

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Charakterisierung einer neuen, FSGS-assoziierten *ACTN4* Mutation im Podozyten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sebastian Dittrich
aus Mönchengladbach

promoviert am 27. März 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Danksagung

Nach langer, intensiver Zeit im Studium und während der klinischen Tätigkeit ist diese Dissertationsschrift nun fertiggestellt. Ich bedanke mich zuallererst bei Herrn Professor Benzing und Herrn Professor Schermer, die mir die Möglichkeit gegeben haben, in Ihrer Klinik bzw. ihrem Labor an der Fertigstellung dieses Projektes zu arbeiten. Ich bedanke mich auch bei Martin Höhne, der mich bei meinen ersten Schritten an der Bench begleitet hat und mir mit seiner Menschlichkeit und seinem offenen Ohr immer zur Seite stand.

Diese Doktorarbeit wäre ohne die unschätzbare Unterstützung meiner Familie und Freunde nie entstanden. Abgesehen vom inhaltlichen Input, der meine berufliche Zukunft wesentlich geprägt hat, hat die Zeit im Nephrolabor dazu geführt, dass ich viele wundervolle Menschen kennengelernt habe, die meine Freunde geworden sind. Hierbei möchte ich insbesondere Madlen Kaldirim nennen, die mit mir produktive Sessions im leeren Büro des Nephrolabors verbracht hat. Zu keiner Zeit hat diese Dissertationsschrift mehr Fortschritt gemacht. Ich bedanke mich ganz besonders bei Malte Bartram, der mich neben der unschätzbaren inhaltlichen Unterstützung wesentlich in der Finalisierung dieser Arbeit unterstützt hat und zu jeder Zeit mein erster Ansprechpartner war. Ich bedanke mich außerdem bei meiner Freundin Vera Nied, die mich in der intensiven Phase vor Einreichung dieser Promotionsarbeit zu jeder Zeit unterstützt hat. Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die alle meiner Sorgen mit mir geteilt haben und immer bedingungslos für mich da waren. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Für meine Eltern Susanne und Georg Dittrich

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	10
2.1. Chronische Nierenerkrankungen	10
2.2. Fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS)	11
2.3. Der Podozyt und die Schlitzmembran	12
2.4. Das Zytoskelett des Podozyten	16
2.5. Alpha-Aktinin-4	18
2.6. Vordaten aus dem nephrologischen Forschungslabor	19
2.7. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	24
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1. Material	26
3.1.1. Antikörper	26
3.1.2. Puffer	27
3.1.3. Enhanced chemiluminescence (ECL)	28
3.1.4. Primer	28
3.1.5. Enzyme	29
3.1.6. Bakterien	29
3.1.7. Plasmide	29
3.1.8. Zellen	30
3.1.9. Zellkulturmedien und Reagenzien	31
3.1.10. Kits	32
3.2. Methoden	32
3.2.1. Zellkultur	32
3.2.2. Transfektion	32
3.2.3. Herstellung von Proteinlysaten	33

3.2.4.	Immunfluoreszenzfärbung	33
3.2.5.	SDS-PAGE	34
3.2.6.	Western Blot	34
3.2.7.	Visualisierung mittels ECL oder Immunfluoreszenz	34
3.2.8.	Mutagenese mittels Quickchange-PCR	35
3.2.9.	Gateway-Klonierung für pLenti	36
3.2.10.	Bakterielle Transformation und Amplifikation	36
3.2.11.	Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.12.	Sequenzierung	37
3.2.13.	Etablierung stabiler Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion	38
3.2.14.	Aktin-Fraktionierungsassay	39
3.2.15.	Zellzählungen	39
3.2.16.	Statistik	40
4.	ERGEBNISSE	41
4.1.	Funktionelle Analysen von ACTN4-M240T im Zellkulturmodell	41
4.2.	ACTN4-M240T löst eine DNA-Schadensantwort in MOIN-Podozyten aus	46
4.3.	Analysen zur Proteinstabilität von ACTN4-M240T	47
5.	DISKUSSION	50
5.1.	DNA-Schadensantwort	51
5.2.	Zytoskelett	53
5.3.	Proteinstabilität	54
5.4.	Limitationen	54
5.5.	Ausblick	55
6.	LITERATURVERZEICHNIS	56
7.	ANHANG	61
7.1.	Abbildungsverzeichnis	61
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN	62

Abkürzungsverzeichnis

ABD	Aktin-bindende Domäne
Arp2/3	Aktin-ähnliches Protein 2/3 Komplex
ca.	Circa
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
CDC42	Cell division control protein 42 homolog
Cdh1	Cadherin-1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. Coli	Escherichia coli
ECL	Verbesserte Chemolumineszenz
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (Green fluorescent protein)
GBM	Glomeruläre Basalmembran
h	Stunde/n
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen (Human embryonic kidney)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilo-Basen
kDa	KiloDalton (1.000 Dalton)
mA	Milliampere
Min	Minute/n
NDS	Normal donkey serum/Eselserum
NPHS1	Nephrin

NPHS2	Podocin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PFA	Paraformaldehyd
QC	Quick change
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SYNPO	Synaptopodin
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
V	Volt
W	Watt
WCL	Ganzzelllysate (whole cell lysate)

1. Zusammenfassung

Ein zentraler Baustein für die Funktion der Nieren sind ihre Filtrationseinheiten, die Glomeruli. Hierbei ist der Podozyt – eine hochspezialisierte Epithelzelle - als wesentlicher Strukturgeber von großer Bedeutung. Ein wesentlicher Baustein ist hierbei das podozytäre Zytoskelett, das neben der strukturellen Funktion auch in der Signaltransduktion und der hochdynamischen Zellmotilität eine wichtige Rolle spielt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit erfolgte die Untersuchung und Charakterisierung einer bislang unbekanntes *de novo* Mutation des humanen *ACTN4*-Gens im Zellkulturmodell des Podozyten. Alpha-Aktinin-4 ist hierbei ein bekannter, entscheidender Baustein und Regulator des podozytären Zytoskeletts. Die hier präsentierten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die hier untersuchte Punktmutation zu einer Veränderung des Zytoskeletts und der Proliferation der betreffenden Zellen führt. Die Überexpression der Mutante löste in Podozyten im Zellkulturmodell eine DNA-Schadensantwort mit verkürzter Lebensdauer aus. Weiterhin zeigen die Untersuchungen eine deutliche Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts, mit Formierung großer, F-Aktin-positiver Aggregate. Bioinformatik-basierte Prädiktionen lassen auf eine Verringerung der thermodynamischen Stabilität der Mutante durch die Punktmutation schließen.

Die vorliegenden Ergebnisse ergänzen Daten zu bereits publizierten Mutationen von *ACTN4* hinsichtlich der Beeinflussung des podozytären Zytoskeletts und sprechen dafür, dass diese neue, erstmalig beschriebene Variante tatsächlich krankheitsverursachend ist.

Ein neuer Aspekt – auch im Vergleich zu bekannten pathogenen *ACTN4* Varianten - ist die Induktion einer DNA-Schadenssignatur mit Absterben der Podozyten bei Überexpression. Ob dies der Effekt einer ausgeprägten Toxizität der Mutante und der entstehenden Aggregate in diesem *in vitro* Model ist oder ob auch spezifische nukleäre Funktionen von Aktinin-4 im Zellkern hier eine Rolle spielen, kann durch die bislang durchgeführten Experimente nicht eruiert werden. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere mit Bestätigung und Erweiterung der Daten im Tiermodell.

2. Einleitung

2.1. Chronische Nierenerkrankungen

Die paarig angelegten Nieren des Menschen filtern pro Tag etwa 180 Liter nahezu proteinfreien Primärharn und erfüllen viele wichtige Funktionen: Neben der Regulierung des Wasserhaushaltes und Entgiftung des Körpers durch das Ausscheiden harnpflichtiger Substanzen über den Urin tragen sie wesentlich zur Regulation des Elektrolyt- und Säure-/Basen-Haushalts, sowie des Blutdrucks und der Blutbildung bei. Jede Niere besteht aus etwa einer Millionen Nephrone, die jeweils eine funktionelle Einheit bilden. Nephrone bestehen aus einem Glomerulus, das von einem Kapillarknäul durchzogen wird und die glomeruläre Filtrationsbarriere als makromolekularen Filter beinhaltet. Von diesem aus erfolgt eine Filtration des einströmenden Blutes mit Entstehung des Primärharns, der dann in den schlauchförmigen Tubuli weiter konzentriert und modifiziert wird.

Inzidenz und Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen in der Gesamtbevölkerung steigen seit Jahren an und unterscheiden sich je nach Region beträchtlich¹. Aktuellen Daten nach leiden mindestens 2 Millionen Menschen in Deutschland an einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), definiert als eine GFR <60ml/Minute². Weitere Daten aus den USA zeigen eine Prävalenz von etwa 15% der Gesamtbevölkerung³ für jegliche Form der chronischen Nierenerkrankung.

Chronische Nierenerkrankungen können im Verlauf in die sogenannte terminale Niereninsuffizienz übergehen, welche dann ein Nierenersatzverfahren wie die Dialyse oder eine Nierentransplantation erforderlich macht. Die wenigsten Patient:innen erreichen jedoch dieses Stadium, da chronische Nierenerkrankungen zudem ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sind^{4,5}. All diese Faktoren lassen chronische Nierenerkrankungen zu einem wesentlichen Kostentreiber im Gesundheitswesen werden³.

Nierenerkrankungen können anhand des zugrundeliegenden Schädigungsmusters in der Niere eingeteilt werden. Oftmals besteht eine Schädigung der Filtrationseinheiten der Niere, der Glomeruli. Diese Filtrationsbarriere besteht aus drei Kompartimenten: Dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und schließlich den Podozyten, die die glomeruläre Schlitzmembran bilden⁶. Erkrankungen der podozytären Seite der Filtrationsbarriere treten oftmals als nephrotisches Syndrom in Erscheinung, welches durch eine ausgeprägte Proteinurie, Hypalbuminämie, Ödeme und Dyslipidämie charakterisiert ist.

Dem nephrotischen Syndrom können sowohl eine primäre Nierenerkrankung als auch verschiedene, die Niere mitbetreffende Systemerkrankungen zu Grunde liegen. Beispielsweise kommt es häufig im Rahmen eines Diabetes mellitus oder einer arteriellen Hypertonie, bei Autoimmunerkrankungen oder bei verschiedenen Malignomen zu sekundären

Schädigungen der Niere mit der klinischen Präsentation eines nephrotischen Syndroms. Zu den häufigsten primären Ursachen eines nephrotischen Syndroms zählen die Minimal-Change-Glomerulopathie, die membranöse Glomerulonephritis und die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Die Unterscheidung zwischen diesen Ätiologien bedarf einer Nierenbiopsie mit histopathologischer Begutachtung. Während die Minimal-Change-Nephropathie bei Kindern die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms darstellt, sind die FSGS und die membranöse Glomerulonephritis bei Erwachsenen vorherrschend. Auch sekundäre Formen, die letztlich auf eine systemische Erkrankung als Auslöser der Nierenerkrankung zurückzuführen sind, machen einen beträchtlichen Anteil dieser Krankheitsbilder aus^{7,8}.

2.2. Fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

Ein mögliches morphologisches Korrelat glomerulärer Nierenerkrankungen ist die fokale segmentale Glomerulosklerose. Sie ist eine primär histopathologische Diagnose, die durch das Vorhandensein einer Vernarbung (Sklerose) in einzelnen Abschnitten mancher (segmental), aber nicht aller Glomeruli der Niere definiert und im Rahmen einer Nierenbiopsie mit anschließender nephropathologischer Begutachtung diagnostiziert wird⁹.

Inzidenz und Prävalenz der FSGS unterscheiden sich sowohl nach geographischer als auch ethnischer Herkunft: So variiert die Inzidenz zwischen 1.4 und 21 auf 1 Million, zudem sind Personen afroamerikanischer Herkunft rund fünfmal häufiger betroffen als Kaukasier^{10,11}. Daten aus den USA konnten zeigen, dass die FSGS die häufigste primär glomeruläre Ursache eines terminalen Nierenversagens in diesem Kollektiv ist¹².

Grundsätzlich gibt es sowohl primäre als auch erworbene (sekundäre) Formen der FSGS, so dass viele verschiedene Erkrankungen zu diesem Schädigungsmuster führen können. Sekundäre Formen sind insbesondere im Erwachsenenalter deutlich häufiger als primäre. Hierzu gehören beispielsweise virale Erkrankungen, bestimmte Medikamente, ein Diabetes mellitus, ein lang andauernder arterieller Hypertonus oder verschiedene Glomerulonephritiden. Bei all diesen Erkrankungen kann die FSGS die Endstrecke der Erkrankung bilden. Als primäre Formen der FSGS kommen sowohl monogenetische Ursachen, als auch zirkulierende, lösliche Faktoren in Betracht. Grundlage dieser Hypothese sind Beobachtungen, dass bei etwa 30% der Patienten mit primärer FSGS nach einer Nierentransplantation ein Rezidiv der Erkrankung auftritt, zum Teil mit gutem Ansprechen auf eine Plasmapherese, welche im Blut zirkulierende Faktoren entfernt¹³⁻¹⁵. Insbesondere der lösliche Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (suPAR) wird als ein auslösendes Pathogen diskutiert^{16,17}.

In den letzten Jahren wurden mit der verbesserten Verfügbarkeit von Sequenzierungstechniken zahlreiche monogenetische Ursachen für primäre Formen der FSGS entdeckt. Die Diagnosestellung solcher primärer Formen der FSGS erfolgt – im Gegensatz zu den vorbeschriebenen sekundären Formen – meist bereits im frühen Kindes- und Jugendalter. Hierbei sind durch die auslösende Mutation sowohl Proteine betroffen, welche unmittelbarer struktureller Bestandteil der Schlitzmembran sind, als auch Proteine des Zytoskeletts oder anderer zellulärer Bestandteile des Podozyten. Autosomal-rezessiv vererbte Varianten werden klinisch oftmals innerhalb der ersten Lebensjahre apparent, während autosomal-dominant vererbte Formen sich teils erst im Jugendalter manifestieren.

2.3. Der Podozyt und die Schlitzmembran

Podozyten sind terminal differenzierte Zellen, welche einen großen Zellkörper besitzen und davon ausgehend primäre und sekundäre Fußfortsätze ausbilden. Die sekundären Fußfortsätze benachbarter Podozyten interdigitieren miteinander und umschließen die Kapillaren des Glomerulus⁶. Dabei befindet sich zwischen diesen Fußfortsätzen ein etwa 40 nm großer Spalt, welcher durch die extrazelluläre podozytäre Schlitzmembran überbrückt wird^{18,19}.

