

***In situ* Assay zur Untersuchung der  
Wirkung pharmazeutischer Substanzen auf die  
Podozytendifferenzierung**

**I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von  
Frances Kindt

Greifswald, 11.02.2021

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. Karlhans Endlich

2. Gutachter: Prof. Dr. Dennis Schade

Tag der Promotion: 29.11.2021

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis .....	I
II. Abbildungsverzeichnis .....	III
III. Abkürzungsverzeichnis .....	IV
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Die glomeruläre Filtrationsbarriere .....	1
1.2. Der Podozyt .....	2
1.3. Nephrin .....	5
1.3.1. Expression .....	5
1.3.2. Proteinstruktur und extrazelluläre Funktion.....	5
1.3.3. Nephrin-Expression in erworbenen Nierenerkrankungen.....	7
1.4. Der Podozyt als Ziel therapeutischer Interventionen.....	8
1.4.1. Podozyten in Nierenerkrankungen.....	8
1.4.2. Behandlung chronischer Nierenerkrankungen.....	9
1.4.3. Entwicklung podozytenspezifischer Therapien .....	10
1.5. Ziele der Arbeit.....	12
<b>2. Material und Methoden</b> .....	13
2.1. Material .....	13
2.1.1. Primer für die PCR .....	13
2.1.2. Verwendete Antikörper .....	13
2.1.3. Verwendete Software .....	14
2.1.4. Pharmakologische Substanzen .....	14
2.1.5. Versuchstiere .....	15
2.2. Methoden .....	16
2.2.1. Glomeruli-Isolation aus Mäusenieren .....	16
2.2.2. Kultivierung und Visualisierung isolierter Glomeruli .....	17
2.2.3. Zellviabilitäts-Assay.....	18
2.2.4. Quantifizierung der Fluoreszenzintensität.....	18
2.2.5. Pharmakologische Behandlung isolierter Glomeruli.....	19
2.2.6. Probengewinnung für die Transkriptom- und Proteomanalyse.....	20
2.2.7. Molekularbiologische Methoden .....	20
2.2.8. Proteinanalytische Methoden .....	24
2.2.9. Elektronenmikroskopie .....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	32
3.1. Isolation intakter Glomeruli .....	33
3.1.1. Siebmethode .....	33

3.1.2. Kollagenase A-Methode .....	35
3.1.3. Dynabeads-Methode .....	36
3.1.4. Untersuchung der Zellviabilität isolierter Glomeruli .....	37
3.1.5. Nachweis podozytenspezifischer Proteine in isolierten Glomeruli .....	39
3.1.6. Auswahl einer geeigneten Isolationsmethode .....	40
3.2. Verringerung der Nephrin-abhängigen CFP-Expression während der Dedifferenzierung von Podozyten .....	41
3.2.1. Dedifferenzierung der Podozyten isolierter Glomeruli in Zellkultur .....	41
3.2.2. Nachweis der abnehmenden Nephrin- und CFP-Expression in kultivierten Glomeruli mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse .....	43
3.2.3. Ultrastrukturelle Veränderungen kultivierter Glomeruli über die Zeit .....	45
3.3. Zeitabhängige Veränderungen des Transkriptoms und Proteoms von Glomeruli in Zellkultur .....	46
3.3.1. Analyse podozytenrelevanter Gene und Proteine .....	47
3.3.2. Analyse charakteristischer Gene und Proteine verschiedener renaler Zelltypen .....	49
3.3.3. Bioinformatische Analyse des Proteoms .....	50
3.4. Modulation der CFP-Intensität durch Pharmaka .....	53
3.4.1. Inkubation der Glomeruli mit Daunorubicin und Vinblastin .....	53
3.4.2. Inkubation der Glomeruli mit Dexamethason, all-trans-Retinsäure, 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> und Pioglitazon .....	54
3.4.3. Untersuchungen zur Wirkung von Hämopexin .....	57
3.4.4. Einfluss von BDNF und TrkB-Inhibitoren auf die CFP-Intensität .....	57
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
4.1. Glomeruli-Isolation .....	60
4.2. Dedifferenzierung der Podozyten isolierter Glomeruli in Zellkultur .....	62
4.3. Transkriptom- und Proteomanalyse .....	64
4.4. Substanzscreening .....	67
4.5. Perspektiven .....	70
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>101</b>
7.1. Geräte, Materialien und Lösungen .....	101
7.2. Experimentelle Befunde zu den untersuchten Podozytenmarker .....	108
7.3. Funktionelle Annotations-Cluster .....	114
Eigenständigkeitserklärung .....	141
Lebenslauf, Publikationen und wissenschaftliche Leistungen .....	142
Danksagung .....	145

