,5%)	78,9	FBS (0,5%)	13
FBS (5%)	65,6	FBS (5%)	23,8
Glukose (5mM)	62	Glukose (5mM)	11,3
Glukose (30mM)	63,9	Glukose (30mM)	20
AGE (100µg/ml)	58,2	AGE (100µg/ml)	39,1
TGF-β1 (5ng/ml)	71	TGF-β1 (5ng/ml)	41,2
Triton X (1%)	100	Triton X (1%)	100

3.1.2. Proliferation muriner parietaler Epithelzellen

In einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde nun die Proliferation der murinen PECs nach Behandlung mit den verschiedenen Stimulantien untersucht. Hierbei wurden erneut jeweils Triplikate der Zellkulturschalen in sieben verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Zellen wurden für 24h, 48h oder 72h in Medium ohne FBS, Medium mit 0,5% FBS, Medium mit 5% FBS oder Medium mit 0,5% FBS und 5mM Glukose, 30mM Glukose, 100µg/ml AGE oder 5ng/ml TGF-β1 kultiviert. Unterschiedliche Konzentrationen an FBS in Zellkulturmedium stellten die Positiv-, sowie Negativkontrolle dar, da gut bekannt ist, dass die Proliferation der mPECs von der Konzentration an FBS abhängig ist. Zellkulturmedium ohne FBS diente als Negativkontrolle und Zellkulturmedium versetzt mit 5% FBS als Positivkontrolle. Alle Stimulantien wurden in Medium mit 0,5% FBS auf die Zellen gebracht, da bei dieser Konzentration von keinem starken Proliferationsreiz durch FBS ausgegangen werden kann, die Zellen aber ausreichend Nutrition für eine mögliche Proliferation zur Verfügung hatten. Der statistische Vergleich erfolgte daher gegen die Behandlungsgruppe mit Medium mit 0,5% FBS. Zum Zeitpunkt 24h unterschied sich keine der Behandlungsgruppen signifikant von der Kontrollgruppe. Nach 48h war die Proliferationsrate der murinen PECs durch Behandlung mit 30mM Glukose signifikant gesteigert. Eine signifikant verminderte Proliferation zeigte sich nur nach Behandlung mit 100µg/ml AGE nach 72h. (Abbildung 12)

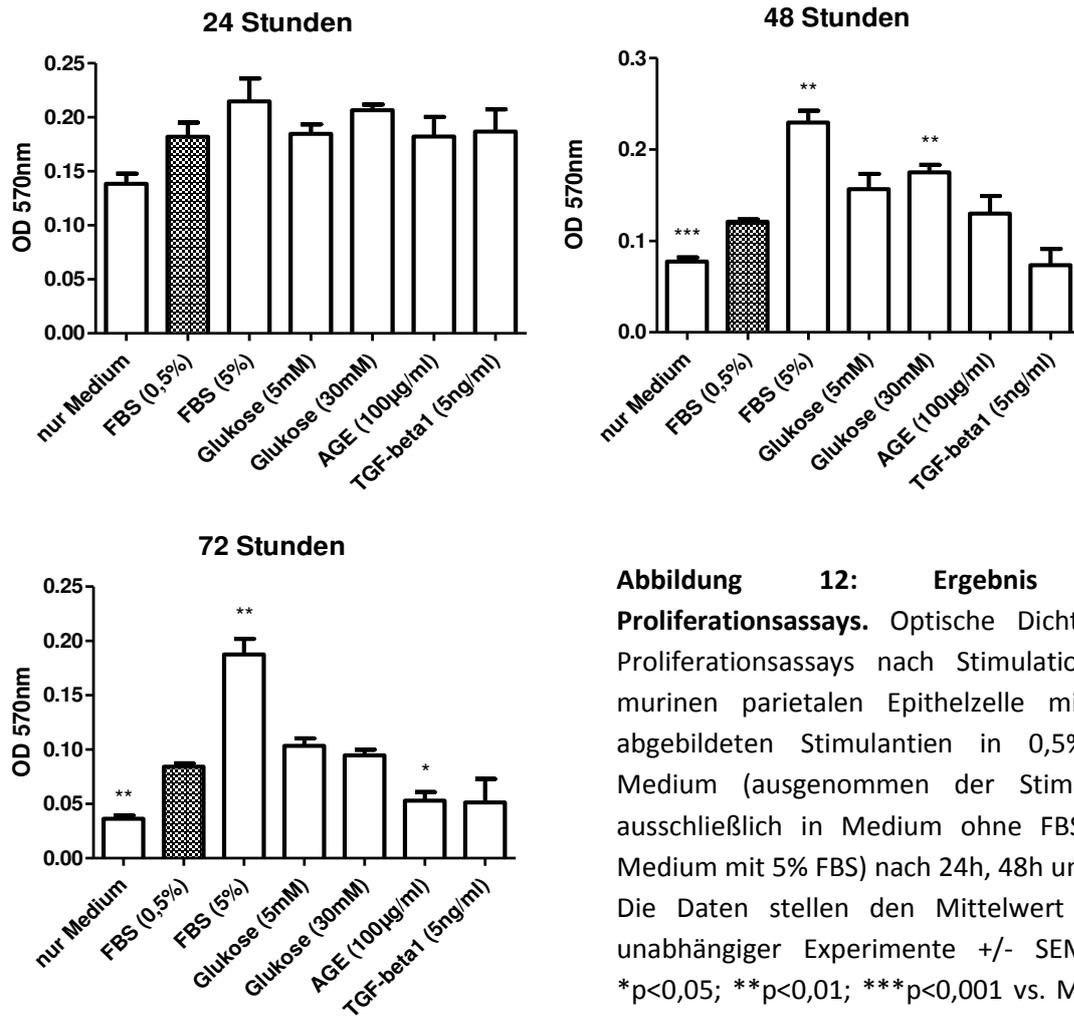


Abbildung 12: Ergebnis des Proliferationsassays. Optische Dichte des Proliferationsassays nach Stimulation der murinen parietalen Epithelzelle mit den abgebildeten Stimulantien in 0,5% FBS Medium (ausgenommen der Stimulation ausschließlich in Medium ohne FBS oder Medium mit 5% FBS) nach 24h, 48h und 72h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Medium mit 0,5% FBS.

3.1.3. Aktivierung der parietalen Epithelzelle (CD44)

Um die Aktivierung der PECs nach Stimulation mit Glukose, AGEs und TGF- β 1 zu testen, wurde eine real-time PCR zur Quantifizierung der Expression von CD44 in den murinen und humanen PECs durchgeführt. Hier wurden die Zellen in Triplikaten für 6h, 24h oder 48h mit 30mM Glukose, 100µg/ml AGE oder 5ng/ml TGF- β 1 stimuliert.

Bei den **murinen PECs** ergab sich ausschließlich nach Behandlung mit TGF- β 1 nach 24h eine signifikant erhöhte Expression von CD44 im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Stimulantien. (Abbildung 13)

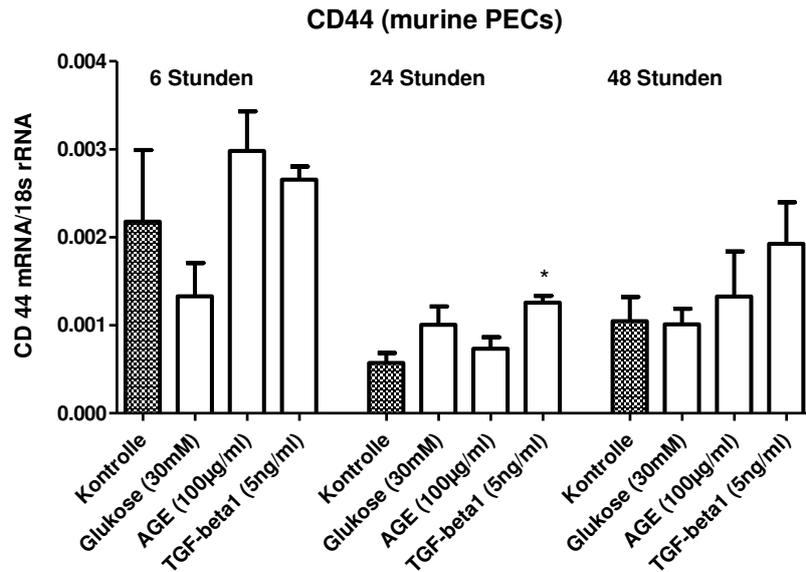


Abbildung 13: Expressionsanalyse von CD44 in murinen parietalen Epithelzellen. Expression von CD44 nach Stimulation für 6h, 24h und 48h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Medium mit 0,5% FBS.

Anders verhielt sich die Genexpression von CD44 im gleichen Versuchsaufbau bei den **humanen PECs**. Auch hier war ein signifikanter Unterschied nach Behandlung mit TGF- β 1 nach 24h messbar. Die Expression von CD44 zeigte sich hier jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. (Abbildung 14)

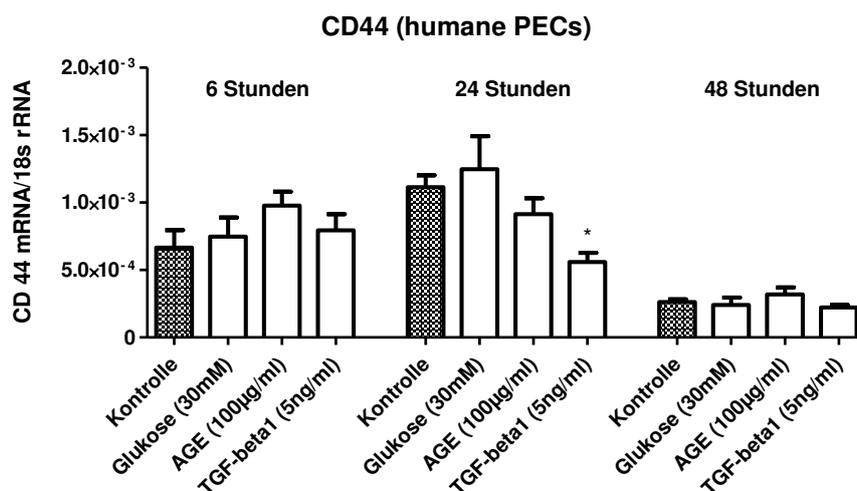


Abbildung 14: Expressionsanalyse von CD44 in humanen parietalen Epithelzellen. Expression von CD44 nach Stimulation für 6h, 24h und 48h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Medium mit 0,5% FBS.

3.1.4. Einfluss von TGF- β 1 auf die parietale Epithelzelle

Genexpression von TGF- β 1

Die Quantifizierung der Genexpression von TGF- β 1 erfolgte ebenfalls per real-time PCR. Hier wurden erneut murine und humane PECs für 6h, 24h oder 48h in Triplikaten mit 30mM Glukose, 100 μ g/ml AGE oder 5ng/ml TGF- β 1 stimuliert.

Für die **murinen PECs** konnte nach Behandlung mit TGF- β 1 nach 6h eine signifikant höhere Expression von TGF- β 1 gezeigt werden. Alle anderen Behandlungsgruppen wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression von TGF- β 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. (Abbildung 15, Tabelle 5) Der Befund einer erhöhten Expression von TGF- β 1 nach Behandlung mit TGF- β 1 kann nur durch eine positive Feedbackschleife erklärt werden.

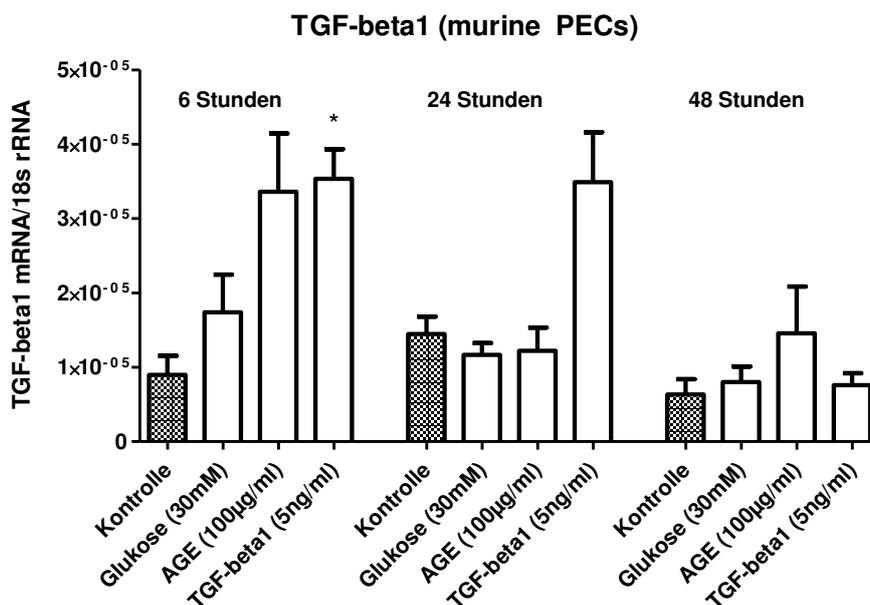


Abbildung 15: Expressionsanalyse von TGF- β 1 in murinen parietalen Epithelzellen. Expression von TGF- β 1 nach Stimulation für 6h, 24h und 48h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Medium mit 0,5% FBS.

Tabelle 5: Auflistung der Mittelwerte der drei unabhängigen Experimenten mit gesamtem Mittelwert der Expression von TGF- β 1 nach Stimulation für 6h, 24h und 48h in murinen parietalen Epithelzellen (wie in Abbildung 15 dargestellt) und Angabe des zweiseitigen, gepaarten t-tests der Behandlungsgruppen vs. der Kontrollgruppe.

		Behandlungsgruppe (Behandlung für 6h)			
		Kontrolle	AGE	Glukose	TGF- β 1
TGF- β 1 mRNA / 18s rRNA	Mittelwert 1. Experiment	6,28E-06	4,84E-05	1,35E-05	3,11E-05
	Mittelwert 2. Experiment	6,53E-06	3,07E-05	2,74E-05	4,33E-05
	Mittelwert 3. Experiment	1,41E-05	2,17E-05	1,13E-05	3,17E-05
	Mittelwert gesamt	8,97E-06	3,36E-05	1,74E-05	3,54E-05
t-test (Behandlungsgruppe vs. Kontrollgruppe)			0,132	0,344	0,042

		Behandlungsgruppe (Behandlung für 24h)			
		Kontrolle	AGE	Glukose	TGF- β 1
TGF- β 1 mRNA / 18s rRNA	Mittelwert 1. Experiment	1,21E-05	1,32E-05	1,47E-05	2,61E-05
	Mittelwert 2. Experiment	1,68E-05	1,70E-05	1,07E-05	3,05E-05
	Mittelwert 3. Experiment	1,38E-05	6,46E-06	9,56E-06	4,81E-05
	Mittelwert gesamt	1,42E-05	1,22E-05	1,17E-05	3,49E-05
t-test (Behandlungsgruppe vs. Kontrollgruppe)			0,532	0,436	0,093

		Behandlungsgruppe (Behandlung für 48h)			
		Kontrolle	AGE	Glukose	TGF- β 1
TGF- β 1 mRNA / 18s rRNA	Mittelwert 1. Experiment	5,47E-06	8,15E-06	4,41E-06	8,12E-06
	Mittelwert 2. Experiment	1,02E-05	2,71E-05	1,17E-05	4,60E-06
	Mittelwert 3. Experiment	3,34E-06	8,44E-06	7,93E-06	1,01E-05
	Mittelwert gesamt	6,35E-06	1,46E-05	8,01E-06	7,61E-06
t-test (Behandlungsgruppe vs. Kontrollgruppe)			0,202	0,417	0,764

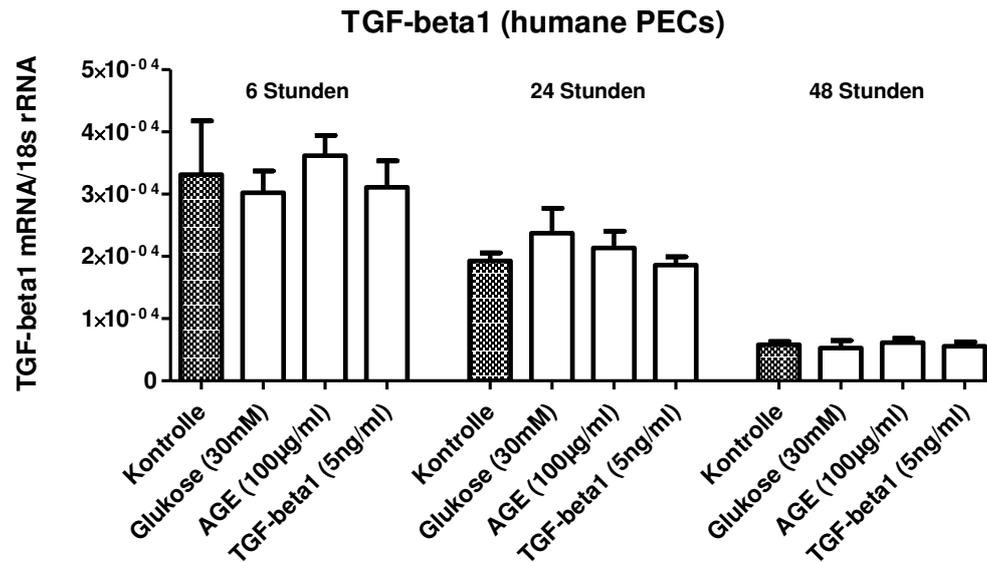


Abbildung 16: Expressionsanalyse von TGF-β1 in humanen parietalen Epithelzellen. Expression von TGF-β1 nach Stimulation für 6h, 24h und 48h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Medium mit 0,5% FBS.

Bei den **humanen PECs** waren die bei den murinen PECs festgestellten Unterschiede nicht replizierbar. In keiner der Behandlungsgruppen kam es zu den verschiedenen Zeitpunkten zu einem signifikanten Unterschied in der Expression von TGF-β1 im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Abbildung 16)

Quantitativer Nachweis der Proteinsynthese von TGF- β 1

Die bereits auf Genebene untersuchten Expressionsunterschiede von TGF- β 1 sollten per ELISA aus dem Zellüberstand auch auf Proteinebene untersucht werden. Die Behandlung der **murinen PECs** mit Glukose ergab nach 24h und 48h eine signifikant geringere Synthese und Sekretion von TGF- β 1 in den Zellüberstand, welche im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Genexpressionsanalyse für TGF- β 1 steht. Eine Hochregulation der Expression von TGF- β 1 nach Behandlung mit AGEs konnte auf Proteinebene nach 24h und signifikant nach 48h bestätigt werden. Durch Abgleich mit der Standardkurve konnte die absolute Konzentration von TGF- β 1 bestimmt werden, welche nach Stimulation für 24h mit 30mM Glukose 6,03 pg/ml, nach Stimulation für 48h mit 30mM Glukose 9,37pg/ml und nach Stimulation für 48h mit 100 μ g/ml AGE 22,3 pg/ml betrug. (Abbildung 17)

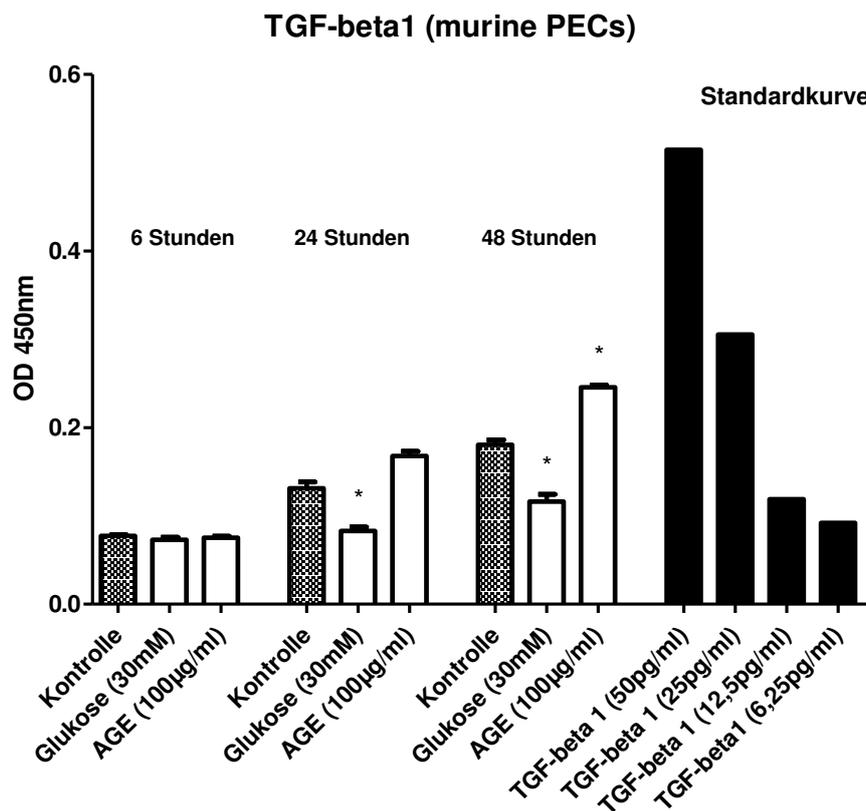


Abbildung 17: ELISA zum Nachweis von TGF- β 1 aus dem Zellüberstand muriner parietaler Epithelzellen. Optische Dichte des TGF- β 1 ELISA nach Stimulation mit 30mM Glukose oder 100 μ g/ml AGEs für 6h, 24h und 48h. Die Standardkurve entspricht nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls einer definierten Menge an zugegebenem TGF- β 1 zur absoluten Quantifizierung von TGF- β 1. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Medium mit 5% FBS.