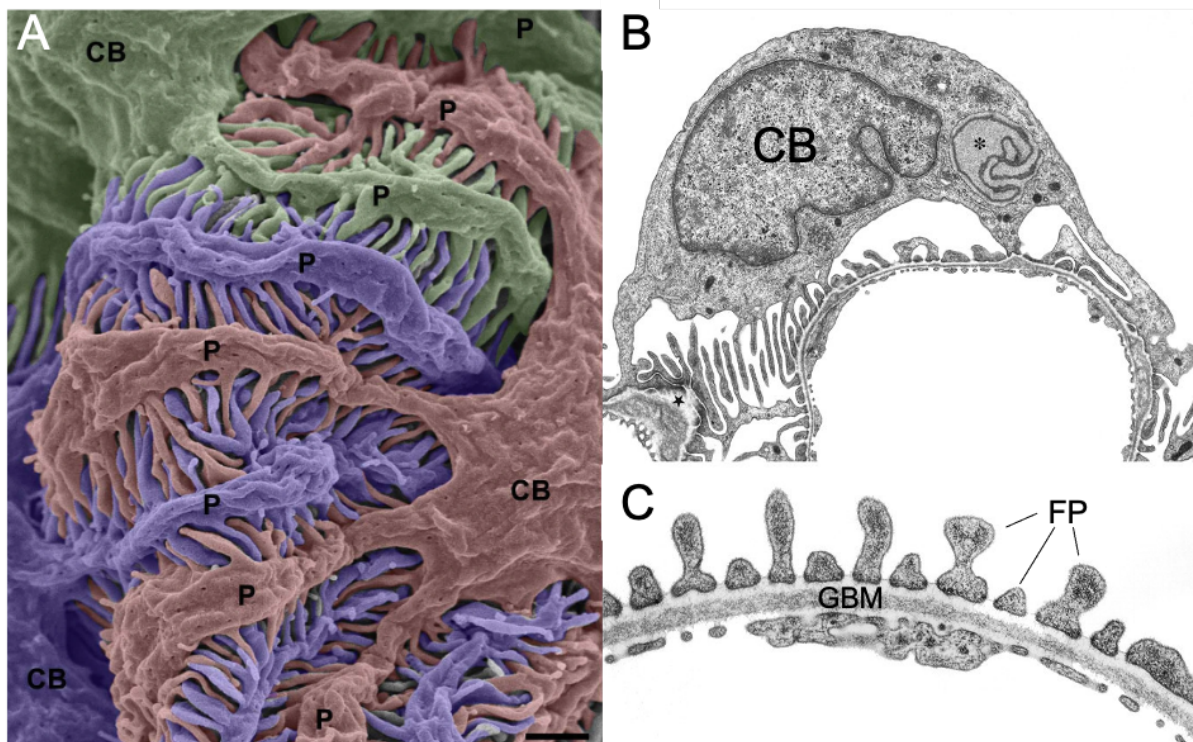


Abbildung 1: Morphologische Struktur des Podozyten und der Schlitzmembran

A. Rasterelektronenmikroskopische Visualisierung mehrerer Podozyten. Zu sehen sind die Zellkörper (CB, cell body), primäre Fortsätze (P) und die davon ausgehenden sekundären

Fußfortsätze. B-C. Transmissionselektronenmikroskopische Visualisierung der glomerulären Schlitzmembran. Dargestellt ist der Zellkörper eines Podozyten (CB), mit mehreren Fußfortsätzen (FP) und der glomerulären Basalmembran (GBM). Abbildungen aus Ichimura et al.²⁰ (A) und modifiziert von Pavenstädt et al.⁶ (B-C).

Die glomeruläre Schlitzmembran ist seit Jahrzehnten ein wesentlicher Gegenstand der nephrologischen Grundlagenforschung. Ihre Visualisierung gelang erstmals im Jahre 1955 mittels elektronenmikroskopischer Methoden²¹. Zuletzt wurde neben der Elektronenmikroskopie als weitere Methode zur Visualisierung der glomerulären Schlitzmembran die fluoreszenzbasierte STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion) etabliert: Als fluoreszenzbasiertes Verfahren ermöglicht diese, anders als die Elektronenmikroskopie, eine gleichzeitige Visualisierung verschiedener Proteine²².

Auf molekularer Ebene stellt die glomeruläre Schlitzmembran einen spezialisierten, extrazellulären Zell-Zell-Kontakt dar, welcher Elemente verschiedener Zell-Zell-Kontakte wie beispielsweise tight junctions, adherens junctions, gap junctions oder neuronaler Synapsen enthält²³⁻²⁹. Die am Schlitzmembrankomplex beteiligten Proteine besitzen im Wesentlichen vier verschiedene Funktionen: Die Ausbildung eines makromolekularen Filters, die Verankerung der Schlitzmembran mit der GBM, die intrazelluläre Vernetzung der Schlitzmembran mit dem Aktin-Zytoskelett des Podozyten und die Vermittlung verschiedener Signalkaskaden¹⁸.

Mit der zunehmenden Etablierung und Nutzbarkeit molekularbiologischer Methoden gelang seit den späten 90er Jahren des letzten Jahrtausends die Identifizierung dreier wesentlich am Schlitzmembrankomplex beteiligter Proteine. Im Jahre 1998 wurde Nephrin als Strukturgeber der Schlitzmembran identifiziert³⁰. Nephrin ist ein Transmembranprotein der Immunglobulin-Familie und besteht aus acht extrazellulären Immunglobulin-Domänen, einer Fibronektindomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil. Nephrin bildet einen Komplex mit dem Transmembranprotein Neph1^{29,31-33}. Auch Neph1 ist der Immunglobulin-Familie zugehörig, besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu Nephrin und 5 extrazelluläre Immunglobulin-Domänen³³. Die extrazellulären Domänen von Nephrin und Neph1 ragen in den Raum zwischen den Fußfortsätzen und fungieren so als makromolekularer Filter^{18,19}.

Ein weiteres zentrales Protein der Schlitzmembran ist das Membranprotein Podocin, welches im Jahre 2000 identifiziert wurde³⁴. Podocin ist ein Mitglied der Stomatin-Familie, das neben zahlreichen membranständigen Domänen einen zytoplasmatischen C- und N-Terminus besitzt. Der C-Terminus von Podocin interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von

Nephrin und sorgt so für eine Verankerung von Nephrin an der Zellmembran¹⁸. In den letzten Jahren konnten weitere Proteine identifiziert werden, die in vielfältiger Weise am Schlitzmembrankomplex beteiligt sind: Das CD2-assoziierte Protein (CD2AP) interagiert sowohl mit Podocin als auch mit Nephrin^{35,36}. CD2AP-defiziente Mäuse zeigten in Untersuchungen morphologische Korrelate einer Schädigung der Filtrationsbarriere, im Sinne eines Fußfortsatz-Verlustes und Proteinurie, zudem konnte bei mehreren Patienten mit kongenitalem nephrotischen Syndrom eine Mutation in mindestens einem Allel des Gens gefunden werden^{36,37}. Neben seiner Interaktion mit Podocin und Nephrin konnte gezeigt werden, dass CD2AP auch mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert^{38,39}.

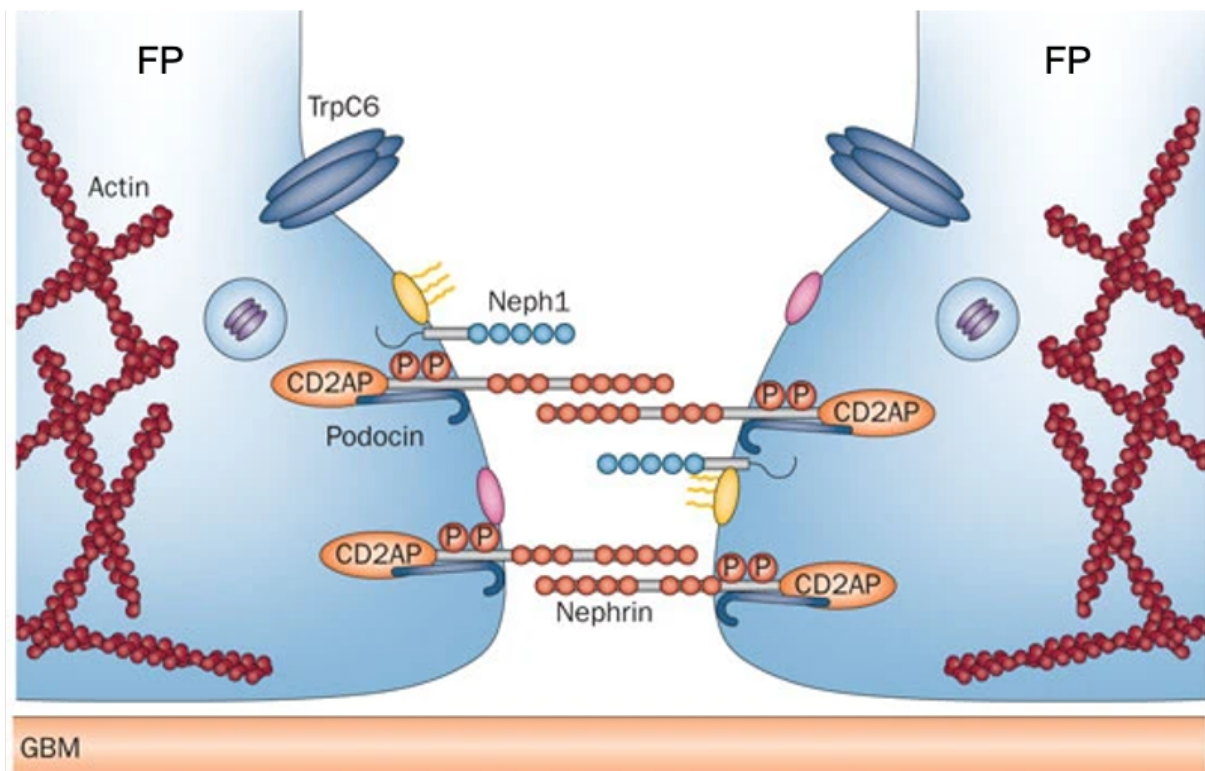


Abbildung 2: Der Schlitzmembrankomplex

Visualisierung der am Aufbau der Schlitzmembran beteiligten Proteine. Dargestellt sind die Fußfortsätze zweier benachbarter Podozyten (FP), welche den Schlitzmembrankomplex bilden. Außerdem dargestellt ist die glomeruläre Basalmembran (GBM). Modifiziert nach Grahammer et al.¹⁸.

Während man in der Vergangenheit zunächst morphologisch von einer eher starren, reißverschlussartigen Struktur ausgegangen ist, zeigen neuere Untersuchungen, dass der

durch die beteiligten Schlitzmembranproteine gebildete Filter dynamischer ist als zunächst angenommen: Untersuchungen von Grahammer et al. haben eine bedeutsame Varianz in der Größe des Raumes zwischen den Fußfortsätzen dargestellt, weshalb die Autoren vermuten, dass sich die Weite der Schlitzmembran dynamisch verschiedenen Gegebenheiten, wie z.B. einem veränderten Blutfluss, anpassen kann¹⁹. Neuere Untersuchungen von Butt et al. unter Nutzung der STED-Mikroskopie legen nahe, dass im Rahmen einer Albuminurie im Mausmodell eine veränderte Organisation des Aktin-Zytoskeletts in den Fußfortsätzen der Podozyten auftritt und hierdurch eine relative Verkürzung der Schlitzmembran auftritt⁴⁰. Resultierend wiederum ist eine Dilatation der Kapillaren mit einem erhöhten hydrostatischen Druck⁴⁰.

2.4. Das Zytoskelett des Podozyten

Von besonderer Bedeutung für die Funktion der Podozyten und die Struktur ihrer Fußfortsätze ist ihr Zytoskelett. Es ist im Wesentlichen aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktin aufgebaut, wobei diese Komponenten in unterschiedlicher Weise auf Primär- und Sekundärfortsätze verteilt sind. Mikrotubuli und Intermediärfilamente sind die primären Strukturgeber der Primärfortsätze, wohingegen die Komponenten des Aktin-Zytoskeletts eine entscheidende Rolle beim Aufbau der Sekundärfortsätze spielen^{41,42}.

In den Fußfortsätzen ist das podozytäre Zytoskelett im Bereich fokaler Adhäsionen mit der extrazellulären Matrix verankert, insbesondere mit der glomerulären Basalmembran⁴³. Dies geschieht mittels verschiedener Transmembranproteine, von denen Integrine die größte Gruppe darstellen^{43,44}. Im Mausmodell führten Podozyten-spezifische Knockouts von Integrin β -1 und Integrin α -3 zu einem letalen, proteinurischen Phänotyp⁴⁵. Eine Aktivierung von Integrinen durch verschiedene Mechanismen scheint ein wesentlicher Faktor zu sein, der die glomeruläre Filtrationsbarriere in Krankheitszuständen schädigt. Beispielsweise wurde gezeigt, dass der transforming growth factor beta (TGF- β), welcher vom Podozyten im Rahmen von Schadensantworten sezerniert wird, zu einer Aktivierung von Integrin β -1 führt⁴⁶. Auch an der intrazellulären Seite der fokalen Adhäsionen sorgen mehrere Proteine für eine Verbindung des Zytoskeletts mit der glomerulären Basalmembran: Die Tyrosinkinase focal adhesion kinase (FAK) ist an der Innenseite fokaler Adhäsionen lokalisiert und interagiert mittels der Proteine Paxilin und Talin mit Integrinen⁴⁷. Eine verringerte FAK-Expression scheint die Adhäsionen der Podozyten an der glomerulären Basalmembran zu erhöhen und somit gegen eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere zu schützen, wohingegen eine FAK-Aktivierung häufig im Rahmen glomerulärer Schädigungsszenarien beobachtet wird⁴⁸⁻⁵⁰. Funktionell spielt das podozytäre Zytoskelett eine wesentliche Rolle für die Fähigkeit des Podozyten, sich dynamisch verschiedenen Gegebenheiten anzupassen, ob im Gesunden oder als Stressantwort. Der Podozyt muss vor allem unter mechanischem Stress in der Lage sein, die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere aufrecht zu erhalten. Falls dies nicht passiert, kann es zur Ablösung des Podozyten von der Basalmembran und ultimativ zum Verlust von Podozyten kommen. Dieses sog. „foot process effacement“ wurde bereits vor geraumer Zeit als wesentlicher Mechanismus für das Fortschreiten chronischer Nierenerkrankungen, sowohl im Menschen als auch im Tiermodell, erkannt⁵¹.

In den letzten Jahren wurde entschlüsselt, dass Podozyten zur dynamischen Anpassung an diese Gegebenheiten in gewissem Maße die Eigenschaften kontraktile Zellen besitzen⁵². Hierbei spielt das Aktin-Zytoskelett eine besondere Rolle: Aktinmoleküle können in zwei verschiedenen Formen vorliegen und Umwandlungen zwischen den beiden Formen erfolgen reversibel⁵³. Als Einzelmolekül liegt Aktin als globuläres G-Aktin vor, welches nach Polymerisierung mehrerer Einzelmoleküle zum filamentösen F-Aktin wird⁵³. In jeder Zelle

erfolgt eine kontinuierliche Polymerisierung von G-Aktin-Monomeren zu F-Aktin und umgekehrt, was für die Motilität einer Zelle von Bedeutung ist⁵⁴. Dieser Prozess unterliegt einer Regulation durch zahlreiche andere Proteine, unter ihnen der „actin regulating protein complex 2/3“ (Arp2/3)⁵⁵.

Zuletzt zeigten vielfache Untersuchungen, dass die glomeruläre Schlitzmembran nicht nur eine strukturelle Funktion als makromolekularer Filter erfüllt, sondern auch der Mittelpunkt ausgedehnter Signaltransduktionsprozesse ist. Beispielsweise vermittelt das Transmembranprotein Nephrin Signalkaskaden, die an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts des Podozyten beteiligt sind. Über diesen Mechanismus kann der Podozyt sich dynamisch verschiedenen Gegebenheiten anpassen. Nach Phosphorylierung unterschiedlicher Tyrosin-Residuen kann Nephrin entweder die Polymerisierung von Aktin-Fasern oder die Zusammenlagerung von Aktin-Fasern und Formung von so genannten Lamellopodien vermitteln⁵⁶⁻⁵⁸.

Bei der Reorganisation der Aktin-Fasern spielen dabei Rho-GTPasen eine Rolle: Zhu et al. beschrieben, dass im Zellkulturmodell eine Phosphorylierung von Nephrin zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) führt, was wiederum die Aktivität von Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) erhöht. Morphologisch ließ sich dadurch eine Vermehrung von Lamellopodien, sowie eine Verminderung von Aktin-Stressfasern in kultivierten Ratten-Podozyten zeigen⁵⁷. Der gleiche Effekt wird der Rho-GTPase Cell division control protein 42 homolog (CDC42) zugeschrieben⁵⁹.

Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass RhoA die Formation von Stressfasern vermittelt⁶⁰. In diesem Prozess ist auch das Aktin-bindende Protein Synaptopodin beteiligt, indem es den proteasomalen Abbau von RhoA inhibiert⁶¹.

Während man anhand der vorliegenden Zellkulturdaten noch vor einiger Zeit davon ausging, dass die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in Podozyten stets entweder Rac1- und CDC42-vermittelt zu einer eher hypermotilen Form oder mittels RhoA-Vermittlung eher zu einer hypomotilen Form erfolgt, geht man heute eher von einem dynamischen Geschehen aus, welches zu jeder Zeit eine ausgewogene Aktivität aller dreier Proteine erfordert⁶².

Die Fähigkeit des Podozyten, sein Zytoskelett dynamisch zu organisieren, wird als ein wesentlicher Faktor für die Integrität der Filtrationsbarriere angesehen. Beispielsweise muss trotz erheblich schwankender Blutdruckwerte in den glomerulären Kapillaren eine funktionierende glomeruläre Filtrationsbarriere aufrechterhalten werden, wofür unter anderem die rasche Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und eine daraus resultierende Motilität der podozytären Fußfortsätze vonnöten ist⁶³.

