Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Eine Untersuchung der Bedeutung des Apoptose-induzierenden Faktors für den podozytären Zelltod

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kristina Kruse

aus

Detmold

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. M. Zeisberg

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Referent/in: Prof. Dr. M. Zeisberg

Drittreferent/in: PD Dr. S. Sennhenn-Kirchner

Datum der mündlichen Prüfung: 18.07.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Eine Untersuchung der Bedeutung des Apoptose-induzierenden Faktors für den podozytären Zelltod" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **IV**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

1 Einleitung **1**

1.1 Aufbau und Funktion der Niere 1
1.1.1 Aufbau des Glomerulus 1
1.1.2 Podozyten als spezialisierte Nierenzellen 2
1.2 Chronische Nierenerkrankung 3
1.3 Glomerulopathien 4
1.4 Fokal segmentale glomeruläre Sklerose 4
1.5 Der Apoptose-induzierende Faktor und sein Anteil am programmierten Zelltod 7
1.6 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit 11

2 Material und Methoden **12**

2.1 Material 12
2.2 Methoden 22
2.2.1 Zelllinien 22
2.2.2 Zellkultur 22
2.2.3 Analysen auf Proteinebene 24
2.2.4 Überexpression von Proteinen 26
2.2.5 Transienter Knock-down von Proteinen 28
2.2.6 Präparation der Deckgläser 28
2.2.7 Fixierung und Färbung von Zellen für die Konfokalmikroskopie 28
2.2.8 Konfokalmikroskopie 29
2.2.9 Imitierung des Podozytenschadens 29
2.2.10 Durchflusszytometrie 30
2.2.11 Datenanalyse 31
2.2.12 Herstellung histologischer Schnittpräparate 31
2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung der Schnittpräparate 31

3 Ergebnisse **33**

3.1 Der Einfluss der Behandlung mit verschiedenen Agenzien auf den podozytären Zelltod 33
3.2 Untersuchung des *In-vitro*-Modells der fokalen segmentalen glomerulären Sklerose in Podozyten auf Proteinebene 36
3.3 Veränderung der Proteinmenge des Apoptose-induzierenden Faktors 37
3.4 Intrazelluläre Lokalisation des Apoptose-induzierenden Faktors in Podozyten 39
3.5 Untersuchung der Kolokalisation von AIF mit Podozyten in humanen Biopsien mit FSGS 41

3.6 Der Einfluss der AIF Überexpression auf den podozytären Zelltod 43
3.7 Der Einfluss des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod 46

4 Diskussion 49

4.1 Die Eignung des verwendeten Modells zur Imitation des Podozytenschadens bei einer FSGS 49
4.2 Die Auswirkungen des Podozytenschadens auf die Mengen an relevanten Proteinen *in vitro* 51
4.3 Die Folgen der veränderten Genexpression des Apoptose-induzierenden Faktors auf PARP-1 und γH2AX 52
4.4 Die Lokalisation von AIF in Podozyten *in vitro* sowie in humanen Biopsien 53
4.5 Der Einfluss der veränderten Genexpression von AIF auf den podozytären Zelltod 55
4.5.1 Die Folgen der Überexpression von AIF auf den podozytären Zelltod 55
4.5.2 Die Folgen des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod 55
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick 56

5 Zusammenfassung 57

6 Literaturverzeichnis 58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einfluss von ADR, PAM und PAN auf den podozytären Zelltod. 35
Abbildung 2: Untersuchung des *In-vitro*-Modells der FSGS in Podozyten auf Proteinebene. 37
Abbildung 3: Veränderung der Proteinmenge des Apoptose-induzierenden Faktors. 38
Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von AIF in Podozyten 40
Abbildung 5: Untersuchung der Kolokalisation von AIF mit Podozyten in humanen Biopsien 42
Abbildung 6: Der Einfluss der AIF Überexpression auf den podozytären Zelltod. 44
Abbildung 7: Der Einfluss des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod unter Behandlung mit ADR und PAM. 47
Abbildung 8: Der Einfluss des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod unter Behandlung mit PAN. 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien 12
Tabelle 2: Primäre Antikörper 15
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper 16
Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe 16
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien 17
Tabelle 6: Geräte 18
Tabelle 7: Software 20
Tabelle 8: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme 21
Tabelle 9: Plasmide und Vektoren 21
Tabelle 10: Puffer und Lösungen Zellkultur 23
Tabelle 11: Puffer und Lösungen Proteinisolation 24
Tabelle 12: Puffer und Lösungen Western Blot 26
Tabelle 13: Puffer und Lösungen Transformation 26
Tabelle 14: Puffer und Lösungen Deckglaspräparation 28
Tabelle 15: Puffer und Lösungen Zellfärbung 29
Tabelle 16: Puffer und Lösungen Gewebefärbung 32

Abkürzungsverzeichnis

ADR	Adriamycin
AIF	*apoptosis inducing factor,* Apoptose-induzierender Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
CKD	*chronic kidney disease,* Chronische Nierenerkrankung
Cyp A	Cyclophilin A
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dd	doppelt destilliert
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetraessigsäure
et al.	*et alii,* und andere
FCS	*fetal calf serum,* fetales Kälberserum
FSGS	Fokal segmentale glomeruläre Sklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
KDIGO	*kidney disease-improving global outcomes,* Nierenerkrankung-Verbesserung der globalen Ergebnisse
KO	Kontrolle
MCN	*minimal change nephritis,* glomeruläre Minimalläsion
MIF	Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor
MNNG	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAM	Pamidronat
PAN	Puromycin Aminonukleosid
PARP-1	Poly-(ADP-Ribose)Polymerase 1
PBS	*phosphate buffered saline,* Phsophat gepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase chain reaction,* Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat

SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	*small interfering RNA,* kleine eingreifende RNA
tAIF	*truncated AIF*, verkürztes AIF
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBST-T	*tris-buffered saline with Tween20,* Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris-aminomethan
VDAC	*voltage-dependent anion channel*, spannungsabhängiger Anionenkanal
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, welches vielfältige Aufgaben im menschlichen Körper erfüllt und dadurch eine lebensnotwendige Rolle spielt. Sie ist unter anderem für die Harnproduktion, den Elektrolythaushalt und die Volumenregulation durch Stabilisierung des Wasserhaushalts verantwortlich, außerdem stellt sie den Bildungsort für das Hormon Erythropoetin dar (Jelkmann 2011). Das Nierengewebe lässt sich in Rinde und Mark einteilen.

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, bestehend aus dem Glomerulus und der Bowman-Kapsel, dem proximalen und distalen Tubulus, der Henle-Schleife und dem Sammelrohr (Preuss 1993). Eine menschliche Niere enthält etwa 1.000.000 Nephrone (Quaggin und Kreidberg 2008).

1.1.1 Aufbau des Glomerulus

Der renale Glomerulus ist eine hochspezialisierte Struktur, welche für die Ultrafiltration des Blutes und für die Herstellung des Primärharns zuständig ist (Pollak et al. 2014).

Der Glomerulus stellt die Filtrationseinheit der Niere dar und ist der proximal gelegene Teil des Nephrons (Quaggin und Kreidberg 2008). Er enthält ein Kapillarnetz, das aus einer afferenten Arteriole gespeist wird und in eine efferente Arteriole mündet. Das Kapillarnetz ist von der Bowman-Kapsel umhüllt. Die Bowman-Kapsel wird aus einem inneren (viszeralen) und einem äußeren (parietalen) Blatt gebildet, welches aus Epithelzellen besteht (Arakawa und Tokunaga 1977). Der glomeruläre Filter besteht aus drei Anteilen: Die innere Schicht wird von einem fenestrierten Endothel gebildet, dessen Fenestrierungen einen Durchmesser von etwa 70-100 nm aufweisen und nicht für Blutzellen durchlässig sind (Reiser und Altintas 2016). Benachbart zu den Endothelzellen finden sich die intraglomerulären Mesangiumzellen und die mesangiale Matrix (Quaggin und Kreidberg 2008), die unter anderem die Aufgabe haben, das kapilläre Netzwerk im Glomerulus zu stützen (Stockand und Sansom 1998). Die zweite Schicht wird von der glomerulären Basalmembran (GBM) gebildet, die sich aus extrazellulären Proteinen wie Typ IV Kollagen, Laminin, Fribronektin und Proteoglykanen zusammensetzt. Die dritte Schicht wird von Podozyten gebildet, welche auch als viszerale epitheliale Zellen bezeichnet werden (Stockand und Sansom 1998) und das innere Blatt der Bowman-Kapsel

bilden. Die Epithelzellen des äußeren Blattes werden als Parietalzellen bezeichnet. Das Ultrafiltrat, welches durch die letzte Barriere, die durch die Fußfortsätze der Podozyten gebildet wird, gelangt, befindet sich im Bowman-Raum. Von dort aus gelangt das Ultrafiltrat in den proximalen Tubulus und in die Henle-Schleife (Garg 2018).

1.1.2 Podozyten als spezialisierte Nierenzellen

Die Glomeruli der Niere sind verantwortlich für die Filtration des Blutes und für die Herstellung des Primärharns. Diese als Blut-Harn-Schranke bezeichnete Struktur wird aus den Endothelzellen des Glomerulus, der GBM und aus den Podozyten gebildet (Lal und Patrakka 2018).

Die Podozyten sind post-mitotische, epitheliale Zellen, die sich auf der GBM befinden. Sie bestehen aus drei Strukturen, dem Zellkörper, dem Hauptfortsatz und den Fußfortsätzen. Podozyten umgreifen mit ihren primären und sekundären Fußfortsätzen die glomerulären Kapillaren und bilden so den äußeren Anteil des glomerulären Filters. Zwischen den Fußfortsätzen der verschiedenen Podozyten bestehen Zell-Zell-Kontakte. Diese Verbindung wird als Schlitzmembran bezeichnet, wobei die Verbindung zwischen Fußfortsätzen eines einzelnen Podozyten auf unbekannte Weise vermieden wird (Garg 2018). Diese Schlitzmembran überbrückt einerseits den Raum zwischen den Fortsätzen, lässt aber gleichzeitig auch Filtrationsschlitze frei (Hagmann und Brinkkoetter 2018), die von Molekülen mit einer Größe bis 70 kDa passiert werden können (Hamano et al. 2002). Eine Zerstörung dieser Schlitzmembran wird mit dem Auftreten von glomerulären Erkrankungen in Verbindung gebracht (Quaggin und Kreidberg 2008). Auf Grund ihrer Lokalisation und ihres Aufbaus sind Podozyten sowohl mechanischem Stress, als auch chemischem Stress durch Sauerstoffradikale und Zytokine ausgesetzt. Auf diesen Stress reagieren Podozyten häufig mit einem hypertrophen Wachstum, um die glomeruläre Funktion aufrecht zu erhalten (Hagmann und Brinkkoetter 2018).

Bei einer Beschädigung der Podozyten kommt es häufig zu einem Verstreichen der Fußfortsätze, bei dem ihre ursprüngliche Struktur verloren geht und ihre Filterfunktion reduziert wird. Dies wird auf einen Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts zurückgeführt, das im gesunden Zustand für die Kontraktilität und die Reorganisation der Fußfortsätze zuständig ist. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um einen passiven Prozess, sondern um einen Adenosintriphosphat(ATP)-verbrauchenden, signal-gesteuerten Vorgang (Garg 2018). Die Hauptfortsätze der Podozyten bestehen aus Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (Drenckhahn und Franke 1988). Das Verstreichen der Fußfortsätze wird häufig mit einer Proteinurie in Verbindung gebracht, allerdings kann eine Proteinurie auch ohne verstrichene Fußfortsätze vorliegen, hier

liegt in vielen Fällen eine Ablösung der Podozyten von der GBM zu Grunde (Garg 2018). Der Vorgang der Depletion ist nicht reversibel, da Podozyten allenfalls eine limitierte Fähigkeit haben, sich zu teilen (Griffin et al. 2003). Die Depletion von mehr als 20 % der Podozyten von der Basalmembran hat eine fokal segmentale glomeruläre Sklerose (FSGS) mit Proteinurie sowie Verwachsungen der Bowmankapsel an die GBM zur Folge, wobei das Ausmaß dieser pathophysiologischen Konsequenzen positiv mit dem Prozentsatz der depletierten Podozyten korreliert. Diese Beobachtung lässt die Hypothese zu, dass verbliebene Podozyten bis zu einem gewissen Grad die Podozytendepletion kompensieren können, es jedoch ab einer Überschreitung eines kritischen Werts zu den beschriebenen Konsequenzen kommt (Wharram et al. 2005).

1.2 Chronische Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) ist ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem, für das in den nächsten 15 Jahren ein steigender Anteil an den verursachten Todesfällen weltweit erwartet wird. Für das Jahr 2015 schätzte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) den Anteil der CKD als Ursache der Todesfälle weltweit noch auf 1,4 % (871 000 Todesfälle), für das Jahr 2030 wird ein Anstieg von 0,2 % auf 1,6 % (1 152 000 Todesfälle) erwartet. Damit würde sich die Erkrankung auf Platz 13 aller Todesursachen weltweit befinden (Ronco 2007).

Risikofaktoren für die Erkrankung stellen Bluthochdruck, Diabetes, Dyslipoproteinämie und Rauchen dar. CKD manifestiert sich in einer Fibrosierung des Nierengewebes als Ausdruck einer fehlerhaften Wundheilung. Die Fibrosierung ist gekennzeichnet durch glomeruläre Sklerose, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose (Webster et al. 2017).

Die CKD wird definiert über ein Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min pro 1,73 m^2 (Normalwert 90-120 ml/min), einem Vorliegen von Markern des Nierenschadens oder die Kombination beider Symptome über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten (Webster et al. 2017). Als Marker für einen Nierenschaden gelten eine Albuminurie, eine übermäßige Sedimentbildung oder Elektrolyte im Urin, Pathologien bezüglich der Histologie und der Struktur, sowie eine Nierentransplantation in der Vergangenheit (KDIGO 2012). Ab einer GFR von 15 ml/min pro 1,73 m^2 ist das Endstadium der CKD erreicht, in welchem nur wenige Therapiestrategien wie eine Nierentransplantation oder die Dialyse in Frage kommen (Webster et al. 2017). Die chronische Nierenerkrankung kann verschiedene Strukturen betreffen. Hierzu gehören zum Beispiel die Glomeruli, das Tubulussystem oder die Blutgefäße.

1.3 Glomerulopathien

Als Glomerulopathie bezeichnet man Erkrankungen der Glomeruli, die wie oben beschrieben, eine wichtige Aufgabe für die Filterfunktion der Niere erfüllen. Diese kann durch systemische Erkrankungen wie Diabetes, Autoimmunerkrankungen, systemische Infektionen, Drogenabusus oder Neoplasien hervorgerufen werden. In diesen Fällen werden sie als sekundäre Glomerulopathien bezeichnet. Primäre Glomerulopathien zeichnen sich dadurch aus, dass die Glomeruli direkt betroffen sind und keine systemische Erkrankung zu Grunde liegt (KDIGO 2012).

1.4 Fokal segmentale glomeruläre Sklerose

Die FSGS ist gekennzeichnet durch glomeruläre Vernarbung und durch eine Proteinurie, die meist von einer Hypoalbuminämie, Hypercholsterinämie und peripheren Ödemen begleitet wird (D'Agati 2011). Histologisch zeigt sich eine fokale und segmentale Sklerose und eine Verstreichung der podozytären Fußfortsätze. Die Bezeichnung fokal bezieht sich hierbei auf die Beobachtung, dass lediglich ein Teil aller Glomeruli betroffen ist. Der Befall ist segmental, das heißt die Erkrankung betrifft nur einige Kapillarschlingen innerhalb eines Glomerulus (Habib 1973). Mit Progression breitet sich die Sklerose zu einer globalen Erkrankung der Niere aus (D'Agati 2011).

Die FSGS und die Minimal-change-Nephritis (MCN) können auch als Podozytopathien bezeichnet werden, da bei beiden Erkrankungen ein Verstreichen der Fußfortsätze durch eine Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts in Folge eines Podozytenschadens auftritt (Wiggins 2007). Durch die Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts wird die Bindung an die GBM verringert. In der Folge kommt es leichter zu einer Ablösung der Podozyten durch den Filtrationsdrucks oder durch den Fluss des glomerulären Ultrafiltrats in der Bowmankapsel (Friedrich et al. 2006). Häufig sind die juxtamedullären Glomeruli zuerst betroffen und es kommt zu einer Ablagerung von mesangialem, fibrillärem Material oder mesangialer Matrix (Nagi et al. 1971) in den Kapillaren der Glomeruli, was deren Obliteration zur Folge hat. Anschließend kommt es zu einer Adhäsion der Gefäßschlinge an den benachbarten Teil der Bowman-Kapsel (Habib 1973).

In einer Studie zwischen 1986 bis 2015 und einem Patientenkollektiv von 21.374 Patienten mit renalen Biopsien, die eine der 18 meist verbreitetsten glomerulären Erkrankungen aufwiesen, zeigte sich bis 2005 ein Anstieg des Anteils der Patienten mit einer FSGS, der sich anschließend wieder leicht verringerte. In der Bevölkerung zwischen 30-50 Jahren war die FSGS die

häufigste glomeruläre Erkrankung im Vergleich zu anderen Subtypen. In der Bevölkerung afrikanischer Abstammung war die Inzidenz deutlich höher als in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe. (O'Shaughnessy et al. 2017).

In einer Studie von 2000 bis 2011 mit einer Kohorte von 2501 Patienten mit primären Glomerulonephropathien präsentierte sich die FSGS unabhängig von der ethnischen Zugehörigkeit als häufigste Glomerulonephropathie (38,9 %). Zwischen 2000 und 2011 wies die FSGS den höchsten Anstieg auf (1,6/100.000 in 2000, 5,3/100.000 in 2011). Die Patientengruppe mit einer FSGS wies im Vergleich zu den anderen Glomerulonephropathien den höchsten Anteil an afro-amerikanischen Personen auf (22,3 %) (Sim et al. 2016). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in dieser Bevölkerungsgruppe das individuelle Risiko für eine FSGS höher ist (Satko et al. 2005). Die besondere Prädisposition dieser Bevölkerungsgruppe ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich in Subsahara-Afrika zwei Genvarianten des *APOL1*-Gens durch positive Selektion ausgeprägt haben. Die zwei Genvarianten *G1* und *G2* scheinen mit einem erhöhten Vorkommen an FSGS, Hypertonus assoziierten Nierenversagen und Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) assoziierter Nephropathie in Zusammenhang zu stehen (Genovese et al. 2010).

Das *APOL1*-Gen codiert für das Apolipoprotein L-1, einen Plasmafaktor, der in der Lage ist, den Parasiten *Trypanosoma brucei brucei* zu lysieren, wobei jedoch zwei Stämme des Parasits resistent gegen Apolipoprotein L-1 sind. Einer dieser Stämme, die besonders im Subsahara-Afrika vorkommen, ist empfindlich gegen die zwei Genvarianten *G1* und *G2* von *APOL1*, was den Selektionsvorteil erklärt (Genovese et al. 2010).

Eine weitere Erklärung für das vermehrte Auftreten von glomerulären Erkrankungen in der afro-amerikanischen Bevölkerung liefern unter Umständen gemeinsame Variationen im *MYH9 Locus* auf Chromosom 22, ein Gen das für die schwere Kette des Nicht-Muskel-Myosins Typ IIA codiert (Linda Kao et al. 2008).

Bei der FSGS wird zwischen einer primären und einer sekundären Form unterschieden, wobei etwa 80 % aller FSGS-Fälle der primären, idiopathischen Form zugeschrieben werden. Die sekundären Formen lassen sich in genetische-, virusassoziierte-, drogen- oder medikamenten-induzierte oder adaptive Formen untergliedern (D'Agati 2011).