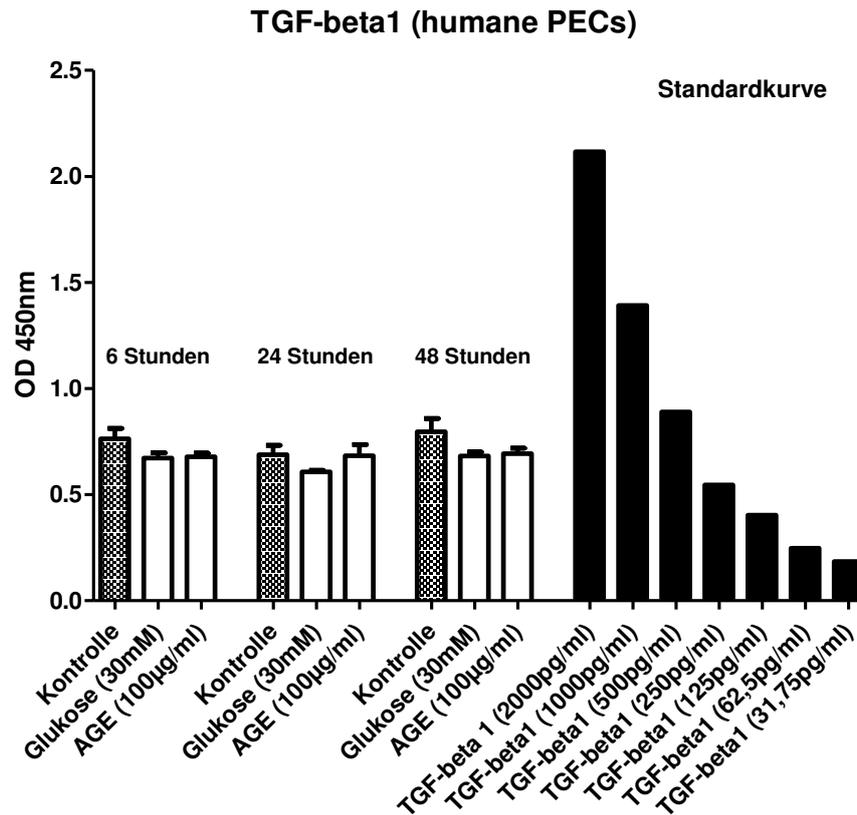


Abbildung 18: ELISA zum Nachweis von TGF-β1 aus dem Zellüberstand humaner parietaler Epithelzellen. Optische Dichte des TGF-β1 ELISA nach Stimulation mit 30mM Glukose oder 100 µg/ml AGEs für 6h, 24h und 48h. Die Standardkurve entspricht nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls einer definierten Menge an zugegebenem TGF-β1 zur absoluten Quantifizierung von TGF-β1. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Medium mit 5% FBS.

Der ELISA zum Nachweis von TGF-β1 im Zellüberstand der **humanen PECs** nach Stimulation mit 30mM Glukose oder 100µg/ml AGEs bestätigte das Ergebnis der Genexpressionsanalyse. Es konnten keine Unterschiede in der Synthese von TGF-β1 in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 6h, 24h oder 48h festgestellt werden. Durch Abgleich mit der Standardkurve konnte die absolute Konzentration von TGF-β1 bestimmt werden, welche in allen Behandlungsgruppen bei ca. 400 pg/ml lag. (Abbildung 18)

3.1.5. Transkription von Genen der Bowman'schen Kapsel

Die Durchführung der Versuche zu den Expressionsanalysen der Gene der extrazellulären Matrix und der BK erfolgten äquivalent zu den vorherigen Expressionsanalysen. Murine und humane PECs wurden für 6h, 24h und 48h mit 30mM Glukose, 100µg/ml AGE oder 5ng/ml TGF-β1 stimuliert. Alle im Folgenden beschriebenen Genexpressionen fielen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant aus.

Murine parietale Epithelzellen

Nach Behandlung mit **Glukose** kam es bei keiner untersuchten mRNA zu einer signifikanten Änderung des Expressionsniveaus im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Behandlung mit **AGE** für 6h kam es bei fast allen Kollagenen zu einer Herunterregulation, welche für die Kollagene IV α 1, α 2, α 3 und α 5 signifikant ausfiel. Lediglich Kollagen IV α 6 zeigte keine Änderung nach 6h im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 24h blieb das Expressionsniveau in dieser Behandlungsgruppe auf dem Niveau der Kontrollgruppe, wohingegen sich nach 48h ein diverseres Bild darstellte. Hier kam es für Kollagen IV α 1 zu einer verminderten Expression. Bei den restlichen Kollagenen wurde keine Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 48h beobachtet. Die Behandlung mit **TGF-β1** erbrachte nach 6h eine Hochregulation der Expression von Kollagen IV α 4. Nach 24h waren Kollagen I α 1, sowie die Kollagene IV α 3 und α 4 verstärkt exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt waren bei gleicher Behandlung die Expression der Kollagene IV α 5 und α 6 herunterreguliert. Zum Zeitpunkt 48h kam es für Kollagen IV α 6 zu einer Herunterregulation der Expression.

Im Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte kann festgestellt werden, dass sich v.a. die signifikanten Unterschiede nach 24h zum Zeitpunkt 48h und ebenso die signifikanten Veränderungen nach 48h bereits zum Zeitpunkt 24h andeuten. Die mehrfach beobachtete Herunterregulation nach 6h nach Behandlung mit AGE konnte nach 24h nicht mehr repliziert werden. Hier ist von einem bereits nach 6h eintretendem und ebenso schnell abklingendem Effekt auszugehen. (Abbildung 19) Tabelle 6 gibt eine Übersicht der Änderungen in der Genexpression der untersuchten Gene nach Simulation mit Glukose, AGEs und TGF-β1 in den murinen und humanen PECs.

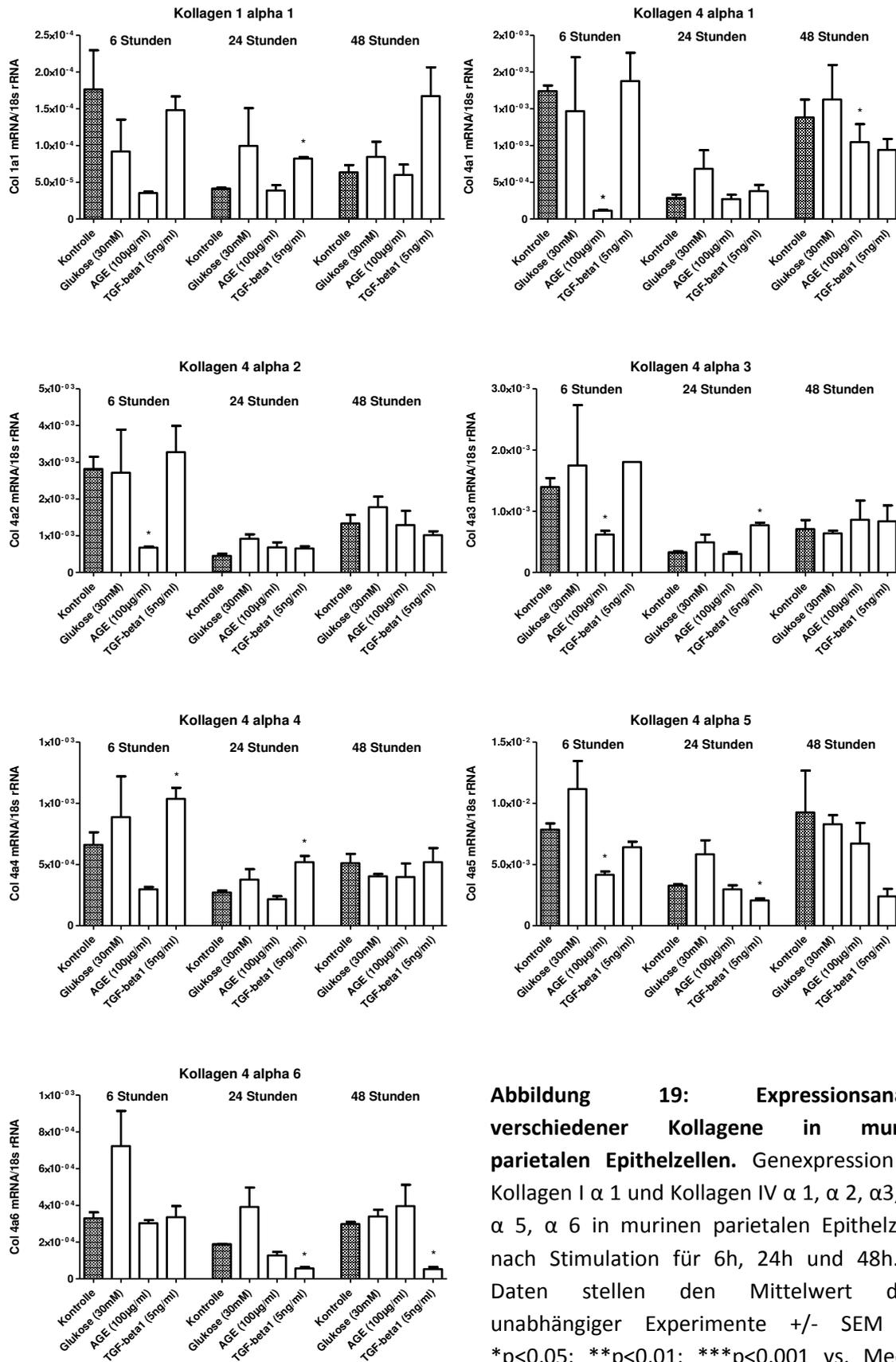


Abbildung 19: Expressionsanalyse verschiedener Kollagene in murinen parietalen Epithelzellen. Genexpression von Kollagen I α 1 und Kollagen IV α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6 in murinen parietalen Epithelzellen nach Stimulation für 6h, 24h und 48h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Medium mit 0,5% FBS.

Humane parietale Epithelzellen

Auch nach Simulation der humanen PECs mit **Glukose** kam es zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer signifikanten Veränderung der Expression der Kollagene. Nach Behandlung mit **AGEs** war die Expression von Kollagen I α 1 und der Kollagene IV α 2, α 4 und α 6 nach 6h signifikant erhöht. Zusätzlich zeigte sich hier auch die Expression von Kollagen IV α 2 nach 24h und die Expression von Kollagen IV α 4 nach 48h erhöht. **TGF- β 1** stellte neben AGEs einen starken Stimulus für die gesteigerte Hochregulation der verschiedenen Kollagene dar. Kollagen I α 1 zeigte sich zu allen Zeitpunkten hochreguliert. Nach 6h war zusätzlich die Expression von Kollagen IV α 1 und nach 24h die Expression von Kollagen IV α 1 und α 4 gesteigert. Einzig auf die Expression von Kollagen IV α 5 hatte TGF- β 1 nach 24h einen negativen Effekt.

Betrachtet man die unterschiedlichen Zeitpunkte, so führte die Stimulation mit AGE hauptsächlich nach 6h (Kollagen I α 1 und IV α 2, α 4 und α 6) und die Stimulation mit TGF- β 1 hauptsächlich nach 24h (Kollagen I α 1, Kollagen IV α 1, α 4 und α 5) zu einer Änderung des Expressionsniveaus. (Abbildung 20) Tabelle 6 gibt eine Übersicht der Änderungen in der Genexpression der untersuchten Gene nach Simulation mit Glukose, AGEs und TGF- β 1 in den murinen und humanen PECs.

Die Auswertung der real-time PCR von Kollagen IV α 3 ergab eine insgesamt schwache Expression auf gleichem Niveau wie die RT- Werte (Crossing – Point bei ca. 34 Zyklen) und konnte somit nicht in die Analyse einhergehen.

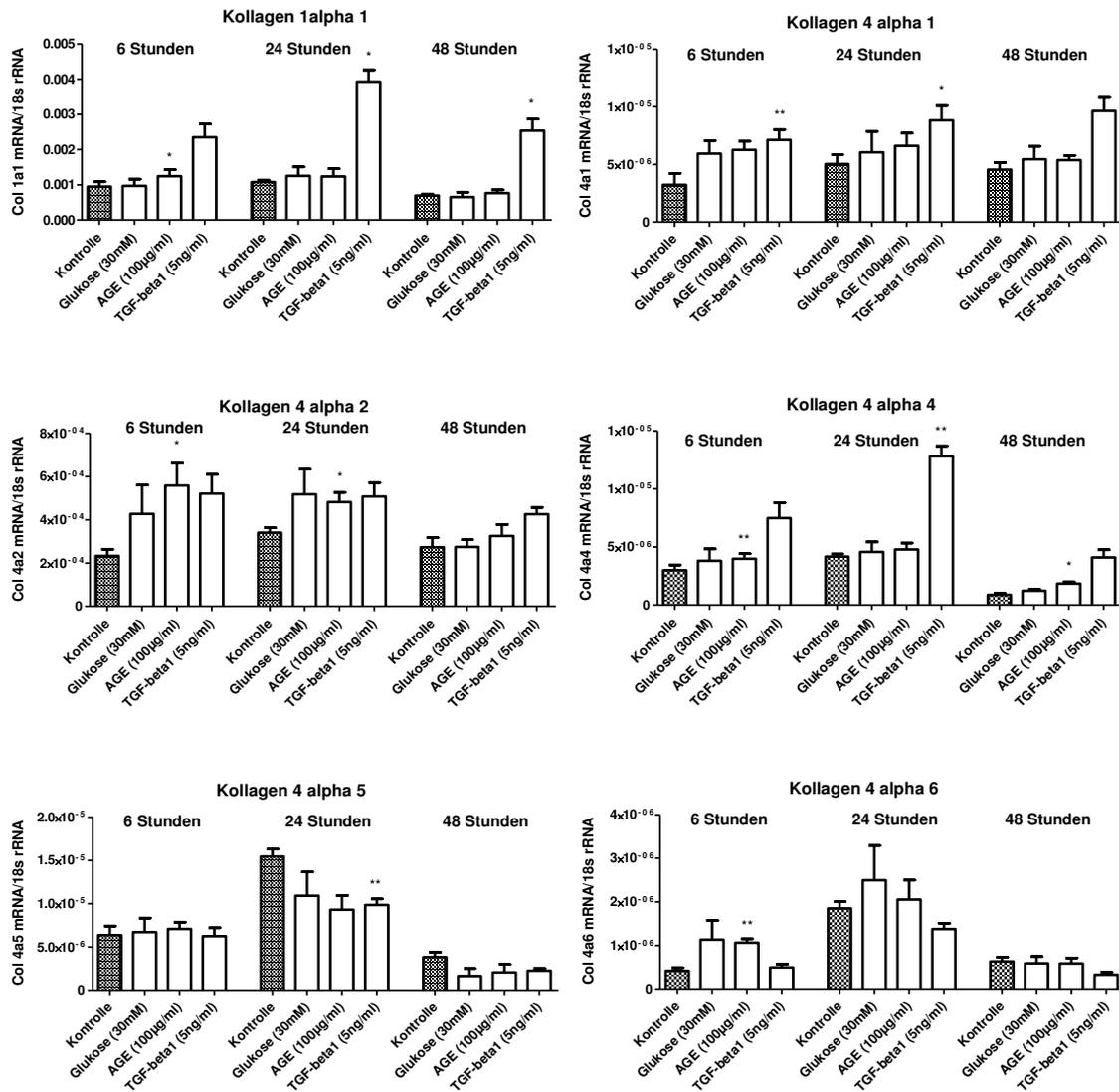


Abbildung 20: Expressionsanalyse verschiedener Kollagene in humanen parietalen Epithelzellen. Genexpression von Kollagen I α 1 und Kollagen IV α 1, α 2, α 4, α 5, α 6 in humanen parietalen Epithelzellen nach Stimulation für 6h, 24h und 48h. Die Daten stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente +/- SEM dar. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. Medium mit 0,5% FBS.

Tabelle 6: Genexpressionsänderungen nach Stimulation mit Glukose, AGEs oder TGF-β1.

	Murine PECs			Humane PECs		
	Glukose	AGE	TGF-β1	Glukose	AGE	TGF-β1
CD44			↑			↓
TGF-β1			↑			
Kollagen I α 1			↑	↑		↑ ↑
Kollagen IV α 1		↓ ↓				↑ ↑
Kollagen IV α 2		↓		↑ ↑		
Kollagen IV α 3		↓	↑	n.a.	n.a.	n.a.
Kollagen IV α 4			↑ ↑	↑ ↑		↑
Kollagen IV α 5		↓	↓			↓
Kollagen IV α 6			↓ ↓	↑		

Dargestellt sind die Änderungen der Genexpressionen von CD44, TGF-β1, Kollagen I α 1, Kollagen IV α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6 zu den Zeitpunkten 6h, 24h und 48h in den murinen und humanen parietalen Epithelzellen. Die Felder mit hellgrüner Schattierung geben die in ihrer Transkription untersuchten Gene an. Hellblau hinterlegt sind die zugefügten Stimulantien. Die Lokalisation und Farbe der Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Regulationsänderungen an. Blaue Pfeile deuten auf Änderungen nach 6h, grüne Pfeile auf Änderungen nach 24h und rote Pfeile auf Änderungen nach 48h hin. Stehen die Pfeile linksbündig bedeutet dies eine Änderung nach 6h, mittige Pfeile geben Änderungen nach 24h an und rechtsbündige Pfeile bedeuten Änderungen nach 48h.

3.1.6. Semiquantitativer Nachweis von Kollagen IV in humanen parietalen Epithelzellen

Nachdem der Effekt der Stimuli auf die Expression der Kollagene auf Transkriptionsniveau untersucht worden war, wurde bei diesem Experiment die Translation von Kollagen IV in den humanen PECs untersucht. Hierzu wurde ein Antikörper verwendet, der unabhängig von der α-Kette Kollagen IV detektiert. Bei diesem Experiment wurden die humanen PECs erneut mit Glukose, AGEs und TGF-β1 für 24h und 48h stimuliert. Hier ergab sich eine deutliche Verdickung der Banden nach Behandlung der humanen PECs mit Glukose und TGF-β1, sowie am stärksten nach Stimulation mit AGEs zu beiden Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Abbildung 21 und 23) Die Gesamtmenge an produziertem Kollagen IV war nach 48h in allen Gruppen größer als nach 24h. Die dargestellten Banden erschienen auf Höhe der 220 kDa Bande des Proteinmarkers. (Abbildung 21) Zur Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet, welches keine Mengenunterschiede in der Lademenge zeigte. (Abbildung 22).

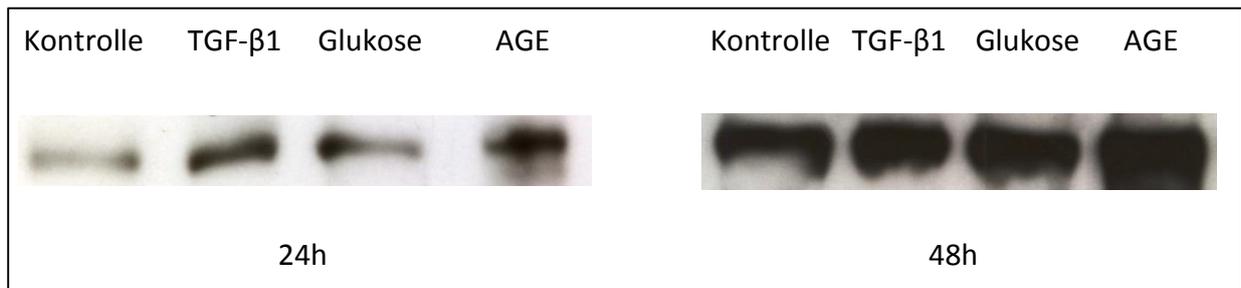


Abbildung 21: Western-Blot zum Nachweis von Kollagen IV in humanen PECs nach Stimulation für 24h oder 48h. Die abgebildeten Banden des Antikörpers gegen humanes Kollagen IV lagen auf Höhe der erwarteten 220kDa und zeigen einen Anstieg der Bandendicke nach Behandlung mit Glukose, AGE und TGF- β 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Stimulation für 24h und 48h.

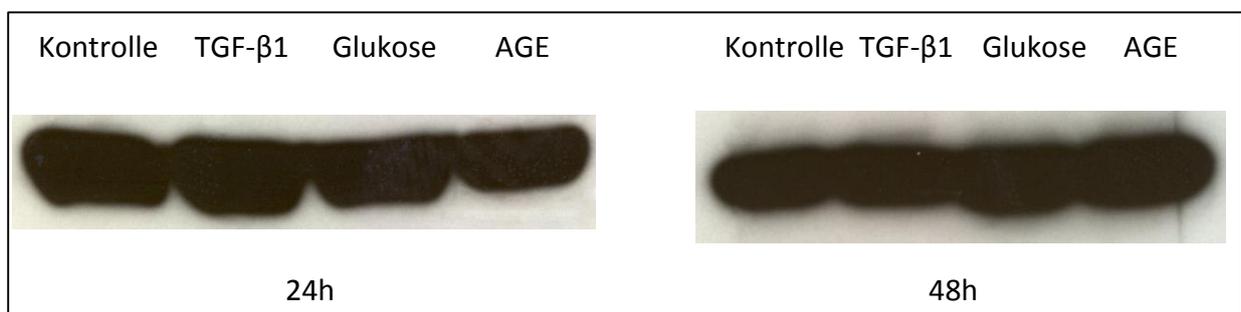


Abbildung 22: Western-Blot zum Nachweis von β -Aktin in humanen PECs nach Stimulation für 24h oder 48h. Die abgebildeten Banden des Antikörpers gegen humanes β -Aktin lagen auf Höhe der erwarteten 42kDa und zeigten keine Mengenunterschiede in der Lademenge.

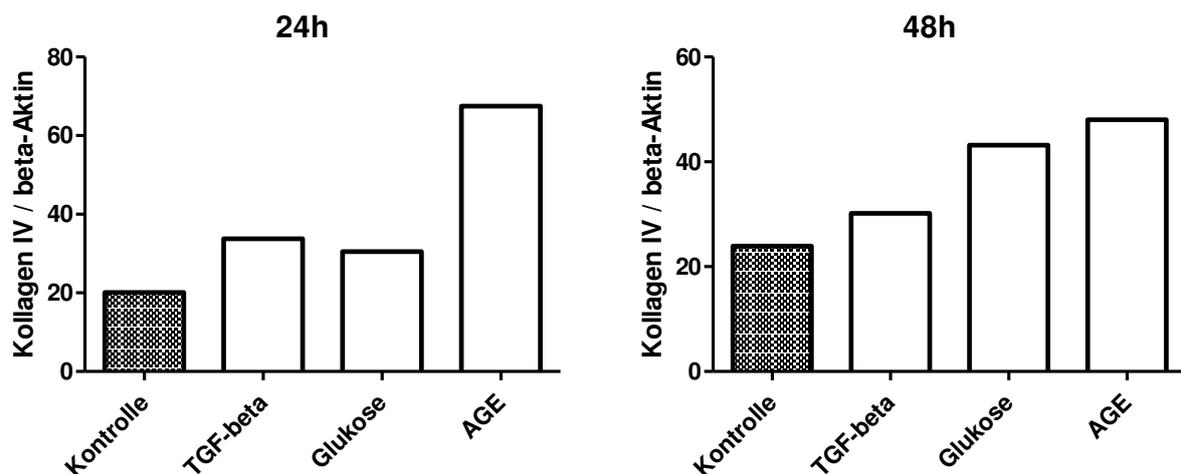


Abbildung 23: Quantitativer Vergleich der Expressionslevel von Kollagen IV im Vergleich mit β -Aktin nach 24h und 48h. Die Behandlung mit AGE führt zu einer deutlichen Verdickung der Bandenstärke von Kollagen IV, während die Behandlung mit TGF- β 1 und Glukose zu verschiedenen Ausmaßen die verstärkte Expression von Kollagen IV nach 24h und 48h induzieren. Abgebildet sind die Messungen der Bandenstärken im Vergleich zu β -Aktin des unter Abbildung 21 und 22 dargestellten Western-Blots.

