

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

Mechanoprotektion durch BAG3-vermittelte Regulation des Zytoskeletts in humanen Podozyten

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

vorgelegt von
Jan Christoph Degenhardt
aus Düsseldorf

promoviert am 03. Dezember 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin PhD C. M. Niessen

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 Professor Dr. med. Bernhard Schermer
Herr Dr. med. Ingo Plagmann

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 Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. Ingo Plagmann von mir selbst ausgeführt worden.

Die Probenvorbereitung für massenspektrometrische Untersuchungen wurde nach entsprechender Anleitung von Frau Ruth Herzog durch mich selbst durchgeführt.

Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten erfolgte gemeinsam mit Dr. Ingo Plagmann.

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 12.01.2025

Unterschrift:

Danksagung

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich allen Personen ausdrücken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht entstanden. Ich möchte Univ.-Prof. Dr. Thomas Benzing für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit im nephrolab zu beginnen und meine klinische Tätigkeit unmittelbar im Anschluss aufzunehmen. Für den reibungslosen Wechsel vom Labor in die Klinik 2 für Innere Medizin möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Volker Burst bedanken.

Viel Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Schermer, der mir den Einstieg in meine Doktorarbeit im nephrolab leicht machte und bei experimentellen Schwierigkeiten oder zur Diskussion von Ergebnissen stets ansprechbar war. Von der ersten Minute im Nephrolab hat mich Dr. Ingo Plagmanns unermüdlicher Tatendrang beim Ersinnen und Realisieren von Experimenten mitgerissen. Sein vor Ideen sprudelnder Geist hat die Arbeit geprägt. Er hat mich in alle seine methodischen oder konzeptuellen Überlegungen einbezogen und ermöglichte mir Fähigkeiten und Verständnis im *genome editing* sowie Massenspektrometrie bzw. Proteomics. aufzubauen.

Besonderer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Lena Ebert, die mich mit ihrer Erfahrung und klugen Überlegungen vor einigen Fallstricken bewahrte. Bedanken möchte ich mich auch bei Ruth Herzog, die als Schreibtischnachbarin für eine ruhige und konzentrierte Atmosphäre sorgte und außerdem bei der Vorbereitung der MS-Proben mit Rat und Tat zur Stelle war. Ebenso möchte ich Stefanie Keller, Martyna Brütting und Serena Greco-Torres meinen Dank für ihre Geduld und technische Unterstützung aussprechen.

Bei Alina Braun, Janna Bredow, Karim Heinlein und Robert Hahnfeldt möchte ich mich für die exzellente kollegiale Atmosphäre unter Doktoranden bedanken.

Ich bedanke mich schließlich bei meiner Familie, besonders meinen Eltern dafür, dass sie mir mein Studium ermöglichten und mich beim Erreichen meiner Ziele unterstützten. Meine Frau Anna hat außerdem viel wertvolle Zeit gegeben, um mir die Fertigstellung des Manuskriptes zu ermöglichen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1 Die steigende Inzidenz chronischer Nierenkrankheiten und glomeruläre Erkrankungen	11
2.2 Der glomeruläre Filter	11
2.2.1. Fußfortsatzverbreiterung und Podozytenverlust	13
2.2.2. Schädigung von Glomerulus und Podozyten	14
2.2.3. Therapeutische Ansätze bei glomerulären Erkrankungen	14
2.2.4. Die Schlitzmembran und ihre Komponenten	15
2.2.5. Glomeruläre Erkrankungen und Kompensationsmechanismen	16
2.3 Proteostase	17
2.3.1. Autophagie und die Rolle von Chaperonen	17
2.3.2. Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA)	18
2.4 BAG3 (Bcl-2-associated athanogene 3)	19
2.4.1. Struktur	19
2.4.2. Expression und Funktion von BAG3	20
2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Material	23
3.1.1. Geräte	23
3.1.2. Verbrauchsmaterial	24
3.1.3. Zelllinien	25
3.1.4. Bakterien	26
3.1.5. Antikörper	26
3.1.6. Enzyme	27
3.1.7. Wachstumsmedien und -zusätze	27
3.1.8. Oligonukleotide	27
3.1.9. Plasmide	28
3.1.10. Kits und Reagenzien	28
3.1.11. Chemikalien	29

3.1.12.	Puffer und Lösungen	31
3.1.13.	Software und webbasierte Werkzeuge	34
3.2	Methoden	34
3.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion	34
3.2.2.	Agarosegelelektrophorese	35
3.2.3.	Restriktionsverdau	36
3.2.4.	Ligation	36
3.2.5.	Transformation	36
3.2.6.	Sequenzierung	37
3.2.7.	Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation	37
3.2.8.	Transfektion mittels GeneJuice®	38
3.2.9.	Verwendete Zelllinien	38
3.2.10.	Arbeit in der Zellkultur	39
3.2.11.	Applikation von mechanischem Stress <i>in vitro</i>	39
3.2.12.	Ernten der Zellen	39
3.2.13.	Auswahl der gRNA für CRISPR/Cas9	40
3.2.14.	Klonierung der Plasmide für CRISPR/Cas9	40
3.2.15.	Fluorescence activated cell sorting (FACS) und Screening der Zellklone	41
3.2.16.	Co-Immunpräzipitation	42
3.2.17.	SDS-PAGE Western Blot (Immunoblot)	42
3.2.18.	Western Blot / Immunoblot	43
3.2.19.	Immunfluoreszenz-Färbung	43
3.2.20.	Massenspektrometrie	43
3.2.21.	Probenvorbereitung für LC-MS/MS	43
3.2.22.	Statistik	44
4.	ERGEBNISSE	46
4.1	Generierung von BAG3-defizienten Podozyten mittels CRISPR/Cas9	46
4.1.1.	Auswahl der CRISPR-Zielsequenz	46
4.1.2.	Validation der CRISPR-Zelllinien: Sequencing	47
4.1.3.	Validation mittels Western Blot	49
4.1.4.	Validation mittels Immunfluoreszenzfärbung	49
4.2	Umsetzung eines Modells für mechanischen Stress <i>in vitro</i>	52
4.2.1.	Zyklischer mechanischer Stress reguliert SQSTM1, BAG3 und pERK1/2	53
4.2.2.	Podozyten exprimieren vermehrt BAG3 sowie ARPC5 unter mechanischem Stress	54
4.2.3.	Zyklischer mechanischer Stress induziert PPP1R14B in BAG3 ^{-/-} -Podozyten	56
4.2.4.	Die Anwesenheit von BAG3 reguliert die RhoA-Expression	56

5.	DISKUSSION	59
5.1	Generation einer BAG3-defizienten humanen Podozytenlinie – alternative Strategien	60
5.2	Validierung des funktionellen BAG3- <i>knockout</i> : Western Blot und Immunopräzipitation mit den BAG3-Antikörpern	60
5.3	Immunfluoreszenz auf BAG3 ^{-/-} -Podozyten	61
5.4	Die Funktion von BAG3 im Podozyten ist nicht auf CASA beschränkt	62
5.5	CHIP ist nicht Teil des BAG3-Interaktoms in humanen Podozyten	62
5.6	Untersuchung von humanen Podozyten unter equibiaxialem mechanischem Stress	63
5.7	Mechanischer Stress beeinflusst die Regulation des Aktinzytoskeletts in humanen Podozyten	64
5.8	Stressapplikation im Podozytenmodell	65
5.9	Einordnung der Ergebnisse anhand klinischer BAG3-Pathologien	66
6.	LITERATURVERZEICHNIS	67
7.	ANHANG	76
7.1	Abbildungsverzeichnis	76
7.2	Tabellenverzeichnis	77
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	78
8.1	Kongressbeiträge	78

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
>/<	größer/kleiner
°C	Grad Celsius
A.	Arteria
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	Actin-related protein 2/3 complex
ARPC2/5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2/5
BAG3	Bcl2-associated athanogene 3
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cas9	Caspase 9
CASA	chaperone assisted selective autophagy
CD2AP	Cluster of differentiation 2 associated protein
CHIP	C-terminus of HSP70 interacting protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DMEM	Dulbecco 's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales bovines Serum
FDR	False detection rate
fs	frameshift
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
Fyn	Tyrosinkinase Fyn
GBM	glomeruläre Basalmembran
GO	Gene ontology
gRNA	Guide-RNA
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEK293T	human embryonic kidney cells

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSF	Heat shock factor
Hsp70/HSC70	Heat shock protein 70
IB	Immunoblot
iBAQ	intensitätsbasierte absolute Quantität
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	lysogeny broth
LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LC-MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
LFQ	Label free quantitation
mA	Milliampere
MCD	Minimal-change disease
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MgSO₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Myosin light chain
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase protein
NDS	Normal Donkey Serum
NEF	Nucleotide exchange factor
NHEJ	Non-homologous end joining
PCA	HKA, Hauptkomponentenanalyse
pERK1/2	phospho-extracellular-signal regulated kinases 1/2
PFA	Paraformaldehyd
PI3/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PPP1R14B	Proteinphosphatase-1 regulatory inhibitor subunit 14N
PRM	Parallel reaction monitoring
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RhoA	Ras homolog family member A
ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

s.u.	siehe unten
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SP3	single-pot solid phase enhanced sample preparation
SQSTM1	Sequestosome-1
Src	Src family kinase
STED	stimulated emission depletion
SYNPO	Synaptopodin
SYNPO2	Synaptopodin 2
TAE Puffer	Tris-acetate-EDTA Puffer
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
TRPC6	Transient receptor potential cation channel subfamily C member 6
u.a.	unter Anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
V	Volt
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula-occludens-1

1. Zusammenfassung

Glomeruläre Erkrankungen sind die häufigste Ursache für einen chronisch progredienten Nierenfunktionsverlust. Glomeruläre Schädigungen betreffen den Nierenfilter und gehen mit einer Proteinurie einher, die einen prognostischen Faktor für den weiteren Nierenfunktionsverlust darstellt. Unter physiologischen Bedingungen ist der glomeruläre Filter impermeabel für Proteine. Er besteht aus dem glomerulären Endothel, einer Basalmembran und aus Podozyten, postmitotischen hochdifferenzierten Epithelzellen. Podozyten bilden zwischen miteinander verschränkten Fußfortsätzen die Schlitzmembran aus, einen spezialisierten Zell-Zell-Kontakt, der essenziell für die Struktur und Funktion des Filters ist. Aufgelagert auf die glomeruläre Basalmembran sind sie pulsatilem mechanischem Stress ausgesetzt. Hier könnten die Proteine BAG3 und die Chaperone des Casa Komplexes, die protektive Effekte gegen mechanischen und proteotoxischen Stress vermitteln, und die in Podozyten gegenüber anderen glomerulären Zellen verstärkt exprimiert sind, eine wichtige Rolle spielen.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit mithilfe von LC-MS/MS basierter Proteomik und unter Verwendung einer CRISPR/Cas9-generierten BAG3-defizienten Podozytenlinie Podozyten in einem *in vitro* Modell zyklischem mechanischem Stress ausgesetzt, um BAG3-vermittelte mechanoprotektive Effekte in humanen Podozyten zu untersuchen. Aus BAG3-profizienten Podozyten wurde der Bag3 Komplex präzipitiert und es reichert sich Proteine an, die mit dem Aktinzytoskelett sowie Transkription und Translation assoziiert sind. Signifikante mögliche Interaktoren nach Co-IP mit zwei verschiedenen BAG3-Antikörpern waren die regulatorischen Untereinheiten von PP-1 (*protein phosphatase 1*). Dieser Proteinkomplex moduliert die Kontraktilität von Aktinfasern. Mechanischer Stress führte zur Anreicherung inhibitorischer Untereinheiten von PP-1. In Anwesenheit von BAG3 führte mechanischer Stress zur vermehrten Expression von Arp2/3, einem Proteinkomplex, der eine Schlüsselrolle bei der Polymerisation von Aktin spielt. BAG3-defiziente Podozyten zeigten hingegen eine erhöhte Expression von RhoA, welches ebenfalls die Kontraktilität des Aktinzytoskeletts moduliert und mit der Bildung von Stress Fasern assoziiert ist. Kanonische Komponenten des CASA-Komplexes, HSP70 und HSPB8, konnten zwar nachgewiesen werden, wurden jedoch nicht durch mechanischen Stress verändert.

Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle von BAG3 in der Mechanoprotektion in Podozyten, speziell bei der Regulation Zytoskelett-assoziiierter Prozesse unter mechanischem Stress. Vor dem Hintergrund des Verlusts von Schlitzmembran und Fußfortsätzen in geschädigten Podozyten könnten der BAG3 Komplex und Regulatoren des Aktinzytoskeletts mögliche therapeutische Ziele bieten. Weitere Forschungsvorhaben sollten die Bedeutung Bag3-abhängiger Mechanismen *in vivo* untersuchen.

2. Einleitung

2.1 Die steigende Inzidenz chronischer Nierenkrankheiten und glomeruläre Erkrankungen

Die Inzidenz chronischer Nierenkrankheit (*chronic kidney disease*, CKD) nimmt weltweit zu: in den USA leiden 14 % der Bevölkerung an CKD, weltweit wird die Prävalenz auf ca. 10% geschätzt¹. CKD trägt damit zunehmend zu Morbidität und Mortalität bei^{2,3}. Steigende Lebenserwartung sowie hohe Prävalenz von arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus in den Industriegesellschaften, aber zunehmend auch in Entwicklungs- und Schwellenländern tragen maßgeblich zu dieser epidemiologischen Entwicklung bei⁴. Da Menschen über 65 Jahre die am schnellsten wachsende demografische Gruppe darstellen, rückt die Erforschung der genauen Mechanismen der Entstehung von CKD zunehmend in den Fokus^{5,6}. Diese chronisch progrediente Nierenfunktionseinschränkung bleibt zu Beginn meist unbemerkt. So zeigt sich in der Normalbevölkerung schon ab dem 40. Lebensjahr eine Funktionsabnahme um ca. 1% pro Jahr. Die bestmögliche Kontrolle modifizierbarer Risikofaktoren, insbesondere einer arteriellen Hypertonie oder eines Diabetes mellitus, ist daher für die Verlangsamung des Nierenfunktionsverlustes wichtig^{7,8}.

In den USA entstehen 70% der dialysepflichtigen Nierenerkrankungen als Folgen von Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie⁹. Die diabetische und die hypertensive Nephropathie betreffen vorwiegend die Glomeruli, die glomerulären Schäden führen zur Eiweißausscheidung im Urin (Proteinurie)¹⁰. Der Nachweis von Proteinurie oder Albuminurie, auch in geringen Mengen, geht dem Nierenfunktionsverlust voraus¹¹. Daher gilt die Proteinurie als unabhängiger Risikofaktor für die Progression einer chronischen Nierenkrankheit.^{12,13} Das Progressionsrisiko steigt mit der Proteinurie, beispielsweise zeigt sich im Frühstadium einer diabetischen Nephropathie eine Mikroalbuminurie (30 – 300 mg Albumin/24 h). Mit Fortschreiten der diabetischen Nephropathie kann es bis zum nephrotischen Syndrom (>3,5 g Albumin/24 h) kommen¹⁰.

2.2 Der glomeruläre Filter

Die Nierenfunktion wird durch Nephrone genannte Untereinheiten abgebildet, die aus dem Glomerulus sowie einem angeschlossenen Tubulussystem bestehen. Unter physiologischen Bedingungen ist der glomeruläre Filter zur Filtration von 180 l Blut pro Tag unter nahezu kompletter Retention von Albumin und anderen großen Proteinen in der Lage. Gleichzeitig sind Elektrolyte und kleine Moleküle wie Harnstoff frei filtrierbar¹⁴. Eine Schädigung der

Glomeruli führt häufig zur Durchlässigkeit des Filters für Proteine. Der Übertritt von Eiweiß in den Urin führt zu einer Proteinurie¹⁵.

Die Filtrationsbarriere zwischen Blut und eiweißfreiem Primärharn setzt sich aus drei Komponenten zusammen (Abb. 1A): den fenestrierten Endothelzellen, die die glomerulären Kapillaren auskleiden, der glomerulären Basalmembran (GBM) sowie den Podozyten, die auf der Harnseite des glomerulären Filters sitzen und die Kapillaren mit ihren Fortsätzen bedecken¹⁶. Allen Komponenten des glomerulären Filters wird eine Beteiligung an der glomerulären Barriere zugeschrieben¹⁷: So sind die fenestrierten Endothelien mit negativ geladener Glykokalyx besetzt, die zur Ladungselektivität des Filters führt¹⁸. Andererseits führen Abnormalitäten der glomerulären Basalmembran, wie zum Beispiel beim Alport-Syndrom, zu Proteinurie und Nierenfunktionsverlust¹⁹.

Für glomeruläre Schädigungen, die mit einer Proteinurie und schließlich Nierenfunktionsverlust einhergehen, spielen außerdem Podozyten^{20,21} eine herausragende Rolle. Podozyten verfügen über primäre und sekundäre namensgebende Fußfortsätze, die sich mit denen benachbarter Zellen interdigitierend verschränken. Zwischen den Fußfortsätzen bilden sie untereinander einen einzigartigen Zell-Zellkontakt - die Schlitzmembran - aus²². Die meisten Mutationen, die zu erblichen Erkrankungen mit einer massiven Proteinurie führen, betreffen Gene, die exprimiert in Podozyten für Bestandteile des Schlitzmembrankomplexes kodieren.

Die Modellvorstellung über die Entstehung einer Proteinurie wurde in der Vergangenheit mehrfach revidiert. Nachdem initial die GBM als zentraler Bestandteil angesehen wurde, konnten mikroskopische Studien einen podozytären Phänotyp zeigen, der mit einer Proteinurie einhergeht²³. Ein aktuelles Modell des glomerulären Filters geht von einer Kompression der GBM zwischen Endothel und Podozyten aus (Abb. 1A). Zwischen dem Endothel der glomerulären Kapillaren und den viszeral anliegenden Podozyten bildet die glomeruläre Basalmembran eine Gel-Matrix-Struktur aus. Bei Verlust der Podozyten kann diese Matrix expandieren und permeabel für Proteine werden (Abb. 1B)²⁴.

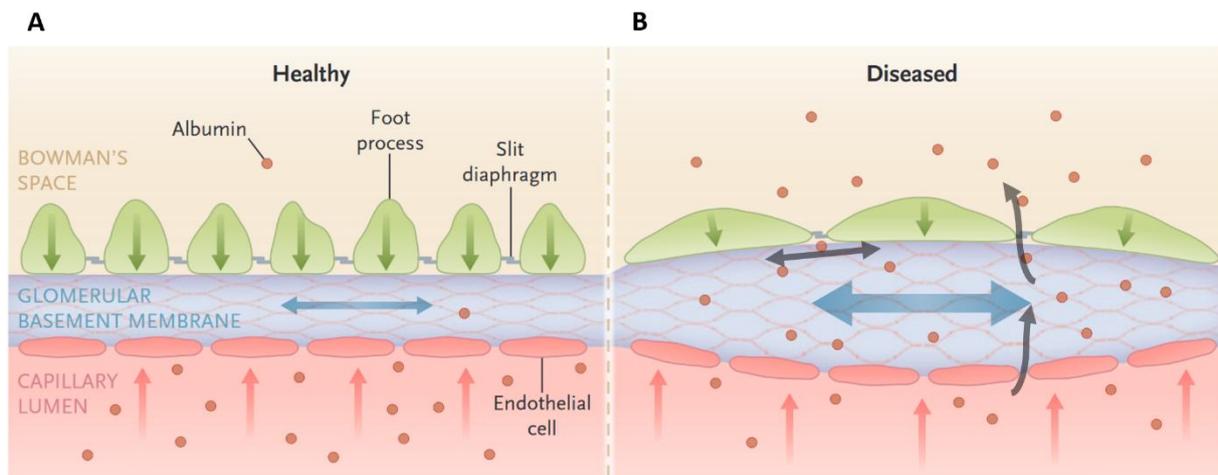


Abbildung 1: Der glomeruläre Filter. Im physiologischen Zustand **(A)** ist der dreischichtige Filter undurchlässig für Albumin. Wie eine Gelmatrix wird die glomeruläre Basalmembran zwischen Podozyten (**grün**) und Kapillarendothel (**rot**) komprimiert (**grüne und rote Pfeile**). Bei Schädigung des glomerulären Filters **(B)** expandiert die glomeruläre Basalmembran, die Podozyten verändern ihre Struktur. In diesem Zustand ist der glomeruläre Filter durchlässig für Albumin. Die Podozyten sind auf der Urinseite des glomerulären Filters tensilem Stress (**doppelseitiger Pfeil**) und Scherkräften durch vorbeiströmende Flüssigkeit ausgesetzt (**einseitige Pfeile**). Verwendet mit Erlaubnis von²⁵, © Massachusetts Medical Society

2.2.1. Fußfortsatzverbreiterung und Podozytenverlust

Schädigungen der Podozyten, die mit einer Proteinurie einhergehen, zeigen ultrastrukturell pathognomonische Alterationen in der Podozytenarchitektur und der Schlitzmembran²⁶. Eine Schädigung der Fußfortsätze ist dabei in der konventionellen Lichtmikroskopie auflösungsbedingt nicht direkt sichtbar. Die Visualisierung der Schlitzmembran gelingt ausschließlich in der Elektronenmikroskopie. Techniken wie STED (*stimulated emission depletion*)-Mikroskopie²⁴ oder andere hochauflösenden Verfahren können jedoch einen Verlust der Sekundärfortsätze sowie eine Verplumpung der Primärfortsätze darstellen (*podocyte effacement*). Hierbei ist die Veränderung der Struktur der Fußfortsätze schon vor dem Einsetzen der Proteinurie zu beobachten²². Podozyten sind hochdifferenzierte postmitotische Epithelzellen, die kaum über Regenerationsfähigkeit verfügen¹³. Bei einer Schädigung und dem Verlust von Podozyten kommt es zunächst zu einer Hypertrophie überlebender Zellen²⁷. Diese Kompensationsleistung ist jedoch limitiert. Wird eine Schwelle überschritten, kommt es zur Sklerosierung mit einem irreversiblen progredienten Verlust der Podozyten²⁸.

2.2.2. Schädigung von Glomerulus und Podozyten

Die Pathomechanismen, die zu einer glomerulären Schädigung führen sind vielgestaltig. Neben - oft altersassoziierten - Erkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas können auch akute Glomerulonephritiden, Infektionen oder Autoimmunerkrankungen eine glomeruläre Schädigung bedingen, die zu einer Proteinurie führt. Zur Abschätzung der Prognose und Steuerung der Therapie kann die histopathologische Untersuchung beitragen. In einigen Fällen kann so eine behandelbare Grunderkrankung nachgewiesen werden²⁹. Einige Krankheitsentitäten zeigen histopathologische Veränderungen, die auf den Glomerulus beschränkt sind. Diese Nierenkrankheiten werden wesentlich nach einem Verletzungsmuster (*pattern of injury*) von Glomeruli oder Podozyten diagnostiziert: Eine *minimal change disease* (MCD) ist zunächst nur elektronenmikroskopisch anhand der verbreiterten Fußfortsätze festzustellen³⁰. Bei der fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) kommt es durch vereinzelte Ablösung der Podozyten zur Vernarbung von Abschnitten der Glomeruli³¹, die auch lichtmikroskopisch darstellbar ist. Beide Erkrankungen gehen mit einer ausgeprägten, häufig nephrotischen Proteinurie einher. Bei Voranschreiten glomerulärer Erkrankungen kommt es schlussendlich zu einer kompletten Sklerosierung der Glomeruli. Die glomeruläre Globalsklerose stellt einen irreversiblen Funktionsverlust dar³². Während die MCD eine gute Prognose hat, kommt es bei der FSGS häufig zu Rezidiven oder therapieresistenten Verläufen mit zunehmendem Nierenfunktionsverlust. Für beide Entitäten ist die Reduktion der Proteinurie ein entscheidender Prognosefaktor³³.