Genetische Prädispositionen betreffen überwiegend verschiedene podozytär exprimierte Proteine (D'Agati 2011), die häufigsten sind jedoch Mutationen im *NPHS1*-Gen, welches für Nephrin codiert und *NPHS2*, ein Gen das für Podocin codiert (Santín et al. 2011). Ebenfalls scheinen Mutationen im *Wilms-tumor-suppressor (WT1)*-Gen (Barbaux et al. 1997), Mutationen

von Phospholipase C-ε (PLCE1), Mutationen im *TRPC6*-Gen (Winn et al. 2005), das für den *transient receptor potential channel 6* codiert, und einige weitere Mutationen eine Rolle zu spielen.

Die virusassoziierten Formen der FSGS können einerseits durch ein Virus ausgelöst werden, das die Podozyten direkt infiziert, wie im Beispiel HIV Typ-1 (Bruggeman et al. 2000). Andererseits können auch durch die Virusinfektion freigesetzte inflammatorische Zytokine an die Rezeptoren der Podozyten binden und so Einfluss auf sie nehmen (D'Agati 2011).

Die drogenassoziierten Formen können beispielweise durch Heroin ausgelöst werden, wobei die Reinheit des Heroins einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung der FSGS zu haben scheint, da verunreinigtes Heroin die Ausprägung verstärkt (Friedman und Rao 1995). Bei den medikamentenassoziierten Formen der FSGS steht vor allem die durch Pamidronat (PAM) induzierte Form im Vordergrund, möglicherweise durch eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts (Markowitz et al. 2001). Neben PAM scheint auch die Therapie mit Interferonen (Markowitz et al. 2010) oder mTOR Inhibitoren wie Rapamycin (Vollenbröker et al. 2009) eine FSGS auslösen zu können.

Eine weitere große Gruppe der sekundären FSGS stellen die adaptiven Formen dar. Hier finden strukturelle und funktionale Anpassungen auf erhöhte Kapillardrücke oder Plasmaflussraten statt. Durch eine glomeruläre Hypertension kommt es zu einer Vergrößerung des Glomerulus (Rennke und Klein 1989) und zu einer lokalen Gefäßexpansion, wodurch mechanischer Stress auf die Podozyten ausgeübt wird, welche mit einem hypertrophen Wachstum reagieren und sich an die Bowmankapsel anreihen. Lokal kommt es zur Ablösung der Podozyten von der GBM, wodurch Parietalzellen an die GBM adhärieren können (Nagata und Kriz 1992).

Histologisch unterscheidet man zwischen verschiedenen Unterformen der FSGS. Dazu gehören die nicht-anderweitig-spezifizierte, die perihiläre, die zelluläre und die kollabierende Läsion genauso wie die Spitzenläsion (D'Agati et al. 2004).

Um eine Prognose für das Fortschreiten der FSGS zu stellen, werden verschiedene Merkmale berücksichtigt. Vor allem die Remission der Proteinurie scheint eine entscheidende Rolle zu spielen, da bei rascher Remission die Prognose deutlich besser ist (Chun et al. 2004). In einer Studie zwischen 1982 und 2001 mit 197 Patienten, die unter einer durch Biopsie gesicherten FSGS erkrankt waren, hatten Patienten mit der kollabierenden Variante das geringste ein-und drei-Jahres-Überleben. Die höchste Remissionsrate und das höchste drei-Jahres Überleben wiesen Patienten mit Spitzenläsion auf (Thomas et al. 2006).

Die Therapie der FSGS strebt eine partielle oder totale Remission sowie den Erhalt der renalen Funktion an. Kinder mit einem nephrotischen Syndrom werden empirisch für vier bis sechs Wochen mit Prednisolon behandelt, in der Regel wird nur im Falle einer Glukokortikoidresistenz eine Nierenbiospie vorgenommen. Im Vergleich dazu wird bei Erwachsenen häufig schon vor Beginn der Therapie eine Biopsie durchgeführt. Die initiale Therapie bei adaptiven Formen ist eine Behandlung mit Blockern des Renin-Angiotensin-Systems und eine salzarme Diät. Bei anderen sekundären Formen wird zuerst die Ursache behandelt. Die primäre Form der FSGS wird mit Glukokortikoiden oder in resistenten Fällen mit einem Calcineurin-Inhibitor behandelt (D'Agati 2011).

1.5 Der Apoptose-induzierende Faktor und sein Anteil am programmierten Zelltod

Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) wird von dem *AIFM1* Gen codiert und ist ein mitochondriales Flavoprotein mit einer molekularen Masse von 613 Aminosäuren und 67 kDa. Es wird im Zytosol synthetisiert und nach Abspaltung einer mitochondrialen Lokalisationssequenz durch eine mitochondriale Signalpeptidase in das Mitochondrium importiert (Otera et al. 2005). Nach Abspaltung dieser Sequenz liegt das reife AIF mit einer molekularen Masse von 57 kDa vor (Susin et al. 1999b). Im Vergleich zu dieser Beobachtung konnten Otera et al. (2005) eine Masse von 62 kDa des reifen AIF detektieren.

In gesunden Mitochondrien übernimmt AIF die Funktion einer Oxidoreduktase, die mit seiner N-terminalen Domäne in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist. Die C-terminale Domäne befindet sich im intermembranösen Raum (Otera et al. 2005) (Arnoult et al. 2002). Genauso wie eine Lokalisation an der inneren Membran ist auch eine zweite Lokalisation an der zytosolischen Seite der äußeren Membran möglich, wie unter anderem in Neuronen gezeigt werden konnte. Außerdem konnte auch eine geringe Menge an freiem AIF im Intermembranraum nachgewiesen werden (Yu et al. 2009). Im Vergleich zu seiner pro-apoptotischen Rolle scheint AIF auch eine anti-apopotische Funktion zu erfüllen, da es durch seine Oxidoreduktaseseaktivität freie Radikale abfangen kann (Miramar et al. 2001). Dies zeigt sich auch in einem Harlequin-Maus Modell, hier führen verringerte Mengen an AIF in Neuronen zu einem Anstieg neuronaler Schäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht werden (Klein et al. 2002). Außerdem scheint AIF in Neuronen während der Entwicklung kortikaler Strukturen sowie in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie einen entscheidenden Einfluss zu haben. Die physiologischen Funktionen von AIF sind unabhängig von seiner Rolle als apoptotischer Stimuli zu betrachten (Cheung et al. 2006).

Im Zuge eines apoptotischen Reizes kommt es zur Porenbildung in der inneren Mitochondrienmembran und nachfolgend zu einer Verringerung des Membranpotentials (Zamzami et al. 1995). Im weiteren Verlauf kommt es zur Permeabilitätserhöhung der äußeren mitochondrialen Membran und zur Freisetzung löslicher Proteine aus dem intermembranösen Raum (Heiden et al. 1997). In Folge eines apoptotischen Stimulus kommt es zur Aktivierung einer Protease, die für die Ablösung von AIF von der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist. AIF befindet sich dann als abgespaltene Form im Intermembranraum und kann freigesetzt werden (Otera et al. 2005). Zu den Proteinen, die vom Intermembranraum in das Zytosol übertreten, gehören Cytochrom c (Kluck et al. 1997), Procaspase 2, 3 und 9 (Susin et al. 1999a) (Mancini et al. 1998) sowie AIF (Susin et al. 1996). Die Freisetzung von AIF über die Permeabilitäts-Transitions-Pore kann durch Cyclosporin A inhibiert werden (Susin et al. 1999b).

Nach Induktion des Zelltods transloziert AIF in das Zytosol und in den Nukleus, zur gleichen Zeit, zu der auch das mitochondriale Transmembranpotential reduziert wird und die Zellkerne eine Chromatinkondensation aufweisen. Die Überexpression von Bcl-2 verringert die induzierte Freisetzung von AIF und Cytochrom c und stabilisiert das Transmembranpotential (Susin et al. 1999b). Der Effekt von AIF scheint nicht von anderen zytoplasmatischen Faktoren abhängig zu sein und ist bereits nach einer Minute nachweisbar. Im Zuge dessen kommt es zu einer Bindung an Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Ye et al. 2002) und zur Fragmentierung von Chromatin, wobei Fragmente einer Größe von etwa 50 Kilobasen entstehen. Die Fragmentierung kann durch Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und 4-Chlormercuribenzoesäure gehemmt werden. Durch die intrazelluläre Injektion von AIF oder AIF mit der Deletion der Aminosäuren 1-120, die nur beim Precursor Protein nachweisbar sind und als mitochondriale Lokalisationssequenz dienen, kommt es zur nukleären Chromatinkondensation, zum DNA Verlust, zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie zur Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Seite der Plasmamembran. Der zytosolische beziehungsweise nukleäre Effekt von AIF kann nicht durch den Caspase Inhibitor Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone Z-VAD-FMK und Bcl-2 verringert werden. Dass Caspase-Inhibitoren den AIF-induzierten Zelltod nicht verhindern können, lässt den Rückschluss zu, dass diese Form des Zelltodes Caspase-unabhängig ist (Susin et al. 1999b).

Der Caspase-abhängige Zelltod wird als Apoptose bezeichnet und ist als ein regulierter Bestandteil des physiologischen Zellzyklus beschrieben (Hengartner 2000). Im Zuge der Apoptose kommt es zur Kondensation von Chromatin, zur Fragmentierung und zur Bildung

von Apoptosekörpern, die von einer intakten Zellmembran umgeben sind. Diese Apoptosekörper werden im weiteren Verlauf phagozytiert und von anderen Zellen degradiert (Kerr et al. 1972).

Im Vergleich zur Apoptose sind die nicht-apoptotischen Zelltodmechanismen deutlich weniger erforscht. Zu diesen Mechanismen gehören zum Beispiel die Autophagie, die Nekrose sowie diverse Zwischenformen (Edinger und Thompson 2004) (Golstein et al. 2003) (Clarke 1990) (Clarke 2002). Die Unterscheidung zwischen den nicht-apoptotischen Mechanismen ist Gegenstand vielfältiger Diskussionen und ist morphologisch anspruchsvoll. Bei der Autophagie werden innerhalb der sterbenden Zelle autophagozytotische Vakuolen gebildet (Dunn 1990). Während des nekrotischen Zelltodes kommt es zu einer gesprenkelten Chromatinkondensation, zum Anschwellen des Mitochondriums sowie der gesamten Zelle, zu einer Unterbrechung der Membranintegrität, zu einem Verlust der mitochondrialen Ultrastruktur und zu einem Austreten von intrazellulärem Bestandteilen (Golstein et al. 2003) (Wang et al. 2009). Im Gegensatz zu früheren Auffassungen scheint es sich bei der Nekrose genauso wie bei der Apoptose um einen regulierten Mechanismus zu handeln, der eine Rolle bei der Entwicklung und der Erhaltung der Homöostase von Organismen spielt (Zong und Thompson 2006).

Zu den Mediatoren der Nekrose gehören unter anderem Calcium, der Tumornekrosefaktor α (TNFα), die Aktivierung von Calpain (Wang 2000) sowie reaktive Sauerstoffspezies (Zong und Thompson 2006). Letztere können, genauso wie Alkylantien (Moubarak et al. 2007), DNA-Schäden verursachen, was unter anderem zur Aktivierung der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) führt und so eine Form der programmierten Nekrose auslöst (D'Amours et al. 1999) (Zong und Thompson 2006) (Zong et al. 2004). Durch die Aktivierung der PARP-1 kommt es zur Bildung des PAR Polymers unter Verbrauch von Nicotinamidadenindinucleotiden (NAD) (D'Amours et al. 1999) und zur poly(ADP-ribosyl)ierung von Schlüsselproteinen zur DNA Reparatur (Baritaud et al. 2010). Das PAR Polymer induziert auf bisher unbekannte Weise die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium und die Translokation in den Zellkern sowie eine nukleäre Kondensation, was die oben beschriebenen Konsequenzen zur Folge hat. Hierfür transloziert PAR Polymer vom Nukleus in das Zytoplasma und zeigt eine mitochondriale Lokalisation, wie Yu et al. (2006) in einer Studie an Neuronen zeigen konnten. Der durch die Aktivierung von PARP -1 ausgelöste Zelltod wird zur Unterscheidung von der Nekrose und der Apoptose als Parthanatos bezeichnet. Im Vergleich zur reinen Nekrose kommt es nicht zu einem Anschwellen der Zelle, sondern zur Kondensation des Zytoplasmas, die DNA wird in große Fragmente zerlegt und nicht wie

bei der Nekrose hydrolysiert. Beim Parthanatos zeigt sich eine mitochondriale Depolarisation und nicht wie oben beschrieben ein Verlust der mitochondrialen Ultrastruktur (Wang et al. 2009).

Als wichtiger Zwischenspieler agiert hier die Cysteinprotease Calpain1, die AIF in der Nähe seiner N-terminalen Domäne spaltet, sodass die freie verkürzte AIF (tAIF)-Variante mit einer Masse von 57 kDa ohne Bezug zur inneren Mitochondrienmembran entsteht. Bei diesem Prozess verliert AIF das hydrophobe Transmembransegment (Polster et al. 2005) (Otera et al. 2005). Die Protease Calpain1 wird durch Calcium und andere apoptotische Stimuli aktiviert (Otera et al. 2005). In einer Studie von Braun et al. (2002) konnte die Freisetzung von AIF und der Zelltod durch die Komplexierung von Calcium inhibiert werden. Moubarak et al. (2007) konnten zeigen, dass die Calpain1 Aktivierung nach alkylierendem DNA Schaden PARP–1 abhängig ist. Die Freisetzung von AIF kann nicht allein durch den Porenbildner Bid, sondern nur durch Bid und Calpain1 in Kombination gefördert werden, was den Rückschluss zulässt, dass Calpain1 durch die Pore ins Mitochondrium gelangen kann und dort proteolytisch aktiv wird (Polster et al. 2005) Sowohl die AIF Freisetzung, als auch der resultierende Zelltod konnten durch Bcl-2, ein anti-apoptotisches Mitglied der Familie der Bcl-Proteine, inhibiert werden. Die Aktivierung des pro-apoptitischen Protein Bax führt zur Bildung einer mitochondrialen Pore, wodurch mitochondriale Proteine wie AIF ins Zytoplasma gelangen können. Bax transloziert, induziert durch 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (MNNG), vom Zytoplasma zum Mitochondrium. Die Aktivierung und Translokation zum Mitochondrium von Bax ist Calpain1 und PARP-1 abhängig (Moubarak et al. 2007).

In Fibroblasten konnten Scharstuhl et al. eine Beteiligung des spannungsabhängigen Anionen Kanal (VDAC) nachweisen, der eine Komponente des Permeabilitäts-Transitions-Poren Komplex darstellt. Der VDAC Inhibitor 4,4-Diisothiocyanato-Dihydrostilben-2,2-Disufonsäure konnte die Freisetzung von AIF ins Zytoplasma und so den Zelltod verhindern, möglicherweise über eine Inhibierung der Translokation von Bax zum Mitochondrium, da Bax mit VDAC interagiert. Im Vergleich dazu konnte Cyclosporin A als Inhibitor des Permeabilitäts-Transitions-Porenkomplexes dieses nicht verhindern (Scharstuhl et al. 2009).

In Abgrenzung zur bislang gezeigten Lokalisation von AIF konnten Yu et al. (2009) zeigen, dass etwa 30 % des AIF locker mit der äußeren Mitochondrienmembran in Verbindung steht und sich auf der zytosolischen Membranseite befindet. Etwa 20 % des AIF transloziert in ungespaltener Form zum Nukleus und löst dort den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) induzierten Zelltod aus. Laut dieser Studie spielt Calpain keine Rolle beim PARP-1 induzierten Zelltod.

Der Signalweg von AIF im Zellkern ist weitestgehend unbekannt. Artus et al. konnten zeigen, dass AIF im Zellkern über seine C-terminale Domäne mit Histon H2AX direkt interagiert und einen Komplex mit CyclophilinA (CypA) bildet (Artus et al. 2010). Histon H2AX gehört zu der Histon H2A Familie, die am Aufbau des Nukleosomen-Core-Partikels beteiligt ist. Kommt es zum DNA Doppelstrangbruch durch Alkylatientien wie MNNG, wird H2AX an Serin139 phosphoryliert und dann als γ-H2AX bezeichnet (Thiriet und Hayes 2005) und ist deshalb ein sehr sensitiver Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (Fernandez-Capetillo et al. 2004). γH2AX scheint die Struktur des Chromatins zu verändern, um die Anlagerung von Reparaturfaktoren zu ermöglichen (Paull et al. 2000). Die Phosphorylierung ist wahrscheinlich entscheidend für den Ablauf der programmierten Nekrose. Ohne H2AX oder Cyp A kann AIF keine Chromatinkondensation und DNA Fragmentierung (auch bezeichnet als Chromatinolyse) im Zellkern hervorrufen und so keinen programmierten Zelltod auslösen. Artus et al. (2010) konnten zeigen, dass es nach einer MNNG-induzierten programmierten Nekrose zu einer Phosphorylierung von H2AX an Serin139 kommt. Sie gehen von einer Interaktion von AIF und H2AX an der C-terminalen Domäne von AIF aus und vermuten, dass die von γH2AX ausgelöste DNA-Umstrukturierung für die Wirkung von AIF erforderlich ist.