3.2. Nierenbiopsien von Patienten mit diabetischer Nephropathie

Für die Interpretation der Vermessung der BK und der Beurteilung der PECs war es notwendig, zunächst die PAS Färbungen der Paraffinschnitte nach den histopathologischen Kriterien der DN zu beurteilen [108]. (Tabelle 8) Insgesamt konnten fünf Nierenbiopsien und eine Obduktionsgewebeprobe eines verstorbenen Patienten mit DN analysiert werden. Alle Patienten waren in Erwachsenenalter und hatten einen langjährig (>5 Jahre) bestehenden DM Typ II. Die Proben stammten von vier männlichen und zwei weiblichen Patienten. Das Durchschnittsalter betrug 65,5 Jahre. Alle Veränderungen in den Präparaten entsprachen denen einer DN passend zu den Symptomen der Patienten (erhoben aus den ausgefüllten pathologischen Untersuchungsanträgen zu den Nierenbiopsien der Patienten). Zur Vermessung der BK wurden lediglich Glomeruli mit einem Durchmesser von >100µm herangezogen. Hierdurch konnten Dickenänderungen der BK durch tangentielles Anschneiden der Glomeruli ausgeschlossen werden. Die statistische Bereinigung der Messungen erfolgte per Boxplot-Berechnungen. (Abbildung 37 und 46) Die nachfolgende Tabelle fasst die Messungen zusammen. (Tabelle 7)

Tabelle 7: Übersicht der begutachteten und vermessenen Nierenbiopsien.

Patientennummer	Geschlecht	Alter	Anzahl der vermessbaren Glomeruli pro Biopsie	Stadium DN	Anzahl Messungen in PAS-Färbung vor Boxplot-Bereinigung	Anzahl Messungen in PAS-Färbung nach Boxplot-Bereinigung	Anzahl Messungen per TEM vor Boxplot-Bereinigung	Anzahl Messungen per TEM nach Boxplot-Bereinigung
1	m	62	4	Ila	382	356	42	39
2	m	72	2	Ila	68	62	56	55
3	m	75	6	Ila	266	256	61	59
4	w	72	3	IIb	165	163	198	193
5	w	49	3	III	113	108	95	93
6	m	63	5	IV	300	286	239	235
7	w	56	7	-	554	539	93	93
8	m	61	2	-	135	126	34	34
9	m	30	2	-	49	48	160	156
10	w	77	6	-	352	330	133	129
11	na	na	5	-	261	249	626	604
12	w	37	7	-	466	453	70	70

3.2.1. Klassifizierung der diabetischen Nephropathie

Die Beurteilung der Nierenbiopsien und Klassifikation der DN erfolgte nach T.W. Tervaert [108]. Im Stadium I der DN liegt lediglich eine Verdickung der GBM über 395nm bei weiblichen und über 430nm bei männlichen Patienten vor. Das Stadium II umfasst eine leichte (Stadium IIa) und ausgeprägte (Stadium IIb) mesangiale Expansion in über 25% des beurteilbaren Mesangiums. Im Stadium III liegen Kimmelstiel-Wilson Läsionen, bzw. eine noduläre Glomerulosklerose vor. Bei fortgeschrittener diabetischen Glomerulosklerose wird das Stadium IV klassifiziert, wenn alle Kriterien von Stadium I-III vorhanden sind und zusätzlich eine globale Glomerulosklerose in über 50% der Glomeruli besteht. Von den sechs Patienten litten drei Patienten an einer DN Stadium IIa, ein Patient an einer DN Stadium III und ein Patient an einer DN Stadium IV. Die folgenden Abbildungen zeigen glomeruläre Veränderungen in den Nierenbiopsien von Patienten mit DN in der PAS Färbung. (Abbildung 24 – 29)

Tabelle 8 Pathologische Klassifizierung der Nierenbiopsien mit diabetischer Nephropathie (nach Tervaert [108])

<i>Patientennummer</i>	1	2	3	4	5	6
Glomeruläre Basalmembran: Frauen > 395nm; Männer > 430nm	x	x	x	x	x	x
Mesangiale Expansion > 25%, aber mehr Kapillarlumen als Mesangium	x	x	x			
Mesangiale Expansion > 25%, aber mehr Mesangium als Kapillarlumen				x	x	x
Noduläre Sklerose (Kimmelstiel-Wilson Knoten)					x	x
Globale Glomerulosklerose bei >50% der Glomeruli						x
Stadium der diabetischen Nephropathie	IIa	IIa	IIa	IIb	III	IV

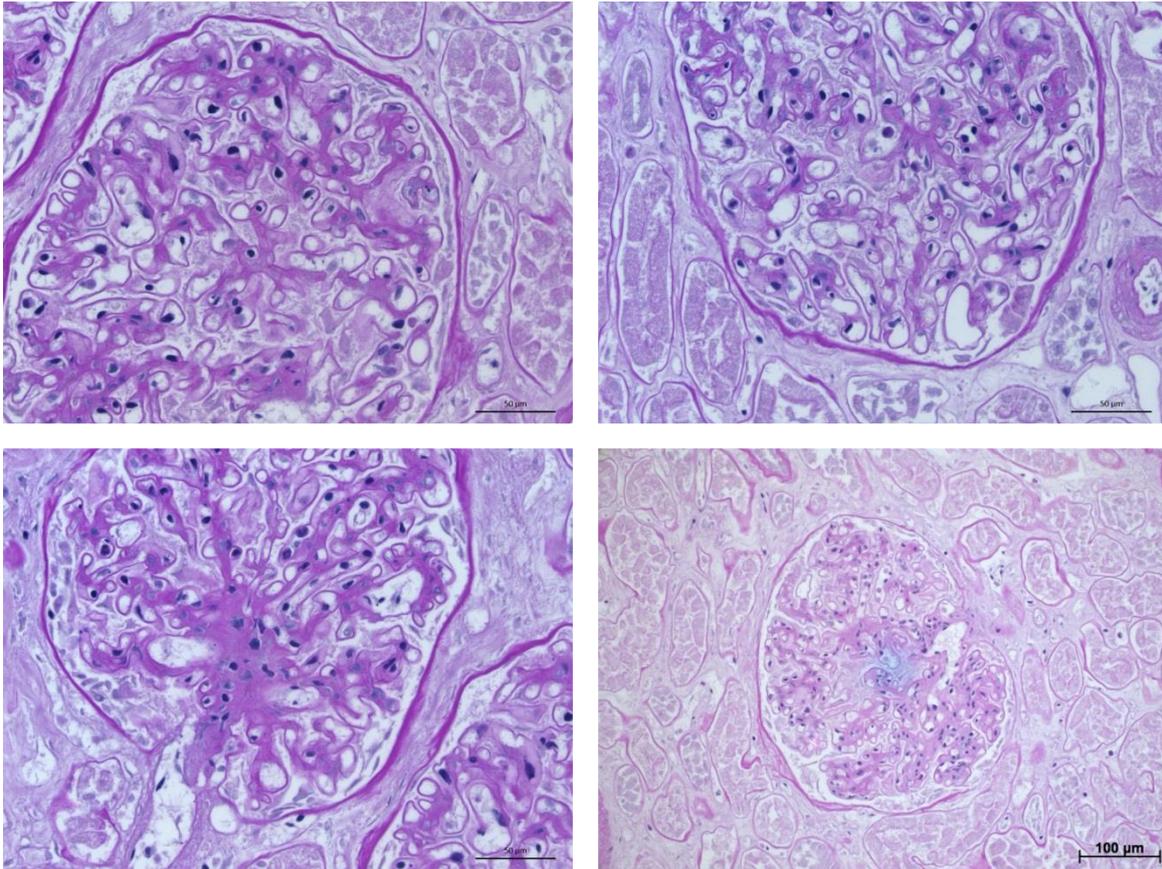


Abbildung 24: PAS Färbung der Gewebeprobe von Patient 1 (DN IIa). Histologischer Schnitt der Gewebeprobe der Niere von Patient 1 (DN IIa) in der PAS Färbung bei 400x Vergrößerung.

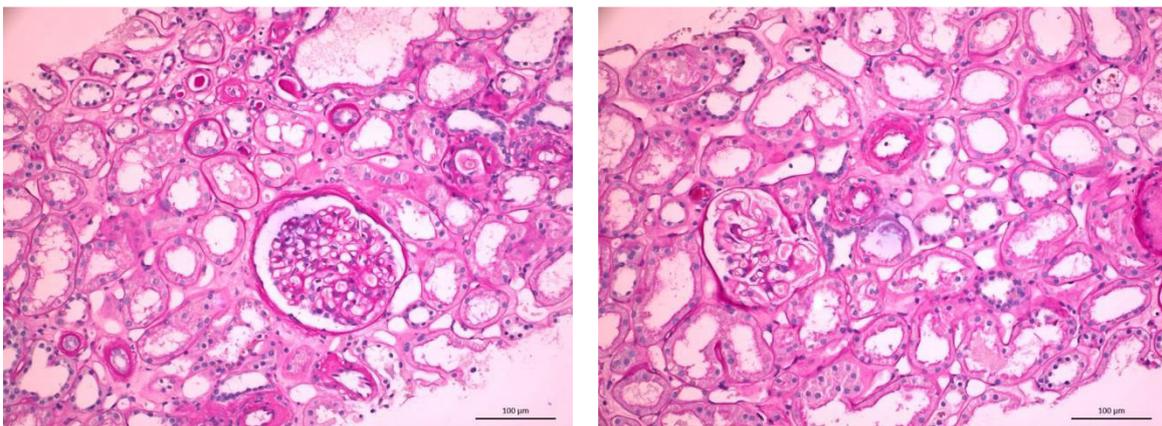


Abbildung 25: PAS Färbung der Nierenbiopsie von Patient 2 (DN IIa). Histologischer Schnitt der Nierenbiopsie von Patient 2 (DN IIa) in der PAS Färbung bei 200x Vergrößerung.

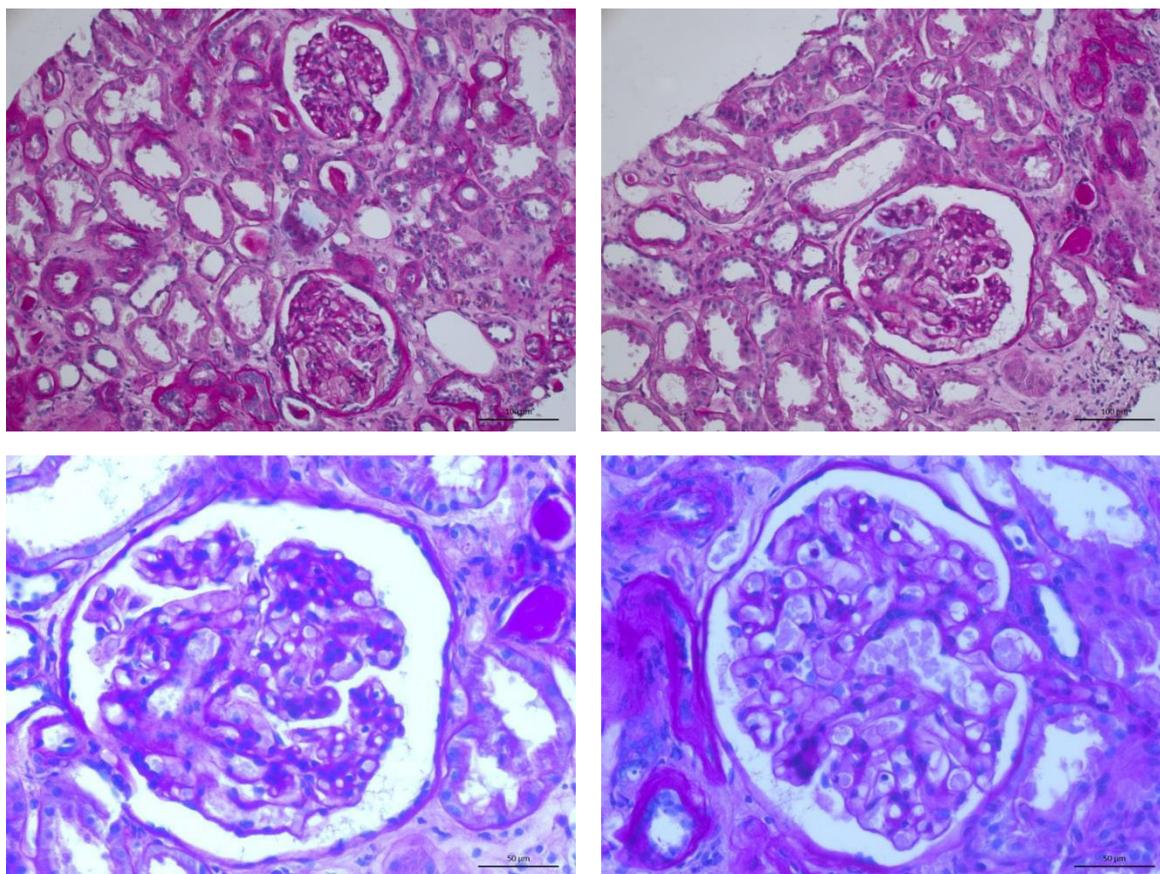


Abbildung 26: PAS Färbung der Nierenbiopsie von Patient 3 (DN IIa). Histologischer Schnitt der Nierenbiopsie von Patient 3 (DN IIa) in der PAS Färbung. Obere Reihe: 200x Vergrößerung. Untere Reihe: 400x Vergrößerung.

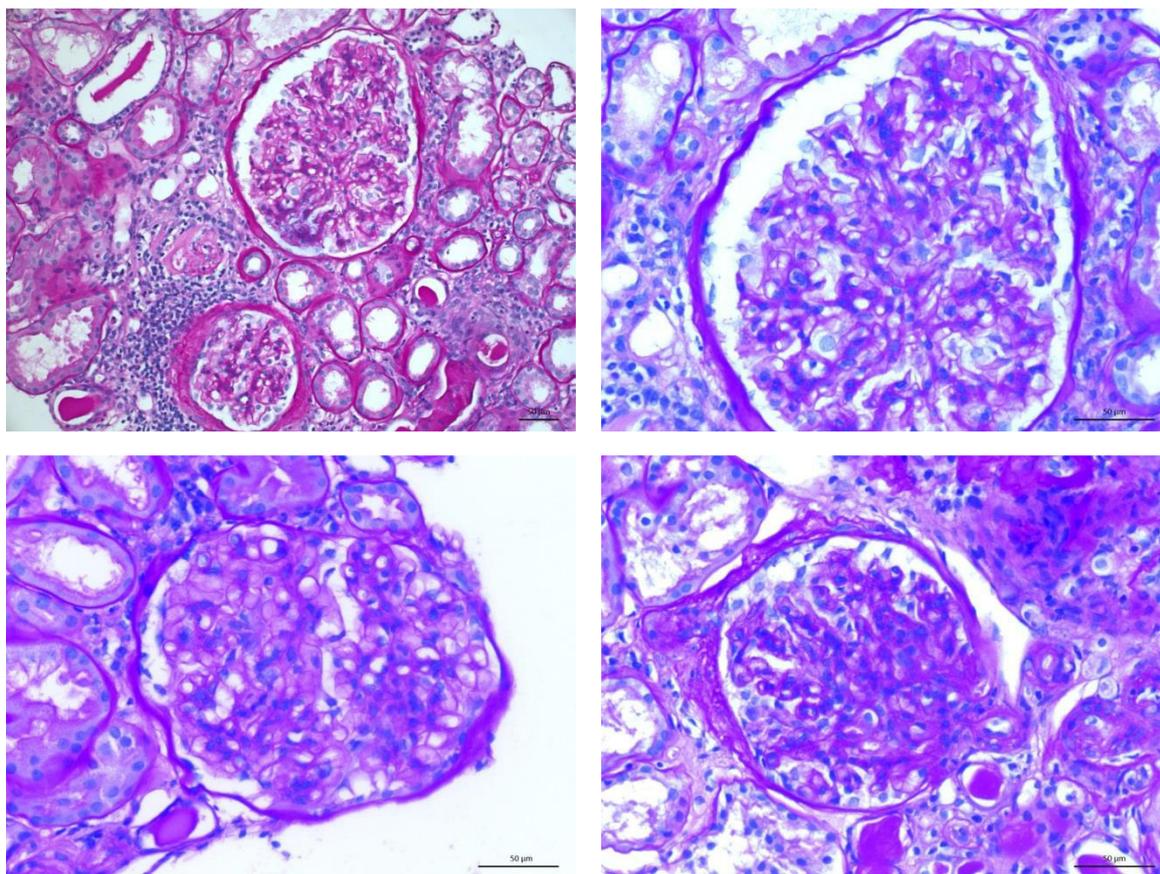


Abbildung 27: PAS Färbung der Nierenbiopsie von Patient 4 (DN IIb). Histologischer Schnitt der Nierenbiopsie von Patient 4 (DN IIb) in der PAS Färbung. Bild oben links: 200x Vergrößerung. Bild oben rechts und untere Bildreihe: 400x Vergrößerung.

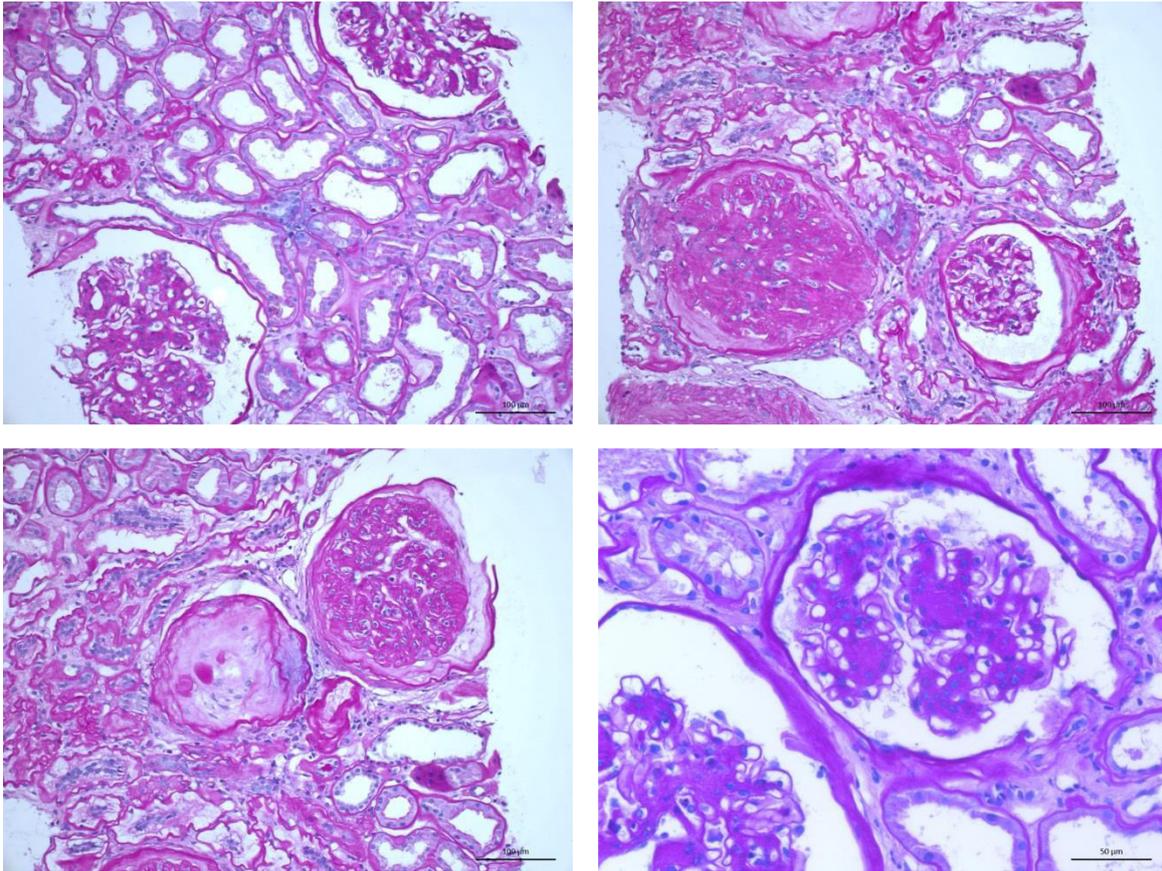


Abbildung 28: PAS Färbung der Nierenbiopsie von Patient 5 (DN III). Histologischer Schnitt der Nierenbiopsie von Patient 5 (DN III) in der PAS Färbung. Obere Bildreihe und Bild unten links: 200x Vergrößerung. Bild unten rechts: 400x Vergrößerung.