2.2.3. Therapeutische Ansätze bei glomerulären Erkrankungen

Sowohl bei primären glomerulären Erkrankungen als auch sekundär vermittelten Schäden, wie durch arteriellen Hypertonus oder Diabetes mellitus steht die Verminderung der glomerulären Hypertension und Hyperfiltration therapeutisch im Vordergrund. Herkömmlich werden Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten oder ACE-Inhibitoren zur Relaxation des *vas efferens* und damit Senkung des glomerulären Drucks verwendet^{34,35}. Neuerdings werden auch SGLT2-Inhibitoren zur Nephroprotektion verwendet, selbst bei Patienten, die nicht an einem Diabetes mellitus erkrankt sind³⁶. Auch hier wird eine Senkung des glomerulären Drucks erzielt. Die Inhibition von SGLT2 führt über verstärkte Natriuresis und nachfolgende Inhibition des tubuloglomerulären Feedback zur Vasokonstriktion des *vas afferens*³⁷. Nicht unerwähnt bleiben sollen die extrarenalen pleiotropen Effekte dieser Substanzklasse, die unzureichend verstanden sind. Die Optimierung der glomerulären Hämodynamik bietet jedoch eine plausible Erklärung für die antiproteinurischen Effekte dieser Medikation³⁸.

Bei den Krankheitsbildern der MCD und FSGS führen auch immunsuppressive Therapieansätze mit Glukokortikoiden, Calcineurininhibitoren, Proliferationshemmern und monoklonalen CD20-Antikörpern zu einer Reduktion der Proteinurie^{39,40}. Es sind also nicht allein hämodynamische Effekte für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere an der Schlitzmembran verantwortlich. Vielmehr können auch inflammatorische Prozesse zur Disruption des glomerulären Filters führen⁴¹.

Zur Behandlung von MCD und FSGS stellt die Erstlinie meistens eine hochdosierte Glukokortikoid-Therapie dar⁴². Bei Steroid-resistentem nephrotischen Syndrom (SRNS) im Rahmen einer MCD kommen schließlich Calcineurininhibitoren oder CD20-Antikörper zum Einsatz⁴³. Schließlich sind auch extrakorporale Verfahren wie Plasmaseparation oder Immunadsorption therapeutische Optionen⁴⁴. Der therapeutische Einsatz von B-Zellgerichteten Therapien bzw. Depletion von Immunglobulin G ging dabei dem Nachweis der therapeutischen Zielstruktur voraus. Mehrere Hypothesen, welche zirkulierenden Faktoren für die Entstehung des rekurrenten nephrotischen Syndroms verantwortlich sind, wurden aufgestellt und teils verworfen^{45,46}. Schließlich gelang der Nachweis von Antikörpern gegen Nephrin, einem Bestandteil der Schlitzmembran in Patienten mit MCD und FSGS^{47,48}.

2.2.4. Die Schlitzmembran und ihre Komponenten

Die Schlitzmembran ist eine elektronendichte Struktur, die die Distanz von 40 nm zwischen benachbarten Fußfortsätzen überbrückt und neben der zentralen Rolle bei der Bildung der glomerulären Filtrationsbarriere auch an zahlreichen Signalwegen und deren Regulation beteiligt⁴⁹.

An der Bildung dieses Zell-Zell Kontakts ist Nephrin, bestehend aus einem zytoplasmatischen C-Terminus, einer Transmembrandomäne und einer größeren extrazellulären Domäne mit acht IgG-artigen Motiven, beteiligt. Nephrin ist an der Schlitzmembran Teil eines Proteinkomplexes, der mit *lipid rafts* bzw. *detergent resistant membranes* assoziiert ist. Intrazellulär kann Nephrin abhängig von der Phosphorylierung von einzelnen Aminosäureresten durch Kinasen der Src-Familie wie Fyn weitere Adapterproteine rekrutieren. Zum Beispiel nimmt Nephrin über Nck1/2 an Signalwegen wie PI3/AKT oder WASp teil⁵⁰⁻⁵².

Ein weiterer Bestandteil des Schlitzmembrankomplexes ist das haarnadelartige Protein Podocin, das mit Nephrin sowie Nephrin interagiert^{52,53}. Nephrin und Nephrin bilden einen Komplex an der Schlitzmembran, beide verfügen über eine extrazelluläre sowie eine Transmembrandomäne. Außerdem interagieren Nephrin und Nephrin intrazellulär mit ZO-1.⁵⁴ Weiterhin reguliert Podocin den Calciumkanal TRPC6⁵⁵. Ein zusätzliches Adapterprotein ist CD2AP, welches über Assoziation mit Synpo2 und Inhibition der GTPase-Aktivität von RhoA

die Ausbildung von Aktin-Stressfasern begünstigt⁵⁶⁻⁵⁹. Weiterhin interagiert CD2AP mit Filamin A, welches als Mechanosensor- und Transduktor mit dem Aktinzytoskelett verbunden ist^{60,61}.

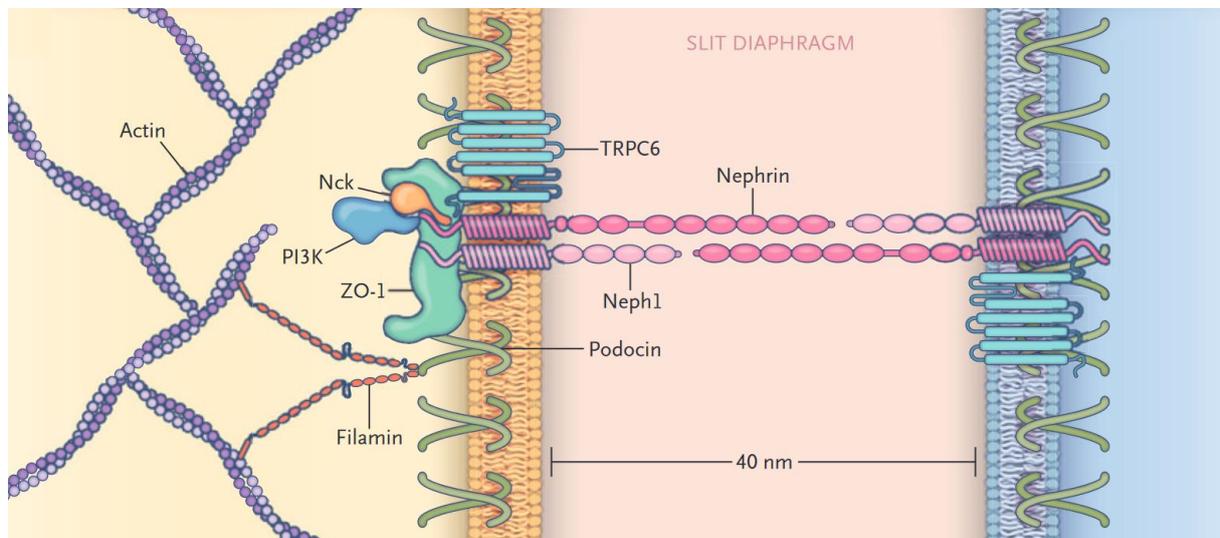


Abbildung 2: Das Schlitzdiaphragma. Das Schlitzdiaphragma bildet durch die extrazellulären Domänen von Neph1 und Nephrin einen 40nm breiten Spalt zwischen benachbarten Podozyten. Membranständig ist Podocin und eine Signalschaltstelle mit diversen Kinasen (Nck, PI3K) aber auch mechanosensitiven Proteinen wie TRPC6 lokalisiert. Über tight-junctions und das Filamin besteht eine Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett. *Verwendet mit Erlaubnis von*²⁵, © Massachusetts Medical Society²⁵

Podozyten verfügen mit der Schlitzmembran also über einen Komplex der Mechanosensation (z.B. über TRPC6), Mechanotransduktion (z.B. über CD2AP und Filamin), sowie Mechanoprotektion (z.B. RhoA) .

2.2.5. Glomeruläre Erkrankungen und Kompensationsmechanismen

Mutationen in den Genen, die Proteine der Schlitzmembran kodieren, führen zum klinischen Bild eines nephrotischen Syndroms. Mutationen in *NPHS1*, kodierend für Nephrin, bedingen das steroidresistente nephrotische Syndrom vom finnischen Typ⁶², pathogenetische Varianten in *NPHS2* führen ebenfalls zu einem steroid-refraktären nephrotischen Syndrom⁶³. Sowohl *gain-of-function*, als auch *loss-of-function*-Mutationen in *TRPC6* können ebenfalls dazu führen⁶⁴. Im Mausmodell zeigen Tiere mit einem *CD2AP*-Knockout einen letalen renalen Phänotyp mit Albuminurie. Auch beim Menschen scheint eine Haploinsuffizienz von *CD2AP* für glomeruläre Erkrankungen zu prädisponieren⁶⁵.

Häufiger als genetisch bedingte Erkrankungen des Glomerulus ist jedoch eine erworbene, oft mechanische Schädigung durch glomeruläre Hyperfiltration⁶⁶. Diese tritt bei Diabetes, Bluthochdruck und Adipositas auf⁶⁷. Möglich ist einerseits die akute Schädigung durch einen erhöhten Druck in den glomerulären Kapillaren. Andererseits kommt es mit abnehmender Nephronzahl bei anhaltender Nierenschädigung zu einer kompensatorischen Hypertrophie der

verbliebenen Glomeruli⁶⁸. Glomeruläre Hyperfiltration führt über einen Anstieg des hydraulischen glomerulären Drucks und dadurch erhöhten transkapillären konvektiven Fluss zu einer mechanischen Belastung der Podozyten. Es wirken an den Fußfortsätzen sowohl Scherkräfte durch den Harnfluss, als auch tensiler Stress durch Elongation der glomerulären Basalmembran⁶⁹. Dieser mechanische Stress wirkt auf die Schlitzmembran und setzt sich über Adapterproteine auf das Zytoskelett fort. Das Zytoskelett bestimmt maßgeblich die Morphologie der Fußfortsätze. Hier spielen besonders Aktinfilamente durch ihre stetige De- und Repolymerisation, Kontraktilität sowie Ausbildung von Stressfasern eine Rolle⁷⁰.

2.3 Proteostase

Auch unter idealen, physiologischen Bedingungen ist die Proteinbiosynthese fehleranfällig, es fallen funktionslose oder sogar toxische Produkte an. Gleichzeitig ist die Lebensdauer funktionsfähiger Proteine begrenzt. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Synthese, Degradation, Aggregation und Utilisation von Proteinen wird als Proteostase bezeichnet^{71,72}. Ein Mechanismus hierfür ist der Abbau fehlgefalteter zytosolischer Proteinen nach Ubiquitylierung in den Proteasomen. Der proteasomale Abbau ist ein effizienter Mechanismus zum Abbau kleiner und löslicher Proteine und Peptide⁷³. Daneben verfügen Zellen über den lysosomalen Abbau und damit eng verbunden den Prozess der Autophagie.

2.3.1. Autophagie und die Rolle von Chaperonen

Autophagie beschreibt den Abbau von zelleigenen Bestandteilen. Sie ist ein kataboler Prozess und kann als Reaktion auf verschiedene Stressoren induziert werden. Autophagie kann Zellschäden verhindern und die Viabilität verbessern⁷⁴. Um den Abbau von großen Proteinen, Proteinaggregaten und Organellen zu ermöglichen, werden diese in membranumhüllten Organellen, den Autophagosomen, sequestriert. Diese fusionieren mit Lysosomen weiter zu Autolysosomen^{75,76}.

Autophagieprozesse können regulatorische Funktionen übernehmen und z.B. Synthese und Degradation von Proteinen beeinflussen oder durch Interaktion mit Chaperonen Proteinaggregate und fehlgefaltete Proteine abbauen^{77,78}. Chaperone sind Proteine, die ATP-abhängig andere Proteine dabei unterstützen eine physiologische Sekundärstruktur einzunehmen. Das Chaperon bindet dazu reversibel die hydrophoben Regionen des Substrats. Bindung und Freisetzung des Substrats am C-Terminus des Chaperons benötigen dabei ATP beziehungsweise einen *nucleotide exchange factor* (NEF)⁷⁷.

Chaperone werden bei Bedingungen, die eine Fehlfaltung von Proteinen erleichtern, auch vermehrt gebildet: Die Synthese von Chaperonen wird bei erhöhten Temperaturen gesteigert,

daher werden sie als Hitzeschockproteine bezeichnet. Auch oxidativer Stress oder mechanischer Stress führt zu einer Steigerung der Chaperonsynthese⁷⁵. Unter physiologischen Bedingungen stellen Chaperone eine Qualitätskontrolle neugebildeter Proteine dar, erleichtern den Zusammenbau von Proteinkomplexen und führen Proteine gegebenenfalls der Degradation durch das Ubiquitin-Proteasomen- oder Autophagie-Lysosomen-System zu⁷⁸.

2.3.2. Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA)

Anfangs ging man davon aus, dass Autophagie nicht-selektiv zur Degradation zytosolischer Proteine führt. Dice et al. konnten aber bereits 1982 unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten für verschiedene Proteine *in vitro* feststellen⁷⁹. Weitere Arbeiten konnten letztlich ein KFERQ-Motiv als Merkmal zur Erkennung von Autophagieklienten durch das Chaperon HSC70 identifizieren^{80,81}. Aufgrund der zentralen Rolle des Hitzeschockproteins HSC70 wird dieser Vorgang Chaperon-medierte Autophagie genannt.

Durch Assoziation mit weiteren Proteinen, sogenannter Co-Chaperone, ist eine Selektion und Modifikation der Substrate möglich. Auch können Co-Chaperone als Regulatoren von Signalwegen auftreten⁸². Bei der chaperon-assistierten-selektiven Autophagie (CASA) bildet sich ein Komplex aus dem Chaperon HSC70, der E3-Ubiquitinligase *carboxyl terminus of HSC70-interacting protein* (CHIP), sowie den Co-Chaperonen HSPB8 und BAG3⁸³. In diesem Komplex besteht eine Bindung von CHIP und dem C-Terminus von HSC70, während BAG3 mit dem N-Terminus von HSC70 interagiert. HSPB8 assoziiert BAG3-abhängig mit HSC70. CHIP und BAG3 sind in der Lage das Ubiquitin-Adapterprotein p62 zu rekrutieren. Dieses bindet weiterhin an das *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (LC3), welches sich auf der Oberfläche von Membranorganellen findet, die Phagophoren genannt werden. Mit der Umhüllung des BAG3-Komplexes durch die Membran entsteht das Autophagosom. Das Autophagosom kann durch Verschmelzung mit Lysosomen den BAG3-Komplex und assoziierte Klienten hydrolytisch abbauen⁸⁴. Beispielhaft für CASA-Klienten sind Filamin A, B und C⁸⁵. Filamine liegen als Dimere vor, die eng mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Filamin A fungiert als Mechanosensor: wirken mechanische Kräfte auf das Aktinzytoskelett entwindet sich die sprunghafte Struktur von Filamin⁶¹.

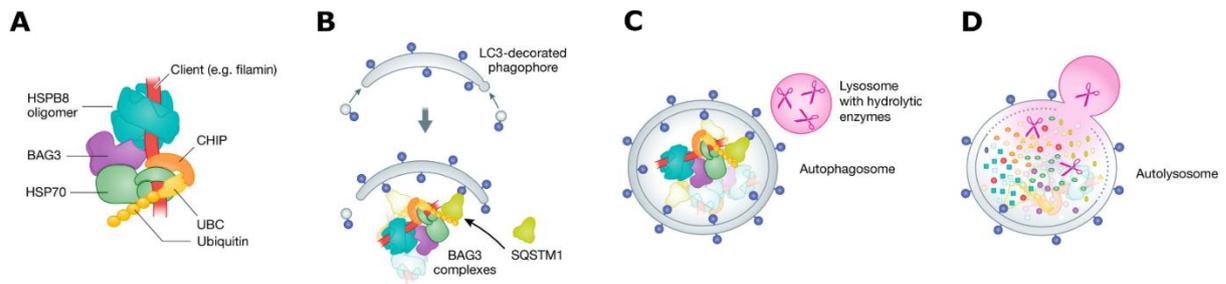


Abbildung 3: Chaperon-assistierte selektive Autophagie am Beispiel des BAG3-Komplexes. **A:** BAG3 formiert mit HSP70 und HSPB8 sowie CHIP als Ubiquitinligase einen Komplex. **B:** SQSTM1 (p62) fungiert als Adapterprotein zwischen Ubiquitin und LC3 rekrutiert BAG3-Komplexe mit deren Klienten zu LC3-markierten Phagophoren. **C:** Nach Bildung des Autophagosoms verschmilzt dieses mit einem Lysosom. **D:** Durch hydrolytische Enzyme erfolgt im Autolysosom die Degradation von BAG3-Komplexen und deren Klienten. *Verwendet mit Genehmigung von⁸⁶.*

2.4 BAG3 (Bcl-2-associated athanogene 3)

2.4.1. Struktur

BAG3 ist unter physiologischen Bedingungen im Cytoplasma lokalisiert. BAG3 hat ein Molekulargewicht von 74kDa⁸⁷. Unter Stressbedingungen kann eine Variante mit höherem Molekulargewicht beobachtet werden, mutmaßlich durch posttranslationale Modifikation von Serin- und Tyrosin-reichen Regionen⁸⁸. Außerdem kann eine etwa 40kDa schwere Isoform in neuronalen Strukturen beobachtet werden⁸⁹.

Die Proteine der BAG-Familie verfügen über eine konservierte C-terminale BAG-Domäne, wohingegen der N-Terminus variabel ist⁹⁰. Diese BAG-Domäne dient als Bindungsstelle für HSC70 sowie für das namensgebende Protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2). Neben BAG3 können auch BAG1 und BAG2 mit HSC70 interagieren⁹¹. Proximal hiervon verfügt BAG3 über ein PxxP-Motiv, für das Interaktionen mit Src-Kinasen, Dynein, sowie PLC- γ beschrieben sind. Weiter N-terminal finden sich zwei IPV-Domänen, die unter anderem das in der CASA implizierte HSPB8 binden können. Zwischen diesen beiden Domänen findet sich eine 14-3-3-Proteinbindungsstelle. Noch weiter N-Terminus befindet sich eine Tryptophanhaltige (WW-) Domäne, die mit der Tyrosinkinase LATS1/2, SYNPO2 und TSC1 interagieren kann^{92,93}.

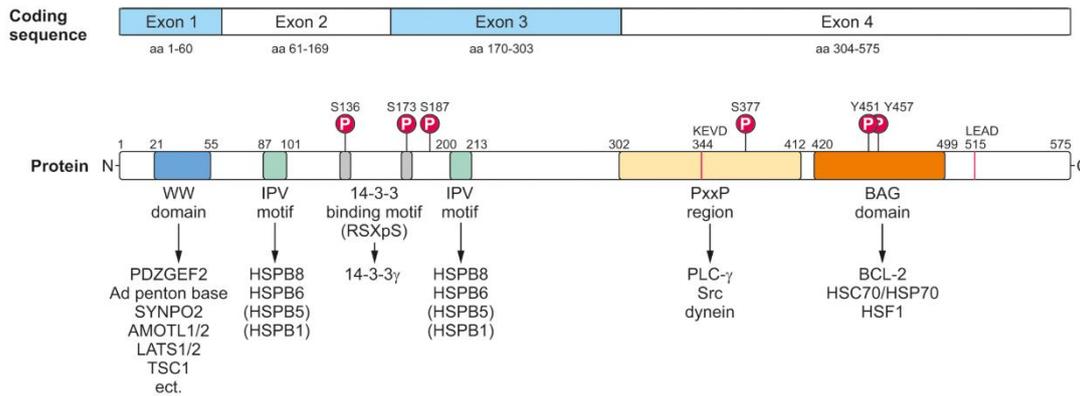


Abbildung 4: Struktur von *BAG3* mit Darstellung diverser Domänen und Bindungspartnern. *BAG3* enthält 4 Exons. Exon 1 kodiert für die tryptophanhaltige Bindungsstelle die z.B. mit SYNPO2 und LATS1/2 interagiert. Exon 2 und 3 enthalten Bindungsstellen für HSPB8 zur Ausbildung des BAG3-Komplexes. Exon 4 verfügt über eine PxxP-Domäne die mit Src-Kinasen und Dynein interagieren kann. Im Exon 4 findet sich auch die zwischen BAG-Proteinen konservierte BAG-Domäne an der die Interaktion mit dem namensgebenden Bcl-2 aber auch HSP70 stattfindet. *Verwendung mit Genehmigung von*⁹³.

2.4.2. Expression und Funktion von BAG3

BAG3 wird in verschiedenen neoplastischen Geweben und Organen und exprimiert: Besonders sind Skelett- und Herzmuskeln zu nennen, darüber hinaus wird *BAG3* in neuronalem Gewebe (Kortex, Cerebellum, Retina, Rückenmark) und lymphatischem Gewebe exprimiert. In geringerem Maße liegt *BAG3* in Placenta, Mamma, Dickdarm, Leber und Haut vor^{89,94}. *BAG3*-Expression wird durch den Transkriptionsfaktor WT1 sowie Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSF) reguliert⁹⁵. Außerdem ist *BAG3* zur Autoregulation in der Lage, indem es die Transkription seines eigenen Promotors im Sinne eines positiven *feedback loop* induziert⁹⁶.

Durch die Interaktion mit Bcl-2 greift *BAG3* in die Regulation von apoptotischen Vorgängen ein⁹⁷, wie bei der humanen chronisch lymphatischen Leukämie beobachtet werden konnte⁹⁸. In soliden Tumoren wie Mammakarzinomen⁹⁹ und Urothelkarzinomen¹⁰⁰ konnte eine *BAG3*-abhängige Resistenz gegenüber oxidativem Stress und Chemotherapeutika gezeigt werden. *BAG3* werden Funktionen bei der Zellmigration zugeschrieben, ein *BAG3*-Knockdown¹⁰⁰ oder anti-*BAG3*-Antikörper¹⁰¹ konnten Tumorstadium und Metastasierung reduzieren.

Ein *Bag3*-Knockout im Mausmodell führt zu einer zunächst normalen Entwicklung, postnatal entwickeln *Bag3*-Knockout-Mäuse jedoch eine letale Myopathie¹⁰². In physiologischem Zustand ist *BAG3* mit den Z-Scheiben der Sarkomere kolokalisiert¹⁰³. Ein Verlust von *BAG3* führt zur Desintegration der Z-Scheiben mit Verlust der Sarkomerstruktur¹⁰⁴.

Im Menschen ist eine *BAG3*-abhängige myofibrilläre Myopathie durch die Mutation P209L beschrieben, welche zum Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie im Kindesalter führt^{105,106}. Betroffene Personen leiden außerdem an einer axonalen Neuropathie.

BAG3-P182L-Mutationen führen zur Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 2. Heterozygote Mutationen in *HSPB8* führen ebenfalls zu einem Phänotyp einer myofibrillären Myopathie sowie zur Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie Typ 2¹⁰⁷. Gemeinsam ist beiden BAG3-Mutanten sowie der *HSPB8* Mutanten, dass in den betroffenen Myozyten oder Neuronen Proteinaggregate nachzuweisen sind. In Myozyten sind P209L-BAG3-Mutanten ebenfalls in der Lage, Autophagieklienten zu Aggresomen zu binden. Die Um- bzw. Freisetzung der Proteine ist jedoch, was die Bildung der toxischen Proteinaggregate bedingt.^{108–110}.

Ähnlich den Myozyten sind Podozyten besonderem mechanischem Stress ausgesetzt. Mit neuronalen Zellen teilen sich Podozyten die hochdifferenzierte polare Organisation, den postmitotischen Status, sowie Ausbildung eines spezialisierten Zellkontaktes als Schnittstelle zahlreicher Signalwege^{111,112}. Dies wirft die Frage auf, ob CASA in Podozyten eine ebenso zentrale Rolle spielt. Rinschen et al. konnten 2018 (Abbildung 5) zeigen, dass BAG3, HSP70 und HSPB8 in murinen Podozyten angereichert vorkommen¹¹³. Dies untermauert die Hypothese, dass CASA und BAG3 bei der podozytären Anpassung an mechanischen Stress von Relevanz sein könnten.