2.5. Alpha-Aktinin-4

Alpha-Aktinin-4 ist ein Aktin-bindendes Protein aus der Familie der Spektrine, eine von aktuell vier bekannten humanen Isoformen des Alpha-Aktinin⁶⁴ und das Produkt des *ACTN4*-Gens. Während Alpha-Aktinin-2 und Alpha-Aktinin-3 hauptsächlich im Sarkomer von Muskeln zu finden sind, kommen Alpha-Aktinin-1 und -4 ubiquitär vor^{65,66}. Während *ACTN4* kodierende Gen auf Chromosom 19 lokalisiert ist, befinden sich *ACTN1* auf Chromosom 14, *ACTN2* auf Chromosom 1 und *ACTN3* auf Chromosom 11. Dabei ist das 1998 erstmalig beschriebene Alpha-Aktinin-4 die zuletzt beschriebene aller heute bekannten Isoformen des Proteins und besitzt mit etwa 86% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz eine hohe Ähnlichkeit zu Alpha-Aktinin-1⁶⁵. In der Niere wird Alpha-Aktinin-4 hauptsächlich im Glomerulus exprimiert, dort fast ausschließlich im Podozyten⁶⁷.

Alpha-Aktinin ist ein antiparalleles Homodimer mit einem Molekulargewicht von 100 kDa pro Kette⁶⁴. Die N-terminale Domäne von Alpha-Aktinin-4 ist die Aktin-bindende-Domäne (ABD) und besteht aus einem Tandem-Paar von Calponin-homology (CH) Domänen. Die C-terminale Domäne besteht aus einem Paar von Calcium-bindenden EF-Domänen. Beide Domänen sind mittels 4 Spektrin-Sequenzen verbunden⁶⁸. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Formen von Alpha-Aktinin hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Ca^{2+} -Bindung: Während Alpha-Aktinin-1 und -4 in der Lage sind, Ca^{2+} zu binden, fehlt diese Möglichkeit bei Alpha-Aktinin-2 und -3^{69,70}.



Abbildung 3: Visualisierung der funktionellen Domänen des Alpha-Aktinin-4.

Dargestellt sind das N-Terminale Ende des Proteins mit der Aktin-bindenden Domäne (ABD), das C-Terminale Ende mit Calcium-bindenden EF-Domänen, sowie eine Verbindung aus Spektrin-Domänen (SR).

Eine der wesentlichen Funktionen von Alpha-Aktinin-4 ist die Quervernetzung von Aktin-Filamenten^{71,72}, jedoch wurden verschiedene weitere Funktionen außerhalb des Zytoskeletts beschrieben: So wurde gezeigt, dass Alpha-Aktinin-4 zentrale Rollen im Rahmen der Zelladhäsion einnimmt. Es interagiert an fokalen Adhäsionen unter anderem mit β 1-

Integrin^{73,74}, Vinculin^{75,76}, Zyxin⁷⁷ und Kindlin-1⁷⁸. Im Nukleus besitzt Alpha-Aktinin-4 eine Funktion als transkriptioneller Co-Aktivatoren für verschiedene Rezeptoren und Signalwege: So wurde gezeigt, dass Alpha-Aktinin-4 mit dem Östrogen-Rezeptor-alpha interagiert im Zellkulturmodell die Proliferation von Brustkrebszellen fördert^{79,80}. Ebenso ist Alpha-Aktinin-4 als Aktivator des Myocyte enhancer factor 2 bekannt und reguliert über dessen Signalweg die Differenzierung von Skelettmuskelzellen^{81,82}. Der Androgen-Rezeptor wurde ebenso als Interaktionspartner von Alpha-Aktinin-4 entdeckt und es konnte in immunhistochemischen Untersuchungen von Prostatagewebe nachgewiesen werden, dass hochgradig kanzeröse Zellformationen dort eine verringerte Expression von Alpha-Aktinin-4 im Nukleus aufweisen⁸³. Zudem konnte gezeigt werden, dass Alpha-Aktinin-4 in B-Zellen unabhängig von seiner Aktin-Bindungsaktivität ein Koaktivator des NF-κB-Transkriptionsfaktors ist⁸⁴.

Insbesondere in der nephrologischen Forschung ist Alpha-Aktinin-4 in den letzten Jahren in den Fokus gerückt. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass heterozygot Alpha-Aktinin4-defiziente Mäuse eine Proteinurie, sowie histologische Zeichen einer schweren glomerulären Schädigung im Sinne einer FSGS zeigen⁸⁵. Hierbei war auffällig, dass die noch vorhandene Expression von Alpha-Aktinin-1 trotz der großen Ähnlichkeit der beiden Isoformen nicht zu einer Verhinderung des Phänotyps führte. Ein homozygoter Knockout von Alpha-Aktinin-4 wirkte sich größtenteils perinatal letal aus, bei geborenen Mäusen konnte das Protein WT1 im Urin nachgewiesen werden, vereinbar mit einer Ablösung der Podozyten vom Glomerulus⁸⁶. Es konnte gezeigt werden, dass Alpha-Aktinin-4 wesentlich an der Adhäsion von Podozyten beteiligt ist. Im Podozyten interagiert Alpha-Aktinin-4 an der glomerulären Schlitzmembran mit dem Transmembranprotein Nephrin⁸⁷.

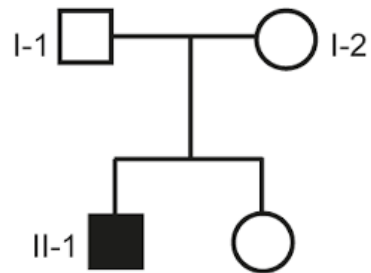
Im Rahmen der Erforschung von Ursachen, die bei Menschen zu einer FSGS führen, konnten mehrere Mutationen von *ACTN4* als kausal identifiziert werden⁸⁸. Dabei folgt die Vererbung dieser Erkrankungen typischerweise einem autosomal-dominanten Vererbungsweg. Klinisch präsentieren sich die betroffenen Patienten zumeist mit einer „late onset FSGS“, also einem Auftreten der Erkrankung im späten Jugendlichen- oder jungen Erwachsenenalter. Die Patienten zeigen eine Proteinurie und eine zunehmende Niereninsuffizienz, die progredient ist und bis zum terminalen Nierenversagen fortschreitet. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der Aktin-bindenden Domäne des Proteins zu einer erhöhten Affinität zu F-Aktin führen⁸⁹⁻⁹¹.

2.6. Vordaten aus dem nephrologischen Forschungslabor

In den letzten Jahren sorgte die immer bessere Verfügbarkeit von Techniken des so genannten „next generation sequencing“ (NGS) für einen Paradigmenwechsel in der Diagnostik

möglicher genetischer Formen der FSGS: Umfassende genetische Testungen spielen eine zentrale Rolle in Fällen, in denen die Ursache für ein nephrotisches Syndrom insbesondere bei jungen Patienten unklar bleibt. Neben der möglichen Aufdeckung der Ursache der Nierenerkrankung ergibt sich auch eine therapeutische Relevanz: Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die z.B. an einer primären FSGS monogenetischer Ursache leiden, deutlich weniger wahrscheinlich von einer immunsupprimierenden Therapie mit Kortikosteroiden oder anderen Immunsuppressiva profitieren im Vergleich zu anderen Entitäten^{92,93}. In der klinischen Praxis werden dabei zunehmend so genannte Gen-Panel-Analysen durchgeführt, wobei vom Indexpatienten Gene sequenziert werden, welche bekannterweise für ein vermutetes Spektrum an Erkrankungen in Frage kommen. Dieses Prinzip der Diagnostik wurde beispielsweise von Otto et. al. im Rahmen der Diagnostik von Ziliopathien beschrieben⁹⁴. Im Vorfeld dieser Doktorarbeit hatte sich ein pädiatrischer Patient im Alter von 5 Jahren erstmalig mit dem klinischen Bild eines steroidresistenten nephrotischen Syndroms vorgestellt. Beide Eltern waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gesund. Eine durchgeführte Nierenbiopsie ergab nach nephropathologischer Begutachtung das morphologische Bild einer FSGS. Zur weiteren Diagnostik wurde eine Gen-Panel-Analyse mit Testung verschiedener bekannt FSGS-assoziiierter Gene durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine heterozygote Mutation im *ACTN4*-Gen, welche nach gleichzeitiger Sequenzierung der Eltern als *de novo* Mutation zu werten ist und in der Literatur und in verfügbaren Datenbanken bislang nicht bekannt war.

A



B

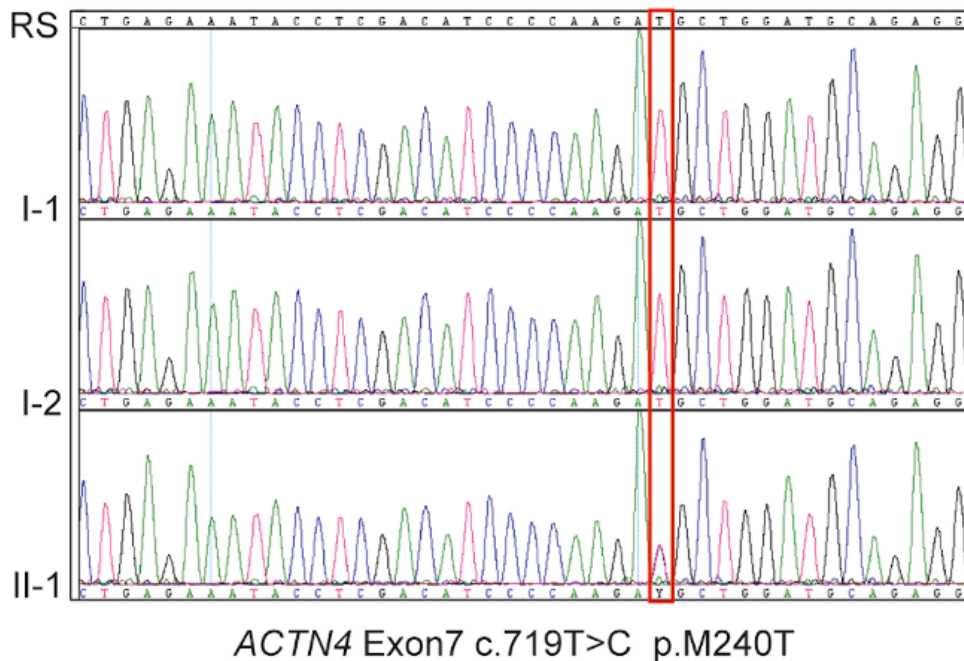


Abbildung 4: Vorarbeiten aus dem nephrologischen Forschungslabor

- A. Stammbaum des Indexpatienten (II-1). Beide Elternteile (I-1, I-2), sowie die Schwester des Patienten sind gesund.
- B. Sequenzierung des *ACTN4*-Gens mit Darstellung der Referenzsequenz (RS). Auszugsweise dargestellt sind die Ergebnisse beider Elternteile (I-1, I-2), sowie des Indexpatienten (II-1).

Zellkulturmodelle sind ein etabliertes Werkzeug in der Molekularbiologie. Als Vorarbeit dieser Doktorarbeit wurde im nephrologischen Forschungslabor epitheliale Zellen aus primären Urinzellen des Indexpatienten asserviert (URECs, urine-derived renal tubular epithelial cells)^{95,96}. Diese Zelllinie wurde im Rahmen der Arbeiten zu dieser Doktorarbeit weiter ausgebaut und für Proteomanalysen genutzt.

Als Kontrollzellen dienten URECs gesunder, altersentsprechender Kontrollen. Eine Zuordnung der identifizierten Proteine zu bestimmten Gruppen erfolgte mittels Nutzung der Ontologie-Datenbank (GO-Terms). Hierbei können Über- oder Unterexpression verschiedener, den GO-Begriffen zugehörigen Gruppen graphisch dargestellt werden.

Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, findet sich in den Proben der URECs des Patienten eine deutlich geringere Anreicherung von Proteinen, die der DNA-Homöostase zuzuordnen sind. Beispielsweise sind mehrere Proteine des minichromosome maintenance Komplex (MCM), MCM2, MCM3, MCM4 und MCMZ im Proteom der URECs unterrepräsentiert. Der MCM-Komplex ist in der Initiierung der DNA-Replikation und der Elongation im Verlauf beteiligt. Auch Condensine, die an der Kondensation der Chromosomen während der Zellteilung beteiligt sind, zeigen in den URECs des Indexpatienten geringere Expressionslevel. Ein weiteres, signifikant unterrepräsentiertes Protein ist Copin-1, das als Zellmembran-bindendes Protein an Prozessen zwischen Zellmembran und Zytoplasma beteiligt ist. Weiterhin unterrepräsentiert ist Anilin, ein Aktin-bindendes Protein das im Rahmen der Zellmotilität eine Rolle spielt. Zusammenfassend scheint die Mutante einen Einfluss auf Zellproliferation, Zellteilung und DNA-Schadensantwort zu haben.

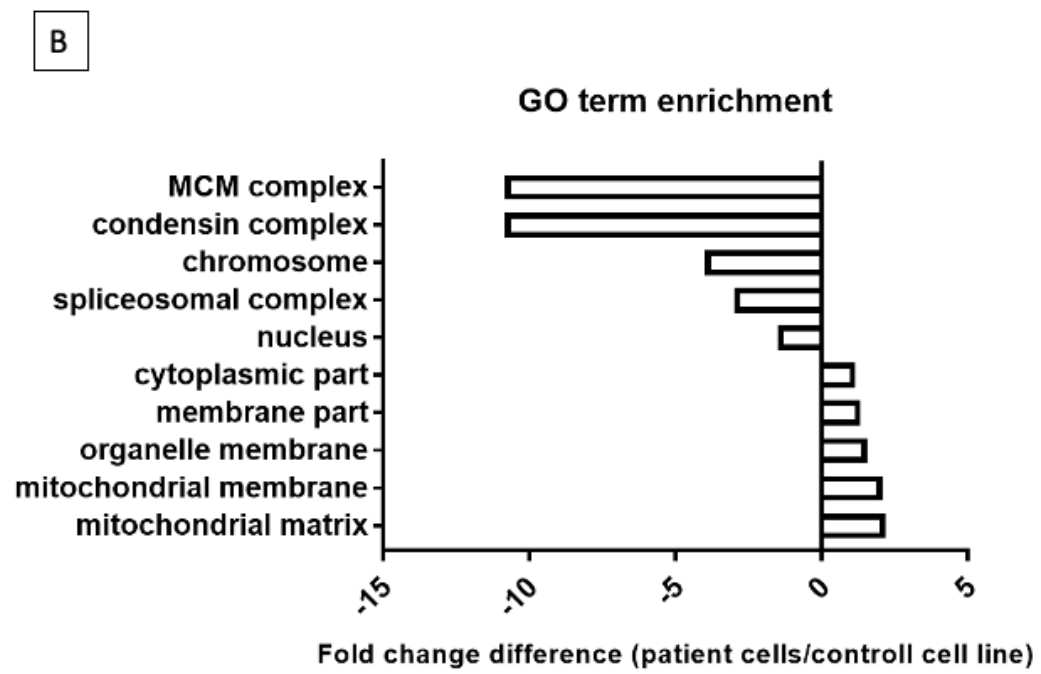
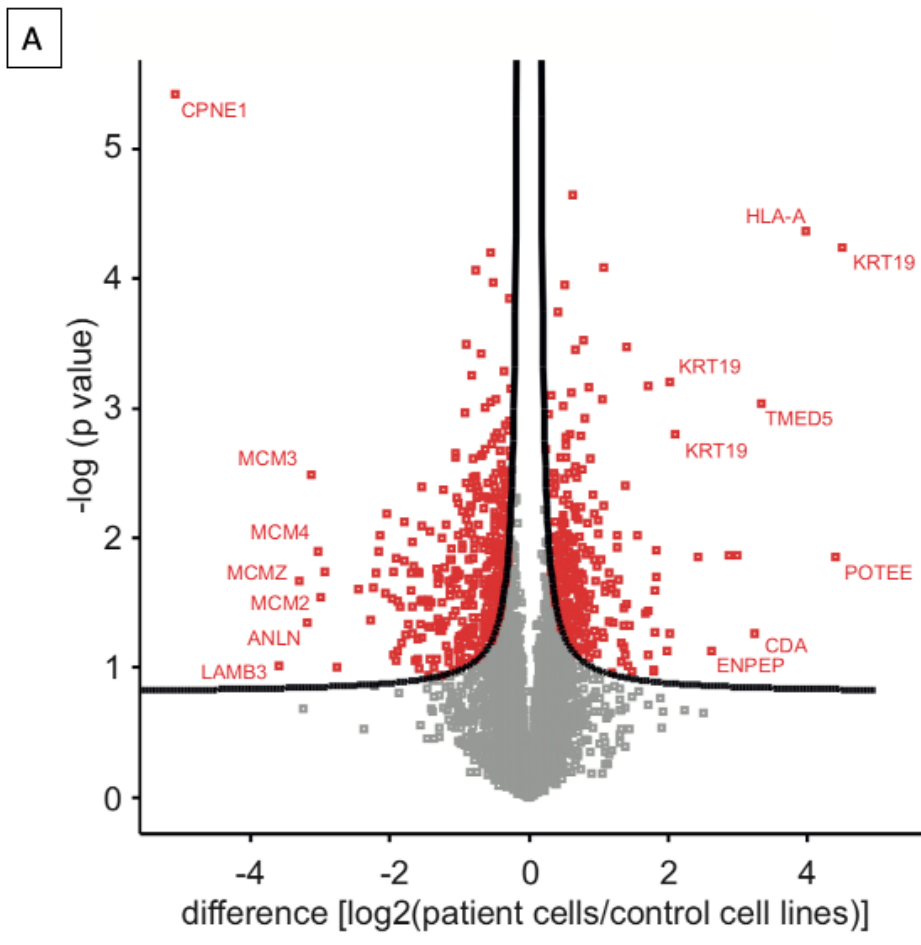


Abbildung 5: Analyse des UREC-Proteoms

- A. Volcano Plot Histogramm, das die Unterschiede im Proteom zwischen den URECs des Indexpatienten und denen der Kontrollen visualisiert. Jeder einzelne rote Punkt repräsentiert ein Protein, für ausgewählte Proteine sind zur Identifizierung die GeneCard-Symbole beigefügt. Dargestellt ist der P-Wert eines zweiseitigen T-Tests gegenüber der x-fachen Veränderung (fold change) der Expression des betreffenden Proteins auf einer logarithmischen Skala. Das Signifikanzniveau beträgt $p < 0.005$.
- B. Analyse der GO-Terms über- oder unterexprimierter Proteine in den URECs des Indexpatienten und der Kontrollpatienten. Graphisch dargestellt ist die x-fache Veränderung (fold change) in den Zellen des Indexpatienten gegenüber den URECs der Kontrollpatienten.