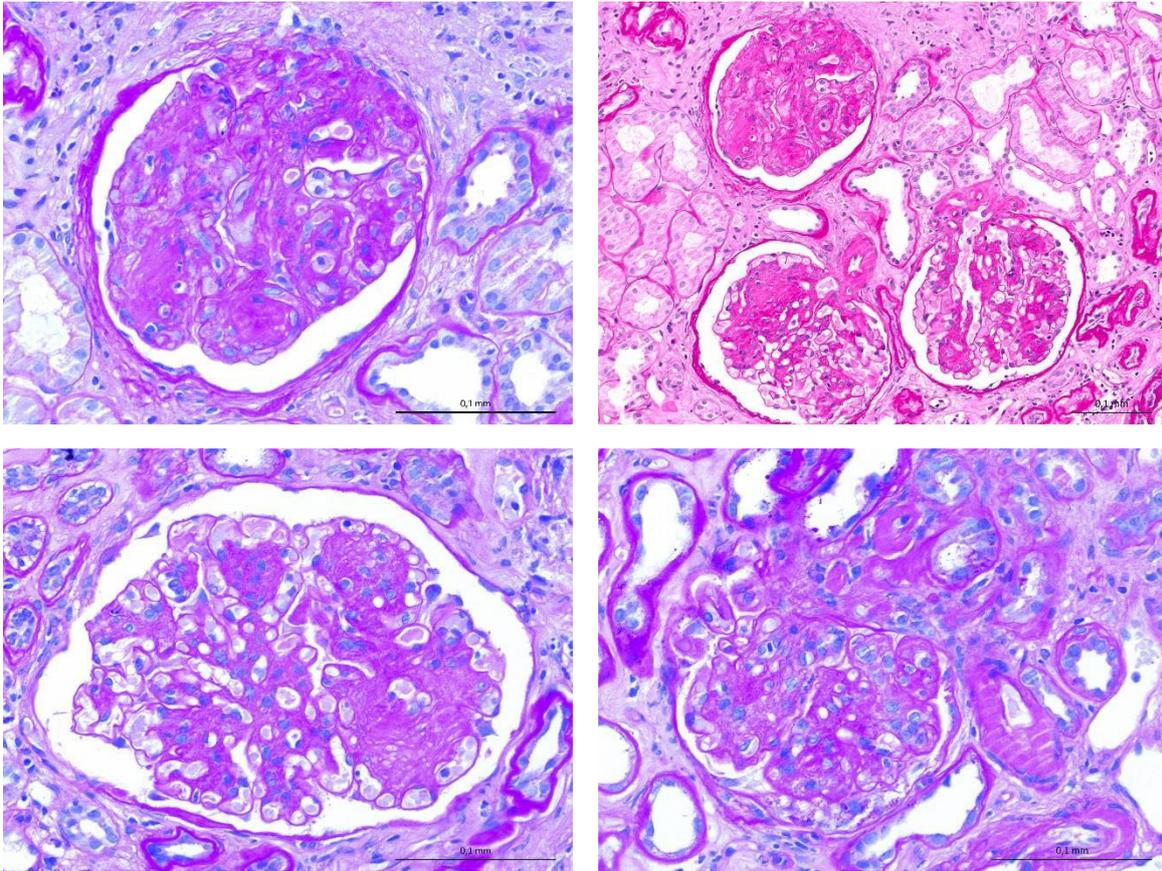


Abbildung 29: PAS Färbung der Nierenbiopsie von Patient 6 (DN IV). Histologischer Schnitt der Nierenbiopsie von Patient 6 (DN IV) in der PAS Färbung. Obere Bildreihe und Bild unten links: 400x Vergrößerung. Bild unten rechts: 200x Vergrößerung.

3.2.2. Aktivierung der parietalen Epithelzelle

Initial wurde der Aktivierungsgrad der PECs per Genexpressionsanalyse von CD44 untersucht. Zusätzlich wurden nun per TEM ultrastrukturelle Veränderungen der Zellkerne von PECs dokumentiert um auch morphologisch die Aktivierung der PECs zu charakterisieren. Dazu wurden die Durchmesser der Zellkerne der PECs gemessen und mit Angaben in der Literatur verglichen [111]. Außerdem erfolgte die Beurteilung des Chromatins und Einteilung in Heterochromatin und Euchromatin. (Tabelle 9) Euchromatine und vergrößerte Nuclei sind Kennzeichen aktivierter PECs [35].

Nachfolgend sind alle transmissionselektronenmikroskopisch vermessenen Zellkerne der PECs von Patienten mit DN (Abbildung 30 - Abbildung 33) und eine repräsentative Auswahl an Aufnahmen der Vergleichsgruppe (Abbildung 34) dargestellt.

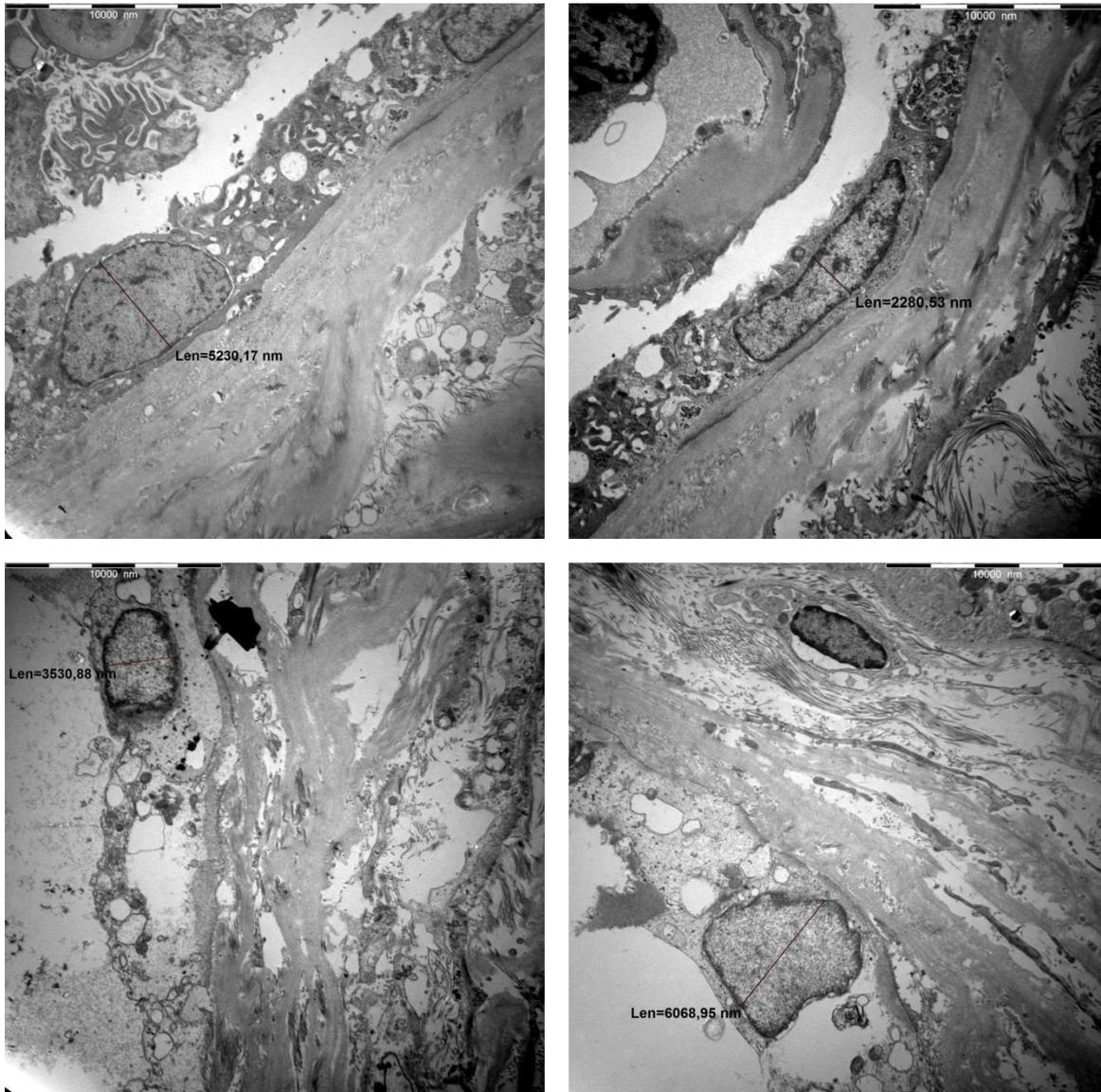


Abbildung 30: Ultrastruktur der parietalen Epithelzellen von Patient 3 (DN IIa). Abgebildet sind euchromatine Nuclei in drei der vier dokumentierten PECs. Die euchromatinen Nuclei haben einen Durchmesser von $> 3,5\mu\text{m}$. Dargestellt sind Messwerte in nm bei 1250 x Vergrößerung.

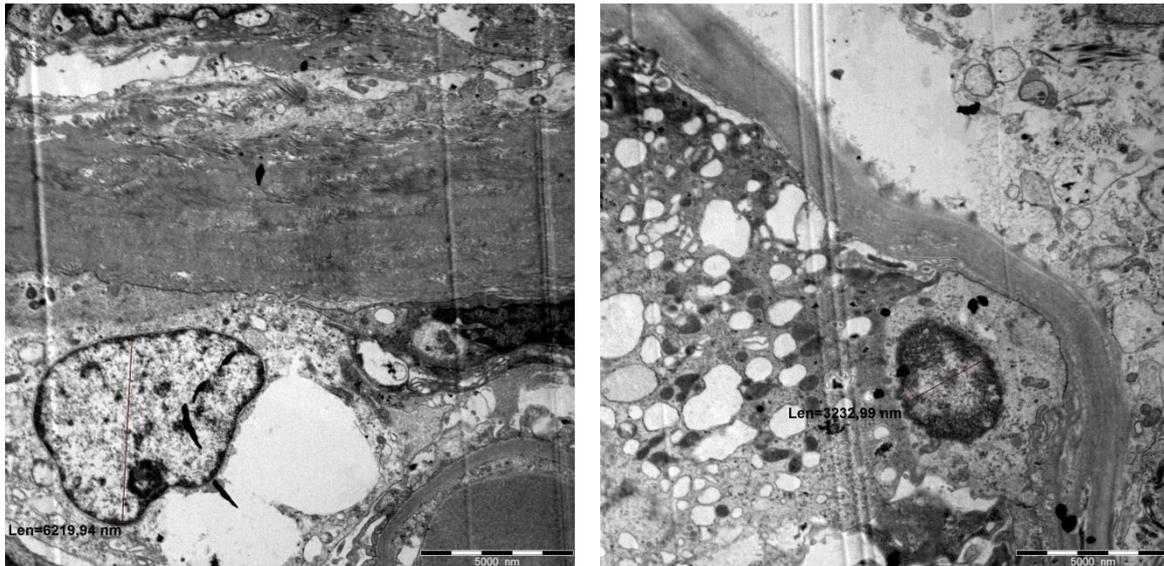


Abbildung 31: Ultrastruktur der parietalen Epithelzellen von Patient 4 (DN IIb). Abgebildet sind euchromatine Nuclei in einer der zwei dokumentierten PECs. Der euchromatine Nucleus hat einen Durchmesser von $> 3,5\mu\text{m}$. Dargestellt sind Messwerte in nm bei 1600 x Vergrößerung.

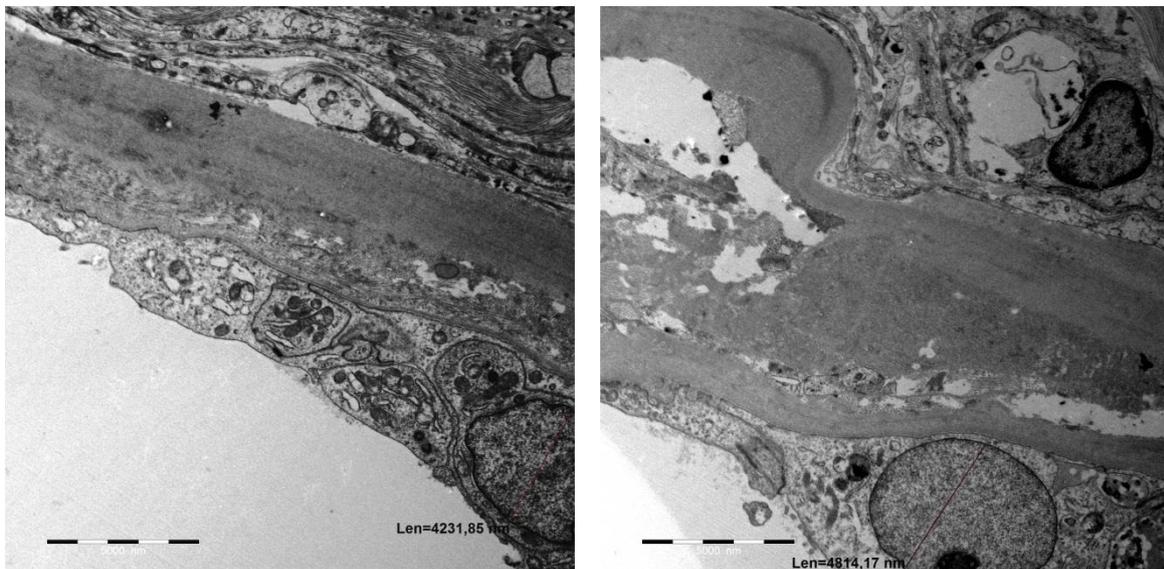


Abbildung 32: Ultrastruktur der parietalen Epithelzellen von Patient 5 (DN III). Abgebildet sind euchromatine Nuclei in beiden der zwei dokumentierten PECs. Die Nuclei der beiden PECs haben einen Durchmesser von $> 3,5\mu\text{m}$. Dargestellt sind Messwerte in nm bei 1600 x Vergrößerung.

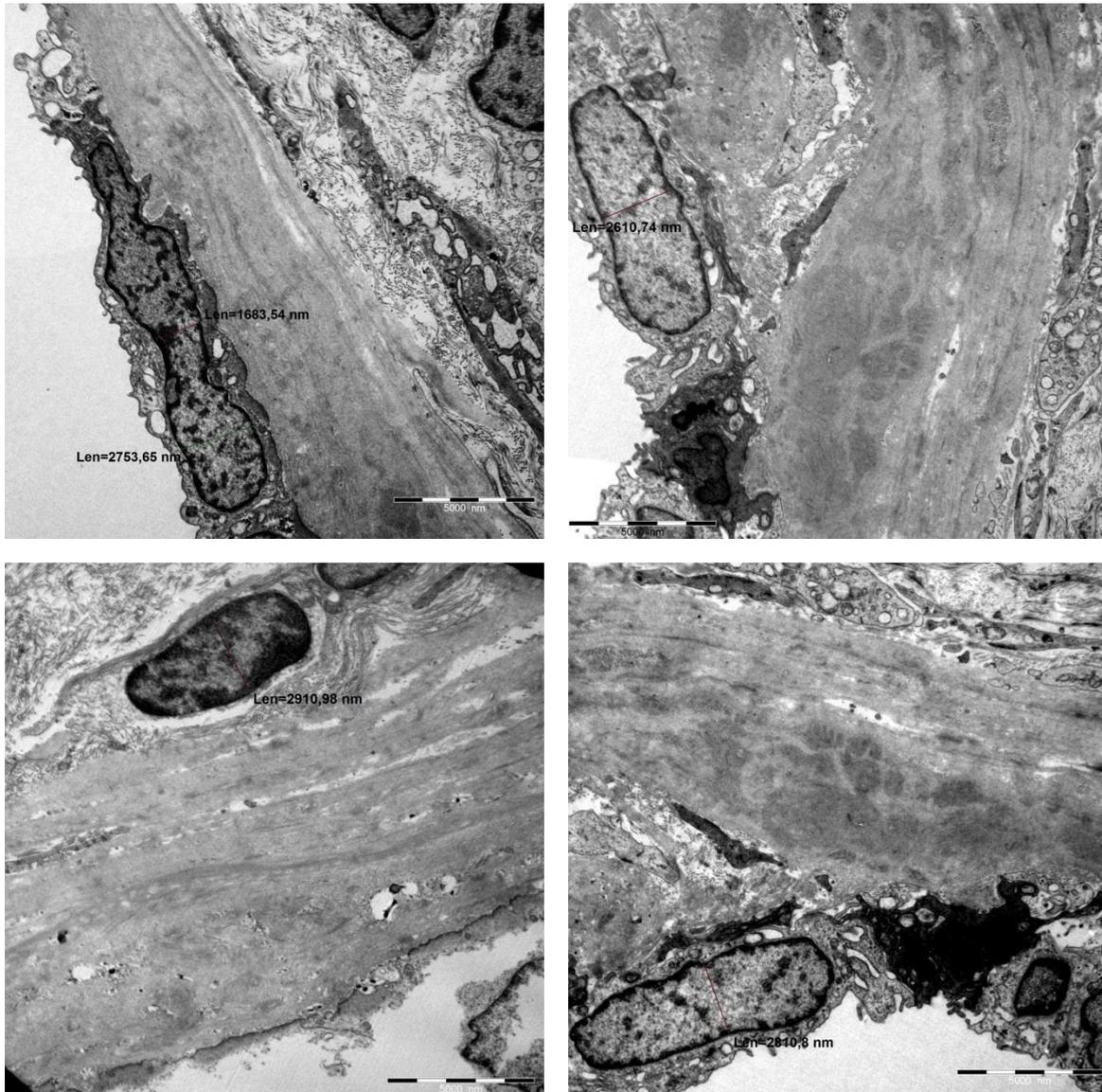


Abbildung 33: Ultrastruktur der parietalen Epithelzellen von Patient 6 (DN IV). Abgebildet sind euchromatine Nuclei in keinem der vier dokumentierten PECs. Kein Nucleus hat einen Durchmesser von $> 3,5\mu\text{m}$. Dargestellt sind Messwerte in nm bei 1600 x Vergrößerung.

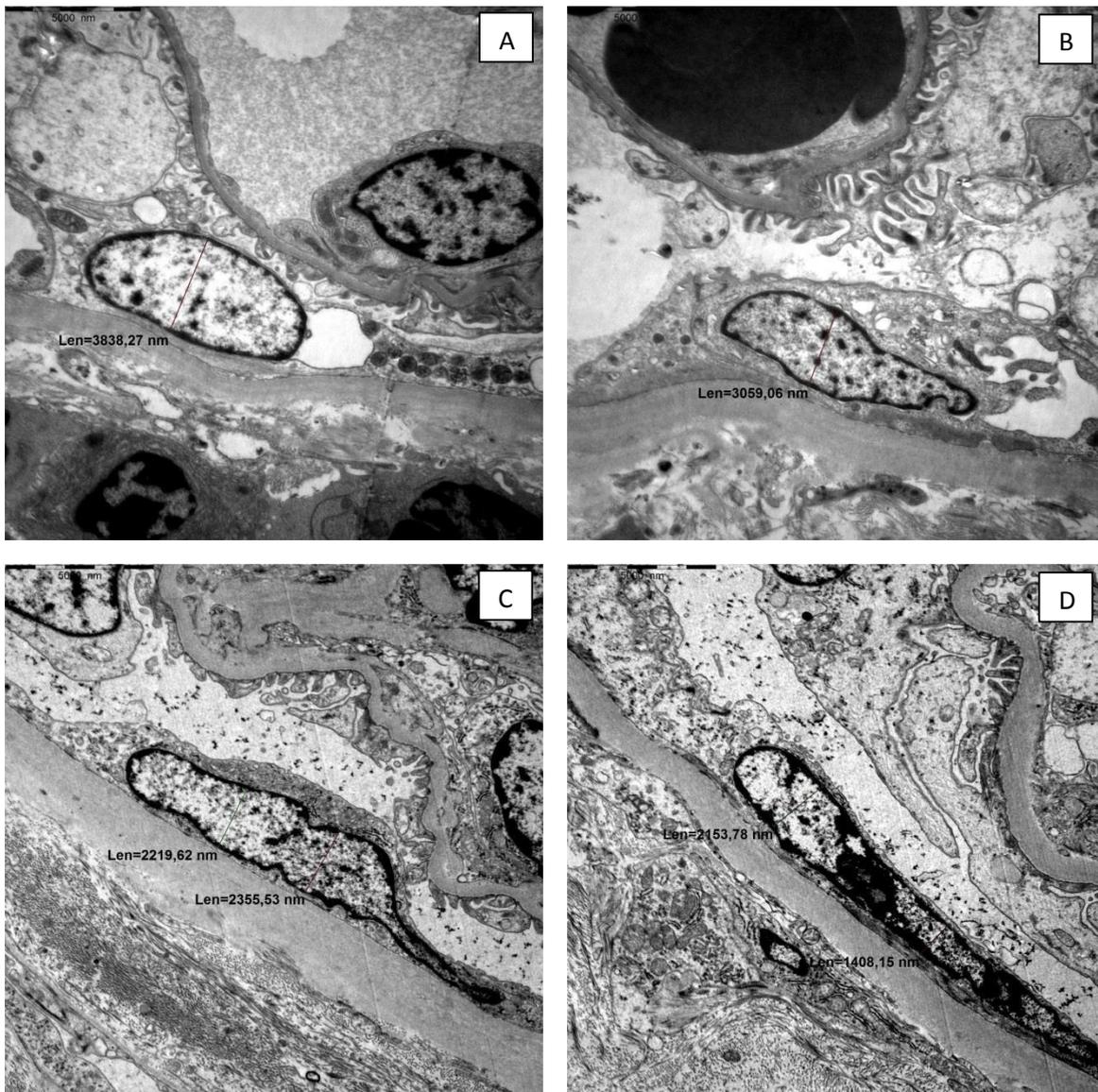


Abbildung 34: Repräsentative Darstellung der parietalen Epithelzellen der Vergleichspatienten. Abgebildet sind heterochromatine Nuclei, die auf eine fehlende Aktivierung der PECs hinweisen bei Patient 7 (A und B) und Patient 11 (C und D). Dargestellt ist ein Nucleus mit einem Durchmesser von $> 3,5\mu\text{m}$ (A) und drei Nuclei mit einem Durchmesser von $> 3,5\mu\text{m}$. Die Messwerte werden in nm angegeben, bei 1480 x Vergrößerung bei Vergleichspatient 7 und 1600 x Vergrößerung bei Vergleichspatient 11.

Abhängig von der technischen Anfertigung der Gewebeproben und der Fotodokumentation konnten bis zu sechs PECs pro Patient beurteilt werden. Es konnte kein Unterschied zwischen den Patienten mit DN und den Vergleichspatienten hinsichtlich des Auftretens eines euchromatinen Nucleus oder der Größe des Nucleus festgestellt werden. Alle Vergrößerungen des Nucleus gingen mit einer Auflockerung des Chromatingerüsts einher. Es wurden jedoch auch euchromatine Nuclei dokumentiert, die einen Durchmesser $< 3,5 \mu\text{m}$ aufwiesen. (Tabelle 9)

Tabelle 9: Beurteilung der ultrastrukturellen Veränderungen aktivierter PECs in den Nierenbiopsien der Patienten mit diabetischer Nephropathie.