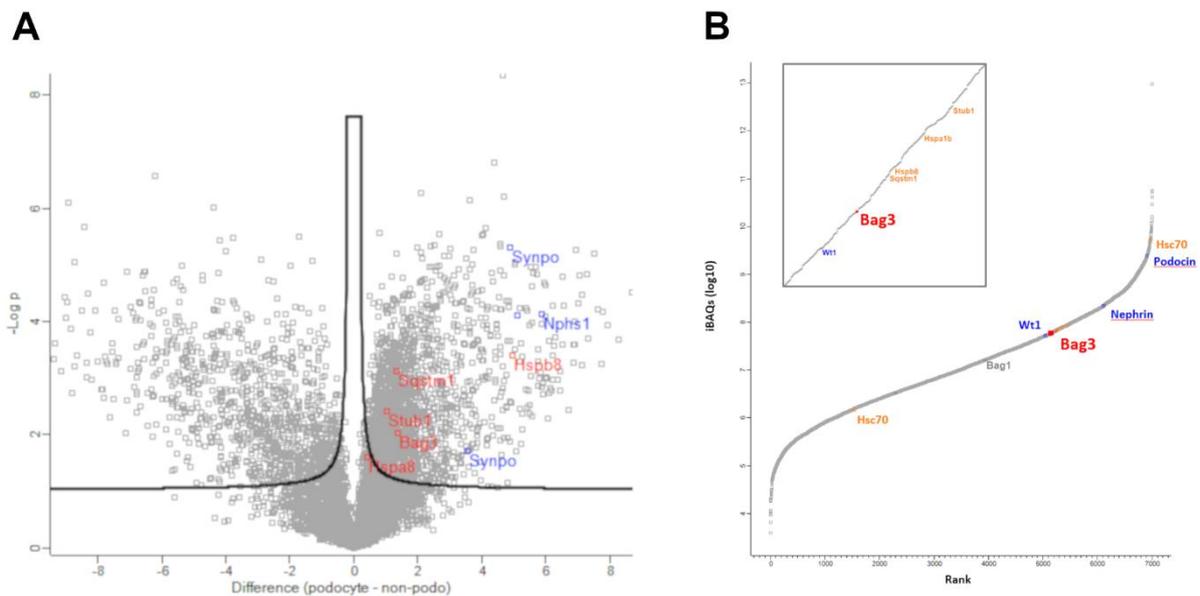


Abbildung 5: Proteom muriner Podozyten gegenüber glomerulären, nicht podozytären Zellen. **A:** Volcano-Plot von podozytären gegenüber nicht-podozytären Zellen aus murinen Glomeruli. Neben bekannten podozytären Proteinen wie Neph1 und Synaptopodin zeigten sich auch BAG3, HSPB8/A8 sowie SQSTM1 in Podozyten angereichert. **B:** iBAQ-Analyse (intensitäts-basierte absolute Quantität) in murinen Podozyten. Podocin und Neph1 als podozytäre Proteine aber auch Hsc70 (HSP70) zeigten sich angereichert. *Daten aus*¹¹³.

2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Als Bestandteile des glomerulären Filters sind Podozyten in der Niere signifikantem mechanischem Stress ausgesetzt. Sie verfügen mit der Schlitzmembran über einen sehr ausgedehnten, mechanosensitiven Zell-Zellkontakt. Die Mechanismen, mit denen Podozyten mechanischem Stress widerstehen, sind nicht ausreichend erforscht. Podozyten zeigen eine vermehrte Expression von Komponenten der chaperon-assistierten selektiven Autophagie (CASA). Hier erscheint das Protein Bag3 sehr prominent, das transkriptionell von WT1 reguliert wird, einem der wesentlichen Transkriptionsfaktoren in Podozyten. CASA bietet in mechanisch beanspruchten Geweben einen Protektions- und Adaptationsmechanismus gegen mechanischen Stress.

In dieser Arbeit soll daher die podozytäre Antwort auf mechanischen Stress in Abhängigkeit von BAG3 untersucht werden. Dafür sollen zunächst eine BAG3-defiziente Podozyten Zelllinie generiert und validiert werden. Anschließend soll diese Zelllinie in einem *in vitro* Modell mechanischem Stress ausgesetzt werden. Dabei sollen die Veränderungen des Proteoms untersucht werden, um Aufschlüsse über den Bag3 abhängigen Proteinabbau zu erhalten.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Autoklav	Systec	V-150
Axiovert Mikroskop	Zeiss	200M
Blockthermostat	VWR	460-0350P
DynaMag2, Magnetständer	Life Technologies	12321D
Elektrophoresenetztteil	Consort	Z337447
Dunkelkammer mit integrierter Kamera	Peqlab	SL-3500 WL
Fusion Solo Chemiluminometer	Peqlab	60-FU Solo
Geldokumentationssystem ChemiDoc™	Bio-Rad	XRS
Gelelektrophoresekammer L	Peqlab	40-1214
Gelelektrophoresekammer S	Peqlab	40-0708
Gelelektrophoresesystem	Invitrogen	100601-1408
Hamilton Pipette 50µl	Hamilton	705
Heraeus Megafuge	Heraeus	4 KR
Inkubator	Sanyo	MCO-20AIC
Inkubator	Binder	BD115
Konfokalmikroskop	Zeiss	LSM 710
Laminar Flow Workbench	Scanlaf	Class 2 Mars B2
Zentrifuge	VWR	521-2844
Mithras Mehrmodus-Plattenlesegerät	Perkin Elmer	2300-0000
Multichannelpipette 30-300 µl	VWR	613-0887
Nanodrop Spektrophotometer	Peqlab	1000
Optima Max-XP Ultrazentrifuge	Beckman-Coulter	CTZ13G02
Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Fisher	Q Exactive EASY 1000 UPLC
Pipettierhelfer	Integra	1550

Pipetten	Gilson	P2/P10/P20/P100/P200/P1000
Pneumatischer Stressbioreaktor	FlexCell	FX-6000
Semi-Dry Blottingsystem	Peqlab	Sedec M
Thermocycler	Bio-Rad	PTC-1148
Thermocycler	Bio-Rad	PTC-200
Thermocycler	MJ	S1000
Thermoschüttler	Grant	444-0823
Tischzentrifuge Mini Star Silverline	VWR	521-2844
Transfer Powerpac Hc Netzteil	Bio-Rad	1645052
Überkopfschüttler	Elmi	ELME10030
Ultraschallhomogenisator Sonoplus	Bandelin	HD2070
Vakuumpumpe	Hettich Benelux	HETTBE_290004B
Vakuumpumpe	VWR	1810067DE
Vortexer	VWR	444-1372
Wasserbad	Memmert	WNB22
Zentrifuge 5415R	Eppendorf	2262140-8
Zentrifuge 5417R, temperierbar	Eppendorf	2262180-7

Tabelle 1: Geräte

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Katalognummer
96-Well-Platte	Greiner	655180
Adhäsionsobjektträger	Geyer	7695019
BioFlex 6-Well-Platten	FlexCell	BF3001U
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl, steril	Sarstedt	70762211
Blottingpapier	Sartorius	FT-2-251-580600G
Deckgläser, rund, 18mm Durchmesser, 1,5 mm Dicke	Menzel	CB00180RAC
Eppendorfreagenzgefäß 1,5 ml	Sarstedt	224739
Falcon 15ml	Greiner	227261
Falcon 50ml	Greiner	188271

Gelkamm, 10 Taschen	ThermoFisher	NC3010
Gelkamm, 12 Taschen	ThermoFisher	NC3012
Gelkassetten 1mm	ThermoFisher	NC2010
Loading Station Grease	FlexCell	LS-LUB
Nitrit Einmalhandschuhe, Größe L	Abena	3926
Objektträger	Engelbrecht	K123
PAP-Pen	Plano	L4197
Parafilm	Brand	163-9170002
PCR-Deckelkette, 8er-Reihe	Sarstedt	6598002
PCR-Gefäß, 0,2ml, 8er-Reihe	Sarstedt	72985002
PVDF-Membranen	Millipore	IPVH00010
Safe-Lock Reagenzgefäß 1,5ml	Eppendorf	0030 123.328
Stripetten 10ml	Corning	4101
Stripetten 25ml	Corning	4251
Stripetten 50ml	Corning	4501
Stripetten 5ml	Corning	4051
TipOne Pipettenspitzen 10 µl, steril	Starlab	S1110-3810
TipOne Pipettenspitzen 10 µl, unsteril	Starlab	S1110-3700
TipOne Pipettenspitzen 1000 µl, steril	Starlab	S1111-1816
TipOne Pipettenspitzen 1000 µl, unsteril	Starlab	S1111-6700
TipOne Pipettenspitzen 200 µl, steril	Starlab	S1111-6700
TipOne Pipettenspitzen 200 µl, unsteril	Starlab	S1111-1700
Zellkulturplatten 12 well	Corning	3513
Zellkulturplatten 6 well	Corning	3516
Zellkulturschalen 10 cm	Corning	430167
Zellschaber	Corning	3008

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

3.1.3. Zelllinien

Bezeichnung	Gewebe	Spezi es	Herkunft
HEK293T	Embryonale Niere	human	Prof. Dr. B. Seed, Boston

Humane Podozyten	Niere	human	Prof. Dr. M. Saleem, Bristol
BAG3^{-/-} -Podozyten (gRNA#1)	Niere	human	Für diese Arbeit generiert
BAG3^{wt} -Podozyten (gRNA#1)	Niere	human	Für diese Arbeit generiert
BAG3^{-/-} -Podozyten (gRNA#2)	Niere	human	Für diese Arbeit generiert
BAG3^{wt} -Podozyten (gRNA #2)	Niere	human	Für diese Arbeit generiert

Tabelle 3: Zelllinien

3.1.4. Bakterien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
DH10 B Phage-resistant E. Coli	Thermo Fisher	12331013

Tabelle 4: Bakterien

3.1.5. Antikörper

Spezifität	Klonalität	Wirt	Dilution	Hersteller	Katalognummer
BAG3 (478-575)	monoklonal	Maus	1:2.000	St. Cruz Biotechnology	sc-136467
BAG3 (275-575)	polyklonal	Kaninchen	1:10.000	proteintech	10599-1-AP
Flag (M2)	monoklonal	Maus	1:10.000	Sigma Aldrich	F3165
GAPDH	monoklonal	Kaninchen	1:2.000	Cell Signaling	#2118
Kaninchen-IgG (H+L)	polyklonal	Esel	Cy™3	Jackson ImmunoResearch	711-165-152
Kaninchen-IgG HRP-konjugiert (H+L)	polyklonal	Ziege	1:30.000	Jackson ImmunoResearch	111-035-003
Maus-IgG (H+L)	polyklonal	Esel	Cy™3	Jackson ImmunoResearch	715-165-150
Maus-IgG HRP-konjugiert (H+L)	polyklonal	Ziege	1:30.000	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
p62	polyklonal	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling	#5114
pan-Actin	monoklonal	Rabbit	1:10.000	Cell Signaling	#8456

pERK1/2	polyklonal	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling	#9101
---------	------------	-----------	---------	----------------	-------

Tabelle 5: Antikörper und -seren.

3.1.6. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
BbsI 10.000 U/ml	NEB	R0539S
Exonuklease I 20U/μl	Thermo Fisher	EN0581
Go Taq Flexi DNA Polymerase 5U/μl	Promega	M7808
LysC Endoprotease, MS-Gütegrad	Thermo Fisher	90051
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Thermo Fisher	783901000UN
T4 DNA Ligase, 400 000 U/ml	NEB	M0202s
T4 Polynukleotidkinase	NEB	M0201
T7 DNA Ligase 3.000.000 U/ml	NEB	M0318
Trypsin, MS-Gütegrad	Thermo Fisher	90057
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco	25300096

Tabelle 6: Enzyme

3.1.7. Wachstumsmedien und -zusätze

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX	Gibco	31966-021
Ampicillin (Amp)	Roth	K029.2
RPMI-1640 Medium	Sigma	R8758
Lysogeny Broth (LB) Agar	Roth	X965.1
Lysogeny broth (LB) Medium	Roth	X964.1
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	10270-106
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Corning	25-800-CR
Penicillin-Streptomycin	Sigma	P4333

Tabelle 7: Wachstumsmedien und -zusätze

3.1.8. Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
oligo fw (gRNA#1)	CACCGTGAAGGCGCTGAGAA CCGGC	IDT
oligo rev (gRNA#1)	AAACGCCGGTTCTCAGCGCC TTCAC	IDT

oligo fw (gRNA#2)	CACCGGTTTCGGAATCGCTGC ATCCC	IDT
oligo rev (gRNA#2)	AAACGGGATGCAGCGATTCC GAACC	IDT
BAG3 Exon2 fw	CTCCATCCTCTGCCAATGGC	IDT
BAG3 Exon 2 rev1	CCTGGCCTCTCCTTACCTCA	IDT
BAG3 Exon 2 rev2	CTGCAGGCTAGACCCAGATG	IDT

Tabelle 8: Oligonukleotide

Soweit nicht anders angegeben, wurden Oligonukleotide in einer Konzentration von 100µM verwendet.

3.1.9. Plasmide

Bezeichnung	Insert	Tag	Backbone	Herkunft
3FI.GFP	GFP	3xFlag	pcDNA6	Nephrolab
F.BAG3	BAG3	Flag	pcDNA6	Nephrolab
pSpCas9(BB) (PX458)	hSpCas9	2A-GFP	PX458	Addgene (Katalog-Nr.: 48138)
pSpCas9(gRNA#1)	hSpCas9	2A-GFP	PX458	kloniert
pSpCas9(gRNA#2)	hSpCas9	2A-GFP	PX458	kloniert

Tabelle 9: Plasmide

3.1.10. Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Herausgeber	Katalognummer
Bichinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA-Assay)	Pierce	23227
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher	4337455
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (PIM) + EDTA	Roche	11836145001
Dynabeads (magnetisch)	Life Tech	14305D
Dynabeads Protein G 30 mg/ml	Lifetech	10003d
ECL Femto	Thermo Fisher	34095
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher	K0691
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher	K0702
GeneJET Plasmid MiniPrep Kit	Thermo Fisher	K0503
Genejuice Transfection Reagent	Sigma	70967

GeneRuler 0,5kb DNA Ladder	Thermo Fisher	SM0372
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher	Sm0311
Incuwater-Clean	Applichem	A5219,0100
Magnesium Chloride (MgCl ₂) Solution	NEB	B9021S
NEB 3.1 Buffer 10x	NEB	B7203s
NucleoBond® Xtra MidiPrep Kit	Macherey-Nagel	740410.10
Pageruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher	26620
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Promo-Kine	PK-CA91-1096
Phalloidin (Alexa Fluor 647 Plus)	Thermo Fisher	A30107
Prolong Diamond Antifade + DAPI	Invitrogen	P36971
Q5® High GC Enhancer	NEB	B9028a
Q5® Reaction Buffer Pack	NEB	B9027s
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaktionsmix	Sigma	R2523
T4-Ligase-Puffer	NEB	B0202s
Tango Buffer (10x)	Thermo Fisher	BY5

Tabelle 10: Kits und Reagenzien

3.1.11. Chemikalien

Bezeichnung	Herausgeber	Katalognummer
Agarose	Sigma	A9539
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem	A1142
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma	A9418-500g
Bromphenolblau	Roth	A512
Collagen IV	Flexcell	BF-3001C-LV
Coumarinsäure	Sigma	C9008
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) 100 mM	Thermo Fisher	R0182
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem	A3672,0100
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma	S9390
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher	R0862
Essigsäure	Sigma	P36971
Ethanol ≥99.9 %	Roth	9065
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8.5	Sigma	60-00-4

Fibronectin	Flexcell	BF-3001P
Formaldehyd 37 %	Geyer	4979.1
Glycerol	Chemsolute	2039.1000
H ₂ O ₂ 30%	Roth	8070.2
Hefeextrakt	Becton Dickinson	212750
HEPES 1M	Sigma	H0887
IGEPAL	Sigma	I8896
Iodoacetamid (IAA)	Bio-Rad	1632109
Isopropanol	Roth	5752.3
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma	P5405
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma	P5655
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck	10035048
Luminol 250 mM	Sigma	09253
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck	1058330250
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth	P027
Methanol ≥99.9 %	Roth	4627
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth	2367.3
Natriumacetat	Merck	6268
Natriumazid	Roth	K305.1
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma	S5886
Natriumdeoxycholat	Sigma	D6750
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem	A2263,0500
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth	T135
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma	S6508
Natriumpyruvat	Sigma	S8636
Normal Donkey Serum (NDS)	Jackson Immunoresearch	017-000-121
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma	P6148
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem	A0999
Polyacrylamid	Roth	T802.1
Tris (Base)	Sigma	T1503
Tris-HCl	Roth	9090.3
Triton X 100	Applichem	A4975,1000
Trypton	MP Biomedical	1010817
Tween-20	Caesar u. Lorentz	3472
Xylol ≥98%	Geyer	0371

Zitronensäure	Roth	1818.1
---------------	------	--------

Tabelle 11: Chemikalien

3.1.12. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
1x Laemmli-Puffer	50 mM Tris 10% (v/v) Glycerol 2% (w/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 50 mM DTT
2x HBS	50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 5 mM Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 12 mM Dextrose in aqua dest., ad pH 7,09-7,10
2x Laemmli-Puffer	100 mM Tris 20% (v/v) Glycerol 4% (w/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 100 mM DTT
5x Laemmli-Puffer	250 mM Tris 50% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 100 mM DTT
CRISPR-Lysepuffer	0,45% (v/v) Tween-20 0,45% Triton X 100 2,5 mM MgCl ₂ 50 mM KCl 10 mM Tris-HCL pH 8.3 100 µg/ml Proteinase K
ECL-Lösung A	100 mM Tris, pH 8,5 2,5 mM Luminol 0,4 mM p-Cumarsäure

ECL-Lösung B	100 mM Tris, pH 8,5 1,5% (v/v) H ₂ O ₂
FACS-Puffer	0.5% (m/v) BSA 0.05% (m/v) NaN ₃ in sterilem PBS
Färbungs-Puffer	0,1% (v/v) Triton X 100 In 1x PBS
IF-Blocking-Puffer	5% (v/v) NDS 0,1% (v/v) Triton X100 in 1x PBS
IF-Waschpuffer	1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ in 1x PBS
Laufpuffer	192 mM (v/v) Glycin 0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris-Base
LB-Amp-Agarplatten	32 g/l LB-Medium 0,1 g/l Ampicillin
LB-Amp-Medium	20 g/l LB-Medium 0,1 g/l Ampicillin
Medium humane Podozyten	RPMI-1640 Medium 10% (v/v) FBS 5% (v/v) ITS
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-Tween	0,1% (v/v) Tween-20 In 1x PBS
Protein-Waschpuffer	300 mM NaCl 30 mM Tris 0,3% (v/v) Tween-20 pH 7,5
RIPA Minus Puffer	25 mM Tris Ad pH 8 2 mM EDTA 0,5% (v/v) Na-Deoxycholat 150 mM NaCl 1% (v/v) IGEPAL 10% (v/v) Glycerol 2 mM Na ₃ VO ₄

	44 mg/ml PMSF 1 Tablette/50ml Puffer PIM + EDTA
SDS-PAGE Sammelgel	5% (w/v) Polyacrylamid 0,2% (w/v) APS 0,2% (w/v) SDS 0,3% (v/v) TEMED 250 mM Tris pH 6,8
SDS-PAGE Trenngel	10% (v/v) Polyacrylamid 0,1% (w/v) APS 0,2% (w/v) SDS 0,15% (v/v) TEMED 750 mM Tris pH 8,8
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O
TAE-Puffer	10 mM Essigsäure 0,0005% Ethidiumbromid 1 mM EDTA 22 mM Tris
Transferpuffer	188 mM Glycin 15,2% (v/v) Methanol 0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris Base
Tris-Acetate-EDTA	40 mM Tris-Base 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,5
Tris-EDTA-Puffer	10 mM Tris-Base 1 mM EDTA 0,0025% (v/v) Tween-20 pH 9,0
Zellkulturmedium HEK293T	DMEM mit L-Glutamin 10% FBS (v/v)
Zellkulturmedium humane Podozyten	RPMI + GlutaMAX

10% (v/v) FBS
5% (v/v) ITS

Tabelle 12: Puffer und Lösungen

3.1.13. Software und webbasierte Werkzeuge

Bezeichnung	Herausgeber
FusionCapt Advance	Vilber
MaxQuant	MPG
Office 2018 für Windows	Microsoft
Perseus 1.6.7.0.	MPG
Biorender	BioRender
Zen Software 2009	Zeiss
FlexSoft	FlexCell
Inkscape	InkScape-Entwicklerteam
Gnu Image Manipulation Program	GIMP-Entwicklerteam
Fiji 2.5.0	GPL ¹¹⁴
RStudio 2022-07-20 (R Version 4.2.0)	Posit (GNU-GPL License for R)

Tabelle 13: Software

Domain	Herausgeber
https://benchling.com	Benchling, Inc.
https://wge.stemcell.sanger.ac.uk/	Sanger Institute
http://msr.cs.nthu.edu.tw/	Chang, C ¹¹⁵
https://indelpi.giffordlab.mit.edu	Shen, MW ¹¹⁶

Tabelle 14: Webbasierte Werkzeuge:

3.2 Methoden

3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Durch die Wahl zweier spezifischer Oligonukleotide kann eine spezifische DNA-Sequenz (Amplicon) gewählt werden, die durch zyklische Denaturierung, Hybridisierung und Elongation exponentiell vermehrt wird^{117,118}. Diese Schritte werden automatisiert in einem Thermocycler durchgeführt. Die jeweils optimale Temperatur ist von gewählter Polymerase und Primersequenz abhängig.

Reagenz	Menge (Konzentration)
---------	-----------------------

RedTaq ReadyMix	10 µl
Primer (vorwärts)	1 µl (0,5 µM)
Primer (rückwärts)	1 µl (0,5 µM)
Template DNA	10-100 ng
ddH ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 15: : RedTaq-Polymerasekettenreaktion

Reagenz	Menge (Konzentration)
5x Q5 Reaction Buffer	4 µl
Primer (vorwärts)	1 µl (0,5 µM)
Primer (rückwärts)	1 µl (0,5 µM)
10mM dNTPs	0,4 µl (200 µM)
Q5 HotStart High Fidelity DNA Polymerase	1 µl
Template DNA	10-100 ng
ddH ₂ O	ad 20 µl
optional: 5X High GC Enhancer	1x

Tabelle 16: Q5-Polymerasekettenreaktion

Temperatur	Schritt		Dauer
98 °C	Denaturierung	initial	30 s
98 °C	Denaturierung		10 s
50-72 °C	Annealing	25-35 Zyklen	30 s
72 °C	Elongation		30 s / kb
72 °C	Elongation	final	120 s
20 °C			

Tabelle 17: PCR-Protokoll Thermocycler

3.2.2. Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte oder Produkte des Restriktionsverdau wurden für die Agarosegelelektrophorese mit einem farbigen Ladepuffer versetzt und neben einem 1 kb-Basenpaarmarker auf in die Taschen eine Agarosegels pipettiert. Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurde ein- bis zweiprozentiges Agarosegel verwendet. Per Elektrophorese mit 80 V für 30-60 min wurden DNA-Proben nach ihrer Größe aufgetrennt. Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid zugesetzt, sodass eine Analyse unter UV-Beleuchtung erfolgen konnte.

3.2.3. Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau werden Restriktionsendonukleasen verwendet, um an spezifischen Stellen mittels Hydrolyse der Phosphodiesterbindung DNA zu schneiden. Erkennungsstellen sind meist palindromische Sequenzen. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme verwendet, die einen Überhang an der Schnittstelle erzeugen („sticky ends“). Der Ansatz für den Restriktionsverdau wurde auf Eis pipettiert und für 1-4 h bei 37 °C inkubiert.

Reagenz	Menge (Konzentration)
Template DNA	200 ng – 1 µg
Restriktionsenzym	1 µl (pro Enzym 0,5 µl)
NEB 3.1 Buffer 10x	3 µl (1x)
ddH ₂ O	ad 30 µl

Tabelle 18: Restriktionsverdau

3.2.4. Ligation

Die Ligation dient der Verknüpfung von doppelsträngigen DNA- Fragmenten¹¹⁹. Bei Klonierungen kann so zum Beispiel eine gewünschte Sequenz in einen Vektor eingefügt werden. Voraussetzung ist eine vorherige Linearisierung der DNA. Ein basenkomplementärer Überhang an den Enden von Vector und Insert steigert die Effizienz der enzymkatalysierten Ligation. Zur Ligation wurden Vector und Insert mit T4-Ligase für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Als Kontrolle dient ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA.