1.6 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte die Fragestellung bearbeitet werden, welche Rolle AIF in Podozyten und besonders in bereits etablierten *In-vitro*-Modellen der FSGS spielt. Die einzelnen Ziele waren die Analyse der *In-vitro*-Modelle der FSGS, die immunhistochemische Analyse der intrazellulären Lokalisation von AIF in kultivierten Podozyten und die histologische Analyse der intrazellulären Lokalisation von AIF in humanem Material. Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Effekt eine Überexpression und ein Knock-down von AIF auf das Überleben der Podozyten haben. Zusätzlich sollte eine Analyse der Zelltodmechanismen vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Agens	Hersteller
1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
10X Fast Digest Green Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
2x Lämmli Sample Puffer	Bio Rad, Hercules, USA
(3-Aminopropyl)triethoxysilan	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4,5 % Formaldehyd	Büfa Chemikalien GmbH & Co.KG, Hude, Deutschland
4x Lämmli Sample Puffer	Bio Rad, Hercules, USA
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Bio Labs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
AllStar Neg. Control siRNA (20 nmol)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Annexin V	BioLegend, San Diego, USA
Annexin V Binding Buffer	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Mouse Conventional Immuno Gold Reagent, 6nm	Aurion Immuno Gold Reagent& Accessories, Wageningen, Niederlande
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Complete, EDTA-free (1 Tablette gelöst in 2 ml H_2O)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
CutSmart Buffer	New England Bio Labs GmbH, Frankfurt am

	Main, Deutschland
DC Protein Assay Reagent A	Bio Rad, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio Rad, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagent S	Bio Rad, Hercules, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Honeywell, Morris Plains, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (1x)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Doxorubicin Hydrochlorid (Adriamycin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (100 %) (EtOH)	Chemsolute®, Renningen, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FastDigest KpnI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest NotI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit, Starter Pack	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Fremont, USA
Heat inactivated FBS	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Buffer Solution	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
HiPerFect Tranfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Insulin-Transferrin-Sodium	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamine 200 mM	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Larixyl acetate	HWI pharma services GmbH, Ruelzheim, Deutschland

LB-Medium (Luria/ Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol® 4-88	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NP-40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
O‘ GeneRuler DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pamidronat disodium sulfate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
ROTI®Plast Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin Streptomycin 10,000 U/mL	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Phenylmethanesulfonyl fluoride solution	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Bio Labs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Polybrene	Merck MIllipore, Burlington, USA
Ponceau S (C.I. 27195)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Propidiumjodid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Puromycin Aminonukleosid	Cayman Chemical, Michigan, USA
RPMI Medium 1640	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
siRNA AIF PDCD8 11	Qiagen, Hilden, Deutschland
SiRNA AIF PDCD8 6	Qiagen, Hilden, Deutschland
siRNA negativ Kontrolle	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sodium deoxycholate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Sodium orthovanadate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
StarPure Agarose, Low EEO Standard	Starlab International GmbH, Hamburg,

	Deutschland
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, USA
Tris-aminomethan (TRIS)-Borat-EDTA-Puffer (TBE) Puffer (10x)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Thimerosal	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trans Blot Turbo 5x Transfer Puffer	Bio Rad, Hercules, USA
TransIT-LT1 Reagent	Mirus Bio, Madison, USA
TRIS Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-hydrochlorid Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris/Glycin/SDS Puffer	Bio Rad, Hercules, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Western Lightning Plus-ECL	PerkinElmer, Waltham, USA
X-tremeGENE HP DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Antikörper (nach Antigen)	**Herkunft**	**Verdünnung**	**Hersteller**
γH2AX (#9718)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
AIF (Klon 4E7)	Maus	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Caspase – 3 (#9662)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
GAPDH (D16H11) XP	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA

(#5174S)			
Monoclonal Anti-β-Aktin (A2228)	Maus	1:1000	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PARP (#9542)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
Podocin (P0372)	Kaninchen	1:1000	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Antikörper	**Verdünnung**	**Hersteller**
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen (IF)	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus IgG, Rabbit anti- Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Cy5, Invitrogen #10537643	1:1000	Fisher Scientific, Vantaa, Finnland
Polyklonal Ziege-anti-Kaninchen, Goat anti- Rabbit igG (H+L) Highly Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647 #A32733	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper	**Verdünnung**	**Hersteller**
DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol)	1:1000	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Invitrogen™ Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	1:400	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Material	**Hersteller**
Cellstar Röhrchen (15 ml,50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Combitips advanced (1 ml; 5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryo Pure Röhrchen (1,8 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritzen BD Discardit II (10 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Händedesinfektionsmittel	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Mikro-Schraubenröhre 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, 4-15 %	Bio Rad, Hercules, USA
Objektträger	Labortechnik Süsse, Gudensberg, Deutschland
Parafilm	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA
Pasteurpipetten 230mm	Th. Geyer Ingredients GmbH&Co. KG
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips (0,1-20 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Quality Tips (0,1-20 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen für Durchflusszytometer (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Syringe Filter	Nalge Nunc International, Rochester, USA
TC-Flasche T75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

TC-Schale 100	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trans-Blot Turbo Mini-size Transfer Stacks	Bio Rad, Hercules, USA
Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Nitrocellulose	Bio Rad, Hercules, USA
TransBlot Turbo Mini size nitrocellulose Membran	Bio Rad, Hercules, USA
Untersuchungshandschuh Sempercare nitrile skin[2]	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Wien, Österrreich
Waschlotion	Schülke& Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Zellkulturplatte 12-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatte 6-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatte 96-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 6: Geräte

Geräte	**Hersteller**
Agarosegeldetektionssystem BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen, Deutschland
Analysewaage R160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autostainer Link 48	Agilent Technologies, Kalifornien, USA
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Blaubrand-Zählkammer	Brand GmbH+ Co Kg, Wertheim, Deutschland
Brutschrank Heracell 150 (+33 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank, CO2 Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland

(+37 °C)	
Canon EOS 650D	Canon Deutschland, Krefeld, Deutschland
EC 3000-90 Power Supply	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einfriercontainer, Nalgene Mr. Frosty	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Elektrophorese-Kammer Blue Marine 100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flockeneisbereiter AF80	Scotsman Industries, Illinois, USA
Fusion FX Vilber Lourmat Analysekamera	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Kamm 1,5 mm, 8 wells, BM-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank Sikarost Comfort (+4 °C, -20 °C)	Siemens, München, Deutschland
LC-/AC-Waage LC 620s manual	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle 8018E	Bauknecht Hausgerät GmbH, Stuttgart, Deutschland
Mini Protean Tetracell	Bio Rad, Hercules, USA
Mini Protean Tetrasystem	Bio Rad, Hercules, USA
Muse Cell Analysator	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Optiplex 780 Desktop PC	Dell, Texas, USA
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland

Power-Pac 200/300	Bio Rad, Hercules, USA
Schlittenmikrotom Leica SM2010 R	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Shandon Excelsior ES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektrales konfokales Laserscanning Mikroskop IX81	Olympus, Tokio, Japan
Systec VX-100 Autoklav	Systec, Linden, Deutschland
Tecan Plate Reader infinite M200 Pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermo Scientific EC3000-90 Electrophoresis Supply	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio Rad, Hercules, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5804	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Perfect Spin Mini	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Tabelle 7: Software

Software	**Hersteller**
Adobe Photoshop CC2018	Adobe Systems Inc., Kalifornien, USA
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Fluoview FV 1000	Olympus, Tokio, Japan
Fusion FX Evolution- Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland

GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc., Kalifornien, USA
Inkscape	Inskape Project c/o Software Freedom Conservancy, New York, USA

Tabelle 8: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	**Hersteller**
EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	Agilent Technologies, Kalifornien, USA
EnVision FLEX Wash Buffer (20x)	Agilent Technologies, Kalifornien, USA
Muse Count&Viability Kit 40ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Plasmid Midi Kit (25)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript IV Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 9: Plasmide und Vektoren

Plasmid	**Hersteller**
Mouse AIFM1 ORF mammalian expression plasmid, C-Myc tag	Sino Biological Inc., Pennsylvania, USA
pCMV3-C-Myc Negative Control Vector (C-terminal Myc-tagged)	Sino Biological, Peking, China
pCR-2.1-TOPO Vektor	Invitrogen, Carlsbad, USA

pENTR AIF Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Für die Forschungsarbeit stand die bedingt immortalisierte Podozytenzelllinie AB8/13 zur Verfügung. Diese Zelllinie proliferiert bei 33 °C, die Ausdifferenzierung findet bei 37 °C statt. Bei 37 °C werden Marker differenzierter Podozyten exprimiert. Diese Temperatursensitivität wird durch das SV40-T Gen, welches bei 37 °C inaktiviert wird und ein Telomerasegen hervorgerufen (Saleem et al. 2002). Die Inkubation erfolgte bei 5 % CO_2. Für die Ausdifferenzierung benötigen die Zellen etwa sieben Tage. Verwendet wurden die Passagen 7-35. Die Zelllinien wurden freundlicherweise durch Jochen Reiser und Mohammed Saleem zur Verfügung gestellt. Der Ethikantrag mit der Antragsnummer 8/7/18 wurde ohne medizinisch-ethische oder rechtliche Bedenken genehmigt.

2.2.2 Zellkultur

Die gesamte Arbeit mit der Zellkultur fand stets unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank statt, um eine Kontamination der Zellen zu verhindern.

Zur Proliferation der Zellen befanden sich die Podozyten in einer T75-Flasche im Inkubator bei 33 °C. Sie waren adhärent auf dem Flaschenboden und wurden mit einer Nährlösung bestehend aus Kulturmedium und Insulin-Transferrin im Verhältnis 1:100 (Endkonzentration 0,005 µg/ml Insulin, 0,005 µg/ml Transferrin, 0,005 ng/ml Natrium Selenit) versorgt. Ein Medienwechsel fand alle drei Tage statt.

Zur Trypsinierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und mit 3 ml 1x Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Dieses wurde abgesaugt, dann 2 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und die Flasche für 2 min bei 33 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen leicht abgeklopft und deren Ablösung vom Flaschenboden unter dem Lichtmikroskop überprüft. Danach wurde die Trypsinierung mit 2 ml Medium gestoppt.

Zum Teilen (1:2) der Zellpopulation wurden zweimal 2 ml des Trypsin-Medium-Zell-Gemisches in neue Flaschen überführt und auf 10 ml Medium aufgefüllt. Hierbei entstand eine neue Passage. Die Teilung fand bei einer Konfluenz von 80-90 % statt.

Eingefrorene Zellen wurden aufgetaut und mit 5 ml Medium in einem 15 ml Falconröhrchen aufgefüllt und anschließend für 2 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute (RPM) in der Zent-

rifuge Eppendorf 5804 zentrifugiert. Der Überschuss wurde abgenommen, das Pellet wurde in 2 ml Medium resuspendiert und anschließend in eine T75-Flasche mit 8 ml Medium überführt.

Zum Einfrieren der Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt und anschließend mit 3 ml 1xPBS gespült. Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsiniert und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Dieses Röhrchen wurde für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 1200 RPM in der Zentrifuge Eppendorf 5804 zentrifugiert und der Überschuss entfernt. Das Pellet konnte nun mit 1,5 ml Medium resuspendiert werden und mit weiteren 1,5 ml Einfriermedium zur Zellstabilisierung versetzt werden. Nun wurden drei Einfrierröhrchen mit je einem Milliliter der Zelllösung befüllt und vorerst in einem Einfriercontainer (Abkühlung -1 °C pro Minute) für 24 h bei -80 °C gelagert, danach konnten sie in flüssigem Stickstoff zur langfristigen Lagerung überführt werden.

Zum Aussäen der Zellen wurden diese wie bereits oben beschrieben trypsiniert (2 ml Trypsin) und die Trypsinierung mit Medium (18 ml) abgestoppt.

Von diesen 20 ml wurden 10 µl entnommen und auf jeweils zwei Felder der Zählkammer pipettiert. Auf diesen zwei Feldern finden sich insgesamt viermal 16 Rechtecke, innerhalb derer die Zellen ausgezählt und ein Mittelwert berechnet wurde. Dieser Mittelwert wurde mit 10.000 multipliziert, woraus sich die Zellanzahl pro Milliliter ergab. Diese Zellzahl wurde mit dem totalen Volumen (20 ml) multipliziert, um die gesamte Zellzahl zu erhalten. Die gewünschte Zellzahl (auf einer konfluenten10 cm-Platte in der Regel 150.000) konnte nun auf die Platten verteilt werden. Die Zelllösung wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit Medium aufgefüllt und wie oben beschrieben mit Insulin und Transferrin versetzt. Anschließend wurden die Platten leicht geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Diese Platten wurden zur Differenzierung bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 10: Puffer und Lösungen Zellkultur

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
Einfriermedium	50 % fetales Kälberserum (FCS), 30 % Kulturmedium, 20 % DMSO
Kulturmedium	RPMI Medium 1640 ,10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Glutamin

2.2.3 Analysen auf Proteinebene

2.2.3.1 Proteinisolation

Für die Isolierung von Proteinen aus Podozyten wurde das Medium aus der Kulturschale abgenommen und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 500 µl PBS wurde der Boden der Kulturschale mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und so die adhärenten Zellen vom Boden gelöst. Das Zell-PBS-Gemisch wurde nun mit einer Pipette aufgenommen und in das entsprechende Schraubröhrchen überführt. Anschließend wurden die befüllten Röhrchen in der Zentrifuge Eppendorf 5804 bei 2000 RPM für 1 min zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus Medium und PBS, wurde anschließend abgenommen und verworfen. Nun wurden 500 µl PBS zugefügt und die Lösung mit den Zellen resuspendiert, um die Zellen zu waschen und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen aufgenommen. Die Röhrchen wurden erneut für 3 min bei 4 °C und 2000 RPM in der Zentrifuge Eppendorf 5430R zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 100 µl Lysepuffer und sorgfältiger Resuspension durch den Vortex Genie 2 für drei Sekunden wurde die Lösung für 15 Minuten inkubiert. In der Inkubationszeit wurde in fünf-minütigen Abstand eine Durchmischung durch den Vortex Genie 2 vorgenommen. Anschließend wurden alle Röhrchen für 30 Minuten bei 4 °C mit 14000 RPM in der Zentrifuge Eppendorf 5430R zentrifugiert. Von dem dabei entstehenden Überstand wurden jeweils 70 µl in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Überschüsse des Überstandes wurden für die Proteinmessung verwendet. Die 70 µl wurden mit 30 µl 4-fach Laemmli Puffer vermengt und für 5 min bei 94 °C aufgekocht. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Tabelle 11: Puffer und Lösungen Proteinisolation

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
4x Laemmli-Puffer	900 µl 4x Laemmli Sample Buffer, 100 µl Mercapto Ethanol
Lysepuffer	940 µl Ripa-Puffer, 40 µl Complete, EDTA-free, 10 µl Phenylmethanesulfonyl fluoride solution, 10 µl Sodium orthovanadate
Ripa-Puffer (für 1 l)	1 l PBS, 5 g Sodium deoxycholate, Igepal Ca-630

2.2.3.2 Proteinmessung

Bei der Proteinmessung wurde der Überstand (beschrieben in 2.2.3.1) verwendet. Zuerst wurde eine Lösung, bestehend aus Reagenz S und Reagenz A (DC Protein Assay) im Verhältnis 1:50 angesetzt. Von dieser Lösung wurden jeweils 20 µl in eine 96-Well-Mikrotestplatte vorgelegt. Jede Proteinprobe wurde in Triplikaten gemessen, sodass von jedem Proteinlysat anschließend dreimal 2 µl pipettiert wurden. Der Lysepuffer diente als Negativkontrolle. Dann wurden 200 µl der Substanz B zugegeben und die Platte für 10 min bei RT inkubiert. Die Messung wurde mit dem Tecan Reader durchgeführt. Aus der Konzentration des Proteinlysats wurde errechnet, wie viel Volumen des Proteinlysats 15 µg Protein entsprechen.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot

Für den Western Blot wurden Zwölf-Kammer Gele verwendet, von denen jede Kammer mit dem errechneten Volumen des Proteinlysats entsprechend der Proteinmessung (15 µg Protein) befüllt wurde. Das Proteinlysat wurde aufgefüllt mit 1x Laemmli Puffer, um alle Kammern gleichmäßig zu befüllen. Zusätzlich wurde je eine Kammer mit der Proteinleiter versehen, die übrigen wurden mit 1x Laemmli Puffer aufgefüllt. Die SDS-Page lief bei 80 Volt in dem Laufpuffer für etwa 3 h. Anschließend wurde der Laufpuffer aufgefangen, die Gelform aufgebrochen und das Gel in eine Schale mit Transferpuffer gelegt. Danach wurde es auf eine Schicht Filterpapier und auf die Membran aus Nitrozellulose in die Schublade des Transfergerätes gelegt, mit einer weiteren Schicht Filterpapier bedeckt und die Luftblasen herausgerollt. Der Transfer konnte nun nach dem Schließen der Schublade gestartet werden. Nach Ende des Transfers wurde die Membran mit Ponceau kurz angefärbt und unbedeutende Teile der Membran entfernt, sowie eine visuelle Kontrolle vorgenommen, ob erwartete Banden vorhanden sind. Die Entfärbung fand mit destilliertem Wasser statt. Dann wurde mit Magermilch für 60 min geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4 °C geschwenkt. Am folgenden Tag fand eine dreimalige Spülung für jeweils 15 min mit TBS-T und nachfolgend die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 60 min statt. Danach wurde erneut dreimal 15 min gewaschen und die Entwicklungslösung appliziert. Die Darstellung der Proteinbanden fand entsprechend der Qualität des Signals mit unterschiedlichen Belichtungsdauern statt.

Tabelle 12: Puffer und Lösungen Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x TBS (für 1 l)	1 l doppelt destilliertes Wasser (ddH_2O) 292,7 g Natriumchlorid (NaCl), 4,24 g Tris, 26 g Tris-HCl
1x Laemmli-Puffer	500 µl 2x Laemmli Sample Buffer, 500 µl Ripa-Puffer
Laufpuffer	100 ml Tris/Glycin/SDS Puffer, 900 ml destilliertes Wasser
Magermilch	2,5 g Magermilchpulver, 50 ml Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (TBST)
Ponceau	0,1 % (w/v) Ponceau, 1 % (v/v) Essigsäure, 98,9 % ddH_2O
TBS-T	9 l ddH_2O, 10 ml Tween 20, 1 l 10x TBS
Transferpuffer	200 ml 5xTransferpuffer, 600 ml destilliertes Wasser, 200 ml Ethanol

2.2.4 Überexpression von Proteinen

2.2.4.1 Transformation

Zur Transformation von DNA in E. coli wurden 3,176 ng DNA in 50 µl einer Lösung kompetenter *DH5 alpha E.coli* gegeben und für 15 min auf Eis gelagert. Danach folgte eine Inkubation bei 42 °C für 30 s und anschließend eine weitere Lagerung von 10 min auf Eis. Die Suspension wurde dann in 500 µl LB-Medium gegeben und bei 37 °C mit 450 RPM für 1-2 h inkubiert. Die Flüssigkeit wurde nach Abschluss des Experiments autoklaviert.

Zur Vervielfältigung der Bakterien wurden die transformierten *E. coli* Bakterien in LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Zusätzlich wurde Kanamycin zur Selektion transformierter Bakterien zugesetzt.

Tabelle 13: Puffer und Lösungen Transformation

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	25 g LB-Medium (Luria/ Miller) auf 1 l destilliertem Wasser, Kanamycin 50 µg/µl

2.2.4.2 Plasmidpräparation

Bei der Plasmidpräparation werden die Plasmide mittels alkalischer Lyse aus den transformierten Bakterien isoliert. Bei der hier verwendeten Midipräp (Plasmid Midi Kit) konnten etwa 25 µg Plasmid isoliert werden.

Hierbei wurden zuerst die Bakterien bei 8000 RPM für 15 min bei 4 °C herunterzentrifugiert. Dem bakteriellen Pellet wurde nun 0,3 ml Puffer P1 zugefügt, um die Zellen zu resuspendieren, sowie eine RNase, um die Ribonukleinsäure (RNA) zu degradieren. Dann wurden 0,3 ml Puffer P2 zugefügt, der die Zellen unter alkalischen Bedingungen lysierte. Während dieses Schrittes wurde für 5 min bei Raumtemperatur invertierend durchmischt. Der dritte Puffer P3, von dem 0,3 ml verwendet wurden, diente der Neutralisierung des pH-Wertes, da unter neutralen Bedingungen die Plasmid-DNA renaturieren kann. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C und 13000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine dem Kit beigefügte Filtersäule filtriert. Die Plasmid DNA blieb im Filter retiniert und wurde im nächsten Schritt durch zwei Waschvorgänge mit je 2 ml Puffer QC gewaschen und anschließend mit Hilfe von 0,8 ml des Puffers QF eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,56 ml Isopropanol präzipitiert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 13000 RPM in der Zentrifuge 5430 R zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das DNA Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13 000 RPM in der Zentrifuge Eppendorf 5430R für 10 min wurde der Überstand entfernt und das Pellet für 10 min getrocknet. Das trockene Pellet wurde in PE Puffer gelöst und bei 4 °C verwahrt. Mit Hilfe des Nano Drops wurde die DNA Konzentration gemessen.

2.2.4.3 Transfektion

Für die Überexpression von Proteinen durch den Vektor pCMV3-C-Myc wurden ausdifferenzierte Podozyten verwendet, die sieben Tage zuvor auf eine 10 cm Platte ausgesät wurden.

Zu Beginn wurde unter der Sterilbank ein Ansatz aus 10 µl X-tremeGENE HP DNA Transfektionreagenz, 10 µg des Plasmids (siehe 2.2.4.2) und 400 µl serumfreien Mediums hergestellt. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Podozyten getropft, deren Kulturmedium kurz zuvor gewechselt wurde. Nach 24 h konnte mit der Behandlung der Podozyten begonnen oder die Proteine isoliert werden.

2.2.5 Transienter Knock-down von Proteinen

Zur Transfektion der Zellen mit der siRNA wurden 50 µl des HiPerFect Transfektionsreagenz und 10 µl der siRNA eingesetzt, um eine 20 nM siRNA-Lösung zu erreichen. Diese Transfektionslösung wurde zusammen mit 340 µl serumfreien Medium für 30 min bei RT inkubiert. Die vorbereiteten 10 cm Platten mit ausdifferenzierten Zellen wurden mit neuem Medium versehen. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung auf die 10 cm Platten getropft und diese zurück in ihren Inkubationsschrank (37°C) gestellt. Nach 48 h wurden die Proteine isoliert (siehe 2.2.3.1).