Patientennummer	Euchromatiner Nucleus	Kerndurchmesser $> 3,5\mu\text{m}$
1 (DN IIa)	n.a.	n.a.
2 (DN IIa)	n.a.	n.a.
3 (DN IIa)	3/4	3/4
4 (DN IIb)	1/2	1/2
5 (DN III)	2/2	2/2
6 (DN IV)	0/4	0/4
7	0/4	3/4
8	2/2	2/2
9	4/6	2/6
10	3/3	3/3
11	0/5	1/5
12	3/6	2/6

Die Patienten 1 – 6 stellen Patienten in verschiedenen Stadien der DN dar, während die Patienten 7 – 12 Vergleichspatienten entsprechen. Dargestellt ist die Anzahl der beurteilten Nuclei im Nenner der Brüche, während die Anzahl der euchromatinen Nuclei in der mittleren Spalte und der Nuclei mit Durchmesser $> 3,5 \mu\text{m}$ im Zähler des Bruches steht.

3.2.3. Morphometrische Untersuchungen der Bowman'schen Kapsel

Lichtmikroskopische Messungen anhand der PAS Färbung

Die Dicke der BK wurde anhand der PAS gefärbten Schnittpräparate der Nierenbiopsien bei 200x – 400x Vergrößerung gemessen. Hier wurden nur Glomeruli mit mindestens 100µm Durchmesser zur Beurteilung herangezogen, um Dickenartefakte der BK durch tangenciales Anschneiden zu vermeiden. Dadurch konnten zwischen 2 und 7 Glomeruli bei einem Durchschnitt von 4,3 Glomeruli pro Patient beurteilt werden. Es wurden zwischen 49 und 554 Messungen pro Patient im Abstand von maximal 10µm entlang der BK angefertigt. Die Messlinien wurden vom Grenzbereich der BK / periglomerulären Gewebe zur PEC gezogen. (Abbildung 35) Dies ergab im Durchschnitt 259,25 Messungen pro Patient bei insgesamt 3111 Messungen. Die Messwerte wurden einer Boxplot-Berechnung unterzogen um Extremwerte aus der statistischen Beurteilung auszuschließen.

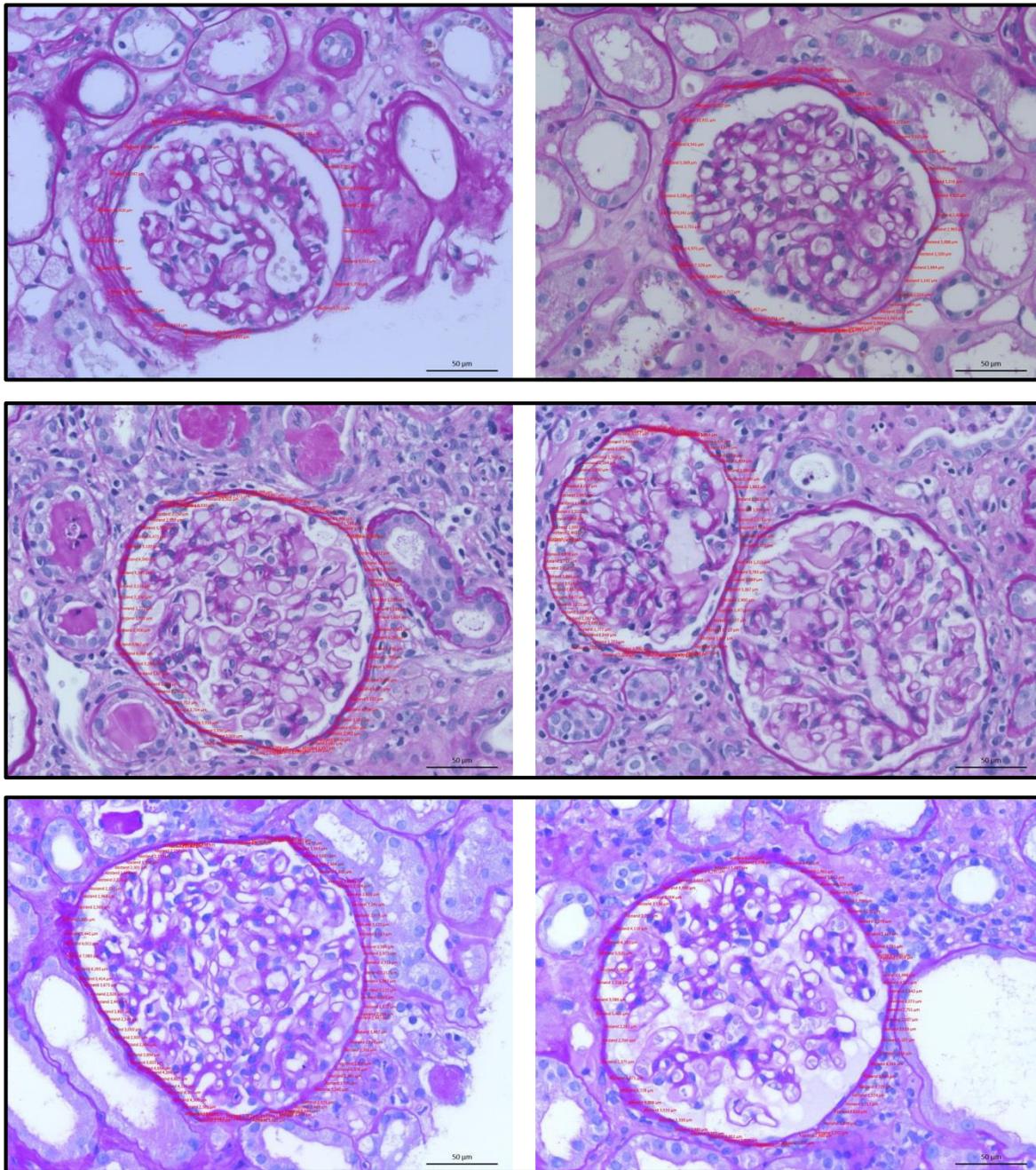


Abbildung 35: Beispiele der Messungen der Bowman'schen Kapsel aus Nierengewebeproben in der PAS Färbung bei 400x Vergrößerung. Jeweils 2 nebeneinanderliegenden Bilder von oben nach unten: Patient 4, Patient 7, Patient 12.

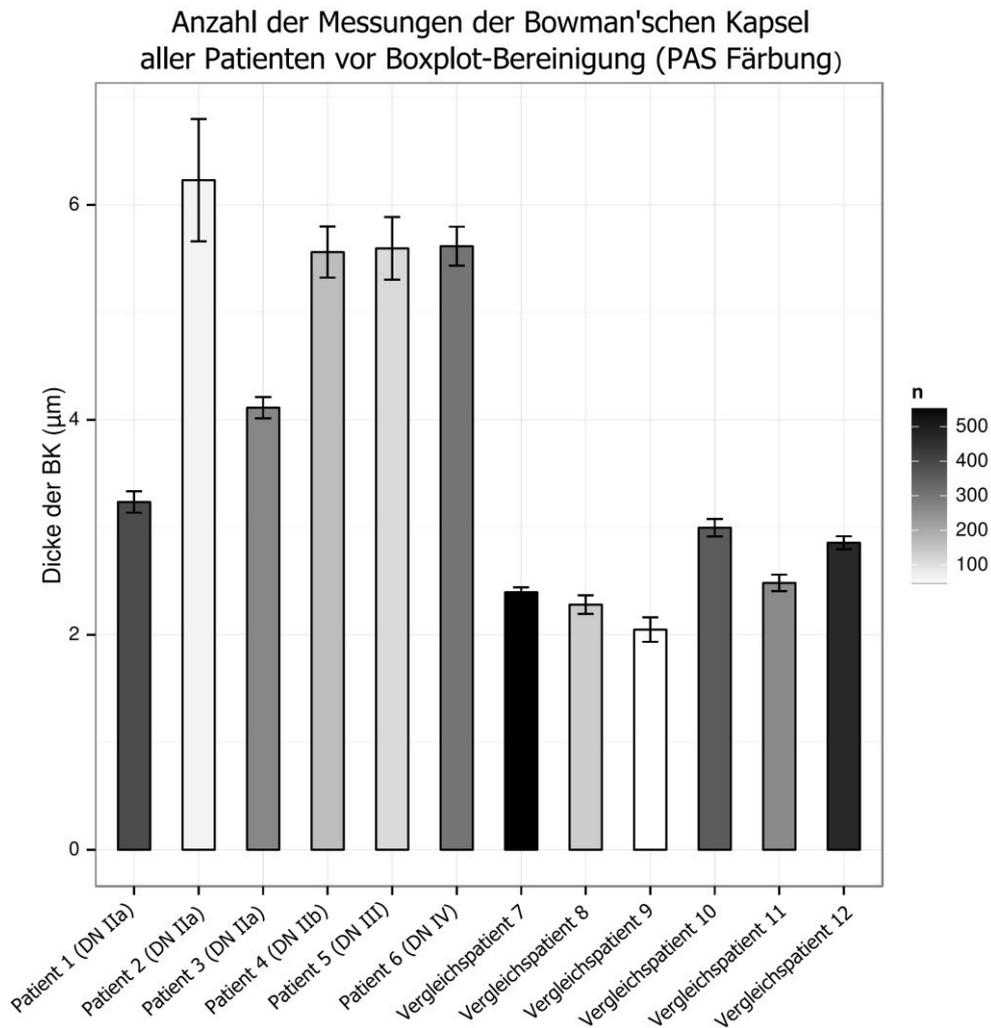


Abbildung 36: Anzahl der Dickenmessungen der Bowman'schen Kapsel in der PAS Färbung. Entsprechend der Legende sind die Balken der Patienten mit einer höheren Anzahl an Messungen dunkler eingefärbt. Zusätzlich dargestellt ist der Mittelwert +/- SEM.

Bei den Patienten mit DN konnten aus 23 Glomeruli 1294 Stellen gemessen werden, in der Vergleichsgruppe aus 34 Glomeruli 1817 Stellen. (Abbildung 36)

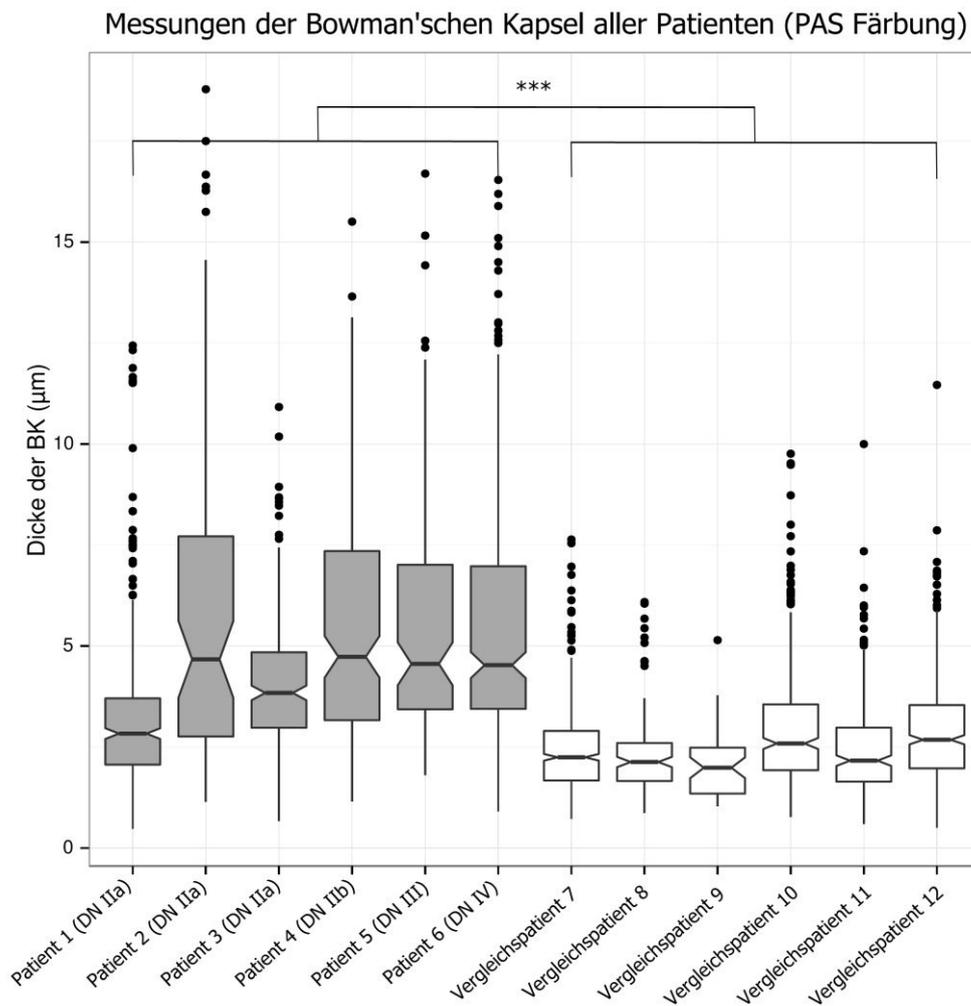


Abbildung 37: Boxplot zur Bereinigung der Rohdaten in den lichtmikroskopischen Messungen der PAS gefärbten Gewebeproben. Oberhalb des oberen Whiskers sind die Extremwerte schwarz gepunktet dargestellt, die aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Dargestellt ist zusätzlich der Median mit unterem und oberem Quartil, sowie unterem und oberem Whisker. Der Gruppenvergleich der Patienten mit diabetischer Nephropathie (Patient 1 – 6) mit den Vergleichspatienten (Patient 7 – 12) erfolgte per Berechnung des Mittelwertes und Anwendung des t-tests der Werte nach Boxplot-Bereinigung. Im Gruppenvergleich weisen die Patienten mit diabetischer Nephropathie eine signifikant ($p < 0,0001$) dickere BK auf. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Vergleichspatienten.

Zur Bereinigung der Daten erfolgte eine Boxplot-Berechnung nach der 135 Extremwerte aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. (Abbildung 37) Nach Bereinigung der Werte erbrachte die Auswertung der Dickenmessung der BK der PAS gefärbten histologischen Proben im Gruppenvergleich eine signifikante Verdickung ($p < 0,0001$) der BK aller Patienten mit DN im Vergleich zu den Vergleichspatienten. (Abbildung 37) Bei den Patienten mit DN lag die durchschnittliche Dicke bei $4,3 \pm 0,07 \mu\text{m}$ mit einer Streuung zwischen $2,8 \mu\text{m}$ bei Patient 1 und $5,2 \mu\text{m}$ bei Patient 4. In der Vergleichsgruppe ergab sich eine durchschnittliche Dicke der BK von $2,5 \pm 0,02 \mu\text{m}$. Die Streuung lag zwischen $2,7 \mu\text{m}$ bei Patient 10 und 12 und $2,0 \mu\text{m}$ bei Patient 9.

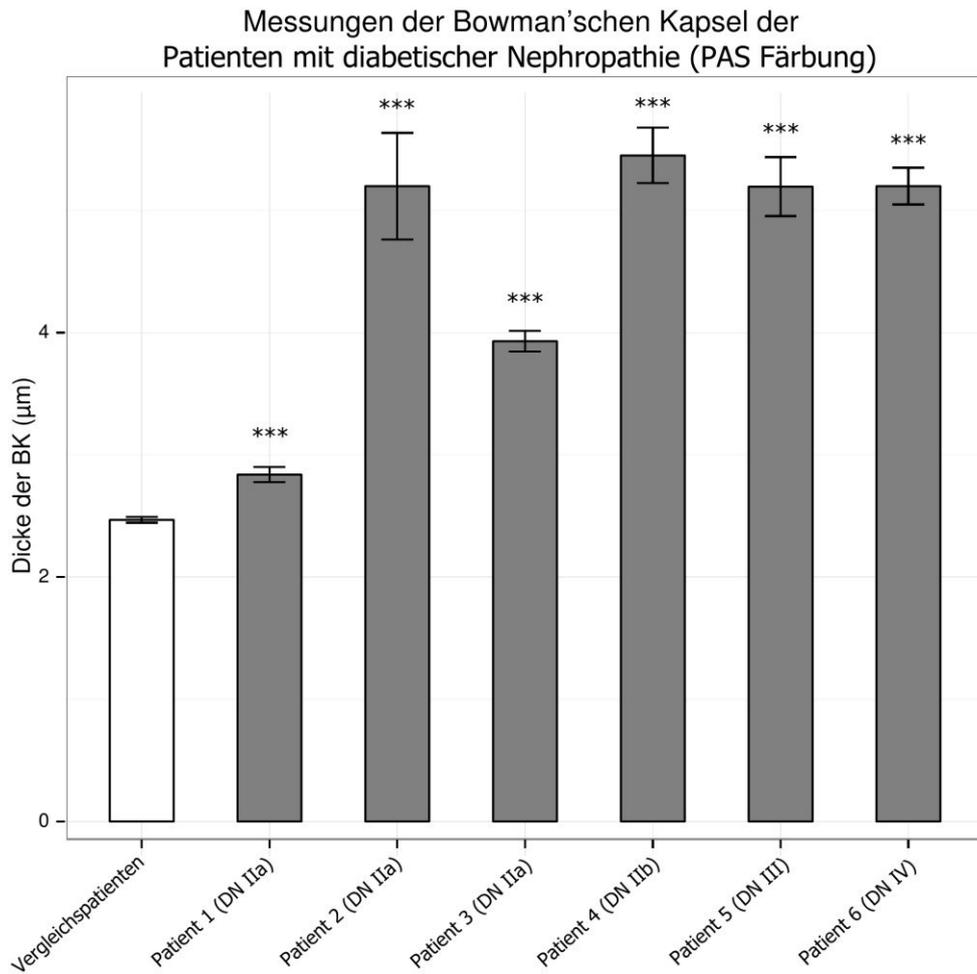


Abbildung 38: Vergleich der Dicken der Bowman'schen Kapsel aller Patienten mit diabetischer Nephropathie mit dem Durchschnittswert der Dickenmessungen aller Vergleichspatienten. Alle Patienten mit diabetischer Nephropathie (Patient 1 – Patient 6) weisen eine im Vergleich zu den Vergleichspatienten signifikant verdickte Bowman'sche Kapsel auf. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Vergleichspatienten.

Im Vergleich der Dickenmessungen der BK der einzelnen Patienten mit DN zu dem Durchschnittswert der Dickenmessungen aller Vergleichspatienten zeigte sich eine signifikante Verdickung der BK aller Patienten mit DN. (Abbildung 38)

Transmissionselektronenmikroskopische Messungen

Neben der Beurteilung des Aktivierungszustandes der PECs wurde die TEM auch verwendet, um die lichtmikroskopischen Dickenmessungen zu bestätigen. Ähnlich wie bei den lichtmikroskopischen Messungen wurden auch hier bei allen zwölf Patienten insgesamt 1807 Dickenmessungen im Abstand von max. 10µm durchgeführt. Dies entspricht einem Durchschnitt von 150,6 Messungen bei einer Streuung von 34 Messungen (Patient 8) bis 626 Messungen (Patient 11). Aus technischen Gründen konnten nur bei Patient 6 und Patient 11 vier Glomeruli transmissionselektronenmikroskopisch beurteilt werden. Bei allen anderen Patienten wurde lediglich ein Glomerulus vermessen.

Die Abbildung 39 zeigt beispielhaft die ultrastrukturellen Messungen der BK per TEM. Nach der Messwertbereinigung mittels Boxplot-Berechnung (Abbildung 41) werden die Messwerte der Patienten mit DN graphisch gegen den Durchschnittswert aller Vergleichspatienten (Abbildung 42) dargestellt.

