

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

**Biochemische Charakterisierung des
Polymorphismus Podocin p.R229Q *in vitro* und *in vivo***

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

vorgelegt von
Robert Hahnfeldt
aus Mönchengladbach, Deutschland

promoviert am 18. September 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Koch
3. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. D. A. Braun

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten

Herr Prof. Dr. Schermer
Herr Dr. Butt

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Zellkultur-Experimente, die Messung der ACR-Ratios aus Mausurin, als auch die histologischen Färbungen der Mausnierenschnitte sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. Linus Butt von mir selbst ausgeführt worden.

Die Operationen an den Versuchstieren mit Entnahme der Nieren und Sammeln des Mausurins sind von Dr. Linus Butt durchgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 21.10.2023

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei all denen Bedanken, die mich auf ganz unterschiedliche Weise auf dem Weg zu dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben. Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Benzing für die Möglichkeit, an der Klinik II für Innere Medizin der Uniklinik Köln promovieren zu können. Darüber hinaus gilt mein großer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Schermer für die freundliche Unterstützung und Betreuung als auch für die richtungsweisenden Tipps bei wichtigen Experimenten. Ein besonders herzliches Dankeschön gilt meinem Betreuer Dr. Linus Butt für die großartige Einarbeitung, die tagtägliche Hilfe und Beratung ohne diese die Arbeit erst möglich wurde. Der regelmäßige Austausch sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher und freundschaftlicher Ebene haben mich stets motiviert und ermutigt. Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Martin Höhne ohne dessen Expertise, insbesondere bei der Programmierung von ImageJ, diese Arbeit nicht möglich wäre. Ebenso möchte ich mich auch bei Stefanie Keller, Martyna Brütting, Serena Greco-Torres und Ruth Herzog für die große Hilfe und die vielen praktischen Tipps im Labor bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich auch beim ganzen Team des Nephrolabs für die wirklich schöne Zeit bedanken. Die angenehme Atmosphäre im Labor war außergewöhnlich.

Ferner bedanke ich mich bei meiner ganzen Familie für die großartige Unterstützung ohne diese ich das alles nicht geschafft hätte. Ein liebevolles Dankeschön geht an meine Eltern Christiane & Thomas Hahnfeldt, meinen Bruder Henry Hahnfeldt und last but not least an meine Ehefrau Vivika Hahnfeldt. Durch die liebevolle Unterstützung und tägliche Hilfe wurde das alles erst möglich.

Abschließend nochmal ein herzliches Dankeschön an alle Menschen die mich auf diesem Weg so tatkräftig unterstützt haben. Es ist ein schönes Gefühl mit solch großartigen Menschen während dieser Zeit gearbeitet zu haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	7
2.1 Die Niere und das Nephrotische Syndrom	7
2.2 Aufbau der Schlitzmembran	10
2.3 Funktion des Proteins Podocin und pathogenetische <i>NPHS2</i> Mutationen	11
3. Material und Methoden	15
3.1 Allgemeine Materialien, Geräte und Zentrifugen	15
3.2 Klonierung	16
3.2.1 Restriktionsverdau	16
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	17
3.2.3 Ligation	17
3.2.4 Transformation	18
3.2.5 Mini-Präparation	19
3.2.6 Sequenzierung	19
3.2.7 Midi-Präparation	20
3.2.8 Rekombination	20
3.2.9 Plasmide	21
3.3 Zellkultur	22
3.3.1 Calcium-Phosphat-Transfektion	23
3.3.2 Lentivirale Transduktion	23
3.4 Ernten und Lysieren von Zellen	24
3.5 SDS und Western Blot	26
3.6 Immunfluoreszenzfärbung	29
3.6.1 Immunfluoreszenz von Zellen	29
3.6.2 Immunfluoreszenz von Gewebe	29
3.7 Quantitative Echtzeit PCR	31
3.8 Proteinstabilitätsassays	33
3.8.1 Cycloheximid-Assay	33

3.8.2	MG-132-Assay	33
3.8.3	Chloroquin-Assay	34
3.9	Lipid-Raft-Präparation	34
3.10	Histologie	35
3.10.1	PAS-Färbung	36
3.10.2	SFOG (Trichrom)-Färbung	36
3.11	Albumin-ELISA und Kreatinin-Kalorimetrie-Assay	37
4.	Ergebnisse	38
4.1	<i>in vivo</i> Ergebnisse	38
4.1.1	Homozygote Podocin p.R231Q Mäuse zeigen nach zwei Jahren einen Phänotyp	38
4.2	<i>In vitro</i> Ergebnisse	41
4.2.1	Geringere Fluoreszenzintensität und verändertes Membrantargeting von Podocin^{R231Q/R231Q} in kultivierten Zellen	41
4.2.2	Geringeres Proteinlevel von Podocin p.R231Q aufgrund schnellerer Degradation	44
4.2.3	Podocin p.R231Q wird erheblich durch das Proteasom degradiert	47
5.	Diskussion	51
6.	Literaturverzeichnis	54
7.	Anhang	61
7.1	Abbildungsverzeichnis	61
7.2	Tabellenverzeichnis	62
8.	Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen	63

Abkürzungsverzeichnis

ACR	Albumin-Kreatinin-Ratio
APS	Ammoniumperoxodisulfat
CHX	Cycloheximid
CNF	Nephrotisches Syndrom des Finnischen Typs
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESRD	End Stage Renal Disease
FBS	Fetales Rinderserum
FSGS	Fokal Segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HRP	Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
KCl	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NDS	Normal Donkey Serum
NS	Nephrotisches Syndrom
PAA	Polyacrylsäure
PAS	Periodic-acid-Schiff reaction
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHB	Prohibitin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylfluorid
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFOG	Saure-Fuchsin-Orange G
SRNS	Steroid Resistentes Nephrotische Syndrom
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Zusammenfassung

Das Nephrotische Syndrom ist ein Symptomkomplex bestehend aus großer Proteinurie ($\geq 3 - 3,5$ g/d), Hypalbuminämie, Hyperlipoproteinämie und Ödemen, das sich histologisch u.a. als eine fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) darstellen kann. In Kohortenstudien konnte gezeigt werden, dass Menschen mit dem häufig vorkommenden Polymorphismus p.R229Q im Protein Podocin vermehrt in FSGS-Patientenkohorten vertreten sind. In der Regel liegt bei diesen Patienten jedoch eine zweite, pathogene Mutation in Trans-Assoziation vor. Ob p.R229Q eine eigenständige Pathogenität aufweist ist unklar, was u.a. an uneindeutigen Beobachtungsstudien liegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die äquivalente murine Variante p.R231Q *in vivo* in der Maus und *in vitro* näher charakterisiert. Dabei konnte mittels histologischen Färbungen und Ermittlung der Albumin-Kreatinin-Ratio gezeigt werden, dass homozygote p.R231Q Mäuse im hohen Lebensalter eine milde Albuminurie entwickeln. In *time course* Experimenten mit CHX und MG-132 wurde die Proteinstabilität von Podocin Wildtyp und p.R231Q untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass p.R231Q vermehrt vom Proteasom degradiert wird. Insgesamt zeigt die Arbeit, dass die p.R231Q Variante, und damit mutmaßlich auch die humane p.R229Q Variante, eine geringere Proteinstabilität als die Wildtyp Variante aufweist und mit der Entwicklung einer Albuminurie vergesellschaftet ist. Damit deuten die erhobenen Daten bereits auf eine eigenständige Pathogenität der Variante hin, was angesichts der hohen Allelfrequenz von 2-7 % in der europäischen Bevölkerung für eine Vielzahl von Menschen relevant ist.

2. Einleitung

2.1 Die Niere und das Nephrotische Syndrom

Die Niere ist ein im Retroperitoneum liegendes, paarig angelegtes Organ mit einem breit gefächerten Aufgabenspektrum. Sie ist verantwortlich für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, für den Wasser- und Elektrolythaushalt, für die langfristige Blutdruckregulation, für den Metabolismus, für die Hormonbildung (Calcitriol, Erythropoetin, Renin, Angiotensin) und für die Hormonwirkung (Antidiuretisches Hormon, Aldosteron u.a.) (52). Jede normal entwickelte Niere des Menschen besteht aus etwa einer Million funktionell eigenständiger Untereinheiten, den Nephronen. Das Nephron besteht aus einem Glomerulus, einem Verbund aus anastomosierenden Kapillaren, und einem Tubulussystem, eingeteilt in proximalen Tubulus, Henle-Schleife und distalen Tubulus (52). Jedes Nephron hat über das *Vas afferens* und das *Vas efferens* Anschluss an den Blutkreislauf (52). Das *Vas afferens* teilt sich im Glomerulus in das Knäuel vieler anastomosierender Kapillaren auf, welche im weiteren Verlauf wieder verschmelzen, um als *Vas efferens* den Glomerulus zu verlassen (52). Das Blut in den Kapillaren des Glomerulus wird gefiltert und von harnpflichtigen Substanzen befreit. Dabei

können die Nieren pro Tag 180 Liter Primärharn bilden (52). Dieser entsteht in der Bowman Kapsel durch Filtration des Blutes durch den Nierenfilter. Entscheidend für die Menge des Primärharns ist die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Niere. Die von Adolf Fick erstmals untersuchte Einheit beschreibt das Volumen, welches von den Nieren pro Zeiteinheit filtriert wird (52). Dabei liegt die durchschnittliche GFR bei 120 ml/min/1,73 m² Körperoberfläche (52). Die 180 Liter Primärharn werden im Tubulussystem auf etwa einen Liter Endharn konzentriert. Die Zusammensetzung des Primärharns wird selektiv durch den glomerulären Filter bestimmt. Der glomeruläre Filter ist die Barriere zwischen dem Blut in den Kapillaren und dem Primärharn der Bowman Kapsel. Die von Susan E. Quaggin und Jordan A. Kreidberg schematische Darstellung eines Glomerulus (Abbildung 1) zeigt, dass der Filter aus drei Schichten besteht: dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, einer glomerulären Basalmembran (GBM) und den Sekundärfortsätzen der Podozyten, den terminal differenzierten Zellen des viszeralen Epithels (53). Dieser Filter selektiert das Filtrat nach Größe und Ladung. Die am fenestrierten Endothel befindliche, negativ geladene Glykokalix erschwert negativ geladenen Molekülen den Übertritt in die Bowman Kapsel (52). Die Fenestrierungen des Endothels werden auf 50-100 nm beziffert (52). Im Primärharn sind im physiologischen Zustand nur niedermolekulare Stoffe zu finden. Es bedeutet, dass die Größenselektion der Moleküle nicht vom fenestrierten Endothel, sondern von der GBM in Verbindung mit den Sekundärfortsätzen der Podozyten gewährleistet wird (7). Die GBM ist ein Netzwerk aus v.a. Kollagen IV, Laminin, und Nidogen (52). Diese Moleküle bilden lange Ketten, die wiederum ein Gitter ausbilden. Die Poren in diesem Gitter sind derart klein, dass ausschließlich Moleküle mit einem Molekülradius $\leq 1,6-1,8$ nm frei filtriert werden, bzw. frei durch die GBM diffundieren können.

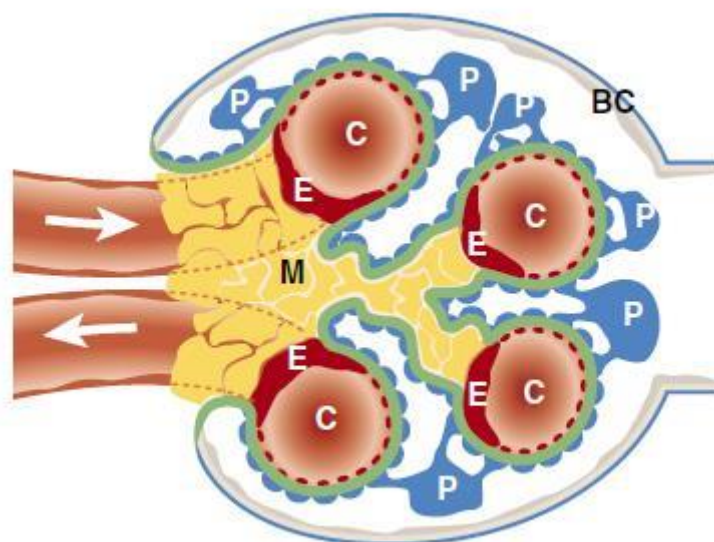


Abbildung 1.: Schema des glomerulären Filters
 (Abb. aus „Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences“ von Susan E. Quaggin *et. al.* (57))

P= Podozyten, C=Kapillare, E= Endothelzellen, M= Mesangiumszellen, Pfeile= *Vas afferens/efferens*, Grüne Linie= Glomeruläre Basalmembran

Moleküle mit einem Molekülradius zwischen 1,8 - 4,4 nm können filtriert werden, dies ist jedoch ladungsabhängig. So wird das negativ geladene Protein Albumin mit einem Molekülradius von 3,48 nm (69 kDa) nur zu 0,03% filtriert (52). Die dritte Schicht des glomerulären Filters bilden die Sekundärfortsätze der Podozyten. Die in der Bowman Kapsel frei liegenden Podozyten-Zell- Körper bedecken mit ihren Primär- und Sekundärfortätzen vollständig die Kapillaroberfläche. Eine wichtige Aufgabe der Podozyten ist eine, dem Filtrationsdruck in den Kapillaren, entgegengesetzte Kraft zu bilden, um die Porengröße im Gitternetzwerk der GBM möglichst gering zu halten (7). Zwischen den Sekundärfortsätzen (o.a. Fußfortsätze genannt) befindet sich der einzige Zell-Zell Kontakt der Podozyten, die sogenannte Schlitzmembran. Sie ist ein Multiproteinkomplex, der von hochspezialisierten Proteinen gebildet wird. Schädigungen in jeder dieser drei Schichten können zum klinischen Bild des Nephrotischen Syndroms (NS) führen. Als NS wird eine typische Symptomkonstellation bezeichnet, bestehend aus großer Proteinurie ($\geq 3 - 3,5$ g/d), Hypalbuminämie, Hyperlipoproteinämie und Ödemen (1, 14, 15). Pathogenetisch liegen den meisten Fällen sogenannte Glomerulonephritiden oder eine diabetische Nephropathie zugrunde. Aber auch eine Amyloidose oder eine Leichtkettenerkrankung kann zur Ausbildung des NS führen (1). Klinisch kommt es beim NS zu Ödemen (im Frühstadium meist Lidödeme) mit Gewichtszunahme, einer erhöhten Infektanfälligkeit (IgG-Mangel), einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse (v.a. durch einen Antithrombin III-Mangel), sowie zu einer Hypertonie. Die pathophysiologischen Ursachen sind vielfältig. So können zum Beispiel Immunkomplexe, die sich in den Schichten des glomerulären Filters ablagern, zu immunvermittelten Schädigungen führen. Das resultierende NS ist, wie auch bei vielen anderen Ursachen, i.d.R. mit Steroiden behandelbar. Die Schädigungen können jedoch auch familiär bzw. genetisch bedingt sein. Nephrotische Syndrome, welche genetischen Ursprungs sind, sprechen meist nicht auf die Behandlung mit Steroiden an. Solch ein NS wird als „Steroid Resistentes Nephrotisches Syndrom“ (SRNS) bezeichnet. Die Prognose dieser Erkrankung wegen des Fehlens einer kausalen Therapie schlecht und durch eine regelhafte Progression zu einem chronischen Nierenversagen gekennzeichnet (1). Als einziger kurativer Therapieansatz gilt die Nierentransplantation, wobei auch nach Transplantation ein 30%iges Risiko für ein Rezidiv besteht (28). 50% der Kinder mit einem SRNS entwickeln innerhalb von 15 Jahren das Stadium des „End Stage Renal Disease“ (ESRD) (47). 82% der Patienten mit einem SRNS zeigen keine extrarenalen Symptome, während 17% der Patienten solche entwickeln. Zu den häufigsten extrarenalen Symptomen gehören u.a. eine mentale Retardierung, Erkrankungen des zentralen Nervensystems, eine kleine Statur und kardiale Störungen (75). Beim erwachsenen Patienten zeigt sich histopathologisch das Bild einer Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), bei der sich bei einem Teil der Glomeruli eine segmentale

Vernarbung zeigt (37). Nach derzeitigem Wissenstand liegt diesen Vernarbungen ein progredienter Verlust von Podozyten zugrunde, der durch die limitierte Fähigkeit der Podozyten zur Zellerneuerung nicht kompensiert werden kann. Elektronenmikroskopisch fallen (Pseudo-) Verschmelzungen der Sekundärfortsätze der Podozyten auf (14). Molekular spielt dabei das Schlitzmembranprotein Podocin eine entscheidende Rolle.

2.2 Aufbau der Schlitzmembran

In Abbildung 2 ist der Aufbau und die Signalwege der Schlitzmembran dargestellt. Dabei fällt auf, dass der Aufbau als auch die Signalwege sehr komplex sind, so dass die Erklärung aller beteiligten Komponenten sehr viel Zeit in Anspruch nehmen würde. Eine kurze Einführung und die Erwähnung einiger wichtiger Proteine sei jedoch für das Verständnis dieser Arbeit erlaubt. Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, ist die Schlitzmembran ein Multiproteinkomplex, gebildet von hochspezialisierten Proteinen. Dabei überbrückt dieser Komplex einen Zell-Zell-Kontakt von ca. 40 nm. Entscheidend für die Ausbildung dieses Zell-Zellkontakts ist das von *Kestilä et.al.* 1998 entdeckte Protein Nephrin(35).

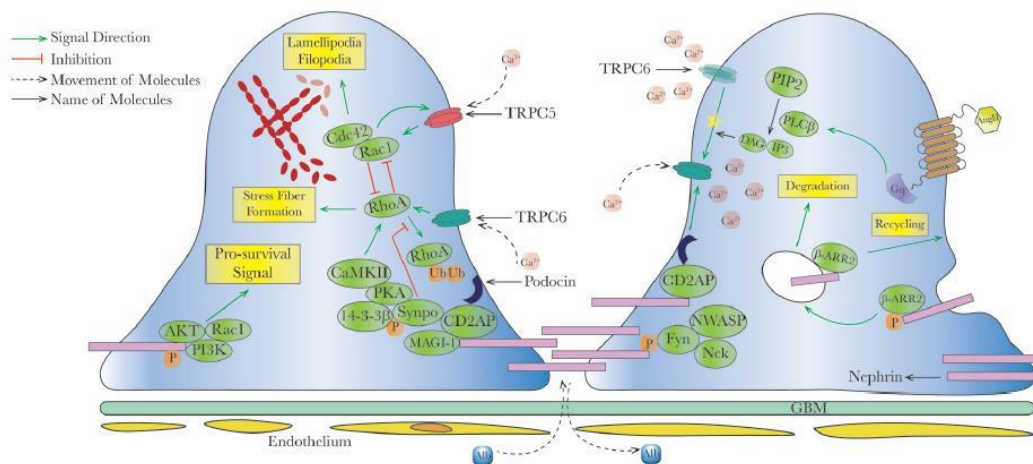


Abbildung 2.: Schematische Darstellung vom Aufbau und den Signalwegen der Schlitzmembran (Abb. aus „Proteinuric Kidney Diseases: A Podocyte’s Slit Diaphragm and Cytoskeleton Approach“ von Samuel Mon-Wie Yu et. al.(62))

Nephrin (*NPHS1*-Gen) gehört zur Immunglobulin-Super-Familie und ist ein transmembranäres Adhäsionsprotein(35). Nephrinmoleküle unterschiedlicher Fußfortsätze verbinden sich zu Homodimeren(21, 36) und bilden so das Grundgerüst der Schlitzmembran(60). Mutationen im *NPHS1*-Gen führen zum „Nephrotischen Syndrom des Finnischen Typs“ (CNF), bei dem Patienten schon früh *in utero* oder früh neonatal eine Proteinurie aufweisen(56). Ein weiteres Protein, welches an der Bildung der Reißverschluss-ähnlichen Schlitzmembran beteiligt ist, heißt Nephrin. Nephrin ist wie Nephrin ein transmembranäres Protein(2, 17, 19, 21). Es formt mit Nephrin oder mit einem anderen Nephrin-Molekül homo- bzw. heteromere Oligomere. Beide

Moleküle werden zytoplasmatisch von Fyn, einer Tyrosinkinase der Src-Familie, phosphoryliert(20, 42, 77). Es wurde bereits gezeigt, dass phosphoryliertes Nephrin wichtig für die Ausbildung und Anpassung des Aktin-Zytoskeletts im Podozyten ist(77). Beiden Protein ist gemein, dass sie Interaktionspartner von Podocin (Gen *NPHS2*) sind(31, 42). Podocin rekrutiert in Verbindung mit Nephrin an die Membran. In der Membran lokalisieren die Proteine an die „*Lipid-Rafts*“ (oder auch „*Detergent-Resistent-Membranes*“ genannt)(64). Diese sind organisierte Mikrodomänen, bestehend aus Sphingolipiden, Glykolipiden, Cholesterin und Proteinen(66). Detaillierten Untersuchungen in T- und B-Zellen zeigten, dass diese Mikrodomänen wichtig für die Kommunikation mit der Umgebung sind(6). Durch Protein-Lipid, Protein-Protein und Lipid-Lipid Interaktionen entsteht die sogenannte *LO-Phase* („*Liquid Ordered Phase*“)(43). Diese zeichnet sich durch eine Verdickung der Membran aus, bei der alle *Lipid-Raft* assoziierten Lipid und Proteine die *Raft-Plattform* bilden und Signaltransduktionen in die Zelle starten(43). Am Beispiel der B- Zell Aktivierung lässt sich dies verdeutlichen. So führt die Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor zur Translokation der acylierten Lyn-Kinase, einem Mitglied der Src-Familie, an die *Lipid-Rafts*. Durch die Interaktion kommt es zur Bildung der Raft-Plattform und zum Aufbau der Immunologischen Synapse(67). Dieser Vorgang ähnelt stark der Phosphorylierung von Nephrin durch Fyn an den *Lipid-Rafts*. Neben den Interaktionen zwischen den *Lipid-Rafts* assoziierten Lipiden und Proteinen stabilisiert ebenso das Aktin-Zytoskelett die *Lipid-Rafts*(24). Podocin ist verantwortlich für die Rekrutierung der Schlitzmembran-Proteine an die *Lipid-Rafts* und ist als strukturgebendes Protein maßgeblich verantwortlich für die funktionelle Aufrechterhaltung der Schlitzmembran.