2.2.6 Präparation der Deckgläser

Die Behandlung der Deckgläschen war notwendig, um einerseits eine Oberflächenrauigkeit und andererseits sterile Bedingungen zu erzielen. Die Oberflächenrauigkeit war von großer Bedeutung, da nur so die Zellen adhärieren konnten. Zuerst wurde eine 2 M HCl Lösung hergestellt. Die Deckgläschen wurden dreimal mit ddH_2O gespült, anschließend wurden sie für 15 min in 70 % Ethanol unter leichtem Schütteln gelagert, um sie zu entfetten. Dann wurden sie erneut dreimal mit ddH_2O gespült und an der Luft getrocknet. Nach sorgfältiger Trocknung wurde die vorbereitete HCl Lösung auf die Deckgläschen pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Die Deckgläschen wurden erneut mit Ethanol gewaschen und auf Papiertüchern getrocknet, zuletzt erfolgte die Autoklavierung.

Tabelle 14: Puffer und Lösungen Deckglaspräparation

Bezeichnung	Zusammensetzung
2 M HCl Lösung	37 % HCl Lösung in 5 ml ddH_2O

2.2.7 Fixierung und Färbung von Zellen für die Konfokalmikroskopie

Jeweils zwei Deckgläschen (siehe 2.2.6) wurden in eine 6-Well Platte gelegt. Danach wurden jeweils 40.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach Behandlung (siehe 2.2.9) der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 1x PBS gewaschen. Nun wurden die Deckgläschen in eine 12-Well-Platte umgelagert, sodass sich jeweils ein Deckgläschen in einem 12-Well befand. Anschließend wurden 500 µl 4 % Paraformaldehyd auf die Deckgläschen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert und die Zellen somit fixiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde ab-

gesaugt und die Deckgläschen mit 0,3 % Triton X-100 benetzt, um die Membrankontinuität zu unterbrechen. Dieses wurde anschließend entfernt und die Zellen dreimal für 3 min mit PBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit einer Blockierlösung blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper bei 4 °C. Am zweiten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper sowie DAPI als Kernfärbung hinzugegeben und für 60 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Zuletzt wurde dreimal mit PBS und anschließend mit ddH_2O gewaschen. Die Deckgläschen wurden umgedreht auf einen Objektträger gelegt und mit Mowiol eingedeckt.

Tabelle 15: Puffer und Lösungen Zellfärbung

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
0,3 % Triton X-100	3 µl gelöst in 1 ml PBS
AIF Antikörper (4E7), Mouse	Angesetzt im Verhältnis 1:1000
Blockinglösung	FCS, 1:100 in PBS verdünnt
DAPI	Angesetzt im Verhältnis 1:1000
Phalloidin	Angesetzt im Verhältnis 1:400

2.2.8 Konfokalmikroskopie

Bei der Konfokalmikroskopie wird spezifisch eine Ebene einer dreidimensionalen Zellstruktur, die mit einem spezifischen Antikörper angefärbt ist, betrachtet. Durch zwei Blenden kann Licht, dass nicht in der Brennebene liegt, abgestrahlt werden und so ein sehr scharfes Bild einer definierten Ebene dargestellt werden. Einzelne Bereiche werden punktförmig angestrahlt, wobei die im Sekundärantikörper befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht definierter Wellenlängen angeregt werden.

2.2.9 Imitierung des Podozytenschadens

Der Podozytenschaden wurde durch verschiedene Agenzien ausgelöst, von denen bekannt ist, dass sie einen pathogenen Einfluss auf Podozyten haben.

Verwendet wurde der zytostatisch wirkende Topoisomerase II Hemmer Adriamycin (ADR) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml, das die Proteinsynthese hemmende Antibiotikum Puromycin Aminonukleosid (PAN) in einer Konzentration von 50 µg/ml und das Bisphosphonat Pamidronat (PAM) in einer Konzentration von 100 µM. Die Podozyten wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit den Agenzien inkubiert.

2.2.10 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zellen analysiert. Die Zellen wurden mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) gefärbt, um eine Unterscheidung zwischen lebenden Zellen, Zellen in früher und später Apoptose, und nekrotischen Zellen vorzunehmen. Bei dieser Methode handelt es sich bei Annexin V-und PI-negativen Zellen um intakte, lebende Zellen, bei Annexin V-positiven und PI-negativen um apoptotische Zellen und bei Zellen, die sowohl Annexin V-positiv als auch PI-positiv sind, um nekrotische Zellen. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches bei Einleitung der Apoptose von der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran an die äußere Zellmembran transloziert. Erst wenn Phosphatidylserin sich auf der äußeren Membran befindet, kann Annexin V binden. PI ist ein kationischer Farbstoff, der nicht membrangängig ist. Nur wenn die Integrität der Membran wie bei der Nekrose nicht mehr gewährleistet ist, kann PI an DNA binden (Cummings et al. 2004).

Hierfür wurden Zellen in 10 cm oder 6-Well Platten ausgesät und für sieben Tage ausdifferenziert und eine Behandlung (s. 2.2.9) vorgenommen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Die adhärenten Zellen wurden mit 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin pro 10 cm Platte trypsiniert. Die direkte Wirkung des Trypsins auf die Zellen wurde anschließend durch das FCS im RPMI Medium inhibiert, da das zusätzliche Protein die Menge an Substrat für das Trypsin erhöht. Die Suspension wurde in das entsprechende Falconröhrchen überführt. Danach wurde der Plattenboden mit einem Zellschaber abgeschabt und die restliche Flüssigkeit ebenfalls in das Falconröhrchen überführt. Die Falconröhrchen wurden für 5 min bei 1200 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 500 µl PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde in ein Röhrchen für die Durchflusszytometrie überführt und erneut bei 1200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet in 100 µl Annexin Binding Puffer resuspendiert. Außerdem wurden je Röhrchen 5 µl Annexin V und 10 µl Propidiumjodid hinzugegeben und die Probe wurde für 15 min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden erneut 100 µl Annexin Binding Puffer hinzugegeben.

Nach der Messung wurde zuerst ein Messbereich definiert, der sich an der Hauptpopulation orientierte. Hierbei wurden unbehandelte Zellen, denen nur 200 µl Annexin Binding Puffer hinzugesetzt waren, verwendet. Gemessen wurden 3.000 – 10.000 Events.

2.2.11 Datenanalyse

Weitere Details in Bezug auf die statistische Analyse sowie die Anzahl der Replikate sind den jeweiligen Ergebnisabschnitten zu entnehmen. Signifikanzlevel wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p<0,0001$. Die Daten wurden mit Hilfe des ungepaarten T-Tests unter Anwendung von Graph Pad Prism v.7 analysiert und dargestellt. Zur Erstellung der Abbildungen wurde das Programm Inkscape verwendet.

2.2.12 Herstellung histologischer Schnittpräparate

Das gewonnene Nierengewebe wurde in 4 %iger Formalinlösung fixiert, anschließend wurde es entsprechend des Protokolls der Pathologie der Universität Göttingen über Nacht mit Hilfe des Excelsiors ES wie folgt entwässert und paraffinisiert. Das Gewebe wird für 1,5 h in Formalin 4 % inkubiert, worauf die Entwässerung durch Alkohol erfolgt. Hierbei lagert das Gewebe zuerst für 30 min in Ethanol 75-85 %, anschließend für 45 min in Ethanol 90 %, dann für 1 h in Ethanol 96 %. Es folgen drei Bäder in Ethanol 100 %, zuerst für 75 min, dann für 70 min und für 90 min. Daran angeschlossen erfolgen drei Xylol Bäder, jeweils für 20 min, dann für 30 min und für 1 h. Zuletzt erfolgen drei Paraffinbäder bei 55-65 °C für 30 min, 45 min und für 90 min. Das Gewebe wird anschließend mit heißem Paraffin in Blöcken übergossen und härtet im Zuge des Auskühlens aus. Die Blöcke werden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms in 1,5 µm dicke Scheiben geschnitten, die dann auf einen Objektträger gezogen werden, der zuvor mit einem Silan beschichtet wurde.

2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung der Schnittpräparate

Die immunhistochemische Färbung soll der selektiven Visualisierung bestimmter Antigene von Proteinen dienen. Für die Kernfärbung wurde DAPI zur direkten Anfärbung von DNA verwendet. Ansonsten wurde die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Bei der AIF-Färbung wurde ein sekundärer Anti-Maus-, bei der Podocin-Färbung ein Anti-Kaninchen-Antikörper genutzt. Die Färbung des humanen Gewebes fand mit Hilfe des Autostainers statt. Zuerst wurde das Gewebe für 5 min in dem Envision Flex Wash Puffer gewaschen. Anschließend wurde zum Blockieren der endogenen Peroxidase für weitere 5 min mit dem EnVision Flex Peroxidase-Blocking Reagenz inkubiert und wieder für 5 min mit dem Puffer gewaschen.

Anschließend wurde der primäre Antikörper aufgetragen und für 30 min inkubiert. Bevor der sekundäre Antikörper aufgetragen wurde, fand erneutes Waschen in dem Puffer für 5 min statt. Die Inkubationszeit für den zweiten Antikörper betrug 15 min. Anschließend wurde für 5 min mit dem Puffer gewaschen und mit Mowiol eingedeckt.

Tabelle 16: Puffer und Lösungen Gewebefärbung

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
AIF- Antikörper (Klon 4E7)	1:1000
DAPI	1:1000
Podocin Antikörper (P0372)	1:1000
Polyclonal Ziege-anti-Kaninchen IgG (sek. Antikörper), Alexa Fluor Plus 674	1:1000
Polyclonal Kaninchen-anti-Maus IgG (sek. Antikörper), Cy5	1:1000

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss der Behandlung mit verschiedenen Agenzien auf den podozytären Zelltod

Um in Podozyten ähnliche Pathologien hervorzurufen wie im Krankheitsbild der FSGS, wurden die Podozyten mit etablierten Stressoren behandelt (siehe 2.2.9). Bei diesen Stressoren handelte es sich um Adriamycin (ADR), Pamidronat (PAM) und Puromycin Aminonukleosid (PAN). Als Lösungsmittelkontrolle diente Wasser und DMSO in entsprechenden Konzentrationen. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Hilfe des Annexin V/Propidiumjodid (PI) Assays in der Durchflusszytometrie dargestellt und vermessen (siehe 2.2.10).

Bereits nach 24 h war lichtmikroskopisch festzustellen, dass die Dichte der adhärenten Zellen durch die Behandlungen deutlich rückläufig war. Durchflusszytometrisch konnte bestätigt werden, dass ein höherer Anteil an Podozyten unter Behandlung mit den Stressoren im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen nicht mehr vital war. Im Vergleich zur Kontrolle (H_2O: 88,52 % ± 0,90) reduzierte sich der Anteil lebender Zellen unter Behandlung mit ADR (82,32 % ± 0,91) für 24 h signifikant ($p = 0,0051$). Das gleiche galt für die Behandlung mit PAM (81,32 % ± 1,10) nach 24 h ($p = 0,0023$). Der Anteil an toten und sterbenden Zellen nahm unter der Behandlung von ADR (17,68 % ± 0,91) und PAM (18,69 % ± 1,10) im Vergleich zur Kontrolle (H_2O:11,48 % ± 0,90) signifikant zu ($p(ADR) = 0.0051$, $p(PAM) = 0,0023$) (Abbildung 1 A, B). Der Anteil an lebenden Zellen nahm unter der Behandlung mit PAN (75,17 % ± 1,28) nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle (DMSO: 89,30 % ± 0,77) signifikant ab ($p < 0,0001$) (Abbildung 1 C, D). Dementsprechend nahm der Anteil an toten und sterbenden Zellen unter der Behandlung mit PAN (24,83 % ± 1,28) im Vergleich zur Kontrolle (DMSO: 10,71 % ± 0,77) signifikant zu ($p < 0.0001$) Dieser Effekt verstärkte sich zeitabhängig, sodass nach 48 h mit der Behandlung mit ADR (lebende Zellen: 41,24 % ± 3,29, tote und sterbende Zellen: 58,77 % ± 3,29) und PAM (lebende Zellen: 57,21 % ± 2,83, tote und sterbende Zellen: 42,79 % ± 2,83) ein Großteil der Podozyten nicht mehr vital war. Diese Veränderung war im Vergleich zur Kontrolle (H_2O lebende Zellen 85,60 % ± 1,45; tote und sterbende Zellen 14,40 % ± 1,45)) signifikant (p ADR<0,0001, p PAM= 0,0001). Auch bei Behandlung mit PAN sank der Anteil der vitalen Zellen weiter (lebende Zellen 14,02 % ±

1,05; tote und sterbende Zellen 85,98 % ± 1,05). Auch diese Veränderung war im Vergleich zur Kontrolle (DMSO lebende Zellen 84,73% ± 1,32; tote und sterbende Zellen 15,28 % ± 1,32) signifikant ($p < 0,0001$).

Es konnte also gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit den verschiedenen Stressoren in der gewählten Dosierung der Zellmetabolismus der Podozyten *in vitro* gestört und so Zelltod induziert wird. Es ist anzumerken, dass trotz der Behandlung noch ein ausreichender Anteil an lebenden Zellen (Q3), vorhanden war. Dies lässt weitere Untersuchungen bezüglich der Mechanismen des podozytären Zellschadens mit Hilfe des beschriebenen Modells zu.

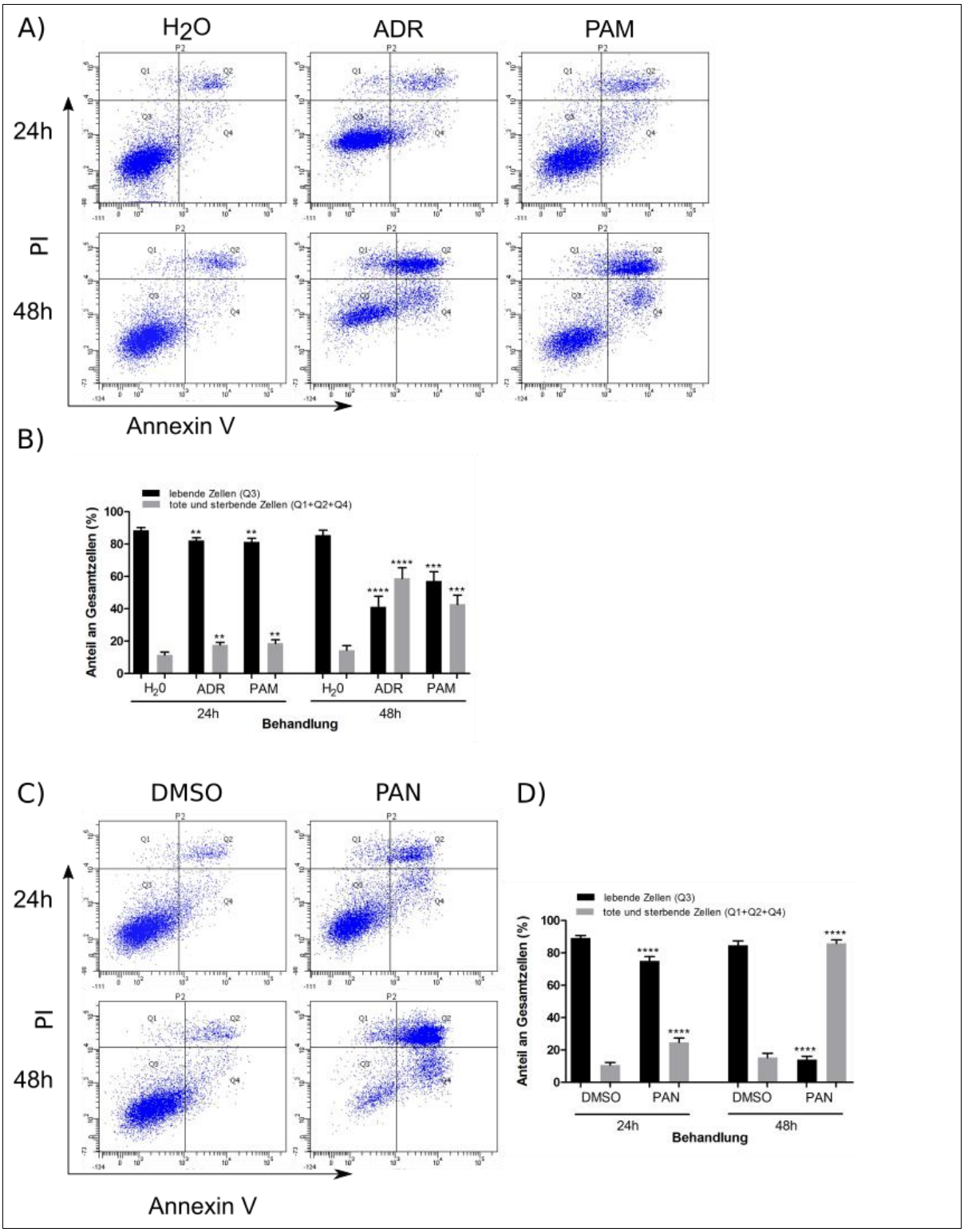

Abbildung 1: Einfluss von ADR, PAM und PAN auf den podozytären Zelltod. Die immortalisierte Podozytenzelllinie AB 8/13 wurde für 24 h und 48 h mit ADR, PAM und PAN behandelt (Konzentrationen siehe 2.2.9). Als Lösungsmittelkontrolle dienten Wasser und DMSO. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Propidiumiodid und Annexin V angefärbt und anschließend in der Durchflusszytometrie gemessen (n = 1, Daten zeigen Triplikate, Mittelwert ± Fehler der Standardabweichung). Signifikanzen wurden mit einem T-Test errechnet (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$). Die prozentualen Werte der Diagramme von A) wurden in B) aufgetragen, die prozentualen Werte von B) wurden in C) aufgetragen.

3.2 Untersuchung des *In-vitro*-Modells der fokalen segmentalen glomerulären Sklerose in Podozyten auf Proteinebene

Zur Untersuchung der zellulären Mechanismen, die durch die Behandlung der Podozyten mit ADR, PAN und PAM initiiert werden, wurden die Proteine aus den Podozyten isoliert, mit Hilfe der SDS-Page bezüglich ihres molekularen Gewichts voneinander getrennt und im Western Blot dargestellt (siehe 2.2.3).

Es war zu beobachten, dass es bei der Behandlung mit PAN bereits nach 48 h ausschließlich zu einer Detektion eines kleineren Fragmentes (57 kDa) von AIF kam. Bei der Behandlung mit ADR und PAM nach 72 h gelang der Nachweis eines großen Fragmentes (67 kDa) und eines kleineren Fragmentes (57 kDa). Bereits nach 24 h kam es unter der Behandlung mit PAN zu einer gesteigerten Proteinmenge von γH2AX im Vergleich zur Wasser-Kontrolle, dies war unter Behandlung mit ADR und PAM erst nach 48 h zu beobachten. Die gleiche Beobachtung ließ sich auf für das Spaltprodukt von Caspase3 beschreiben. Das PARP-1-Spaltprodukt ließ sich unter allen drei Behandlungen bereits nach 24 h nachweisen, am stärksten jedoch auch unter der Behandlung mit PAN.