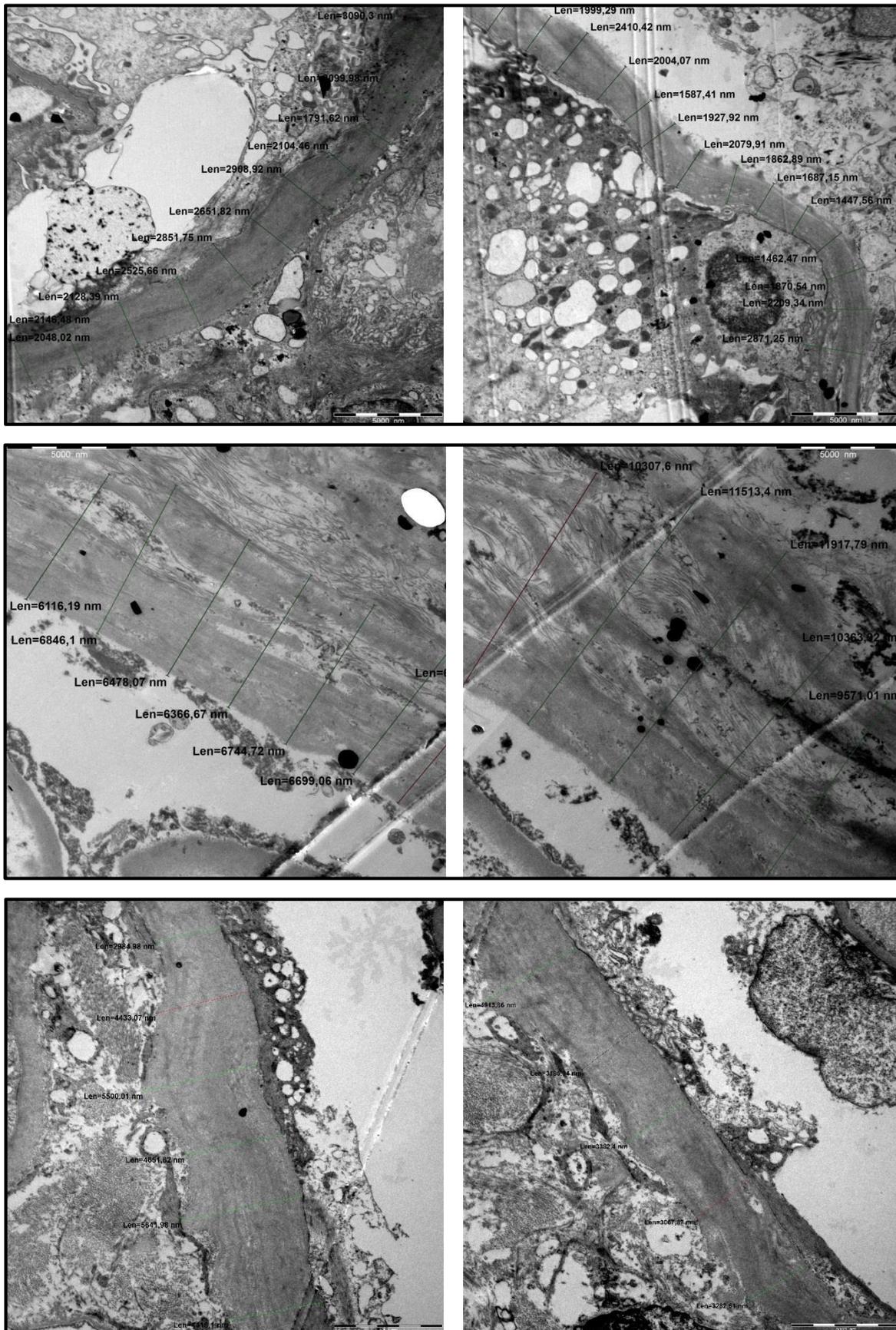


Abbildung 39: Beispiele der ultrastrukturellen Messung der Dicke der Bowman'schen Kapsel per Transmissionselektronenmikroskopie. Jeweils 2 nebeneinander liegende Bilder von oben nach unten: Patient 1 (DN IIa), Patient 4 (DN IIb), Patient 9 (Vergleichspatient)

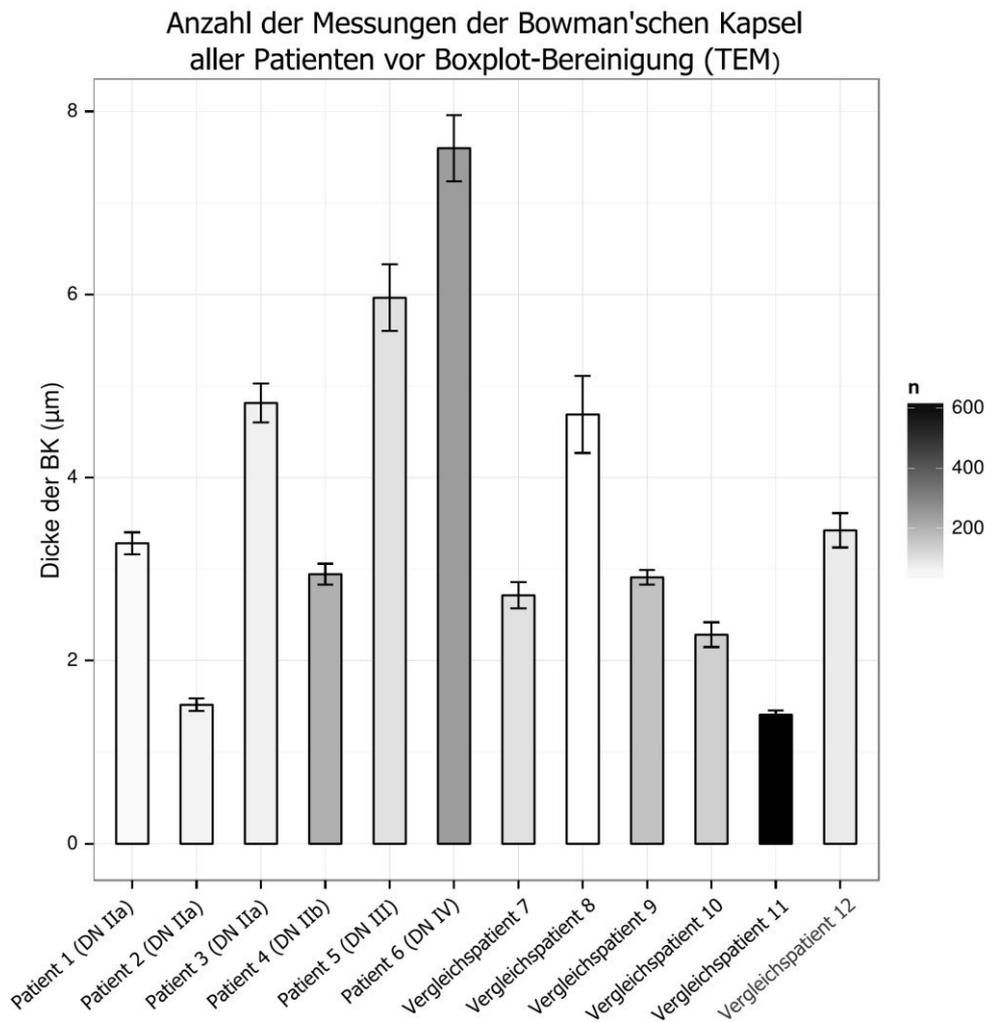


Abbildung 40: Anzahl der transelektronenmikroskopischen Dickenmessungen der Bowman'schen Kapsel. Entsprechend der Legende sind die Balken der Patienten mit einer höheren Anzahl an Messungen dunkler eingefärbt. Zusätzlich dargestellt ist der Mittelwert +/- SEM.

Bei den Patienten mit DN konnten aus 9 Glomeruli 691 Messungen angefertigt werden, wohingegen in der Vergleichsgruppe aus 9 Glomeruli insgesamt 1116 Messungen durchgeführt werden konnten. (Abbildung 40) Aus technischen Gründen konnten ausschließlich bei Patient 6 und Patient 11 vier Glomeruli vermessen werden. Bei allen anderen Patienten war nur die Vermessung eines Glomerulus möglich.

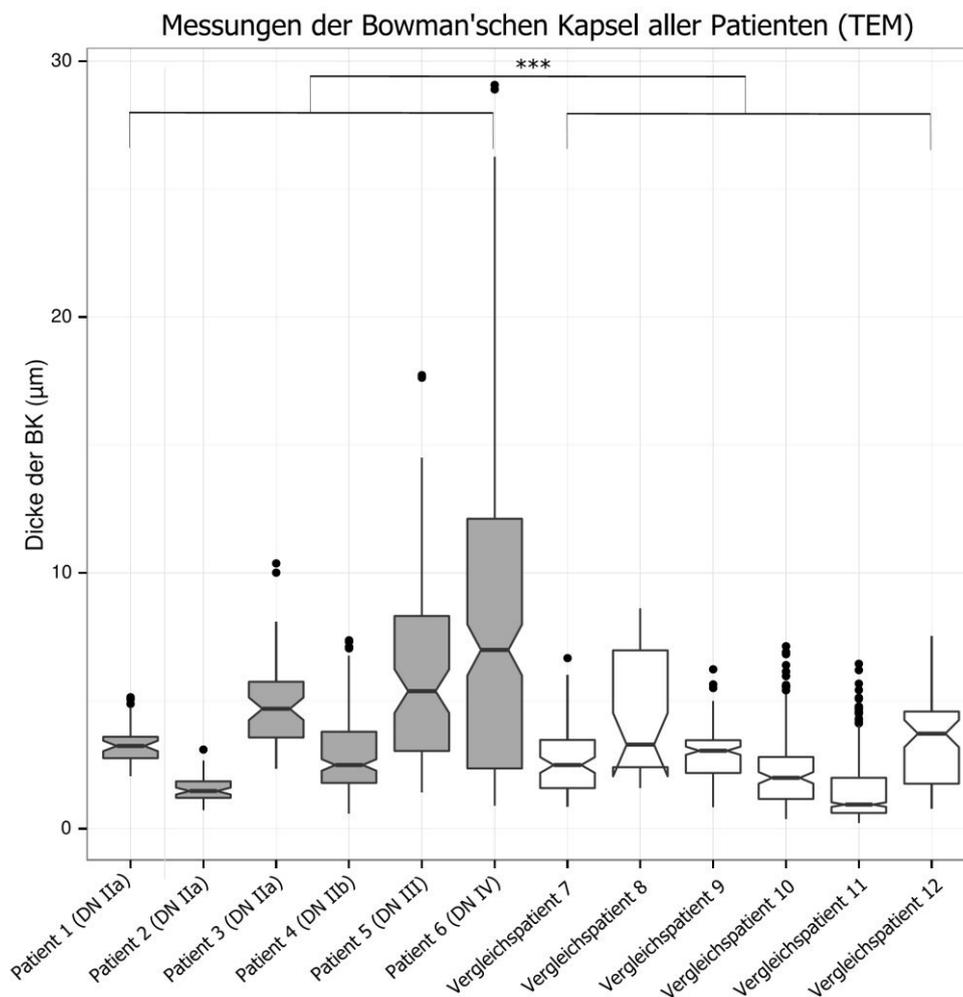


Abbildung 41: Boxplot zur Bereinigung der Rohdaten in der transelektronenmikroskopischen Messung. Oberhalb des oberen Whiskers sind die Extremwerte schwarz gepunktet dargestellt, die aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Dargestellt ist zusätzlich der Median mit unterem und oberem Quartil, sowie unterem und oberem Whisker. Der Gruppenvergleich der Patienten mit diabetischer Nephropathie (Patient 1 – 6) mit den Vergleichspatienten (Patient 7 – 12) erfolgte per Berechnung des Mittelwertes und Anwendung des t-test nach Boxplot-Bereinigung. Im Gruppenvergleich weisen die Patienten mit diabetischer Nephropathie eine signifikant ($p < 0,0001$) dickere BK auf. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Vergleichspatienten.

Zur Bereinigung der Daten erfolgte eine Boxplot-Berechnung, nach der 47 Extremwerte aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurden (Abbildung 41). Nach Bereinigung der Werte erbrachte die transelektronenmikroskopische Auswertung der Dickenmessung der BK im Gruppenvergleich eine signifikante Verdickung ($p < 0,0001$) der BK aller Patienten mit DN im Vergleich zu den Vergleichspatienten. Bei den Patienten mit DN lag die durchschnittliche Dicke bei $4,90 \pm 0,34 \mu\text{m}$ mit einer Streuung zwischen $1,5 \mu\text{m}$ bei Patient 2 und $7,4 \mu\text{m}$ bei Patient 5. In der Vergleichsgruppe ergab sich eine durchschnittliche Dicke der BK von $2,0 \pm 0,06 \mu\text{m}$. Die Streuung lag zwischen $1,3 \mu\text{m}$ bei Patient 11 und $4,7 \mu\text{m}$ bei Patient 8. (Abbildung 42)

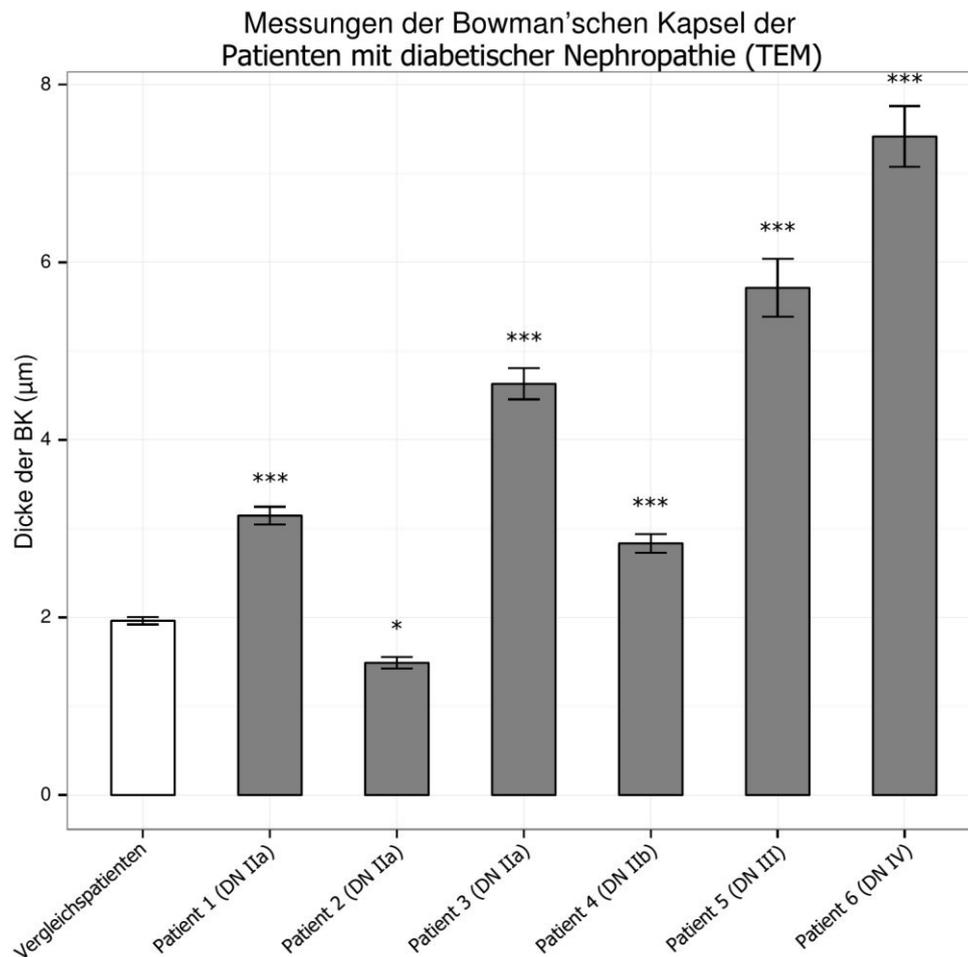


Abbildung 42: Vergleich der Dicken der Bowman'schen Kapsel aller Patienten mit diabetischer Nephropathie mit dem Durchschnittswert der Dickenmessungen aller Vergleichspatienten. Die Patienten 1, 3, 4, 5 und 6 weisen eine im Vergleich zu den Vergleichspatienten signifikant verdickte Bowman'sche Kapsel auf. Bei Patient 2 ergab sich eine signifikant dünnere Bowman'sche Kapsel in den Messungen. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Vergleichspatienten.

Bei den transmissionselektronenmikroskopischen Messungen der BK ergab sich ein Befund, welcher sich von den lichtmikroskopischen Ergebnissen nur bei Patient 2 unterscheidet. Dieser weist in den transmissionselektronenmikroskopischen Messungen eine schmalere BK auf. Da sich die Anzahl der Messungen aller Patienten mit DN (691 Messungen) um einen Faktor von $>1,5$ von der Anzahl der Messungen der Vergleichspatienten (1116 Messungen) unterscheidet und die Varianzen der Stichproben in beiden Gruppen signifikant unterschiedlich ist (nach Anwendung eines Levene-Tests mit $F = 578,612$ und $p < 0,005$) waren die beiden Voraussetzungen zur Durchführung eines approximativen Zweistichproben Gaußtest erfüllt. Dieser ergab einen Testwert von 18,140 was einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen entspricht. (Abbildung 41)

4. Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit verifizieren die Hypothese der Verdickung der BK durch PECs unter diabetischer Kondition. PECs bilden unter diabetischer Kondition vermehrt extrazelluläre Matrix, was zu einer Verdickung der BK führt und zur Sklerosierung des Glomerulus beiträgt.

In Mesangialzellen wurde der Mechanismus der vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix in verschiedenen Studien untersucht. Hier induzierte eine Hyperglykämie die Hochregulation von GLUT1, was intrazellulär zu einer gesteigerten Bildung von ROS und AGEs führt. Diese wiederum induzieren über mehrere intrazelluläre Signalwege eine gesteigerte TGF- β 1 Bildung, was letztlich über para- und autokrine Regulation die zusätzliche Bildung von extrazellulärer Matrix fördert [112]. Auch für die parietale Epithelzelle konnte die Bildung von extrazellulärer Matrix nach Stimulation mit TGF- β 1 gezeigt werden [16, 17]. Dies konnte *in vivo* bei der FSGS nachgewiesen werden, bei der die Aktivierung der PECs mit der zusätzlichen Ablagerung von extrazellulärer Matrix einhergeht [31]. Einen Hinweis für die gesteigerte Bildung und basale Ablagerung von extrazellulärer Matrix bei der diabetischen Nephropathie konnte in einer Studie von 1982 gezeigt werden, in der erstmals der Zusammenhang zwischen einem „prominentem parietalen Epithel“ und der diabetischen Nephropathie beobachtet wurde [35]. Auch wurde hier eine Assoziation zwischen prominentem (=aktiviertem) parietalen Epithel und einer Verdickung der BK hergestellt. Dies führte uns zu der Hypothese, dass die PEC unter diabetischer Kondition verstärkt extrazelluläre Matrix bildet, was letztlich zu einer Verdickung der BK führt. Um den Einfluss der diabetischen Kondition auf die PECs zu simulieren, verwendeten wir zur Stimulation Glukosekonzentrationen von 30mM, AGEs und TGF- β 1, da für diese eine große Bedeutung bei der diabetischen Nephropathie nachgewiesen ist [57, 78, 79, 81, 82, 87, 92]. Für die *in vitro* Untersuchungen kamen eine murine immortalisierte PEC Zelllinie aus dem Forschungslabor von Herrn Prof. Shankland (Seattle, USA) [94] und eine primäre humane PEC Zelllinie von Frau Prof. Romagnani (Florenz, IT) [20] zur Anwendung.

Die Frage nach der Aktivierung der PECs und der Bildung von TGF- β 1 mit einem möglichen positiven Feedbackmechanismus unterliegt einem zellspezifischen Effekt. Für murine PECs wurde eine Aktivierung und verstärkte Expression von TGF- β 1 beobachtet, während humane

PECs keine Aktivierung oder TGF- β 1 Bildung *in vitro* zeigten. Beide Zelltypen bildeten jedoch vermehrt extrazelluläre Matrix und Kollagene der BK unter diabetischer Kondition. *In vivo* konnte eine vermehrte Bildung und Ablagerung von Proteinen der BK durch Dickenzunahme der BK – nachgewiesen durch Dickenmessungen der BK in den humanen Nierenbiopsien von Patienten mit DN - bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die PEC unter diabetischer Kondition verstärkt extrazelluläre Matrix bildet und diese basal abgelagert.

4.1. Aktivierung der parietalen Epithelzelle bei der diabetischen Nephropathie

Effekte der Stimuli auf die Zytotoxizität und Proliferation der parietalen Epithelzellen

Als Voraussetzung zu dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss der verwendeten Stimulantien (Glukose, AGEs und TGF- β 1) auf die Zytotoxizität der murinen PECs untersucht. Ein Effekt der Stimulantien auf die Zytotoxizität von PECs ist in der Literatur nicht beschrieben und konnte auch hier nicht gefunden werden. Auch ein möglicher Effekt auf die Proliferation, bzw. Stoffwechselaktivität wurde per MTT-Assay untersucht und zeigte geringfügige Änderungen in der Stoffwechselaktivität nach Zugabe der Stimulantien. Das Ergebnis der Proliferationsanalyse bestätigte die Notwendigkeit von internen Kontrollen bei allen folgenden Experimenten. Die Effekte der Stimuli auf die Zytotoxizität und Proliferation wurden lediglich an murinen PECs getestet, da die Schlussfolgerung der Notwendigkeit von internen Kontrollen bereits nach den Versuchen mit den murinen PECs bestand und die Effekte der Stimulantien auf die Zytotoxizität oder Proliferation der PECs keinen gesonderten Stellenwert in den Untersuchungen dieser Arbeit hatten, sondern lediglich zur Optimierung der Versuche diente.

Aktivierungsmarker CD44

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Expression des Oberflächenmarkers CD44. Dieser transmembrane Rezeptor für Hyaluronsäure spielt auch eine bedeutende Rolle in der Tumor-/Metastasenforschung und Immunregulation [113, 114]. Er findet sich auf verschiedenen Zelltypen, sowie als Bestandteil der perizellulären Matrix von CD44-tragenden Zellen und bei Patienten mit bestimmten Tumorerkrankungen im Blutplasma [115]. In der nephrologischen Forschung wurde die Bedeutung von CD44 2009 von B. Smeets et al. erkannt [24]. Dieser zeigte die *de novo* Expression von CD44 auf PECs bei hyperplastischen Läsionen der BK. In gesunden Glomeruli konnte kein CD44 gefunden werden, was Rückschlüsse auf diesen Oberflächenmarker als Marker für das Auftreten von Halbmonden und Marker für aktivierte PECs zuließ [24]. Bei experimentellen Modellen der FSGS in Ratten- und Mauslinien konnte das Auftreten von CD44 auf PECs, die an der FSGS beteiligt waren, gezeigt werden. Hier wurde die Aktivierung der PECs auch durch morphologische Veränderungen beurteilt (z.B. gesteigertes Zellvolumen, erhöhte Zelldichte, verdickte BK). CD44 trat bei den meisten der morphologisch als aktiviert definierten PECs auf, jedoch nicht bei allen. Die Autoren vermuten daher die Bedeutung von CD44 als späten Marker der Zellaktivierung [31]. Auch in humanen Biopsien wurde das Auftreten von CD44 auf PECs bei der FSGS und in der Nierenentwicklung beobachtet [116, 117].

Die Genexpressionsanalyse von CD44 zeigte die Aktivierung der murinen PECs 24h nach Stimulationsbeginn mit TGF- β 1. In den humanen PECs wurde im Gegensatz dazu nach gleicher Stimulation eine Herunterregulation von CD44 zum Zeitpunkt 24h beobachtet. Für murine und humane PECs konnte zu keinem der Zeitpunkte eine veränderte CD44 Expression nach Stimulation mit AGEs und Glukose gefunden werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse in murinen und humanen PECs könnten durch den gesteigerten Stoffwechsel der immortalisierten PECs begründet sein. Dieser könnte eine höhere Aufnahme von TGF- β 1 begründen und dadurch eine (frühere) Aktivierung der murinen PECs induzieren. Eine zweite Ursache könnte in einer kompensatorischen Herunterregulation von CD44 zugunsten anderer Gene liegen. Die insgesamt geringen Veränderungen des Expressionsniveaus von CD44 erklärt sich jedoch am besten durch eine späte Expression bei ausgeprägter Pathologie mit starken zusätzlichen Stimuli (ROS, IL-6, etc.), wie bereits durch B. Smeets et al. vermutet [24]. Hier stellt sich die Frage, ob die Aktivierung der PECs, erhoben durch Genexpressionsanalyse von CD44 auch durch eine ultrastrukturelle Analyse der PECs in den Nierenbiopsien nachgewiesen werden kann?