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Schematischer Aufbau eines Nierenkörperchens und der Filtrationsbarriere .....	2
<b>Abb. 2</b>	Morphologie des Podozyten im gesunden und geschädigten Zustand.....	3
<b>Abb. 3</b>	Schematischer Aufbau der Podozyten-Fußfortsätze .....	4
<b>Abb. 4</b>	Hypothetischer Aufbau der Schlitzmembran .....	6
<b>Abb. 5</b>	Folgen einer Podozytenschädigung.....	8
<b>Abb. 6</b>	Schematischer Aufbau des Sandwich-Blots.....	26
<b>Abb. 7</b>	Darstellung von Nephrin und dem cyan-fluoreszierenden Protein (CFP) an Kryostatschnitten von Mäusenieren .....	32
<b>Abb. 8</b>	Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der Sieb-, Kollagenase A- und Dynabeads-Methode zur Isolation von Glomeruli.....	33
<b>Abb. 9</b>	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der angewandten Isolationsmethode. .	34
<b>Abb. 10</b>	Fluoreszenzintensität und Kapsulierung der mittels der Siebmethode erhaltenen Glomeruli .....	35
<b>Abb. 11</b>	Glomeruli-Isolation mit magnetischen Dynabeads .....	36
<b>Abb. 12</b>	Morphologie der mit Dynabeads isolierten Glomeruli .....	37
<b>Abb. 13</b>	Propidiumiodid-Assay zur Untersuchung der Zellviabilität isolierter Glomeruli .....	38
<b>Abb. 14</b>	Immunfluoreszenzfärbung podozytenspezifischer Proteine an Kryostatschnitten von Glomeruli isoliert mit magnetischen Dynabeads.....	39
<b>Abb. 15</b>	Zeit- und FBS-abhängiger Abfall der CFP-Intensität kultivierter Glomeruli .....	42
<b>Abb. 16</b>	Auswachsende Podozyten isolierter Glomeruli .....	43
<b>Abb. 17</b>	Nachweis des zeitabhängigen Abfalls der Nephrin- und CFP- Expression auf mRNA- und Proteinebene.....	44
<b>Abb. 18</b>	Raster (REM)- und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) kultivierter Glomeruli .....	45
<b>Abb. 19</b>	Ergebnisse der Transkriptom- und Proteomanalyse .....	46
<b>Abb. 20</b>	Heatmap podozytenrelevanter Gene und Proteine .....	48
<b>Abb. 21</b>	Heatmap charakteristischer Gene und Proteine renaler Zelltypen .....	50
<b>Abb. 22</b>	Abfall der CFP-Intensität nach 6-tägiger Inkubation der Glomeruli mit Daunorubicin und Vinblastin .....	53
<b>Abb. 23</b>	Untersuchungen zum Einfluss von ATRA, Dexamethason, Vitamin D und Pioglitazon auf die CFP-Expression der Podozyten .....	55
<b>Abb. 24</b>	Anstieg der Nephrin- und CFP-Expression nach Vitamin D-Behandlung. ....	56
<b>Abb. 25</b>	Behandlung der Glomeruli mit Hämopexin.....	57
<b>Abb. 26</b>	Modulation der CFP-Intensität durch BDNF und TrkB-Inhibitoren.....	58

### III. Abkürzungsverzeichnis

Ad libitum	Nach Belieben
AF	Anreicherungsfaktor
AKT	Proteinkinase B
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATRA	All-trans-Retinsäure
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein
CKD	Chronic kidney disease, chronische Nierenerkrankung
CNF	Kongenitales nephrotisches Syndrom vom Finnischen Typ
COX-2	Cyclooxygenase 2
CycloB	Cyclotraxin B
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
Dexa	Dexamethason
DFG	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Glomerulus
DHI	Durchschnittliche Hintergrundintensität
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ESRD	End-stage renal disease, Nierenversagen im Endstadium
FACI	Funktionelles Annotationscluster
FBS	Fetal bovine serum, Fötales Kälberserum
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HPX	Hämopexin
HRP	Horseradish peroxidase, Merrettichperoxidase
HTS	High-Throughput-Screening, Hochdurchsatz-Screening
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
KD	Knock-Down
KO	Knock-Out
LSM	Laser-Scanning Mikroskopie
MCGP	Minimal-Change-Glomerulopathie
MPK	Magnetischer Partikelkonzentrator

---

MS	Massenspektrometrie
MUK	Minimal umliegende Kreise
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Next Generation Sequencing
OD	Optische Dichte
p75NTR	p75 Neutrophin Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEC	Parietale Epithelzellen
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pio	Pioglitazon
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEAP	Sekretierte alkaline Phosphatase
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
SM	Schlitzmembran
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TBS	Tris Buffered Saline, Tris-Puffer
TBST	Tween 20-haltige Tris gepufferte Salzlösung
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TrkB	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B
ÜE	Überexpression
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
VDRE	Vitamin D response element, Vitamin D-Antwortelement
VitD	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>
VRAD	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> , all-trans-Retinsäure und Dexamethason
ZF	Zebrafisch