2.3 Funktion des Proteins Podocin und pathogenetische *NPHS2* Mutationen

Podocin wird durch das *NPHS2*-Gen (1q 25-31) kodiert. Der *NPHS2*-Kodierungsabschnitt beinhaltet 1149 Basenpaare(18). Podocin wird der Stomatin-Protein-Familie zugeordnet(5). 46% der Aminosäuren von Stomatin und Podocin sind identisch(18). Charakteristisch für Proteine die zur Stomatin-Familie gehören ist die sogenannte Prohibitin (PHB)- Domäne(49). Diese Domäne ist hoch konserviert und erfüllt bestimmte Aufgaben. So neigen Proteine mit der PHB-Domäne zur Oligomerisierung. Zudem kommt es an der PHB-Domäne zu ko- und posttranslationalen Modifikationen (z.B. Acylierung und/oder Palmitoylierung) als Zielmotiv für definierte Zelllokalisationen(49). Bislang wurden Organismen übergreifend bis zu 1800 Proteine entdeckt, die eine derartige PHB-Domäne beinhalten. Davon werden 142 Proteine den Säugetieren zugeordnet(30). Das zurzeit detaillierteste untersuchte Protein ist MEC2 im *Caenorhabditis elegans*. MEC2 wird in sensorischen Nervenzellen exprimiert und dient dort als Mechanosensor(29, 51). Durch palmitoylierte Reste lokalisiert es an die *Lipid-Rafts* und aktiviert dort Na⁺-sensitive Kanäle(23). MEC2 und Podocin sind sehr eng miteinander

verwandt. So sind die Sequenzen beider Proteine zu 40% identisch. Nicht zuletzt wegen dieser engen Verwandtschaft wird dem Podocin im Podozyten eine ähnliche Rolle zugeschrieben, wie sie MEC2 in sensorischen Nervenzellen einnimmt. Wie auch MEC2 bildet Podocin eine Haarnadel-ähnliche Struktur aus, mit dem N- und C-terminale Ende im Zytoplasma und einer dazwischenliegenden Intermembran- Domäne(59). Als Gerüst-bildendes Protein ist es zum einen für die Aufrechterhaltung der Schlitzmembran verantwortlich, zum anderen dient es als Regulator des Aktin-Zytoskeletts. Wichtig für die Aufrechterhaltung der Schlitzmembran ist u.a. die Rekrutierung von Nephrin an die *Lipid-Rafts*. Podozyten sind zwei mechanischen Kräften ausgesetzt, den Scherkräften und den Zugkräften(68). Während Zugkräfte durch Druckveränderungen in den glomerulären Kapillaren entstehen, werden die Scherkräfte durch das Ultrafiltrat ausgelöst, welches an den Podozyten vorbeifließt(39). Dabei ist es von entscheidener Bedeutung, dass bei Veränderungen der beiden mechanischen Kräften, das Aktin-Zytoskelett sich den Bedingungen anpasst(3). Ein wichtiger Regulator des Aktin-Zytoskeletts und gleichzeitig Interaktionspartner von Podocin ist der Kationenkanal TRPC6(48). Es wird vermutet, dass durch zwei palmitoylierte Reste an der PHB-Domäne von Podocin Cholesterin an die Membran rekrutiert wird und dieses zur Aktivierung des TRPC6-Kanals beiträgt(63). Dabei ist TRPC6 insbesondere für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in den Podozyten verantwortlich, welches an der Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist(48). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen im *TRPC6*-Gen zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts führen und Patienten das Krankheitsbild der FSGS entwickeln(78). In Anbetracht der Funktion von MEC2 in sensorischen Nervenzellen, wird vermutet, dass Podocin in Podozyten ebenfalls als Mechanosensor dient, um bei Veränderungen der äußeren mechanischen Kräfte über die Regulation von TRPC6 das Aktin-Zytoskelett anzupassen(30). Die besondere Bedeutung von Podocin wird verdeutlicht durch das Auftreten vom SRNS bei Patienten mit Mutationen im *NPHS2*-Gen. 12-18% aller Fälle von SRNS beruhen auf Mutationen im *NPHS2*-Gen(5). Aktuell sind 126 Mutationen im *NPHS2*-Gen beschrieben. Mit 53 *Missense* Mutationen weist diese Gruppe den größten Anteil auf(4). Die häufigste *Missense* Mutation ist die p. R138Q (c.413 G>A). Durch den Austausch von Arginin gegen Glutamin an Position 138 verbleibt Podocin im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und erreicht nicht die Plasmamembran. Durch den Verbleib von Podocin im ER wird es durch Calnexin überprüft und massiv durch das Proteasom degradiert(65). Im Elektronenmikroskop fällt eine deutliche Verkürzung und Verbreiterung der podozytären Fußfortsätze auf, das sogenannte „*Foot Process Effacement*“(55). Dieses ist exemplarisch in Abbildung 3. dargestellt, bei der *Tabatabaeifar et al.* ein induzierbares Mausmodell für das nephrotische Syndrom charakterisierten, indem sie *knock-in* *NPHS2* R140Q/-Mäuse generierten. Podocin p. R140Q ist dabei das Mausäquivalent zum humane Podocin p. R138Q. In Abbildung 3D. ist das Verschmelzen der Fußfortsätze sehr gut zu sehen, während in Abbildung 3A. (Kontroll-Maus;

Podocin WT) die einzelnen Fußfortsätze gut differenziert werden können(70). Patienten, welche homozygot für Podocin. p. R139Q sind, weisen häufig schon im Säuglingsalter eine massive Proteinurie auf und entwickeln im Durchschnitt mit 1,7 Jahren ein SRNS(28). Man spricht dabei von einer „*early-onset*“ FSGS. Entscheidend für das frühe Auftreten der Erkrankung ist u.a. das Gen welches mutiert ist. So führen Mutationen in Nephtrin (*NPHS1*), Podocin (*NPHS2*), Laminin- β (*LAMB2*) und in der Phospholipase C- ϵ 1 (*PLCE1*) zum „*early-onset*“ des SRNS. Eine Ausnahme bildet dabei der Polymorphismus in Podocin p. R229Q, dessen Prävalenz in der kaukasischen Population bei 2-7% liegt(28). Durch den Austausch von Guanin gegen Adenin an der Stelle 686 der cDNA, kommt es auf Proteinebene zum Austausch von Arginin gegen Glutamin(32). In Homozygotie oder in Heterozygotie, mit Podocin Wildtyp auf dem zweiten Allel, führt der Polymorphismus nicht oder nur in sehr geringer Penetranz zur Ausbildung des SRNS(34). 2014 veröffentlichte *Tory et. al.* eine ausgesprochen interessante Studie, in der gezeigt wurde, dass der Polymorphismus p. R229Q in Verbindung mit einer pathogenen 3' *NPHS2*-Mutation zum Auftreten eines SRNS führt(73). Dabei ist entscheidend, dass die 3'- Mutation in Exon 7 oder Exon 8 liegt, um eine Dimerisierung/ Oligomerisierung der Podocin Moleküle zu verhindern(5, 64, 73).

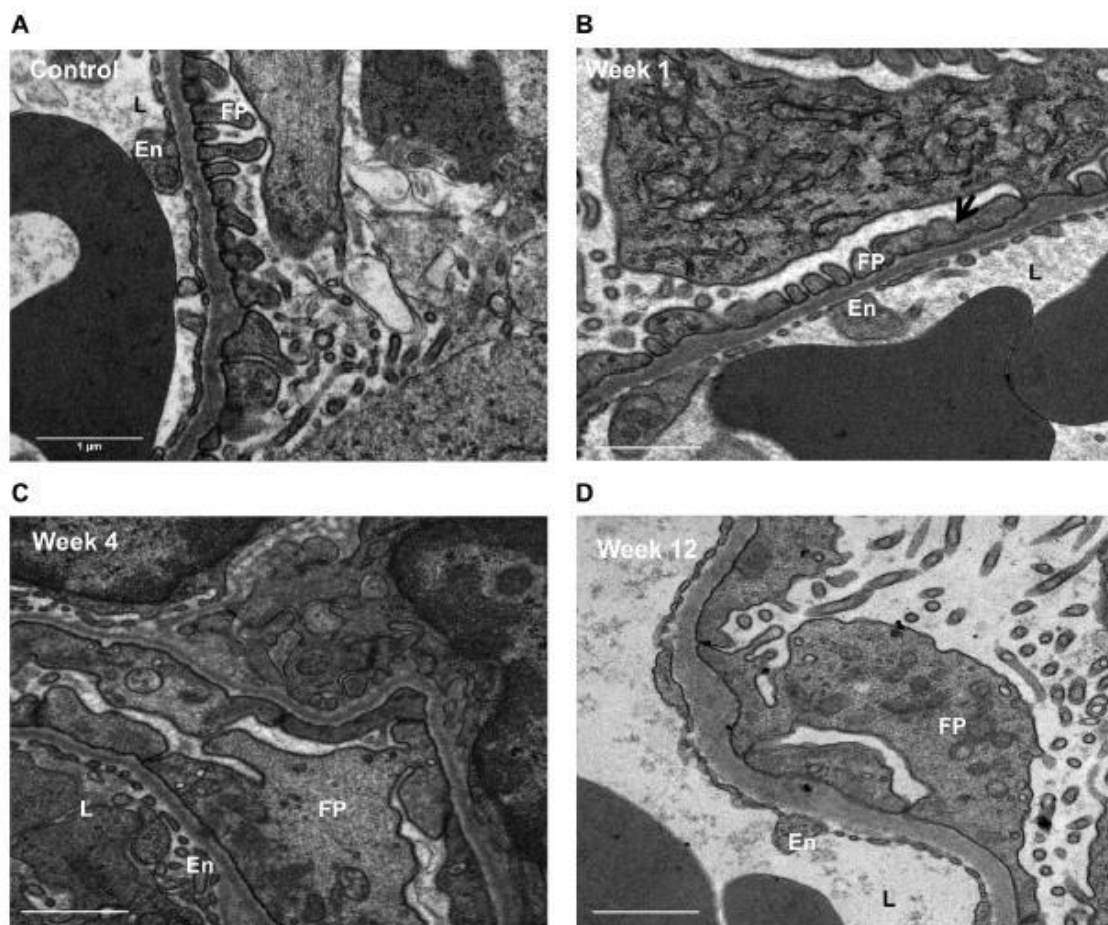


Abbildung 3.: *Foot Process Effacement in knock-in NPHS2 R140Q/-Mäusen*
 (Abb. aus „*An inducible mouse model of podocin-mutation-related nephrotic syndrome*“ von Mansoureh Tabatabaeifar *et. al.* (70)).

En= Endothel-Zelle, L= Kapillarlumen, FP= Fußfortsatz

Eine häufig vorkommende trans-assoziierte Mutation ist p. A284V. Die Kombination aus p. R229Q und p. A284V (auch *compound heterozygot* genannt) verhindert zum einen die Dimerisierung der Podocin Moleküle, zum anderen die Lokalisation an die Membran. Tatsächlich verbleiben die Podocin Moleküle im ER(73). Im Vergleich dazu ist bei der Kombination aus Podocin p. R229Q und Podocin Wildtyp keine Veränderung der Dimerisierung zu beobachten und Podocin lokalisiert an die Membran. *Compound heterozygote* Patienten (Podocin p. R229Q / p. A284V) entwickeln im Durchschnitt mit 13 Jahren ein SRNS, welches durch stetige Progredienz nach weiteren 13 Jahren in ein ESRD mündet(45). Bis zuletzt wurde angenommen, dass der Polymorphismus eher ein Katalysator/Modifizierer für ein SRNS ist, anstatt dieses selbst kausal zu verursachen(34). 2006 veröffentlichte jedoch *Franceschini et al.* eine Kohortenstudie in der gezeigt wurde, dass bei Patientenkohorten mit einer FSGS der Polymorphismus eine höhere Prävalenz aufwies als bei Patientenkohorten ohne FSGS(18). So wurde für heterozygote p. R229Q-Träger ein 20-70% erhöhtes (jedoch nicht signifikant erhöhtes) Risiko ermittelt an einer FSGS zu erkranken(18). Daneben zeigte *Machucha et. al.* mittels einer Kohortenstudie, dass der Polymorphismus proportional häufiger in Individuen vorkam, welche zusätzlich eine zweite pathogene Mutation aufwiesen, als Individuen mit einem Wildtyp Allel(45). Zudem beschrieben *Pereira et. al.* und *Köttgen et. al.* einen Trend, bei dem Patienten mit dem Polymorphismus häufiger eine Mikroalbuminurie aufweisen, als Patienten ohne diesen(38, 54). So beträgt die Odds Ratio für heterozygote Merkmalsträger 2,8 (95% KI 1,2-6,3) eine Mikroalbuminurie zu erleiden(54). Bei dieser Erhöhung wurde jedoch nur von einer Assoziation gesprochen, nicht von einem Signifikanten Unterschied. Erst die Verbindung von Podocin p. R229Q und Übergewicht sorgt für ein signifikant erhöhtes Risiko eine Mikroalbuminurie aufzuweisen(54). Zusätzlich zeigte *Machucha et. al.*, dass homozygote Merkmalsträger früh ein SRNS entwickeln können(45). Es wurde von acht Patienten berichtet, welche homozygote Podocin p. R229Q-Träger waren und schon im Alter von durchschnittlich 6,3 Jahren ein SRNS entwickelten. Im Alter von durchschnittlich 11 Jahren erreichten sie das Stadium der ESRD(45).

Aufgrund der klinischen Daten ergeben sich diverse Gründe den Polymorphismus Podocin p. R229Q auf zellulärer Ebene näher zu charakterisieren:

- i) Die hohe Allelfrequenz von Podocin p. R229Q in der kaukasischen Bevölkerung (2-7%) sorgt für eine hohe medizinische Bedeutsamkeit in Bezug auf Prävention und Beratung.
- ii) Durch die Albuminurie (v.a. im Rahmen von Nierenerkrankungen) als Hochrisikofaktor für ESRD(12) und kardiovaskuläre Erkrankungen(22) entsteht eine hohe Mortalität bei Patienten mit Nephrotischen Syndrom.

iii) Durch neue Erkenntnisse im Pathomechanismus des SRNS gehört es zum langfristigen Ziel, neue Therapieansätze zu ermitteln, um die Nierentransplantation als aktuell einzige kurative Therapieoption zu ersetzen.

3. Material und Methoden

3.1 Allgemeine Materialien, Geräte und Zentrifugen

Folgende Materialien, Geräte und Zentrifugen wurden bei mehreren unterschiedlichen Experimenten benutzt und werden in diesem Kapitel aufgelistet. Materialien, welche speziell nur für ein Experiment benutzt wurden, werden in dem dazugehörigen Kapitel gelistet.

Material	Hersteller	Katalognummer
1,5 ml Eppendorf Tube	Sarstedt	72.706.201
2 ml Eppendorf Tube	Sarstedt	72.691
Pipetboy	Integra Bioscience	524787
Pipettenspitzen:		
0,1-10 µl	Starlab	S1110-3810
1-200 µl	Starlab	S1111-1816
101-1000 µl	Starlab	S1111-6811
Multiply-uStrip 0,2 ml Kette	Sarstedt	72.985.002
Stripetten:		
5 ml	Sarstedt	4051
10 ml	Sarstedt	4101
25 ml	Sarstedt	4251
Thermocycler S1000	Bio-Rad	
Thermomixer Comfort	Eppendorf	
Eppendorf Centrifuge 5819R	Eppendorf	
Digital Heatblock	VWR	
Apotome	Zeiss	

Tabelle 1: Allgemeine Materialien, Geräte und Zentrifugen

Folgende Softwares wurden im Rahmen der Arbeit verwendet:

Software	Hersteller
Zen2.6 Blue Edition	Zeiss
ImageJ	National Institutes of Health
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla
Benchling	Benchling
Image Studio	Li-Cor

Tabelle 2: Softwares

3.2 Klonierung

3.2.1 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau erkennen Restriktionsenzyme ihre individuellen Palindromsequenzen und führen mit Hilfe der eigenen Endonuclease zu einer Hydrolyse der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Dies führt zur Offenlegung von „*Sticky-Ends*“, welche für eine Verbindung mit einem anderen passenden DNA-Fragment genutzt werden können. Zusätzlich kann der Restriktionsverdau zur Kontrolle einer Klonierung angewandt werden.

Material	Volumen (µl)
Puffer	2
Restriktionsenzym A	0,5
Restriktionsenzym B	0,5
DNA	0,5-1 µg
ddH ₂ O	ad 20

Tabelle 3: Reaktionsansatz Restriktionsverdau

Die Reaktion wurde für 1-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Material	Hersteller	Katalognummer
MluI	New England BioLabs	R0198L
NotI	New England BioLabs	R0189L
EcoRV	New England BioLabs	R0195L
AflIII	New England BioLabs	R052L
XhoI	New England BioLabs	R0146L
3.1 Puffer	New England BioLabs	B7203S
Cutsmart Puffer	New England BioLabs	B2704S

Tabelle 4: Materialien Restriktionsverdau

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können verdaute DNA-Fragmente anhand ihrer Größe getrennt und analysiert werden(46). Dabei werden 10 µl des Restriktionsverdaus neben einem 1kb DNA-Marker auf ein 1% Agarosegel geladen. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Proben für 45 Minuten bei 100 Volt. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA. Unter UV-Licht bei 302 nm konnte die DNA sichtbar gemacht werden.