2.7. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Inzidenz und Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen steigen seit Jahren an und sind ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. Diese Faktoren machen die Erforschung chronischer Nierenerkrankungen als wesentlicher Kostentreiber im Gesundheitswesen höchst relevant. Hierbei dienen genetische Erkrankungen mit Mutationen, die bestimmten Strukturen in der Niere betreffen, häufig als Modell zum Verständnis von Funktionsweise des Nierenfilters und Pathomechanismen von Nierenerkrankungen.

Das Ziel dieser Promotionsarbeit ist die funktionelle Charakterisierung einer erstmalig bei einem pädiatrischen, an einer FSGS leidenden, Patienten beschriebenen, potenziell pathogenen Mutation im für das Protein Alpha-Aktinin-4 kodierenden Gen *ACTN4*. Hier konnte im Rahmen humangenetischer Voruntersuchungen die Punktmutation *ACTN4-M240T* identifiziert werden. Für die im Rahmen dieser Doktorarbeit geplanten Untersuchungen soll als etabliertes Modell das Zellkulturmodell des humanen Podozyten genutzt werden.

Thematisch soll insbesondere eruiert werden, inwiefern die vorliegende Mutation einen Einfluss auf das Zytoskelett des Podozyten hat. Anhand von Voruntersuchungen in epithelialen Zellen aus primären Urinzellen des Indexpatienten lässt sich zudem eine Beeinflussung der Chromosomen-Homöostase und der DNA-Replikation vermuten, weshalb auch hierzu Untersuchungen durchgeführt werden sollen.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit geplanten Untersuchungen sind entscheidend, um zu belegen, dass die untersuchte Mutation tatsächlich krankheitsverursachend ist. Dies ist von

zentraler Bedeutung hinsichtlich der weiteren Beratung und Behandlung des Patienten und seiner Familie. Weiterhin sollen wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle des Aktin-Zytoskeletts bei der Pathogenese der FSGS gewonnen werden, welche zum Verständnis chronischer Nierenerkrankungen und zur Findung möglicher Therapien beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Typ	Hersteller	Bestellnummer
FLAG M2	Maus	Monoklonal	Sigma	F1804
Phalloidin – Alexa fluor 647			Dyomics	647P1-33
IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG	Ziege	Polyklonal	LI-COR	926-68070
IRDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	Polyklonal	LI-COR	926-68071
IRDye 800CW Goat anti-Mouse	Ziege	Polyklonal	LI-COR	926-32210
IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	Polyklonal	LI-COR	926-32211
Aktin	Maus	Monoklonal	Milipore	MAB150R
Pan-Aktin	Kaninchen	Monoklonal	Cell Signaling	8456

Tubulin-beta (E7)	Maus	Monoklonal	Developmental Studies Hybridoma Bank	
Maus-IgG (H+L) (konjugiert mit HRPO)	Ziege	Polyklonal	Jackson Immunoresearch	115-035-003
Kaninchen-IgG (H+L) (konjugiert mit HRPO)	Ziege	Polyklonal	Jackson Immunoresearch	111-035-003

3.1.2. Puffer

HEBS 2X	50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 12 mM Dextrose	
IP-Puffer-Stammlösung	1 % Triton X-100; 50 mM NaCl; 50 mM NaF; 20 mM Tris/HCl pH 7.5; 15 mM Na ₄ P ₂ O ₇	
IP-Buffer-Gebrauchslösung	IP-Puffer Stammlösung + 2 mM Na ₃ VO ₄	
Laufpuffer Western	2 M Glycin, 1,0 % SDS, 250 mM Trizma-Base	
Transferpuffer	25 mM Tris pH 8,3; 0,1 % SDS; 192 mM Glycin; 20 % Methanol, 4 °C	
PBS+	PBS 1x, 1 mM Ca ²⁺ , 0,5 mM Mg ²⁺	
PBS	0.137 M NaCl, 0.05 M NaH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O, pH 7.4	
Rotiblock	Roth	A151

3.1.3. Enhanced chemiluminescence (ECL)

Zutat	Volumen Lösung A	Volumen Lösung B	Finale Konzentration
H2O	17,7ml	18ml	
1M Tris/HCl pH 8.5	2ml	2ml	100mM
30 % H2O2		12µl	1,5%
Luminol	200µl		2,5mM
Coumarinsäure	88µl		0,4mM

3.1.4. Primer

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
hACTN4 bp 431 fsp	5' GAA TGA TCT GGA CCA TCA TCC	Sequenzierung
hACTN4 bp 964 fsp	5' CAA AAG ACT ATC CAG GAG ATG	Sequenzierung
hACTN4 bp 1556 fsp	5' CAG GGA AGC CCT GGA GA A AAC	Sequenzierung
hACTN4 QC M240T EcoRV fp version2	5' CTC GAC ATC CCC AAG ACG CTG GAT GCA GAG GAT ATC GTG GGC ACT CTG AGG	Mutagenese
hACTN4 QC M240T EcoRV rp version2	5' CCT CAG AGT GCC CAC GAT ATC CTC TGC ATC CAG CGT CTT GGG GAT GTC GAG	Mutagenese

3.1.5. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
MluI	NEB	Klonierung
NotI	NEB	Klonierung
EcoRV	NEB	Klonierung
XhoI	NEB	Klonierung
AflII	NEB	Klonierung
DpnI	NEB	Mutagenese
KOD-Polymerase	Novagen	PCR (Klonierung)
LR-clonase II	Thermo Fisher Scientific	Klonierung

3.1.6. Bakterien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
DH10 B T1 Phage-Resistant E. coli	ThermoScientific	12331013

3.1.7. Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Referenz
GFP pcDNA6	pcDNA6	Nephrolabor
F.hACTN4-WT FL pcDNA6	pcDNA6	Nephrolabor
F.hACTN4-M240T pcDNA6	pcDNA6	Kloniert für diese Arbeit

pLenti6.3/V5/dest	pLenti6.3/V5/dest	Invitrogen
F.hACTN4 WT FL pLenti6.3	pLenti6.3	Nephrolabor
F.hACTN4 FL WT pENTR1a Be	pENTR1A Be	Nephrolabor
F.hACTN4 M240T pENTR1aBe	pENTR1A Be	Nephrolabor
F.hACTN4 M240T pLenti6.3	pLenti6.3	Kloniert für diese Arbeit
pLenti6.3/V5-GW/EmGFP	pLenti6.3	Nephrolabor
pMD2 VSV-G		Nephrolabor
pMDL g/p		Nephrolabor
pRSV rev		Nephrolabor

3.1.8. Zellen

Zelltyp	Informationen	Referenz
HEK293T	Humane, embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney)	Prof. Dr. B. Seed (Harvard Medical School, Boston)
Podozyten (MOIN)	Konditionell immortalisierte humane Podozyten	Prof. Dr. Moin Saleem (University of Bristol)

3.1.9. Zellkulturmedien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	ThermoFisher Scientific	31966
RPMI-1640 (1X) + GlutaMAX-I	ThermoFisher Scientific	61870
0.05% Trypsin-EDTA (1X)	ThermoFisher Scientific	25300
DMSO	AppliChem	A3672
ITS	Corning	25-800-CR
Blasticidin	Invivogen	Ant-bl-1
Puromycin	Invivogen	Ant-pr-5b
HEPES solution 1M	Sigma	7365-45-9
Hexadimethrinbromid (Polybrene)	Sigma	H9268
Prolong Diamond + 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermofisher	P36971

3.1.10. Kits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
GeneJET Gel Extraction Kit	Molecular Biology	K0692
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Molecular Biology	K0503
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel	740410

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit steriler Luftzirkulation und einem Abzug durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Zelltypen verwendet, HEK293T-Zellen⁹⁷ und MOIN-Podozyten, eine immortalisierte humane Podozyten-Zellkultur⁹⁸. HEK293T-Zellen wurden in DMEM + 10% FBS kultiviert, MOIN-Podozyten in RPMI 1640 unter Zugabe von 10% FBS und 1% ITS. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturschalen mit 10cm Durchmesser in einem Brutschrank mit einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C [HEK29T], respektive 33°C [MOINs]. Zwecks Passagierung wurde bestehendes Nährmedium mittels einer Absaugvorrichtung entfernt und die Zellen mit 5ml sterilem PBS bei Raumtemperatur gewaschen, sowie anschließend unter Brutbedingungen mit 1ml Trypsin behandelt. Nach einer Inkubationszeit bis zur Ablösung der Zellen von der Schale wurde die Zellsuspension mit Nährmedium verdünnt und entsprechend auf neue Schalen verteilt. Im Falle einer regulären Passagierung erfolgte die erneute Verteilung in 10cm-Schalen, für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden Zellen in 12-Well-Schalen auf Glasplättchen verteilt.

3.2.2. Transfektion

HEK293T-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert. Das Prinzip dieser Transfektionsmethode ist, dass DNA in eine speziell gepufferte Lösung mit Calciumchlorid gebracht wird, wodurch sich Calcium-Phosphat-DNA-Coprezipitate in Kristallform bilden. Diese werden anschließend per Phagozytose von den Zellen aufgenommen.⁹⁹⁻¹⁰¹ Es wurden in einem 2 ml fassenden Eppendorf-Gefäß unter sterilen Bedingungen jeweils 2 µg DNA mit

500 µl 0,25M Calciumchlorid vermischt und anschließend unter Rütteln tropfenweise weitere 500µl eines 2x HEBS-Puffers hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend dem Nährmedium der Zellen hinzugefügt. Nach 6-8 Stunden erfolgte ein Wechsel des Nährmediums, um nach erfolgter Phagozytose die in der Schale befindlichen Calciumphosphat-Kristalle zu entfernen.

3.2.3. Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 4°C kaltem PBS wurden die Zellen in 5ml PBS pro Schale geerntet, wobei zum Lösen der Zellen von der Kulturschale ein Schaber benutzt wurde. Die Zellen wurden bei 500g 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet anschließend mit IP-Puffer mit Na₃VO₄ und PMSF resuspendiert. Für eine 10cm Schale wurde im Falle von HEK293T-Zellen 500 µl Puffer benutzt, für MOIN-Zellen 250 µl. Die Inkubation mit dem Lysepuffer erfolgte für 30 Minuten auf Eis, anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 g für 20 Minuten.

3.2.4. Immunfluoreszenzfärbung

Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung ist die Darstellung bestimmter Strukturen mittels epitopspezifischer Primärantikörper und einer anschließenden Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten, speziesspezifischen Sekundärantikörpern. Dabei ermöglicht die Nutzung verschiedener Fluoreszenzspektren der Sekundärantikörper in Verbindung mit Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies eine gleichzeitige Visualisierung verschiedener Proteine.

Für die Färbung wurden MOIN-Podozyten in einer 12-well-Zellkulturschale auf sterile Glasplättchen (Coverslips) gesplittet und bis zu einer Konfluenz von etwa 60% kultiviert. Zur Ernte erfolgte zuerst die Absaugung des Mediums und anschließend ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS+ für je 5 Minuten. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 Minuten auf Raumtemperatur mit je 1 ml 4% PFA pro Coverslip fixiert. Die Zellen wurden erneut dreimal für fünf Minuten mit PBS+ gewaschen und anschließend für eine Stunde auf Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung aus 5% NDS in PBS+ behandelt, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers bei 4°C über Nacht. Alle Primärantikörper wurden in einer Verdünnungslösung aus 1% NDS + 0,05% Triton-X100 + 0,02% Natriumazid in PBS+ aufgelöst. Nach einer weiteren Waschung für dreimal 5 Minuten erfolgte die Inkubation der Sekundärantikörper für eine Stunde auf Raumtemperatur. Alle Sekundärantikörper wurden in PBS+ verdünnt. Nach erneuter, dreimaliger Waschung wurden die Coverslips einmal in destilliertes Wasser getaucht und anschließend mit 10 µl Prolong Diamond + 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingedeckelt.

3.2.5. SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese [SDS-PAGE] ist ein Verfahren, bei dem Proteine ihrer Größe und Ladung entsprechend in einem Trägergel aus Polyacrylamid aufgetrennt werden. Die Proben werden dafür zunächst mit 2x Lämmli-puffer, 200 mM DTT und SDS versetzt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen. Aufgrund der anionischen Eigenschaften des SDS können sich die Proteine unabhängig von ihrer eigenen Ladung im Trägergel bewegen. Dabei erfolgt die Bewegung der Proteine entlang eines Ladungsgradienten in Richtung der Anode. Eine Auftrennung nach Größe ergibt sich durch eine bestimmte Dichte des Polyacrylamidgels, wobei Proteine mit hohem Molekulargewicht in einer bestimmten Zeiteinheit weniger weit durch das Gel laufen als Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht. Für die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente wurden Polyacrylamid-Trägergele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10-12% benutzt, die Proteinproben wurden in eine Sammelphase mit 6% Polyacrylamid geladen.

3.2.6. Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Trägermembran aus Polyvinylidendifluorid [PVDF]. Im Anschluss wurde der so genannte Semi-Dry-Transfer durchgeführt: Nach Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol werden Gel und Membran aufeinandergelegt, mit von Transferpuffer getränktem Filterpapier beschwert und in eine Vorrichtung eingespannt, die das Anlegen einer Spannung ermöglicht. Hierbei liegt die Spannung, anders als bei der SDS-PAGE, senkrecht zur Oberfläche von Gel und Membran an. Entlang dieser Spannung erfolgt eine Wanderung der Proteine aus dem Gel auf die Membran, wo sie aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen haften bleiben.