Reagenz	Menge
DNA (Vector)	2 µl
DNA (Insert)	2-8 µl (0 µl für Negativkontrolle)
T4 DNA Ligase	0,8 µl
T4 DNA Ligase Buffer	4,2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 19: Ligation

3.2.5. Transformation

Der Transfer von DNA in prokaryotische Zellen, meist mit dem Ziel der Amplifikation, wird als Transformation bezeichnet. Die Kompetenz der prokaryotischen Zellen zur Aufnahme von DNA kann z.B. durch chemische oder thermische Reize verbessert werden.

Escherichia coli (DH10) wurden mit Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Erhitzung auf 42 °C für 45 s im Wasserbad. Anschließend wurden die Bakterien mit SOC-Nährmedium versetzt und bei 37 °C für 1 h auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die Suspension wurde im Anschluss auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Die transformierte DNA verwendete sämtlich ein Ampicillin-Resistenzgen (*ampR*) zur Selektion. Die beimpften Agarplatten inkubierten über Nacht bei 37 °C in einem dezidierten Brutschrank. Am Folgetag wurde das Koloniewachstum inspiziert, fünf Kolonien mit einer Impföse geerntet und diese dann erneut über Nacht in SOC-Nährmedium bei 37°C in einem Brutschrank auf einem Schüttler inkubiert. Abhängig von der zu isolierenden DNA-Menge wurden kommerziell erhältliche Kits für eine Miniprep oder Midiprep nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde zunächst durch einen Restriktionsverdau, vor Verwendung in Experimenten auch durch eine Sequenzierung überprüft.

3.2.6. Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde das Sanger-Verfahren verwendet. Hierbei läuft eine PCR in Anwesenheit von Didesoxyribonukleotiden (ddNTP) ab, deren Einbau in den DNA-Strang einen Kettenabbruch zur Folge hat. Während bei Entwicklung des Verfahrens nukleotidspezifische Reaktionsansätze pipettiert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert werden mussten, wird die Sangersequenzierung mittlerweile mit automatisierten Verfahren und fluoreszenzmarkierten ddNTP durchgeführt.

Der nachfolgende Reaktionsansatz wurde vorbereitet und im Thermocycler inkubiert. Die Analyse des PCR-Produktes erfolgte im Cologne Center for Genomics (CCG).

Reagenz	Menge (Konzentration)
BigDye Terminator v3.1	0,25 µl
Primer (10 µM)	0,25 µl
Template DNA	150 – 200 ng
5x BigDye Sequencing Buffer	2,25 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 20: Sequenzierung

3.2.7. Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Transfektion beschreibt die Introduktion von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurden chemische Transfektionsverfahren verwendet. Zur Transfektion von HEK293T

wurde die Calcium-Phosphat-Präzipitation angewandt¹²⁰. Die Transfektion erfolgte bei 60% Konfluenz und nach Wechsel auf serumfreies Medium. Zunächst wurde in einem Reaktionsgefäß Plasmid-DNA mit Calciumchlorid vermischt und unter kontinuierlichem Vortexen langsam 2xHBS im 1:1 Verhältnis zugesetzt. Der Ansatz wurde dann auf die Zellen gegeben und diese für 6 h im Inkubator belassen. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel, um die Transfektion zu stoppen. Am Folgetag wurde die Transfektionseffizienz lichtmikroskopisch anhand einer eGFP-transfizierten Positivkontrolle evaluiert.

3.2.8. Transfektion mittels GeneJuice®

Zur Transfektion der humanen Podozyten-Zelllinien wurde das proprietäre Transfektionsreagenz GeneJuice verwendet, das mit durch Komplexbildung mit einem Protein und kationischen Polyaminen eine Aufnahme von DNA in eukaryotische Zellen ermöglicht. Zellen wurden am Vortag in 6-Well-Zellkulturschalen mit 100.000/Well ausgesät. Das Transfektionsreagenz wurde mit serumfreiem Medium vermischt, gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA hinzugegeben, der Ansatz durch vorsichtiges Pipettieren durchmischt und erneut für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann tröpfchenweise in die Zellkulturgefäße gegeben und durch sanftes Schwenken verteilt. Am Folgetag wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.2.9. Verwendete Zelllinien

Zur Durchführung der Experimente wurde einerseits die HEK293T-Zelllinie verwendet (humane embryonale Nierenzelllinie). Diese Zelllinie ist durch adenovirale Transduktion eines *SV40 large T antigen* immortalisiert. Die Kultur erfolgte in einem feuchten Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre. Als Zellkulturmedium wurde DMEM mit 10% FBS verwendet. Andererseits wurden humane konditional immortalisierte Podozyten verwendet. Initial wurde die podozytäre Zelllinie durch retrovirale Einbringung einer temperatursensitiven *SV40 large T antigen*-Variante von Moin A. Saleem generiert. Die Zelllinie erlaubt die Kultivierung bei einer permissiven Temperatur von 33 °C (5% CO₂). Zur Differenzierung erfolgte die Kultivierung bei der nichtpermissiven Temperatur von 37 °C für 14 Tage (5% CO₂). Das Zellkulturmedium bestand aus RPMI mit 10% FBS sowie 1% ITS.

3.2.10. Arbeit in der Zellkultur

Die Arbeit in Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Zellkultur-Werkbank mit sterilem Abzug (*laminar flow workbench*, HEPA-Filter). Verbrauchsmaterialien und Arbeitsflächen wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert oder autoklaviert. Die Kultur erfolgte in 10 cm-Zellkulturschalen, für Experimente wurden Zellen neben 10 cm-Schalen auch in 6-, 12, oder 96-Well-Platten ausgebracht.

Während der Kultivierung wurde das Zellkulturmedium dreimal wöchentlich nach Absaugen des alten Mediums und Waschen mit 1xPBS gewechselt. Subkultivierung erfolgte ab einer Konfluenz von 80% bis 90%. Nach Absaugen des Mediums und einem Waschvorgang mit angewärmtem 1x PBS (25-30 °C) wurde Trypsin auf die Zellen gegeben und die Zellkulturschalen bei Kulturtemperatur inkubiert. Nach Verlust der Adhärenz wurde die Trypsinisierung mit FBS-haltigem Kulturmedium unterbrochen und die Zellsuspension gleichmäßig auf zwei (humane immortalisierte Podozyten, Moin) oder sechs (HEK293T) Zellkulturschalen verteilt. Zellen zur Verwendung in Experimenten wurden nach Zählung in einer Neubauer-Zählkammer auch in 6/12/96-Well-Zellkulturplatten ausgesät.

3.2.11. Applikation von mechanischem Stress *in vitro*

Die Applikation von mechanischem Stress *in vitro* erfolgte mithilfe des proprietären FlexCell-Systems, basierend auf digital gesteuerter pneumatischer Verformung von flexiblen Zellkulturgefäßen. Diese Zellkulturgefäße wurden vor Aussäen der Zellen unter sterilen Bedingungen mit Kollagen I sowie Fibronectin beschichtet. Die Kultur erfolgte in einem dedizierten Inkubator unter den oben genannten Bedingungen. Der Inkubator wurde mit einem pneumatischen System und entsprechender Sensorik an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Die Ansteuerung der Vakuumpumpe erfolgte über das Programm FlexSoft.

3.2.12. Ernten der Zellen

Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde eiskaltes 1x PBS in die Zellkulturgefäße gegeben. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß beziehungsweise ein 15 ml Falcon überführt. Durch Zentrifugation mit 800 rpm für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand vom Zellpellet getrennt. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die weitere Behandlung des Zellpellets entsprechend der angewandten Methode. Zur späteren Verwendung wurden Zellpellets in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.13. Auswahl der gRNA für CRISPR/Cas9

Mithilfe des Wellcome Genome Editing-Webtools wurden CRISPR-Sequenzen im gewünschten Abschnitt berechnet. Das Ergebnis wurde für die 25% CRISPR-Kandidaten mit den geringsten prädizierten off-target-Effekten gefiltert. Über das inDelphi-Webtool wurde die Kandidaten mit günstigen indel-Größen identifiziert. Die verbliebenen CRISPR-Kandidaten wurden in Benchling erneut hinsichtlich der prädizierten on/off-target-Effekte verglichen und zwei nicht überlappende CRISPR-Kandidaten zur weiteren Verwendung ausgewählt.

3.2.14. Klonierung der Plasmide für CRISPR/Cas9

Oligonukleotide, die die gewünschte gRNA-Sequenz enthielten, wurden von einem kommerziellen Anbieter (IDT) bezogen. Zur Generierung eines gRNA-Doppelstrangs wurde der Versuchsansatz mit 5'-3'-Oligonukleotid sowie 3'-5'-Oligonukleotid zunächst bei 37 °C für 30 min phosphoryliert und dann bei 95 °C für 5 min denaturiert. Durch eine Temperaturrampe von -5 °C/min bis auf 25 °C wurde die Hybridisierung erreicht. Der Oligonukleotid-Doppelstrang wurde mittels Restriktionsverdau mit BbsI und Ligation mit T7-Ligase in einen pSpCas9(BB)-2A-GFP-Backbone integriert. Das Plasmid (Tabelle 9) wurde uns freundlicherweise durch Feng Zhang zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle diente ein Versuchsansatz ohne sgRNA-Insert.

Das Ligaseprodukt wurde wie oben beschrieben in DH10-Bakterien transformiert, durch Miniprep aufgereinigt und die Region des gRNA-Inserts mittels Sangersequencing überprüft. Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden humane immortalisierte Podozyten in 10 cm-Schalen kultiviert und bei einer Konfluenz von 60% mit den generierten Plasmiden transfiziert.

Reagenz	Menge
gRNA-Oligonukleotid (vorwärts)	1 µl
gRNA-Oligonukleotid (rückwärts)	1 µl
T4 PNK	1 µl
T4 Ligase Buffer 10x	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 21: Annealing der gRNA-Oligonukleotide

Reagenz	Menge
Oligonukleotid-Doppelstrang	2 µl
Plasmid pSpCas9(BB)	100 ng

BbsI	1 µl
DTT 10mM	1 µl
ATP 10mM	1 µl
T7 Ligase	0,5 µl
T4 Ligase Buffer 10x	2 µl
Tango Buffer 10x	2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 22: Klonierung der Cas9-Plasmide

3.2.15. Fluorescence activated cell sorting (FACS) und Screening der Zellklone

Nach lichtmikroskopischer Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen wie beschrieben geerntet und mit PBS in ein Falcongefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 800 rpm bei 4 °C wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert. Durch die 2A-eGFP-Region der verwendeten Plasmide ermöglicht, wurde eine Sortierung der transfizierten Zellen mittel *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) vorgenommen. GFP-positive Zellen wurden mit einer Zelle pro Well in 96-well-Platten überführt. Über die nächsten Wochen wurden die 96-Well-Platten regelmäßig auf Wachstum von Zellklonen inspiziert. Einzelne kontaminierte Wells wurden mit Penicillin/Streptomycin-haltigem Zellkulturmedium befüllt, um weitere Kontaminationen zu vermeiden. Bei Konfluenz wurden die Zellen in 96-Well-Platten parallel in einer Erhaltungs- und Analyseplatte subkultiviert.

Zur Analyse wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 1x PBS gewaschen und mit 30 µl CRISPR-Lysepuffer für 5 min bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert. Danach wurde das Lysat in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und für 60 min bei 56 °C bebrütet. Zum Screening erfolgte eine PCR mit die prädisierte CRISPR/Cas9-Schnittstelle flankierenden Primern. Anschließend wurde aus einem Aliquot des PCR-Produktes nach Exo-SAP-Aufreinigung eine Sangersequenzierung durchgeführt. Die Analyse der Chromatogramme erfolgte mit Benchling sowie einem Mischsequenz-Lesealgorithmus¹¹⁵.

Reagenz	Menge (Konzentration)
Template DNA (PCR Produkt)	8 µl
Exo-I	0,075 µl
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	0,3 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 23: Exo-I-SAP Aufreinigung

3.2.16. Co-Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wird ein spezifischer Antikörper auf einem festen Substrat, in diesem Fall Protein G Beads, fixiert. Die Proteine mit dem entsprechenden Epitop aus der Probe werden von dem spezifischen Antikörper gebunden. Neben dem Zielprotein präzipitieren an das Zielprotein gebundene weitere Proteine und RNA an den Beads. Die Detektion der Proteine und Interaktoren erfolgt im Immunoblot¹²¹.

Die Arbeitsschritte bei der Immunpräzipitation wurden auf Eis durchgeführt. Zellpellets wurden mit 1x modifiziertem RIPA-Puffer resuspendiert und für 15 min inkubiert. Danach wurden die Proben für 9 s mit einer Amplitude von 25% sonifiziert. Im Anschluss wurde das Lysat für 15 min bei 14.000 rpm ultrazentrifugiert. Nach Asservierung einer Probe von 30-50 µl des Lysats als Kontrolle wurden 800-900 µl zur weiteren Aufarbeitung verwendet.

Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen wurden die Proben zunächst mit 30 µl Protein G Beads ohne Primärantikörper für 60 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert und die Protein G Beads nach Zentrifugation mit 14.000 rpm für 3 min verworfen. Dann wurde der spezifische Antikörper (αBAG3) zugesetzt und für weitere 60 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden drei Waschgänge, jeweils mit Zentrifugation bei 2000 rpm für 3 min und Absaugen des Überstandes sowie Resuspension der Beads im IP-Buffer, durchgeführt. Nach dem letzten Waschgang wurde der Überstand entfernt und das Bead-Pellet für weitere Experimente verwendet.

3.2.17. SDS-PAGE Western Blot (Immunoblot)

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese wird zunächst die Eigenladung von Proteinen einer Probe durch Beladung mit dem anionischen SDS überdeckt und Disulfidbrücken durch Reduktion mit Dithiotretiol reduziert, sodass nach Anlegen einer Spannung über die Matrix eines Acrylamidgels die Trennung der Proteine nach ihrer Größe erreichen lässt. Anschließend erfolgt der Transfer auf eine Trägermembran, auf der mit spezifischen Antikörpern eine Peptidsequenz nachgewiesen werden kann.

Zellpellets oder Protein-Bead-Komplexe wurden mit 1x Laemmli-Puffer mit 100 mM DTT resuspendiert. Zellysate wurden im 1:1 Verhältnis mit 2x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden dann für fünf Minuten bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden gemeinsam mit dem Größenstandard auf 10% Polyacrylamidgele geladen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst mit 70 V für 30 min, dann bei 25 mA für 90-120 min.

3.2.18. Western Blot / Immunoblot

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch Semi-Dry-Blotting vom Gel auf die Trägermembran transferiert. Gele wurden 10 min im Transferpuffer äquilibriert, die Trägermembran in Methanol aktiviert. Gel und Transfermembran wurden zwischen transferpuffergetränktem Blotpapier in die Transferkammer eingelegt. Das Blotting erfolgte bei 12 V für 60 min. Die Trägermembran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in 5% BSA geblockt und anschließend dreimal für 5 min mit Protein-Waschpuffer behandelt. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag folgten erneut drei Waschschrte. Die Inkubation mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern erfolgte danach für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran erfolgte Entwicklung mit ECL-Lösung in der Dunkelkammer.

3.2.19. Immunfluoreszenz-Färbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung (IF) wird die Bindung von Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern an spezifische Primärantikörper genutzt, um die räumliche Verteilung von einem oder mehreren Epitopen in Zellkultur oder im Gewebe zu ermöglichen.

Zellen wurden auf Deckgläsern in 6- bzw. 12-Well-Platten ausgesät. Bei Erreichen von 60-80% Konfluenz wurde nach Absaugen des Zellkulturmediums und einmaligem Waschen mit 1x PBS für 15 min mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurde noch dreimal mit 1xPBS gewaschen und das Deckglas aus dem Zellkulturgefäß entnommen.

Danach wurde für 30 min mit IF-Blocking-Puffer in einer feuchten Kammer geblockt. Nach dreimaligem Waschen wurde für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht mit Primärantikörper inkubiert. Im Falle von Co-Stainings erfolgte die Inkubation simultan. Nach dreimaligem Waschen wurde dann für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit DAPI-haltigem Eindeckmedium auf Objektträger gebracht. Die Analyse erfolgte mittels AxioVert A.1 Fluoreszenzmikroskop.

3.2.20. Massenspektrometrie

3.2.21. Probenvorbereitung für LC-MS/MS

Proteomanalysen durch LC-MS/MS sind auf eine möglichst vollständige Extraktion der Proteine aus dem Probenmaterial angewiesen, gleichzeitig gilt es Interaktoren wie Salze, Detergenzien oder Chromatin aus dem Probenmaterial zu entfernen. MS-Proben wurde nach dem *single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation*-Protokoll (SP3)¹²² behandelt:

Das Pellet wurde mit 300-500 μ l 8 M Urea-Puffer in 50 mM Ammonium-Bikarbonat mit *Halts' phosphatase protease inhibitor* resuspendiert und gevortext. Anschließend erfolgte eine Sonifikation (1 Hz, 1 min, 10% Amplitude, 10% Zyklus). Anschließend wurde für 45 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde ein Aliquot zur Proteinbestimmung via BCA-Assay abgenommen. Hierauf basierend wurden 20 μ g Protein je Probe eingesetzt. Weiter erfolgte zur Reduktion der Proteine die Zugabe von 10 mM DTT. Danach wurde durch Zugabe von 50 mM IAA die Probe im Dunkeln alkylert.

Es erfolgte die Zugabe von magnetischen Beads im Masseverhältnis 10:1 zum Proteingehalt der Probe. Nach Zugabe von 80% Ethanol im Volumenverhältnis 1:1 wurde die Probe für 5 min bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden auf einen Magnetständer gestellt und zugewartet, bis die magnetischen Beads sich der Wand des Reaktionsgefäßes anlegten. Die magnetischen Beads wurden mit 180 μ l 80% Ethanol aufgefüllt und resuspendiert. Der Arbeitsschritt wurde dann zweimal wiederholt.

Zum Peptidverdau wurde 100 μ l MS-Digestionslösung Trypsin + LysC hinzugefügt. Zur Verteilung der magnetischen Beads und Benetzung mit der MS-Digestionslösung wurde für 10 min bei 1000 rpm im Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Nach Rekonstitution der Lösung folgte eine Inkubation für maximal 18 h. Die Probe wurde dann für 2 min bei 14.000rpm zentrifugiert und der Überstand zur Analyse in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Durchführung der Massenspektrometrie erfolgte in der Proteomics Core Facility des CECAD-Forschungsclusters mit einem Q Exactive Plus Orbitrap Quadrupole Massenspektrometer.

Soweit nicht anders beschrieben wurden die Analysen als sogenannter *shotgun* Ansatz durchgeführt, bei dem eine simultane Analyse mehrerer tausend Proteine gleichzeitig erfolgen kann. Die Proben replizierter Experimente wurden in einem Durchlauf verarbeitet und der MS zugeführt und Signifikanzunterschiede durch *batch*-Effekte zu vermeiden. Zur Analyse wurden die LFQ-Werte verwendet. Es wurden jeweils fünf Replikate pro Bedingung gemessen. Das *Parallel reaction monitoring* (PRM) erfolgte ohne Replikation. Proteine die anhand einer umgekehrten (*reverse*) Peptidsequenz identifiziert wurden, potentielle Kontaminanten sowie Proteine die nur anhand eines modifizierten Peptids erkannt wurden sowie Peptide die nur in einer einzelnen Probe gemessen wurden, wurden von der Datenanalyse ausgeschlossen. Linearisierung erfolgte durch Logarithmierung (\log_2), Normalisierung von Replikation erfolgte durch Mediansubtraktion. Soweit nicht anders benannt, wurde eine *false discovery rate* (FDR) = 0,05 und $S_0 = 0,1$ für die statistische Analyse verwendet.

3.2.22. Statistik

Dargestellte Signifikanzniveaus wurden mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) bzw. ns. (nicht signifikant) für Experimente mit drei unabhängigen Replikaten gekennzeichnet. Zur Analyse wurde R-

Studio verwendet mit Ausnahme der LC-MS/MS-Datensätze. Diese wurde mit MaxQuant bzw. Perseus analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung von BAG3-defizienten Podozyten mittels CRISPR/Cas9

4.1.1. Auswahl der CRISPR-Zielsequenz

Mit dem Ziel der Generierung eines BAG3-Knockouts wurde der Ansatz mit einer einzelnen gRNA gewählt, da durch die zumeist resultierende nicht-homologe Endstückverbindung (*non-homologous end joining, NHEJ*) häufig indel-Mutationen auftreten, die eine Verschiebung des DNA-Leserasters bedingen (*frameshift-mutation, fs*). Die Suche einer Zielsequenz mit PAM erfolgte sowohl auf dem codogenen als auch dem nicht-codogenen Strang. Als Ziel-Region wurde Exon 2 von BAG3 verwendet, da in diesem Bereich eine IPV-Domäne liegt, die zur Assoziation mit HSPB8 im BAG3-Komplex führt. Für die sgRNA Suche wurde wie beschrieben das Wellcome Genome Editing-Webtool verwendet.

Name	Sequenz	Stran	Schnittpositi	on-target	off-target
		g	on		
gRNA #1	TGAAGGCGCTGAGAACCGGC AGG	+	119651992	61,5	44,6
gRNA #2	GTTCGGAATCGCTGCATCCC AGG	-	119652030	52,5	46,8

Tabelle 24: Übersicht der verwendeten gRNA sowie prädizierte on-target/off-target-Scores; on target: berechnet nach Rule set 2¹²³; off-target: berechnet nach CFD-Score (Doench et al. 2016)

Wir verwendeten die Strategie und Plasmide nach Ran et al¹²⁴. Oligonukleotide mit der jeweiligen gRNA und einer BbsI-Schnittstelle wurden in Benchling erstellt und von einem kommerziellen Anbieter bezogen. Nach dem Annealing wurde die gRNA-codierende dsDNA in den pSp(Cas9)-2A-GFP-Vektor kloniert und humane immortalisierte Podozyten damit transfiziert. Nach lichtmikroskopischer Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen per FACS in 96-Well-Platten sortiert. Die Platten wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Zellwachstum inspiziert und bei 60-80% Konfluenz gescreent.