## 1. Einleitung

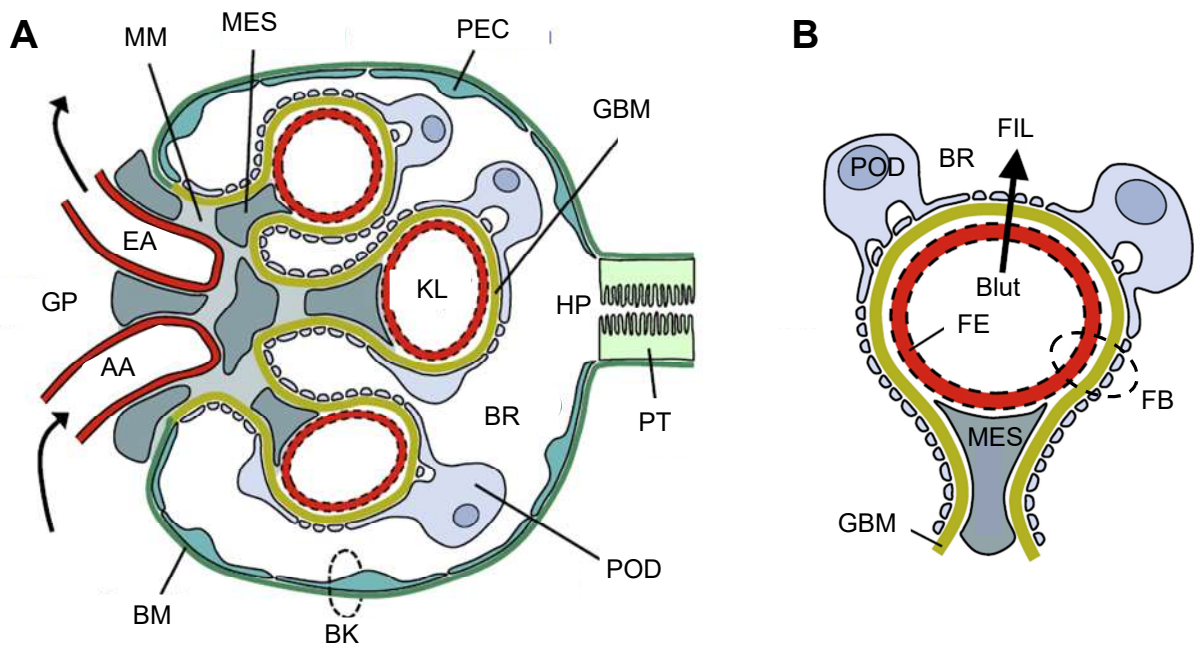
Wie Studien zeigen, leiden etwa 17 % der Bevölkerung Mecklenburg-Vorpommerns und ungefähr 10 % der Menschen in Deutschland unter einer chronischen Nierenerkrankung (Chronic kidney disease, CKD)<sup>1,2</sup>. Das Fortschreiten einer solchen CKD endet langfristig in einem totalen Nierenversagen (End-stage renal disease, ESRD), nicht zuletzt, weil es momentan keine Medikamente gibt, die ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung verhindern können. Als Mittel erster Wahl dienen Glukokortikoide wie Prednison oder der Calcineurin-Inhibitor Ciclosporin A. Diese bergen jedoch ein erhebliches Nebenwirkungspotential und der Therapieerfolg unterliegt starken interindividuellen Schwankungen<sup>3,4</sup>. Selbst Patienten, die gut auf die Behandlung ansprechen, besitzen nach wie vor eine schlechte Prognose<sup>5</sup> und müssen sich langfristig einer Dialyse und/oder einer Nierentransplantation unterziehen<sup>6,7</sup>.

Da etwa 70 % aller CKD-Erkrankungen auf Podozytopathien zurückgeführt werden können<sup>8</sup>, steht der Podozyt zunehmend im Fokus der Wissenschaft. Jedoch scheiterten bereits zahlreiche klinische Studien zur Entwicklung podozytenspezifischer Arzneimittel, da sie aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen oder eines ausbleibenden renoprotektiven Effektes vorzeitig abgebrochen werden mussten<sup>9</sup>. Um solche Misserfolge zukünftig zu vermeiden, sollte das Screening von Arzneimittel bereits in der präklinischen Phase stärker forciert werden. Zu diesem Zweck wurde ein neues Verfahren etabliert, mit dem Ziel schneller podozytenspezifische Pharmaka zu identifizieren.

### 1.1. Die glomeruläre Filtrationsbarriere

In den menschlichen Nieren besteht jedes der etwa 2 Millionen Nephrone<sup>10</sup> aus einem Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*) und einem dazugehörigen Nierenröhrchen (*Tubulus renalis*). Die Ultrafiltration des Blutes erfolgt in den Nierenkörperchen, welche sich wiederum aus einer Bowman-Kapsel und einem Kapillarknäuel, dem Glomerulus, zusammensetzen (Abb. 1). Pro Tag werden rund 180 l Primärharn produziert, von welchem nach Reabsorption im Tubulussystem jedoch nur 0,8–2 l letztendlich als Urin ausgeschieden werden. Während zelluläre Bestandteile wie Erythrozyten bei der Ultrafiltration gänzlich zurückgehalten werden, gelangt ein Teil der Plasmaproteine und Makromoleküle in Abhängigkeit ihrer Größe, Form und Ladung in den Primärharn. Die Selektivität dieses Prozesses wird durch eine dreischichtige, glomeruläre Filtrationsbarriere gewährleistet. Die initiale Barriere stellt dabei das fenestrierte, Diaphragma-freie Endothel dar, das die glomerulären Kapillaren auskleidet und von einer stark negativ geladenen Glykokalyx überzogen ist<sup>11</sup>. Ihm folgt die

240–370 nm dicke, glomeruläre Basalmembran (GBM)<sup>12</sup>, welcher die Podozyten in Richtung des Bowmanschen Kapselraums aufsitzen.