Material	Hersteller	Katalognummer
Agarose	Sigma	A9539-500G
Ethidiumbromid	Roth	2218.2
1 kb-DNA-Marker	Fermentas	SM0311
1x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer:		
21,7 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma	T1503-1KG
10,8 mM Essigsäure	Merck	1.00056.1000
1,1 mM Na ₂ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva	11280
1,4 µM Ethidiumbromid	Roth	2218.2

Tabelle 5: Materialien Agarose-Gelelektrophorese

3.2.3 Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente, mit passenden „*Sticky-Ends*“, enzymkatalysiert verknüpft. Dabei werden mit Hilfe der T4-Ligase Phosphodiesterbindungen zwischen den DNA-Fragmenten aufgebaut.

Material	Volumen (µl)
T4-Ligase	0,4
10x Ligase Puffer	2
Vektor	1
Insert	4
ddH ₂ O	ad 20

Tabelle 6: Reaktionsansatz Ligation

Die Reaktion wird für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgt eine Transformation.

Material	Hersteller	Katalognummer
T4-Ligase	Thermo Scientific	EL0011
10x Ligase Puffer	Thermo Scientific	B69

Tabelle 7: Materialien Ligation

3.2.4 Transformation

Die Transformation beschreibt die nicht-virale Einbringung von freier DNA oder Plasmiden in kompetente Bakterien. Es wurden zwei unterschiedliche Bakterienarten benutzt, welche verschiedene optimale Temperaturbedingungen besitzen. Während DH10 Bakterien bei 37°C wachsen, dürfen TOP10 Bakterien maximal bei 30°C gehalten werden, Zu Beginn der Transformation wurden 50 µl Bakterien und 5 µl des Plasmids in einer Eppendorfer Tube pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurde das Tube für 45 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben. Unmittelbar danach erfolgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Im nächsten Schritt wurden 300 µl Soc-Medium in das Tube pipettiert. Die Bakterien wurden eine Stunde bei 37°C und 850 rounds per minute (rpm) inkubiert. Zum Schluss wurden 100 µl der Lösung auf einer Agarplatte ausgestrichen. Wichtig ist es darauf zu achten, die Agarplatten mit dem richtigen Antibiotikum zu wählen (pcDNA6- und pLenti Plasmide auf Ampicillin-Platten, pEntr1A-Plasmide auf Kanamycin-Platten). Die Agarplatte wurde über Nacht bei der für die Bakterien spezifische Temperatur inkubiert.

Material	Hersteller	Katalognummer
DH10 Bakterien	Invitrogen	18297010
Top10 Bakterien	Invitrogen	C404010
Agar	Srva	11396.03
Ampicillin	Carl Roth	K029.2
Kanamycin	Sigma	K-4000-5G
SOC-Medium:		
2% Bactotrypton		
0,5% Bactoyeast extract		
10 mM Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	3957,1
2,5 mM Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	6781
10 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck	1.05833.0250
20 mM Glucose	Merck	1.08324.1000

Tabelle 8: Materialien Transformation

3.2.5 Mini-Präparation

Nach dem Anwachsen von Bakterienkolonien, wurde eine Minikultur angesetzt. Dabei wurden 3 ml LB-Medium in ein Falcon vorgelegt. Dem LB-Medium wurde zuvor das individuelle Antibiotikum in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben. Anschließend wurde eine Bakterienkolonie mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt und diese in das Falcon gegeben. Die Mini-Kultur wurde über Nacht bei der Bakterien-spezifischen Temperatur und bei 120 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die von den Bakterien produzierten Plasmide mit Hilfe des Mini-Prep-Kits von ThermoFisher extrahiert. Dabei wurde das Kit-spezifische Protokoll angewendet. Nach der Gewinnung der Plasmide wurde die Konzentration mit Hilfe des Nanodrops gemessen. Zur Überprüfung des Plasmids wurde ein Kontroll-Restriktionsverdau und eine Sequenzierung durchgeführt.

Material	Hersteller	Katalognummer
LB-Medium	Carl Roth	X964.2
Carbenicillin	Carl Roth	6344.2
Kanamycin	Sigma	K-4000-5G
GeneJet Plasmid Mini-Prep-Kit	Thermo Scientific	K0503

Tabelle 9: Materialien Mini-Präparation

3.2.6 Sequenzierung

Die klonierten Plasmide wurden mit Hilfe der Firma Microsynth Seqlab sequenziert.

Material	Volumen (µl)
Primer (10 µm)	3
Plasmid	1 µg
ddH ₂ O	ad 15

Tabelle 10: Reaktionsansatz Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden folgende Primer genutzt:

Primer	Hersteller	Sequenz 5' → 3'
pEntry fsp Rm2	Biomers	ctgtagtagtacttaagctc
pEntr P3 Be rsp		atgttgagacacgggcccaga
pLenti CMV fsp	Biomers	cacaaaatcaacgggactt
FLAG fp	Biomers	caaggacgacgatgacaag

Tabelle 11: Sequenzierungs-Primer

Hat sich im Kontrollverdau und in der Sequenzierung das Plasmid bestätigt, wurde aus der Mini-Kultur eine Midi-Kultur angesetzt.

3.2.7 Midi-Präparation

Für die Midi-Kultur wurden zunächst 200 ml ddH₂O, 4 g LB-Medium und 200 µl Antibiotikum in ein 500 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt. Daraufhin wurden 100 µl der ursprünglichen Mini-Kultur hinzugegeben. Die Kultur inkubierte über Nacht bei der Bakterien-spezifischen Temperatur und 100 rpm. Am nächsten Tag wurde das Plasmid mit Hilfe des NucleoBond Xtra midi Kits aus der Kultur extrahiert. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Bei der Midi-Präparation von pLenti6.3 V5/dest. Plasmiden wurde vor dem letzten Zentrifugationsschritt das Eluat durch einen Filter gespritzt, um Verunreinigungen zu eliminieren. Zur Überprüfung des Plasmids wurde im Anschluss ein Kontroll-Restriktionsverdau durchgeführt.

Material	Hersteller	Katalognummer
LB-Medium	Carl Roth	X964.2
Carbenicillin	Carl Roth	6344.2
Kanamycin	Sigma	K-4000-5G
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel	740410.100
Vented Millex-GS 0,22 µm	Millipore	SLGSV255F

Tabelle 12: Materialien Midi-Präparation

3.2.8 Rekombination

Für eine Transduktion von Zellen benötigt man das zu untersuchende Gen in einem pLenti Vektor. Mit Hilfe der Gateway Klonierung(33) wurde das Gen in den pLenti6.3 V5/dest. Vektor rekombiniert. Die Technik geht aus der Fähigkeit von Phagen hervor, ihr Genom sequenzspezifisch in das Genom von Bakterien zu integrieren. Für die Rekombination muss das Gen von zwei spezifischen Sequenzen flankiert sein. Dazu wurde das Gen zunächst in einen pEntr1 Vektor kloniert. In diesem ist das Gen von zwei spezifischen Sequenzen flankiert: *attL1* und *attR1*. Der Zielvektor pLenti6.3 V5/dest. beinhaltet ebenfalls zwei spezifische Sequenzen, *attR1* und *attR2*. Mit Hilfe der LR-Klonase II wird die Rekombination des Gens in den neuen Zielvektor katalysiert.

Material	Volumen (µl)
LR-Klonase II	1
pEntr1A Be	150 ng

pLenti6.3 V5/dest.	50 ng
Tris-EDTA-Puffer (pH= 8,0)	ad 8

Tabelle 13: Reaktionsansatz Rekombination

Die Reaktion wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 µl Proteinase K hinzugegeben und für Zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation in chemokompetente Top10 Bakterien.

Material	Hersteller	Katalognummer
LR-Klonase	Invitrogen	11791100
Proteinase K	Invitrogen	25530049
Tris-EDTA-Puffer:		
10 mM Tris	Sigma	T1503-1KG
1 mM EDTA	Sigma	E-5134

Tabelle 14: Materialien Rekombination

3.2.9 Plasmide

Mit folgenden Plasmiden wurde während des Projektes gearbeitet:

Name des Plasmids	Insert	Tag	Vektor
pEntr1A Be	ccdb	-	pEntr1A
pLenti6.3 V5/dest.	Ccdb	-	pLenti6.3 V5/dest.
F9. mPodocin WT pcDNA6	Podocin Wildtyp	F9	pcDNA6
F9. mPodocin p. R231Q pcDNA6	Podocin p. R231Q	F9	pcDNA6
F9. mPodocin WT pEntr1A Be	Podocin Wildtyp	F9	pEntr1A
F9. mPodocin p. R231Q pEntr1A Be	Podocin p. R231Q	F9	pEntr1A
F9. mPodocin WT pLenti6.3 V5/dest.	Podocin Wildtyp	F9	pLenti6.3 V5/dest.
F9. mPodocin p. R231Q pLenti6.3 V5/dest.	Podocin p. R231Q	F9	pLenti6.3 V5/dest.

Tabelle 15: Plasmide

3.3 Zellkultur

Bei der Arbeit mit Zellen wurde stets unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit sterilen Abzug gearbeitet. Alle Lösungen wurden vorher steril gefiltert oder autoklaviert. Vor der Arbeit mit den Zellen wurde die Arbeitsfläche und alle Gegenstände mit Ethanol (70%) desinfiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hek293T-Zellen und humanen immortalisierten Podozyten gearbeitet(61). Die Zellen wurden in einem befeuchteten Brutschrank bei 5% CO₂ inkubiert. Während die Hek293T-Zellen bei 37°C gehalten wurden, wurden die humanen immortalisierten Podozyten bei 30°C gehalten. Neben unterschiedlichen Temperaturen benötigten die Zellen auch unterschiedliche Medien. Hek293T-Zellen wurden mit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) + 10% Fetalem Rinderserum (FBS) gehalten, humane immortalisierte Podozyten in *Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium* (RPMI) + 10% FBS + 1% Insulin- Transferin- Selenium. Die Subkultivierung der Zelllinien erfolgte durch Absaugen des alten Mediums, gefolgt von einem Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und anschließender Trypsinisierung mit 1 ml Trypsin-EDTA. Während der Trypsinisierung wurden die Zellen zurück in den Brutschrank gestellt. Nach einer Minute bei Hek293T-Zellen bzw. 5-10 Minuten bei humanen immortalisierten Podozyten wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf vorbereitete 10 cm Schalen, 6- Well- oder 12-Wellplatten verteilt. Das Verhältnis der Subkultivierung war abhängig vom weiteren Vorgehen mit diesen Zellen.

Material	Hersteller	Katalognummer
DMEM	Gibco	31966-021
RPMI	Gibco	61870-010
Fetales Rinderserum	Gibco	10270-106
Trypsin-EDTA	Gibco	25300-054
Insulin-Transferin-Selenium (ITS)	Corning	25-800-CR
Schalen/Platten:		
10 cm Schalen	Corning	430167
6- Well-Platten	Corning	3516
12- Well-Platten	Corning	3513
PBS- Puffer:		
134 mM NaCl	Carl Roth	3957,1
2,7 mM KCl	Carl Roth	6781
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	1.06574.1000
2 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth	6875,1

Tabelle 16: Materialien Zellkultur

3.3.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Für die transiente Transfektion von Hek293T-Zellen wurde die von Chen und Okayama 1987 entwickelte Calcium-Phosphat-Methode benutzt(10). Bei dieser Methode werden Calciumphosphatkristalle und kopräzipitierte Plasmid-DNA von den Zellen phagozytiert. Dabei wurden zunächst 500 µl 0,25M CaCl₂ und 3-5 µg Plasmid-DNA in ein Eppendorfer Tube vorgelegt. Im nächsten Schritt wurden dann 500 µl 2x HEBS unter ständigen vortexen tröpfchenweise hinzu pipettiert(10, 25, 44). Im Anschluss wurden 980 µl der Lösung tröpfchenweise zu den, am Vortag 1:6 gesplitteten, Hek293T-Zellen gegeben. Nach 6-8 Stunden wurde die Transfektion durch eine Wechsel des Mediums gestoppt. Die Zellen wurden bis zur Durchführung weiterer Experimente über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Material	Hersteller	Katalognummer
Calciumchlorid (0,25M)	Merck	1.02382.0500
2x Hebs-Puffer:		
50mM HEPES	Sigma	H0887
280 mM NaCl	Roth	3957,1
10 mM KCl	Roth	6781
12 mM D-Glucose	Merck	1.08342.1000
1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH= 7,09	Merck	1.06574.1000

Tabelle 17: Materialien Calcium- Phosphat- Transfektion

3.3.2 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion beschreibt die stabile Integration eines Gens in das Genom der Wirtszelle(50). Dabei ist zu beachten, dass das Arbeiten mit Lentiviren unter der biologischen Sicherheitsstufe S2 einzuordnen ist und somit verschärfte Sicherheitsvorkehrungen zu treffen sind. Beim Arbeiten mit S2-Material wurden stets Handschuhe und eine Atemschutzmaske getragen. Zudem wurde nach Beendigung der S2-Arbeit darauf aufmerksam gemacht den Raum mit speziellen Reinigungsmitteln zu säubern. Um Zellen mit Lentiviren transduzieren zu können, muss das Virus zuallererst hergestellt werden. Dafür wurden der Lentivektor zusammen mit den Hilfsvektoren in Hek293T- Zellen transient kotransfiziert. Die Transfektion wurde mittels der Calcium-Phosphat-Methode durchgeführt. Zum Abstoppen der Transfektion wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt und in jede 10 cm Schale 20 mM Hepes hinzugegeben. Das neue Medium war in diesem Fall spezifisches Medium für humane immortalisierte Podozyten , da diese im weiteren Verlauf transduziert werden sollten. Die von

den Hek293T-Zellen gebildeten Viruspartikel, mit dem zu integrierenden *NPHS2*-Gen, gelangen durch spezielle Oberflächenproteine in das Medium der 10 cm Schale.

Plasmid	Stoffmenge (μg)
pRSV rev	2,5
pMD2 vsv g	2,5
pMDL g/p	6,5
pLenti6.3 V5/dest. + Konstrukt	10

Tabelle 18: Materialien Zellkultur

Nach drei Tagen wurde das Virus geerntet. Dabei wurde das Medium der 10 cm Schale abgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Das Falcon wurde für 5 Minuten bei 1000 rpm und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand mit einer 20 ml Luer-Lock-Spritze aufgezogen und durch einen sterilen 0,45 μm Polyvinylfluorid-(PVDF) Filter in ein neues 50 ml Falcon filtriert. Zur Transduktion der humanen immortalisierten Podozyten wurden diese am Vortag gesplittet, sodass diese am Tag der Transduktion maximal 50% konfluent waren. Für die Virustransduktion wurde das Medium der Zellen abgesaugt und durch 5 ml Virus und 5 μl Polybrene (8 mg/ml) ersetzt. Das Virus verblieb 24 Stunden auf den Zellen. Nach diesen wurde das Virus abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 24-72 Stunden, abhängig von der Konfluenz der Zellen, wurde die Blasticidin-Selektion (10 mg/ml) gestartet (10 μl / 10 ml Medium). Bei dieser Selektion wurden alle Zellen durch das Blasticidin zerstört, welche nicht das Virus aufgenommen und integriert hatten. Neben den transduzierten Zellen wurde als Kontrolle eine Schale humaner immortalisierter Podozyten mit Blasticidin inkubiert. Sobald auf der Wildtyp Schale alle Zellen tot waren, galt die Selektion als abgeschlossen.

Material	Hersteller	Katalognummer
1000x Polybrene	Invitrogen	H9268
Blasticidin (10 mg/ml)	Invitrogen	Ant-bl-1
20 ml Luer-Lock-Spritze	BD-Luer Lok	300629
0,45 μm PVDF Filter	Carl Roth	P667.1

Tabelle 19: Materialien Lentivirale Transduktion

3.4 Ernten und Lysieren von Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Arten des Erntens und des Lysierens durchgeführt. Bei den Proteinstabilitätsassays (Cycloheximid-, MG132- und Chloroquin-Assay) wurden die Zellen aus praktischen Gründen mit Hilfe des modifizierten RIPA- Puffers geerntet. Bei allen anderen Versuchen wurden die Zellen mit PBS geerntet. Zunächst wird das

Ernten mit PBS beschrieben, im Anschluss die Methode mit modifizierten RIPA-Puffer. Unabdingbar, für beide Methoden, ist das ständige Arbeiten auf Eis. Zu Beginn wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Mit 8 ml kaltem PBS wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von der Schale gelöst und in ein 15 ml Falcon überführt. Während Hek293T-Zellen sich durch das Auf- und Abpipettieren sehr gut von der Schale lösen lassen, ist bei den humanen immortalisierten Podozyten ein Zellkratzer notwendig gewesen. Das Falcon wurde für fünf Minuten bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet wiederum in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfer Tube überführt. Nach erneuter Zentrifugation von 5 Minuten bei 4°C und 1000 rpm wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Zellpellet in 1x Laemmli resuspendiert und über 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Das Ernten und Lysieren mit Hilfe des modifizierten RIPA-Puffers wurde bei den Proteinstabilitätsassays angewendet, diese wurden ausschließlich in 6-Well-Schalen durchgeführt. Zu Beginn wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Mit 100 µl modifiziertem RIPA-Puffer wurden die Zellen durch Schaben mit einem Zellkratzer von der Platte gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfer Tube überführt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 15 Minuten. Im Anschluss wurde das Tube für 20 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 80 µl in ein neues 1,5 ml Eppendorfer Tube überführt und 20 µl 2x Laemmli hinzugegeben und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Es folgte eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot.

Material	Hersteller	Katalognummer
PBS-Puffer s. Tabelle 16		
Modifizierte RIPA-Puffer:		
1% IGEPAL	Sigma	I-3021
150 mM NaCl	Carl Roth	395,1
0,25% Na-Deoxycholate	Sigma	D6750-25g
50 mM Tris, pH= 7,5	Sigma	T1503
2x Laemmli:		
100 mM Tris, pH= 6,8	Sigma	T15030
4% SDS	Carl Roth	CN30.3
20% Glycerol	Carl Roth	3783
0,2% Bromphenolblau	Carl Roth	A512
100 mM Dithiothreitol (DTT)	Fermentas	R0862

Tabelle 20: Materialien Ernten und Lysieren von Zellen

3.5 SDS und Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS) ist ein Verfahren zur größenabhängigen und ladungsunabhängigen Auftrennung von Proteinen, welche im Anschluss auf eine PVDF-Trägermembran aufgebracht werden(26, 40) und mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können(74). Zu Beginn wurden die Proben in 1x. bzw. 2x. Laemmli-Puffer aufgeköcht (s. Kapitel 3.4). Dabei spaltet das darin befindliche DTT Disulfidbrücken zwischen den Proteinen, sodass diese möglichst ungefaltet vorliegen. Das Natriumdodecylsulfat solubilisiert die Proteine und gibt diesen eine negative Gesamtladung. Hierdurch verläuft die Wanderung der Proteine möglichst größenabhängig und ladungsunabhängig. Nach dem Aufkochen der Proben wurden diese in die Taschen eines 10% Polyacrylamid (PAA)-Gels pipettiert. Ein solches Gel besteht aus zwei Phasen, dem Sammelgel und dem Trenngel. Zu Beginn wanderten die Proteine während der Sammelphase für 30 Minuten bei 70 Volt in Richtung Anode und sammelten sich am Übergang zwischen Sammelgel und dem Trenngel. Es folgte die Trennphase für 105 Minuten bei 25 mA, in der sich die Proteine in Abhängigkeit der Größe auftrennten. Unmittelbar nach der SDS-PAGE wurde ein elektrophoretischer Transfer durchgeführt, bei dem die Proteine auf eine PVDF-Membran aufgebracht wurden. Dabei wurde die Methode des „*Semidry-Verfahrens*“ angewendet. Zunächst wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert. Nach Anlegen einer Spannung von 12 Volt wanderten die Proteine für eine Stunde in Richtung Anode und wurden auf diesem Weg an die aktivierte PVDF-Membran gebunden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei Arten von Detektionsmethoden benutzt. Zum einen wurde die Detektion mittels Fluoreszenz (PVDF-FL-Membran) angewendet, zum anderen die Detektion mittels Chemilumineszenz (PVDF-P-Membran). Je nach Art der Detektionsmethode wurde die spezifische Membran benutzt. Die Art der Membran beeinflusst nicht das weitere Vorgehen, jedoch wurden andere Puffer und Antikörper benötigt. Auf beiden Membrane wurden unmittelbar nach dem Transfer unspezifische Bindungen geblockt. Während die PVDF-P-Membran in 5% BSA inkubiert wurde, wurde die PVDF-FL-Membran in 1x-Roti-block inkubiert. Beide Membranen wurden jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blocken wurden die Membranen für 3x10 Minuten gewaschen, die PVDF-P-Membran in Protein-Wasch-Puffer, die PVDF-FL-Membran in Licor-Wasch-Puffer. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher das gewünschte Epitop zielgerichtet bindet. Dabei wurden die Antikörper den Anforderungen entsprechend verdünnt. Durch einen erneuten Waschschrift von 3x10 Minuten wurden die überschüssigen Antikörper entfernt und die Membran anschließend im Sekundärantikörper inkubiert. Die Sekundärantikörper erkennen den F_c-Teil des Primärantikörpers und waren entweder mit der Meerrettichperoxidase (HRP) (Chemilumineszenz) oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszenz) gekoppelt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Membranen erneut für 3x10 Minuten

gewaschen. Anschließend wurden die Proteine detektiert. Dabei wurde auf die PVDF-P-Membran Enhanced *Chemiluminescence* (ECL)-Visualisierungslösung pipettiert und die Reaktion mit der Meerrettichperoxidase mittels Fusion Solo Chemiluminometer detektiert. Die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper konnten mit Hilfe des Li-Cor CLX Systems detektiert werden.