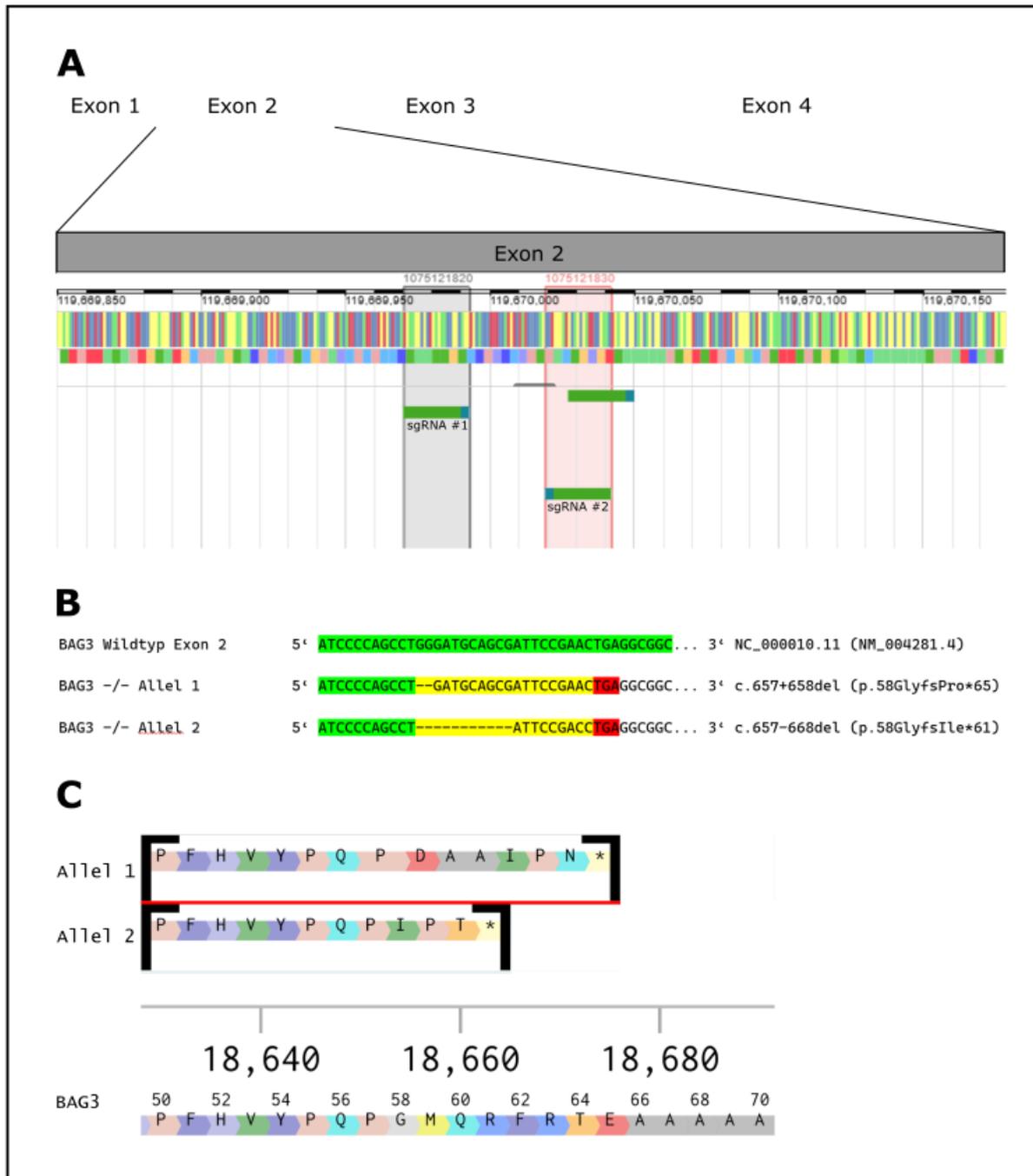


Abbildung 6 A: Darstellung der Zielsequenz in Exon 2 von BAG3. Verwendet wurden zwei nicht-überlappende gRNA, wobei gRNA#1 eine Zielsequenz auf dem codogenen Strang und gRNA#2 eine Zielsequenz auf dem nicht-codogenen Strang hatte. **B:** Sequenzierung für den weiter verwendeten Klon von gRNA#2. Der *compound* heterozygote Genotyp führt zu zwei Leserastermutationen. **C:** Translation für die Leserasterverschiebungen mit Stopcodon in Exon 2 an Position 61 bzw. 65.

4.1.2. Validation der CRISPR-Zelllinien: Sequencing

Zum Screening auf indel-Mutation im Exon 2 von BAG3 wurde eine PCR mit flankierenden Primern um Exon 2 entworfen. In der PCR aus gDNA der BAG3wt-Podozytenlinie zeigten sich

je nach Primerpaar PCR-Produkte von ca. 350 bp Länge für Primerpaar BAG3Exon2 fw/rev1 bzw. 320bp Länge für das Primerpaar BAG3Exon2 fw/rev2.

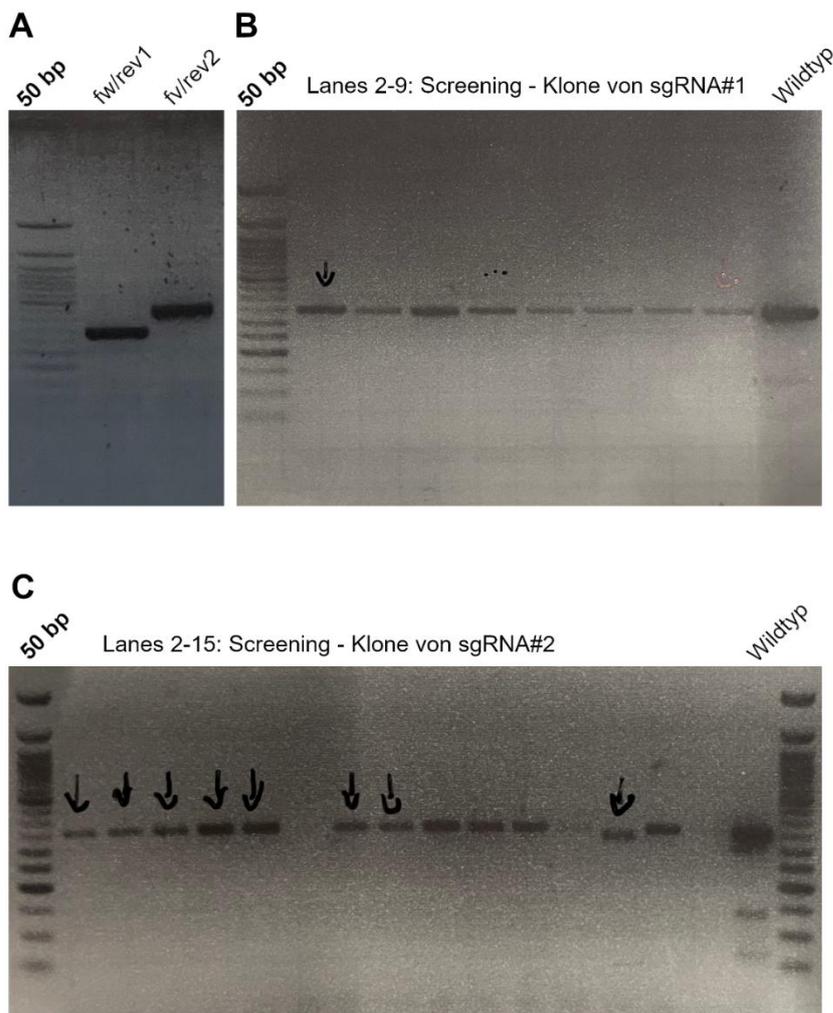


Abbildung 7: PCR zum Screening der indel-Mutationen in Exon 2 von BAG3. Es wurden zwei Primerpaare getestet (**A**) und das Primerpaar BAG3 Exon 2 fw/rev2 für die weiteren Screening-PCRs verwendet. Podozyten wurden nach Transfektion mit pSpCas9(gRNA#1)-2A-GFP (**B**) bzw. pSpCas9(gRNA#1)-2A-GFP (**C**) mittels FACS 96-Wellplatten ausgesät und wachsende Zellklone mittels BAG3 Exon 2-PCR analysiert. Klone mit einer PCR-Bande entsprechend ca. 320bp oder kleiner wurden weiter mittels Sangersequenzierung analysiert. Handschriftliche Pfeile: Klone, die während dem Screeningprozess weiter sequenziert wurden.

Nach Etablierung der BAG3 Exon2-PCR wurden die CRISPR-Klone im Screening untersucht: Klone mit positiver PCR wurde weiter mit Sangersequencing auf die genaue indel-Mutation untersucht. Beispielhaft zeigte das Sequenzierungsergebnis eines durch gRNA#2 generierten Klons einen compound heterozygoten Genotyp, der durch eine Rastermutation zu einem Stopcodon an Position 61 bzw. 65 führt (Abbildung 6 C).

4.1.3. Validation mittels Western Blot

Im nächsten Schritt erfolgte die Überprüfung der BAG3-Expression im Western Blot. Hierzu wurden Klone, deren Sequenzierungsergebnis eine indel-Mutation mit Stopcodon in Exon 2 voraussagte in 10 cm Schalen ausgesät und bei 60-80% Konfluenz geerntet. Als Kontrolle dienten immortalisierte humane Podozyten sowie transient mit einem 3Flag.BAG3-Plasmid transfizierte HEK293T-Zellen.

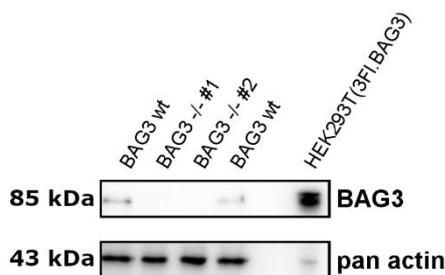


Abbildung 8: Western Blot zur Validierung des BAG3-Knockouts auf Proteinebene der CRISPR/Cas9-generierten Podozytenlinie. Es wurden 20 µg Protein pro Geltasche verwendet. Pan-actin wurde als Ladekontrolle verwendet. BAG3wt-Podozyten zeigen eine Bande auf Höhe von ca. 85 kDa. BAG3^{-/-}-Podozyten zeigen keine Bande. Bag3^{-/-} #2 ist der Klon, der für die weiteren Arbeiten verwendet wurde.

Während BAG3wt-Podozyten eine Bande bei ca. 85 kDa zeigten, ließ sich bei Zelllinien, die mittels gRNA#1 bzw. gRNA#2 generiert wurden, keine Bande feststellen. WB-Gele wurden nach BCA-Assay normalisiert mit 20 µg pro Tasche beladen. In der Ladekontrolle mit Pan-actin zeigten sich keine Unterschiede zwischen BAGwt-Podozyten und BAG3^{-/-}-Podozyten. HEK293T(3FI.BAG3) zeigten eine breite Bande von 85-100kDa (Abbildung 8).

Nachfolgend aufgeführte Experimente wurden mit der BAG3^{-/-}-Podozytenlinie durchgeführt, die mit durch CRISPR/Cas9 unter Verwendung von gRNA#2 generiert wurde und deren Sequenzierung in Abb. 6B gezeigt wurde.

4.1.4. Validation mittels Immunfluoreszenzfärbung

Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf PFA-fixierten Podozyten durchgeführt. Hier zeigten die BAG3-wt-Podozyten ein deutliches zytosolisches sowie nukleäres Signal. Die Belichtungszeiten der Fluoreszenzspektra wurden ausgehend von den BAG3wt-Podozyten angewendet. BAG3^{-/-}-Podozyten zeigten ein schwaches nukleäres Signal. Die Farbgebung der Cy3- und Cy5-Kanäle wurde zur besseren Unterscheidbarkeit im *merge*-Bild gewählt.

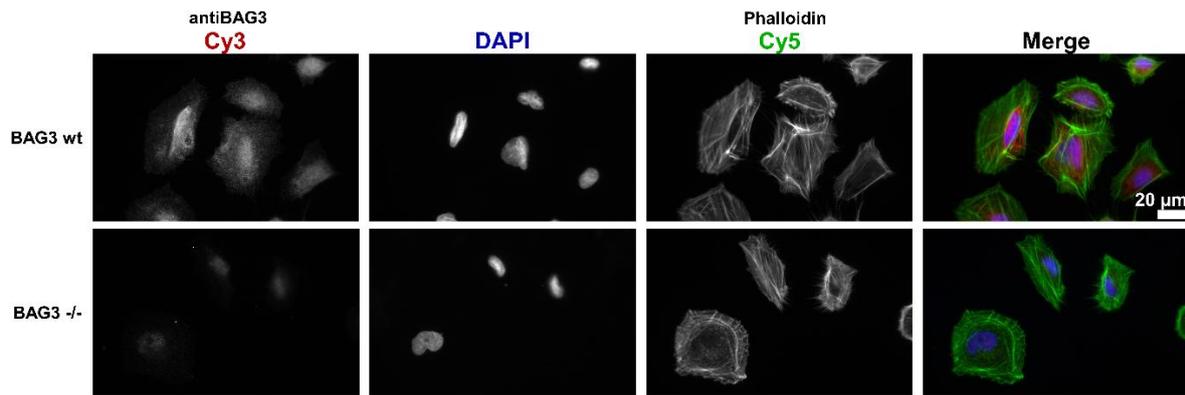


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung auf 4%PFA-fixierten Podozyten, 63x Objektiv. BAG3 zeigt in BAG3wt-Podozyten ein granuläres zytosolisches Signal im Cy3-Kanal. BAG3-defiziente Podozyten zeigen ein minimales Signal, welches mit nukleär färbendem DAPI überlappt, N=3.

Um BAG3-abhängige Veränderungen im Proteom zu erkennen und Interaktionspartner zu identifizieren, wurden Protinlysate mit MS/MS untersucht sowie eine Immunpräzipitation von differenzierten BAG3-wt-Podozyten und BAG3^{-/-}-Podozyten durchgeführt (Abb. 10). In der Immunpräzipitation wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet: ein polyklonaler Antikörper (α BAG3 pAB) mit Spezifität für Aminosäuren 275-575 des BAG3-Proteins und ein monoklonaler Antikörper (α BAG3 mAB) mit Spezifität für Aminosäuren 478-575. BAG3-wt-Podozyten zeigten im Lysat eine klare Bande bei 85 kDa. Auch Immunpräzipitate durch α BAG3 pAB und α BAG3 mAB zeigten diese Bande. Die BAG3^{-/-}-Podozyten zeigten nach Färbung mit α BAG3mAB im Lysat eine schwache Bande und auch in den Immunpräzipitaten fiel eine minimale Bande auf.

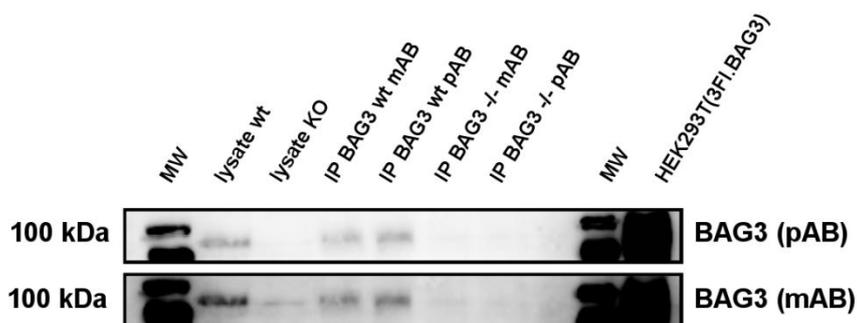


Abbildung 10: BAG3-Co-Immunpräzipitation von BAG3-Wildtyp und BAG3-defizienten Podozyten. Die Co-IP wurde mit einem monoklonalen und mit einem polyklonalen BAG3-Primärantikörper durchgeführt. Das Lysat und beide Immunpräzipitate der Wildtyp-Zelllinie zeigten deutliche Banden für BAG3 auf Höhe von ca. 85 kDa. Die als Positivkontrolle verwendeten, transient mit 3FI.BAG3 transfizierten, HEK293T-Zellen zeigten eine sehr intensive Bande bis 100 kDa. In der Färbung mit monoklonalem BAG3-Primärantikörper zeigt sich auf Höhe von 85 kDa auch im Lysat der BAG3^{-/-}-Zelllinie eine Bande.

Aufgrund dieser Ergebnisse, die wir als Hinweis auf fehlende Spezifität des monoklonalen Antikörpers werteten, wurde die folgenden Co-Immünpräzipitation für MS/MS mit dem α BAG3pAB durchgeführt (Abb. 11). Hierbei wurden die Knockout Zellen als Negativkontrolle verwendet.

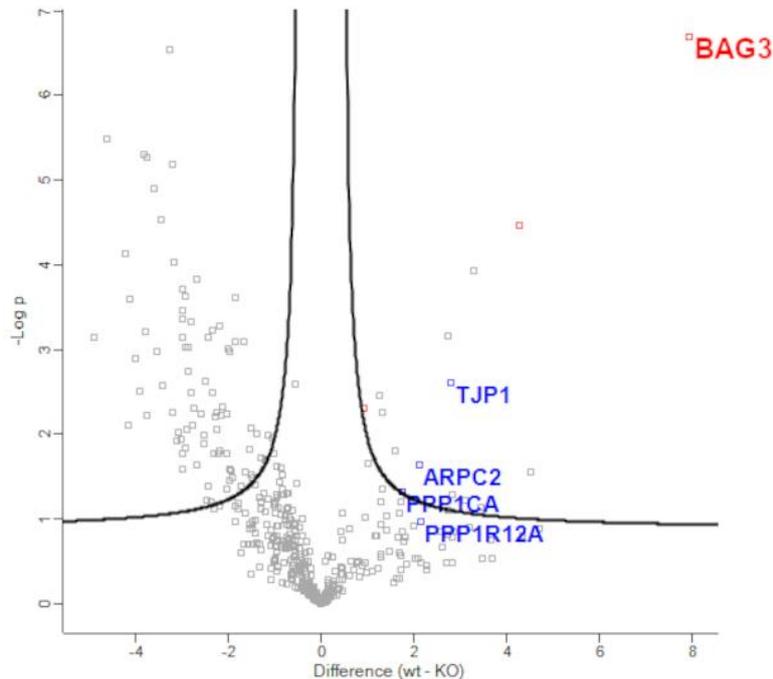


Abbildung 11: LC-MS/MS von humanen BAG3wt- versus BAG3^{-/-}-Podozyten nach Immunpräzipitation mit α BAG3pAB. TJP1 (ZO-1) trat in BAG3wt-Podozyten vermehrt auf, ebenso ARPC2. Weiterhin konnten PPP1CA und PPP1R12A angereichert nachgewiesen werden. $FDR=0,1$; $S0=0,3$

BAG3-Peptid konnte dabei in BAG3wt-Podozyten angereichert nachgewiesen werden. Ebenso traten *Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A* (PPP1R12A) und *Protein phosphatase 1 alpha catalytic subunit* (PPP1CA) häufiger in BAG3wt-Podozyten auf. Bestandteile des BAG3-CASA-Komplexes wie HSPB8, HSC70 oder CHIP konnten in diesem Datensatz in BAG3wt-Podozyten nicht angereichert nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde zur zusätzlichen Validierung der KO-Zellen eine zielgerichtete massenspektrometrische Untersuchung der Zelllinien mittels *parallel reaction monitoring* (PRM) durchgeführt. Hierzu werden die Peptide von Interesse quantifiziert, indem die Intensität mit der eines markierten Standardpeptids verglichen wird.

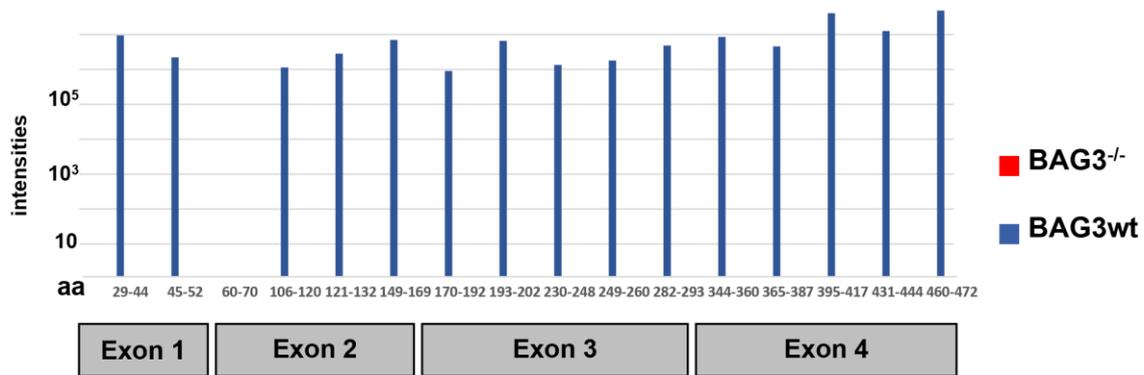


Abbildung 12: Parallel reaction monitoring von BAG3wt-Podozyten und BAG3^{-/-}-Podozyten. Für BAG3^{-/-}-Podozyten konnte keines der abgebildeten BAG3-Peptide nachgewiesen werden.

In den BAG3^{-/-}-Podozyten konnte kein BAG3-Peptid nachgewiesen werden, wohingegen BAG3-Peptide in Wildtyp-Podozyten abundant waren.

4.2 Umsetzung eines Modells für mechanischen Stress *in vitro*

Als nächstes sollte ein Modell umgesetzt werden, um mechanischen Stress in Zellkultur zu applizieren.

Die räumliche Organisation von Zellen und Extrazellulärmatrix *in vivo* führt zu Ausbildung von Organen, die gegenüber mechanischen Kräften eine spezifische Steifigkeit bzw. Elastizität besitzen. Die Verarbeitung und Anpassung an mechanische Stimuli oder Stressoren von einzelnen Zellpopulationen – beispielweise von Podozyten - lassen sich *in vivo* schwer isoliert untersuchen. *In vitro* hingegen bilden Zellen planare adhärenente Verbände auf einer steifen Oberfläche. Die Elastizität eines Gewebes in Pa (Pascal) lässt sich durch den Elastizitätskoeffizienten beschreiben, der der Steigung des linearen Abschnitts einer Spannungs-Dehnungs-Kurve entspricht. Die Elastizität von Nierengewebe bei Säugetieren liegt im Bereich von 16-20 kPa, eine herkömmliche Zellkulturschale aus Plastik hat eine Elastizität von 1-10 GPa¹²⁵. Diese hohe Steifigkeit stellt einen mechanischen Stressor für die kultivierten Zellen dar. Zur Mitigation dieses Effektes können Zellen auf weicherem Substrat kultiviert werden. Mechanischer Stress kann auf verschiedenen Wegen ausgeübt werden. Ob die Anwendung im Experiment physiologisch sinnvoll ist, hängt von der jeweiligen Fragestellung ab: Muskelgewebe wird in der Regel uniaxial tensil belastet, wohingegen Binde- und Stützgewebe auch Kompression ausgesetzt sind¹²⁶. Podozyten sind pulsatilem Scherstress und auch biaxialem tensilem Stress ausgesetzt.

Zur Durchführung der Stretch-Experimente wurde ein pneumatisches System verwendet, das durch Verformung einer flexiblen PDMS-Membran equibiaxialen Stress auf adhärenente Zellen ausübt. Vor Kultivierung wurden die flexiblen Zellkulturplatten mit Kollagen I sowie Fibronectin

beschichtet. In den Experimenten wurde eine Dehnungs-Ratio von $\varepsilon = 17,5\%$ der Zellkulturfläche bei 0,5 Hz mit Sinuskurvenverlauf verwendet. Kontrollen wurden auf gleichermaßen beschichteten flexiblen Zellkulturplatten kultiviert. Durch diesen Versuchsaufbau realisierter mechanischer Stress wird weiter als zyklischer mechanischer Stress beschrieben (ZMS).

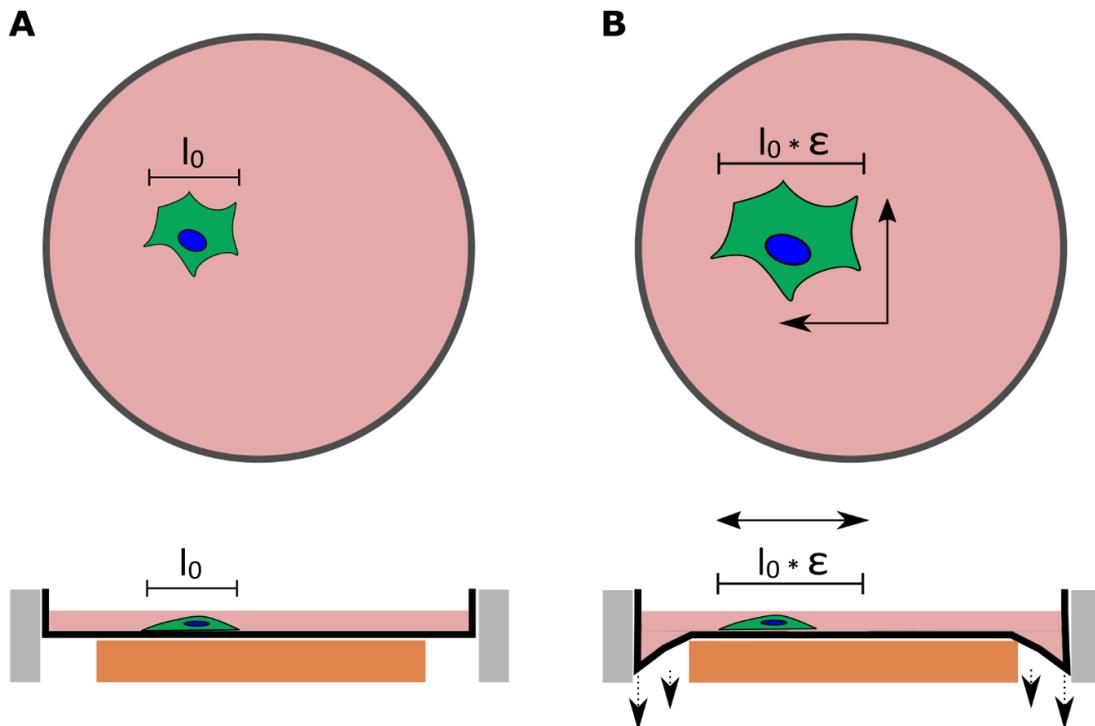


Abbildung 13: Pneumatisches System zur Applikation von mechanischem Stress in vitro. Zellen werden **(A)** in 6-Well-Platten mit elastischem PDMS-Boden (rot und schwarz) kultiviert, der über einem Ladepfosten (orange) gelagert wird. Durch Lagerung auf einer Basisplatte wird die Unterseite des Zellkulturgefäßes abgedichtet. Zur Applikation von mechanischem Stress **(B)** wird über eine digital gesteuerte Vakuumpumpe ein Unterdruck erzeugt. Der Ladepfosten sorgt für eine gleichmäßige radiäre Verformung der PDMS-Membran. Es resultiert ein equibiaxialer Stress durch Dehnung der Membran und adhärenter Zellen um den Faktor ε . Doppelseitige Pfeile: equibiaxialer Stress. Gestrichelte Pfeile: Unterdruck/Vakuum, l_0 : Länge unter Ruhebedingungen

4.2.1. Zyklischer mechanischer Stress reguliert SQSTM1, BAG3 und pERK1/2

Zunächst sollte untersucht werden, wie die Applikation von ZMS in Wildtyp-Podozyten sich auf die Expression von BAG3 auswirkt⁶². Zudem wurden *Sequestosome 1* (SQSTM1; p62) als Indikator für Autophagosomenbildung und pERK1/2 als Effektor von BAG3-regulierten Signalwegen untersucht. Die Podozyten wurden in BioFlex-6-Well-Platten ausgesät und vor der Ernte für bis zu 2h bei 17,5% Dehnungs-Ratio bei 0,5 Hz inkubiert.