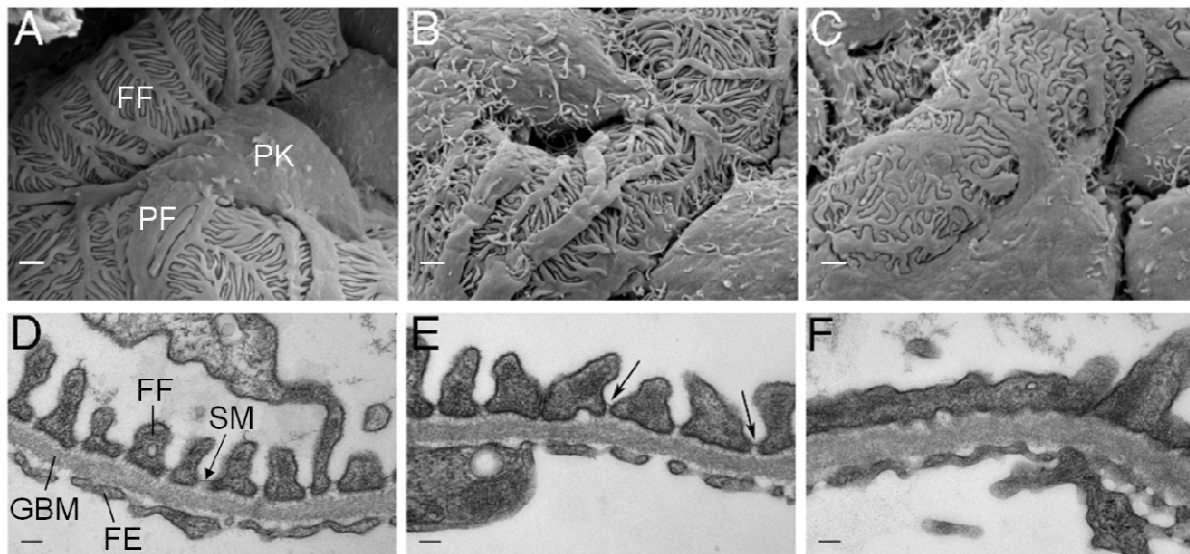
**Abb. 1 Schematischer Aufbau eines Nierenkörperchens (A) und der Filtrationsbarriere (B) modifiziert nach Leeuwis *et al.*<sup>13</sup>.** GP - Gefäßpol, AA - Afferente Ateriole, EA - Efferente Ateriole, BM - Bowman-Basalmembran, BK - Bowman-Kapsel, POD - Podozyt, BR - Bowmanscher Kapselraum, HP - Harnpol, PT - Proximaler Tubulus, KL - Kapillarlumen, GBM - Glomeruläre Basalmembran, PEC - Parietale Epithelzelle, MES - Mesangiumzelle, MM - Mesangiale Matrix, FE - Fenestriertes Endothel, FB - Filtrationsbarriere, FIL - Filtrationsrichtung

Der Raum zwischen den Kapillaren wird vom intraglomerulären Mesangium eingenommen, das aus Mesangiumzellen und der von ihnen gebildeten mesangialen Matrix besteht. Das Mesangium trägt wesentlich zur Stabilisation des Glomerulus bei und beeinflusst mutmaßlich auch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR)<sup>14,15</sup>.

## 1.2. Der Podozyt

Podozyten sind hochdifferenzierte, postmitotische, polarisierte Epithelzellen und bilden das innere, viszerale Blatt der Bowman-Kapsel. Sie zeichnen sich durch ihre hochspezialisierte Morphologie aus. So zweigen sich von einem Zellkörper, der im Ultrafiltrat des Bowmanschen Kapselraums hineinragt, lange Primärfortsätze ab, deren Enden wiederum zahlreiche, feine Sekundärfortsätze (Fußfortsätze) entspringen (Abb. 2A, D). Die

Fußfortsätze benachbarter Podozyten interdigitieren und bilden untereinander 30–35 nm breite Filtrationsschlitzte<sup>16</sup>, welche von einer Schlitzmembran überbrückt werden (Abb. 2D).