Nach 72 h schien unter der Behandlung mit PAN kein βAktin mehr nachweisbar zu sein (Abbildung 2)

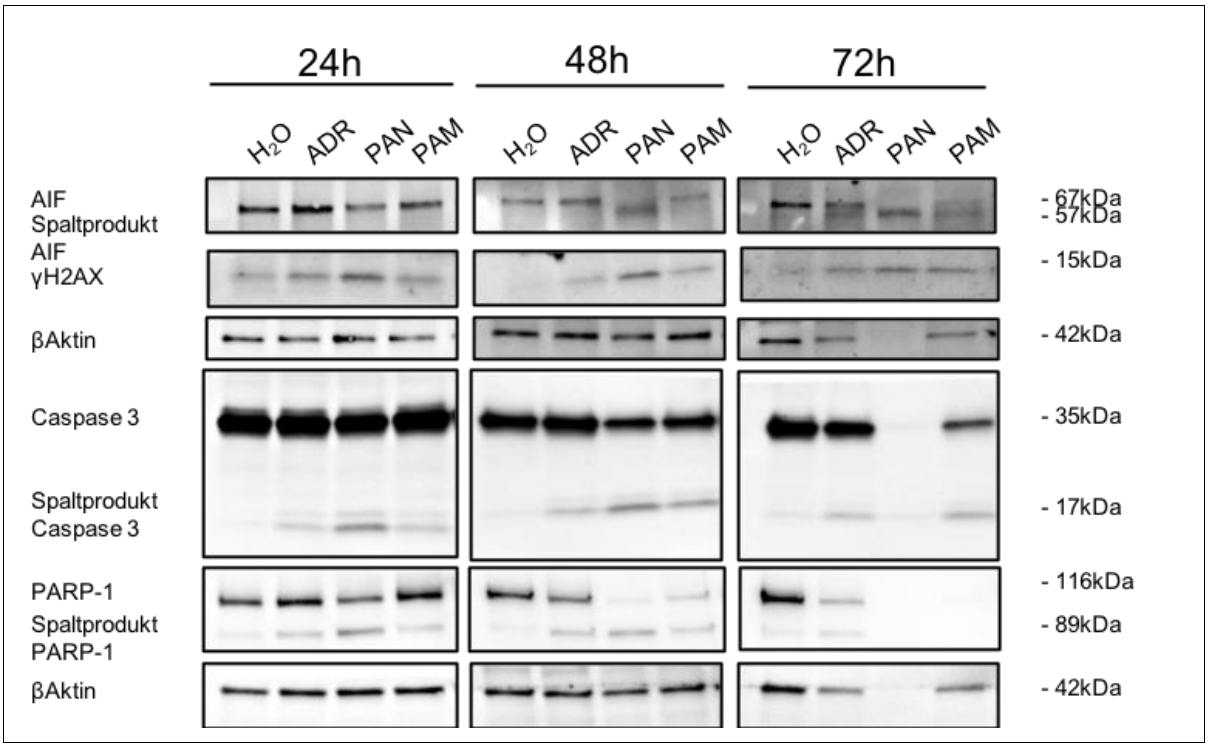

Abbildung 2: Untersuchung des *In-vitro*-Modells der FSGS in Podozyten auf Proteinebene. Nach der Behandlung der Podozyten für verschiedene Zeiträume (24 h, 48 h und 72 h, Konzentrationen siehe 2.2.9) wurden die zellulären Proteine isoliert, mit Hilfe der SDS-Page nach Größe aufgetrennt und ein Western Blot mit verschiedenen Antikörpern, die Zellstressmarker darstellen, durchgeführt. β-Aktin (42 kDa) diente zur Kontrolle gleich aufgetragener Proteinmengen. Als Lösungsmittelkontrolle diente Wasser.

3.3 Veränderung der Proteinmenge des Apoptose-induzierenden Faktors

Um die Funktion von AIF in Podozyten näher zu untersuchen, wurde die Menge des Proteins einerseits durch transiente Überexpression (Abbildung 3 A) andererseits durch induzierbaren Knock-down (Abbildung 3 B) verändert.

Die Überexpression von AIF wurde mit Hilfe eines Vektors, in dem das *AIFM1*-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors abgelesen wird und mit einem Myc-Tag versehen ist, vorgenommen (siehe 2.2.4). Deutlich wurde die um etwa 50 % verstärkte Expression im Vergleich zur einfachen Kontrolle und im Vergleich zur Kontrolle mit einem entsprechenden Leervektor (pMSCV). Dass das Plasmid in die Podozyten aufgenommen wurde, wurde durch die Expression des Myc-Anhangs unter Beweis gestellt. Die Proteinmenge von γH2AX wurde durch die Überexpression von AIF nicht verändert. Im Gegensatz dazu kam es bei einer

Überexpression von AIF zu einer verringerten Proteinmenge von PARP-1, ein Spaltprodukt wurde nicht sichtbar.

Die Verringerung der Produktion von AIF wurde durch zwei verschiedene siRNAs vorgenommen, wobei der Effekt durch PDCD8-6 noch deutlicher wurde als durch PDCD8-11 (siehe 2.2.5). Außerdem zeigte sich bei Verwendung von PDCD8-6 zusätzlich eine Expression des Spaltproduktes von AIF (57 kDa). Die Proteinmenge von γH2AX und PARP-1 wurde nur bei der Verwendung von PDCD8-6 leicht verringert. Auch hier konnte kein Spaltprodukt von PARP-1 nachgewiesen werden (Abbildung 3).

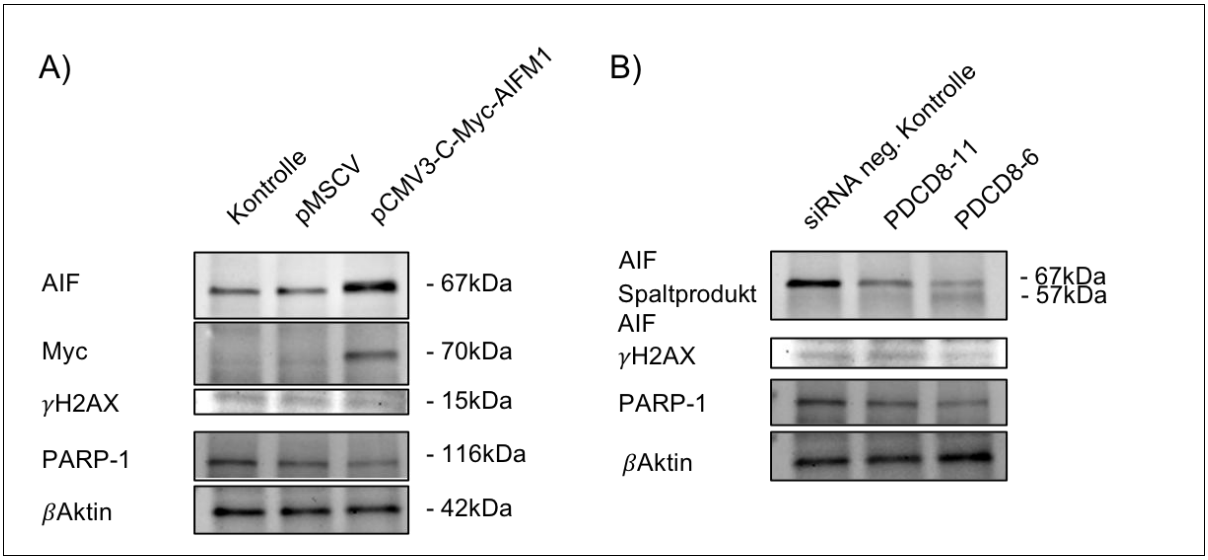

Abbildung 3: Veränderung der Proteinmenge des Apoptose-induzierenden Faktors. Mit Hilfe des Überexpressionsvektors pCMV3-C-Myc, der das *AIFM1*-Gen enthielt, wurde die Expression von AIF verstärkt. Als Kontrollvektor diente pMSCV, um eine veränderte Expression durch die Transfektion auszuschließen. Die Inkubationszeit betrug 24 h (A). Durch die Inkubation mit zwei verschiedenen siRNAs (PDCD8-11 und PDCD8-6) wurde die Expression von AIF herunterreguliert. Als Kontrolle, um Veränderungen in der Expression durch die Transfektionsreagenzien auszuschließen, diente eine negativ Kontroll- siRNA. β-Aktin (42 Da) diente zur Kontrolle gleich aufgetragener Proteinmengen (B).

3.4 Intrazelluläre Lokalisation des Apoptose-induzierenden Faktors in Podozyten

Zur genaueren Untersuchung der Lokalisation von AIF wurden die Podozyten wie bereits beschrieben behandelt und anschließend mit DAPI, Phalloidin und einem monoklonalen AIF-spezifischen Antikörper, gefärbt (siehe 2.2.7). Diese Färbung wurde unter dem Konfokalmikroskop begutachtet und quantifiziert. Bei sichtbarer AIF- Fluoreszenz im Zellkern galt eine Zelle als AIF- positiv. Es erfolgte eine Bildakquisition von jeweils 50 Podozyten, welche im Anschluss ausgezählt wurden. Es wurde unterschieden zwischen AIF-positiven Zellen (Zellen bei denen nukleäres AIF durch die AIF- Fluoreszenz im Zellkern nachgewiesen werden konnte) und AIF- negativen Zellen.

Es zeigte sich, dass es unter Behandlung mit ADR im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit H_2O zeitabhängig zu einer ansteigenden Lokalisation von AIF im Zellkern kam (24 h (50 %), 48 h (53,9 %), 72 h (54 %), H_2O Kontrolle 37,8 %). Nach 48 h stagnierte der Anteil an nukleärem AIF (Abbildung 4 A, C).

Bei der Behandlung mit PAN kam es nach der Behandlung von 24 h und 48 h zu einer Verringerung des Anteils an nukleärem AIF (24 h (42 %), 48 h (38,7 %), 72 h (50 %), DMSO Kontrolle 47,06 %), nach 72 h jedoch wieder zu einem leichten Anstieg (Abbildung 4 B, D), der sich etwa mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichen ließ (DMSO Kontrolle 47,06 %).

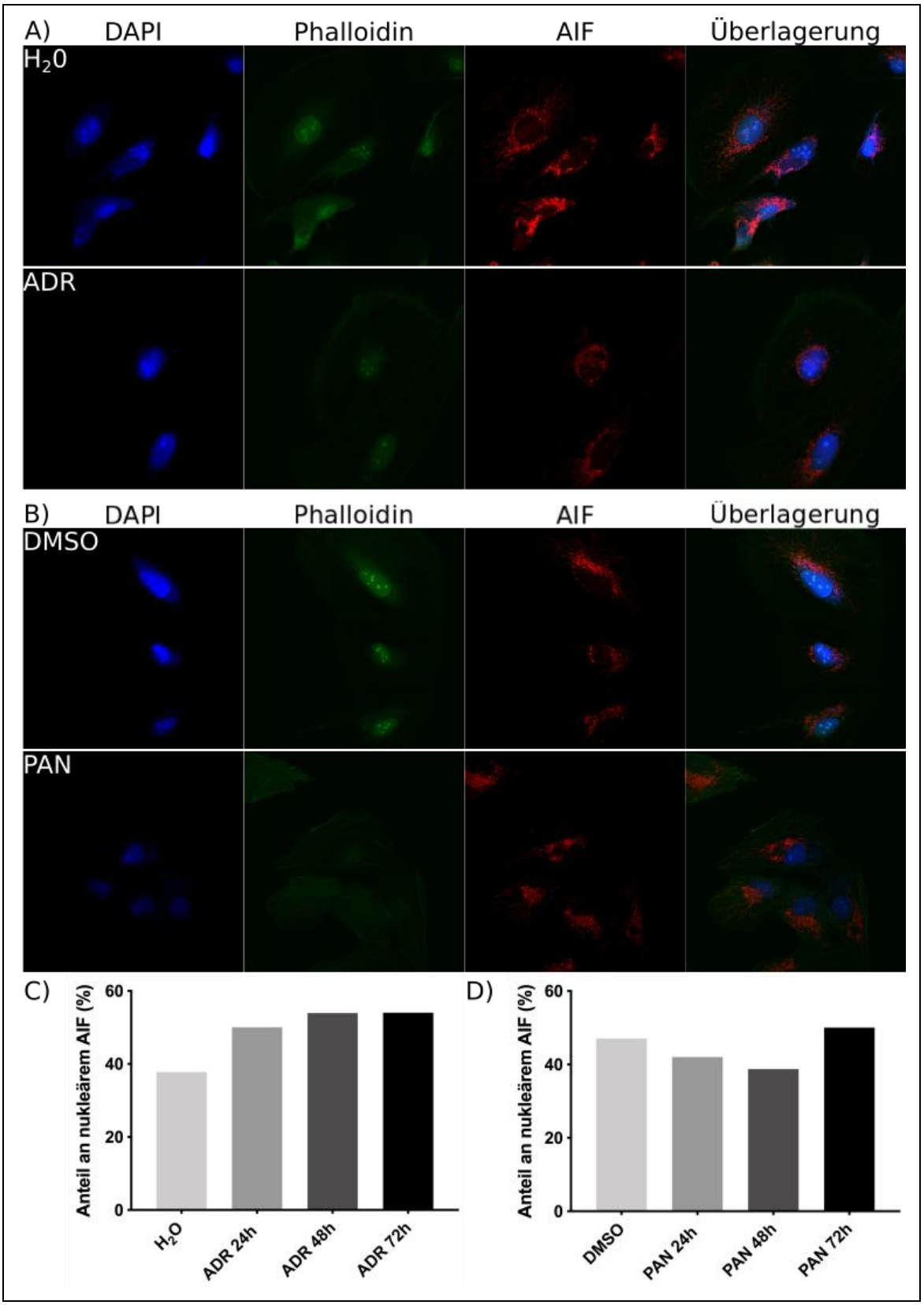

Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von AIF in Podozyten Die Podozyten wurden mit DAPI, Phalloidin und einem monoklonalen, spezifisch an AIF-bindenden Antikörper gefärbt. Gezeigt sind beispielhaft die Färbungen nach einer Behandlung von 24 h (A, B). Der Anteil von Podozyten mit AIF in nukleärer Lokalisation ist in Prozent angegeben (Anteil an nukleärem AIF). Es wurden 50 Zellen ausgezählt, eine Zelle galt bei sichtbarer AIF Fluoreszenz im Kern als AIF-positiv (C, D).

3.5 Untersuchung der Kolokalisation von AIF mit Podozyten in humanen Biopsien mit FSGS

Um die Lokalisation von AIF in humanem Gewebe näher zu untersuchen, wurden Biopsien von Läsionen, in denen eine FSGS diagnostiziert wurde, angefärbt und analysiert. Für die Färbung wurden DAPI, sowie ein für Podocin (spezifischer Podozytenmarker) und AIF spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet (siehe 2.2.12). Die Podozyten, in denen sich AIF im Zellkern nachweisen ließ, wurden ausgezählt und ein prozentualer Wert errechnet.

Es zeigte sich, dass besonders häufig in humanem Gewebe mit diabetischer Nephropathie im Vergleich zum Kontrollgewebe eine Lokalisation von AIF in Podozyten nachzuweisen war (Abbildung 5 B). Besonders deutlich wurde dies bei der diabetischen Nephropathie mit reaktiver FSGS vom kollabierenden Subtyp (d.N., FSGS k.S) (46,7 %) (Abbildung 5 A, B). Im Vergleich zum Kontrollgewebe (Ko) (24,3 %) konnte auch bei der mesangioproliferativen Glomerulopathie mit reaktiver FSGS (Mp. Gp., FSGS) (37,4 %) und bei der Glomerulomegalie mit FSGS (33,4 %) ein erhöhter Prozentsatz an AIF positiven Podozyten nachgewiesen werden. Etwa auf dem Niveau der Kontrolle befand sich dieser Wert bei der primären FSGS vom Spitzen-Läsions-Typ (22,5 %), bei der sekundären FSGS vom perihiliären Subtyp (21,45 %) und bei der Übergewichts-induzierten Glomerulopathie mit sekundärer FSGS (20 %). Deutlich seltener im Vergleich zum Kontrollgewebe ist die Lokalisation von AIF in Podozyten bei der primären FSGS vom zellulären Subtyp (prim. FSGS, z.S.) (8,3 %) (Abbildung 5 A, B).

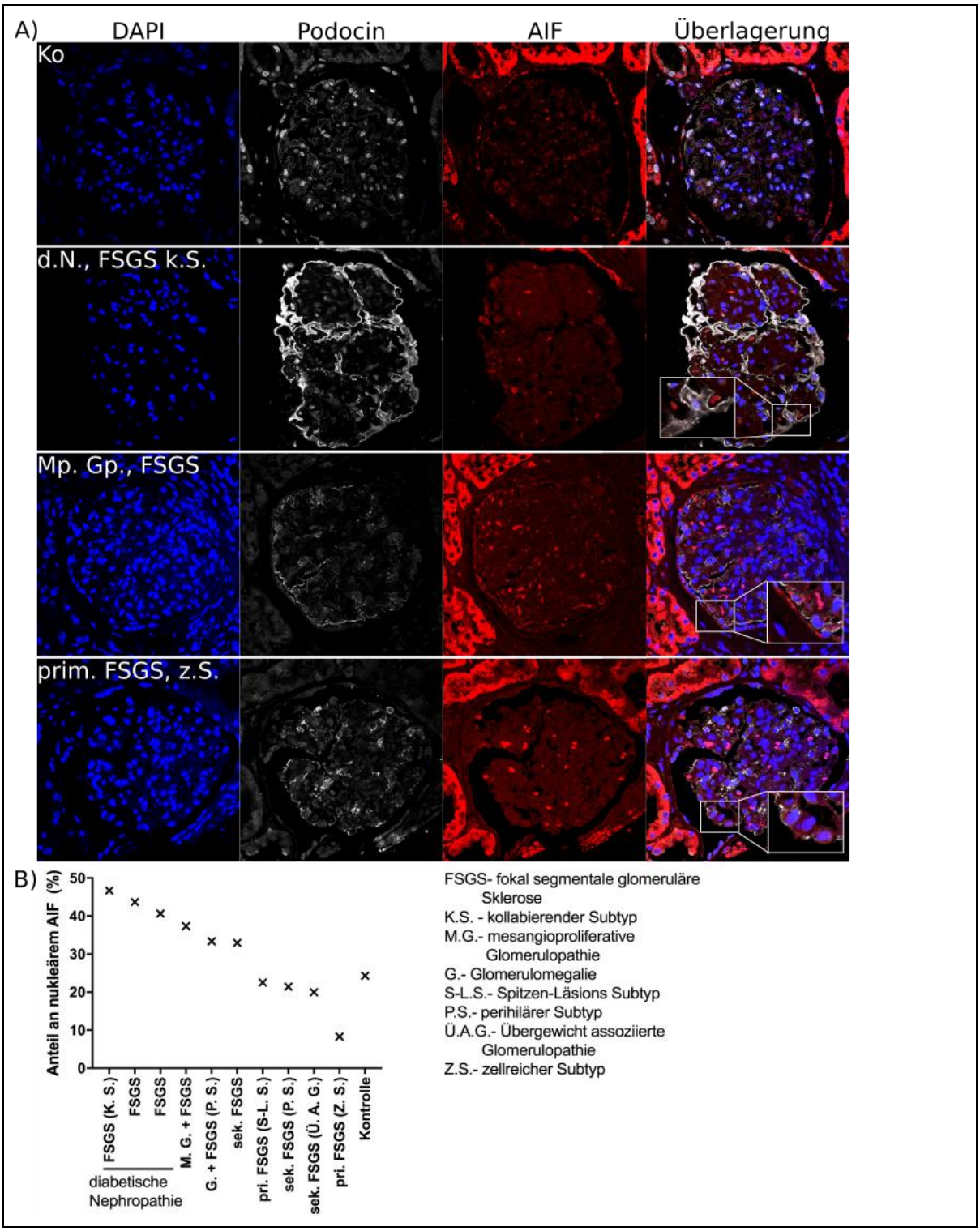

Abbildung 5: Untersuchung der Kolokalisation von AIF mit Podozyten in humanen Biopsien Das humane Gewebe wurde mit DAPI sowie mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für Podocin und AIF sind, gefärbt und unter dem Konfokalmikroskop dargestellt. Es wurde nur eine Auswahl an Geweben beispielhaft dargestellt (A) (d.N., FSGS k.S.= diabetische Nephropathie mit FSGS vom kollabierenden Subtyp; Mp. Gp., FSGS = Mesangioproliferative Glomerulopathie mit FSGS; prim. FSGS, z.S.= primäre FSGS vom zellulären Subtyp). Gezählt wurde die Anzahl an Gesamtpodozyten in einem Glomerulus sowie die Anzahl an Podozyten, bei denen eine Kolokalisation mit AIF nachzuweisen war (B) (gemessen wurden Duplikate).