3.2.7. Visualisierung mittels ECL oder Immunfluoreszenz

Eine Visualisierung der Proteine erfolgte entweder mittels Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence, ECL) oder mittels Immunfluoreszenz. Im Falle der ECL wurden mit Meerrettichperoxidase konjugierte Sekundärantikörper verwendet, die nach Zugabe entsprechender Substrate eine Chemilumineszenz-Reaktion umsetzen. Im Falle der Immunfluoreszenz wurden mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Zur digitalen Darstellung wurden entweder das Licor-System (Immunfluoreszenz) oder ein Fusion Chemiluminometer (ECL) verwendet. Vor Applikation der Antikörper erfolgte eine Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen der Membran für 30 Minuten, für ECL

mit 5% bovinem Serumalbumin [BSA], bei späterer Nutzung einer Immunfluoreszenzdetektion mit speziellem Waschpuffer (Rotiblock). Primärantikörper wurden in entsprechenden Konzentrationen [siehe Kapitel Antikörper] in Waschpuffer verdünnt und es fand eine Inkubation auf einem Schüttler für eine Stunde bei Raumtemperatur statt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer auf einem Schüttler erfolgte die Inkubation im jeweiligen Sekundär-Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

3.2.8. Mutagenese mittels Quickchange-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Hierbei können sowohl ganze Gene als auch nur Teile eines Gens oder nicht-kodierende DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Genutzt werden dazu ein den zu amplifizierenden Abschnitt flankierendes Primer-Paar, eine DNA-Ursprungssequenz, sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die Reaktion findet in einem Thermocycler statt und besteht aus einer Reihe aufeinanderfolgender Sequenzen, die jeweils in spezifischen Temperaturbereichen ablaufen. Die Quickchange-PCR wird als Spezialanwendung der PCR dazu genutzt, Punktmutationen in Genen zu induzieren. Hierbei werden spezielle Primer verwendet, deren Sequenz die gewünschte Punktmutation im Zielgen enthält. Es werden somit lineare DNA-Einzelstränge polymerisiert, die die Punktmutation enthalten. Nach Durchführung der PCR erfolgt ein Verdau des PCR-Produktes mit dem Enzym *dpn1* für 4h auf 37°C. Dieser Schritt dient dazu, methylierte Ursprungs-DNA in der Probe zu verdauen, wodurch nur noch DNA-Einzelstränge übrig bleiben, welche im Rahmen der PCR von der DNA-Polymerase polymerisiert wurden und somit nicht methyliert sind.

Initiale Denaturierung	98°C	2 Minuten
Denaturierung	98°C	30 Sekunden
Primerhybridisierung	52°C	30 Sekunden
Elongation	72°C	8 Minuten (15x ab Schritt 2)
Finale Elongation	72°C	2 Minuten
Kühlung	4°C	

Zur Klonierung der *ACTN4*-M240T-Konstrukte wurden entsprechende Primer konstruiert und von Integrated DNA Technologies bezogen. Als Amplikon wurden im Labor vorhandene Konstrukte verwendet, welche die Wildtyp-Variante von *ACTN4* enthalten.

3.2.9. Gateway-Klonierung für pLenti

Die Klonierung der Alpha-Aktinin-4-Konstrukte in die Zielvektoren für das pLenti6.3-System erfolgte mittels Gateway-Klonierung. Das Gateway-Klonierungssystem macht sich Eigenschaften des Phagen λ zu Nutze, welcher mit Hilfe eines eigenen Rekombinationssystems Bakterien vom Typ E.Coli befällt. Dabei erfolgt die Integration seiner DNA in das Erbgut des Bakteriums enzymatisch katalysiert und abhängig von speziellen Recombination Sites, welche von bestimmten DNA-Sequenzen flankiert werden. Es wird zunächst das gewünschte Insert mittels spezieller Primer so kloniert, dass es an beiden Enden jeweils sog. attB-Sites besitzt. Im nächsten Schritt wird das Insert in einen sog. Donor-Vektor kloniert, welcher ein ccdB-Gen mit flankierenden attP-Sites besitzt. Bei der BP-Reaktion wird dieses ccdB-Gen mit dem Insert ausgetauscht, indem eine Reaktion an den attB- und attP-Sites stattfindet. Es entsteht ein sog. Entry-Klon, welcher das zu klonierende Insert, nun flankiert von attL-Sites, enthält. Im letzten Schritt der Klonierung erfolgt die LR-Reaktion. Hierbei reagiert der Entry-Klon mit dem zu klonierenden Insert mit dem Zielvektor, welcher erneut das ccdB-Gen enthält, flankiert von attR-Sites. Im Rahmen der LR-Reaktion zwischen den attL- und attR-Sites entsteht nun das Zielplasmid, welches das klonierte Insert, flankiert von attB-Sites, enthält.

Zur Klonierung der im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten pLenti6.3-Plasmide wurden im Nephrolabor vorhandene pENTR-Konstrukte und ebenfalls im Labor vorhandene Zielvektoren im Rahmen einer LR-Clonase-Reaktion verwendet.

3.2.10. Bakterielle Transformation und Amplifikation

Zur Transformation von Bakterien wurden chemokompetente E.Coli-Stämme verwendet, im Falle der pLenti6.3-Konstrukte Top10 und im Falle aller anderen Plasmide DH-10 [siehe Kapitel Bakterien]. Bei allen im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Transformationen wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Das Wachstum der Kolonien erfolgte anschließend auf Platten mit LB-Agar und Ampicillin, entweder bei 37°C für 12h [pcDNA6] oder bei 30°C für 48h [pLenti6.3]. Zur weiteren Amplifikation von Plasmiden wurden Mini- und Midi-Kulturen in LB-Medium angesetzt, ebenfalls unter Zugabe von Ampicillin.

Nach Amplifikation erfolgte die Extraktion der Plasmide mittels alkalischer Lyse und eine anschließende Aufreinigung der DNA mittels kommerziell erhältlicher Kits [Mini-Prep Kit; Macherey-Nagel Midi Prep Kit].

3.2.11. Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der amplifizierten Plasmide wurde jeweils im Anschluss an die Amplifikationen ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass bestimmte Restriktionsenzyme, je nach Plasmid, Schnittfragmente unterschiedlicher Größe ergeben. Die verdauten Proben werden auf ein Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend werden die Proben mittels UV-Licht im Gel sichtbar gemacht und mit dem gewünschten Bandenmuster verglichen.

Im Falle der pcDNA6-Konstrukte wurde der Restriktionsverdau mit Mlu1/Not1 und EcoRV durchgeführt. Der Mlu1/Not1-Verdau dient dem Ausfällen des gesamten ACTN4-Inserts, der EcoRV-Verdau macht sich eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym zunutze, die durch das Einfügen der Punktmutation M240T entstanden ist. Im Falle der pLenti6.3-Konstrukte erfolgte der Restriktionsverdau in zwei Ansätzen, einmal mit EcoRV und einmal mit XhoI/AflII. Der Verdau mit EcoRV bewirkt das Ausfällen des Inserts, wohingegen der Verdau mit XhoI/AflII ein für den pLenti6.3-Vektor klassisches Bandenmuster ergibt. Alle Restriktionsverdaue wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

	15 µl-Ansatz
DNA (500 ng)	1 µl
Enzym 1	0,5 µl
Enzym 2	0,5 µl
10x Puffer	1,5 µl
ddH ₂ O	11,5 µl

3.2.12. Sequenzierung

Alle Plasmide wurden nach erstmaliger Klonierung mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

3.2.13. Etablierung stabiler Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten wurden in einem designierten Arbeitsbereich für S2-Arbeiten an einer Sicherheitswerkbank mit sterilem Abzug durchgeführt. Für die Produktion der Lentiviren wurden HEK293T-Zellen genutzt. Dabei wurden die drei Helferplasmide zusammen mit dem jeweiligen Zielplasmid mittels Calciumphosphat-Transfektion in die Zellen eingebracht. Nach 8 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zum Medium der zu transduzierenden Zellen, stets mit Zusatz von 20 mM HEPES. Nach weiteren 72 Stunden erfolgte die Ernte des Virus, wozu das virushaltige Medium abgenommen und für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das virushaltige Medium mit Hilfe einer Spritze durch einen 0,45 µm großen Filter gepresst und fortan bei 4°C gelagert.

Plasmid	Menge je 10 cm-Schale
pLenti6.3-Plasmid	10 µg
pRSV rev	2,5 µg
pMD2-G	3,5 µg
pMDL g/p	6,5 µg

Zur lentiviralen Transduktion von MOIN-Podozyten wurden die Zellen bei etwa 60% Konfluenz für 48h mit 4ml regulärem MOIN-Medium, 4 ml virushaltigem Medium und einem Zusatz von 1x Polybrene behandelt. Nach 48h wurde das gesamte Medium abgenommen und durch normales MOIN-Medium ersetzt. Nach weiteren 24h erfolgte der Start der Selektion durch Zugabe von 10 µg/ml Blasticidin zum Medium. Die Zellen wurden bis zur vierten Passagierung unter regulären Brutbedingungen in designierten Inkubatoren für S2-Arbeiten kultiviert.

3.2.14. Aktin-Fraktionierungsassay

Das Prinzip des Aktin-Fraktionierungsassays ist die Auftrennung des zellulären Aktins in eine Triton-unlösliche (TI) Fraktion und eine weitere Fraktionierung in filamentöses F-Aktin und G-Aktin. Zunächst erfolgte die Transfektion von jeweils 2 µg *ACTN4*-WT bzw. -M240T in HEK293T-Zellen mittels Calciumphosphat-Präzipitation. Nach 24 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen nach Standardmethoden. Je Schale wurde für den Fraktionierungsassay 1ml IP-Puffer unter Zusatz von Na₃VO₄ und PMSF genutzt. Nach Resuspendierung des Zellpellets im Lysepuffer erfolgte die Abnahme von 60µl Lysat als Ganzzelllysate (Whole Cell Lysate, WCL) und Verdünnung dieses Lysats mit 2x Lämmli-puffer. Das restliche Lysat wurde bei 12.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. 900 µl des Überstands wurden beiseite gelegt, das entstandene Pellet und der restliche Überstand wurden als Triton-unlösliche (TI) Fraktion mit 100 µl 2x Lämmli aufgefüllt und resuspendiert. Der Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge für 25 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert. Erneut wurden 60 µl des Überstands als lösliche (S) Aktin-Fraktion abgenommen und mit 60 µl 2x Lämmli verdünnt. 750 µl des restlichen Überstands wurden verworfen und der verbleibende Überstand sowie das Pellet wurden als Pellet (P) Aktin-Fraktion mit 60 µl 2x Lämmli verdünnt. Alle Lysate wurden nach der Verdünnung mit 2x Lämmli für 5 Minuten aufgekocht.

3.2.15. Zellzählungen

Für die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Zellzählungen wurden die beschriebenen, lentiviral transduzierten MOIN-Podozyten verwendet. Am Tag 4 nach erfolgter Transduktion wurden die Zellen aus 10cm-Zellkulturschalen mittels Standardmethoden gelöst und in Standard-Zellkulturmedium auf die gleiche Zellzahl verdünnt. Es erfolgte das Aussähen von 5×10^5 Zellen pro Well einer 6-Well-Zellkulturschale. Für jede Zelllinie wurden parallel 3 Wells angelegt. Verglichen wurden F.hACTN4-M240T MOIN-Podozyten mit F.hACTN4-WT MOIN-Podozyten. Nach Aussähen wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. An Tag 1, Tag 3 und Tag 5 nach dem initialen Aussähen wurden die Zellen mit Hilfe einer verbesserten Neubauer Zählkammer gezählt. Hierfür erfolgte ein Lösen aus den 6-Well-Schalen unter Nutzung von 250 µl Trypsin-EDTA pro Well, eine Verdünnung mit 2.5 ml Standard-Medium und ein Auftragen von je 8 µl in den oberen und unteren Teil der verbesserten Neubauer-Zählkammer. Die Ergebnisse der 3 parallel kultivierten Wells pro Zelllinie wurden jeweils gemittelt.

3.2.16. Statistik

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten statistischen Analysen wurden mit GraphPad PRISM in Version 8 durchgeführt. Als Signifikanztest wurde der Student's t-Test verwendet. Die Erstellung von Grafiken erfolgte teilweise in GraphPad PRISM, teilweise in Adobe Illustrator.

4. Ergebnisse

4.1. Funktionelle Analysen von ACTN4-M240T im Zellkulturmodell

Zur Untersuchung der Auswirkungen der vorliegenden *ACTN4*-Mutation auf das Aktin-Zytoskelett des Podozyten erfolgte die Generierung einer Zelllinie aus immortalisierten humanen Podozyten (MOIN) mit stabiler Überexprimierung von entweder F.h*ACTN4*-M240T oder F.h*ACTN4*-WT. Die betreffenden Zellen wurden bei 33°C in einem speziellen Nährmedium kultiviert (siehe Abschnitt Methoden). Zur Überexprimierung der WT-Variante oder Mutante wurden die Methoden des lentiviralen Gentransfer genutzt. Nach Transduktion der Wildtyp-Zellen mittels der zuvor in HEK293T-Zellen produzierten Lentiviren erfolgte eine Selektion der Zellen mittels Blasticidin. Die mit F.h*ACTN4*-WT transduzierten Zellen dienten in den folgenden Experimenten als Kontrolle.

Es erfolgte zunächst eine Untersuchung der Zellen mit Fokus auf das Zytoskelett, unter Nutzung von Immunfluoreszenz-Färbungen. Verwendet wurde das im Abschnitt Methoden beschriebene Protokoll. Zur Visualisierung der beiden überexprimierten *ACTN4*-Varianten erfolgte eine Färbung mit einem gegen das FLAG-Tag (F.) gerichteten Antikörper. Zur Visualisierung von F-Aktin wurde Phalloidin verwendet, ein Toxin vom Pilz *Amanita phalloides*, das mit hoher Affinität an F-Aktin bindet und in unseren Experimenten mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert verwendet wurde. Eine weitere Co-Färbung erfolgte mit DAPI, welches den Zellkern anfärbt. Wie in Abbildung 6 zu erkennen, lokalisiert *ACTN4*-WT wie vorbeschrieben, hauptsächlich entlang der Zellmembran. Für das mutierte Protein *ACTN4*-M240T fällt eine deutlich veränderte Lokalisation auf: Es werden große, F-Aktin-positive Aggregate angefärbt und die für *ACTN4*-WT typische Lokalisation entlang der Zellmembran ist nicht mehr vorhanden.

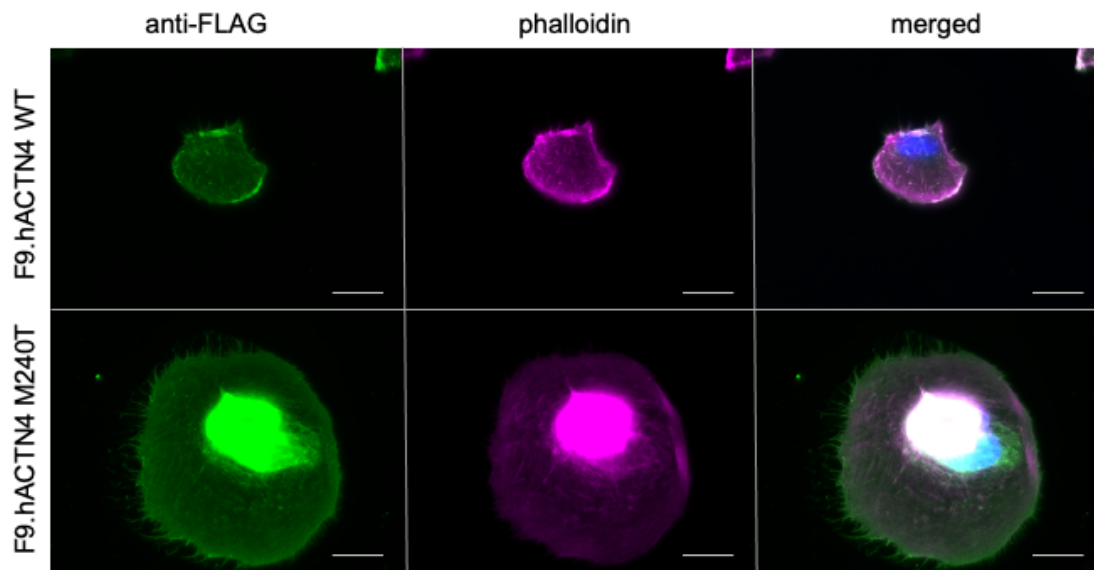


Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung transgener MOIN-Podozyten

Transgene MOIN-Podozyten, die F.hACTN4-WT oder F.hACTN-M240T exprimieren, wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Es erfolgte eine Färbung von ACTN4 mittels anti-FLAG-Antikörper, das Aktin-Zytoskelett wurde mittels Phalloidin angefärbt und der Zellkern mittels DAPI.