Im Western Blot zeigte sich zum 30 min-Messzeitpunkt eine Reduktion der BAG3-Expression unter ZMS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 120 min war die BAG3-Expression jedoch

wieder ähnlich unter ZMS- und Kontrollbedingungen. SQSTM1 zeigte sich zum Zeitpunkt 30 min ebenfalls signifikant unter Stressbedingungen reduziert. pERK1/2 zeigte einen raschen Anstieg unter ZMS und blieb bis zum 120min Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

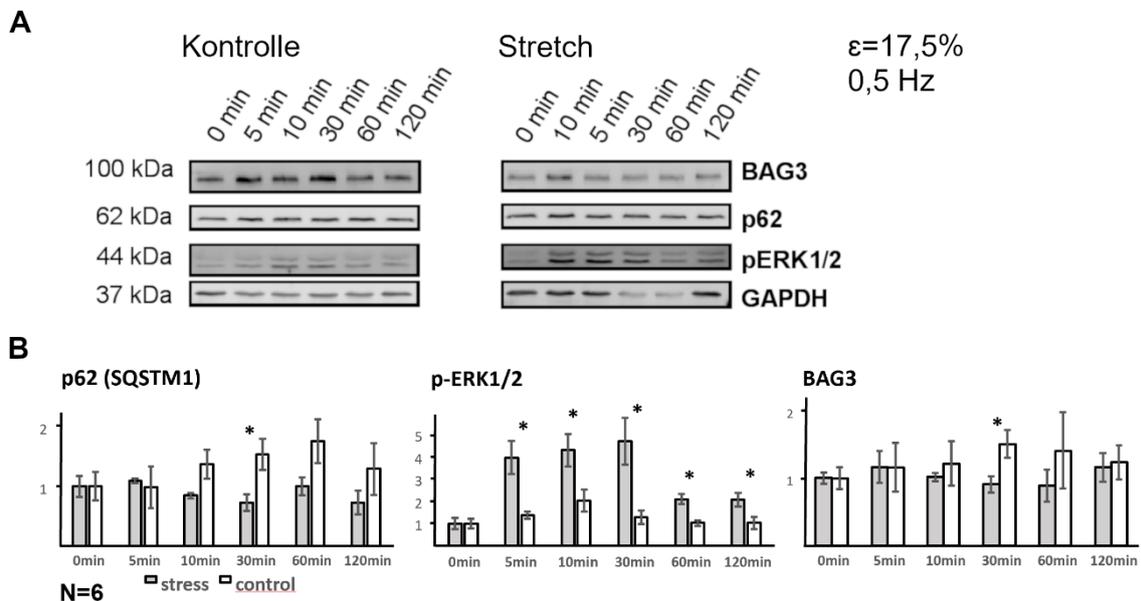


Abbildung 14: Western Blot von BAG3, SQSTM1 und p62 unter mechanischem Stress vs. Kontrollbedingungen. **A:** Western Blot von Podozyten unter mechanischem Stress bzw. Kontrollbedingungen. GAPDH diente als Ladekontrolle. **B:** SQSTM1 und BAG zeigten sich unter mechanischem Stress zum Zeitpunkt 30 min reduziert. pERK1/2 konnte durch mechanischen Stress vermehrt nachgewiesen werden. N=6, Student's t-test, zweiseitig.

4.2.2. Podozyten exprimieren vermehrt BAG3 sowie ARPC5 unter mechanischem Stress

Nachdem im Western Blot die Expression einzelner Proteine durch ZMS beeinflusst werden konnte, folgte eine erneute massenspektrometrische Analyse. Dieses mal wurden Podozyten für 24h unter den genannten Bedingungen ZMS ausgesetzt. Nach 24 h zeigte sich unter ZMS eine erhöhte Expression von BAG3. Weiterhin wurden *Actin-related protein 2/3 complex subunit 5* (ARPC5) und *Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 14B* (PPP1R14B) hochreguliert. Die Expression verschiedener Hitzeschockproteine einschließlich HSPB8, aber auch von SQSTM1 zeigte sich in dem Experiment nicht signifikant verändert. Gegenüber der ZMS-Bedingung zeigten sich unter Kontrollbedingungen verschiedene Kollagene signifikant überexprimiert. In der Hauptkomponentenanalyse des Experiments stellten sich die beiden Gruppen unscharf voneinander getrennt dar. ZMS führte in BAG3wt (Abbildung 16A) und in

BAG3^{-/-}-Podozyten (Abbildung 16A) zur vermehrten Expression von verschiedenen Kollagenen.

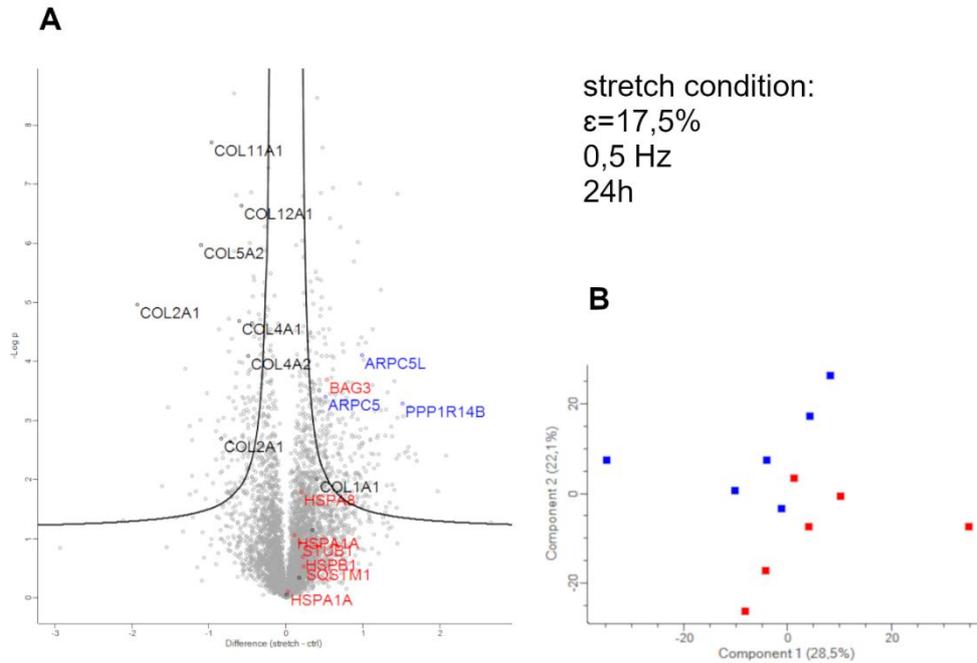


Abbildung 15: A: Volcano Plot von BAG3wt-Podozyten unter Stress- gegenüber Kontrollbedingungen. $FDR=0,05$; $S=0,1$ **B:** Hauptkomponentenanalyse des Experiments. Rot: mech. Stress, Blau: Kontrolle

4.2.3. Zyklischer mechanischer Stress induziert PPP1R14B in BAG3^{-/-}-Podozyten

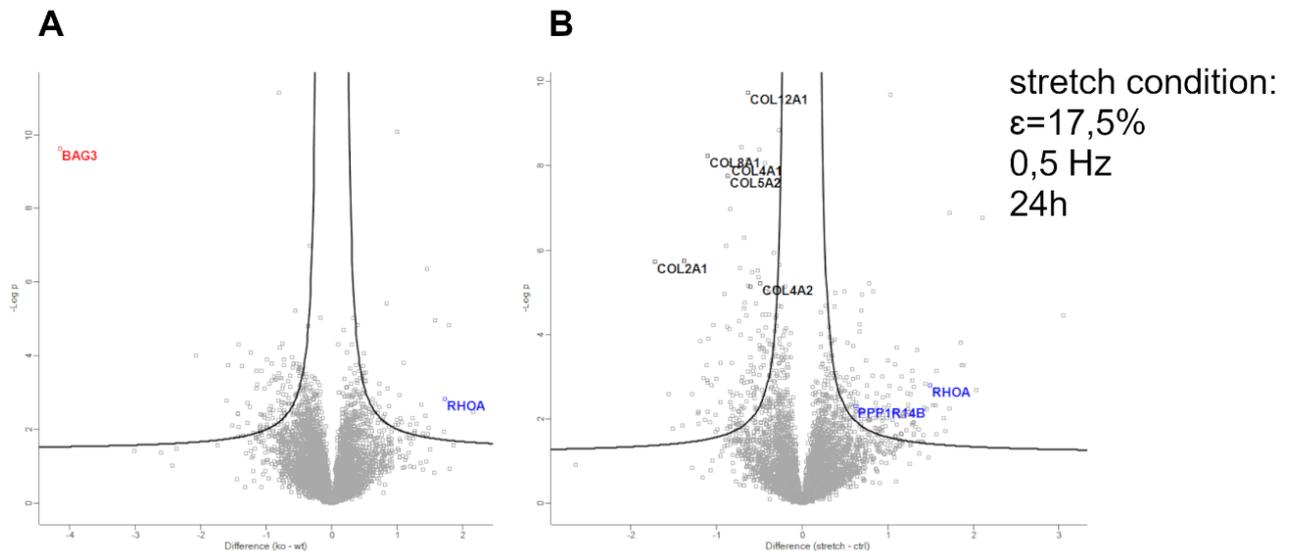


Abbildung 16: **A:** Volcano Plot von BAG3^{-/-}-Podozyten gegenüber BAG3wt. BAG3^{-/-}-Podozyten zeigen vermehrte Expression von RhoA unter Kontrollbedingungen. **B:** Volcanoplot von BAG3^{-/-}-Podozyten unter Kontroll- bzw. mechanischen Stressbedingungen. RhoA und PPP1R14B kommen angereichert vor. $FDR=0,05$; $S=0,1$

Schließlich untersuchten wir das Proteom humaner BAG3wt-Podozyten und BAG3^{-/-}-Podozyten gegenüber Kontroll- und ZMS-Bedingung in einem Experiment. In BAG3^{-/-}-Podozyten (Abbildung 17A) zeigte sich sowohl unter Kontrollbedingungen (Abbildung 17A) als auch unter ZMS (Abbildung 17B) eine vermehrte Expression von RhoA. BAG3^{-/-}-Podozyten zeigten unter ZMS außerdem (Abbildung 17B) eine gesteigerte Expression von PPP1R14B und RhoA.

4.2.4. Die Anwesenheit von BAG3 reguliert die RhoA-Expression

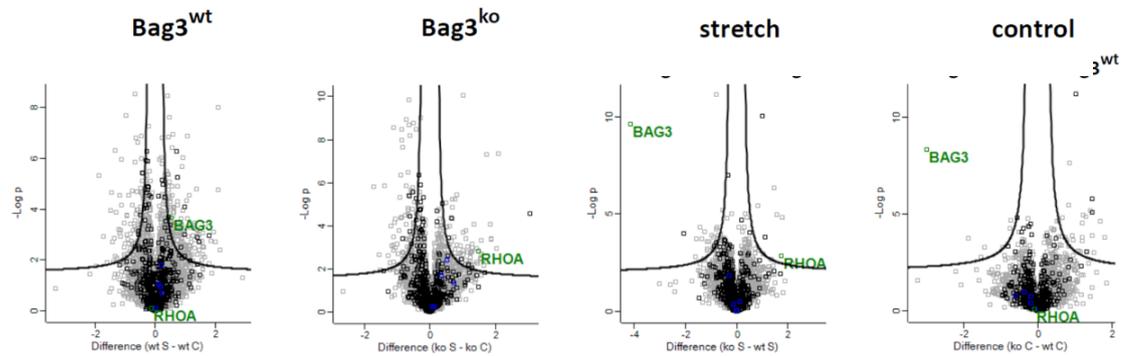
In der gemeinsamen Auswertung der MS Daten zeigt sich in BAG3wt-Podozyten unter ZMS eine gesteigerte BAG3-Expression (Abbildung 17A1). BAG3^{-/-}-Podozyten weisen unter ZMS eine erhöhte RhoA-Expression auf (Abbildung 17A2 und A3). In Wildtyp-Podozyten zeigte sich unter ZMS keine Veränderung in der RhoA-Expression (Abbildung 17A1). Mechanischer Stress führte in BAG3wt-Podozyten zur Regulation von 240 Proteinen (Abbildung 17B1), in BAG3^{-/-}-Podozyten zeigten sich 149 Proteine reguliert (Abbildung 17B2). Der BAG3-Status regulierte hingegen unter ZMS 36 Proteine und unter Kontrollbedingungen nur 30 Proteine (Abbildung 17B3/4).

Eine GO-Term-Analyse (Abbildung 17C) anhand von der UniProt-Datenbank entnommenen Schlüsselwörtern zeigte keine signifikante Regulation in Abhängigkeit vom BAG3-Status. In BAG3^{wt}-Podozyten führte ZMS zur „Hochregulation“ von Proteinen, die z.B. mit den Schlüsselwörtern „Kollagen“, „Basalmembran“ oder „Extrazellulärmatrix“ assoziiert waren, während Schlüsselwörter mit Bezug zu DNA-Modifikationen und posttranslationalen Modifikationen wie „Acetylierung“ und „Methylierung“ negativ reguliert waren (Abbildung 17C1).

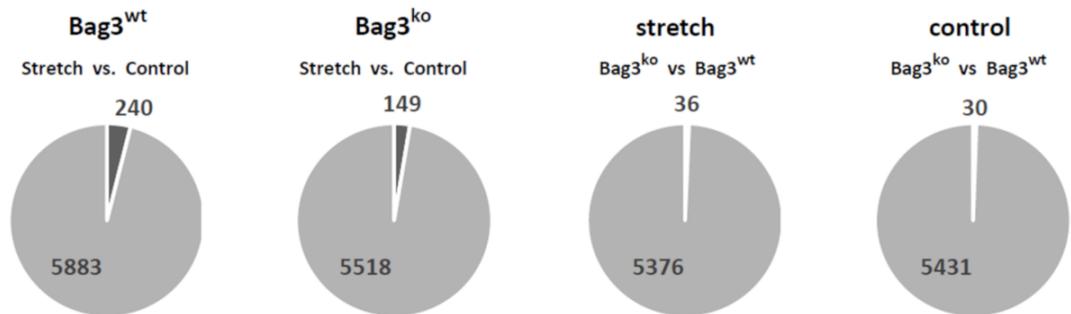
In BAG3^{-/-}-Podozyten zeigten sich neben den Schlüsselwörtern „Collagen“, „Basalmembran“ oder „Extrazellulärmatrix“ auch „Ig-Domäne“, „Zelladhäsion“ positiv reguliert. Negativ reguliert waren die Schlüsselwörter „Nukleus“, „Transkription“, „Phosphoprotein“ und „Acetylierung“ (Abbildung 17C2).

In diesem Versuchsansatz mit zwei Konditionen, BAG3-Status und Stress-/Kontrollbedingung zeigte sich kein BAG3-abhängig reguliertes GO-Vokabular (gegenüber Abbildung 13).

A



B



C

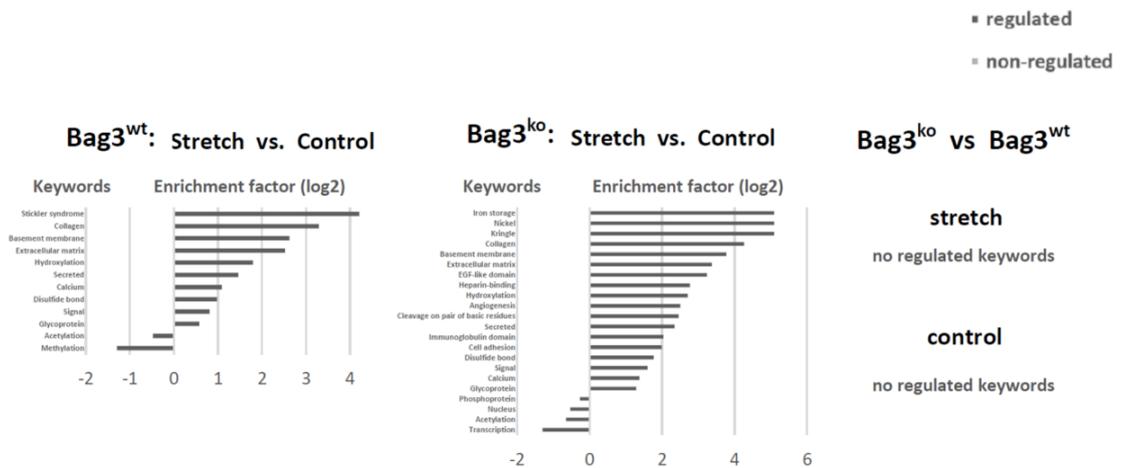


Abbildung 17: Analyse von humanen Podozyten unter Kontroll- und Stretch-Bedingungen sowie in An- oder Abwesenheit von BAG3 (BAG3^{wt} vs. BAG3^{-/-}). **A:** Die BAG3 Expression ist in BAG3^{wt}-Podozyten unter mechanischem Stress erhöht. BAG3^{-/-}-Podozyten zeigen sowohl im Vergleich zum BAG3^{wt} als auch unter Stressbedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine erhöhte RhoA-Expression. *FDR=0,05; S=0,1, schwarz: UniProt-Schlüsselwort „Zytoskelett“*. **B:** Anzahl der regulierten Proteine unter den angegebenen Bedingungen. Mechanischer Stress regulierte eine höhere Anzahl an Proteinen als der BAG3-Status. **C:** GO-Term-enrichment aus UniProt-Schlüsselwörtern.

5. Diskussion

Um die Funktion einzelner Gene und korrespondierender Proteine in einem Organismus zu erforschen ist der *knockout* oder die Überexpression des Gens ein naheliegender Ansatz. Wir haben dazu CRISPR/Cas9 basierte Technologie eingesetzt. Der Weg zu diesen modernen Verfahren war jedoch lang: Als Beatrice Mintz und Rudolf Jaenisch 1974 die erste transgene Maus generierten, waren aber sowohl die DNA-Sequenzierung, als auch PCR-Verfahren noch nicht entdeckt¹²⁷. Die genetische Modifikation bestand in der Integration eines SV40-Virus in das Genom eines Mausembryos. Neben den damaligen technischen Limitationen begrenzten auch letale Phänotypen und die geringe Zahl möglicher Modellorganismen die wissenschaftliche und klinische Anwendung. Seitdem wurden Techniken zur Generierung von Organismen mit konditionalen und organspezifischen genetischen Modifikationen etabliert. Die Entdeckung von RNA-Interferenz (RNAi) ermöglichte die effizienten und zielgerichteten *knockdown* einzelner Gene, zudem wurde ein partieller Knockdown möglich. Allerdings zeigten sich auch hier Grenzen der Methoden. So ist zum Erzielen eines stabilen *knockdowns* mittels RNAi eine endogene Synthese von shRNA oder miRNA erforderlich. Zudem kommt es zu *off target*-Effekten mit schwer vorhersagbaren Konsequenzen für den modifizierten Organismus¹²⁸. Zusätzlich zu einem *knockout* und *knockdown* ermöglichen proteinbasierte Methoden wie *transcriptional activator-like effector nucleases* (TALEN) oder Zinkfinger-nukleasen auch präzise Insertionen und Deletionen im Sinne eines *genome editing*¹²⁹. Da die Spezifität dieser Verfahren von der Modifikation einer Aminosäuresequenz abhängt, sind diese Verfahren aufwändig und zeitintensiv. Beim in der vorliegenden Arbeit eingesetzten CRISPR/Cas9-System hingegen wird die Spezifität von einer RNA bedingt und bestimmt die Zielsequenzen der Nuklease Cas9. So wurde *genome editing* mit hoher Effizienz bis hin zu Multiplex-Verfahren in einer Vielzahl an Organismen verfügbar^{130,131}.

Für Forscher ermöglicht das CRISPR/Cas9-System die effiziente Generierung genetisch modifizierter Organismen zur Überprüfung von Hypothesen. So können Proteine oder Gene, die im Rahmen Omics-Experimenten vielversprechende Signale zeigen, auf biologische Relevanz weiter untersucht werden. Wir nutzen diese Technik, um gezielt Bag3-defiziente Podozyten zu generieren und um so die Rolle von Bag3 in Podozyten und speziell unter mechanischem Stress zu untersuchen. In Abbildung 5 ist der Proteomics-Datensatz dargestellt, der ausschlaggebend für diese Arbeit war. Ausgehend von der Anreicherung von Bag3 und CASA-assoziierten Proteinen in murinen Podozyten sollte die Rolle BAG3 in humanen Podozyten weiter geklärt werden. Ausgehend vom etablierten Phänotyp einer BAG3-Defizienz mit Myopathie wurde ein *in vitro* Modell für mechanischen Stress als weitere Variable eingeführt.

5.1 Generation einer BAG3-defizienten humanen Podozytenlinie – alternative Strategien

Zur Generierung eines BAG3-knockout in humanen Podozyten zielte die gewählte CRISPR/Cas9-Strategie (Abbildung 6A) auf die Generierung einer *missense* oder *nonsense*-Mutation durch *non homologous end joining*-vermittelte Reparatur (NHEJ) der DNA-Doppelstrangbrüche¹¹⁶. Dieser Ansatz ist allerdings fehleranfällig: Zunächst kann durch *exon-skipping* oder Splicevarianten das Ziel-Exon übersprungen werden. Für BAG3 ist eine kürzere Isoform von ca. 40kDa beschrieben. Diese Variante ist allerdings nur in neuronalen Zellen beschrieben und das zugrundeliegende Transkript nicht bekannt⁸⁹. Eine Alternative zur Generierung mittels CRISPR/Cas9-System ist die Verwendung von TALEN. Diese erfordern allerdings die Ko-Transfektion mit beiden TALEN-Armen, was ein Hindernis bei der Arbeit mit hochdifferenzierten Zellen wie humanen Podozyten ist¹³². Außerdem kann auch durch alternative CRISPR/Cas9-Ansätze ein sicherer Knockout generiert werden. Dies erfordert allerdings die Klonierung eines Vektors mit zwei, das Zielgen flankierenden, gRNA¹³³. Da durch FACS eine hohe Anzahl an Klonen zur weiteren Analyse generiert werden konnte, auf die im Fall der Expression einer BAG3-Trunkation zurückgegriffen werden könnte, wurde mit einer einzelnen gRNA fortgefahren. Die Bestätigung eines Expressionsverlustes von BAG3 auf Proteinebene erfolgte letztlich im Western Blot bzw. massenspektrometrisch und konnte in unserem Fall den Knockout von Bag3 zweifelsfrei bestätigen.