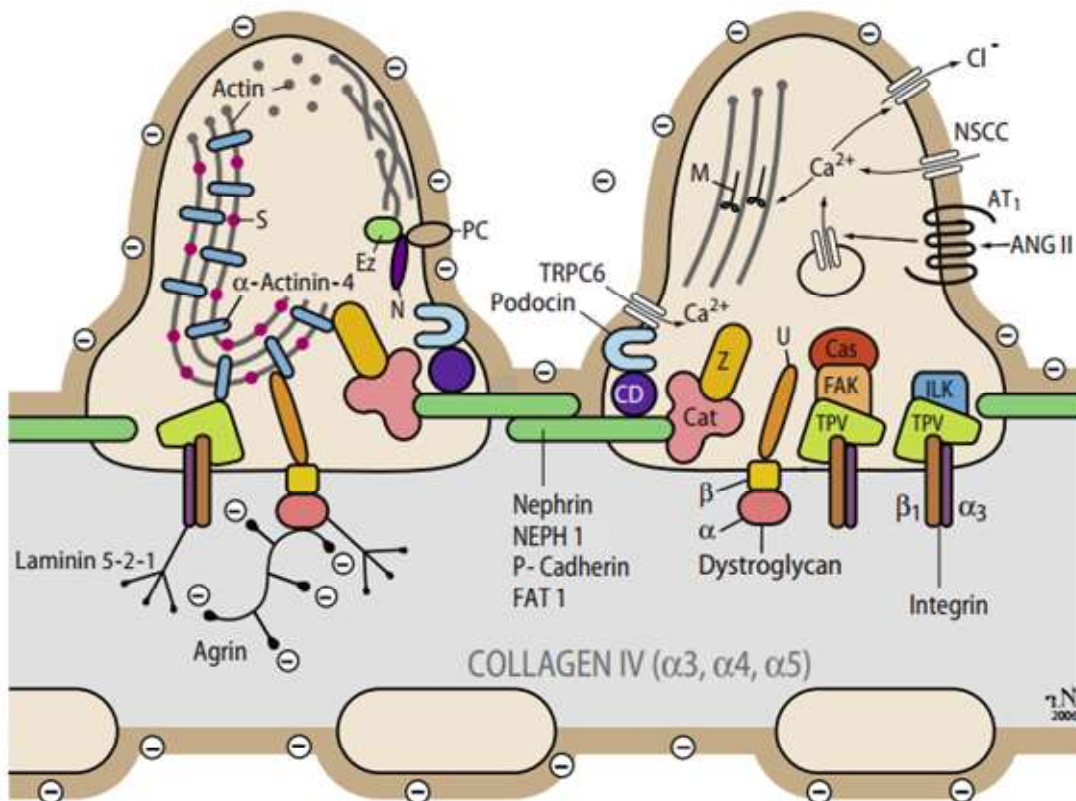


**Abb. 2 Morphologie des Podozyten im gesunden und geschädigten Zustand.** Raster- (A–C) und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (D–F) von Glomeruli aus Mäusenieren vor (A, D) und nach (B, C, E, F) Schädigung (modifiziert nach Lefevre *et al.*)<sup>17</sup>. **A** Die von den Primärfortsätzen ausgehenden, interdigitierenden Fußfortsätze umfassen die glomerulären Kapillaren. **D** Die Filtrationsschlitzte zwischen den Fußfortsätzen werden von einer Schlitzmembran überspannt. **B–C, E–F** Eine Schädigung des Podozyten (hier konditionelle Deletion des „Pax transactivation-domain interacting protein“) führt anfänglich zu einer Desorganisation (B, E) und letztlich zu einer Abflachung der Fußfortsätze (Effacement), welche mit einem Verlust der Schlitzmembran einhergeht. PK - Podozytenkörper, PF - Primärfortsatz, FF - Fußfortsatz, GBM - Glomeruläre Basalmembran, FE - Fenestriertes Endothel, SM - Schlitzmembran. Messbalken = 1 µm (A–C), 100 nm (D–F)

Die Fußfortsätze stellen die einzige Kontaktstelle des Podozyten mit der GBM dar und sind in dieser über Adhäsionsproteine wie Integrine (bspw.  $\alpha3\beta1$ -Integrin)<sup>18,19</sup> und Dystroglykane<sup>20,21</sup> mechanisch verankert. Darüber hinaus sind diese Adhäsionsproteine auch an der Signaltransduktion zwischen dem Podozyt und der Basalmembran beteiligt, indem sie durch Rekrutierung von Adaptor- und Effektormolekülen das komplexe Aktinzytoskelett der Fußfortsätze modulieren können<sup>22</sup>. Dessen Organisation ist essentiell für die intakte Fußfortsatzmorphologie und wird durch verschiedene Aktin-assoziierte Proteine wie bspw.  $\alpha$ -Actinin-4<sup>23,24</sup>, Synaptopodin<sup>25,26</sup> oder Palladin<sup>27</sup> reguliert. Durch die Schädigung von Podozyten kann eine Umlagerung des Aktinzytoskeletts induziert werden, wodurch es zu einer Abflachung der Podozyten-Fußfortsätze, dem sogenannten Effacement und einem Verlust der Schlitzmembran kommt (Abb. 2B, C, E, F)<sup>28</sup>. Diese Veränderungen

wiederum ziehen eine Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsfähigkeit und eine Proteinurie nach sich<sup>29,30</sup>.

Die Schlitzmembran wurde erstmals von Rodewald und Karnovsky als ein isoporöses, „reißverschlussähnliches“ Band beschrieben, welches durch Interaktion transmembranärer Proteine gebildet wird<sup>31</sup>. Später gelang es Kestilä *et al.*, Nephrin als dessen erstes spezifische Protein zu identifizieren<sup>32</sup>.