Auffällig war, dass nach Transduktion Podozyten, welche F.hACTN4-M240T exprimierten vermehrt abstarben, dies war nicht bei den ACTN4-WT Zellen zu beobachten. Zur Objektivierung dieses Effekts erfolgten Zellzählungen zu gleichen Zeitpunkten nach lentiviraler Transduktion. Die Zählungen wurden, wie im Abschnitt Methoden dargelegt, mittels einer verbesserten Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Zu Beginn der Experimente wurden die betreffenden Zellpopulationen auf die gleiche Anzahl an Zellen, die ausgesät wurden, verdünnt.

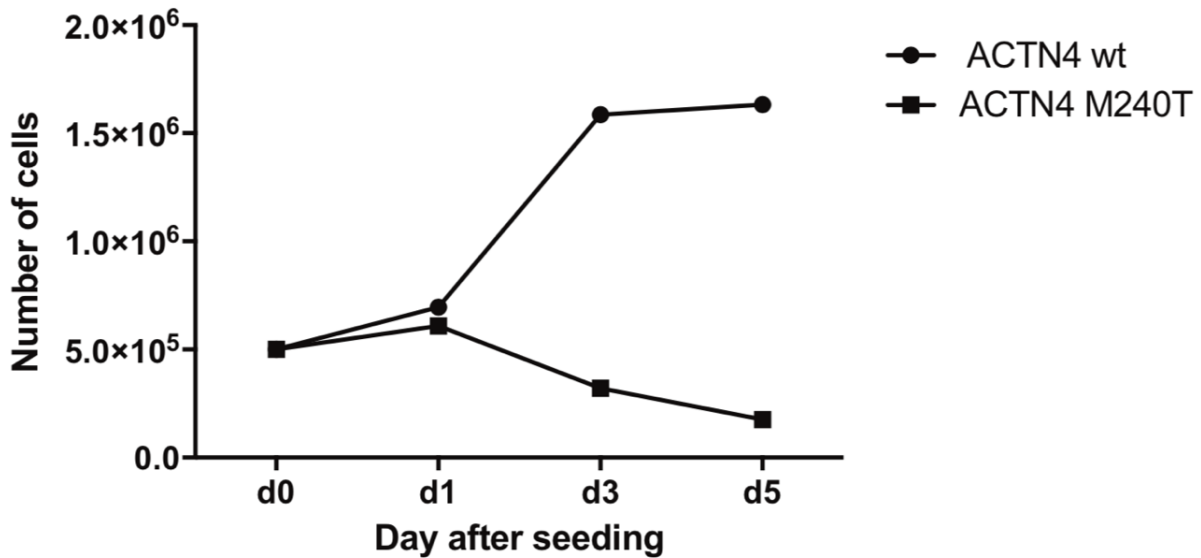


Abbildung 7: Zählung transgener MOIN-Podozyten nach lentiviraler Transduktion

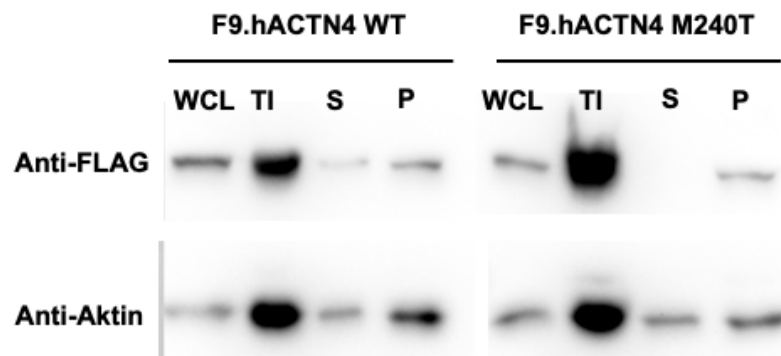
Am vierten Tag nach erfolgter lentiviraler Transduktion wurden transgene MOIN-Podozyten in gleicher Dichte in 6-Well-Schalen ausgesät. An Tag 1, 3 und 5 erfolgte eine Bestimmung der Zelldichte in den Wells, 3 gleichzeitig kultivierte Wells wurden jeweils gemittelt. (n=3)

Wie in Abbildung 7 erkennbar, proliferierten die Kontrollzellen (F.hACTN4-WT) bis zum Tag 3 nach Beginn des Experiments und füllten hierbei dann nahezu die gesamte Zellkulturschale aus. Um ein weiteres Wachstum gewährleisten zu können, erfolgte an Tag 3 eine Verdünnung der Zellen mit erneutem Aussähen auf die Ursprungsdichte. Bis Tag 5 wuchs die Zahl der Zellen in einem Well der 6-Well-Schale dann erneut bis 1.5×10^6 an. Nach Expression von F.hACTN4-M240T stagnierte die Proliferation der Podozyten in der Zellkulturschale ab dem ersten Tag nach Aussähen der Zellen. Ab Tag 3 waren in der lichtmikroskopischen Kontrolle zahlreiche abgestorbene Zellen zu sehen. Die Proliferation stagnierte, es kam insgesamt zu einer Verringerung der Zellzahlen in den Wells bis zu Tag 5.

Zur weiteren Untersuchung von ACTN4 auf subzellulärer Ebene verwendeten wir neben der soeben beschriebenen Immunfluoreszenz ein in der Literatur mehrfach vorgeschriebenes Experiment zur Fraktionierung von verschiedenen Aktin Kompartimente^{90,96,102}. Hierbei erfolgt mittels mehrerer Zentrifugationsschritte eine Sedimentation verschiedener Phasen von Zelllysaten. Für dieses Experiment verwendet wurden HEK293T-Zellen, die nach transienter Transfektion mit F.hACTN4-M240T oder F.hACTN4-WT lysiert und dann mehreren Zentrifugationsschritten zugeführt wurden. Hierbei entstehen Lysate mehrerer Fraktionen: Die Triton-unlösliche (TI) Fraktion enthält unlösliche Zellbestandteile, wie beispielsweise große Aktin-Bündel. Die nach Ultrazentrifugation entstehende Pellet-Fraktion (P) enthält filamentöses F-Aktin, wohingegen der dann entstehende Überstand (S) lösliches G-Aktin

enthält. Es erfolgte eine Auftrennung der Lysate mittels SDS-Page und eine anschließende Visualisierung. Hierbei zeigt sich relativ eine deutlich vermehrte Anreicherung von ACTN4-M240T in der TI-Phase verglichen zu ACTN4-WT. Diese Ergebnisse sind in 4 biologischen Replikaten statistisch signifikant.

A



B

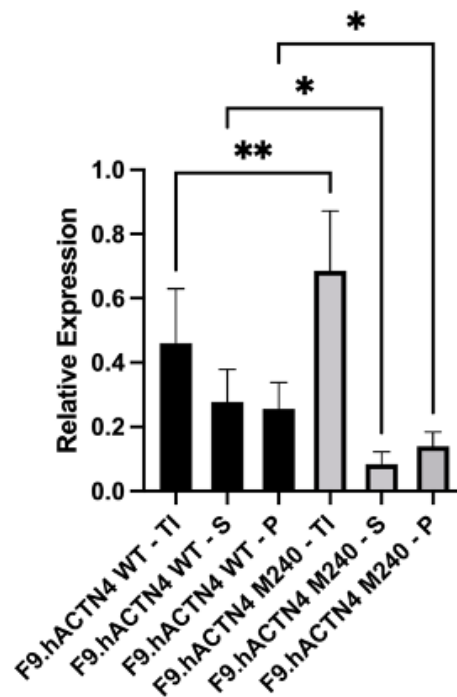


Abbildung 8: Aktin-Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation

- A. F.hACTN4-M240T oder F.hACTN4-WT wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach Ernte der Zellen und Lyse mit Standardmethoden erfolgte eine Aktin-Fraktionierung (s. Methoden). Im Anschluss erfolgte eine Visualisierung mit einem anti-FLAG-Antikörper. Als Ladekontrolle wurde ein anti-Aktin Antikörper verwendet.
- B. Densitometrische Untersuchung der Verteilung von ACTN4 in den verschiedenen Fraktionen. (n=4, * p<0.02, ** p<0.05)

4.2. ACTN4-M240T löst eine DNA-Schadensantwort in MOIN-Podozyten aus

Zur weiteren Untersuchung der zuvor gesehenen Mortalität der ACTN4-M240T exprimierenden Podozyten erfolgte eine Anfärbung des phosphorylierten Histon H2AX (γ H2AX) als DNA-Schadensmarker. Das Histon H2AX ist im Zellkern lokalisiert und stabilisiert die DNA. Nach Auftreten eines DNA-Doppelstrangbruchs wird das Histon H2AX an Serin 139 phosphoryliert, weshalb es in seiner phosphorylierten Form als DNA-Schadensmarker genutzt werden kann¹⁰³.

Hierfür wurden die transgenen MOIN-Podozyten nach erfolgter lentiviraler Transduktion mit F.hACTN4-M240T pLenti6.3 oder F.hACTN4-WT pLenti6.3 96 Stunden nach der Transduktion geerntet und Proteinlysate hergestellt. Die weitere Visualisierung der Proteinmengen erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunblotting. Wie in Abbildung 9 zu erkennen, ist der DNA-Schadensmarker γ H2AX nach erfolgter Quantifizierung und Normalisierung der Proteinmengen zur Kontrolle in den hACTN4-M240T exprimierenden MOIN-Podozyten deutlich vermehrt zu detektieren.

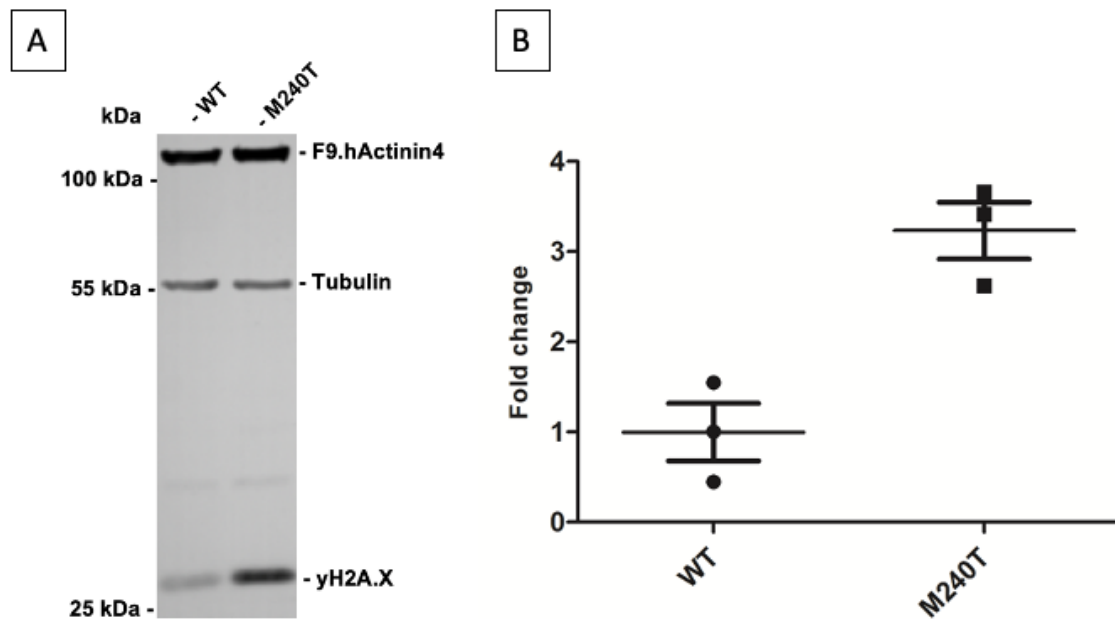


Abbildung 9: Analyse der Expression des DNA-Schadensmarkers γ .H2AX in transgenen MOIN-Podozyten

- A. Mittels lentiviraler Transduktion wurden F.hACTN4-M240T oder F.hACTN4-WT stabil in MOIN-Podozyten überexprimiert, eine Selektionierung erfolgte im Anschluss mit Blasticidin. Nach erfolgter Selektionierung wurden die Zellen lysiert, die Zelllysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit anti-FLAG- und anti-Tubulin-Antikörpern visualisiert.
- B. Densitometrische Untersuchung der in A. gewonnenen Ergebnisse. Es zeigt sich eine deutlich vermehrte Expression von γ .H2AX in den F.hACTN4-M240T Zellen verglichen zur Kontrolle. Eine Normalisierung der Proteinmenge erfolgte zu Tubulin (n=3, p<0.05).

4.3. Analysen zur Proteinstabilität von ACTN4-M240T

Voruntersuchungen zu anderen Mutanten des humanen Alpha-Aktinin-4 konnten eine verringerte Proteinstabilität zeigen⁹⁶. Um die Stabilität der Mutante zu untersuchen, wurden Wildtyp-HEK293T-Zellen entweder mit F.hACTN4-M240T oder F.hACTN4-WT transfiziert (s. Abschnitt 4). Zur Kontrolle und Normalisierung der Proteinmengen erfolgte eine Kotransfektion mit F.GFP.

Wie in Abbildung 10 zu sehen, ist trotz gleicher Gesamt-Proteinmenge in den Lysaten und gleicher Menge an transfiziertem Plasmid eine verringerte Expression der neu beschriebenen ACTN4 Mutante zu sehen. Auch eine Quantifizierung mittels Densitometrie ergab eine signifikant reduzierte Expression der Mutante in HEK293T-Zellen.

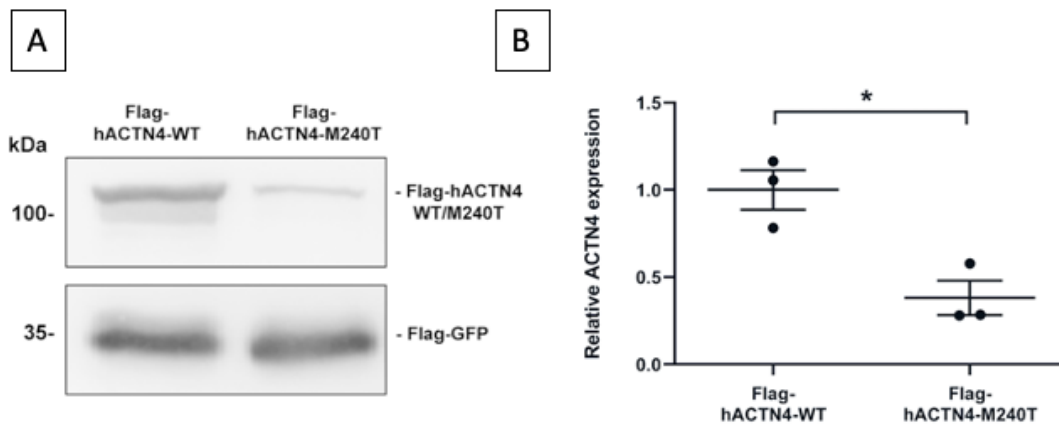


Abbildung 10: Analyse der Expression von Alpha-Aktinin-4-M240T und Alpha-Aktinin-4-WT in HEK293T-Zellen

- A. Visualisierung von ACTN4-WT/-M240T nach transients Transfektion in 293T-Zellen. Die Anfärbung erfolgte mittels anti-FLAG-Antikörper. Zur Normalisierung erfolgte eine Co-Transfektion von F.GFP.
- B. Densitometrische Ergebnisse der in A. zu erkennenden Banden. Nach Normalisierung auf die GFP-Banden zeigt sich eine deutlich verringerte Expression von F.hACTN4-M240T verglichen zu F.hACTN4-WT als Kontrolle. (n=3, p<0.05).

Die Punktmutation *ACTN4*-M240T betrifft den für die Aktin-bindende Domäne kodierenden Abschnitt des *ACTN4*-Gens. Auch andere bekannte, mit dem Auftreten von FSGS assoziierte Mutationen im *ACTN4*-Gen betreffen diese Domäne. Im Rahmen früherer Experimente konnte für die vorgeschriebenen Mutationen in diesem Bereich ein destabilisierender Effekt des Proteins berechnet werden⁹⁶. Auch für *ACTN4*-M240T erfolgte eine Berechnung der thermischen Stabilität mittels bioinformatischer Methoden. Hierfür sind mehrere Algorithmen vorgeschrieben, die anhand statistischer Methoden unter anderem intramolekulare Potenziale berechnen und somit eine Aussage über die Veränderung der thermodynamischen Stabilität nach Punktmutationen treffen¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Die hierzu in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse der genutzten Algorithmen sagen in jedem jeweils einen destabilisierenden Effekt der hier neu beschriebenen Punktmutation und des resultierenden Aminosäureaustauschs für das Protein vorher. Da die betreffende Domäne eine konservierte Domäne in verschiedenen Varianten von Alpha-Aktinin ist, erfolgte diese Untersuchung auch für *ACTN1* und *ACTN3*. Auch hier sorgt die betreffende Punktmutation in der Aktin-bindenden Domäne für eine Destabilisierung des Proteins.