3.6 Der Einfluss der AIF Überexpression auf den podozytären Zelltod

Wie in 2.2.4 beschrieben wurde die Menge des AIF-Genprodukts durch eine transiente Überexpression mit Hilfe des Vektors pMSCV3-C-Myc-AIFM1 erhöht. Unter diesen Bedingungen wurden die humanen Podozyten für 24 h *in vitro* mit ADR, PAM und PAN sowie mit den Lösungsmittelkontrollen Wasser (für ADR und PAM) und DMSO (für PAN) behandelt. Es wurde der Anteil an nicht-vitalen Zellen gemessen (Q1, Q2, Q4). Anschließend erfolgte ein Vergleich dieses Wertes zwischen der Überexpression und dem Kontrollvektor pMSCV (Abbildung 6).

Zu beobachten war, dass bereits bei den Lösungsmittelkontrollen mit Wasser und DMSO unter Überexpression von AIF mit dem pCMV3-C-Myc-AIFM1 Vektor im Vergleich zum Kontrollvektor signifikant mehr nicht-vitale Zellen (H_2O pMSCV 14,19 % ± 0,68; H_2O pCMV3-C-Myc-AIFM1 28,35 % ± 2,25; $p = 0{,}001$; DMSO pMSCV 11,45 % ± 0,94; DMSO pCMV3-C-Myc-AIFM1 26.07 % ± 0,81; $p < 0{,}0001$) gemessen wurden (Abbildung 6 B, D). Die gleiche Beobachtung ließ sich für die Behandlung mit ADR und PAM treffen, auch hier lagen in beiden Fällen unter Überexpression signifikant mehr nicht-vitale Zellen (ADR pMSCV 16,74 % ± 1,25; ADR pCMV3-C-Myc-AIFM1 33,28 % ± 1,52; $p = 0{,}0002$; PAM pMSCV 11,45 % ± 1,73; PAM pCMV3-C-Myc-AIFM1 36,45 % ± 1,62; $p < 0{,}0001$) im Vergleich zum Kontrollvektor vor. Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass unter der Überexpression insgesamt mehr nicht-vitale Zellen unter Behandlung gemessen wurden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (H_2O pCMV3-C-Myc-AIFM1 28,35 % ± 2,25; ADR pCMV3-C-Myc-AIFM1 33,28 % ± 1,52; PAM pCMV3-C-Myc-AIFM1 36,45 % ± 1,62).

Unter der Behandlung mit PAN war zu beobachten, dass zwar signifikant mehr nicht-vitale Zellen unter Überexpression im Vergleich zum Kontrollvektor gemessen wurden, allerdings war dieser Unterschied im Vergleich zu den Behandlungen mit ADR und PAM (Abbildung 6: B) deutlich geringer (PAN pMSCV 28,35 % ± 0.90; PAN pCMV3-C-Myc-AIFM1 35,29 % ± 2,60; $p = 0{,}0450$)(Abbildung 6 D).

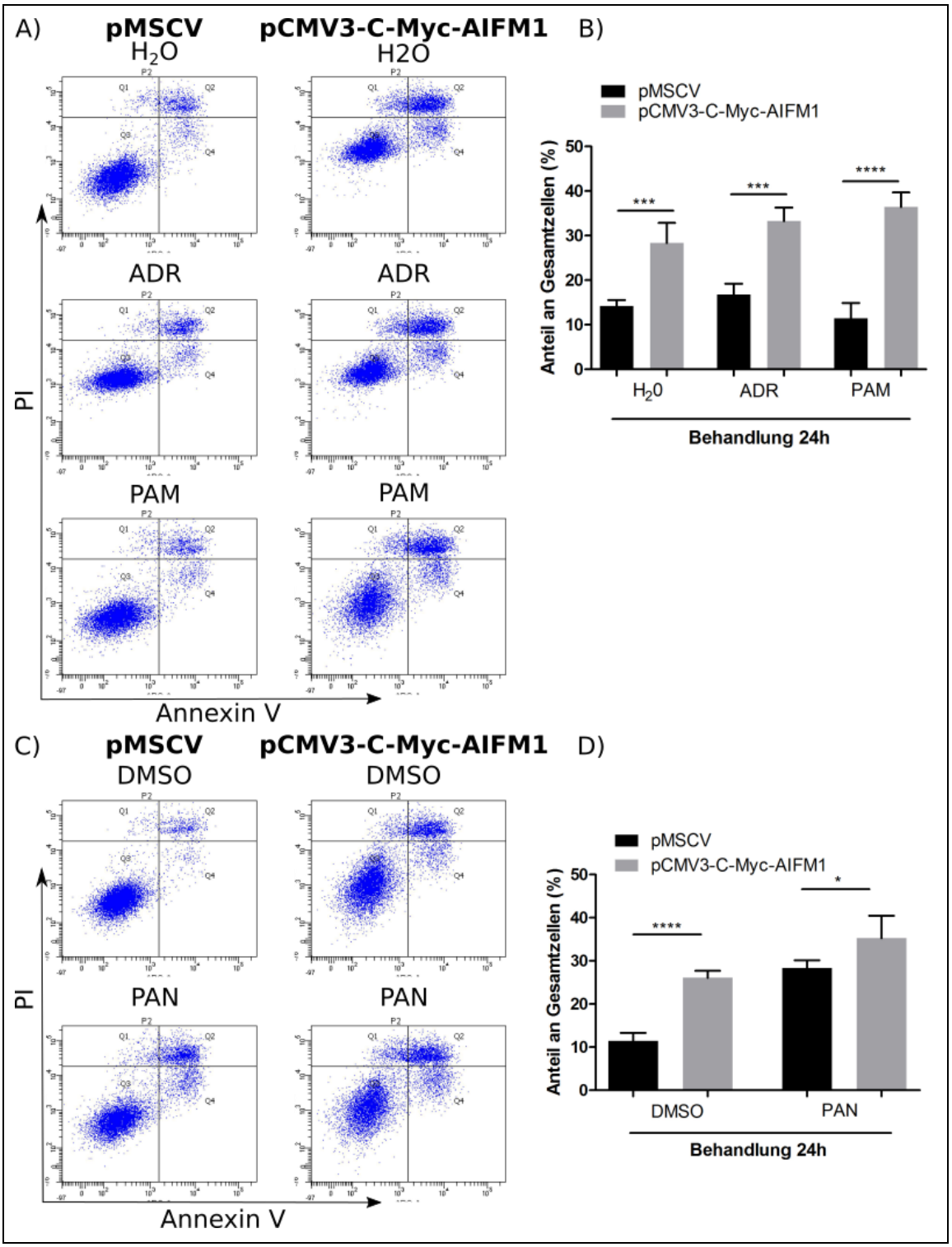

Abbildung 6: Der Einfluss der AIF Überexpression auf den podozytären Zelltod. Mit Hilfe des Überexpressionsvektors pCMV3-C-Myc-AIFM1 wurde eine Überexpression von AIF induziert. Als Kontrollvektor diente pMSCV. Zusätzlich zur Überexpression wurden die Podozyten mit ADR und PAM behandelt, als Lösungsmittelkontrolle diente Wasser (A). Unter der Behandlung wurde der Anteil von nicht vitalen Zellen unter dem Einfluss der Überexpression mit der Kontrolle verglichen (B, D) (n = 1, Daten zeigen Triplikate, Mittelwert ± Fehler der Standardabweichung). Behandlung mit PAN, als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (D). Signifi-

kanzen wurden mit einem T-Test errechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (Konzentrationen siehe 2.2.9).

3.7 Der Einfluss des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod

Wie bereits in 2.2.5 beschrieben, wurde die Menge des AIF-Genprodukts durch zwei verschiedene siRNAs herunterreguliert. Hierbei handelte es sich um die siRNA PDCD-8-11 und PDCD-8-6. Als Negativ-Kontrolle diente eine siRNA, die keinen Effekt auf die Regulation der Genexpression zeigte. Nach der Behandlung der Podozyten für 24 h mit den drei verschiedenen siRNAs wurden die Podozyten für weitere 24 h und 48 h mit ADR, PAM und PAN sowie mit den bereits beschriebenen Lösungsmittelkontrollen Wasser und DMSO behandelt. Ausgewertet wurde der Anteil an nicht-vitalen Zellen und dieser Wert unter AIF Knock-down mit der Kontroll-siRNA verglichen.

Es zeigte sich, dass lediglich unter Behandlung für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle Wasser unter dem Knock-down von AIF bei beiden siRNAs eine signifikante Verringerung an nicht-vitalen Zellen zu messen war (H_2O siRNA neg. Ktr. 21,97 % ± 1,80; H_2O siRNA PDCD 8-11 12,28 % ± 0,56; p = 0,0068; H_2O siRNA PDCD 8-6 14,68 % ± 1,34; p = 0,0325). (Abbildung 7). Unter der Behandlung mit ADR und PAM war nach 24 h zwar ein leichter Trend in Richtung Abnahme an nicht-vitalen Zellen unter dem Einfluss der siRNA PDCD-8-11 zu erkennen, die allerdings nicht signifikant war (ADR siRNA neg. Ktr. 24,17 % ± 0,92; ADR siRNA PDCD 8-11 21,47 % ± 1,045; ADR siRNA PDCD 8-6 23,50 % ± 2,11) (PAM siRNA neg. Ktr. 24,52 % ± 0,85; PAM siRNA PDCD 8-11 16,77 % ± 3,69; PAM siRNA PDCD 8-6 28,98 % ± 3,30). Nach 48 h neutralisierte sich der Effekt beider siRNAs unter beiden Behandlungen sowie bei der Lösungsmittelkontrolle gänzlich (Abbildung 7 C), weshalb hier keine weiteren Daten gezeigt wurden.

Unter der Behandlung für 24 h mit PAN zeigte sich unter dem Einfluss der siRNA PDCD-8-11 eine signifikante Verringerung an nicht-vitalen Zellen (PAN siRNA neg. Ktr. 29,62 % ± 1,03; PAN siRNA PDCD 8-11 24,50 % ± 1,02 p = 0,0243; PAN siRNA PDCD 8-6 32,01 % ± 1,21) (Abbildung 8 B). Unter Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO war für diese siRNA lediglich eine Tendenz zur Verringerung zu erkennen, welche nicht signifikant war (DMSO siRNA neg. Ktr. 16,78 % ± 4,48; DMSO siRNA PDCD 8-11 12,54 % ± 1,16; DMSO siRNA PDCD 8-6 15,87 % ± 1,37). Die zweite siRNA PDCD-8-6 zeigte weder für die Behandlung mit PAN noch für die Lösungsmittelkontrolle DMSO einen Einfluss. Nach 48 h war unter Behandlung mit PAN sowie der Lösungsmittelkontrolle für beide siRNAs kein Effekt zu verzeichnen (Abbildung 8 C).

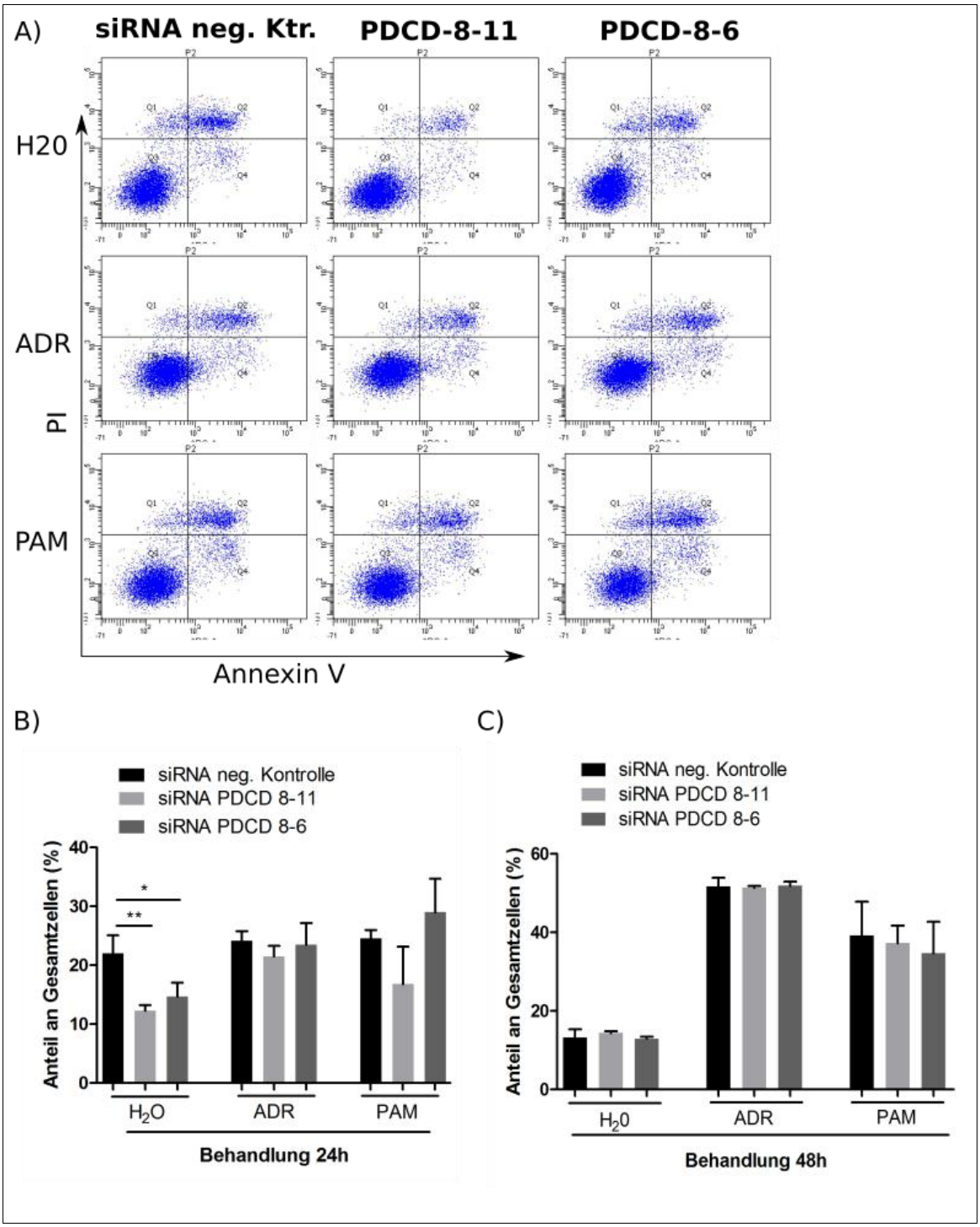

Abbildung 7: Der Einfluss des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod unter Behandlung mit ADR und PAM. Mit Hilfe der beiden siRNAs PDCD-8-11 und PDCD-8-6 wurde die Menge des AIF-Genprodukts reduziert. Zusätzlich wurde eine siRNA ohne spezifischen Effekt als Kontrolle verwendet. Nach Behandlung mit der siRNA für 24 h wurden die Podozyten für 24 h mit ADR und PAM behandelt, als Lösungsmittelkontrolle diente Wasser (A). Unter der Behandlung für 24 h wurde der Anteil von nicht-vitalen Zellen an Gesamtzellen unter dem Einfluss des Knock-downs mit der Kontrolle verglichen (B). Anteil von nicht-vitalen Zellen an Gesamtzellen unter Behandlung der Podozyten nach Knock-down von AIF mit ADR und PAM für 48 h (C) (n = 3, Mittelwert ± Fehler der Standardabweichung). Signifikanzen wurden mit einem T-Test errechnet (* $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$) (Konzentrationen siehe 2.2.9).

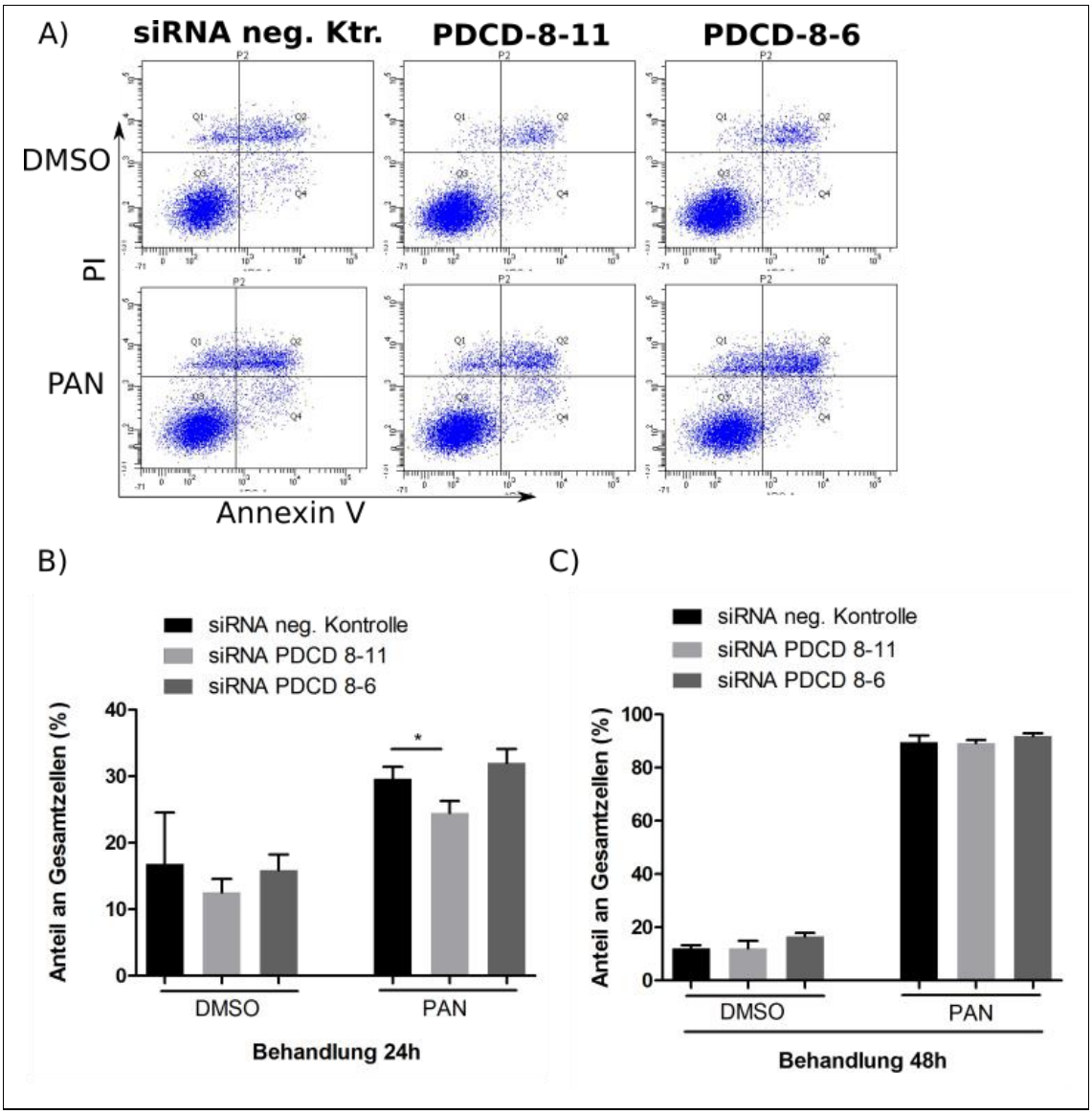

Abbildung 8: Der Einfluss des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod unter Behandlung mit PAN. Mit Hilfe der beiden siRNAs PDCD-8-11 und PDCD-8-6 wurde die Menge des AIF-Genprodukts reduziert. Zusätzlich wurde eine siRNA ohne spezifischen Effekt als Kontrolle verwendet. Nach Behandlung mit der siRNA für 24 h wurden die Podozyten für 24 h mit PAN behandelt, als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (A). Unter der Behandlung wurde der Anteil von nicht-vitalen Zellen unter dem Einfluss des Knock-downs mit der Kontrolle verglichen (B) (n=3-4, Mittelwert ± Fehler der Standardabweichung). Behandlung der Podozyten nach Knock-down von AIF mit PAN für 48 h (C). Für Konzentrationen von ADR, PAN und PAM siehe 2.2.9.