**Abb. 3 Schematischer Aufbau der Podozyten-Fußfortsätze.** Die Filtrationsschlitze zwischen den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten werden von der Schlitzmembran überspannt (grün) (modifiziert nach Kriz)<sup>33</sup>. ANG II - Angiotensin II, AT1 - Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 1, Cas - p130Cas, Cat - Catenin, CD - CD2AP, Ez - Ezrin, FAK - fokale Adhäsionskinase, ILK - Integrin-verknüpfte Kinase, M - Myosin, N - NHERF2, NSCC - Nichtselektiver Ionenkanal, PC - Podocalyxin, S - Synaptopodin, TPV - Talin, Paxillin, Vinculin, U - Utrophin, Z - ZO-1,

Heute weiß man, dass außer Nephrin noch weitere Proteine wie bspw. Podocin<sup>34,35</sup>, NEPH-1<sup>36</sup>, P-Cadherin<sup>37</sup>, FAT-1<sup>38</sup>,  $\alpha/\beta/\gamma$ -Catenin<sup>37</sup>, ZO-1<sup>39,40</sup>, MAGI-2<sup>41</sup>, Occludin und JAM-A<sup>42</sup> am Aufbau der Schlitzmembran beteiligt sind.

## 1.3. Nephrin

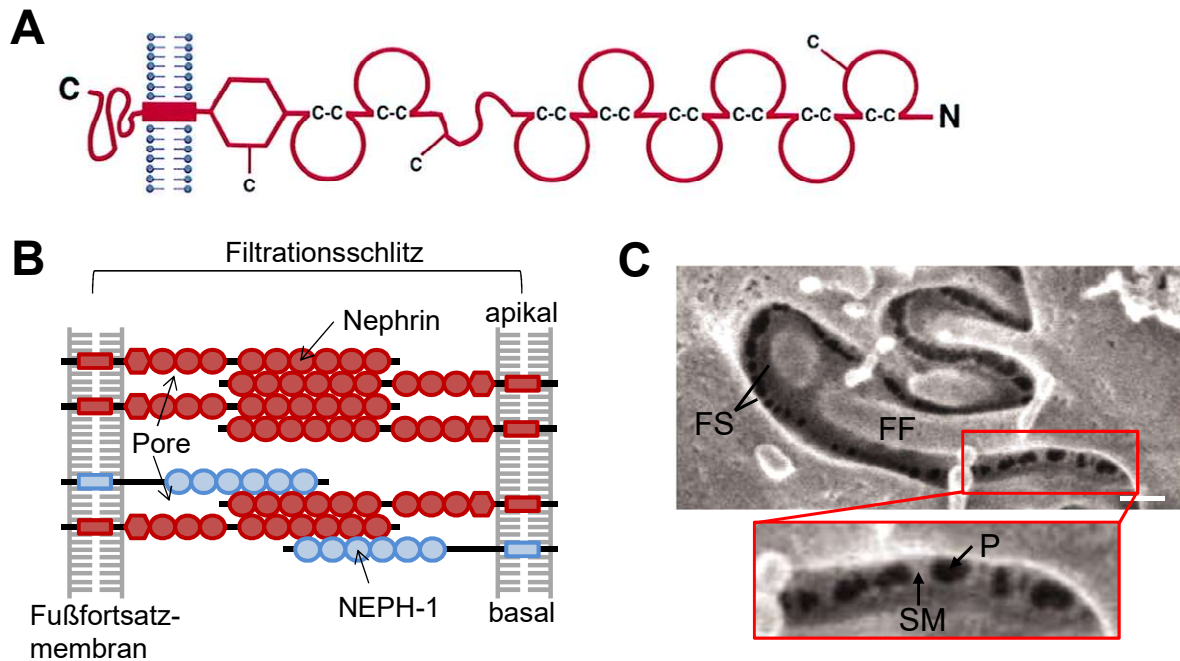
### 1.3.1. Expression

Nephrin wird im Menschen durch das *NPHS1*-Gen kodiert<sup>32</sup> und ist innerhalb der Niere spezifisch in Podozyten lokalisiert. Extrarenal wird es außerdem im Pankreas<sup>43,44</sup> und in verschiedenen, lymphatischen Geweben<sup>45</sup> exprimiert. Bei Mäusen ist es darüber hinaus im Gehirn<sup>46,47</sup>, der Milz, dem Thymus, den Testikeln<sup>48</sup> und im embryonalen, kardialen Gewebe<sup>49</sup> sowie embryonalen Myoblasten zu finden<sup>50</sup>.

### 1.3.2. Proteinstruktur und extrazelluläre Funktion

Nephrin ist ein 180 kDa großes Transmembranprotein<sup>51</sup>, das aus einer kurzen, intrazellulären und einer 35 nm langen, extrazellulären Domäne besteht (Abb. 4A). Letztere umfasst 8 Immunglobulin (Ig)-ähnliche Motive und ein Fibronectin Typ III-ähnliches Modul<sup>16,32</sup>. Die extrazellulären Domänen von Nephrinmolekülen benachbarter Podozyten interagieren über homophile Wechselwirkungen miteinander und bilden so das zentrale Rückgrat der Schlitzmembran (Abb. 4B)<sup>16,51,52</sup>. Zwischen den Nephrindimeren befinden sich Poren, welche einen etwas geringeren Durchmesser als Albumin besitzen und an der Retention von Plasmaproteinen beteiligt sind (Abb. 4C)<sup>53,54</sup>.