Material	Hersteller	Katalognummer
Sammelgel (5%):		
5% PAA	Carl Roth	
250 mM Tris pH=6,8	Sigma	T1503
0,1% SDS	Carl Roth	CN30.3
0,05% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma	A-3678
0,1% TEMED	Carl Roth	23673
Trenngel (10%):		
10% PAA	Carl Roth	
375 mM Tris	Sigma	T1503
0,1% SDS	Carl Roth	CN30.3
0,05% APS	Sigma	A-3678
0,1% TEMED	Carl Roth	23673
Laufpuffer:		
25 mM Tris, pH= 8,3	Sigma	T1503
0,1% SDS	Carl Roth	CN30.3
192 mM Glycin	Carl Roth	3908.2
Transferpuffer:		
22 mM Tris, pH= 8,3	Sigma	T1503
0,1% SDS	Applichem	A2263, 0500
166 mM Glycin	Carl Roth	3908.2
12% Methanol	Carl Roth	4627,4
Protein-Wasch-Puffer:		
27 mM Tris, pH= 7,5	Sigma	T1503
273 mM NaCl	Carl Roth	3957,1

2,2 mM Polysorbat 20	Caelo	3472
Licor-Wasch-Puffer:		
PBS (s. Tabelle 16)		
2,2 mM Polisorbat 20	Caelo	3472
ECL:		
Lösung A:		
100 mM Tris, pH=8,5	Sigma	T1503
2,5 mM Luminol	Fluka	09253
0,5 Cumarsäure	Sigma	c_ 9008
Lösung B:		
100 mM Tris, pH=8,5	Sigma	T1503
1,5% H ₂ O ₂	Merck	1.07210.1250
Blotting Paper Sheets	Sartorius	FT-2-521 580 600G
Immobilon- P Transfer Membranes	Merck	IPVH00010
Immobilon- FL Transfer Membranes	Merck	IPFL00010
BSA	Applichem	A6588,0100
Kassetten	Novex	NC2010
Fusion Solo vilber lourmat	Peqlab	
Li-Co CLX	Odyssey	
Kämme:		
10- Well	Thermofisher	NC3010
12- Well	Thermofisher	NC3012

Tabelle 21: Materialien SDS-PAGE und Western-Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Flag (M2)	Maus Monoklonal	1:10.000	Sigma
Anti-Pan-Actin	Kaninchen Monoklonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-Flotillin-1 (C2)	Maus Monoklonal	1:500	Santa Cruz
Anti-CD71/Transferrin	Maus Monoklonal	1:500	Santa Cruz
Rezeptor (H68-4)			

Tabelle 22: Primärantikörper Western-Blot

Antikörper	Spezies	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-F _c -IgG	Ziege	HRP	1:30.000	Jackson-Immuno- Research
Anti-Kaninchen-F _c -IgG	Ziege	HRP	1:30.000	Jackson-Immuno- Research

Anti-Maus-F _c -IgG	Ziege	800 CW	1:20.000	LI-COR
Anti-Kaninchen-F _c -IgG	Ziege	680 RD	1:20.000	LI-COR

Tabelle 23: Sekundärantikörper Western-Blot

3.6 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz (IF) ist ein Verfahren zur Darstellung und Analyse spezifischer Moleküle zellulärer Komponenten. Dabei wird ein Antigen durch ein Primärantikörper erkannt und gebunden. Durch Hinzugabe fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper, welche gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet sind, kann die zu untersuchende Struktur unter einem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden(16). In dieser Arbeit wurden sowohl humane immortalisierte Podozyten als auch Nierengewebe der Maus gefärbt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewendet.

3.6.1 Immunfluoreszenz von Zellen

Zu Beginn wurden die Zellen in eine 12-Well-Platte mit Deckgläsern gesplittet und über Nacht bei 30°C inkubiert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, wurden die Zellen für drei Minuten mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese für acht Minuten in 4% Paraformaldehyd inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS+ für jeweils drei Minuten. Zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Zellen für 30 Minuten in PBS-Triton plus 5% *Normal Donkey Serum* (NDS) inkubiert. Nach dem Blocken inkubierten die Zellen über Nacht bei 4°C im Primärantikörper. Daraufhin erfolgten erneut drei Waschschrte mit PBS+ für jeweils drei Minuten. Es folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für 60 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Nach drei erneuten Waschschrten mit PBS+ wurde Dapi in einer Verdünnung von 1:5000 für zehn Minuten in Dunkelheit dazugegeben. Unmittelbar danach folgte ein letzter Waschschrte mit ddH₂O für zwei Minuten. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit Hilfe von Prolong Diamond auf einen Objektträger befestigt.

3.6.2 Immunfluoreszenz von Gewebe

Die 2 µm dicken Nierenschnitte waren in Paraffin eingebettet. Zu Beginn wurden die Schnitte mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert.

Material	Inkubationszeit (AnzahlxMinuten)
100% Xylol	2x5
100% Ethanol	3x3
95% Ethanol	2x2
70% Ethanol	1x1

Tabelle 24: Absteigende Ethanolreihe

Nach der Deparaffinierung folgte drei Waschschr tte mit PBS-Tween 20 (0,1%) von jeweils 2,5 Minuten. Um die Antigene zu demaskieren, wurden die Schnitte für zehn Minuten bei 110°C gekocht. Es folgte ein erster fünfminütiger Waschschr tt mit Wasser, daraufhin zwei Waschschr tt mit PBS-Tween. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit PBS-Tween plus 5% NDS geblockt. Nach dem Blocken inkubierten die Schnitte über Nacht bei 4°C im Primärantikörper. Unabdingbar ist es die Schnitte ab diesem Zeitpunkt in einer dunklen, befeuchteten Box zu lagern, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Nach drei erneuten Waschschr tten mit PBS-Tween folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurden die Schnitte dreimal gewaschen, für zehn Minuten in Dapi (1:5000) inkubiert und in Prolong Diamond eingebettet.

Material	Hersteller	Katalognummer
PBS (s. Tabelle 16)		
PBS+:		
PBS		
10 mM CaCl ₂ * 2H ₂ O	Merck	1.02382.0500
5 mM MgCl * 6H ₂ O	Merck	1.05833.0250
PBS-Triton:		
PBS		
5% Triton	Merck	108643
PBS-Tween		
PBS		
Polysorbat 20	Caelo	3472
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma	P6148-500G
NDS	Jackson Immuno-Research	017-000-121
Dapi	Carl Roth	6335.1
Prolong Diamond without		
Xylol	Chem Solute	371.5000
Ethanol	Carl Roth	9065,3
Deckgläser 18x18 mm	Carl Roth	LH22.1
Deckgläser 24x50 mm	Menzel- Gläser	10318963
Objektträger 76x26 mm	Engelbrecht	10140

Tabelle 25: Materialien Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
------------	---------	------------	------------

Anti-Flag (M2)	Maus Monoklonal	1:1000	Sigma
Anti-Phalloidin-coupled with DY-647P1		1:300	Dyomics
Anti-Vinculin	Maus Monoklonal	1:1000	Sigma
Anti-Podocin	Kaninchen	1:500	Sigma
Anti-Nephrin	Meerschweinchen	1:500	Fitzgerald

Tabelle 26: Primärantikörper Immunfluoreszenz

Antikörper	Spezies	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-IgG	Affe	Cy3	1:500	Jackson Immuno- Research
Anti-Meerschweinchen-IgG	Affe	Alexa488	1:500	Jackson Immuno- Research
Anti-Kaninchen-IgG	Affe	Cy3	1:500	Jackson Immuno- Research

Tabelle 27: Sekundärantikörper Immunfluoreszenz

3.7 Quantitative Echtzeit PCR

Zur relativen messenger-RNA (mRNA) Quantifizierung wurde im Rahmen dieser Arbeit eine qPCR durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Gesamt-RNA aus transduzierten humanen immortalisierten Podozyten gewonnen. Dafür wurden die Zellen zu Beginn mit PBS gewaschen, anschließend in PBS, mit Hilfe eines Zellkratzers geerntet und für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml *TriReagent* lysiert. Für die Gesamt-RNA Präparation wurde das „*Direct-zol RNA mini Prep Kit*“ von *Zymo Research* angewendet. Zur Messung der PBS-Konzentration wurde der Nanodrop benutzt. Unmittelbar danach wurde die mRNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (71, 72). Für die Reaktion wurde das „*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“ von *Applied Biosystems* angewendet. Mit den darin enthaltenden Reagenzien wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Material	Volumen (µl)
10x RT Puffer	2
25x Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) Mix (100 mM)	0,8
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
RNA	500 ng
Nuklease- freies H ₂ O	ad 20

Tabelle 28: Reaktionsansatz Reverse Transkription

Die Reaktion lief im Thermocycler bei folgenden Konditionen:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

Tabelle 29: Cycler-Konditionen Reverse Transkription

Zur quantitativen Analyse der gewonnenen cDNA wurde eine qPCR durchgeführt. Die von Veres *et. al.* 1987 erstmals veröffentlichte Methode erlaubt es mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Fluoreszenzmarkierten Sonden, anhand der entstehenden Fluoreszenz, auf die relative Menge der cDNA zu schließen(76). Dabei wurden *NPHS2* spezifische Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt. Sobald während der PCR die Exonuklease in die der Nähe der Sonde kommt, schneidet diese das fluoreszierende 5'-Ende der Sonde ab, wodurch dieses nicht mehr durch den Quencher am 3'-Ende inhibiert werden kann. Es kommt zu einem fluoreszierenden Signal, welches gemessen werden kann. Dabei wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert.

Material	Volumen (µl)
Genexpression Mastermix	10
Primermix (1:1 <i>forward & reverse primer</i> a 100 pmol/µl)	1
ddH ₂ O	7
cDNA	25 ng

Tabelle 30: Reaktionsansatz qPCR

Von jeder cDNA-Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden zwei *Houskeeping Genes* mitbestimmt, zum einen die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, zum anderen Beta-Aktinin.

Material	Hersteller	Katalognummer
Direct- Zol RNA Mini Prep Kit	Zymo Research	R2052
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
qPCR Probe based assay m Podocin exon 2-3	IDT	74268368
Quant Studio 12K Flex	Applied Biosystems	

Tabelle 31: Materialien qPCR

Primer	Hersteller	Sequenz 5'→3'
Forward Primer	IDT	attactctttcactactcttgccacaac
Reverse Primer	IDT	catcaagccctctggattagg

Tabelle 32: Primer qPCR

3.8 Proteinstabilitätsassays

Zur Überprüfung der Proteinstabilität wurden transduzierten humanen immortalisierten Podozyten im Rahmen von *time-course* Experimenten mit Inhibitoren der Translation, des Proteasoms und des Lysosoms inkubiert.

Material	Hersteller	Katalognummer
Cycloheximid (CHX)	Serva	10700
Dimethylsulfoxid	PanReac Applichem	A3672,0100
Mg- 132	Calbiochem	474790
Chloroquin	Sigma	C6628

Tabelle 33: Materialien Proteinstabilitätsassays

3.8.1 Cycloheximid-Assay

Zur Analyse der Proteindegradation wurden Experimente mit CHX, einem Translationshemmer, durchgeführt(58). Zunächst wurden die transduzierten humanen immortalisierten Podozyten am Vortag in eine 6-Well-Schale gesplittet. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen unterschiedlich lang mit 10 µM CHX inkubiert (30, 60, 90 oder 120 Minuten). Aufgrund des Auflösens von MG-132 in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde eine Schale nur mit DMSO inkubiert. Unmittelbar nach der Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe des modifizierten RIPA-Puffers geerntet (s. Kapitel 3.4). Im Anschluss folgte ein Western Blot (s. Kapitel 3.5).

3.8.2 MG-132-Assay

MG-132 ist ein Inhibitor des Proteasoms (27). Zunächst wurden auch hier die humanen immortalisierten Podozyten in eine 6-Well-Schale gesplittet. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 µM MG-132 inkubiert. Unmittelbar danach wurden ein CHX-Assay durchgeführt. Am Anschluss folgte ein Western-Blot.

3.8.3 Chloroquin-Assay

Chloroquin ist ein lysosomaler Inhibitor, indem es die Ansäuerung des Lysosoms neutralisiert(69). Auch bei diesem Versuch wurden die Zellen am Vortag in eine 6-Well-Schale gesplittet. Am darauffolgenden Tag wurden diese für vier Stunden mit 10 μ M Chloroquin inkubiert. Aufgrund des Auflösens von Chloroquin in Wasser, wurde eine Schale nur mit Wasser inkubiert. Unmittelbar danach folgte ein CHX-Assay, gefolgt von einem Western Blot.

3.9 Lipid-Raft-Präparation

Für die Präparation der *Lipid-Rafts* wurden zunächst je vier 10 cm Schalen Hek293T-Zellen mit Podocin WT oder Podocin p. R231Q durch Anwendung der Calcium-Phosphat-Methode (s. Kapitel 3.3.1) transient transfiziert. Die Präparation der *Lipid-Rafts* erfolgte am darauffolgenden Tag durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe verschieden konzentrierter Sucroslösungen(31). Zu Beginn wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen. Nachfolgend wurden diese in 1x PBS geerntet und für fünf Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 1 ml *Lipid-Raft* Gebrauchslösung resuspendiert und auf Eis im 2 ml Homogenisator homogenisiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Nach dieser wurden die Proben für zehn Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Unmittelbar danach wurden die 800 μ l des Überstandes in ein Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert. Es folgten 800 μ l einer 90% Sucrose-Lösung. Diese und der Überstand wurden durch langsames Auf- und Abpipettieren vermischt. Auf dieses Gemisch wurden 1,6 ml 30% Sucrose-Lösung pipettiert. Es folgten 800 μ l einer 5% Sucrose-Lösung. Es wurde streng darauf geachtet langsam zu pipettieren, sodass sich die Sucrose-Lösungen nicht vermischten. Anschließen wurden die Proben für 16 Stunden bei 41000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden sieben Fraktionen von jeweils 550 μ l abgenommen. Dabei wurden die Fraktionen immer vom oberen Rand der Säule abgenommen. Von den Fraktionen wurden jeweils 80 μ l mit 20 μ l 5x Laemmli versetzt und für fünf Minuten aufgekocht. Im Anschluss folgte ein Wester-Blot.

Material	Hersteller	Katalognummer
Stammlösung:		
150 mM NaCl	Carl Roth	3957,1
20 mM Tris, pH= 7,4	Carl Roth	9090,3
0,1 mM EDTA	Sigma	E-5134
Gebrauchslösung:		
2,5 ml Stammlösung s.o.		
1% Triton X1000	Sigma	S6508-50G
5 mM Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma	P7626-25G

0,25 mM Phenylmethylylsulfonylfluorid (PMSF)		
5xLeammli:		
250 mM Tris	Sigma	T1503
50% Glycerol		
2% SDS	Carl Roth	CN30.3
0,025% Bromphenolblau	Carl Roth	A512
250 mM DTT	Fermentas	R0862
D(+)- Saccharose	Carl Roth	
Ultra- Clear Centrifuge Tubes	Beckman Coulter	344062
Optima XPN-80 Ultracentrifuge	Beckman Coulter	
SW 60 Ti Rotor	Beckman Coulter	13E 1700
2 ml Homogenisator	Wheaton	

Tabelle 34: Materialien *Lipid-Raft*-Präparation

Name	Insert	Tag	Vektor
F9. mPodocin WT pcDNA6	Podocin Wildtyp	F9	pcDNA6
F9. mPodocin R231Q pcDNA6	Podocin p. R231Q	F9	pcDNA6

Tabelle 35: Plasmide *Lipid-Raft*-Präparation

3.10 Histologie

Zur Beurteilung der Glomeruli von Wildtyp-Mäusen und Mäusen welche homozygot für p.Podocin R231Q sind, wurden histologische Färbungen von 2 µm dicken Nierenschnitten angefertigt. Sowohl die „*Periodic-acid-Schiff reaction*“ (PAS)- Färbung als auch die *Saure-Fuchsin-Orange G* (SFOG)-Färbung wurden im Slidescanner der CECAD Imaging Facility eingescannt.

Material	Hersteller	Katalognummer
Xylol	Chem Solute	371.5000
Ethano	Carl Roth	9065,3
Periodsäure	Carl Roth	3257.1
Schiff'sches Reagenz	Merck	1.09033
Mayers Hämatoxylin	Sigma	MHS 16
Histological Mounting Medium	National Diagnostics	HS-103

Bouin'sche Lösung	Sigma	HT10132
Weigert's Gebrauchslösung:		
Hämatoxylinlösung A	Carl Roth	X.906.1
Hämatoxylinlösung B	Carl Roth	X.907.1
Salzsäure (HCl)	Merck	1.00317.1000
Phosphormolybdänsäure	Carl Roth	4440.1
SFOG- Lösung:		
1,5 g Anilinblau	Fluka	95290
3,0 g Orange G	Certistain	15925
4,5 g Säurefuchsin	Carl Roth	42685
300 ml H ₂ O		
Deckgläser 24x50 mm	Menzel- Gläser	10318963

Tabelle 36: Materialien Histologie

3.10.1 PAS-Färbung

Die PAS- Färbung begann mit einer Deparaffinierung der Schnitte mit Hilfe einer absteigenden Ethanolreihe (s. Tabelle 24). Nach einem Waschschrift in Wasser für zwei Minuten wurden die Schnitte für zehn Minuten in 0,9% Periodsäure inkubiert. Es folgte wieder ein Waschschrift in Wasser für eine Minute. Im Anschluss wurden die Schnitte für zehn Minuten in Schiff'schen Reagenz inkubiert. Der folgende Waschschrift wurde für zwei Minuten in Leitungswasser durchgeführt. Unmittelbar danach wurden die Schnitte für zehn Minuten in Mayer's Hämatoxylin inkubiert. Der letzte Waschschrift in Leitungswasser dauerte acht Minuten. Es folgte eine aufsteigende Ethanolreihe:

Material	Inkubationszeit (AnzahlxMinuten)
70% Ethanol	1x3
95% Ethanol	2x3
100% Ethanol	3x3
100% xylol	2x5

Tabelle 37: Aufsteigende Ethanolreihe

Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe von Histomount eingebettet.