Ultrastrukturelle Zeichen der Aktivierung der parietalen Epithelzellen

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die PECs zusätzlich transmissionselektronenmikroskopisch auf morphologische Zeichen der Aktivierung untersucht. Diese Zeichen waren bereits als vergrößerte PEC mit runden oder ovalen euchromatischen Nuclei beschrieben worden [35]. Normwertig wurden die Zellkerne von PECs in der Literatur mit einer Länge von 2,0 – 3,5 μm in der orthogonalen Messung durch den Kern beurteilt [111]. Daher wurde die Einteilung des Chromatins der Nuclei in Heterochromatin und Euchromatin und der Durchmesser des Zellkerns zur morphologischen Beurteilung der Aktivierung von PECs in den Nierenbiopsien herangezogen (Tabelle 9). Euchromatine Nuclei sind im Vergleich zu heterochromatinen Nuclei als transkriptionsaktiver anzusehen. Eine erhöhte Ratio von euchromatinen zu heterochromatinen Zellkernen wurde bei DM in Zellen aus der Adventitia der Aorta mit signifikantem Unterschied gezeigt [118]. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Vergrößerung des Nucleus und Auflockerung des Chromatingerüsts hergestellt werden: Alle vergrößerten Nuclei waren auch euchromatin, während nicht alle euchromatinen Nuclei auch einen Durchmesser von $> 3,5\mu\text{m}$ aufwiesen. Die Ursache hierfür liegt in der Aufbereitung der Gewebeproben. Da retrospektiv auf archiviertes Patientenmaterial zurückgegriffen wurde, lagen keine Serienschnitte zur Beurteilung vor. Daher war in diesen beiden Fällen schnittbedingt keine Bestimmung des maximalen Durchmessers möglich. Da alle Vergrößerungen mit einem euchromatinem Nucleus einhergehen, ist bei den euchromatinen Nuclei mit einem Durchmesser $< 3,5\mu\text{m}$ von einem tangentialen Anschnitt auszugehen. Der Vergleich der Patienten mit DN mit den Vergleichspatienten zeigt, dass kein Zusammenhang zwischen DN und einem vermehrten Vorkommen von euchromatinen Nuclei herzustellen ist. Wegen einer zu geringen Anzahl der untersuchten PECs in der TEM und fehlender Möglichkeit der Untersuchung der PECs bei den Patienten 1 und 2 ist eine Analyse der Aktivierung der PECs nicht möglich.

Die Ergebnisse zur Beantwortung der Frage nach der Aktivierung der PECs unter diabetischer Kondition müssen also zellspezifisch durch Beurteilung der funktionellen Untersuchungen beantwortet werden. Während für die humanen PECs keine Aktivierung beobachtet wurde, zeigten die murinen PECs eine Aktivierung nach Stimulation mit TGF- β 1. Da TGF- β 1 bei der Entstehung der Glomerulosklerose eine entscheidende Rolle spielt und die Regulation von TGF- β 1 in PECs unbekannt ist, war diese Gegenstand der nächsten Untersuchungen.

Rolle von TGF- β 1 bei der diabetischen Nephropathie

Da TGF- β 1 bei Glomerulopathien von Podozyten, Mesangialzellen und proximalen Tubuluszellen gebildet werden kann [32, 90], sollte nun gezeigt werden, ob die Stimulation mit AGE und Glukose auch zu einer Bildung von TGF- β 1 in PECs führt. *In vivo* Untersuchungen von humanem Nierengewebe mit diabetischer Nephropathie konnten bereits per *in situ* Hybridisierung eine verstärkte TGF- β 1 Transkription in den PECs feststellen [119]. Außerdem testeten wir in einem zweiten Schritt, ob bei der Regulation von TGF- β 1 ein Feedbackmechanismus auf Transkriptionsebene in den PECs vorliegt. Bei Tumorzellen und Fibroblasten konnte eine negative Feedbackschleife nach Stimulation mit TGF- β 1 gezeigt werden [120, 121]. Für die PEC ist eine Regulation von TGF- β 1 nicht bekannt.

Die Simulation mit Glukose und AGE erbrachte keine Änderung in der Expression von TGF- β 1 in den murinen oder humanen PECs. Bei den murinen PECs kam es lediglich nach Stimulation mit TGF- β 1 für 6h zu einer signifikant verstärkten Transkription von TGF- β 1. Wegen hoher Standardabweichungen war die Hochregulation von TGF- β 1 nach 24h nicht signifikant. Dieser interessante Befund zeigte, dass bei den murinen PECs die Stimulation mit TGF- β 1 selbst zu einer verstärkten Expression von TGF- β 1 führte. Das lässt den Rückschluss auf die Fähigkeit der murinen PECs zur Bildung von TGF- β 1 zu und ist ein Hinweis auf eine positive Feedbackschleife der TGF- β 1 Regulation.

Auf Translationsebene wurde im Zellüberstand der murinen PECs eine signifikant niedrigere TGF- β 1 Konzentration nach Stimulation mit Glukose nach 24h und 48h und eine gesteigerte TGF- β 1 Konzentration nach Stimulation mit AGEs nach 48h gefunden. Bei den humanen PECs konnte auch auf Translationsebene kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit Glukose oder AGEs stimulierten Zellen gefunden werden. Wenngleich auch keine Literatur zur Bildung von TGF- β 1 nach Behandlung mit hoher Glukosekonzentration in PECs vorhanden ist, so zeigt die Glukosebehandlung von Mesangialzellen der Ratte und humanen Tubulusepithelzellen doch eine Hochregulation von TGF- β 1 [122-124]. Der Effekt der niedrigeren Bildung und Sekretion von TGF- β 1 in den murinen PECs könnte demnach einem zellspezifischen Gegenmechanismus zum ohnehin gesteigerten TGF- β 1 Level in den Glomeruli durch Sekretion der Podozyten, Mesangialzellen und proximalen Tubulusepithelzellen entsprechen [90, 91]. Die gesteigerte Bildung von TGF- β 1 nach Stimulation mit AGEs für 48h wurde in der real-time PCR lediglich nach 6h ohne statistische Signifikanz angedeutet. Die zeitliche Verzögerung zwischen Transkription und Translation/Sekretion entspräche demnach 24h bis 48h. In Mesangialzellen und

Tubulusepithelzellen wird der Effekt der gesteigerten TGF- β 1 Produktion nach Stimulation mit AGEs bereits genannt [82], während für parietale Epithelzellen keine Stimulationsversuche mit AGE in der Literatur beschrieben sind.

Das bedeutet, dass hier erstmalig die Bildung von TGF- β 1 in den murinen PECs nach Stimulation mit AGEs gezeigt werden konnte. Zusammen mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalyse kann gesagt werden, dass die murinen PECs in diabetischer Kondition einen positiven Feedbackmechanismus bei der Regulation von TGF- β 1 ausbilden. Doch führt diese parakrine und autokrine Stimulation von TGF- β 1 zusammen mit den anderen Stimulantien auch zu einer verstärkten Bildung von Kollagenen und Ablagerung in der BK?

4.2. Bildung von Kollagenen und Ablagerung in der Bowman'schen Kapsel

Diese Frage wurde per Genexpressionsanalyse auf Transkriptions- und Translationsebene, sowie durch Vermessung der BK beantwortet.

Es ist bekannt, dass die BK im Wesentlichen aus den Kollagenen IV und in geringerer Menge aus den Proteinen Laminin-1 und -10, Entactin, Perlecan und Bamacan besteht [41-43]. In der BK sind die α -Ketten 1, 2, 5 und 6 von Kollagen IV stärker vorhanden, als die Ketten α 3 und 4. Kollagen IV α 6 kommt nur in der BK und nicht in der GBM vor [41, 42]. Bei dieser Arbeit wurden alle Untereinheiten von Kollagen IV untersucht. Außerdem wurden die Genexpressionsanalysen auch auf Kollagen I α 1 ausgeweitet, da dies die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix vieler Gewebe darstellt [125].

Auf Transkriptionsebene konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit Glukose zu keinem Zeitpunkt bei einer der beiden Zelllinien eine signifikante Änderung des Expressionsniveaus im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ergab. Die Behandlung mit AGEs erbrachten kontroverse Ergebnisse der Expressionen der verschiedenen Kollagene im Vergleich der murinen und humanen PECs. Während AGEs in den murinen PECs zu verschiedenen Zeitpunkten vier α -Ketten von Kollagen IV herunterregulierte, so zeigten die humanen PECs eine Hochregulation von vier α -Ketten. Die Behandlung mit TGF- β 1 führte zu einer Hochregulation von drei α -Ketten von Kollagen IV und Herunterregulation von zwei α -Ketten in murinen PECs, während die humanen PECs nach Behandlung mit TGF- β 1 drei α -Ketten hoch- und eine herunterregulierten. (Tabelle 6)

Die auf Transkriptionsebene beschriebenen Veränderungen konnten per Western-Blot auf Proteinebene bestätigt werden. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der an alle α -Ketten von humanem Kollagen IV bindet. Das Ergebnis des Western-Blots zeigte einen Anstieg der Kollagen IV Produktion nach Behandlung mit Glukose und TGF- β 1, sowie vor allem nach Behandlung mit AGEs im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 24h und 48h. Dies war auf Transkriptionsebene bereits durch signifikante Hochregulation einiger Kollagene nach Stimulation mit AGEs und TGF- β 1 gesehen worden. Für Glukose hatte sich eine Hochregulation der Kollagene IV α 1, α 2 und α 6 angedeutet, wenngleich diese keine statistische Signifikanz erreichten.

Die gesteigerte Genexpression von Kollagen IV α 1, α 2 und Kollagen I α 1 in PECs nach Stimulation mit TGF- β 1 ist in der Literatur bereits vorbeschrieben [18]. Per Immunhistochemie konnte ebenso eine gesteigerte Bildung von Kollagen IV nach Stimulation mit 30mM Glukose in glomerulären Epithelzellen gezeigt werden [126]. Auch wurde in einem experimentellen diabetischen Mausmodell (db/db) eine erhöhte Kollagen IV Konzentration im Urin gefunden, welche mit einer mesangialen Matrixexpansion einherging [37]. *In vivo* konnte die verstärkte Transkription von TGF- β 1 und Kollagen IV in PECs bei der diabetischen Nephropathie per in situ Hybridisierung nachgewiesen werden [119].

Das bedeutet, dass bei der DN verstärkt mRNA von Genen der extrazellulären Matrix und der BK transkribiert und diese auch gebildet werden. (Abbildung 43) Doch werden diese Kollagen nur apikal in den Bowman'schen Kapselraum sezerniert oder führen sie auch zu einer Verdickung der BK?

Einfluss der parietalen Epithelzelle auf die Dicke der Bowman'schen Kapsel

Die Beantwortung der Frage nach der basalen Ablagerung von Kollagen IV und darauf folgender Verdickung der BK war nun Gegenstand der histologischen Untersuchungen.

Für die histologischen Analysen standen humane Nierenbiopsien von fünf Patienten und eine Nierengewebeprobe eines obduzierten Patienten in verschiedenen Stadien der DN, sowie Nierenbiopsien von sechs Vergleichspatienten zur Verfügung. (Tabelle 7) Alle sechs Patienten litten unter einem seit über fünf Jahre bestehenden DM Typ II. Außer den bei DN beschriebenen Auffälligkeiten hatte kein Patient in der pathologischen Untersuchung

zusätzliche glomeruläre Auffälligkeiten. Bei den Vergleichspatienten lagen Nierenbiopsien von Transplantatnieren vor. Die pathologische Untersuchung der Glomeruli aller Vergleichspatienten ergab einen pathologisch vollkommen unauffälligen Befund. Zur morphometrischen Vermessung der BK kamen zwei mikroskopische Untersuchungsmethoden zur Anwendung – die Lichtmikroskopie und die TEM.

Lichtmikroskopische Messungen

Im Vergleich der bereinigten Messwerte der Patienten mit DN mit den Vergleichspatienten zeigten alle Patienten mit DN eine signifikant dickere BK. Die geringe Fallzahl der Patienten in den einzelnen Stadien lässt eine Beurteilung der stadienabhängigen Verdickung der BK nicht zu, wenngleich sich diese andeutet. Die durchschnittliche Dicke der BK betrug bei den Patienten mit DN $4,3 \pm 0,07 \mu\text{m}$ und bei den Vergleichspatienten $2,5 \pm 0,02 \mu\text{m}$.

Wenngleich auch durch die Untersuchungen von E.F. Gaffney 1982 der Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen „prominenten parietalen Epithel“ und DN gegeben wurde [35], so war die Verdickung der BK bei der DN bisher noch nicht Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen, weshalb hier kein direkter Bezug zu bisher bestehender Literatur hergestellt werden kann. Lediglich in der experimentellen FSGS konnte eine Assoziation zwischen der Aktivierung von PECs und Verdickung der BK gezeigt werden [31].

Diese Ergebnisse bedeuten also, dass die PEC in diabetischer Kondition verschiedenen Formen von Kollagen IV bildet und diese basal ablagert, was letztlich zu einer Verdickung der BK führt. (Abbildung 43)

Transmissionselektronenmikroskopische Messungen

Zur transmissionselektronenmikroskopischen Messung der Dicke der BK konnte in der Regel nur ein Glomerulus herangezogen werden. Bei Patient 6 und Patient 11 war die Vermessung von jeweils 4 Glomeruli möglich.

Der Vergleich der Durchschnittswerte der Messungen bei Patienten mit DN und den Vergleichspatienten zeigte eine signifikant dickere BK bei den Patienten 1, 3, 4, 5 und 6.

Lediglich bei Patient 2 wurde eine im Vergleich zu den Vergleichspatienten schmalere BK gemessen. Da sich die Anzahl der Messungen aller Patienten mit DN (691 Messungen) um einen Faktor von $>1,5$ von der Anzahl der Messungen der Vergleichspatienten (1116 Messungen) unterschied und die Varianzen der Stichproben in beiden Gruppen signifikant unterschiedlich war wurde ein approximativer Zweistichproben Gaußtest anstelle eines t-tests durchgeführt, welcher einen statistisch signifikanten Unterschied im Gruppenvergleich der Patienten mit DN mit den Vergleichspatienten erbrachte. Im Vergleich zu den lichtmikroskopisch erhobenen Messungen der BK zeigte das Ausmaß der Dickenzunahme gemessen per TEM teilweise diskrepante Befunde. So ergaben sich für die Patienten 2, 4, 5 und 6 in der lichtmikroskopischen Messung ähnliche absolute Werte der Dickenmessung der BK, während sie in den transkriptionselektronenmikroskopischen Messungen deutliche Unterschiede aufwiesen. Auch war die Varianz der Messungen innerhalb der Vergleichspatienten, erhoben per Lichtmikroskopie, im Vergleich zur TEM deutlich geringer.

Zwei wesentliche Einschränkungen tragen zu diesen Beobachtungen bei. Zum einen ist die Fallzahl von in der Regel einem Glomerulus pro Patient zu gering, um eine Aussage über den Durchschnitt aller Glomeruli des Patienten zu tätigen. Zum anderen wird für die transmissionselektronenmikroskopische Auswertung der kortexnahe Abschnitt des Stanzylinders verwendet, da in der Routinediagnostik die lichtmikroskopische Beurteilung des Gewebes von übergeordneter Bedeutung ist. Die Selektion eines Glomerulus zur TEM unterliegt einem Selektionsbias, da aus dem Semidünnschnitt ein für die TEM gut geeignetes Glomerulus selektiert wird. Dies ist jedoch nicht immer repräsentativ für den Gesamtbefund der Glomeruli in der erkrankten Niere. Glomerulopathien beginnen in ihrer Ausprägung bei den ältesten, innersten Glomeruli und schreiten dann Richtung Kortex fort. Daher weisen die medullanahen Glomeruli in der Regel stärkere Pathologien als die kortexnahen Glomeruli auf, welche für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung zur Verfügung stehen. Dadurch ist die Aussagekraft der transmissionselektronenmikroskopischen Messungen eingeschränkt und dies erklärt auch die diskrepanten Befunde zwischen den lichtmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Messungen.

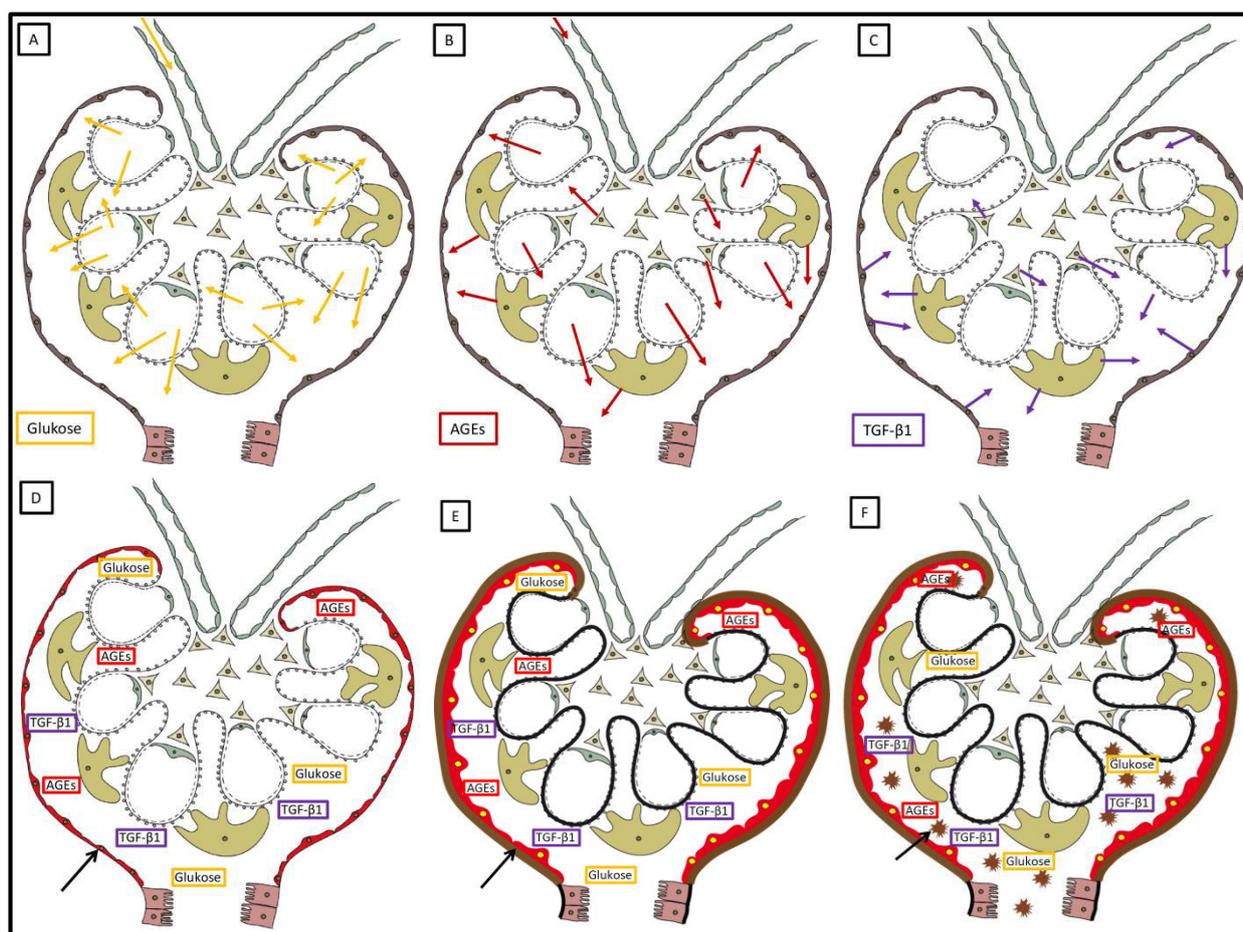


Abbildung 43: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Abläufe bei der Verdickung der Bowman'schen Kapsel durch die parietale Epithelzelle. A) Blutserum mit hyperglykämischen Blutzuckerwerten wird frei durch die GBM filtriert und erhöht die Glukosekonzentration des Primärharns im Bowman'schen Kapselraums (gelbe Pfeile). B) AGEs werden abhängig von ihrer Größe durch die GBM filtriert oder durch Mesangialzellen und Podozyten produziert und sezerniert (rote Pfeile). C) TGF- β 1 wird von Podozyten, Mesangialzellen und parietalen Epithelzellen produziert und in den Bowman'schen Kapselraum sezerniert (lila Pfeile). D) Diese Stimulantien aktivieren die parietale Epithelzelle (schwarzer Pfeil, rote parietale Epithelzellen), welche ihre morphologische Struktur ändert. E) Die aktivierte parietale Epithelzelle produziert vermehrt extrazelluläre Matrix, die sie basal in der Bowman'sche Kapsel abgelagert und dadurch verdickt (schwarzer Pfeil, braune und verdickte Bowman'sche Kapsel). F) Außerdem sezerniert sie Kollagen in den Bowman'schen Kapselraum (schwarzer Pfeil) welches im Urin messbar wird.

Limitationen der Studie

Als Limitation und gleichzeitig Ergebnis der Studie sind die diskrepanten Ergebnisse der Experimente beider Zelllinien zu nennen. Da die Zellkulturexperimente dazu dienten, den pathophysiologischen Mechanismus hinter der Verdickung der BK in den humanen Nierenbiopsien aufzuklären, war hierzu auch die Verwendung einer humanen Zelllinie notwendig. Diese wurde aus einer humanen Niere nach immunomagnetischer Selektion von Zellen mit den Oberflächenmarkern CD133 und CD24 gewonnen [20]. Somit können diese Zellen nicht repräsentativ für alle PECs eines Glomerulus stehen, sondern stellen die Untergruppe der renalen Vorläuferzellen der PECs am Harnpol des Glomerulus dar. Diese maßgebliche Einschränkung in der Gewinnung der humanen Zelllinie machte zur Verifizierung der in der humanen Zelllinie gewonnenen Ergebnisse die Verwendung einer „robusteren“ murine Zelllinie notwendig. Die murine Zelllinie wurde im Forschungslabor von Prof. Shankland charakterisiert und aus einer H-2K^b-tsA58 Mauslinie generiert. Dieses thermolabile Tumor-Antigen wird durch den SV40 Virus kodiert (tsA58TAG) und durch den Histokompatibilitäts-Komplex H-2Kb Klasse I Promoter in diesen Mäusen kontrolliert. Die Expression von tsA58TAG kann durch Hinzugabe von Interferonen verstärkt werden. Bei 33°C ist tsA58TAG dann aktiviert und immortalisiert die Zellen durch Inaktivierung von p53 [94]. Die Niere von Mäusen der H-2K^b-tsA58 Mauslinie werden durch Sieben in Zellkulturmedium gebracht und Glomeruli mit vorhandener BK selektiert. Nach Zellexpansion dieser Glomeruli werden die möglichen PECs subkloniert und wiederum nach morphologischen Kriterien selektiert. Eine Charakterisierung der Zellen erfolgte durch die Verwendung von Claudin-1, Claudin-2 und PGP9.5. Der Vergleich der Experimente unter Verwendung der humanen und murinen Zelllinie erbrachte teils diskrepante Ergebnisse. Dies ist zugleich Limitation, sowie Ergebnis der Studie, da diese auf mögliche pathophysiologische Unterschiede in der Verdickung der BK zwischen den Erkrankungsmodellen der DN im Mausmodell und dem Menschen hinweisen. Weitere Untersuchungen des Einflusses der PECs auf die BK im Mausmodell sollten diese Hinweise auf die pathophysiologischen Unterschiede berücksichtigen.