Beim Menschen führen über 200 verschiedene Mutationen des *NPHS1*-Gens zum Krankheitsbild des kongenitalen nephrotischen Syndroms vom Finnischen Typ (CNF)<sup>55-57</sup>. Die von der Krankheit betroffenen Kinder werden zumeist verfrüht geboren und entwickeln bereits *in utero* eine massive, nichtselektive Proteinurie und Ödeme<sup>58</sup>. Darüber hinaus bedingt das nephrotische Syndrom verschiedene Sekundärerkrankungen (bspw. Hyperlipidämie, Hypothyreose, thrombotische Komplikationen, erhöhte Infektanfälligkeit)<sup>57</sup>. Ohne eine Behandlung versterben die Neugeborenen innerhalb des ersten Lebensjahres. Durch frühzeitige therapeutische Interventionen sowie einer späteren bilateralen Nephrektomie und nachfolgender Dialyse lässt sich die Lebenserwartung verlängern. Jedoch stellt die Nierentransplantation im frühen Kindesalter langfristig die einzige kurative Maßnahme dar<sup>59,60</sup>.



**Abb. 4 Hypothetischer Aufbau der Schlitzmembran.** **A** Schematische Proteinstruktur des Nephtrins. Die 8 extrazellulären Immunglobulin-Domänen sind als geöffnete Kreise visualisiert, welche durch Disulfidbrücken (C-C) verbunden sind (nach Ruotsalainen *et al.* 1999)<sup>51</sup>. **B** Die Schlitzmembran wird durch Nephtrin-Homodimere und Nephtrin-NEPH-1-Heterodimere überbrückt. **C** Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Schlitzmembran (SM) in Rattennieren unter Verwendung eines "In-Lens"-Detektors zeigt deren "reißverschlussähnliche", poröse Struktur (modifiziert nach Gagliardini *et al.*)<sup>54</sup>, Messbalken = 200 nm. C-C - Disulfidbrücken, C - freier Cysteinrest, FF - Fußfortsatz, FS - Filtrationsschlitz, P - Pore, SM - Schlitzmembran

Die Nieren der CNF-Patienten sind etwa um das 2–3-fache vergrößert und zeigen histopathologische Charakteristika wie fibrotische Läsionen, dilatierte, atrophe Tubuli, eine erhöhte Anzahl an Nierenkörperchen, erweiterte Bowman-Kapseln und eine mesangiale Expansion<sup>56,61–63</sup>. Des Weiteren belegen elektronenmikroskopische Aufnahmen eine Abflachung und Fusion der Podozyten-Fußfortsätze sowie das Fehlen der Schlitzmembranen<sup>64,65</sup>. Der Knockout von Nephtrin im Mausmodell führte zu einem Phänotyp, welcher dem Krankheitsbild des kongenitalen CNF ähnelt. So entwickelten die *Nphs1*-defiziente Tiere bereits *in utero* eine massive Proteinurie und verstarben pränatal oder innerhalb von 24 h nach der Geburt<sup>46,66–68</sup>. Elektronenmikroskopisch zeigten sich ultrastrukturelle Veränderungen der Podozyten wie eine Fusion der Fußfortsätze und das Fehlen von Schlitzmembranen<sup>46,67,68</sup>. Die Struktur der GBM sowie die Expression anderer podozytenspezifischer Proteine (bspw. Podocin, CD2AP und FAT-1) blieb hingegen unverändert<sup>66</sup>. Durch das Einbringen eines Doxycyclin-induzierbaren, transgenen Ratten-Nephtrin-Konstrukts in die *Nphs1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, konnte die perinatale Letalität des

*Nphs1*-Knockouts gesenkt werden. Darüber hinaus waren die zwischen den Podozyten befindlichen Filtrationsschlitze noch teils von einer Schlitzmembran überbrückt. Das Auftreten einer Proteinurie und ein Effacement der Podozyten-Fußfortsätze konnte jedoch nicht verhindert werden <sup>69</sup>.

Neben seiner Bedeutung für den Aufbau der Schlitzmembran spielt Nephrin auch eine zentrale Rolle für die intrazelluläre Signaltransduktion, auf welche im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden soll <sup>70</sup>.

### 1.3.3. Nephrin-Expression in erworbenen Nierenerkrankungen

Nephrin ist nicht nur für die Entstehung von hereditären Glomerulopathien bedeutsam, sondern spielt auch eine Rolle in der Pathogenese erworbener Nierenerkrankungen. So stehen Mutationen des *NPHS1*-Gens im Zusammenhang mit der Minimal-Change-Glomerulonephritis <sup>71,72</sup>, der fokal segmentalen Glomerulosklerose <sup>73,74</sup> und der IgA-Nephropathie <sup>75</sup>.