3.10.2 SFOG (Trichrom)-Färbung

Die SFOG-Färbung begann ebenfalls mit der absteigenden Ethanolreihe (s. Tabelle 24). Nach dieser wurden die Schnitte für zwei Minuten in Wasser gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation in der Bouinschen Lösung bei 70°C in einem Wasserbad unter dem Abzug. Nach

der Inkubation wurden die Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte ein Waschschrift für zehn Minuten in Leitungswasser. Nach dem Waschschrift wurden die Hämatoxylinlösungen A und B nach Weigert zu gleichen Anteilen vermischt und die Schnitte in dieser Lösung für fünf Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift von zwei Minuten in Leitungswasser wurden die Schnitte für zehn Sekunden in HCl-Ethanol inkubiert (75% Ethanol + 25% HCl). Es folgte ein Waschschrift von acht Minuten in Leitungswasser. Unmittelbar danach wurden die Schnitte für fünf Minuten in 1% Phosphormolybdänsäure inkubiert und für 20 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte für zehn Minuten in der SFOG-Lösung inkubiert und danach für eine Minute in Leitungswasser gewaschen. Zum Schluss folgte die aufsteigende Ethanolreihe. Auch diese Schnitte wurden in Histomount eingebettet.

3.11 Albumin-ELISA und Kreatinin-Kolorimetrie-Assay

Zur Quantifizierung der Proteinurie von Mäusen wurde ein Albumin ELISA durchgeführt. Dabei wurde auf das Prinzip des „Sandwich-ELISA“ zurückgegriffen(41). Zu Beginn wurde eine 96-Well-Platte mit einem Antikörper beschichtet, welcher Mausalbumin erkennt. Sobald Albumin an dieser festen Phase gebunden war, wurde ein HRP-gekoppelte Antikörper hinzugegeben, welcher ein anderes Epitop am Mausalbumin erkannte. Mittels enzymatischer Reaktion konnte der Zweitantikörper quantifiziert werden und so die Menge an Albumin bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „*Mouse Albumin ELISA Quantification Set*“ von Bethyl angewendet und die Instruktionen des Herstellers befolgt. Zur Bestimmung des Kreatinins im Urin wurde ein *Kolorimetrie-Assay* durchgeführt. Dabei wurde das „*Creatinin (urinary) calorimetric Assay Kit*“ von Cayman benutzt und die Instruktionen des Herstellers befolgt. Sowohl der Albumin-ELISA als auch der Kreatinin *Kolorimetrie-Assay* wurden im Enspire von Corning ausgewertet.

Material	Hersteller	Katalognummer
Mouse Albumin ELISA Quanti_cation Set	Bethyl	E99.134
Creatinin (urinary) Calorimetric Assay Kit	Cayman	500701
Enspire	Corning	

Tabelle 38: Materialien Albumin-Elisa und Kreatinin-Kolorimetrie-Assay

4. Ergebnisse

4.1 *in vivo* Ergebnisse

4.1.1 Homozygote Podocin p.R231Q Mäuse zeigen nach zwei Jahren einen Phänotyp

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, scheint der Polymorphismus Podocin p. R231Q zu einer erhöhten Vulnerabilität der Nieren zu führen. Um diese Situation *in vivo* nachzustellen, wurden im Rahmen dieser Arbeit homozygote Mäuse für Podocin p. R231Q und Mäuse mit Wildtyp Podocin phänotypisiert und verglichen. Für die Präparation wurden die Mäuse zunächst mit Ketamin und Xylazin anästhesiert. Nach Euthanasie der Mäuse durch kardiale Infusion mit HBSS wurden die Nieren entnommen und in Formalin fixiert. Nach Dehydratisierung und Einbettung in Paraffin wurde das Gewebe mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten und auf Glasscheiben befestigt. Für diesen Versuch wurden Mauslinien via *CRISPR-mediated genome editing* generiert, welche homozygot für Podocin p.R231Q waren. Die Entwicklung der Mauslinien und die Experimente an lebenden Tieren wurden von Herrn Dr. Linus Butt durchgeführt. Die Phänotypisierung erfolgte durch histologische Färbungen, (PAS- und SFOG-Färbungen) als auch durch die Quantifizierung von Albumin und Kreatinin im Urin. Die PAS-Färbung von Nierenschnitten dient zur Darstellung von fibrosierenden und sklerosierenden Arealen in den Glomeruli. Dabei wurden 2 µm dicke Mausnierenschnitte zweijähriger Mäuse verwendet. In Abbildung 4A ist eine PAS-Färbung einer zweijährigen Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Maus und einer ebenfalls zweijährigen Podocin^{R231Q/R231Q} Maus dargestellt. Weder bei der Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Maus noch bei der Podocin^{R231Q/R231Q} Maus lassen sich sklerosierende oder fibrosierende Areale bzw. Merkmale einer Fokal-Segmentalen-Glomerulosklerose nachweisen. Die SFOG(Trichrom)-Färbung dient der Darstellung von Proteinablagerungen und Verdickung der Glomerulären Basalmembran. Auch bei dieser Färbung wurden 2 µm dicke Mausnierenschnitte zweijähriger Mäuse verwendet. Wie in Abbildung 4B zu sehen ist, zeigen sich auch bei dieser Färbung keine Unterschiede zwischen der Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Maus und der Podocin^{R231Q/R231Q} Maus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auf histologischer Ebene keine Unterschiede zwischen Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen und Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen darstellbar bzw. nachweisbar sind. Ein weiteres Maß für die Einschätzung einer Nierenschädigung ist die Albumin-Kreatinin-Ratio (ACR), ein Marker für die Proteinurie. Um diese zu ermitteln, wurde im Mausurin Albumin mittels eines Albumin-ELISAs und Kreatinin mittels eines Kolorimetrie-Assays quantifiziert und beide Parameter ins Verhältnis gesetzt. Abbildung 4C zeigt die Albumin-Kreatinin-Ratio in Abhängigkeit zum Alter und Genotyp der Mäuse. Vergleicht man die ACRs von Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen und Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen, ist bis zum Alter von 18 Monaten kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

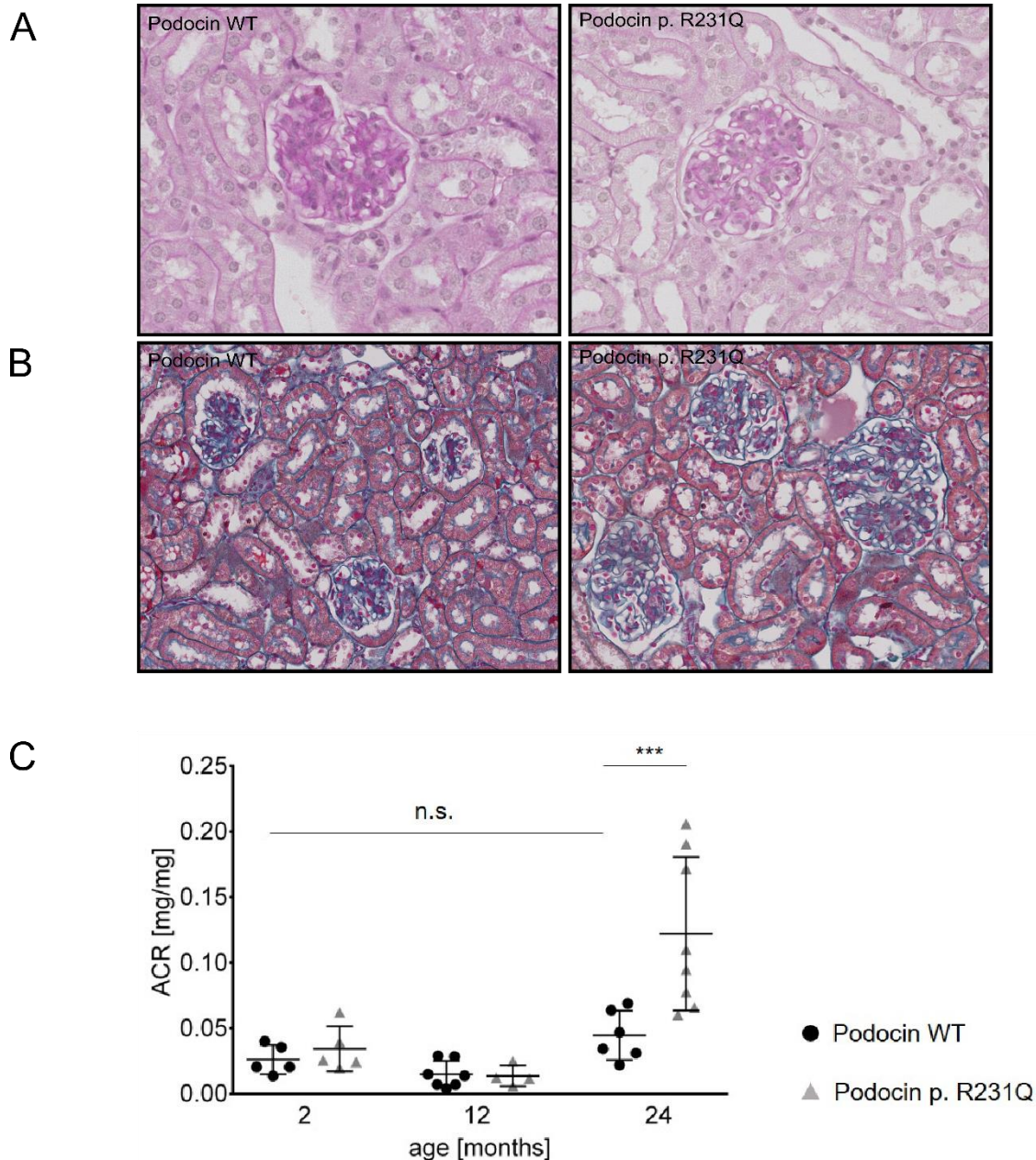


Abbildung 4: Phänotypisierung von homozygoten Mäusen vs. Wildtyp Mäusen

A) PAS-Färbung von 2 μ m dicken Nierenschnitten zweijähriger Podocin^{Wildtyp/Wildtyp}- bzw. Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen. Bei beiden Genotypen sind keine fibrosierende und sklerosierende Areale nachweisbar. B) SFOG-Färbung von 2 μ m dicken Nierenschnitten zweijähriger Podocin^{Wildtyp/Wildtyp}- bzw. Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen. Bei beiden Genotypen sind weder Proteinablagerungen noch eine Verdickung der glomerulären Basalmembran zu erkennen. C) ACR-Ratio von Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen (schwarze Kreise, n= 5 Mäuse bei 2, n= 7 Mäuse bei 12, n= 6 Mäuse bei 24) und Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen (graue Dreiecke; n= 5 Mäuse bei 2, n=4 Mäuse bei 12, n= 8 Mäuse bei 24): bis zum Alter von 18 Monaten zeigen beide Genotypen keinen Unterschied in der Ausscheidung von Albumin. Ab dem Alter von 24 Monaten zeigen homozygote Mäuse eine leicht erhöhte Albuminurie (ACR-Ratio= 0,12 mg/ml) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (ACR-Ratio= 0,04 mg/ml). Die statistische Signifikanz errechnete sich mit Hilfe eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests (*** $P < 0.001$; $P > 0.05$, n.s.= nicht signifikant). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SEM.

Beide befinden sich auf einem konstant niedrigen Niveau. Vergleich man jedoch die ACR-Werte ab dem Alter von 24 Monate, zeigt sich eine signifikant erhöhte ACR bei Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen im Vergleich zu Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen (0,12 mg/ml vs. 0,04

mg/ml; siehe Abbildung 5). Insgesamt lässt sich sagen, dass der Polymorphismus keine histologischen Veränderungen nach sich zieht, es jedoch im hohen Alter zu einer leicht erhöhten Proteinurie führt. Im weiteren Verlauf war es von Interesse, die Morphologie der Glomeruli näher darzustellen. Dafür wurden 2 µm dicke Mäusnierenschnitte von 24 Monaten alten Mäusen für die Schlitzmembran-spezifischen Proteine Nephrin und Podocin gefärbt. In der Nephrin-Färbung fällt auf, dass das bei Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen vorhandene Muster mit Furchen und Einkerbungen bei der homozygoten Maus (Podocin^{R231Q/R231Q}) weniger stark ausgeprägt ist. In der Podocin-Färbung fällt auf, dass die Intensität des Podocin-Signals bei Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen weniger stark ausgeprägt ist als bei der Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen. Butt et. al. konnte diese Beobachtung ebenfalls nachweisen. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, zeigte sich in der STED-Mikroskopie von Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen und Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen, dass Podocin im Vergleich zu Nephrin bei Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen eine geringere Intensität aufweist als bei Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen(8).

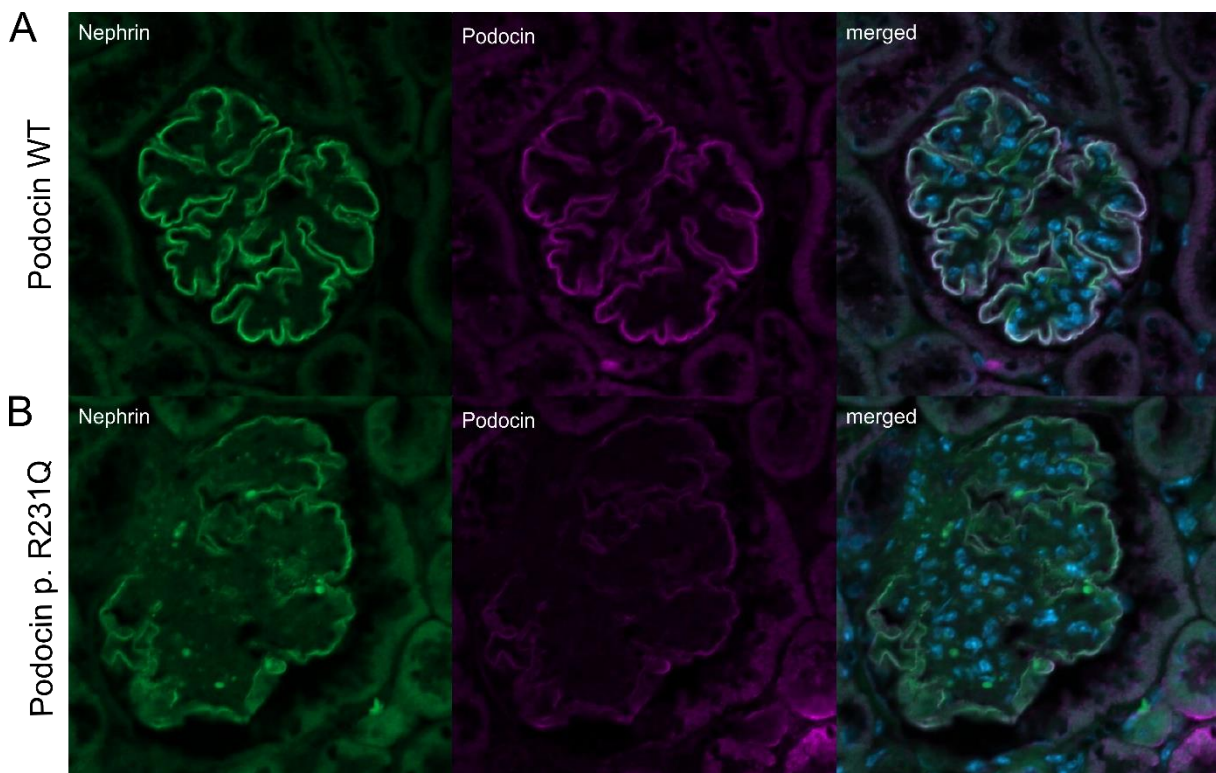


Abbildung 5: Immunfluoreszenz von Mäusnierenschnitten

A) Podocin WT Maus: Nephrin-Alexa 488, Podocin-Cy3 B) Podocin p. R231Q: Nephrin-Alexa 488, Podocin-Cy3 A&B) In der Nephrin-Färbung ist bei den homozygoten Mäusen eine veränderte Morphologie zu erkennen. In der Podocin-Färbung fällt eine geringere Intensität von Podocin bei den homozygoten Mäusen auf.

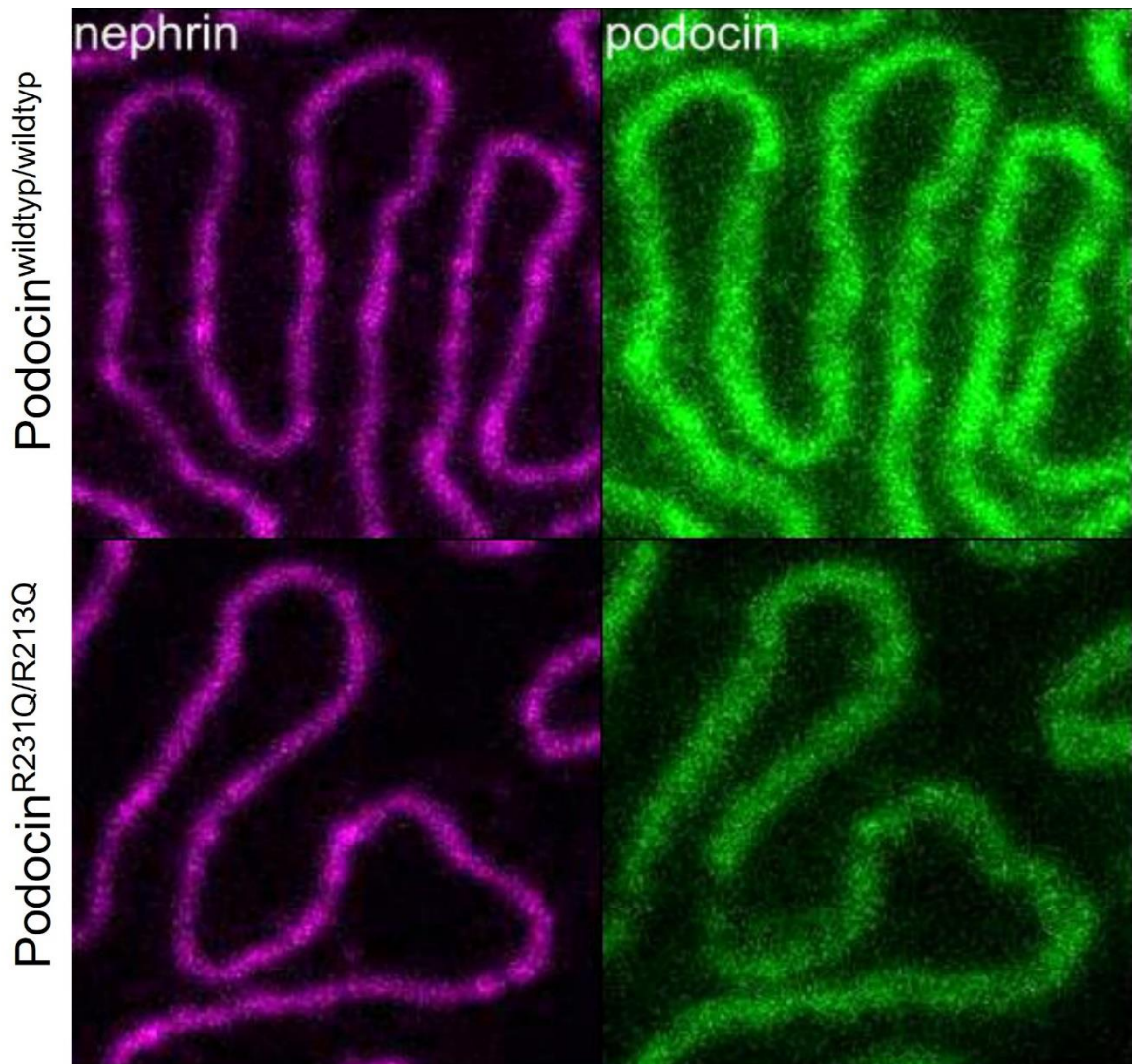


Abbildung 6: Podocin und Nephrin Intensität im Vergleich bei Podocin^{wildtyp/wildtyp} Mäusen und Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen (Abb. aus unserer Publikation „Super-Resolution Imaging of the Filtration Barrier Suggests a Role for Podocin R229Q in Genetic Predisposition to Glomerular Disease“ (8))

4.2 *In vitro* Ergebnisse

4.2.1 Geringere Fluoreszenzintensität und verändertes Membrantargeting von Podocin^{R231Q/R231Q} in kultivierten Zellen

Die Beobachtung in den Mausversuchen werfen Fragen bezüglich der Proteinstabilität und Proteinlokalität von Podocin p.R231Q auf. Für eine detaillierte Analyse dieser Fragen wurden zwei stabile Zelllinien generiert. Durch lentivirale Transduktion wurde in humane immortalisierte Podozyten entweder Podocin Wildtyp oder Podocin p.R231Q stabil exprimiert (s. Abbildung 7A). Auch von den transduzierten Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Dabei ist in Abbildung 6B zu sehen, dass bei den Zellen sowohl die Intensität als auch die Membranlokalisation von Podocin p.R231Q scheinbar geringer zu sein scheint als Podocin Wildtyp. Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurde ein ImageJ Makro angewendet, welches die Intensität von Podocin einerseits an der Membran und andererseits

in der Zell misst (s. Abbildung 7C). Nach der Messung der Intensitäten von Membran und Zellinneren, wurde aus beiden ein Quotient gebildet. Wie Abbildung 7D zeigt, ist der Quotient von Podocin p.R231Q signifikant geringer als bei den Zellen mit Podocin Wildtyp. Für einen tieferen Einblick in das Membran-Targeting von Podocin p.231Q wurde eine *Lipid-Raft*-Präparation durchgeführt. *Lipid-Rafts* sind Cholesterin reiche Areale der Zellmembran. Sie sind unabdingbar für viele Signaltransduktionen der Zelle. Wie Schwarz *et. al.* 2001 zeigte, lokalisiert Podocin Wildtyp an solche *Lipid-Rafts* und formt dort mit einem anderen Podocin-Molekül ein Dimer(64). Für die Lipid-Raft-Präparation wurden Hek293T-Zellen mit entweder Podocin Wildtyp oder Podocin p. R231Q transient transfiziert. Nach erfolgreicher Präparation der *Lipid-Rafts* wurde ein Western-Blot durchgeführt. Wie in Abbildung 8A zu sehen ist, lokalisiert Podocin p.R231Q in die *Lipid-Rafts* (Bande in Fraktion 2). Als Positiv-Kontrolle für die *Lipid-Raft* dient Flotillin. Als Kontrolle für die löslichen Zellkomponenten dient CD71. Zur Quantifizierung des *Lipid-Raft-Targetings*, wurde ein Quotient aus Podocin in Fraktion 2 zu Podocin im Lysat berechnet. Wie in Abbildung 7B zu sehen ist, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen Podocin Wildtyp und Podocin p.R231Q (Podocin WT= 1,0 vs. Podocin p.R231Q= 0,96). Es ist festzuhalten, dass Podocin p.R231Q quantitativ weniger an die Zellmembran lokalisiert, jedoch das *Lipid-Raft-Targeting* nicht beeinträchtigt ist, also der Zielort von Podocin trotz Polymorphismus weiterhin erreicht wird.