4 Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in sechs verschiedene Abschnitte. Zu Beginn wird das in der Arbeit verwendete Modell zur Imitation des Podozytenschadens näher beleuchtet und anschließend die Auswirkungen des Modells auf die Genexpression der Podozyten *in vitro* thematisiert. Im Weiteren wird auf die veränderte Genexpression des Apoptose-induzierenden Faktors und deren Folgen für die Expression von γH2AX und PARP-1 eingegangen, die in der Signalkaskade des induzierten Zelltodes von AIF eine Rolle zu spielen scheinen. Anschließend wird die Lokalisation von AIF, die in Podozyten *in vitro* sowie in humanen Biopsien vorgenommen wurde, näher thematisiert. Um die Rolle von AIF und einen Zusammenhang mit dem podozytären Zelltod zu diskutieren, wird näher auf den AIF Knock-down sowie die AIF Überexpression und die Übertragbarkeit auf den Podozytenschaden, der im Fall einer FSGS vorliegt, eingegangen.

4.1 Die Eignung des verwendeten Modells zur Imitation des Podozytenschadens bei einer FSGS

Für die experimentelle Arbeit wurden verschiedene Stressoren verwendet, um einen Podozytenschaden auszulösen. Hierzu gehören der zytostatisch wirkende Topoisomerase II Hemmer ADR in einer Konzentration von 0,1 µg/ml, das die Proteinsynthese hemmende Antibiotikum PAN in einer Konzentration von 50 µg/ml und das Bisphosphonat PAM in einer Konzentration von 100 µM.

ADR wird als Zytostatikum in der Tumortherapie eingesetzt und wird aus Streptomyces Arten isoliert (Benjamin et al. 1974). Im Mausmodell kommt es bereits nach wenigen Tagen nach der Anwendung von ADR zuverlässig zu einem reproduzierbaren Nierenschaden (Chen et al. 1998). Erste Berichte über einen Nierenschaden im Menschen gab es bereits 1977 (Burke et al. 1977). In einer Studie von Yesair et al. (1972) konnte gezeigt werden, dass ADR größtenteils in der Niere akkumuliert. Ein Problem in der klinischen Anwendung von ADR entsteht durch die enge therapeutische Breite von ADR. Die ADR induzierte Nephropathie ist ein etabliertes Mausmodell der chronischen Nierenerkrankung, bei der es zu einer fokalen glomerulären Sklerose kommt, die einen Podozytenschaden, eine tubulo-interstitielle Entzündung und eine Fibrose beinhaltet (Lee und Harris 2011). Die intravenöse Gabe von ADR in die Schwanzvene von Mäusen hat einen direkten toxischen Effekt auf die Glomeruli und führt zur Vergrößerung der Endothelzellporen und Ausdünnung der Glykokalix auf dem glomerulären Endothel

(Jeansson et al. 2009), zu Veränderungen der GBM und zur Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten, was mit einer Einschränkung der Filtrationsbarriere und damit einem Verlust der Nierenfunktion einhergeht (Lee und Harris 2011). Als ein molekularer Mechanismus wird die erhöhte Produktion an freien Radikalen diskutiert (Barbey et al. 1989). Im hier verwendeten Zellkulturmodell zeigte sich sowohl in der quantitativen, lichtmikroskopischen Analyse als auch in der durchflusszytometrischen Analyse ein signifikanter podozytärer Zelluntergang, welcher in Übereinstimmung mit der vorher beschriebenen Toxizität ist. Der Effekt nahm in Abhängigkeit von der Expositionszeit zu (siehe 3.1). Interessant ist die Beobachtung, dass die PI- negativen Zellen unter Behandlung mit ADR eine höhere PI-Fluoreszenz zeigen als unter der Behandlung mit PAM (Abbildung 1 A). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass ADR durch seine Bindung an DNA einen Einfluss auf die PI-Fluoreszenz hat (Krishan et al. 1978).

PAN ist der Aminonukleosid-Teil des Antibiotikums Puromycin, welcher von Caulfield et al. (1976) bei Verwendung in einem Tiermodell zu starken Veränderungen im Zytoskelett von Podozyten und zu ihrer Ablösung von der Basalmembran führte. In einer Studie von 2002 konnten diese Ergebnisse überwiegend bestätigt werden: bereits nach drei Tagen zeigten die mit PAN-behandelten Ratten eine Proteinurie und eine Veränderung der Expression von Schlüsselproteinen zur Aufrechterhaltung des glomerulären Filters (Luimula et al. 2002). Löwenborg et al. (2000) konnten eine umgekehrte Korrelation zwischen der Menge des verabreichten Aminonukleosids und der GFR zeigen. Bei geringen PAN Konzentrationen kam es zu einer Volumenzunahme der Glomeruli, bei sehr hohen Konzentrationen allerdings zu einer Volumenabnahme, was die Autoren durch eine Volumenkontraktion bei schweren Ödemen oder hohe Urinvolumina erklärten. Interessant ist in dieser Studie die Korrelation zwischen der PAN-Konzentration und der Breite der Fußfortsätze und eine inverse Korrelation zwischen der PAN-Konzentration und der totalen Größe der Schlitzporen. Diese Beobachtungen decken sich mit denen der humanen FSGS, was die Eignung des Modells auch für *In-vitro*-Studien der FSGS bestätigt. Unsere Untersuchungen deckten sich mit den oben beschriebenen Ergebnissen. In der durchflusszytometrischen Auswertung ließ sich ein signifikanter Zelltod erkennen, der in Abhängigkeit von der Expositionszeit zunahm (siehe 3.1). Lichtmikroskopisch zeigte sich nach 48 h sehr eindrücklich die Ablösung sämtlicher Zellen vom Boden der Kulturschale.

Das Medikament PAM gehört zur Gruppe der Bisphosphonate und wird vor allem in der Therapie von osteolytischen Tumoren oder Osteoporose eingesetzt. Unter anderem veröffentlichten Ten Dam et al. (2011) zwei Fallberichte von Patienten, die unter einer intravenösen

Therapie mit PAM ein nephrotisches Syndrom mit histologischen Zeichen einer FSGS entwickelten. Der unerwünschte nephrotoxische Effekt der Bisphosphonate verstärkt sich dosisabgängig, weshalb überwiegend Patienten mit bösartigen Knochentumoren unter einer intravenösen Therapie betroffen sind (Perazella und Markowitz 2008). Auch in einem Tiermodell, in dem die Harnstoffkonzentration im Serum als Marker für einen Nierenschaden verwendet wurde, konnte eine Zeit- und Dosis-abhängige Korrelation zwischen der Gabe von PAM und dem Nierenschaden festgestellt werden (Green et al. 1997). Auch in den Untersuchungen dieser Arbeit kam es unter der Behandlung mit PAM bereits nach 24 h zu einem signifikanten Rückgang von lebenden Zellen. Dieser Effekt verstärkte sich nach 48 h (3.1).

Alle drei verwendeten Stressoren eigneten sich wie ausgeführt, um einen dem *in vivo* ähnlichen Podozytenschaden *in vitro* hervorzurufen. Interessant wären Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen verschiedener Konzentrationen gewesen, wobei wie oben beschrieben bereits durch vorige Arbeiten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen werden konnte. Was in diesem Modell nicht gezeigt wird, ist ob Interaktionen der Podozyten mit anderen Zellen vorhanden sind, beispielsweise mit Immunzellen oder mit extrazellulären Faktoren, welche sich protektiv oder verstärkend auf den podozytären Zelltod auswirken könnten. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der Möglichkeit der isolierten pathomechanistischen Analyse des podozytären Zellschadens ohne äußere Einflüsse.

4.2 Die Auswirkungen des Podozytenschadens auf die Mengen an relevanten Proteinen *in vitro*

Nachdem der Zelltod-induzierende Effekt auf die Podozyten in 3.1 gezeigt wurde, folgte eine Analyse der Zelltodmechanismen auf Proteinebene. Hierbei zeigt sich nach 72 h in dem ADR- und dem PAM- Modell das AIF Spaltprodukt. In allen drei Modellen ließ sich bereits nach 24 h ein Anstieg der phosphorylierten Form des Histons H2AX (γH2AX), sowie das Spaltprodukt von Caspase3 und PARP-1 nachweisen (siehe 3.2).

Die Zelltod-induzierende Wirkung von AIF wird auf eine Translokation von AIF in den Zellkern zurückgeführt (Ye et al. 2002). Die Mechanismen, die diese Translokation bewirken, sind bislang nicht abschließend geklärt. Ebenfalls ungeklärt ist, ob es sich hierbei um das vollständige Protein oder um eine Spaltversion davon handelt, sowie welche Protease letztendlich für die Spaltung von AIF verantwortlich ist (Norberg et al. 2010) (Yu et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit kam es nach einer Reizung mit ADR zu einer erhöhten Menge von AIF, nach Reizung mit PAN konnte nach 48 h das Spaltprodukt von AIF gezeigt werden. Dies war bei ADR und PAM erst nach 72 h möglich. Artus et al. konnten zeigen, dass während des

Caspase-unabhängigen Zelltodes H2AX und AIF in nukleärer Lokalisation assoziiert vorliegen (Artus et al. 2010). Allerdings konnte hier kein direkter Zusammenhang zwischen der phosphorylierten Form von H2AX (γH2AX) und AIF hergestellt werden. Die erhöhte Menge von γH2AX scheint auch in dieser Arbeit nicht mit einer erhöhten Expression von AIF oder dem Vorkommen des Spaltproduktes assoziiert zu sein. Dies könnte auf eine Beteiligung von γH2AX auch in Caspase-abhängigen Zelltodmechanismen zurückzuführen sein (Rogakou et al. 2000). Tatsächlich konnte auch in dieser Arbeit zeitgleich mit dem erhöhten Vorkommen von γH2AX eine erhöhte Proteinmenge des Spaltproduktes von Caspase3 gezeigt werden.

Die Aktivierung PARP-1 wird durch DNA-Doppelstrangbrüche initiiert und führt zu einer Freisetzung des PAR-Polymers. Als Folge dessen wird eine Freisetzung und Translokation von AIF aus dem Mitochondrium in den Nukleus diskutiert (Yu et al. 2006). In dieser Untersuchung kommt es unter Behandlung mit ADR und PAM zwar nach 24 h zu einer minimal gesteigerten Konzentration von PARP-1, allerdings wird zu diesem Zeitpunkt auch bereits das Spaltprodukt von PARP-1 sichtbar. Dies lässt auf eine Caspase-Aktivität schließen, da diese scheinbar für die Spaltung von PARP-1 verantwortlich ist. Dies geschieht vermutlich, um PARP-1 zu inaktivieren und einen NAD^+ Verbrauch bei starken DNA Schäden zu verhindern, der zu einer Nekrose führen würde (Herceg und Wang 1999). Auch in unseren Untersuchungen kommt es zeitgleich mit der Spaltung von PARP-1 zur Spaltung von Caspase3 (siehe 3.2). Die fehlende Aktin Kontrollbande unter PAN Behandlung nach 72 h könnte auf einen fortgeschrittenen Zelltod mit Aktivierung von Aktin-spaltenden Proteasen zurückzuführen sein (Brown et al. 1997).

4.3 Die Folgen der veränderten Genexpression des Apoptose-induzierenden Faktors auf PARP-1 und γH2AX

Wie beschrieben wurde die transiente Überexpression von AIF mit Hilfe eines Vektors vorgenommen. In Abbildung 3 A) ist zu sehen, dass die zelluläre Konzentration von γH2AX durch die gesteigerte Produktion von AIF nicht verändert wird. Wenn man von der oben genannten Theorie ausgeht, dass H2AX und AIF miteinander interagieren und es bei der programmierten Nekrose zu einer Phosphorylierung von H2AX (Artus et al. 2010) kommt, wäre zu erwarten, dass die Menge an γH2AX durch die Überexpression von AIF ansteigt. Auch wenn es sich nicht um eine programmierte Nekrose, sondern um eine Apoptose handelt, müsste die Proteinmenge an γH2AX laut Rogakou et al. (2000) ansteigen.

Diese Beobachtung kann in der aktuellen Arbeit nicht nachvollzogen werden, da es unter der Überexpression von AIF zu einem deutlich angestiegenen Zelltod ohne einen γH2AX-Anstieg kommt (siehe 3.3). Bei einer Verringerung der Expression von AIF mit Hilfe eines induzierbaren Knock-downs mit Hilfe zwei verschiedener siRNAs zeigt sich, dass bei einer deutlichen Verringerung der Expression von AIF auch eine geringere Proteinmenge an γH2AX nachweisbar ist. Diese Beobachtung lässt auf einen Zusammenhang zwischen γH2AX und AIF in dem von AIF ausgelösten Zelltod schließen.

Die nachweisbare Menge des PARP-1-Proteins nimmt sowohl unter der Überexpression als auch beim Knock-down von AIF ab. Ein Spaltprodukt konnte in beiden Fällen nicht nachgewiesen werden. Bisher wurde der Einfluss von AIF auf PARP-1 Proteinlevel nicht untersucht. Die Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass keine Abhängigkeit zwischen dem AIF Proteinlevel und dem PARP-1 Proteinlevel besteht. Eine weitere mögliche Erklärung für die Beobachtung könnte die artifizielle Erhöhung der zellulären AIF – Konzentration durch die Transfektion sein. Es ist vorstellbar, dass PARP-1 durch die AIF Überexpression und eine nachfolgende Zelltodkaskade gespalten wird, was zum Beispiel Caspase- abhängig geschehen kann (Lazebnik et al. 1994). In dieser Arbeit kann eine Beteiligung von Caspasen nicht ausgeschlossen werden, allerdings konnten keine Spaltprodukte im Western Blot nachgewiesen werden. Die abnehmende PARP-1-Konzentration im Rahmen des AIF Knockdowns könnte durch die Beobachtung erklärt werden, dass AIF und PARP-1 einer gegenseitigen Abhängigkeit unterliegen. Einerseits scheint das PAR-Polymer, ein Produkt der PARP-1 Aktivierung, für die Translokation von AIF vom Mitochondrium in den Zellkern bedeutsam zu sein, andererseits scheint AIF für den PARP-1-induzierten Zelltod erforderlich zu sein (Yu et al. 2006).

4.4 Die Lokalisation von AIF in Podozyten *in vitro* sowie in humanen Biopsien

Bei der Untersuchung der Lokalisation von AIF in Podozyten *in vitro* zeigt sich, dass die Menge an Podozyten, bei denen einen AIF- Fluoreszenz im Zellkern detektiert werden konnte, unter der Behandlung von ADR schon nach 24 h anzusteigen scheint, der Zuwachs dann aber nach 48 h stagniert (Abbildung 4). Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit der Untersuchung auf Proteinebene wäre zu erwarten, dass eine nukleäre Lokalisation von AIF erst nach 72 h unter der Behandlung mit ADR sichtbar wird, da erst zu diesem Zeitpunkt ein Spaltprodukt auf Proteinebene zu erkennen ist. Dieses Spaltprodukt transloziert laut Otera et al. (2005) in den mitochondrialen Intermembranraum und von dort ins Zytoplasma. Über das Zytoplasma gelangt das Fragment dann zum Nukleus (Susin et al. 1999b). Eine Erklärung für unsere Be-

obachtung liefert die Arbeit von Yu et al., in der ein zweites Reservoir von AIF an der äußeren mitochondrialen Membran auf der zytosolischen Seite nachgewiesen wird. Hierbei handelt es sich um etwa 30 % der gesamten Menge an AIF. Diese Form von AIF kann schnell nach Behandlung von Neuronen mit NMDA ohne eine Spaltung freigesetzt werden und Zelltod im Zuge des Parthanatos auslösen (Yu et al. 2009). Dies würde erklären, warum auch ohne ein nachweisbares AIF-Spaltprodukt nach 24 h eine nukleäre Lokalisation von AIF sichtbar wird. Fraglich ist, warum die Anzahl an Zellen mit nukleär lokalisiertem AIF unter der Behandlung von PAN im Vergleich zur Kontrolle nach 24 h und 48 h abfällt, um dann nach 72 h wieder auf den Kontrollwert anzusteigen. Unter Umständen ist der durch PAN-induzierte podozytäre Zelltod nicht primär AIF abhängig, was auch durch die frühe Spaltung von Caspase3 nach 24 h deutlich wird (Abbildung 2). Eine zuverlässige Interpretation des Anstieges nach 72 h unter der Behandlung ist nicht möglich, da auch auf Proteinebene keine β-Aktinbande mehr nachweisbar ist.

Zusätzlich zu der Lokalisationsanalyse von AIF in Podozyten *in vitro* wurde auch die Lokalisationsanalyse in humanen Biopsien vorgenommen, bei der einzelne Glomeruli betrachtet wurden. Bei den Biopsien handelte es sich um Nierenbiopsien von Patienten mit nephrologischen Erkrankungen, bei denen histologisch eine FSGS nachgewiesen werden konnte. Es wird deutlich, dass besonders bei den diabetischen Nephropathien die Menge an Podozyten mit nukleär lokalisiertem AIF hoch ist. Ma et al. (2019) konnten zeigen, dass es bei Patienten mit einer diabetischen Nephropathie zu einer Spaltung von mitochondrialen Strukturen kommt. Das könnte dazu führen, dass mitochondriale Proteine wie AIF ins Zytoplasma freigesetzt werden und es anschließend zu einer Translokation in den Zellkern kommt und der Zelltod so beschleunigt wird. Die Translokation von AIF vom Zytoplasma in den Nukleus findet laut einer Untersuchung von Zhu et al. in Neuronen CyclophilinA vermittelt statt (Zhu et al. 2007). Die anschließende Chromatinolyse findet laut Wang et al. (2016) durch die Interaktion des Makrophagen-migrationsinhibierenden Faktors (MIF) mit AIF statt. Diese scheint notwendig zu sein, da AIF im Gegensatz zu MIF nicht über eine Nukleaseaktivität verfügt. In der Studie von Ma et al wird außerdem demonstriert, dass erhöhte Glukosekonzentrationen zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führen und die Apoptoserate der Podozyten ansteigt. Dieses äußert sich in einer erhöhten Proteinurie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ma et al. 2019).

4.5 Der Einfluss der veränderten Genexpression von AIF auf den podozytären Zelltod

4.5.1 Die Folgen der Überexpression von AIF auf den podozytären Zelltod

Allein die Überexpression von AIF führt zu einem verstärkten podozytären Zelltod, die Vulnerabilität gegenüber den zuvor etablierten Stressoren ist jedoch nicht deutlich erhört (siehe 3.6). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die durch ADR, PAM und PAN verurusachte Zytotoxizität nicht auf einem AIF- abhängigen Mechanismus basiert. Durch die hier künstlich vermehrte Proteinmenge wird die Zelltodkaskade eingeleitet, was die Zunahme an nicht-vitalen Zellen erklärt. Eine tiefergehende Erklärung des Mechanismus lässt dieses Experiment nicht zu. Eine genaue Lokalisation des künstlichen AIFs auf der Ebene der verschiedenen Zellorganellen ist in der aktuellen Arbeit aus technischen Gründen nicht gelungen. Es war nicht möglich, eine vollständige Fraktionierung der Zellorganellen vorzunehmen und es kam wiederholt zu Verunreinigungen der Fraktionierung trotz eines etablierten Protokolls. Um eine künftige mechanistische Aufklärung der Rolle von AIF zu liefern, wäre dieses jedoch notwendig. Es ist möglich, dass ein Großteil des überexprimierten AIFs nicht ins Mitochondrium transportiert wurde, da die Größe des detektierten Proteins darauf schließen lässt, dass die mitochon-driale Lokalisationssequenz nicht abgespalten wurde. Laut Susin et al. hat AIF vor der Abspaltung der mitochondrialen Lokalisationssequenz eine Größe von 67 kDa, nach Abspaltung eine Größe von 57 kDa (Susin et al. 1999b). Das überexprimierte AIF hat in dieser Arbeit eine Größe von 67 kDa (Abbildung 3). Im Zytosol stände AIF der Zelltodkaskade direkt zur Verfügung.