Algorithm	ACTN4 (PDB: 2R0O)		ACTN1 (PDB: 2EYN)		ACTN3 (PDB: 1WKU)	
	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Effect	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Effect	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Effect
DUET	-1.797	Destabilizing	-1.767	Destabilizing	-1.893	Destabilizing
PoPMuSiC v 3.1	1.43	Destabilizing	1.3	Destabilizing	1.27	Destabilizing
CUPSAT	-1.04	Destabilizing	-4.95	Destabilizing	-3.18	Destabilizing
IMutant v2.0	-1.96	Destabilizing	-1.9	Destabilizing	-2.21	Destabilizing

Abbildung 11: Berechnung der thermodynamischen Stabilität von ACTN4-M240T mittels bioinformatischer Methoden

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit erfolgt die Charakterisierung einer erstmalig beschriebenen Punktmutation im *ACTN4*-Gen bei einem Patienten mit FSGS. Die FSGS ist von hoher klinischer Relevanz, da sie eine der häufigsten glomerulären Ursachen für eine terminale Nierensuffizienz darstellt und die Identifizierung und Charakterisierung genetischer Nierenerkrankungen zum Verständnis dieser wichtigen Erkrankungsgruppe beiträgt. Insbesondere ist auch im Einzelfall die genaue Einordnung der Krankheitsursache für die optimale weitere Therapie des betroffenen Patienten entscheidend. Hierbei spielen Sequenzierungstechniken, die eine Identifikation bislang unbekannter Mutationen in Genen ermöglichen, die bekannterweise mit dem Auftreten chronischer Nierenerkrankungen assoziiert sind, eine wichtige Rolle.

Im Fall des hier vorgestellten Indexpatienten waren beide Eltern gesund, die Mutation konnte lediglich beim betroffenen Indexpatienten nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine *de novo* Mutation im *ACTN4*-Gen. Von großer Bedeutung ist in der weiteren Aufarbeitung die Unterscheidung - insbesondere bei erstmalig beschriebenen Varianten – zwischen krankheitsrelevanten Varianten und Variationen, die für die Pathogenese der vorliegenden Erkrankung nicht verantwortlich sind. Hier spielt die Grundlagenwissenschaft eine besondere Rolle, da mit der Untersuchung der betreffenden Mutante im Zellkultur- und auch im Tiermodell eine Charakterisierung erfolgen kann.

Für die Untersuchungen im Zellkulturmodell wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze genutzt. Um die Auswirkungen der vorliegenden Mutation im Podozyten zu untersuchen, wurde mithilfe lentiviraler Transduktion eine Zelllinie transgener humaner immortalisierter Podozyten etabliert, die stabil die vorliegende Mutante exprimiert. Eine Untersuchung der Proteineigenschaften auf molekularer Ebene erfolgte zudem in HEK293T-Zellen. Weiterhin konnten *in silico* Berechnungen mittels verschiedener Algorithmen eine verringerte Proteinstabilität vorhersagen. Dieser destabilisierende Effekt zeigt sich auch für Berechnungen am *ACTN1* und *ACTN3*, hier in derselben konservierten funktionellen Domäne.

5.1. DNA-Schadensantwort

Wenige Tage nach lentiviraler Transduktion und Überexprimierung der Mutante in MOIN-Podozyten proliferierten die betreffenden Zellen nicht mehr und starben letztendlich zum großen Teil ab. In der Analyse von Zelllysaten der betreffenden Zellen konnte eine Überexprimierung des DNA-Schadensmarkers γ H2AX festgestellt werden, der DNA-Doppelstrangbrüche visualisiert. Auffällig war eine Anfärbung des Nukleus in FLAG-Färbungen in den transgenen MOIN-Podozyten, was auf eine vermehrte Relokalisation der Mutante in den Nukleus zurückzuführen sein könnte.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass nukleäres Aktin und die hiermit assoziierten Proteine eine wesentliche Rolle im Rahmen der DNA-Schadensantwort spielen: Frühere Untersuchungen in humanen Zellen haben beispielsweise gezeigt, dass sich nukleär lokalisierte Aktin-Filamente als Folge im Rahmen von Schadensmodellen formieren¹⁰⁸. Gleichsam führte in Untersuchungen von Belin et al. eine artifizielle Beeinträchtigung der Aktin-Polymerisierung im Nukleus zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur¹⁰⁸. Verschiedene andere Studien haben gezeigt, dass das Aktin-Zytoskelett gerade bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eine wichtige Rolle spielt und, dass eine Beeinträchtigung des Aktin-Zytoskeletts eine Einschränkung der DNA-Schadensantwort zur Folge hat: So konnte im Maus- und Fliegenmodell gezeigt werden, dass nukleär lokalisiertes F-Aktin und Myosin an einer Relokalisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen in die Peripherie des Nukleus beteiligt sind, um eine Reparatur dieser Doppelstrangbrüche zu vermitteln¹⁰⁹.

Die Ergebnisse des UREC-Proteoms in den Vordaten deuten zudem auf eine Beeinflussung von Bestandteilen der DNA-Replikation und der Chromosomen-Homöostase durch die Mutante hin. In diesem Kontext konnten Untersuchungen von Hishikawa et al. zeigen, dass ein Knockout der Histon acetyltransferase KAT5, die im Rahmen von DNA-Reparaturmechanismen beteiligt ist, zu vermehrten DNA-Doppelstrangbrüchen führt¹¹⁰. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte bereits zuvor zeigen, dass DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen verschiedene podozytäre Phänotypen bedingen¹¹⁰.

Anhand der vorliegenden Daten zu *ACTN4*-M240T wäre eine Beeinflussung der DNA-Reparaturmechanismen durch Affektion der DNA-Replikation denkbar. Es ist zu vermuten, dass in den die Mutante exprimierenden, transgenen MOIN-Podozyten entweder vermehrte DNA-Schäden auftreten oder die DNA-Reparaturmechanismen beeinträchtigt sind. Zahlreiche Faktoren können *in vivo* und *in vitro* zum Auftreten von DNA-Schäden führen: Einerseits kommt es bei der regulär stattfindenden Zellteilung regelhaft im Rahmen der DNA-Replikation zur Akkumulation von DNA-Schäden, welche mittels DNA-Reparaturmechanismen repariert

werden. Ein anderer Faktor, der zu DNA-Schäden führt ist die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche in Stresszuständen in vermehrtem Maße auftritt. Andere exogene Faktoren, wie beispielsweise Hypoxie oder oxidativer Stress sind im Rahmen der Erforschung chronischer Nierenerkrankungen besonders relevant, weil sie häufig in Krankheitszuständen auftreten.

Podozyten – wie bereits einleitend beschrieben – postmitotische, terminal differenzierte Zellen. Davon ausgehend bietet das hier genutzte Zellkulturmodell mit proliferierenden Zellen zahlreiche Limitationen. So ist es denkbar, dass die hier gesehene Beeinflussung von Proteinen des Chromosomen-Haushalts und der DNA-Replikation lediglich einem Zellkulturartefakt entspricht.

Die hier im Zellkulturmodell gesehene, hohe Mortalität der transduzierten MOIN-Podozyten ist zudem vor dem Hintergrund der Klinik des Indexpatienten überraschend. Dieser präsentierte sich zum Zeitpunkt der Arbeit mit einem lediglich milden Verlauf eines steroidresistenten nephrotischen Syndroms. Ein vollständiges Absterben der Zellen wäre also vor dem Hintergrund dessen nicht zu erwarten. Möglich wäre es, dass ACTN4-M240T zu einer Beeinflussung der DNA-Replikationsmechanismen führt und diese Effekte mit dem Artefakt des Zellkulturmodells, der persistierenden Proliferation der Podozyten, mittels Akkumulation von DNA-Schäden und der Anhäufung von DNA-Doppelstrangbrüchen deutlich stärker zum Tragen kommt als bei den terminal differenzierten Podozyten *in vivo*, die sich nicht mehr teilen. Möglich ist auch, dass das genutzte System der lentiviralen Transduktion aufgrund seiner hohen Effizienz zu einer sehr hohen Expression der Mutante führt, was wiederum die Effekte verstärkt.

5.2. Zytoskelett

Die Integrität der glomerulären Schlitzmembran hängt im Wesentlichen von der Funktion und den Interaktionen des podozytären Zytoskeletts als Schnittstelle zu den Transmembranproteinen ab. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass zahlreiche bekannte, mit chronischen Nierenerkrankungen assoziierte Mutationen Proteine betreffen, die mit zytoskelettalen Proteinen interagieren oder integraler Bestandteil des Zytoskeletts sind. Insbesondere für das hier untersuchte Alpha-Aktinin-4 sind in der Literatur verschiedene Mutationen beschrieben.

Um den Einfluss von ACTN4-M240T auf das podozytäre Zytoskelett zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Zelllinie transgener MOIN-Podozyten etabliert, welche die Mutante exprimieren. Morphologisch ließ sich in Immunfluoreszenzfärbungen hier eine deutliche Strukturveränderung des podozytären Zytoskeletts nachweisen. Aktin, in den Färbungen visualisiert durch Nutzung von Phalloidin, lokalisierte in den betreffenden Zellen in Aggregaten, die normalerweise vorhandene Struktur des Aktins als wichtiger Strukturgeber des Zytoskeletts scheint hier nicht mehr vorhanden. Wie zu erwarten kolokalisiert Alpha-Aktinin-4 als Aktin-bindendes Protein mit diesen Aggregaten.

In der Literatur finden sich Untersuchungen zu weiteren Mutationen des Alpha-Aktinin-4, die ebenfalls eine Formierung von Aggregaten beschreiben, wenngleich in weniger ausgeprägter Form⁹⁶. Die genauen molekularen Mechanismen, die zur Pathogenität der betreffenden Mutanten und letztlich zum Auftreten von FSGS führen bleiben jedoch bis heute unklar. So wird einerseits eine Toxizität der Aktin-Aggregate selbst diskutiert, andererseits ist die Genese der beobachteten Aggregierung Teil von Diskussionen: Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Mutation in der Aktin-bindenden Domäne von Alpha-Aktinin-4 zu einer erhöhten Affinität des Proteins zu Aktin führt⁸⁹⁻⁹¹. Auch die im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Experimente zur Aktin-Fraktionierung können eine Anreicherung von Alpha-Aktinin-4 in der Triton-unlöslichen Fraktion zeigen, was für eine Kolokalisation des Proteins zu großen Aktin-Bündeln spricht. Eine andere Hypothese ist, dass Mutationen in Alpha-Aktinin-4 eine funktionelle Störung des Zytoskeletts in seiner Form als mechanischer Strukturgeber bedingen und somit auf molekularer Ebene zum Auftreten der FSGS führen. Diese Hypothese kann im Rahmen dieser Promotionsarbeit mit den vorhandenen *in vitro* Daten nur eingeschränkt bestätigt oder widerlegt werden.

5.3. Proteinstabilität

Frühere Untersuchungen zu anderen Mutationen des Alpha-Aktinin-4 konnten eine verringerte Proteinstabilität zeigen¹¹¹. Zuletzt konnten Bartram et al. für die Mutante *ACTN4-G195D* nachweisen, dass eine vermehrte Ubiquitylierung des mutierten Proteins zu einem vermehrten Abbau durch das Proteasom-System führt⁹⁶. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit generierten Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine verringerte Stabilität der Mutante hin: Nach transienter Expression in HEK293T-Zellen kann nach erfolgter Normalisierung verglichen zum Wildtyp weniger Protein in den Zelllysaten festgestellt werden. Auch eine Vorhersage der Proteinstabilität mittels bioinformatischer Methoden sagte bei Nutzung verschiedener Algorithmen einen destabilisierenden Effekt der Mutation voraus. Hierzu widersprüchlich erscheinen die aus den transgenen MOIN-Podozyten gewonnenen Daten: Anders als bei Überexpression in 293T-Zellen, zeigt sich hier auch nach Normalisierung der Proteinmengen im Western Blot eine gleiche Expression von Mutante und Wildtyp. Denkbar wäre, dass dies ein Effekt des genutzten Zellkulturmodells des Podozyten ist: Während der instabilisierende Effekt der Mutation in den rasch proliferierenden 293T-Zellen möglicherweise zu einem schnelleren Abbau des Proteins führt, ist es möglich, dass dieser Effekt in den langsamer proliferierenden MOIN-Podozyten weniger stark zur Geltung kommt.

5.4. Limitationen

Eine wesentliche Limitation dieser Promotionsarbeit ist die Untersuchung lediglich eines biologischen Replikats, zumindest bei dem Patientenmaterial. Eine Generalisierung ist somit nur eingeschränkt möglich, wobei anhand exemplarisch untersuchter Patientenmutanten durchaus Rückschlüsse auf allgemeine Mechanismen hinsichtlich der Physiologie und auch Pathophysiologie von bestimmten Genen und Proteinen gezogen werden kann und dies unser Verständnis vieler Erkrankungen wesentlich verbessert hat. Die Arbeit enthält zudem Daten, die aus *in vitro* Experimenten sowie *in silico* gewonnen wurden. Die Limitationen von Zellkulturmodellen in der podozytären Grundlagenforschung werden seit Jahren diskutiert: Der Podozyt ist eine terminal differenzierte Zelle, so dass die Nutzung immortalisierter Podozyten für das Zellkulturmodell in der Praxis lediglich eine Annäherung ist. In proteomischen Untersuchungen von kultivierten, immortalisierten Mauspodozyten und MOIN-Podozyten von Rinschen et al. und Schroeter et al. konnte zudem gezeigt werden, dass auch nach Differenzierung bei 37°C nur ein Teil der heute bekannten, wesentlichen Schlitzmembran-Proteine, wie beispielsweise CD2AP, exprimiert wird^{112,113}.

Weitere praktische Limitationen der Zellkulturarbeiten waren durch die hohe Mortalität der transgenen MOIN-Podozyten bedingt. Für Untersuchungen zur Proteinstabilität,

beispielsweise mittels Cyclohexamid-Assay als etabliertes Untersuchungsverfahren, sind mehrere Tage Kultivierung und eine Passagierung über mehrere Zyklen notwendig. Dies war im hier verwendeten Modell nicht möglich, da bereits kurze Zeit nach Transduktion der Zellen keine Proliferation mehr nachzuweisen war. Auch die Aussage von Motilitätsassays, die in vorherigen Studien stets als Korrelat für die Funktion der Podozyten als Strukturgeber der Schlitzmembran verwendet worden sind, ist hierdurch deutlich eingeschränkt. Eine Möglichkeit zur Adressierung dieser Probleme wäre es, ein anderes System für die Etablierung stabiler Zelllinien zu nutzen, beispielsweise mittels induzierbarer Genexpression oder mittels Nutzung eines Systems, das gezielt einen Genlokus adressiert.

5.5. Ausblick

Zur Bestätigung der im Rahmen dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten sind weitere Experimente notwendig. Im Anschluss an diese Arbeit sollten die vorliegenden *in vitro* Daten mittels Untersuchungen im Tiermodell ergänzt werden, um einerseits mehrere biologische Replikate zu ermöglichen und andererseits *in vivo* Daten zu generieren, die die vorbeschriebenen Zellkulturartefakte in Podozyten umgehen. Unveröffentlichte *in vivo* Daten aus dem nephrologischen Forschungslabor legen nahe, dass *ACTN4-M240T* in der Tat eine pathologische, FSGS-verursachende Mutation ist. Im *Drosophila* Nephrozyten-Modell erfolgte der Knockdown von *ACTN4*, was zu einem glomerulär äquivalenten Phänotyp führt. Ein anschließendes Experiment mit Expression von *ACTN4-M240T* konnte im Gegensatz zur Expression von *ACTN4-WT* den durch den Knockdown verursachten Phänotyp nicht mitigieren.