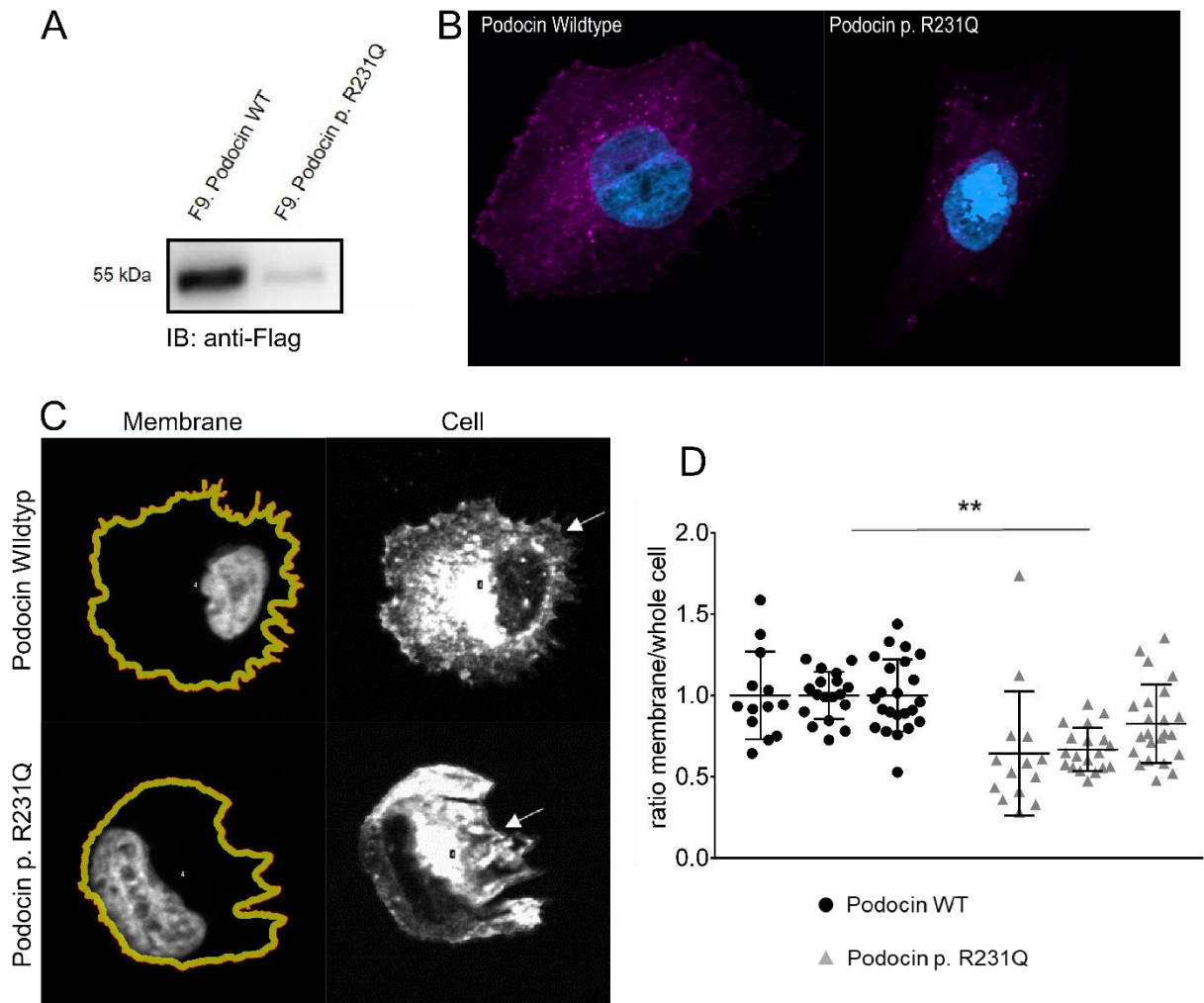


Abbildung 7: Immunfluoreszenz von humanen immortalisierten Podozyten mit Membran-Targeting

A) Expressionskontrolle von transduzierten humanen immortalisierten Podozyten. B) Immunfluoreszenz von humanen immortalisierten Podozyten; links mit Podocin WT, rechts mit Podocin p. R231Q; anti-Flag-Cy3. C) Makro ImageJ; gelbe Linie markiert die Membran, dort wird die Intensität für Podocin an der Membran gemessen; in den rechten Bildern wird die Intensität von Podocin in der Zelle gemessen, dabei wird die zuvor gelb markierte Membran ausgelassen (s. weißer Pfeil). D) Quotient aus Podocin Intensität an der Membran und Podocin Intensität in der Zelle. Signifikanter Unterschied zwischen Podocin Wildtyp und Podocin p. R231Q (n= 3; Podocin WT Ratio= 1,0 vs. Podocin p. R231Q Ratio= 0,58.) Die statistische Signifikanz errechnete sich mit Hilfe eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests (** $P < 0.01$). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SEM.

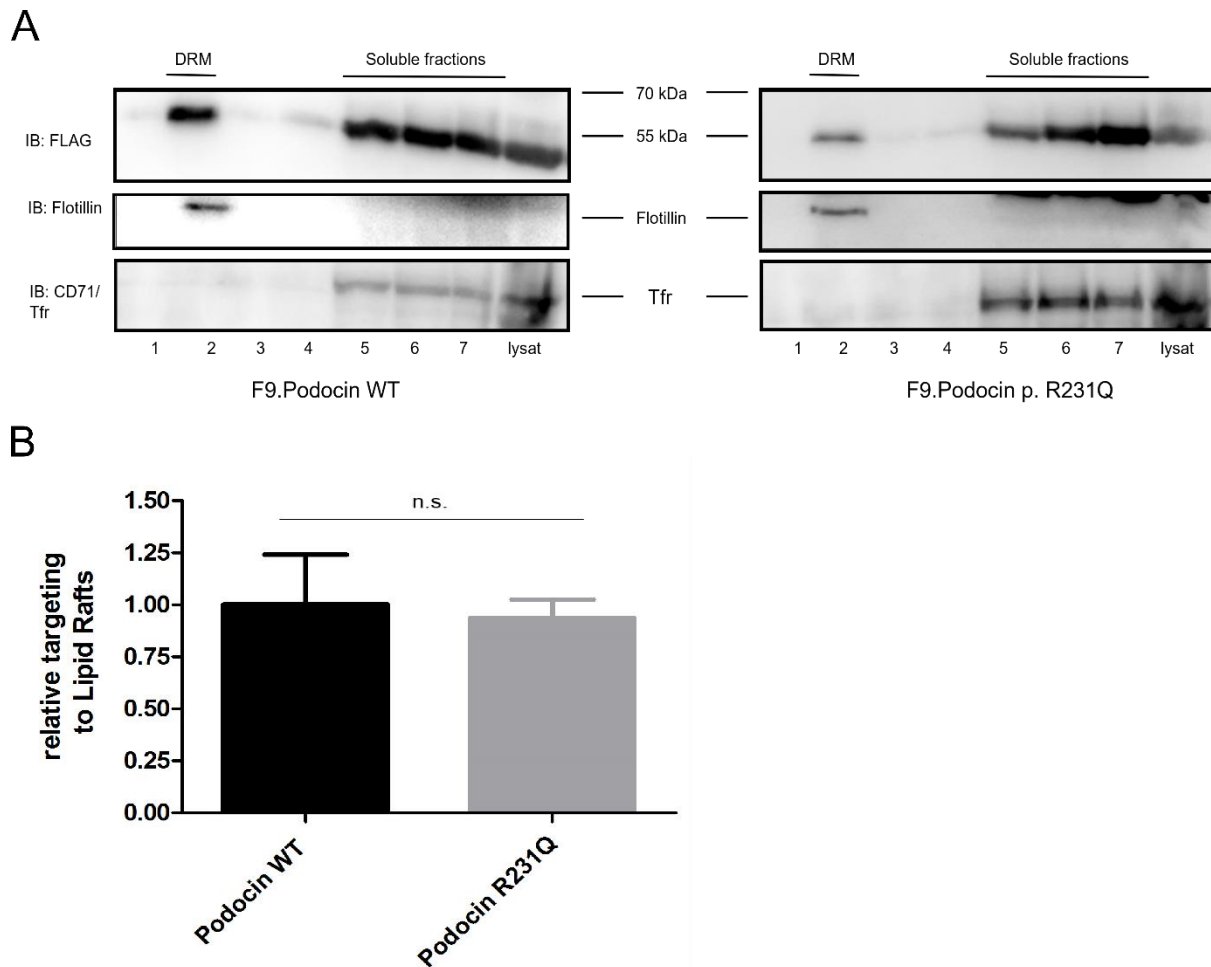


Abbildung 8: *Lipid-Raft-Präparation*

A) Western-Blot nach Lipid-Raft-Präparation; Flotillin dient als Positiv-Kontrolle für die *Lipid-Rafts*; Cd71/Transferrinrezeptor dient als Positiv-Kontrolle für die löslichen Zellkomponenten. Im Western-Blot für Flotillin sei nebenbefundlich auf die in erster Linie unspezifischen Banden in der löslichen Fraktion hingewiesen. B) Verhältnis von Podocin in den *Lipid-Rafts* zu Podocin im Lysat; kein signifikanter Unterschied des relativen *Lipid-Raft-Targetings* zwischen Podocin Wildtyp und Podocin p.R231Q (n= 3). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch einen ungepaarten, zweiseitigen t-Test ($P > 0.05$, n.s.= nicht signifikant). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte + SD.

4.2.2 Geringeres Proteinlevel von Podocin p.R231Q aufgrund schnellerer Degradation

Wie zuvor sowohl im Western Blot (s. Abbildung 7A) als auch in den Immunfluoreszenzbildern (s. Abbildung 7B) gezeigt wurde, ist die Intensität von Podocin p.R231Q geringer als die von Podocin Wildtyp. Es stellt sich die Frage, warum Podocin p.R231Q geringer exprimiert wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurde für eine erste Annäherung zunächst ein Western-Blot mit Lysaten mehrerer transduzierter humaner immortalisierter Podozyten angefertigt. Dabei wurde zum einen das F9-Tag am Podocin detektiert, zum anderen das Housekeeping-Gen Pan-Actin (s. Abbildung 9A). Zur Quantifizierung bzw. Objektivierung wurde ein Quotient aus der Intensität von Podocin und der Intensität von Pan-Actin gebildet. Wie in Abbildung 9B zu sehen ist, ist der Quotient von Podocin p.R231Q signifikant niedriger als der Quotient von

Podocin Wildtyp (Podocin Wildtyp= 1,0 vs. Podocin p.R231Q= 0,6). Das Expressionslevel von Proteinen kann auf zwei Wegen beeinflusst werden, zum einen auf RNA-Ebene (z.B. *Nonsense-mediated mRNA Decay*(9)) zum anderen auf Protein-Ebene (Proteindegradation(13)). Zur Beurteilung, ob es auf RNA-Ebene zu einer Verminderung des Expressionslevels von Podocin p.R231Q kommt, wurde eine qPCR von transduzierten humanen immortalisierten Podozyten durchgeführt. Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden mRNA-Leveln von Podocin p.R231Q und Podocin Wildtyp zu erkennen (s. Abbildung 9C). Zur Beurteilung der Proteindegradation wurde ein *time-course* Experiment mit Cycloheximid, einen Translationshemmer, durchgeführt. Dabei wurden die humanen immortalisierten Podozyten entweder für 30-, 60-, 90- oder 120 Minuten mit CHX inkubiert. Im Anschluss folgte ein Western-Blot. Abbildung 9A zeigt den Western-Blot. Dieser zeigt, dass Podocin p.R231Q, im Gegensatz zu Podocin Wildtyp, nach 120 Minuten Inkubation mit CHX fast vollständig abgebaut ist. Zur Quantifizierung der Podocin-Menge wurde ein Quotient aus der Intensität von Podocin und der Intensität von Pan-Actin gebildet. Der Quotient der CHX-Werte wurde zu dem Quotienten der DMSO-Probe normalisiert. Wie Abbildung 10B zeigt, ist nach 30- und 120 Minuten signifikant weniger Podocin p.R231Q vorhanden als Podocin Wildtyp. Zur Visualisierung des Effekts von CHX, wurde IF-Bilder von humanen immortalisierten Podozyten angefertigt, welche zuvor 120 Minuten mit CHX inkubiert wurden. Wie in Abbildung 10C zu sehen ist, ist die Intensität von Podocin p.R231Q geringer als die Intensität von Podocin Wildtyp. Zusammenfassend zeigt sich, dass Podocin p.R231Q schneller von der Zelle degradiert wird als Podocin Wildtyp.

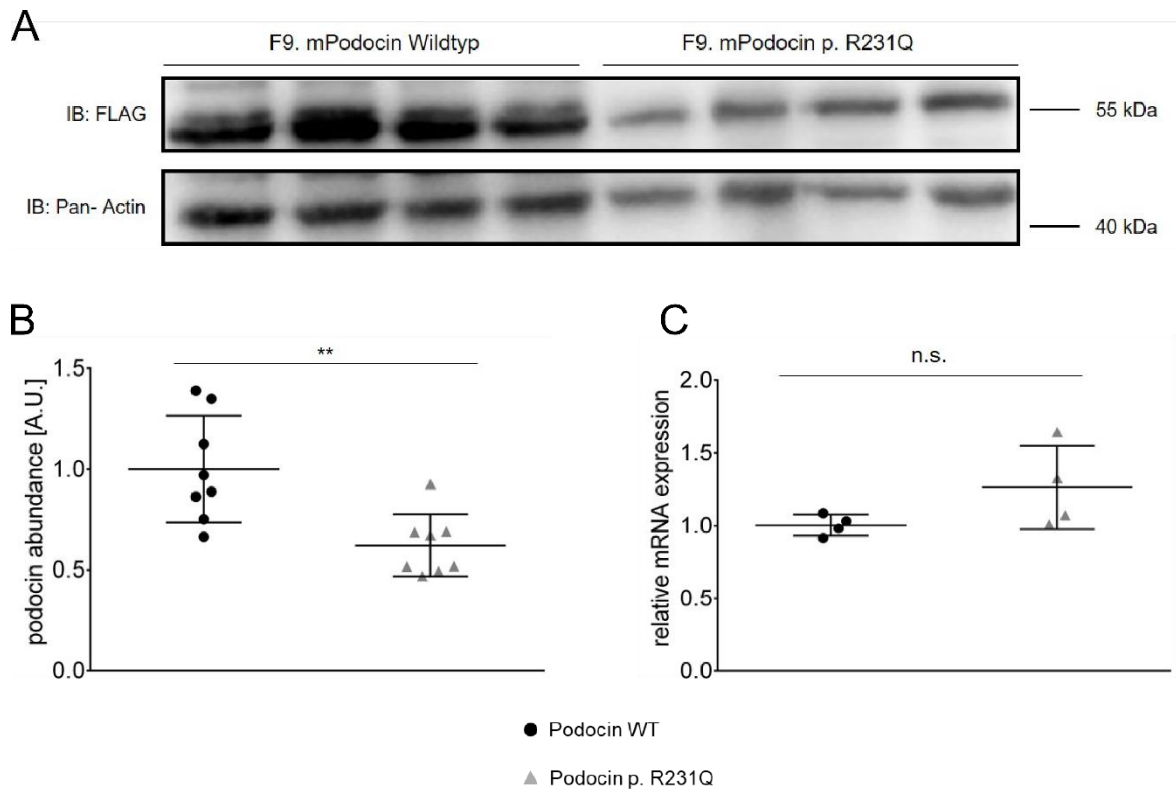


Abbildung 9: Podocin RNA- und Protein Level

A) Western-Blot von jeweils vier Lysaten transduzierter humaner immortalisierter Podozyten B) Podocin Protein-Level von Podocin WT (schwarze Kreise; n= 8) und Podocin p.R231Q (graue Dreiecke; n= 7); Quotient aus der Intensität von Podocin und der Intensität von Pan-Actin (Podocin WT= 1,0 vs. Podocin p. R231Q= 0,6. Die statistische Signifikanz errechnete sich mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests (** $P < 0.01$). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SEM. C) qPCR transduzierter humaner immortalisierter Podozyten mit Podocin WT (schwarze Kreise; n= 4) und Podocin p.R231Q (graue Dreiecke; n= 4); kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expressionslevel. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch einen ungepaarten, zweiseitigen t-Test ($P > 0.05$, n.s.= nicht signifikant). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SEM.