Eine weitere Limitation der Studie stellt die geringe Stimulationszeit mit Glukose, AGEs und TGF- β 1 für maximal 72h dar. Bei einer Stimulationszeit mit Glukose länger als 72h besteht die Gefahr der Bildung von AGEs, was in der Folge die Standardisierung der

Stimulationsbedingungen erschwert. Das Auftreten von DN ist jedoch von einer langjährigen schweren DM Erkrankung, oftmals begleitet von Komorbiditäten wie arterieller Hypertonie oder metabolischem Syndrom, geprägt. Diese Bedingungen können Zellkulturexperimente nicht entsprechend abbilden. Bei den histologischen Untersuchungen dieser Arbeit ist nur eine sehr limitierte Anzahl an Patienten und Vergleichspatienten abgebildet, was die statistische Aussagekraft einschränkt. Zusätzlich hatten alle dieser Patienten eine Nierenfunktionseinschränkung, was zur Nierenbiopsie dieser Patienten führte. Dieses Vorgehen entspricht einem Selektionsbias der Patienten mit DN nach Nierenfunktionseinschränkung und bildet daher nicht die Vielzahl der Stadien der DN ab.

4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen DN und Verdickung der BK durch aktivierte PECs gezeigt werden.

Der Einfluss der PECs auf die Dicke der BK besteht in einer verstärkten Bildung von Kollagenen mit basaler Ablagerung. Die Untersuchungen in den humanen und murinen PECs ergaben auch Hinweise auf den Mechanismus der Kollagenbildung bei DN und Aktivierung eines positiven Feedbackmechanismus von TGF- β 1.

Wegen der kleinen Fallzahl von sechs Patienten mit DN kann eine stadienabhängige Verdickung der BK nur vermutet werden. Klinisch sind die fibrosierenden Eigenschaften der PECs bei DN wichtig, weil die Glomerulosklerose nicht nur die regenerativen Eigenschaften der PECs und die Funktion der BK als mögliche zweite glomeruläre Barriere negativ beeinflusst, sondern auch durch die Obliteration des Bowman'schen Kapselraumes aktiv an der Schädigung der Glomeruli beteiligt ist. Geplante zukünftige Studien werden an einer höheren Fallzahl an Patienten zeigen müssen, ob zwischen der Dicke der BK und den Stadien der DN ein Zusammenhang besteht, was v.a. in der pathologischen Diagnostik der DN bedeutend wäre.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Bueters, R.R., N.C. van de Kar, and M.F. Schreuder, *Adult Renal Size is Not a Suitable Marker for Nephron Numbers: An Individual Patient Data Meta-Analysis*. *Kidney Blood Press Res*, 2013. **37**(6): p. 540-6.
2. Chmielewski, C., *Renal physiology series: Part 1 of 8. Renal anatomy and overview of nephron function*. *ANNA J*, 1992. **19**(1): p. 34-8.
3. Lang, F., [The basics of kidney physiology]. *Pharm Unserer Zeit*, 2006. **35**(4): p. 294-301.
4. Bulger, R.E., *Kidney morphology: update 1985*. *Toxicol Pathol*, 1986. **14**(1): p. 13-25.
5. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, 2006.
6. Romagnani, P., *Toward the identification of a "renopietic system"?* *Stem Cells*, 2009. **27**(9): p. 2247-53.
7. Nishinakamura, R., *Stem cells in the embryonic kidney*. *Kidney Int*, 2008. **73**(8): p. 913-7.
8. Rosenblum, N.D., *Developmental biology of the human kidney*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2008. **13**(3): p. 125-32.
9. Dan L. Longo, A.S.F., Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo, *Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage*. ABW Wissenschaftsverlag, 2012.
10. Grouls, S., et al., *Lineage specification of parietal epithelial cells requires beta-catenin/Wnt signaling*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**(1): p. 63-72.
11. Merkel, C.E., C.M. Karner, and T.J. Carroll, *Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt?* *Pediatr Nephrol*, 2007. **22**(11): p. 1825-38.
12. Bowman, W., *On the Structure and Use of the Malpighian Bodies of the Kidney, with Observations on the Circulation*. . London, R. and J. E. Taylor, 1842.
13. Ohse, T., et al., *A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **297**(6): p. F1566-74.
14. Arakawa, M. and J. Tokunaga, *A scanning electron microscope study of the human Bowman's epithelium*. *Contrib Nephrol*, 1977. **6**: p. 73-8.
15. Ohse, T., et al., *The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review*. *Kidney Int*, 2009. **76**(12): p. 1225-38.
16. Shimizu, M., et al., *Role of integrin-linked kinase in epithelial-mesenchymal transition in crescent formation of experimental glomerulonephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(9): p. 2380-90.
17. Ng, Y.Y., et al., *Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation*. *Nephrol Dial Transplant*, 1999. **14**(12): p. 2860-72.
18. Smeets, B., et al., *Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(12): p. 2593-603.
19. Anders, H.J., *Four danger response programs determine glomerular and tubulointerstitial kidney pathology: clotting, inflammation, epithelial and mesenchymal healing*. *Organogenesis*, 2012. **8**(2): p. 29-40.
20. Sagrinati, C., et al., *Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(9): p. 2443-56.

21. Lazzeri, E., et al., *Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(12): p. 3128-38.
22. Appel, D., et al., *Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 333-43.
23. Hakrrouch, S., et al., *Extensive Podocyte Loss Triggers a Rapid Parietal Epithelial Cell Response*. Journal of the American Society of Nephrology, 2013.
24. Smeets, B., et al., *Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(12): p. 2604-15.
25. Peti-Peterdi, J. and A. Sipos, *A high-powered view of the filtration barrier*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(11): p. 1835-41.
26. Ronconi, E., et al., *Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 322-32.
27. Angelotti, M.L., et al., *Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury*. Stem Cells, 2012. **30**(8): p. 1714-25.
28. Romagnani, P. and G. Remuzzi, *Renal progenitors in non-diabetic and diabetic nephropathies*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(1): p. 13-20.
29. Romagnani, P., *Parietal epithelial cells: their role in health and disease*. Contrib Nephrol, 2011. **169**: p. 23-36.
30. Le Hir, M., et al., *Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(10): p. 2060-71.
31. Smeets, B., et al., *Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(7): p. 1262-74.
32. Lasagni, L. and P. Romagnani, *Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(10): p. 1612-9.
33. Boucher, A., et al., *Relationship between the integrity of Bowman's capsule and the composition of cellular crescents in human crescentic glomerulonephritis*. Lab Invest, 1987. **56**(5): p. 526-33.
34. Ophascharoensuk, V., et al., *Role of intrinsic renal cells versus infiltrating cells in glomerular crescent formation*. Kidney Int, 1998. **54**(2): p. 416-25.
35. Gaffney, E.F., *Prominent parietal epithelium: a common sign of renal glomerular injury*. Hum Pathol, 1982. **13**(7): p. 651-60.
36. Najafian, B., et al., *Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(4): p. 908-17.
37. Cohen, M.P., G.T. Lautenslager, and C.W. Shearman, *Increased urinary type IV collagen marks the development of glomerular pathology in diabetic d/db mice*. Metabolism, 2001. **50**(12): p. 1435-40.
38. Taugner, R., et al., *Cell junctions in the epithelium of Bowman's capsule*. Cell Tissue Res, 1976. **172**(4): p. 431-46.
39. Mbassa, G., M. Elger, and W. Kriz, *The ultrastructural organization of the basement membrane of Bowman's capsule in the rat renal corpuscle*. Cell Tissue Res, 1988. **253**(1): p. 151-63.
40. Mulholland, D.J., et al., *Distribution of actin bundles in Bowman's capsule of rat kidney*. Tissue Cell, 1999. **31**(6): p. 610-6.
41. Steinmetz, O.M., et al., *A pitfall of glomerular sieving: profibrotic and matrix proteins derive from the Bowman's capsule and not the glomerular tuft in rats with renovascular hypertension*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(10): p. 3055-60.

42. Ninomiya, Y., et al., *Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies*. J Cell Biol, 1995. **130**(5): p. 1219-29.
43. Miner, J.H., *Renal basement membrane components*. Kidney Int, 1999. **56**(6): p. 2016-24.
44. Reutens, A.T. and R.C. Atkins, *Epidemiology of diabetic nephropathy*. Contrib Nephrol, 2011. **170**: p. 1-7.
45. Gross, J.L., et al., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment*. Diabetes Care, 2005. **28**(1): p. 164-76.
46. Mogensen, C.E. and C.K. Christensen, *Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients*. N Engl J Med, 1984. **311**(2): p. 89-93.
47. Mogensen, C.E., *Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes*. N Engl J Med, 1984. **310**(6): p. 356-60.
48. Mogensen, C.E., *Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy*. Kidney Int, 1987. **31**(2): p. 673-89.
49. Collins, A.J., et al., *Excerpts from the United States Renal Data System 2003 Annual Data Report: atlas of end-stage renal disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2003. **42**(6 Suppl 5): p. A5-7, S1-230.
50. Caramori, M.L. and M. Mauer, *Diabetes and nephropathy*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(3): p. 273-82.
51. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(1): p. 4-14.
52. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
53. Rossing, P., *Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(6): p. 479-83.
54. Mogensen, C.E., C.K. Christensen, and E. Vittinghus, *The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy*. Diabetes, 1983. **32 Suppl 2**: p. 64-78.
55. Ritz, E. and A. Stefanski, *Diabetic nephropathy in type II diabetes*. Am J Kidney Dis, 1996. **27**(2): p. 167-94.
56. Gonzalez Suarez, M.L., et al., *Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy?* World J Diabetes, 2013. **4**(6): p. 245-255.
57. McClelland, A., S. Hagiwara, and P. Kantharidis, *Where are we in diabetic nephropathy: microRNAs and biomarkers?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(1): p. 80-6.
58. Argyropoulos, C., et al., *Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54662.
59. Szeto, C.C., et al., *Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases*. Dis Markers, 2012. **33**(3): p. 137-44.
60. Zhuo, L., et al., *Evaluation of renal biopsies in type 2 diabetic patients with kidney disease: a clinicopathological study of 216 cases*. Int Urol Nephrol, 2013. **45**(1): p. 173-9.
61. Hironaka, K., et al., *Nondiabetic renal disease complicating diabetic nephropathy*. J Diabet Complications, 1991. **5**(2-3): p. 148-9.
62. Wong, T.Y., et al., *Renal outcome in type 2 diabetic patients with or without coexisting nondiabetic nephropathies*. Diabetes Care, 2002. **25**(5): p. 900-5.
63. He, F., et al., *Diabetic retinopathy in predicting diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes and renal disease: a meta-analysis*. Diabetologia, 2013. **56**(3): p. 457-66.

64. Prakash, J., et al., *Diabetic retinopathy is a poor predictor of type of nephropathy in proteinuric type 2 diabetic patients*. J Assoc Physicians India, 2007. **55**: p. 412-6.
65. Mak, S.K., et al., *Clinical predictors of non-diabetic renal disease in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(12): p. 2588-91.
66. Gambaro, G., et al., *Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients: the Di.N.A.S. randomized trial*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(6): p. 1615-25.
67. Bolton, W.K., et al., *Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy*. Am J Nephrol, 2004. **24**(1): p. 32-40.
68. de Zeeuw, D., et al., *Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease*. N Engl J Med, 2013. **369**(26): p. 2492-503.
69. Harris, R.D., et al., *Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin dependent diabetes*. Kidney Int, 1991. **40**(1): p. 107-14.
70. Heilig, C.W., et al., *Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1802-14.
71. Mishra, R., et al., *High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells*. Kidney Int, 2005. **67**(1): p. 82-93.
72. Lin, C.L., et al., *Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(10): p. 2812-20.
73. Wolf, G., S. Chen, and F.N. Ziyadeh, *From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1626-34.
74. Nishikawa, T., et al., *Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77 Suppl 1**: p. S41-5.
75. Vasavada, N. and R. Agarwal, *Role of oxidative stress in diabetic nephropathy*. Adv Chronic Kidney Dis, 2005. **12**(2): p. 146-54.
76. Suzuki, D., et al., *Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 822-32.
77. Yamagishi, S. and T. Matsui, *Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy*. Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(2): p. 101-8.
78. Mott, J.D., et al., *Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility*. Kidney Int, 1997. **52**(5): p. 1302-12.
79. Brownlee, M., *Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications*. Diabetes, 1994. **43**(6): p. 836-41.
80. Singh, A.K., et al., *Effect of glycated proteins on the matrix of glomerular epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(5): p. 802-10.
81. Li, J.H., et al., *Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease*. FASEB J, 2004. **18**(1): p. 176-8.
82. Li, J.H., et al., *Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway*. Am J Pathol, 2004. **164**(4): p. 1389-97.
83. Mao, Y., et al., *The involvement of advanced glycation endproducts (AGEs) in renal injury of diabetic glomerulosclerosis: association with phenotypic change in renal cells and infiltration of immune cells*. Clin Exp Nephrol, 2003. **7**(3): p. 201-9.
84. Beisswenger, P.J., et al., *Detection of diabetic nephropathy from advanced glycation endproducts (AGEs) differs in plasma and urine, and is dependent on the method of preparation*. Amino Acids, 2014. **46**(2): p. 311-9.

85. Kanwar, Y.S., et al., *Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 4-11.
86. Yamagishi, S., et al., *Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(8): p. 952-9.
87. Dronavalli, S., I. Duka, and G.L. Bakris, *The pathogenesis of diabetic nephropathy*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(8): p. 444-52.
88. Sharma, K., et al., *Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor-beta1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients*. Am J Kidney Dis, 1999. **34**(5): p. 818-23.
89. Chen, S., et al., *Angiotensin II stimulates alpha3(IV) collagen production in mouse podocytes via TGF-beta and VEGF signalling: implications for diabetic glomerulopathy*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(7): p. 1320-8.
90. Sharma, K. and F.N. Ziyadeh, *Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator*. Diabetes, 1995. **44**(10): p. 1139-46.
91. Abbate, M., et al., *Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis*. Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 2179-93.
92. Benigni, A., et al., *Add-on anti-TGF-beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(7): p. 1816-24.
93. Lee, H.B., et al., *Radical approach to diabetic nephropathy*. Kidney Int Suppl, 2007(106): p. S67-70.
94. Ohse, T., et al., *Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal epithelial cells in culture*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(10): p. 1879-90.
95. Ha, T.S., et al., *Regulation of type IV collagen alpha chains of glomerular epithelial cells in diabetic conditions*. J Korean Med Sci, 2009. **24**(5): p. 837-43.
96. Ha, T.S., C.J. Song, and J.H. Lee, *Effects of advanced glycosylation endproducts on perlecan core protein of glomerular epithelium*. Pediatr Nephrol, 2004. **19**(11): p. 1219-24.
97. Kanasaki, K., G. Taduri, and D. Koya, *Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 7.
98. Kim, E.Y. and S.E. Dryer, *Effects of insulin and high glucose on mobilization of slo1 BKCa channels in podocytes*. J Cell Physiol, 2011. **226**(9): p. 2307-15.
99. Sango, K., et al., *Immortalized adult rodent Schwann cells as in vitro models to study diabetic neuropathy*. Exp Diabetes Res, 2011. **2011**: p. 374943.
100. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
101. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.
102. Engvall, E., K. Jonsson, and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes*. Biochim Biophys Acta, 1971. **251**(3): p. 427-34.
103. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
104. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic*

- detection with antibody and radioiodinated protein A.* Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
105. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
106. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
107. M. Knoll, E.R., *Das Elektronenmikroskop.* Zeitschrift für Physik A, 1932. **78**: p. 318-339.
108. Tervaert, T.W., et al., *Pathologic classification of diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 556-63.
109. Yoon, J.J., et al., *Poria cocos inhibits high glucose-induced proliferation of rat mesangial cells.* Am J Chin Med, 2013. **41**(1): p. 71-83.
110. McCarthy, A.D., S.B. Etcheverry, and A.M. Cortizo, *Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development.* Acta Diabetol, 2001. **38**(3): p. 113-22.
111. Shankland, S.J., H.J. Anders, and P. Romagnani, *Glomerular parietal epithelial cells in kidney physiology, pathology, and repair.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013.
112. Qian, Y., et al., *From fibrosis to sclerosis: mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy.* Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1439-45.
113. Misra, S., et al., *Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy.* FEBS J, 2011. **278**(9): p. 1429-43.
114. Johnson, P. and B. Ruffell, *CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases.* Inflamm Allergy Drug Targets, 2009. **8**(3): p. 208-20.
115. Cichy, J. and E. Pure, *The liberation of CD44.* J Cell Biol, 2003. **161**(5): p. 839-43.
116. Fatima, H., et al., *Parietal epithelial cell activation marker in early recurrence of FSGS in the transplant.* Clin J Am Soc Nephrol, 2012. **7**(11): p. 1852-8.
117. Fanni, D., et al., *CD44 immunoreactivity in the developing human kidney: a marker of renal progenitor stem cells?* Ren Fail, 2013. **35**(7): p. 967-70.
118. Lehmann, R.R., et al., *Changes of euchromatin/heterochromatin ratios in cell nuclei of the aortic adventitia in diabetic rats.* Artery, 1987. **14**(2): p. 66-75.
119. Umezono, T., et al., *Glomerular expression of CTGF, TGF-beta 1 and type IV collagen in diabetic nephropathy.* J Nephrol, 2006. **19**(6): p. 751-7.
120. Zhao, Y. and D.A. Geverd, *Regulation of Smad3 expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a negative feedback loop of TGF-beta signaling.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(2): p. 319-23.
121. Yang, K.M., et al., *DRAK2 participates in a negative feedback loop to control TGF-beta/Smads signaling by binding to type I TGF-beta receptor.* Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1286-99.
122. Lee, S.H., et al., *Expression of TGF-beta-induced matrix protein betaig-h3 is up-regulated in the diabetic rat kidney and human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose.* Kidney Int, 2003. **64**(3): p. 1012-21.
123. Li, J.H., et al., *Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions.* Kidney Int, 2003. **63**(6): p. 2010-9.
124. Liu, L., et al., *Notch Signaling Molecules Activate TGF-beta in Rat Mesangial Cells under High Glucose Conditions.* J Diabetes Res, 2013. **2013**: p. 979702.
125. Karsenty, G. and R.W. Park, *Regulation of type I collagen genes expression.* Int Rev Immunol, 1995. **12**(2-4): p. 177-85.
126. Danne, T., M.J. Spiro, and R.G. Spiro, *Effect of high glucose on type IV collagen production by cultured glomerular epithelial, endothelial, and mesangial cells.* Diabetes, 1993. **42**(1): p. 170-7.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGE	Advanced glycation endproduct
BK	Bowman'sche Kapsel
BSA	Bovines Serum-Albumin
cDNA	Komplementäre DNA
CT	Cycle threshold
Depc	Diethyldicarbonat
DM	Diabetes mellitus
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
FBS	Fetales bovines Serum
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
kDa	Kilo dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OD	Optical density
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PAS	Perjodsäure Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEC	Parietale Epithelzelle
PKC	Proteinkinase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems
RAGE	Rezeptor der AGEs
real-time PCR	Real-time Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktiven Oxidationsprodukten
RPM	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standard error of the mean
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	Versus

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Einfluss der parietalen Epithelzellen auf die Bowman’sche Kapsel bei diabetischer Nephropathie“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Dr. med. univ. Alexander Dominik Holderied

München, 05.12.2014

DANKSAGUNG

...und ganz zum Schluss das Erfreuliche: mir fällt bei der Abgabe dieser Arbeit auf, dass ich während der letzten eineinhalb Jahre eine ganz ordentliche (wissenschaftliche) Entwicklung durchgemacht habe. Damit meine ich jedoch nicht nur das Faktenwissen und Denkkonzepte, sondern eine Reihe weiterer Aspekte erfolgreicher medizinischer Grundlagenforschung, die ich erlernt und erlebt habe. Es waren folgende Personen, die daran einen entscheidenden Beitrag hatten:

Heni Susanti, Simone Romoli, Julian Marschner und Satish Devarapu haben mir nicht nur verschiedene Labormethoden, Auswerte- und Troubleshootingstrategien, und vieles mehr beigebracht. Viel wichtiger noch haben sie sich Problemen aus meinem Projekt angenommen und mir mit ihren besonderen Fachkenntnissen und Beharrlichkeit bei der Problemlösung entscheidend geholfen. Somit wurde diese Problemlösung oftmals von einem frustrierenden Erlebnis zu einer Teamarbeit, die mir wirklich viel Spaß gemacht hat und auch letztlich die Lösung des Problems und gute Ergebnisse erbrachte.

Eine tolle Zusammenarbeit hat sich auch mit Frau PD Dr. Susanna Müller über die Monate entwickelt. Vor allem weil ich mir Ihrer täglichen Arbeitsbelastung bewusst bin, weiß ich die vielen Stunden, die Sie in mein Projekt investiert hat, sehr zu schätzen. Ohne Sie wäre die Anfertigung dieser Dissertation in der Form nicht möglich gewesen, weil durch Ihre Hilfe erst die Bedeutung der Ergebnisse aus der Zellkultur beim Patienten hergestellt werden konnte.

Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. Hans-Joachim Anders danken. Er ist entscheidend verantwortlich für meine Begeisterung für nephrologische Forschung, die ich in den letzten eineinhalb Jahren entwickelt habe. Er lebt das Leben eines erfolgreichen „physician scientist“ vor, das ich von keinem Hochschullehrer besser erlernen könnte. Ich möchte mich bei Ihm für die ausgesprochene Förderung und das große Vertrauen bedanken und freue mich auf die kommenden Herausforderungen.

Es sind diese Personen zusammen mit den weiteren Kollegen und Freunden im Labor, die mich so sicher sein lassen, bei dem Karriereweg des „physician scientist“ eine richtige

Entscheidung getroffen zu haben. Ich freue mich auf die kommen Jahre in genau diesem inspirierenden und freundlichen Umfeld.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinen Eltern Petra und Alfred, bei meiner Schwester Sarah und bei meiner Freundin Christina bedanken. Sie durchleben alle Phasen der Freude und auch des Frustes mit mir, halten mir den Rücken frei und unterstützen mich unablässig und haben deshalb einen großen Anteil an der erfolgreichen Abgabe dieser Dissertation.