Ähnlich der RNAi, ist eine Limitation des CRISPR/Cas9-Systems das Auftreten von *off target*-Effekten, vermittelt durch Cas9-Aktivität außerhalb der intendierten gRNA-Bindungsstelle, die durch Sequenzähnlichkeit entstehen. Modellhaft kann der *cutting frequency determination* (CFD) Score die Häufigkeit dieser Effekte voraussagen. CRISPR/Cas9-Strategien mit mehreren gRNA erzielen hier niedrigere Werte¹²³. Auch unter Verwendung einer optimalen gRNA sind *off target*-Effekte aber nicht auszuschließen. Die Effekte können aber durch parallele Generierung mehrerer Zelllinien abgemildert werden. Auch können spezifische Sequenzierungstechniken, z.B. *genome-wide unbiased identification of DSB (double strand breaks) enabled by sequencing* (GUIDE-seq) zur Detektion von *off target*-Effekten verwendet werden. Sollten Zweifel an der Spezifität der beobachteten Effekte aufkommen, ist auch eine Re-Expression zur Kontrolle möglich.

5.2 Validierung des funktionellen BAG3-knockout: Western Blot und Immunopräzipitation mit den BAG3-Antikörpern

Die Sequenzierung der verwendeten Klone sagte einen heterozygoten Genotyp mit Stopcodon in Exon 2 voraus. Im Western Blot (Abbildung 8) zeigte sich keine BAG3-Bande (ca. 85 kDa)

in beiden BAG3^{-/-}-Podozytenlinien. Die verfügbaren Antikörper binden BAG3 jedoch N-terminal des vorhergesagten Stopcodons (vgl. Abbildung 4; Tabelle 5). Das Vorliegen einer trunkierten BAG3-Variante war also nicht ausgeschlossen. In der Immunpräzipitation (Abbildung 10) konnte mit beiden BAG3-Antikörpern ein BAG3-*Pulldown* in BAG3wt-Podozyten erzielt werden. Allerdings gelang aus BAG3^{-/-}-Podozyten auch der Nachweis einer schwachen Bande in Lysaten und Immunpräzipitaten beider BAG3-Antikörper nach Färbung mit αBAG3mAB. Aufgrund dieses widersprüchlichen Ergebnisses wurden weitere Möglichkeiten zur Validierung des BAG3-Knockouts evaluiert: Eine Möglichkeit böte die *real-time-qPCR* zur Überprüfung, ob ein BAG3-Transkript auf mRNA-Ebene vorliegt. Da durch die vorhergesagte *frameshift*-Mutation nicht notwendig eine Veränderung in der mRNA Expression über *nonsense mediated decay* (NMD) auftreten muss, fokussierten wir auf das Proteome: Um auszuschließen, dass BAG3^{-/-}-Podozyten ein BAG3-Peptid exprimieren, wurde eine quantitative massenspektrometrische Analyse mit dem PRM-Verfahren durchgeführt. Hier konnte in den BAG3^{-/-}-Podozyten kein BAG3-Peptid nachgewiesen werden (Abbildung 12). Mit diesem Ergebnis ist mindestens von BAG3-Defizienz und funktionell auch von einem BAG3-*knockout* der BAG3^{-/-}-Podozyten auszugehen. Für die weitere Diskussion wird daher die Bezeichnung als BAG3-defiziente Podozyten oder BAG3^{-/-} verwendet.

5.3 Immunfluoreszenz auf BAG3^{-/-}-Podozyten

In der Immunfluoreszenz (Abbildung 9) zeigten auch die BAG3^{-/-}-Podozyten ein schwaches nukleäres Signal. BAG3-vermittelte CASA ist ein zytosolischer Prozess, eine nukleäre Lokalisation von BAG3 ist jedoch auch beschrieben und am ehesten mit den transkriptionsregulierenden Eigenschaften von BAG3 assoziiert⁸⁹. Eine vermehrte nukleäre Lokalisation von BAG3 von Jin et al.⁹⁵ unter Hitzestress beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe um Gamerding et al.¹³⁴ konnte durch Inhibition des Proteasomensystems BAG3, aber auch Myosin und Dynein induzieren: beide Ansätze führen entweder durch Fehlfaltung von Proteinen oder erhöhte Anforderung an nicht-proteasomale Autophagiemechanismen zu proteotoxischem Stress. Im Kontext der Immunfluoreszenz ist die vermehrte Expression von mit dem Aktinzytoskelett oder Mikrotubulussystem interagierenden Proteinen von Interesse: Die Phalloidin-färbung zeigte in den humanen Podozyten Aktinstressfasern. Diese liegen mit Myosin und α-Aktinin assoziiert vor und sind kontraktile^{135,136}. In Zellkultur sind Stressfasern auch bei regulär nicht kontraktile Geweben zu beobachten, die auf Oberflächen mit hoher Steifigkeit kultiviert werden¹³⁷. Trotz der in der Literatur beschriebenen Einflüsse von BAG3 auf Zytoskelett-assoziierte Proteine zeigten die Stressfasern und Zellmorphologie der Podozyten sich in der Immunfluoreszenz unabhängig vom BAG3-Status.

Die Bildung von Aktinstressfasern ist ein dynamischer Prozess aus Polymerisation und Depolymerisation, der zur Anpassung an mechanischen Stress dient. Dabei kommt es zu einem Fließgleichgewicht, abhängig von Zeit und mechanischem Stress¹³⁸. Dadurch sind in der IF mit langer Kultivierung der Zellen auf einem Substrat mit hoher Steifigkeit Veränderungen des Zytoskeletts durch BAG3-Defizienz mitunter nicht detektierbar. Diese Beobachtungen sollten konsequenterweise unter kürzerer Kultivierungsdauer oder auf einem Substrat mit geringer Steifigkeit wiederholt werden. Hierzu könnten kürzere Experimente mit adäquatem mechanischem Stimulus durchgeführt werden.

5.4 Die Funktion von BAG3 im Podozyten ist nicht auf CASA beschränkt

Die Immunpräzipitation ist ein gängiges Verfahren, um die Zusammensetzung von Proteinkomplexen zu untersuchen¹³⁹. In der Co-IP mit α BAG3-pAB konnten zwar Komponenten und Bindungspartner des BAG3-CASA-Komplexes nachgewiesen werden (HSC70 und HSPB1, vgl. Tabelle 25). HSPB8 wurde aber nicht signifikant angereichert und CHIP überhaupt nicht detektiert. GO-Term-Analysen der Co-IP/MS rücken weiterhin die Assoziation mit dem Aktinzytoskelett und Eigenschaften bei der Transkriptionsregulation in den Vordergrund. Beispielsweise konnte mittels LC-MS/MS ein BAG3-abhängiger *pull-down* von ZO-1 sowie ARPC2 gezeigt werden (Abbildung 11). ZO-1 ist auf Zytosolseite Bestandteil der *zonula occludens*, und ein Bestandteil der Schlitzmembran. Die intrazellulären Domänen von ZO-1 interagieren mit dem Aktinzytoskelett über α -Actinin¹⁴⁰. Die Aufrechterhaltung der *zonula occludens* über Kolokalisation von ZO-1 mit Neph1⁵⁴ unterstützt die Integrität der Schlitzmembran. ARPC2 ist als Teil des ca. 240kDa großen Arp2/3-Komplexes zentral bei der Bildung von filamentärem (F-) aus globulärem (G-) Aktin^{141,142}.

5.5 CHIP ist nicht Teil des BAG3-Interaktoms in humanen Podozyten

Beachtlich ist ein Negativbefund der massenspektrometrischen Analyse: Die Ubiquitinligase CHIP als Co-Chaperon des BAG3-CASA-Komplexes konnte nicht nachgewiesen werden. Bereits Rinschen et al.¹¹³ konnten CHIP nicht in murinen Podozyten nachweisen. Insbesondere nach Immunpräzipitation wäre jedoch eine Anreicherung von BAG3-Interaktionspartnern zu erwarten gewesen. Die Anreicherung von BAG3 im Volcano Plot (Abbildung 11) deutet zunächst nicht auf ein technisches oder experimentelles Problem hin. In späteren Experimenten auf undifferenzierten humanen Podozyten (Abbildung 15A) konnte zumindest HSPB8, wenn auch nicht verstärkt exprimiert, nachgewiesen werden.

Eine beschriebene Funktion von BAG3-assoziiierter CASA ist die Degradation und Expressionsregulation von Filamin¹⁴³. Massenspektrometrisch konnte Filamin jedoch auch nach Anreicherung der BAG3-Interaktoren via IP nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in technischen Limitationen des Verfahrens, die zu exponentiellem Abfall der *signal/noise-ratio* bei der Massenspektrometrie führen¹⁴⁴, dieser Effekt betrifft vor allem Proteine mit hohem Gewicht wie Filamin (Filamin A: 280kDa). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dagegen, dass CASA die zentrale Funktion von BAG3 in humanen Podozyten darstellt. Während diese technischen Limitationen zu berücksichtigen sind, konnten aber in den Experimenten weder die vorbeschriebenen Bestandteile des BAG3-CASA-Komplexes nachgewiesen werden noch ein typischer Klient der CASA. Um die Relevanz von CASA im Podozyten unter mechanischem Stress weiter aufzuklären, wäre zum Beispiel der siRNA-*knockdown* von SQSTM1/p62 als Shuttle-protein der CASA-Klienten zu Autophagosomen ein möglicher Versuchsansatz.

Besonders der fehlende Nachweis von Filamin könnte auf eine Limitation der Untersuchung *in vitro* zurückgeführt werden. Verglichen mit einem physiologischen Milieu stellt eine Zellkultur eine hohe mechanische Belastung für Zellen dar, der sich die Zelle maßgeblich durch Ausbildung von Stressfasern erwehrt. Stressfasern werden lediglich am Übergang zum kortikalen Aktinzytoskelett mit Filamin vernetzt¹⁴⁵. Außerdem exprimieren kultivierte Podozyten zwar Podocin und Nephtrin, bilden aber kein Schlitzdiaphragma aus. Die Anforderung an Mechanoprotektion *in vitro* gehen daher deutlich über die Zellkultur hinaus: Nicht nur Adhäsion und Erhaltung der Zellform sind wichtig, sondern die komplexe Architektur der Fußfortsätze und ein langstreckiger Zell-Zellkontakt mit dem Nachbarpodozyten müssen erhalten bleiben. Dieser Prozess benötigt vermutlich deutlich differenziertere Regulation von Aktinpolymerisation und Kontraktilität. Hierzu sollten die Experimente *in vivo* fortgesetzt werden, beispielsweise aus Glomeruli im (podozytenspezifischen) Bag3-KO-Mausmodell und Wiederholung der Co-IP/MS. Diese Arbeit zeigt, dass die BAG3-Co-IP/MS mit den verwendeten Antikörpern einen zuverlässigen Pulldown von BAG3 erlaubt. Um die zweite Komponente, den erhöhten mechanischen Stress, in das Modell einzuführen könnte ein medikamentös oder operativ induziertes Hypertonie-Modell genutzt werden¹⁴⁶.

5.6 Untersuchung von humanen Podozyten unter equibiaxialen mechanischem Stress

Um den Zeitfaktor und mechanischen Stress der kultivierten Podozyten experimentell zu berücksichtigen wurde das beschriebene Modell (Abbildung 13) zyklischen equibiaxialen Stresses umgesetzt. Die Applikation von mechanischem Stress über eine flexible Membran stellte ein praktisches Hindernis für eine IF dar, weil mit dem Ausbringen der Zellen auf Cover

Slips zur mikroskopischen Begutachtung wiederum eine starre Zellkulturoberfläche notwendig würde. Allerdings konnten im Western-Blot zeitabhängige Effekte beobachtet werden:

Die 120 min-Zeitlinie (Abbildung 15) zeigte im Western Blot für BAG3 und SQSTM1 nur zum Zeitpunkt 30 min einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrolle. Unter ZMS ist eine Depletion von BAG3 durch den verstärkten Ablauf von CASA mit autolysosomaler Degradation auch von BAG3 möglich. Dem entgegen wirkt die Autoregulation von BAG3 sowie Regulation von an CASA-beteiligten Chaperonen durch HSF1⁹⁵.

Die nur transiente Erhöhung von BAG3 und SQSTM1 könnte zwar plausibel mit dem Erreichen eines *steady state* von Depletion und Autoregulation von CASA-Komponenten erklärt werden. In einem nachfolgenden Experiment zeigten sich aber auch massenspektrometrisch (Abbildung 15A) keine Unterschiede in der SQSTM1-Expression nach 24h ZMS. Die Interpretierbarkeit des 120min-Stretchexperiments hätte z.B. durch Ergänzung um einen LC3-ELISA oder LC3-Co-Staining im WB als Biomarker des Autophagie-Flusses verbessert werden können¹⁴⁷.

Im ZMS-Modell ließ sich zu allen Messzeitpunkten eine statistisch signifikante Erhöhung von pERK1/2 erkennen. Während pERK1/2-Induktion kein spezifisches Merkmal der zellulären Antwort auf mechanische Stimuli darstellt, ist die Signifikanz des Signalweges bei der Antwort auf nicht spezifisch-mechanischen Stress sowie Regulation von Zellzyklus und Wachstum unstrittig¹⁴⁸.

5.7 Mechanischer Stress beeinflusst die Regulation des Aktinzytoskeletts in humanen Podozyten

BAG3wt-Podozyten zeigten unter mechanischem Stress darüber hinaus eine verstärkte Expression von BAG3 und ARPC5 (Abbildung 16A). Interessanterweise zeigte sich in BAG3-defizienten Podozyten eine verstärkte Expression von RhoA unter Kontroll- und Stressbedingungen im Vergleich vom BAG3wt.

RhoA ist eine hochkonservierte GTPase mit einer Vielfalt an biologischen Funktionen. Im Kontext des Versuchsaufbaus mit mechanischem Stress ist vor allem die Regulation der Kontraktilität des Aktinzytoskeletts bei der Interpretation der MS-Ergebnisse zu beachten. RhoA entfaltet seine beispielsweise durch Aktivierung der Rho kinase (ROCK), welche die Kontraktilität von Aktinfasern durch Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten (MLC) steigert. Mit der Anreicherung von ARPC2 (Abbildung 11) im BAG3wt und respektive ARPC5 (Abbildung 15A) unter Stressbedingungen sind zwei Komponenten des Arp2/3-Komplexes vertreten, in dem Signalwege zur Ausbildung von *de novo* Aktinfilamenten konvergieren^{142,149}. Pal et al. konnten bereits demonstrieren, dass Arp2/3 und RhoA antagonistisch wirken¹⁵⁰, was

sich gut mit dem Ergebnis der Anreicherung von ARPC2 in BAGwt Podozyten gegenüber BAG3-defizienten Podozyten deckt. Ähnlich zu den Komponenten des Arp2/3-Komplexes, ließen sich auch Bestandteile des Proteinphosphatase-1-Systems (PP-1) finden. PP-1 besteht aus einer katalytischen Domäne wie z.B. PPP1CA, welche nach IP in BAG3wt-Podozyten angereichert nachgewiesen werden konnte. Mit der katalytischen Untereinheit interagieren eine oder mehrere regulatorische Domänen¹⁵¹. Die regulatorischen Untereinheiten wie z.B. inhibierend auf die katalytischen Untereinheiten. Mit katalytischen Untereinheiten dephosphoryliert PP-1 MLC, was zu einer Herabsetzung der Kontraktilität des Aktinzytoskeletts führt¹⁵². Regulatorische Untereinheiten von PP1 wurden unabhängig vom BAG3-Status von humanen Podozyten unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert, während in der MS nach BAG3-IP die katalytische Domäne PPP1CA vorzufinden war. Die vermehrte Expression der regulatorischen Untereinheiten entspricht einer Disinhibition der Aktomyosin-Kontraktilität durch verminderte Dephosphorylierung.

5.8 Stressapplikation im Podozytenmodell

Die Untersuchung von Podozyten unter mechanischem Stress wurde 2001 erstmalig von Endlich et al. publiziert, die murine Podozyten über drei Tage einem biaxialen zyklischen Stress aussetzten¹⁵³. Endlich et al. beobachteten die Induktion von Stressfasern und konnten die Ausbildung von Stressfasern zwar durch Inhibition von Rho, nicht aber durch Inhibition mechanosensitiver Calciumkanäle beeinflussen¹⁵³. Auch Shankland et al. verwendeten murine Podozyten unter zyklischem biaxialem Stress. Während Endlich et al. die Stressexperimente über drei Tage durchführten, verwendeten Shankland et al. auch kürzere Zeitlinien über 10-40 min. In diesen kurzen Zeiträumen fanden auch Shankland et al. eine Aktivierung von p38/ERK nach 20 min Stressapplikation mit anschließender Normalisierung¹⁵⁴. Unter diesen Aspekten ist das Ergebnis der WB-Stretchexperimente (Abbildung 15) einzuordnen: Nach mechanischem Stress zeigen Podozyten eine rasche Antwort mit vermehrter Expression von BAG3 und ERK1/2. In den massenspektrometrischen Untersuchungen mit deutlich längere Stressapplikation lässt sich die ERK1/2 Aktivierung nicht mehr nachvollziehen. Konsequenterweise sollten weitere MS-Experimente nach ebenso kurzandauernder Stressapplikation durchgeführt werden.

Dieser Ansatz sollte auch um die Durchführung eines Stressexperiments mit anschließender BAG3-Co-IP ergänzt werden, um Änderungen des Proteinkomplexes unter mechanischem Stress sicher zu identifizieren. Aber auch *in vitro* können mechanische Stressmodelle weiterentwickelt werden. In dem – auch in dieser Arbeit verwendeten – equibiaxialen Stressmodell fehlt die Komponente des Flüssigkeitsscherstress (*fluid shear stress*). Typischerweise wird dieses Modell über endothelialisierte Kapillaren an einem Pumpensystem

für Zellkulturmedium mit definierter Strömungsgeschwindigkeit umgesetzt¹⁵⁵. Für Podozyten ist eine Umsetzung als Ko-Kultur mit Endothelzellen in einem *Glomerulus-on a-Chip-Modell* eine vielversprechende Alternative¹⁵⁶.

5.9 Einordnung der Ergebnisse anhand klinischer BAG3-Pathologien

Wie eingangs beschrieben, existieren BAG3-abhängige Krankheiten mit klinischer Manifestation einer dilatativen Kardiomyopathie bzw. axonalen Neuropathie. Untersuchungen von BAG3-Mutanten zeigen eine strenge Lokalisation von BAG3 an den Z-Scheiben der Sarkomere, gemeinsam mit allen kanonischen CASA-Komponenten. Die vermehrte Aggresomenbildung durch die BAG3-P209L-Mutante kann durch Reexpression von Wildtyp-BAG3 aufgelöst und die Kontraktilität des Gewebes wiederhergestellt werden^{108,110}. Die BAG3-abhängigen Kardiomyopathien werden aber bisher nicht mit Nierenfunktionsstörungen in Verbindung gebracht. Allerdings kommt es bei den betroffenen Personen bereits in der zweiten Lebensdekade zu einer terminalen Herzinsuffizienz, sodass eine chronische Maladaptation an mechanischen Stress möglicherweise von den raschen klinischen Verläufen verdunkelt wird. Für die axonale Neuropathie Charcot-Marie-Tooth Typ 2 (CMT2) gibt es verschiedene Fallberichte im Zusammenhang mit einer FSGS im Kindesalter. Allerdings konnte kein BAG3-abhängiger Fall berichtet werden, sondern Mutationen in *INF2*¹⁵⁷⁻¹⁶⁰, welches aber ebenfalls an der Bildung von Aktinfilamenten mitwirkt. Die direkte Verbindung von BAG3-assoziierten Krankheiten zu Nierenfunktionsstörungen kann aber nicht hergestellt werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Centers for Disease Control and Prevention. Chronic Kidney Disease in the United States, 2023. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2023.
- 2 Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4340604/> (accessed June 2, 2024).
- 3 Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C. Chronic kidney disease and cardiovascular complications. *Heart Fail Rev* 2015; **20**: 259–72.
- 4 Rhee CM, Kovesdy CP. Spotlight on CKD deaths—increasing mortality worldwide. *Nat Rev Nephrol* 2015; **11**: 199–200.
- 5 Organization WH. World report on ageing and health. 2015.
- 6 Francis A, Harhay MN, Ong ACM, *et al.* Chronic kidney disease and the global public health agenda: an international consensus. *Nat Rev Nephrol* 2024; : 1–13.
- 7 Kohagura K. The public health impact of hypertension and diabetes: a powerful tag team for the development of chronic kidney disease. *Hypertens Res* 2023; **46**: 339–40.
- 8 Fujii M, Ohno Y, Ikeda A, *et al.* Current status of the rapid decline in renal function due to diabetes mellitus and its associated factors: analysis using the National Database of Health Checkups in Japan. *Hypertens Res* 2023; **46**: 1075–89.
- 9 Collins AJ, Foley RN, Gilbertson DT, Chen S-C. United States Renal Data System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 2015; **5**: 2–7.
- 10 Doshi SM, Friedman AN. Diagnosis and Management of Type 2 Diabetic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; **12**: 1366.
- 11 Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, *et al.* Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; **345**: 851–60.
- 12 Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, *et al.* Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One* 2016; **11**: e0158765.
- 13 James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet* 2010; **375**: 1296–309.
- 14 Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Nephrology and Acid-Base Disorders, 2e. McGraw-Hill Education, 2013 https://books.google.de/books?id=8NO_FQPRfOUC.
- 15 Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; **88**: 451–87.
- 16 Suh JH, Miner JH. The Glomerular Basement Membrane as a Barrier to Albumin. *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**: 10.1038/nrneph.2013.109.
- 17 Naylor RW, Morais MRPT, Lennon R. Complexities of the glomerular basement membrane. *Nat Rev Nephrol* 2021; **17**: 112–27.
- 18 Matlin KS, Caplan MJ. Chapter 1 - Epithelial Cell Structure and Polarity. In: Alpern RJ, Moe OW, Caplan M, eds. Seldin and Giebisch's The Kidney (Fifth Edition). Academic Press, 2013: 3–43.

- 19 Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; **83**: 253–307.
- 20 James MT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, *et al.* Glomerular filtration rate, proteinuria, and the incidence and consequences of acute kidney injury: a cohort study. *Lancet* 2010; **376**: 2096–103.
- 21 Brinkkoetter PT, Ising C, Benzing T. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**: 328–36.
- 22 Ichimura K, Miyaki T, Kawasaki Y, Kinoshita M, Kakuta S, Sakai T. Morphological Processes of Foot Process Effacement in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis Revealed by FIB/SEM Tomography. *J Am Soc Nephrol* 2019; **30**: 96–108.
- 23 Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol-Ren Physiol* 2013; **304**: F333–47.
- 24 Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, *et al.* A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab* 2020; **2**: 461–74.
- 25 Benzing T, Salant D. Insights into Glomerular Filtration and Albuminuria. *N Engl J Med* 2021; **384**: 1437–46.
- 26 Basgen JM, Wong JS, Ray J, Nicholas SB, Campbell KN. Podocyte Foot Process Effacement Precedes Albuminuria and Glomerular Hypertrophy in CD2-Associated Protein Deficient Mice. *Front Med* 2021; **8**. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2021.745319> (accessed June 25, 2022).
- 27 van der Wolde J, Haruhara K, Puelles VG, Nikolic-Paterson D, Bertram JF, Cullen-McEwen LA. The ability of remaining glomerular podocytes to adapt to the loss of their neighbours decreases with age. *Cell Tissue Res* 2022; **388**: 439–51.
- 28 Shankland SJ, Pippin JW, Duffield JS. Progenitor Cells and Podocyte Regeneration. *Semin Nephrol* 2014; **34**: 418–28.
- 29 Hogan J, Mohan P, Appel GB. Diagnostic tests and treatment options in glomerular disease: 2014 update. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2014; **63**: 656–66.
- 30 Bertelli R, Bonanni A, Caridi G, Canepa A, Ghiggeri GM. Molecular and Cellular Mechanisms for Proteinuria in Minimal Change Disease. *Front Med* 2018; **5**. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2018.00170> (accessed May 16, 2022).
- 31 Feng D, DuMontier C, Pollak MR. Mechanical challenges and cytoskeletal impairments in focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Physiol-Ren Physiol* 2018; **314**: F921–5.
- 32 Hodgkin JB, Bitzer M, Wickman L, *et al.* Glomerular Aging and Focal Global Glomerulosclerosis: A Podometric Perspective. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**: 3162–78.
- 33 Fuhrman DY, Schneider MF, Dell KM, *et al.* Albuminuria, Proteinuria, and Renal Disease Progression in Children with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; **12**: 912–20.
- 34 Ito S. Usefulness of RAS inhibition depends on baseline albuminuria. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 10–1.
- 35 Zhang F, Liu H, Liu D, *et al.* Effects of RAAS Inhibitors in Patients with Kidney Disease. *Curr Hypertens Rep* 2017; **19**: 72.
- 36 Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, *et al.* Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1436–46.
- 37 Abdelrahman AM, Awad AS, Abdel-Rahman EM. Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors: Mechanism of Action and Efficacy in Non-Diabetic Kidney Disease from Bench to Bed-Side. *J Clin Med* 2024; **13**: 956.
- 38 DeFronzo RA, Reeves WB, Awad AS. Pathophysiology of diabetic kidney disease: impact of SGLT2 inhibitors. *Nat Rev Nephrol* 2021; **17**: 319–34.