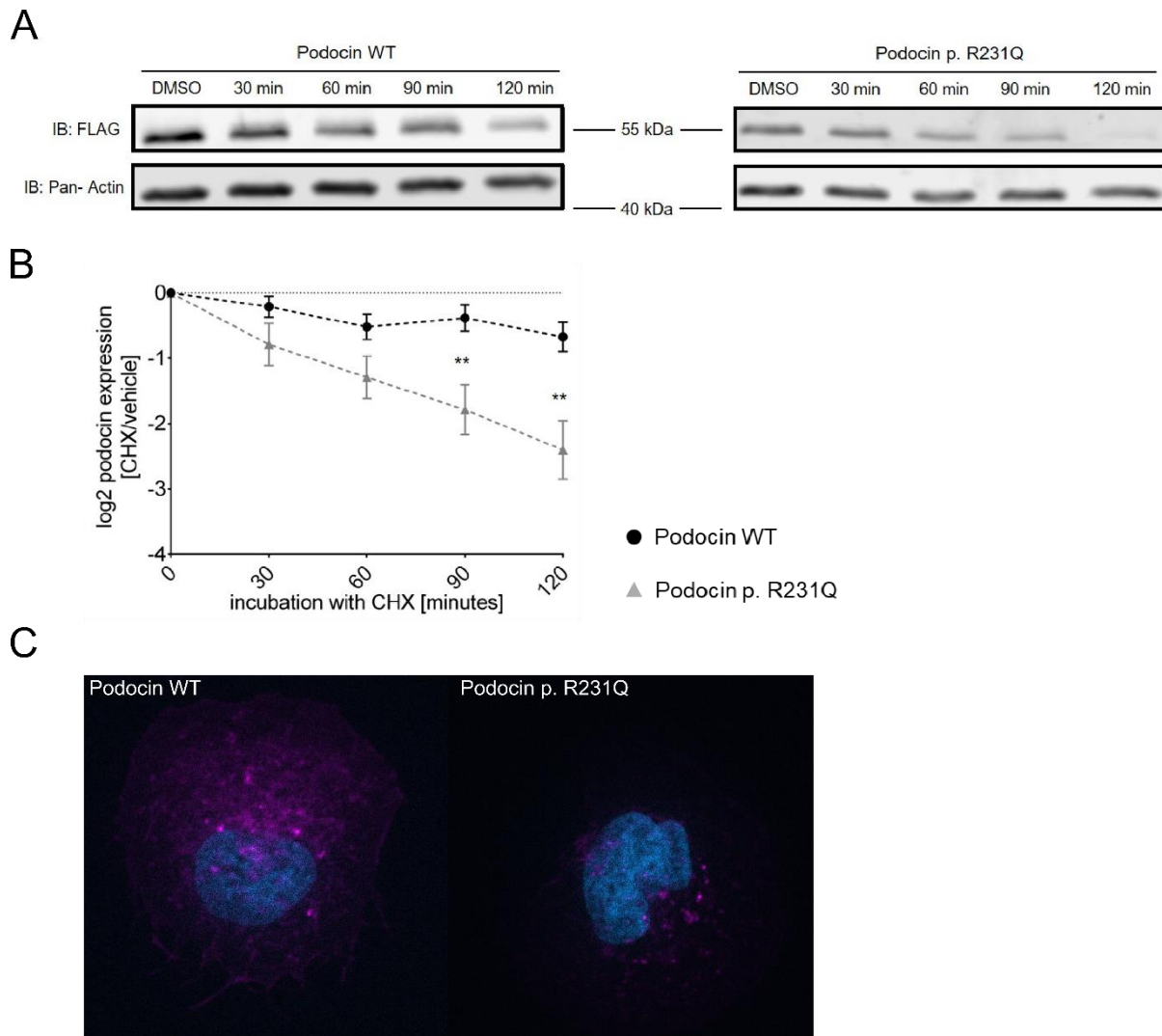


Abbildung 10: Cycloheximid-Assay

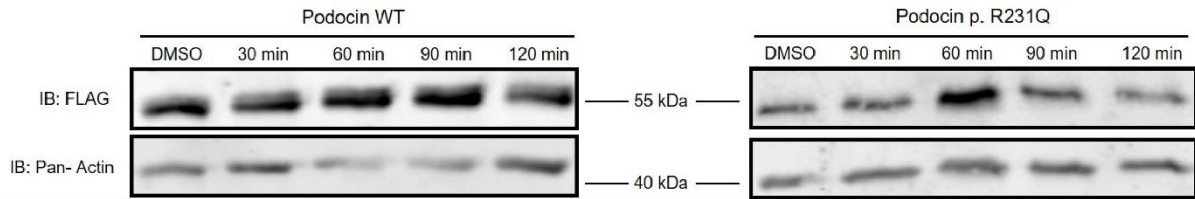
A) Western-Blot; nach 120 Minuten ist Podocin p. R231Q fast komplett degradiert. B) nach 90- und 120 Minuten ist signifikant weniger Podocin p. R231Q vorhanden als Podocin Wildtyp ($n=3$). C) IF-Bilder von humanen immortalisierten Podozyten nach 120 Minuten CHX zeigen geringere Fluoreszenzintensität von Podocin p. R231Q (anti-Flag-Cy3). Die statistische Signifikanz errechnete sich mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests (** $P < 0.01$). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SD.

4.2.3 Podocin p.R231Q wird erheblich durch das Proteasom degradiert

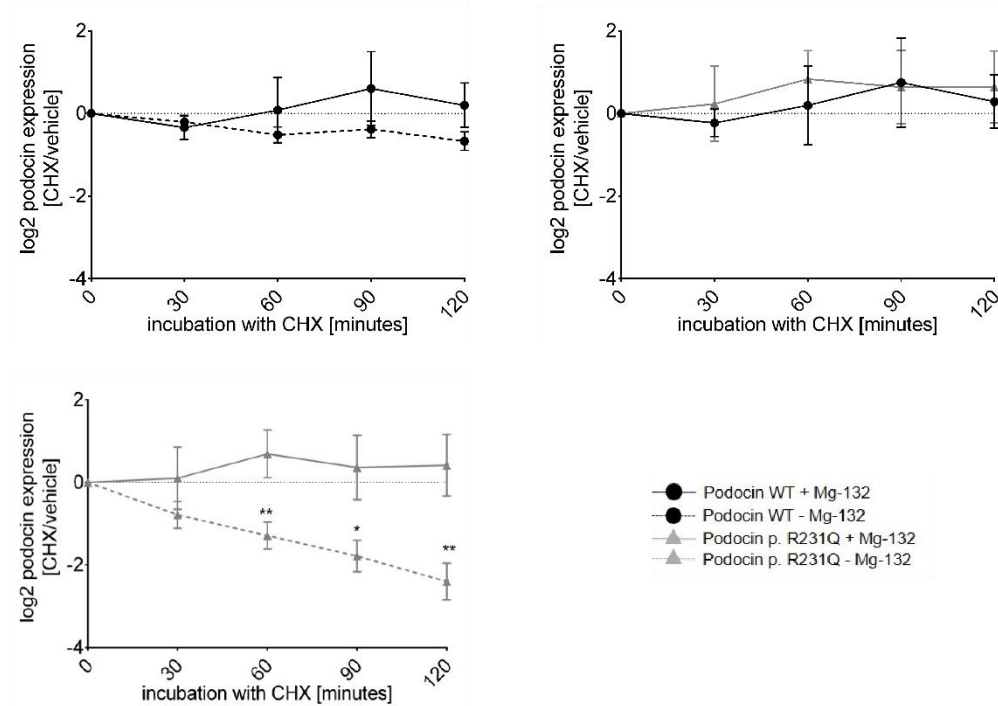
Für die Degradation von Proteinen sind zwei Hauptwege verantwortlich: Der proteasomale und der lysosomale Abbau. Zur Analyse, ob das Proteasom für die schnelle Degradation von Podocin p.R231Q verantwortlich ist, wurde ein Experiment mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 durchgeführt. Dabei wurden die transduzierten humanen immortalisierten Podozyten für vier Stunden mit $10 \mu\text{M}$ MG-132 inkubiert, im Anschluss folgte ein CHX-Assay. In Abbildung 10A ist zu sehen, dass die Bande von Podocin p.R231Q nach 120 Minuten stärker erscheint als beim Western-Blot ohne MG-132. Zur Quantifizierung des Effektes wurde ein Quotient aus der Intensität von Podocin und Pan-Actin gebildet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Proteasoms den Effekt von CHX deutlich entgegenwirken kann. Sowohl

Podocin p.R231Q als auch Podocin Wildtyp zeigen eine erhöhte Expression im Vergleich zum normalen CHX-Assay, als auch eine Erhöhung im Vergleich zum Lysat, welches ausschließlich mit DMSO behandelt wurde (s. Abbildung 11B). Auch hier wurden ergänzende IF-Bilder angefertigt. Wie diese zeigen, ist die Intensität von Podocin deutlich höher als im Vergleich zu den IF-Bildern ohne MG-132 (s. Abbildung 11C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Podocin p. R231Q durch das Proteasom degradiert wird. Für die Beurteilung der lysosomalen Degradation wurde derselbe Versuchsaufbau wie beim MG-132 Assay gewählt. Anstatt MG-132 wurde jedoch Chloroquin, ein Inhibitor des Lysosoms, genutzt. Zur Überprüfung, ob Chloroquin, ohne nachfolgendem CHX-Assay, einen Effekt auf die Podocin Expression hat, wurden die humanen immortalisierten Podozyten für vier Stunden ausschließlich mit 10 μ M Chloroquin behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen nach vierstündiger Inkubation mit Wasser. Abbildung 12A zeigt die Podocin Expression von Podocin Wildtyp und Podocin p. R231Q nach Chloroquin Inkubation. Dabei wird deutlich, dass die Podocin Expression im Vergleich zur Inkubation mit Wasser leicht erhöht ist. Der Unterschied zwischen Podocin Wildtyp und Podocin p.R231Q ist jedoch nicht signifikant. Ob Chloroquin die Stabilität von Podocin beeinflussen kann, sobald man die Translation hemmt, wurde im folgenden Versuch näher analysiert. Wie in Abbildung 12B zu sehen ist, erkennt man nach einer Vorbehandlung mit Chloroquin keine stärkeren Podocin Banden als im Vergleich zum Versuch ohne Chloroquin. Bei genauerer Betrachtung wird der Eindruck erweckt, dass nach 120 Minuten CHX sowohl die Podocin Wildtyp Bande als auch die Podocin p.R231Q Bande weniger intensiv erscheint als im Versuch ohne Chloroquin. Zur Quantifizierung wurde erneut ein Quotient aus den Intensitäten gebildet und gegen den Quotienten aus der DMSO-Probe normalisiert. Abbildung 13A zeigt die Podocin Expression mit und ohne Chloroquin-Vorbehandlung. Es gibt keinen signifikanten Unterschied, weder zwischen Podocin Wildtyp und Podocin p.R231Q noch zwischen „mit Chloroquin“ und „ohne Chloroquin“. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Lysosom bzw. der lysosomale Abbau nicht maßgeblich für die Degradation von Podocin verantwortlich ist.

A



B



C

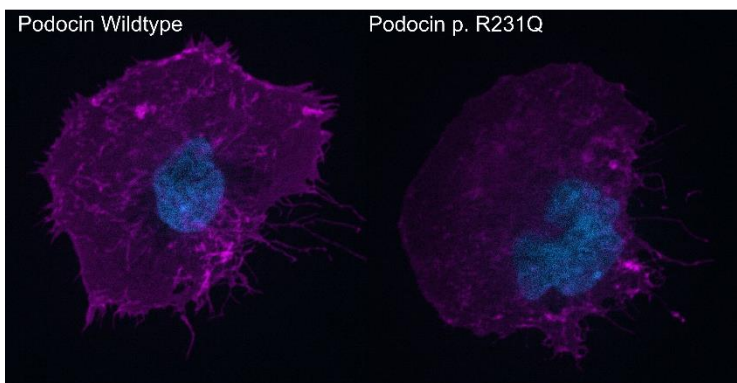


Abbildung 11: MG-132 Assay

A) Western Blot: Nach Vorbehandlung der Zellen mit dem Proteasom-Hemmer Mg-132 und nachfolgendem CHX-Assay ist nach 120 Minuten Podocin p.R231Q weiterhin sichtbar. B) oberes linkes Diagramm: Podocin mit und ohne MG-132, kein signifikanter Unterschied (n= 3); oberes rechtes Diagramm: Podocin und Podocin p.R231Q jeweils mit MG-132, kein signifikanter Unterschied (n= 3); unteres linkes Bild: Podocin p. R231Q mit und ohne MG-132, signifikanter Unterschied zwischen „mit“ und „ohne“ MG-132 nach 60-, 90- und 120 Minuten (n= 3) C) IF-Bilder nach vier Stunden MG-132 und zwei Stunden CHX. Deutlich höhere Intensität von Podocin als ohne Vorbehandlung mit MG-132 (vgl. Abbildung 9C). Die statistische Signifikanz errechnete sich mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SD.

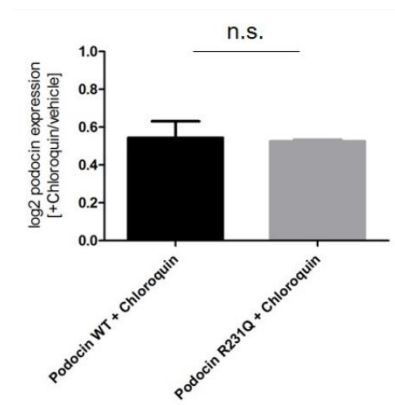
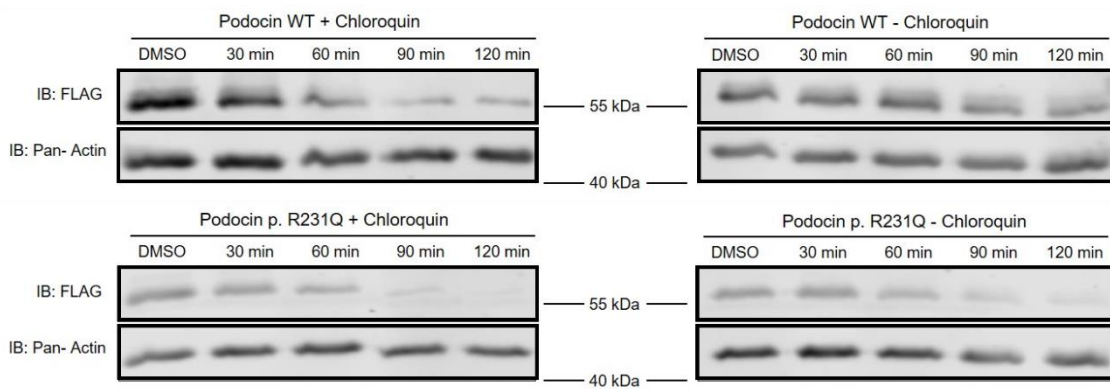
A**B**

Abbildung 12: Chloroquin-Assay

- A) Podocin Expression nach vierstündiger Inkubation mit 10 μM Chloroquin, kein signifikanter Unterschied zwischen Podocin Wildtyp und Podocin p.R231Q ($n= 3$). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch einen ungepaarten, zweiseitigen t-Test ($P > 0.05$, n.s.= nicht signifikant). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SEM. B) Western Blot nach Chloroquin-Assay.

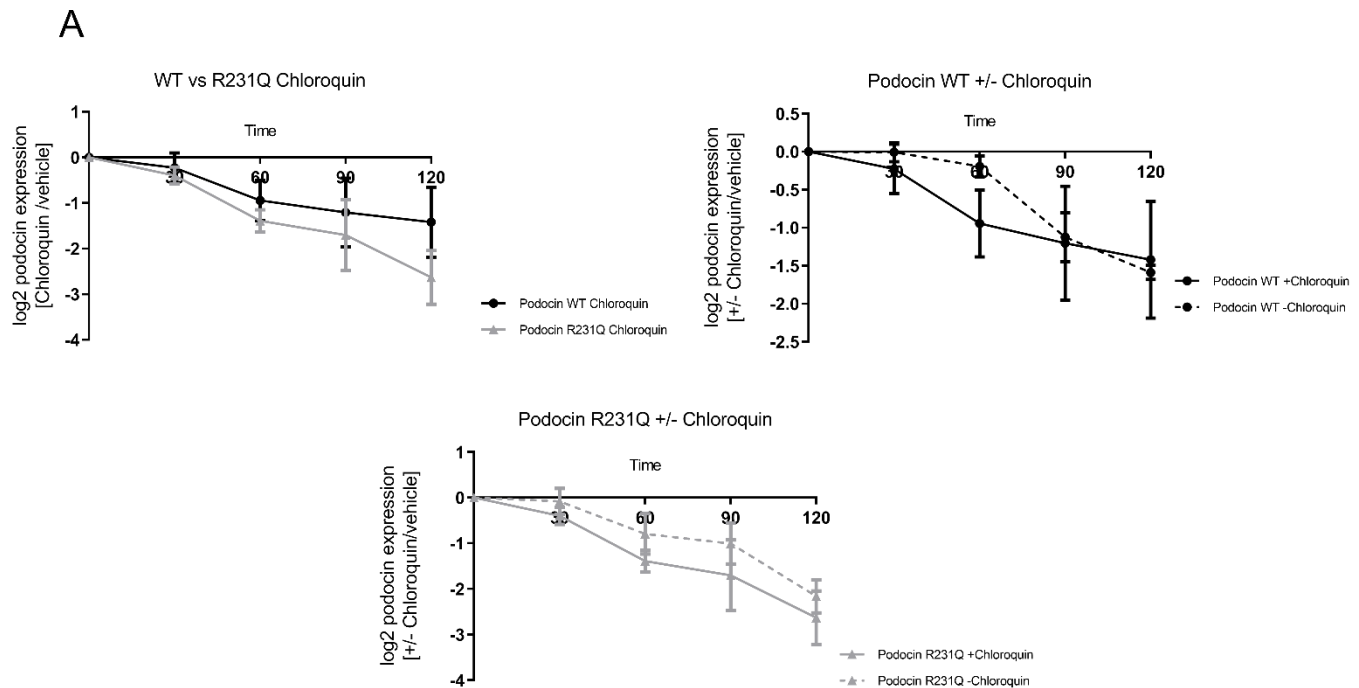


Abbildung 13: Chloroquin-Assay-Auswertung

A) Oberes linkes Diagramm: Podocin Wildtyp und Podocin p.R231Q jeweils mit Chloroquin, kein signifikanter Unterschied ($n=3$); oberes rechtes Diagramm: Podocin Wildtyp mit und ohne Chloroquin, kein signifikanter Unterschied ($n=3$); unteres Diagramm: Podocin p. R231Q mit und ohne Chloroquin, kein signifikanter Unterschied ($n=3$). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch einen Mann-Whitney-U-Test ($P > 0.05$). Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte \pm SD.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Polymorphismus p. R231Q *in vivo* und *in vitro*. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass Podocin^{R231Q/R231Q} Mäuse keine histologischen Auffälligkeiten zeigen, jedoch diese im Alter von zwei Jahren eine leichte Albuminurie aufweisen. Dies ähnelt stark dem klinischen Bild von Patienten mit diesem Polymorphismus, welche ebenfalls im hohen Alter eine Albuminurie aufweisen. Die IF- Bilder von Nierenschnitten zwei Jahre alter Podocin^{R231Q/R231Q} Mäuse zeigen im Vergleich zu Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen eine veränderte Glomerulus- Morphologie und eine verringerte Intensität von Podocin. Bestätigt werden die Ergebnisse durch eine erst kürzlich veröffentlichte Studie unseres Labors, in der mit Hilfe der STED-Mikroskopie gezeigt werden konnte, dass es bei Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen zu einer veränderten Fußfortsatzmorphologie kommt(8). In einer weiteren Studie wurde mit Hilfe der STED-Mikroskopie und mathematischen Modellen nachgewiesen, dass Veränderungen Fußfortsatzmorphologie zu strukturellen Veränderungen des glomerulären Filters führt. Aufgrund dieser Veränderungen kommt es zu einer enormen Abnahme der podozytären Rückstellkraft gegenüber dem Filtrationsdrucks mit der Folge einer vermehrten Dilatation von Kapillaren sowie einer vermehrten Albuminurie(7). Die

Beobachtungen bei Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen zeigen jedoch auch, dass pathologische Veränderungen erst im hohen Alter auftreten (oder detektierbar sind). Warum die Proteinurie bei Mäusen jedoch erst im hohen Alter auftritt, lässt sich nur mutmaßen. Möglicherweise sind Mäuse im hohen Alter anfälliger für weitere Schädigungen des Nierenfilters die letztendlich zur Proteinurie führen. Es könnte jedoch auch das Alter selbst sein, welches der Auslöser der Proteinurie ist. Um zu testen, ob das Alter selbst ein Modell für Schädigung sein kann, könnte ein Nierenschädigungsmodell genutzt werden. Hier könnte untersucht werden, ob bei Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen unterschiedlichen Alters eine erhöhte Proteinurie aufweisen und sich somit eine erhöhte Nierenschädigung nachweisen lässt. Das Podocin p.R231Q zu einer erhöhten Vulnerabilität führt konnte Butt *et. al.* in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie zeigen, indem nachgewiesen wurde, dass heterozygote Podocin^{R231Q/wildtyp} Mäuse nach Gabe eines nephrotoxischen Serums eine erhöhte glomeruläre Schädigung aufweisen als Podocin^{wildtyp/wildtyp} Mäuse(8).