Inhaltlich sollte genauer untersucht werden, ob die hier im Zellkulturmodell gesehene DNA-Schadenssignatur lediglich ein Ausdruck der potenziell toxisch wirkenden Aktin-/ Alpha-Aktinin-4-Aggregate sind, wie in Vorarbeiten vermutet, oder ob die beobachtete Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts durch die vorliegende Mutation etwa auch einen Einfluss auf die Funktionen des Zellkerns hat, einschließlich der DNA-Replikation, DNA-Schadensantwort und Chromosomen-Haushalt.

6. Literaturverzeichnis

1. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 2013; **382**(9888): 260-72.
2. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int* 2016; **113**(6): 85-91.
3. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2018 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 2019; **73**(3 Suppl 1): A7-A8.
4. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; **108**(17): 2154-69.
5. Madison JR, Spies C, Schatz IJ, et al. Proteinuria and risk for stroke and coronary heart disease during 27 years of follow-up: the Honolulu Heart Program. *Arch Intern Med* 2006; **166**(8): 884-9.
6. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; **83**(1): 253-307.
7. Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis* 1997; **30**(5): 621-31.
8. Cameron JS. The nephrotic syndrome and its complications. *Am J Kidney Dis* 1987; **10**(3): 157-71.
9. D'Agati V. The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1994; **46**(4): 1223-41.
10. Sim JJ, Batech M, Hever A, et al. Distribution of Biopsy-Proven Presumed Primary Glomerulonephropathies in 2000-2011 Among a Racially and Ethnically Diverse US Population. *Am J Kidney Dis* 2016; **68**(4): 533-44.
11. Kitiyakara C, Kopp JB, Eggers P. Trends in the epidemiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 2003; **23**(2): 172-82.
12. Shabaka A, Tato Ribera A, Fernandez-Juarez G. Focal Segmental Glomerulosclerosis: State-of-the-Art and Clinical Perspective. *Nephron* 2020; **144**(9): 413-27.
13. Vincenti F, Ghiggeri GM. New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Transplant* 2005; **5**(6): 1179-85.
14. Matalon A, Markowitz GS, Joseph RE, et al. Plasmapheresis treatment of recurrent FSGS in adult renal transplant recipients. *Clin Nephrol* 2001; **56**(4): 271-8.
15. Davenport RD. Apheresis treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation: re-analysis of published case-reports and case-series. *J Clin Apher* 2001; **16**(4): 175-8.
16. Wei C, El Hindi S, Li J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 2011; **17**(8): 952-60.
17. Wei C, Moller CC, Altintas MM, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 2008; **14**(1): 55-63.
18. Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**(10): 587-98.
19. Grahammer F, Wigge C, Schell C, et al. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI Insight* 2016; **1**(9).
20. Ichimura K, Miyazaki N, Sadayama S, et al. Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. *Sci Rep* 2015; **5**: 8993.
21. Yamada E. The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; **1**(6): 551-66.

22. Unnersjo-Jess D, Scott L, Blom H, Brismar H. Super-resolution stimulated emission depletion imaging of slit diaphragm proteins in optically cleared kidney tissue. *Kidney Int* 2016; **89**(1): 243-7.
23. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990; **111**(3): 1255-63.
24. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**(1): 1-8.
25. Fukasawa H, Bornheimer S, Kudlicka K, Farquhar MG. Slit diaphragms contain tight junction proteins. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**(7): 1491-503.
26. Yaoita E, Yao J, Yoshida Y, et al. Up-regulation of connexin43 in glomerular podocytes in response to injury. *Am J Pathol* 2002; **161**(5): 1597-606.
27. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephritin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(14): 7962-7.
28. Lehtonen S, Lehtonen E, Kudlicka K, Holthofer H, Farquhar MG. Nephritin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin-Darby canine kidney cells expressing nephritin. *Am J Pathol* 2004; **165**(3): 923-36.
29. Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstadt H, Walz G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* 2003; **17**(1): 115-7.
30. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephritin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; **1**(4): 575-82.
31. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephritin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**(4): 918-26.
32. Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. Nephritin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem* 2003; **278**(21): 19266-71.
33. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001; **21**(14): 4829-36.
34. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; **24**(4): 349-54.
35. Palmén T, Lehtonen S, Ora A, et al. Interaction of endogenous nephritin and CD2-associated protein in mouse epithelial M-1 cell line. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**(7): 1766-72.
36. Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; **286**(5438): 312-5.
37. Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003; **300**(5623): 1298-300.
38. Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**(4): F734-43.
39. Yuan H, Takeuchi E, Salant DJ. Podocyte slit-diaphragm protein nephritin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **282**(4): F585-91.
40. Butt L, Unnersjo-Jess D, Hohne M, et al. A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab* 2020; **2**(5): 461-74.
41. Drenckhahn D, Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* 1988; **59**(5): 673-82.
42. Andrews PM, Bates SB. Filamentous actin bundles in the kidney. *Anat Rec* 1984; **210**(1): 1-9.
43. Perico L, Conti S, Benigni A, Remuzzi G. Podocyte-actin dynamics in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2016; **12**(11): 692-710.
44. Korhonen M, Ylanne J, Laitinen L, Virtanen I. The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J Cell Biol* 1990; **111**(3): 1245-54.
45. Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, et al. Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev Biol* 2008; **316**(2): 288-301.

46. Zhang YJ, Tian ZL, Yu XY, Zhao XX, Yao L. Activation of integrin beta1-focal adhesion kinase-RasGTP pathway plays a critical role in TGF beta1-induced podocyte injury. *Cell Signal* 2013; **25**(12): 2769-79.
47. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(11): 5192-6.
48. Ma H, Togawa A, Soda K, et al. Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**(7): 1145-56.
49. Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 1995; **377**(6549): 539-44.
50. Michael KE, Dumbauld DW, Burns KL, Hanks SK, Garcia AJ. Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Mol Biol Cell* 2009; **20**(9): 2508-19.
51. Kriz W, Lemley KV. A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**(2): 258-69.
52. Endlich N, Endlich K. Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol* 2006; **85**(3-4): 229-34.
53. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 2011; **40**: 169-86.
54. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; **112**(4): 453-65.
55. Insall RH, Machesky LM. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* 2009; **17**(3): 310-22.
56. Lahdenpera J, Kilpelainen P, Liu XL, et al. Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases. *Kidney Int* 2003; **64**(2): 404-13.
57. Zhu J, Sun N, Aoudjit L, et al. Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney Int* 2008; **73**(5): 556-66.
58. Blasutig IM, New LA, Thanabalasuriar A, et al. Phosphorylated YDXV motifs and Nck SH2/SH3 adaptors act cooperatively to induce actin reorganization. *Mol Cell Biol* 2008; **28**(6): 2035-46.
59. Sever S, Schiffer M. Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases. *Kidney Int* 2018; **93**(6): 1298-307.
60. Kistler AD, Altintas MM, Reiser J. Podocyte GTPases regulate kidney filter dynamics. *Kidney Int* 2012; **81**(11): 1053-5.
61. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; **8**(5): 485-91.
62. Machacek M, Hodgson L, Welch C, et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 2009; **461**(7260): 99-103.
63. Kriz W, Hackenthal E, Nobiling R, Sakai T, Elger M, Hahnel B. A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney Int* 1994; **45**(2): 369-76.
64. Blanchard A, Ohanian V, Critchley D. The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* 1989; **10**(4): 280-9.
65. Honda K, Yamada T, Endo R, et al. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998; **140**(6): 1383-93.
66. Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, Kunkel LM. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem* 1992; **267**(13): 9281-8.
67. Smoyer WE, Mundel P, Gupta A, Welsh MJ. Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol* 1997; **273**(1 Pt 2): F150-7.
68. Borrego-Diaz E, Kerff F, Lee SH, Ferron F, Li Y, Dominguez R. Crystal structure of the actin-binding domain of alpha-actinin 1: evaluating two competing actin-binding models. *J Struct Biol* 2006; **155**(2): 230-8.
69. Noegel A, Witke W, Schleicher M. Calcium-sensitive non-muscle alpha-actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett* 1987; **221**(2): 391-6.

70. BurrIDGE K, Feramisco JR. Non-muscle alpha actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins. *Nature* 1981; **294**(5841): 565-7.
71. Djinovic-Carugo K, Young P, Gautel M, Saraste M. Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell* 1999; **98**(4): 537-46.
72. Tang J, Taylor DW, Taylor KA. The three-dimensional structure of alpha-actinin obtained by cryoelectron microscopy suggests a model for Ca(2+)-dependent actin binding. *J Mol Biol* 2001; **310**(4): 845-58.
73. Otey CA, Vasquez GB, BurrIDGE K, Erickson BW. Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1993; **268**(28): 21193-7.
74. Pavalko FM, Otey CA, Simon KO, BurrIDGE K. Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans* 1991; **19**(4): 1065-9.
75. Kroemker M, Rudiger AH, Jockusch BM, Rudiger M. Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett* 1994; **355**(3): 259-62.
76. Bois PR, Borgon RA, Vonrhein C, Izard T. Structural dynamics of alpha-actinin-vinculin interactions. *Mol Cell Biol* 2005; **25**(14): 6112-22.
77. Li B, Trueb B. Analysis of the alpha-actinin/zyxin interaction. *J Biol Chem* 2001; **276**(36): 33328-35.
78. Has C, Herz C, Zimina E, et al. Kindlin-1 Is required for RhoGTPase-mediated lamellipodia formation in keratinocytes. *Am J Pathol* 2009; **175**(4): 1442-52.
79. Khurana S, Chakraborty S, Cheng X, Su YT, Kao HY. The actin-binding protein, actinin alpha 4 (ACTN4), is a nuclear receptor coactivator that promotes proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2011; **286**(3): 1850-9.
80. Khurana S, Chakraborty S, Zhao X, et al. Identification of a novel LXXLL motif in alpha-actinin 4-spliced isoform that is critical for its interaction with estrogen receptor alpha and co-activators. *J Biol Chem* 2012; **287**(42): 35418-29.
81. An HT, Kim J, Yoo S, Ko J. Small leucine zipper protein (sLZIP) negatively regulates skeletal muscle differentiation via interaction with alpha-actinin-4. *J Biol Chem* 2014; **289**(8): 4969-79.
82. Chakraborty S, Reineke EL, Lam M, et al. Alpha-actinin 4 potentiates myocyte enhancer factor-2 transcription activity by antagonizing histone deacetylase 7. *J Biol Chem* 2006; **281**(46): 35070-80.
83. Jasavala R, Martinez H, Thumar J, et al. Identification of putative androgen receptor interaction protein modules: cytoskeleton and endosomes modulate androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 2007; **6**(2): 252-71.
84. Zhao X, Hsu KS, Lim JH, Bruggeman LA, Kao HY. alpha-Actinin 4 potentiates nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cell (NF-kappaB) activity in podocytes independent of its cytoplasmic actin binding function. *J Biol Chem* 2015; **290**(1): 338-49.
85. Kos CH, Le TC, Sinha S, et al. Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* 2003; **111**(11): 1683-90.
86. Dandapani SV, Sugimoto H, Matthews BD, et al. Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem* 2007; **282**(1): 467-77.
87. Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, Iino N, Zhou H, Farquhar MG. Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(28): 9814-9.
88. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; **24**(3): 251-6.
89. Ehrlicher AJ, Krishnan R, Guo M, Bidan CM, Weitz DA, Pollak MR. Alpha-actinin binding kinetics modulate cellular dynamics and force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**(21): 6619-24.
90. Michaud JL, Chaisson KM, Parks RJ, Kennedy CR. FSGS-associated alpha-actinin-4 (K256E) impairs cytoskeletal dynamics in podocytes. *Kidney Int* 2006; **70**(6): 1054-61.
91. Weins A, Schlondorff JS, Nakamura F, et al. Disease-associated mutant alpha-actinin-4 reveals a mechanism for regulating its F-actin-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(41): 16080-5.

92. Buscher AK, Kranz B, Buscher R, et al. Immunosuppression and Renal Outcome in Congenital and Pediatric Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephro* 2010; **5**(11): 2075-84.
93. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, et al. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**(3): 722-32.
94. Otto EA, Ramaswami G, Janssen S, et al. Mutation analysis of 18 nephronophthisis associated ciliopathy disease genes using a DNA pooling and next generation sequencing strategy. *J Med Genet* 2011; **48**(2): 105-16.
95. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* 2012; **7**(12): 2080-9.
96. Bartram MP, Habbig S, Pahmeyer C, et al. Three-layered proteomic characterization of a novel ACTN4 mutation unravels its pathogenic potential in FSGS. *Hum Mol Genet* 2016; **25**(6): 1152-64.
97. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; **36**(1): 59-74.
98. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**(3): 630-8.
99. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; **7**(8): 2745-52.
100. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; **52**(2): 456-67.
101. Loyter A, Scangos G, Juricek D, Keene D, Ruddle FH. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp Cell Res* 1982; **139**(1): 223-34.
102. Michaud JL, Hosseini-Abardeh M, Farah K, Kennedy CR. Modulating alpha-actinin-4 dynamics in podocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; **66**(3): 166-78.
103. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010; **24**(4): 679-86.
104. Pires DE, Ascher DB, Blundell TL. DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**(Web Server issue): W314-9.
105. Dehouck Y, Kwasigroch JM, Gilis D, Rooman M. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics* 2011; **12**: 151.
106. Parthiban V, Gromiha MM, Schomburg D. CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(Web Server issue): W239-42.
107. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(Web Server issue): W306-10.
108. Belin BJ, Lee T, Mullins RD. DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin -2 and Spire-(1/2) that promotes efficient DNA repair. [corrected]. *Elife* 2015; **4**: e07735.
109. Caridi CP, D'Agostino C, Ryu T, et al. Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* 2018; **559**(7712): 54-60.
110. Hishikawa A, Hayashi K, Abe T, et al. Decreased KAT5 Expression Impairs DNA Repair and Induces Altered DNA Methylation in Kidney Podocytes. *Cell Rep* 2019; **26**(5): 1318-32 e4.
111. Yao J, Le TC, Kos CH, et al. Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biol* 2004; **2**(6): e167.
112. Schroeter CB, Koehler S, Kann M, et al. Protein half-life determines expression of proteostatic networks in podocyte differentiation. *FASEB J* 2018; **32**(9): 4696-713.
113. Rinschen MM, Schroeter CB, Koehler S, et al. Quantitative deep mapping of the cultured podocyte proteome uncovers shifts in proteostatic mechanisms during differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; **311**(3): C404-17.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Struktur des Podozyten und der Schlitzmembran.....	12
Abbildung 2: Der Schlitzmembrankomplex.....	14
Abbildung 3: Visualisierung der funktionellen Domänen des Alpha-Aktinin-4.	18
Abbildung 4: Vorarbeiten aus dem nephrologischen Forschungslabor	21
Abbildung 5: Analyse des UREC-Proteoms	24
Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung transgener MOIN-Podozyten.....	42
Abbildung 7: Zählung transgener MOIN-Podozyten nach lentiviraler Transduktion	43
Abbildung 8: Aktin-Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation	45
Abbildung 9: Analyse der Expression des DNA-Schadensmarkers γ-H2AX in transgenen MOIN-Podozyten.....	47
Abbildung 10: Analyse der Expression von Alpha-Aktinin-4-M240T und Alpha-Aktinin-4-WT in HEK293T-Zellen.....	48
Abbildung 11: Berechnung der thermodynamischen Stabilität von ACTN4-M240T mittels bioinformatischer Methoden	49

8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

J. Odenthal, **S. Ditttrich**, V. Ludwig, T. Merz, K. Reitmeier, B. Reusch, M. Höhne, Z. Cosgun, M. Hohenadel, J. Putnik, H. Göbel, M. Rinschen, J. Altmüller, S. Koehler, B. Schermer, T. Benzing, B. Beck, P. Brinkkötter, S. Habbig, M. Bartram. Modeling of ACTN4-based podocytopathy using *Drosophila* nephrocytes. *KI Reports* 2022.
DOI: 10.1016/j.ekir.2022.10.024

J. Odenthal, **S. Ditttrich**, B. Beck, M. Rinschen, B. Schermer, T. Benzing, S. Köhler, P. Brinkkötter, M. Bartram Functional analysis of a novel FSGS-associated *ACTN4* mutation in podocytes and *Drosophila melanogaster*, Posterpräsentation beim Jahreskongress der American Society of Nephrology, Washington, DC, USA, 2019

S. Ditttrich, A. Wenzel, B. Beck, T. Benzing, M. Höhne, B. Schermer, M. Rinschen, M. Bartram Functional analysis of a novel FSGS-associated *ACTN4* mutation in podocytes. Posterpräsentation beim Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 2018.