- 39 Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *The Lancet* 2003; **362**: 629–39.
- 40 Noone DG, Iijima K, Parekh R. Idiopathic nephrotic syndrome in children. *Lancet Lond Engl* 2018; **392**: 61–74.
- 41 Brähler S, Ising C, Hagmann H, *et al.* Intrinsic proinflammatory signaling in podocytes contributes to podocyte damage and prolonged proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; **303**: F1473-1485.
- 42 Weber L, Dötsch J. Nephrotisches Syndrom. In: Nierenerkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Springer-Verlag, 2017.
- 43 Iijima K, Sako M, Nozu K, *et al.* Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2014; **384**: 1273–81.
- 44 Allard L, Kwon T, Krid S, *et al.* Treatment by immunoabsorption for recurrent focal segmental glomerulosclerosis after paediatric kidney transplantation: a multicentre French cohort. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2018; **33**: 954–63.
- 45 Salfi G, Casiraghi F, Remuzzi G. Current understanding of the molecular mechanisms of circulating permeability factor in focal segmental glomerulosclerosis. *Front Immunol* 2023; **14**. DOI:10.3389/fimmu.2023.1247606.
- 46 Wada T, Nangaku M. A circulating permeability factor in focal segmental glomerulosclerosis: the hunt continues. *Clin Kidney J* 2015; **8**: 708–15.
- 47 Watts AJB, Keller KH, Lerner G, *et al.* Discovery of Autoantibodies Targeting Nephritin in Minimal Change Disease Supports a Novel Autoimmune Etiology. *J Am Soc Nephrol JASN* 2022; **33**: 238–52.
- 48 Hengel Felicitas E., Dehde Silke, Lassé Moritz, *et al.* Autoantibodies Targeting Nephritin in Podocytopathies. *N Engl J Med*; **0**. DOI:10.1056/NEJMoa2314471.
- 49 Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm—from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**: 587–98.
- 50 Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol JASN* 2004; **15**: 1382–91.
- 51 Grahammer F, Wigge C, Schell C, *et al.* A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI Insight* 2016; **1**. DOI:10.1172/jci.insight.86177.
- 52 Huber TB, Schermer B, Benzing T. Podocin Organizes Ion Channel-Lipid Supercomplexes: Implications for Mechanosensation at the Slit Diaphragm. *Nephron Exp Nephrol* 2007; **106**: 27–31.
- 53 Schwarz K, Simons M, Reiser J, *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1621–9.
- 54 Sagar A, Arif E, Solanki AK, *et al.* Targeting Neph1 and ZO-1 protein-protein interaction in podocytes prevents podocyte injury and preserves glomerular filtration function. *Sci Rep* 2017; **7**: 12047.
- 55 Huber TB, Schermer B, Müller RU, *et al.* Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 17079–86.
- 56 Huber TB, Hartleben B, Kim J, *et al.* Nephrin and CD2AP Associate with Phosphoinositide 3-OH Kinase and Stimulate AKT-Dependent Signaling. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 4917–28.
- 57 Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 485–91.

- 58 Huang Z, Zhang L, Chen Y, *et al.* RhoA deficiency disrupts podocyte cytoskeleton and induces podocyte apoptosis by inhibiting YAP/dendrin signal. *BMC Nephrol* 2016; **17**: 66.
- 59 Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; **420**: 629–35.
- 60 Venkatareddy M, Cook L, Abuarquob K, Verma R, Garg P. Nephrin Regulates Lamellipodia Formation by Assembling a Protein Complex That Includes Ship2, Filamin and Lamellipodin. *PLOS ONE* 2011; **6**: 28710.
- 61 Greiten JK, Kliewe F, Schnarre A, *et al.* The role of filamins in mechanically stressed podocytes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2021; **35**: e21560.
- 62 Patrakka J, Kestilä M, Wartiovaara J, *et al.* Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): Features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int* 2000; **58**: 972–80.
- 63 Jain V, Feehally J, Jones G, Robertson L, Nair D, Vasudevan P. Steroid-resistant nephrotic syndrome with mutations in NPHS2 (podocin): report from a three-generation family. *Clin Kidney J* 2014; **7**: 303–5.
- 64 Gigante M, Caridi G, Montemurno E, *et al.* TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2011; **6**: 1626–34.
- 65 Huber TB, Kwoh C, Wu H, *et al.* Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and synaptopodin. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1337–45.
- 66 Chagnac A, Zingerman B, Rozen-Zvi B, Herman-Edelstein M. Consequences of Glomerular Hyperfiltration: The Role of Physical Forces in the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease in Diabetes and Obesity. *Nephron* 2019; **143**: 38–42.
- 67 Tonneijck L, Muskiet MHA, Smits MM, *et al.* Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**: 1023–39.
- 68 Endlich N, Endlich K. The Challenge and Response of Podocytes to Glomerular Hypertension. *Semin Nephrol* 2012; **32**: 327–41.
- 69 Endlich K, Kliewe F, Endlich N. Stressed podocytes—mechanical forces, sensors, signaling and response. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 2017; **469**: 937–49.
- 70 Suleiman HY, Roth R, Jain S, Heuser JE, Shaw AS, Miner JH. Injury-induced actin cytoskeleton reorganization in podocytes revealed by super-resolution microscopy. *JCI Insight* 2022; **2**: e94137.
- 71 Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008; **319**: 916–9.
- 72 Hipp MS, Park SH, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol* 2014; **24**: 506–14.
- 73 Hershko A, Ciechanover A. The Ubiquitin System. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 425–79.
- 74 Höhfeld J. Autophagy: Press and Push for Destruction. *Curr Biol* 2016; **26**: R703–5.
- 75 Kettern N, Dreiseidler M, Tawo R, Hohfeld J. Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem* 2010; **391**: 481–9.
- 76 Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; **19**: 349–64.
- 77 Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; **381**: 571–9.
- 78 Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 2013; **82**: 323–55.

- 79 Dice JF. Altered degradation of proteins microinjected into senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 1982; **257**: 14624–7.
- 80 Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, *et al.* Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLOS Biol* 2019; **17**: e3000301.
- 81 Dice JF, Chiang HL, Spencer EP, Backer JM. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A. Identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide. *J Biol Chem* 1986; **261**: 6853–9.
- 82 Caplan AJ. What is a co-chaperone? *Cell Stress Chaperones* 2003; **8**: 105–7.
- 83 Carra S, Seguin SJ, Landry J. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* 2008; **4**: 237–9.
- 84 Klimek C, Kathage B, Wördehoff J, Höhfeld J. BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J Cell Sci* 2017; **130**: 2781–8.
- 85 Chakraborty D, Felzen V, Hiebel C, *et al.* Enhanced autophagic-lysosomal activity and increased BAG3-mediated selective macroautophagy as adaptive response of neuronal cells to chronic oxidative stress. 2019; : 580977.
- 86 Höhfeld J, Benzing T, Bloch W, *et al.* Maintaining proteostasis under mechanical stress. *EMBO Rep* 2021; **22**: e52507.
- 87 Rosati A, Ammirante M, Gentilella A, *et al.* Apoptosis inhibition in cancer cells: A novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 1337–42.
- 88 Young P, Anderton E, Paschos K, White R, Allday MJ. Epstein–Barr virus nuclear antigen (EBNA) 3A induces the expression of and interacts with a subset of chaperones and co-chaperones. *J Gen Virol* 2008; **89**: 866–77.
- 89 Bruno AP, Festa M, Piaz FD, *et al.* Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle* 2008; **7**: 3104–5.
- 90 Behl C. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol Sci* 2016; **37**: 672–88.
- 91 Takayama S, Xie Z, Reed JC. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 1999; **274**: 781–6.
- 92 Ji C, Tang M, Zeidler C, Höhfeld J, Johnson GV. BAG3 and SYNPO (synaptopodin) facilitate phospho-MAPT/Tau degradation via autophagy in neuronal processes. *Autophagy* 2019; **15**: 1199–213.
- 93 Stürner E, Behl C. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Front Mol Neurosci* 2017; **10**: 177.
- 94 Gamerdinger M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 2009; **28**: 889–901.
- 95 Jin YH, Ahn SG, Kim SA. BAG3 affects the nucleocytoplasmic shuttling of HSF1 upon heat stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **464**: 561–7.
- 96 Gentilella A, Khalili K. Autoregulation of co-chaperone BAG3 gene transcription. *J Cell Biochem* 2009; **108**: 1117–24.
- 97 Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334–6.
- 98 Zhu H, Wu W, Fu Y, *et al.* Overexpressed BAG3 is a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2014; **93**: 425–35.

- 99 Felzen V, Hiebel C, Koziollek-Drechsler I, *et al.* Estrogen receptor α regulates non-canonical autophagy that provides stress resistance to neuroblastoma and breast cancer cells and involves BAG3 function. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1812–e1812.
- 100 Mani J, Antonietti P, Rakel S, *et al.* Knockdown of BAG3 sensitizes bladder cancer cells to treatment with the BH3 mimetic ABT-737. *World J Urol* 2016; **34**: 197–205.
- 101 Rosati A, Basile A, D'Auria R, *et al.* BAG3 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth by activating stromal macrophages. *Nat Commun* 2015; **6**: 8695.
- 102 Homma S, Iwasaki M, Shelton GD, Engvall E, Reed JC, Takayama S. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol* 2006; **169**: 761–73.
- 103 Ulbricht A, Eppler FJ, Tapia VE, *et al.* Cellular Mechanotransduction Relies on Tension-Induced and Chaperone-Assisted Autophagy. *Curr Biol* 2013; **23**: 430–5.
- 104 Ulbricht A, Gehlert S, Leciejewski B, Schiffer T, Bloch W, H?hfeld J. Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy* 2015.
- 105 Selcen D. Myofibrillar myopathies. *Neuromuscul Disord* 2011; **21**: 161–71.
- 106 Selcen D, Muntoni F, Burton BK, *et al.* Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2009; **65**: 83–9.
- 107 Wilkins LW&. Mutations in HSPB8 causing a new phenotype of distal myopathy and motor neuropathy. *Neurology* 2016; **86**: 1077–1077.
- 108 Yerabandi N, Kouznetsova VL, Kesari S, Tsigelny IF. The role of BAG3 in dilated cardiomyopathy and its association with Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Acta Myol Myopathies Cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol* 2022; **41**: 59–75.
- 109 Adriaenssens E, Tedesco B, Mediani L, *et al.* BAG3 Pro209 mutants associated with myopathy and neuropathy relocate chaperones of the CASA-complex to aggresomes. *Sci Rep* 2020; **10**: 8755.
- 110 Martin TG, Myers VD, Dubey P, *et al.* Cardiomyocyte contractile impairment in heart failure results from reduced BAG3-mediated sarcomeric protein turnover. *Nat Commun* 2021; **12**: 2942.
- 111 Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, *et al.* Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2006; **20**: 976–8.
- 112 Weide T, Huber TB. Signaling at the Slit: Podocytes Chat by Synaptic Transmission. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 1862–4.
- 113 Rinschen MM, Gödel M, Grahammer F, *et al.* A Multi-layered Quantitative In Vivo Expression Atlas of the Podocyte Unravels Kidney Disease Candidate Genes. *Cell Rep* 2018; **23**: 2495–508.
- 114 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**: 676–82.
- 115 Chang C-T, Tsai C-N, Tang CY, *et al.* Mixed Sequence Reader: A Program for Analyzing DNA Sequences with Heterozygous Base Calling. *Sci World J* 2012; **2012**: e365104.
- 116 Shen MW, Arbab M, Hsu JY, *et al.* Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature* 2018; **563**: 646–51.
- 117 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; **51**: 263–73.
- 118 Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990; **48**: 579–82.

- 119Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 1974; **186**: 790–7.
- 120Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 2745–52.
- 121Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2008; **424**: 349–64.
- 122Hughes CS, Moggridge S, Muller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc* 2019; **14**: 68–85.
- 123Doench JG, Fusi N, Sullender M, *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 2016; **34**: 184–91.
- 124Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; **8**: 2281–308.
- 125Norman MDA, Ferreira SA, Jowett GM, Bozec L, Gentleman E. Measuring the elastic modulus of soft culture surfaces and three-dimensional hydrogels using atomic force microscopy. *Nat Protoc* 2021; **16**: 2418–49.
- 126Roan E, Waters CM. What do we know about mechanical strain in lung alveoli? *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2011; **301**: L625–35.
- 127Jaenisch R, Mintz B. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1974; **71**: 1250–4.
- 128Sudbery I, Enright AJ, Fraser AG, Dunham I. Systematic analysis of off-target effects in an RNAi screen reveals microRNAs affecting sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *BMC Genomics* 2010; **11**: 175.
- 129Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 2014; **23**: R40–6.
- 130Bock C, Datlinger P, Chardon F, *et al.* High-content CRISPR screening. *Nat Rev Methods Primer* 2022; **2**: 1–23.
- 131McCarty NS, Graham AE, Studená L, Ledesma-Amaro R. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nat Commun* 2020; **11**: 1281.
- 132Yoshida K, Treen N. TALEN-Based Knockout System. *Adv Exp Med Biol* 2018; **1029**: 131–9.
- 133Ishibashi A, Saga K, Hisatomi Y, Li Y, Kaneda Y, Nimura K. A simple method using CRISPR-Cas9 to knock-out genes in murine cancerous cell lines. *Sci Rep* 2020; **10**: 22345.
- 134Gamerding M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep* 2011; **12**: 149–56.
- 135Lee SH, Dominguez R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 2010; **29**: 311–25.
- 136Tavares S, Vieira AF, Taubenberger AV, *et al.* Actin stress fiber organization promotes cell stiffening and proliferation of pre-invasive breast cancer cells. *Nat Commun* 2017; **8**: 15237.
- 137Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 2012; **125**: 1855–64.
- 138Walcott S, Sun SX. A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells. *Proc Natl Acad Sci* 2010; **107**: 7757–62.

- 139 Jensen P, Patel B, Smith S, Sabnis R, Kaboord B. Improved Immunoprecipitation to Mass Spectrometry Method for the Enrichment of Low-Abundant Protein Targets. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2021; **2261**: 229–46.
- 140 Van Itallie CM, Aponte A, Tietgens AJ, Gucek M, Fredriksson K, Anderson JM. The N and C Termini of ZO-1 Are Surrounded by Distinct Proteins and Functional Protein Networks. *J Biol Chem* 2013; **288**: 13775–88.
- 141 Leung G, Zhou Y, Ostrowski P, et al. ARPC1B binds WASP to control actin polymerization and curtail tonic signaling in B cells. *JCI Insight*; **6**: e149376.
- 142 Martin E, Theis S, Gay G, Monier B, Rouvière C, Suzanne M. Arp2/3-dependent mechanical control of morphogenetic robustness in an inherently challenging environment. *Dev Cell* 2021; **56**: 687-701.e7.
- 143 Kathage B, Gehlert S, Ulbricht A, et al. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 2017; **1864**: 62–75.
- 144 Cai W, Tucholski T, Chen B, et al. Top-down Proteomics of Large Proteins up to 223 kDa Enabled by Serial Size Exclusion Chromatography Strategy. *Anal Chem* 2017; **89**: 5467–75.
- 145 Kumar A, Shutova MS, Tanaka K, et al. Filamin A mediates isotropic distribution of applied force across the actin network. *J Cell Biol* 2019; **218**: 2481–91.
- 146 Jama HA, Muralitharan RR, Xu C, et al. Rodent models of hypertension. *Br J Pharmacol* 2022; **179**: 918–37.
- 147 du Toit A, Hofmeyr J-HS, Gniadek TJ, Loos B. Measuring autophagosome flux. *Autophagy* 2018; **14**: 1060–71.
- 148 Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007; **26**: 3227–39.
- 149 Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 713–26.
- 150 Pal D, Ellis A, Sepúlveda-Ramírez SP, et al. Rac and Arp2/3-Nucleated Actin Networks Antagonize Rho During Mitotic and Meiotic Cleavages. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.591141> (accessed June 27, 2022).
- 151 Chen Y, Kotian N, Aranjuez G, et al. Protein phosphatase 1 activity controls a balance between collective and single cell modes of migration. *eLife* 2020; **9**: e52979.
- 152 Álvarez-Santos MD, Álvarez-González M, Estrada-Soto S, Bazán-Perkins B. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. *Front Physiol* 2020; **11**. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.00701> (accessed June 27, 2022).
- 153 Endlich N, Kress KR, Reiser J, et al. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol JASN* 2001; **12**: 413–22.
- 154 Durvasula RV, Shankland SJ. Mechanical strain increases SPARC levels in podocytes: implications for glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F577-584.
- 155 Meng F, Cheng H, Qian J, Dai X, Huang Y, Fan Y. In vitro fluidic systems: Applying shear stress on endothelial cells. *Med Nov Technol Devices* 2022; **15**: 100143.
- 156 Doi K, Kimura H, Matsunaga YT, Fujii T, Nangaku M. Glomerulus-on-a-Chip: Current Insights and Future Potential Towards Recapitulating Selectively Permeable Filtration Systems. *Int J Nephrol Renov Dis* 2022; **15**: 85–101.
- 157 Davies H, Varghese VC, Rogers M, Hartley L. Charcot-Marie-Tooth disease and glomerulonephropathy due to INF2 mutation. *Eur J Paediatr Neurol* 2017; **21**: e231.

- 158 Fillod I, Cochat P, Colon S, Wright C, David L. [Nephropathy and Charcot-Marie-Tooth disease. A case report]. *Pediatric* 1990; **45**: 319–22.
- 159 Hara M, Ichida F, Higuchi A, Tanizawa T, Okada T. Nephropathy associated with Charcot-Marie-Tooth disease. *Int J Pediatr Nephrol* 1984; **5**: 99–102.
- 160 Boyer O, Nevo F, Plaisier E, *et al.* INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med* 2011; **365**: 2377–88.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der glomeruläre Filter. <i>Verwendet mit Erlaubnis von</i> ¹⁰ , © Massachusetts Medical Society	13
Abbildung 2: Das Schlitzdiaphragma. <i>Verwendet mit Erlaubnis von</i> ¹⁰ , © Massachusetts Medical Society ¹⁰	16
Abbildung 3: Chaperon-assistierte selektive Autophagie am Beispiel des BAG3-Komplexes. <i>Verwendet mit Genehmigung von</i> ⁵⁹	19
Abbildung 4: Struktur von <i>BAG3</i> mit Darstellung diverser Domänen und Bindungspartnern. <i>Verwendung mit Genehmigung von</i> ⁶³	20
Abbildung 5: Proteom muriner Podozyten gegenüber glomerulären, nicht podozytären Zellen. <i>Daten aus</i> ⁸¹	21
Abbildung 6 A: Darstellung der Zielsequenz in Exon 2 von <i>BAG3</i>	47
Abbildung 7: PCR zum Screening der indel-Mutationen in Exon 2 von <i>BAG3</i>	48
Abbildung 8: Western Blot zur Validierung des <i>BAG3</i> -Knockouts auf Proteinebene der CRISPR/Cas9-generierten Podozytenlinie.	49
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung auf 4%PFA-fixierten Podozyten, 63x Objektiv.	50
Abbildung 10: <i>BAG3</i> -Co-Immunopräzipitation von <i>BAG3</i> -Wildtyp und <i>BAG3</i> -defizienten Podozyten.	50
Abbildung 11: LC-MS/MS von humanen <i>BAG3</i> wt- versus <i>BAG3</i> ^{-/-} -Podozyten nach Immunpräzipitation mit α <i>BAG3</i> pAB.	51
Abbildung 12: <i>Parallel reaction monitoring</i> von <i>BAG3</i> wt-Podozyten und <i>BAG3</i> ^{-/-} -Podozyten.	52
Abbildung 13: GO-Term Analyse der signifikant regulierten Gene (entsprechend den detektierten Proteinen) im LC-MS/MS-Datensatz nach CO-IP mit α <i>BAG3</i> -mAB.	Fehler!
Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 14: Pneumatisches System zur Applikation von mechanischem Stress in vitro.	53
Abbildung 15: Western Blot von <i>BAG3</i> , SQSTM1 und p62 unter mechanischem Stress vs. Kontrollbedingungen.	54
Abbildung 16: A: Volcano Plot von <i>BAG3</i> wt-Podozyten unter Stress- gegenüber Kontrollbedingungen. <i>FDR=0,05; S=0,1 B:</i> Hauptkomponentenanalyse des Experiments.	55
Abbildung 17: A: Volcano Plot von <i>BAG3</i> ^{-/-} -Podozyten gegenüber <i>BAG3</i> wt.	56
Abbildung 18: Massenspektrometrische Analyse von humanen Podozyten unter Kontroll- und Stretch-Bedingungen sowie in An- oder Abwesenheit von <i>BAG3</i> (<i>BAG3</i> wt vs. <i>BAG3</i> ^{-/-}).	58

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	24
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3: Zelllinien	26
Tabelle 4: Bakterien	26
Tabelle 5: Antikörper	27
Tabelle 6: Enzyme.....	27
Tabelle 7: Wachstumsmedien und -zusätze	27
Tabelle 8: Oligonukleotide	28
Tabelle 9: Plasmide	28
Tabelle 10: Kits und Reagenzien.....	29
Tabelle 11: Chemikalien	31
Tabelle 12: Puffer und Lösungen.....	34
Tabelle 13: Software	34
Tabelle 14: Webbasierte Werkzeuge:.....	34
Tabelle 15: : RedTaq-Polymerasekettenreaktion	35
Tabelle 16: Q5-Polymerasekettenreaktion.....	35
Tabelle 17: PCR-Protokoll Thermocycler.....	35
Tabelle 18: Restriktionsverdau	36
Tabelle 19: Ligation	36
Tabelle 20: Sequenzierung.....	37
Tabelle 21: Annealing der gRNA-Oligonukleotide.....	40
Tabelle 22: Klonierung der Cas9-Plasmide.....	41
Tabelle 23: Exol-SAP Aufreinigung	41
Tabelle 24: Übersicht der verwendeten gRNA.....	46

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

8.1 Kongressbeiträge

2019

American Society of Nephrology (ASN) in Washington D.C. (USA)

Plagmann I, Rinschen M, Heinlein K, **Degenhardt J**, Unnersjö-Jess D, Schermer B, Benzing T.

“BAG3 as potential mechanoprotector in renal podocytes” (Poster)

Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) in Düsseldorf

Plagmann I, Rinschen M, Heinlein K, **Degenhardt J**, Unnersjö-Jess D, Schermer B, Benzing T.

“A role of BAG3 as mechanoprotector in podocytes“ (Poster)

2020

American Society of Nephrology (ASN) (digitaler Kongress)

Plagmann I, Rinschen M, Heinlein K, **Degenhardt J**, Unnersjö-Jess D, Kohler S, Schermer B, Benzing T. “BAG3 as a potential mechanoprotector in podocytes” (Abstract)