Aufgrund der Beobachtungen *in vivo* stellte sich die Frage nach der Lokalisation und der Protein- Stabilität von Podocin p.R231Q im Vergleich zu Wildtyp Podocin. Es konnte in Zellkultur- Experimenten nachgewiesen werden, dass Podocin p.R231Q geringer an die Membran lokalisiert als Podocin Wildtyp. Jedoch wird das „Lipid-Raft-Targeting“ nicht beeinflusst. Weniger Podocin an der Membran bedeutet gleichzeitig weniger Stabilität der Schlitzmembran und der podozytären Fußfortsätze.

Welcher Effekt für die verringerte Membran- Lokalisation verantwortlich ist, oder ob es ein Zusammenspiel mehrerer Effekte/ Faktoren ist, bedarf weiterer Forschung. Aufgrund der geringen Intensität von Podocin p.R231Q in den IF- Bildern wurde die Menge von Podocin auf mRNA- und Protein- Ebene untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass auf Protein- Ebene signifikant weniger Podocin p.R231Q als Wildtyp Podocin vorhanden war. Aufgrund dessen wurden Experimente zu Proteininstabilität durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Podocin p.R231Q erheblich schneller vom Proteasom degradiert wird als Wildtyp Podocin. Serrano-Perez *et al.* konnten bereits zeigen, dass Podocin Varianten, welche im endoplasmatischen Retikulum verbleiben, massiv vom Proteasom degradiert werden(65). Podocin p.R231Q verbleibt jedoch nicht im ER und wird nichtsdestotrotz vorwiegend vom Proteasom abgebaut. Es scheint, als sei das Proteasom maßgeblich für den Abbau von pathogenen Podocin Varianten verantwortlich und folglich ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Podocin-abhängigen Podozytopathien. Die in dieser Arbeit benutzen humanen immortalisierten Podozyten exprimieren endogenes Podocin (61). Es lässt sich nicht sicher sagen welchen Einfluss das endogene Podocin auf die Versuche hat. Es könnte beispielsweise auf Grund des endogenen Podocins auch zu einem vermehrtem *Membrane-trafficking* von Podocin p.R231Q kommen.

Patienten die Träger des Polymorphismus sind, können v.a. in Begleitung einer pathologischen Zweitmutation oder einer nierenschädigenden Zweiterkrankung, klinische Symptome des Nephrotischen Syndroms entwickeln. Dabei kommt es aufgrund des Polymorphismus und der daraus resultierenden vermehrten proteasomalen Degradation zu Veränderungen des Aktin- Zytoskeletts. Solche Veränderungen können zum „*Foot Process Effacement*“ führen und schlussendlich zum histopathologischen Bild der FSGS. Serrano-Perez, M.-C. *et al* zeigte bereits, dass Podocin p.R138Q massiv durch das Proteasom degradiert wird(65). Patienten mit dieser Mutation in Podocin erkranken jedoch schon im Säuglings- bzw. Kleinkindsalter am NS. Über den Grund, warum Patienten mit Podocin p. R138Q deutlich früher am NS erkranken als Patienten mit Podocin p.R229Q kann nur spekuliert werden. Zum einen könnten unterschiedliche Mutationen zu unterschiedlichen Dimerisierungseigenschaften führen. Ein weiterer Grund könnten unterschiedliche Geschwindigkeiten der proteasomalen Degradation sein. Zudem könnte es bei verschiedenen Podocin-Mutationen auch zu unterschiedlichen Interaktomen kommen. Eine weitere Möglichkeit könnte ein qualitativ und quantitativ unterschiedliches *Membrane-trafficking sein*. Es bleibt jedoch die Beobachtung bestehen, dass Patienten mit dem Polymorphismus deutlich später erkranken. Aufgrund der geringen Quantität von Podocin und der Veränderten Podozyten Aktin- Zytoskelett Architektur ist davon auszugehen, dass der glomeruläre Filter anfällig ist für sogenannte "2nd- Hits". Träger des Polymorphismus, welche im fortgeschrittenen Alter z.B. an einem Diabetes Mellitus Typ II oder an einer arteriellen Hypertonie erkranken, sind anfälliger eine Nierenerkrankung, insbesondere das Bild des NS, zu entwickeln. Dazu passt die erst vor kurzem veröffentlichte Studie von Lu *et. al.* in der in humanen Podozyten gezeigt wurde, dass ein hoher Glukosespiegel zu einer- TRPC6 vermittelten- verringerten Podocin Expression führt(11). Die erhöhte Ca^{2+} Konzentration in der Zelle moduliert die Ubiquitinierung von Proteinen und fördert so die Degradation. In diesem Fall würde neben der proteasomalen Degradation von Podocin p. R229Q zudem eine erhöhte Ubiquitinierung durch die erhöhte Glukosekonzentration stattfinden. Es wäre interessant zu erforschen, ob eine solche Kombination die Podocinkonzentration signifikant schneller senken kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der vermehrten Podocin Degradation mit nachfolgender Änderung der podozytären Morphologie der glomeruläre Filter anfälliger bzw. vulnerabler ist für sekundäre Ereignisse wie zum Beispiel Diabetes Mellitus. Diese Tatsache könnte die hohe Prävalenz von Patienten mit dem Polymorphismus in FSGS-Kohorten erklären. Zur Untersuchung dieser These könnte zunächst retrospektiv die Polymorphismus/FSGS-Kohorte auf die Prävalenz von "2nd-Hits" untersucht werden. Es lässt sich zudem diskutieren, inwiefern die hohe Prävalenz des Polymorphismus Auswirkungen auf die Diagnostik haben könnte. Gerade bei Patienten mit einer die Nieren betreffenden Erkrankung wie z.B. Diabetes Mellitus könnte man erwägen eine Sequenzierung des *NPHS2*-

Gens durchzuführen, um zu eruieren, ob eine erhöhte Nierenanfälligkeit besteht. Bei Nachweis des Risikoallels könnte ein entsprechend engeres Therapieregime einleitet werden. Ein Screening bei allen Menschen durchzuführen, bedarf jedoch eines hohen logistischen Aufwands. Des Weiteren stellt sich die Frage nach der Konsequenz, sollte bei gesunden Patienten das Risikoallel nachgewiesen werden. Hier würde man zur Prävention zunächst eine gesunde Lebensweise empfehlen, um „2nd Hits“ wie z.B. Diabetes Mellitus zu verhindern bzw. hinauszuzögern. Eine gesunde Lebensweise ist jedoch generell zu empfehlen. Insgesamt lässt sich sagen, dass bei Patienten mit einer die Nieren betreffenden Erkrankung eine Sequenzierung erwogen werden kann, um bei Nachweis des Risikoallels eine engmaschigere Kontrolle und ggf. eine Therapieeskalation einzuleiten. Eine generelle Sequenzierung bei allen Menschen ist derzeit bei nicht eindeutiger Therapiekonsequenz nicht empfehlenswert.

6. Literaturverzeichnis

1. Andolino TP, Reid-Adam J. 2015. Nephrotic syndrome. *Pediatr. Rev.* 36(3):117–25; quiz 126, 129
2. Barletta G-M, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. 2003. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.* 278(21):19266–71
3. Blaine J, Dylewski J. 2020. Regulation of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. *Cells.* 9(7):1700
4. Bouchireb K, Boyer O, Gribouval O, Nevo F, Huynh-Cong E, et al. 2014. NPHS2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome: a mutation update and the associated phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 35(2):178–86
5. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, et al. 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 24(4):349–54
6. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, et al. 2001. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19:375–96

7. Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, Edwards A, Binz-Lotter J, et al. 2020. A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat. Metab.* 2(5):461–74
8. Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, Hahnfeldt R, Reilly D, et al. 2021. Super-Resolution Imaging of the Filtration Barrier Suggests a Role for Podocin R229Q in Genetic Predisposition to Glomerular Disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* ASN.2020060858
9. Chang Y-F, Imam JS, Wilkinson MF. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 76:51–74
10. Chen C, Okayama H. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7(8):2745–52
11. Chen S, He F-F, Wang H, Fang Z, Shao N, et al. 2011. Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell Calcium.* 50(6):523–29
12. Cheng C-H. 2016. Albuminuria in Childhood is a Risk Factor for Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease. *Pediatr. Neonatol.* 57(4):263–64
13. Cooper GM. 2000. Protein Degradation. *Cell Mol. Approach 2nd Ed.*
14. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. 2011. Focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 365(25):2398–2411
15. De Vriese AS, Sethi S, Nath KA, Glassock RJ, Fervenza FC. 2018. Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 29(3):759–74
16. Donaldson JG. 2015. Immunofluorescence Staining. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 69:4.3.1-7
17. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, et al. 2001. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol. Cell. Biol.* 21(14):4829–36
18. Franceschini N, North KE, Kopp JB, McKenzie L, Winkler C. 2006. NPHS2 gene, nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 8(2):63–75

19. Gang Liu. 2003. *Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability.* - PubMed - NCBI. Journal of Clinical Investigation. www.ncbi.nlm.nih.gov
20. Garg P, Verma R, Nihalani D, Johnstone DB, Holzman LB. 2007. Neph1 cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol. Cell. Biol.* 27(24):8698–8712
21. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. 2003. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 14(4):918–26
22. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, et al. 2001. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA.* 286(4):421–26
23. Goodman MB, Ernstrom GG, Chelur DS, O'Hagan R, Yao CA, Chalfie M. 2002. MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENaC channels needed for mechanosensation. *Nature.* 415(6875):1039–42
24. Goswami D, Gowrishankar K, Bilgrami S, Ghosh S, Raghupathy R, et al. 2008. Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell.* 135(6):1085–97
25. Graham FL, van der Eb AJ. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 52(2):456–67
26. Gültekin H, Heermann KH. 1988. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* 172(2):320–29
27. Hayashi M, Saito Y, Kawashima S. 1992. Calpain activation is essential for membrane fusion of erythrocytes in the presence of exogenous Ca²⁺. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182(2):939–46
28. Hildebrandt F, Heeringa SF. 2009. Specific podocin mutations determine age of onset of nephrotic syndrome all the way into adult life. *Kidney Int.* 75(7):669–71

29. Huang M, Gu G, Ferguson EL, Chalfie M. 1995. A stomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. *Nature*. 378(6554):292–95
30. Huber TB, Schermer B, Müller RU, Höhne M, Bartram M, et al. 2006. Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(46):17079–86
31. Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, et al. 2003. Molecular basis of the functional podocin–nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum. Mol. Genet.* 12(24):3397–3405
32. Ilse M Rood. 2019. *Nephrotic Syndrome With Mutations in NPHS2: The Role of R229Q and Implications for Genetic Counseling*. - PubMed - NCBI. American Journal of Kidney Diseases. www.ncbi.nlm.nih.gov
33. Katzen F. 2007. Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin. Drug Discov.* 2(4):571–89
34. Kerti A, Csohány R, Wagner L, Jávorszky E, Maka E, Tory K. 2013. NPHS2 homozygous p.R229Q variant: potential modifier instead of causal effect in focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 28(10):2061–64
35. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, et al. 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell.* 1(4):575–82
36. Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt L-G, Skoglund U, Obrink B, et al. 2003. Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am. J. Pathol.* 163(6):2337–46
37. Korbet SM. 2012. Treatment of primary FSGS in adults. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 23(11):1769–76
38. Köttgen A, Hsu CC, Coresh J, Shuldiner AR, Berthier-Schaad Y, et al. 2008. The association of podocin R229Q polymorphism with increased albuminuria or reduced estimated GFR in a large population-based sample of US adults. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 52(5):868–75

39. Kriz W, Lemley KV. 2015. A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 26(2):258–69
40. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680–85
41. Lequin RM. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 51(12):2415–18
42. Li H, Lemay S, Aoudjit L, Kawachi H, Takano T. 2004. SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 15(12):3006–15
43. Lingwood D, Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327(5961):46–50
44. Loyter A, Scangos GA, Ruddle FH. 1982. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79(2):422–26
45. Machuca E, Hummel A, Nevo F, Dantal J, Martinez F, et al. 2009. Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int.* 75(7):727–35
46. McDonnell MW, Simon MN, Studier FW. 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110(1):119–46
47. Mekahli D, Liutkus A, Ranchin B, Yu A, Bessenay L, et al. 2009. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 24(8):1525–32
48. Möller CC, Flesche J, Reiser J. 2009. Sensitizing the Slit Diaphragm with TRPC6 ion channels. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 20(5):950–53
49. N. Tavernarakis. 1999. *The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins.* Trends in Biochemical Sciences

50. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, et al. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 272(5259):263–67
51. O'Hagan R, Chalfie M, Goodman MB. 2005. The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat. Neurosci.* 8(1):43–50
52. Pape, H-C. & Kurtz, A. & Silbernagl, S. et al. 2014. *Physiologie*. Stuttgart: Thieme. 7th ed.
53. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol. Rev.* 83(1):253–307
54. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, et al. 2004. NPHS2 R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int.* 65(3):1026–30
55. Philippe A, Weber S, Esquivel EL, Houbron C, Hamard G, et al. 2008. A missense mutation in podocin leads to early and severe renal disease in mice. *Kidney Int.* 73(9):1038–47
56. Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. 2001. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* 10(1):1–8
57. Quaggin, SE & Kreidberg, JA. 2008. *Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences*. Development
58. Rinschen MM, Bharill P, Wu X, Kohli P, Reinert MJ, et al. 2016. The ubiquitin ligase Ubr4 controls stability of podocin/MEC-2 supercomplexes. *Hum. Mol. Genet.* 25(7):1328–44
59. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, et al. 2002. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am. J. Pathol.* 160(1):131–39
60. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, et al. 1999. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(14):7962–67

61. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, et al. 2002. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 13(3):630–38
62. Samuel Mon-Wei Yu. 2018. *Proteinuric Kidney Diseases: A Podocyte's Slit Diaphragm and Cytoskeleton Approach.* - PubMed - NCBI. Frontiers. www.ncbi.nlm.nih.gov
63. Schermer B, Benzing T. 2009. Lipid-protein interactions along the slit diaphragm of podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 20(3):473–78
64. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, et al. 2001. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* 108(11):1621–29
65. Serrano-Perez M-C, Tilley FC, Nevo F, Arrondel C, Sbissa S, et al. 2018. Endoplasmic reticulum-retained podocin mutants are massively degraded by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 293(11):4122–33
66. Simons K, Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1(1):31–39
67. Sohn HW, Tolar P, Pierce SK. 2008. Membrane heterogeneities in the formation of B cell receptor-Lyn kinase microclusters and the immune synapse. *J. Cell Biol.* 182(2):367–79
68. Srivastava T, Dai H, Heruth DP, Alon US, Garola RE, et al. 2018. Mechanotransduction signaling in podocytes from fluid flow shear stress. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 314(1):F22–34
69. Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, Cohn ZA. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* 96(1):1–27
70. Tabatabaeifar M, Wlodkowski T, Simic I, Denc H, Mollet G, et al. 2017. An inducible mouse model of podocin-mutation-related nephrotic syndrome. *PLoS One.* 12(10):e0186574
71. Taylor JM, Illmensee R, Summers J. 1976. Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. *Biochim. Biophys. Acta.* 442(3):324–30

72. Temin HM, Mizutani S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 226(5252):1211–13
73. Tory K, Menyhárd DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, et al. 2014. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 46(3):299–304
74. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76(9):4350–54
75. Trautmann A, Bodria M, Ozaltin F, Gheisari A, Melk A, et al. 2015. Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN.* 10(4):592–600
76. Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT. 1987. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*. 237(4813):415–17
77. Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB. 2006. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J. Clin. Invest.* 116(5):1346–59
78. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, et al. 2005. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*. 308(5729):1801–4

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.: Schema des glomerulären Filters.....	8
Abbildung 2.: Schematische Darstellung vom Aufbau und den Signalwegen der Schlitzmembran	10
Abbildung 3.: Foot Process Effacement in knock-in NPHS2 R140Q/-Mäusen	13
Abbildung 4: Phänotypisierung von homozygoten Mäusen vs. Wildtyp Mäusen	39
Abbildung 5: Immunfluoreszenz von Mausnierenschnitten	40
Abbildung 6: Podocin und Nephrin Intensität im Vergleich bei Podocin ^{wildtyp/wildtyp} Mäusen und Podocin ^{R231Q/R231Q} Mäusen	41

Abbildung 7: Immunfluoreszenz von humanen immortalisierten Podozyten mit Membran-Targeting.....	43
Abbildung 8: Lipid-Raft-Präparation.....	44
Abbildung 9: Podocin RNA- und Protein Level	46
Abbildung 10: Cycloheximid-Assay.....	47
Abbildung 11: MG-132 Assay	49
Abbildung 12: Chloroquin-Assay	50
Abbildung 13: Chloroquin-Assay-Auswertung.....	51

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Materialien, Geräte und Zentrifugen	15
Tabelle 2: Softwares.....	16
Tabelle 3: Reaktionsansatz Restriktionsverdau	16
Tabelle 4: Materialien Restriktionsverdau	16
Tabelle 5: Materialien Agarose-Gelelektrophorese	17
Tabelle 6: Reaktionsansatz Ligation	17
Tabelle 7: Materialien Ligation.....	18
Tabelle 8: Materialien Transformation	18
Tabelle 9: Materialien Mini-Präparation	19
Tabelle 10: Reaktionsansatz Sequenzierung.....	19
Tabelle 11: Sequenzierungs-Primer	19
Tabelle 12: Materialien Midi-Präparation	20
Tabelle 13: Reaktionsansatz Rekombination.....	21
Tabelle 14: Materialien Rekombination.....	21
Tabelle 15: Plasmide	21
Tabelle 16: Materialien Zellkultur	22
Tabelle 17: Materialien Calcium- Phosphat- Transfektion.....	23
Tabelle 18: Materialien Zellkultur	24
Tabelle 19: Materialien Lentivirale Transduktion.....	24
Tabelle 20: Materialien Ernten und Lysieren von Zellen	25
Tabelle 21: Materialien SDS-PAGE und Western-Blot.....	28
Tabelle 22: Primärantikörper Western-Blot	28
Tabelle 23: Sekundärantikörper Western-Blot	29
Tabelle 24: Absteigende Ethanolreihe	29
Tabelle 25: Materialien Immunfluoreszenz.	30
Tabelle 26: Primärantikörper Immunfluoreszenz.....	31
Tabelle 27: Sekundärantikörper Immunfluoreszenz	31

Tabelle 28: Reaktionsansatz Reverse Transkription	31
Tabelle 29: Cyclor-Konditionen Reverse Transkription	32
Tabelle 30: Reaktionsansatz qPCR	32
Tabelle 31: Materialien qPCR.....	32
Tabelle 32: Primer qPCR.....	33
Tabelle 33: Materialien Proteinstabilitätsassays	33
Tabelle 34: Materialien Lipid-Raft-Präparation.....	35
Tabelle 35: Plasmide Lipid-Raft-Präparation	35
Tabelle 36: Materialien Histologie.....	36
Tabelle 37: Aufsteigende Ethanolreihe	36
Tabelle 38: Materialien Albumin-Elisa und Kreatinin-Kalorimetrie-Assay	37

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Ergebnisse in dieser Arbeit wurden vorabveröffentlicht. Butt et. al. publizierten im Dezember 2021 eine Studie zum Polymorphismus Podocin p.R229Q(8). Im Rahmen dieser Publikation wurden die Ergebnisse der ACR-Ratio von Podocin^{Wildtyp/Wildtyp} Mäusen und Podocin^{R231Q/R231Q} Mäusen (s. Abbildung 4C), die STED-Bilder zur Intensität von Podocin und Nephrin (s. Abbildung 6), die Zellkulturergebnisse des CHX-Assays (s. Abbildung 10 A&B) und die des MG-132-Assays (s. Abbildung 11 A&B) mitveröffentlicht.