4.5.2 Die Folgen des AIF Knock-downs auf den podozytären Zelltod

In den Ergebnissen zeigt sich unter Behandlung mit ADR und PAM zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Verringerung an nicht-vitalen Zellen nach AIF Knock-down (siehe 3.7). Allein bei der H_2O Kontrolle nach 24 h ist eine signifikante Reduktion an nicht-vitalen Zellen zu sehen. Nach 24 h ist ein Trend in Richtung Verringerung des Zelltodes bei der Behandlung unter ADR und PAM mit der siRNA PDCD 8-11 sichtbar. Dieser Trend nivelliert sich nach 48 h. Unter der Behandlung mit PAN ist nach 24 h eine signifikante Reduktion der nicht-vitalen Zellen unter Knock-down mit der siRNA PDCD 8-11 sichtbar. Auch dies nivelliert sich zeitabhängig. Ein Effekt des Knock-downs ist also möglich, es ist aber denkbar, dass dieser durch die verschiedenen Stressoren in seiner Ausprägung mitigiert wird. Fraglich ist, warum die zweite siRNA PDCD 8-6 diesen Effekt nicht hervorruft, obwohl der Knock-down im Western Blot im direkten Vergleich deutlicher sichtbar wird. Unter der Behandlung mit der

siRNA PDCD 8-6 wird ein Spaltprodukt von AIF sichtbar, was unter Umständen auf die Induktion der Zelltodkaskade hindeutet.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Rolle von AIF im podozytären Zelltod *in vitro* und *in vivo* näher untersucht. Es konnten Hinweise auf eine Beteiligung von AIF in der Signalkaskade des podozytären Zelluntergangs ermittelt werden, auch wenn sich in keiner der Untersuchungen eine vordergründige Beteiligung von AIF im Sinne eines primär nicht-apoptotischen Zelltodes gezeigt hat. Unklar bleibt weiterhin, inwiefern eine Spaltung von AIF für die Initiation des Zelltodes entscheidend ist und wie diese stattfindet. Im hier verwendeten Modell konnte gezeigt werden, dass eine nukleäre Translokation von AIF in Podozyten stattfindet. *In vivo* zeigte sich eine mögliche Partizipation von AIF in der Ätiologie und Progression der diabetischen Nephropathien mit FSGS. Interessant wäre eine Untersuchung der einzelnen Zellorganellen und die entsprechende Proteinverteilung von AIF im Zuge des Zelltodes. Um die Wirkung von AIF auf die Progredienz einer chronischen Nierenerkrankung näher zu untersuchen, wäre auch ein induzierbarer Podozyten-spezifischer AIF Knock-out im Tiermodell ein interessantes Verfahren, wobei hier die physiologische Rolle von AIF nicht vergessen werden darf. Sollte sich hierbei AIF als wichtiger Zwischenspieler in der Signalkaskade des podozytären Zelltodes herausstellen, käme es als mögliche therapeutische Zielstruktur für eine pharmakologische Intervention in Frage.

5 Zusammenfassung

Chronisch progrediente Nierenerkrankungen sind in unserer alternden Gesellschaft von entscheidender Bedeutung. Eine wichtige Rolle für die renale Filterfunktion spielen Podozyten, welche spezialisierte Epithelzellen darstellen. Die Pathomechanismen des podozytären Zelltodes sind noch nicht hinreichend geklärt. In dieser Arbeit wurde anhand einer etablierten Podozytenzelllinie *in vitro* die Beteiligung von AIF am podozytären Zelltod näher untersucht. Hierzu wurde ein Modell genutzt, bei dem durch die drei verschiedenen Zellstressoren ADR, PAM und PAN eine Signalkaskade eingeleitet wurde, die letztendlich im Zelltod endet. Diese Signalkaskade wurde zu verschiedenen Zeitpunkten auf Proteinebene untersucht. Hierbei zeigte sich keine vordergründige Rolle von AIF, welcher laut Literatur eine Form des nicht-apototischen Zelltods einleitet. Außerdem wurde mit Hilfe eines Überexpressionsvektors eine Überexpression von AIF vorgenommen, was in einem vermehrten podozytären Zelltod mündete. Dieser Effekt wird durch den hier künstlich ausgelösten Zellstress nicht verstärkt. Darüber hinaus wurde durch die Verwendung von zwei verschiedenen siRNAs ein Knock-down von AIF vorgenommen und die Zellen wie beschrieben behandelt. Hierbei konnte in Teilen eine Verringerung des Zelltodes festgestellt werden. Immunzytochemisch zeigte sich teilweise eine geringe Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors in den podozytären Zellkern. Zusätzlich zu den *In-vitro*-Untersuchungen wurde humanes Gewebe immunhistochemisch analysiert, wobei besonders bei den diabetischen Nephropathien eine verstärkte Expression von AIF in Podozyten deutlich wurde. Unter den Biopsien, die histologische Zeichen einer FSGS aufwiesen, war, insbesondere bei den diabetischen Nephropathien, vermehrt nukleäres AIF nachweisbar, was auf eine mögliche Partizipation von AIF in diesem Krankheitsbild hindeutet. In der Zukunft bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Rolle von AIF und die genaue Signalkaskade des podozytären Zelltodes, der eine chronische Niereninsuffizienz nach sich ziehen kann, näher zu bestimmen, um therapeutisch intervenieren zu können. Eine Beteiligung von AIF konnte in dieser Arbeit herausgearbeitet werden, allerdings scheint diese nicht vordergründig für den Krankheitsverlauf verantwortlich zu sein.

6 Literaturverzeichnis

Arakawa M, Tokunaga J (1977): A scanning electron microscope study of the human Bowman's epithelium. Contrib Nephrol 6, 73–78

Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen JC (2002): Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. J Cell Biol 159, 923–929

Artus C, Boujrad H, Bouharrour A, Brunelle MN, Hoos S, Yuste VJ, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, England P, et al. (2010): AIF promotes chromatinolysis and caspase- independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. EMBO J 29, 1585–1599

Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, Fékété CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, et al. (1997): Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. Nat Genet 17, 467–470

Barbey MM, Fels LM, Soose M, Poelstra K, Gwinner W, Bakker W, Stolte H (1989): Adriamycin affects glomerular renal function: evidence for the involvement of oxygen radicals. Free Radic Res Commun 7, 195–203

Baritaud M, Boujrad H, Lorenzo HK, Krantic S, Susin SA (2010): Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. Cell Cycle 9, 3186–3193

Benjamin RS, Wiernik PH, Bachur NR (1974): Adriamycin chemotherapy—efficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high-dosage schedule. Cancer 33, 19–27

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002): Pneumococcal pneumolysin and H_2O_2 mediate brain cell apoptosis during meningitis. J Clin Invest 109, 19–27

Brown SB, Bailey K, Savill J (1997): Actin is cleaved during constitutive apoptosis. Biochem J 323, 233–237

Bruggeman LA, Ross MD, Tanji N, Cara A, Dikman S, Gordon RE, Burns GC, D'agati VD, Winston JA, Klotman ME, et al. (2000): Renal Epithelium Is a Previously Unrecognized Site of HIV-1 Infection. J Am Soc Nephrol 11, 2079–2087

Burke JF, Laucius JF, Brodovsky HS, Soriano RZ (1977): Doxorubicin hydrochloride-associated renal failure. Arch Intern Med 137, 385–388

Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG (1976): Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. Lab Invest 34, 43–59

Chen A, Sheu LF, Ho YS, Lin YF, Chou WY, Chou TC, Lee WH (1998): Experimental Focal Segmental Glomerulosclerosis in Mice. Nephron 78, 440–452

Cheung ECC, Joza N, Steenaart NAE, McClellan KA, Neuspiel M, McNamara S, MacLaurin JG, Rippstein P, Park DS, Shore GC, et al. (2006): Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. EMBO J 25, 4061–4073

Chun MJ, Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ (2004): Focal Segmental Glomerulosclerosis in Nephrotic Adults: Presentation, Prognosis, and Response to Therapy of the Histologic Variants. J Am Soc Nephrol 15, 2169–2177

Clarke PGH (1990): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol 181, 195–213

Clarke PGH (2002): Apoptosis: from morphological types of cell death to interacting pathways. Trends Pharmacol Sci 23, 308–309

Cummings BS, Wills LP, Schnellmann RG (2004): Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. Curr Protoc Pharmacol 56, 12.8.1-12.8.24

D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC (2004): Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. Am J Kidney Dis 43, 368–382

D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ (2011): Focal Segmental Glomerulosclerosis. N Engl J Med 365, 2398-2411

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999): Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. Biochem J 342, 249–268

Drenckhahn D, Franke RP (1988): Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. Lab Invest 59, 673–682

Dunn WA (1990): Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. J Cell Biol 110, 1923–1933

Edinger AL, Thompson CB (2004): Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr Opin Cell Biol 16, 663–669

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004): H2AX: the histone guardian of the genome. DNA Repair 3, 959–967

Friedman EA, Rao TKS (1995): Disappearance of Uremia due to heroin-associated nephropathy. Am J Kidney Dis 25, 689–693

Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K (2006): Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. Am J Physiol Renal Physiol 291, F856–F865

Garg P (2018): A Review of Podocyte Biology. Am J Nephrol 47, 3–13

Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, Bowden DW, Langefeld CD, Oleksyk TK, Knob ALU, et al. (2010): Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African-Americans. Science 329, 841–845

Golstein P, Aubry L, Levraud J-P (2003): Cell-death alternative model organisms: why and which? Nat Rev Mol Cell Biol 4, 798–807

Green JR, Seltenmeyer Y, Jaeggi KA, Widler L (1997): Renal Tolerability Profile of Novel, Potent bisphosphonates in Two Short-Term Rat Models. Pharmacol Toxicol 80, 225–230

Griffin SV, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ (2003): Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. Nephrol Dial Transplant 18, Issue suppl 6 vi8-13

Habib R (1973): Focal glomerular sclerosis. Kidney Int 4, 355–361

Hagmann H, Brinkkoetter PT (2018): Experimental Models to Study Podocyte Biology: Stock-Taking the Toolbox of Glomerular Research. Front Pediatr 6, 193

Hamano Y, Grunkemeyer JA, Sudhakar A, Zeisberg M, Cosgrove D, Morello R, Lee B, Sugimoto H, Kalluri R (2002): Determinants of Vascular Permeability in the Kidney Glomerulus. J Biol Chem 277, 31154–31162

Heiden MGV, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997): Bcl-X_L Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria. Cell 91, 627–637

Hengartner MO (2000): The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770–776

Herceg Z, Wang Z-Q (1999): Failure of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cleavage by Caspases Leads to Induction of Necrosis and Enhanced Apoptosis. Mol Cell Biol 19, 5124–5133

Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B (2009): Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria. J Am Soc Nephrol 20, 114–122

Jelkmann W (2011): Regulation of erythropoietin production. J Physiol 589, 1251–1258

KDIGO 2012 Clinical Practice Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Chapter 1: Definition and classification of CKD (2012) Kidney Int Suppl 3, 19–62

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. Br J Cancer 26, 239–257

Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL (2002): The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. Nature 419, 367–374

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275, 1132–1136

Krishan A, Ganapathi RN, Israel M (1978): Effect of Adriamycin and Analogs on the Nuclear Fluorescence of Propidium Iodide-stained Cells. Cancer Res 38, 3656-3662

Lal MA, Patrakka J (2018): Understanding Podocyte Biology to Develop Novel Kidney Therapeutics. Front Endocrinol (Lausanne) 9, 409

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994): Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature 371, 346–347

Lee VWS, Harris DCH (2011): Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. Nephrology 16, 30–38

Linda Kao WH, Klag MJ, Meoni LA, Reich D, Berthier-Schaad Y, Li M, Coresh J, Patterson N, Tandon A, Powe NR, et al. (2008): A genome-wide admixture scan identifies MYH9 as a candidate locus associated with non-diabetic end stage renal disease in African Americans. Nat Genet 40, 1185–1192

Löwenborg EKM, Jaremko G, Berg UB (2000): Glomerular function and morphology in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. Nephrol Dial Transplant 15, 1547–1555

Luimula P, Sandström N, Novikov D, Holthöfer H (2002): Podocyte-Associated Molecules in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis of the Rat. Lab Invest 82, 713-718

Ma Y, Chen Z, Tao Y, Zhu J, Yang H, Liang W, Ding G (2019): Increased mitochondrial fission of glomerular podocytes in diabetic nephropathy. Endocr Connect 8, 1206–1212

Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A (1998): The Caspase-3 Precursor Has a Cytosolic and Mitochondrial Distribution: Implica-

tions for Apoptotic Signaling. J Cell Biol 140, 1485–1495

Markowitz GS, Appel GB, Fine PL, Fenves AZ, Loon NR, Jagannath S, Kuhn JA, Dratch AD, D'Agati VD (2001): Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. J Am Soc Nephrol 12, 1164–1172

Markowitz GS, Nasr SH, Stokes MB, D'Agati VD (2010): Treatment with IFN-α, β-, or-γ Is Associated with Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis. Clin J Am Soc Nephrol 5, 607–615

Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA (2001): NADH Oxidase Activity of Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor. J Biol Chem 276, 16391–16398

Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, Bouharrour A, Greer PA, Menissier-de Murcia J, Susin SA (2007): Sequential Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1, Calpains, and Bax is Essential in Apoptosis-Inducing Factor-Mediated Programmed Necrosis. Mol Cell Biol 27, 4844–4862

Nagata M, Kriz W (1992): Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. Kidney Int 42, 148–160

Nagi AH, Alexander F, Lannigan R (1971): Light and electron microscopical studies of focal glomerular sclerosis. J Clin Pathol 24, 846–850

Norberg E, Gogvadze V, Vakifahmetoglu H, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010): Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing. Free Radic Biol Med 48, 791–797

O'Shaughnessy MM, Hogan SL, Poulton CJ, Falk RJ, Singh HK, Nickeleit V, Jennette JC (2017): Temporal and Demographic Trends in Glomerular Disease Epidemiology in the Southeastern United States, 1986–2015. Clin J Am Soc Nephrol 12, 614-623

Otera H, Ohsakaya S, Nagaura ZI, Ishihara N, Mihara K (2005): Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. EMBO J 24, 1375–1386

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000): A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. Curr Biol 10, 886–895

Perazella MA, Markowitz GS (2008): Bisphosphonate nephrotoxicity. Kidney Int 74, 1385–

1393

Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD (2014): The Glomerulus: The Sphere of Influence. Clin J Am Soc Nephrol 9, 1461–1469

Polster BM, Basañez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005): Calpain I Induces Cleavage and Release of Apoptosis-inducing Factor from Isolated Mitochondria. J Biol Chem 280, 6447–6454

Preuss HG (1993): Basics of renal anatomy and physiology. Clin Lab Med 13, 1–11

Quaggin SE, Kreidberg JA (2008): Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. Development 135, 609–620

Reiser J, Altintas MM (2016): Podocytes. F1000Res 5,114

Rennke HG, Klein PS (1989): Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. Am J Kidney Dis 13, 443–456

Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000): Initiation of DNA Fragmentation during Apoptosis Induces Phosphorylation of H2AX Histone at Serine 139. J Biol Chem 275, 9390–9395

Ronco P (2007): Proteinuria: is it all in the foot? J Clin Invest 117, 2079–2082

Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P (2002): A Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephrin and Podocin Expression. J Am Soc Nephrol 13, 630–638

Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B, García-Maset R, Giménez I, Silva I, Ruíz P, Ballarín J, Torra R, Ars E (2011): Clinical Utility of Genetic Testing in Children and Adults with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. Clin J Am Soc Nephrol 6, 1139–1148

Satko SG, Freedman BI, Moossavi S (2005): Genetic factors in end-stage renal disease. Kidney Int Suppl S46-49

Scharstuhl A, Mutsaers HAM, Pennings SWC, Russel FGM, Wagener FADTG (2009): Involvement of VDAC, Bax and Ceramides in the Efflux of AIF from Mitochondria during Curcumin-Induced Apoptosis. PLOS ONE 4, e6688

Sim JJ, Batech M, Hever A, Harrison TN, Avelar T, Kanter MH, Jacobsen SJ (2016): Distribution of Biopsy-Proven Presumed Primary Glomerulonephropathies in 2000-2011 Among a Racially and Ethnically Diverse US Population. Am J Kidney Dis 68, 533–544

Stockand JD, Sansom SC (1998): Glomerular Mesangial Cells: Electrophysiology and Regula-

tion of Contraction. Physiol Rev 78, 723–744

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996): Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. J Exp Med 184, 1331–1341

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prévost MC, Alzari PM, Kroemer G (1999): Mitochondrial Release of Caspase-2 and -9 during the Apoptotic Process. J Exp Med 189, 381–394

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, et al. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397, 441–446

ten Dam MAGJ, Hilbrands LB, Wetzels JFM (2011): Nephrotic syndrome induced by pamidronate. Med Oncol 28, 1196–1200

Thiriet C, Hayes JJ (2005): Chromatin in Need of a Fix: Phosphorylation of H2AX Connects Chromatin to DNA Repair. Mol Cell 18, 617–622

Thomas DB, Franceschini N, Hogan SL, ten Holder S, Jennette CE, Falk RJ, Jennette JC (2006): Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. Kidney Int 69, 920–926

Vollenbröker B, George B, Wolfgart M, Saleem MA, Pavenstädt H, Weide T (2009): mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. Am J Physiol Renal Physiol 296, F418–F426

Wang KK (2000): Calpain and caspase: can you tell the difference? Trends Neurosci 23, 20–26

Wang Y, Dawson VL, Dawson TM (2009): Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. Exp Neurol 218, 193–202

Wang Y, An R, Umanah GK, Park H, Nambiar K, Eacker SM, Kim B, Bao L, Harraz MM, Chang C, et al. (2016): A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. Science 354, add6872

Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P (2017): Chronic Kidney Disease. Lancet 389, 1238–1252

Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, Saunders TL, Dysko RC, Kohno K, Holzman LB, et al. (2005): Podocyte Depletion Causes Glomerulosclerosis: Diphtheria Toxin–Induced Podocyte Depletion in Rats Expressing Human Diphtheria Toxin

Receptor Transgene. J Am Soc Nephrol 16, 2941–2952

Wiggins RC (2007): The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. Kidney Int 71, 1205–1214

Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, et al. (2005): A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. Science 308, 1801–1804

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002): DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. Nat Struct Biol 9, 680–684

Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, Denine EP, Asbell MA (1972): Comparative Pharmacokinetics of Daunomycin and Adriamycin in Several Animal Species. Cancer Res 32, 1177–1183

Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2006): Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. Proc Natl Acad Sci USA 103, 18314–18319

Yu SW, Wang Y, Frydenlund DS, Ottersen OP, Dawson VL, Dawson TM (2009): Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. ASN Neuro 5, e00121

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssière JL, Petit PX, Kroemer G (1995): Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J Exp Med 181, 1661–1672

Zhu C, Wang X, Deinum J, Huang Z, Gao J, Modjtahedi N, Neagu MR, Nilsson M, Eriksson PS, Hagberg H, et al. (2007): Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. J Exp Med 204, 1741–1748

Zong WX, Thompson CB (2006): Necrotic death as a cell fate. Genes Dev 20, 1–15

Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB (2004): Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. Genes Dev 18, 1272–1282

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Ströbel danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor wissenschaftlich zu arbeiten und diese Dissertation anzufertigen. Außerdem möchte ich Herrn Professor Zeisberg danken, der gemeinsam mit Professor Ströbel die Betreuung der Arbeit übernommen hat und mir mit hilfreichen Rückmeldungen zur Seite stand.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. Samy Hakroush für seine Unterstützung und Supervision der Dissertation, er war stets erreichbar und wirkte am Studienaufbau sowie der Interpretation der Ergebnisse mit.

Ganz besonders danken möchte ich Dr. Stefan Küffer, der als Laborleiter eine große Stütze war und großen Einfluss auf die erfolgreiche Durchführung von Experimenten nahm. Ich danke auch Sandra Rüngeling für die exzellente technische und logistische Unterstützung und für die schöne Zusammenarbeit. Auch Monique Küffer und Stefanie Schwager möchte ich für ihr Engagement danken.

Außerdem möchte ich Dr. Sebastian Kruse und Dr. Julius Meißner für die Korrektur meiner Arbeit herzlich danken.