Eine Korrelation zwischen der Nephrin-Expression und einer entstehenden Proteinurie konnte erstmals in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden. So verursacht die Injektion der monoklonalen Antikörper 5-1-6 und  $\alpha$ -mNep, welche an die extrazelluläre Domäne des Nephrinproteins binden, in Ratten bzw. Mäusen eine Proteinurie <sup>76-78</sup>. Auch die Induktion einer Nephropathie durch Puromycin-Aminonukleosid oder Quecksilberchlorid zog eine verringerte Expression bzw. eine Umverteilung des Nephrins nach sich <sup>77,79,80</sup>. Ähnliche Ergebnisse lieferten darüber hinaus Tiermodelle der diabetischen Nephropathie (Streptozocin-behandelte Ratten, NOD-Mäuse) <sup>81,82</sup> und der membranösen Glomerulonephritis (passive Heymann-Nephritis in Ratten) <sup>83</sup>.

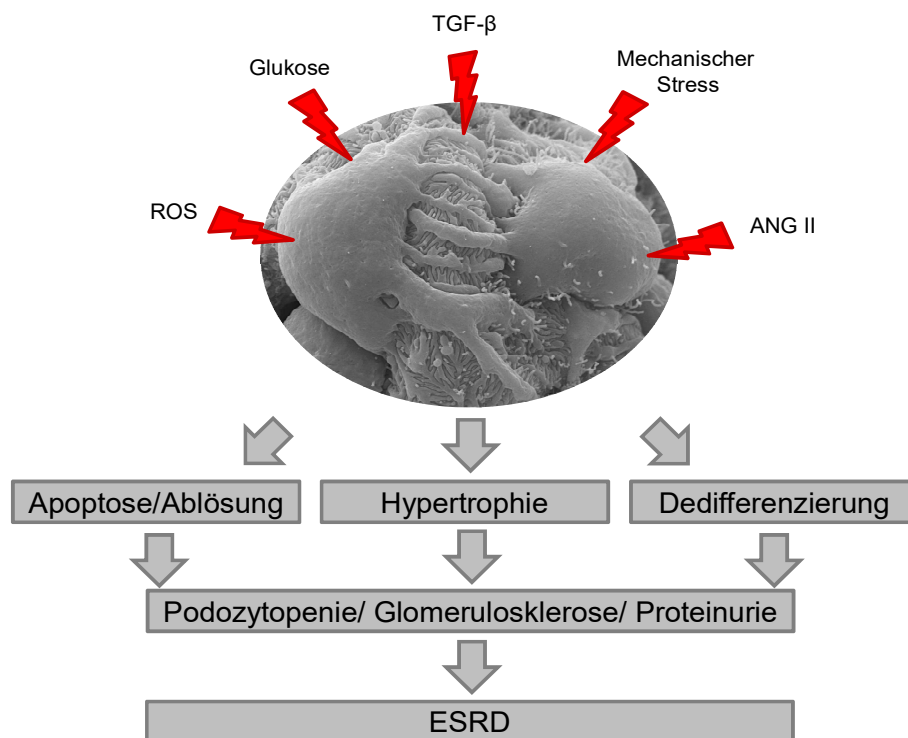
Mittlerweile wurde in einer Vielzahl von Studien belegt, dass verschiedene Nierenerkrankungen auch beim Menschen mit einer verringerten Nephrin-Expression einhergehen. Dies gilt sowohl für primäre Glomerulopathien wie bspw. die Minimal-Change Glomerulonephritis, die membranöse Glomerulonephritis, die fokal segmentale Glomerulosklerose, die IgA-Nephritis und die membranproliferative Glomerulonephritis als auch für sekundäre Glomerulopathien wie die diabetische Nephropathie und die Lupusnephritis <sup>82,84-93</sup>. Bei proteinurischen Patienten im Kindesalter hingegen wurde lediglich eine Umverteilung des Nephrins, jedoch keine verringerte Expression nachgewiesen <sup>94-96</sup>.



## 1.4. Der Podozyt als Ziel therapeutischer Interventionen

### 1.4.1. Podozyten in Nierenerkrankungen

Podozyten spielen aufgrund ihres geringen Regenerationspotentials eine Schlüsselrolle in der Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen. Da sie nicht in der Lage sind, sich postnatal zu replizieren, ist ein Verlust der Podozyten unmittelbar mit der Entstehung einer Proteinurie verbunden <sup>97</sup>.



**Abb. 5 Folgen einer Podozytenschädigung.** Infolge einer pathologischen Aktivierung können Podozyten in Apoptose gehen, hypertrophieren oder dedifferenzieren. Alle Prozesse führen zu einer Podozytopenie und langfristig zur Entstehung eines Nierenversagens im Endstadium (EM-Aufnahme von Nadine Artelt, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universitätsmedizin Greifswald). ROS - reaktive Sauerstoffspezies, TGF-β - Transformierender Wachstumsfaktor β, ANG II - Angiotensin II, ESRD - End-stage renal disease

Die Schädigung eines Podozyten durch Noxen kann verschiedene Konsequenzen nach sich ziehen (Abb. 5). So kann eine pathologische Aktivierung zur Apoptose und/oder Ablösung des Podozyten führen <sup>97</sup>, eine kompensatorische Hypertrophie bedingen <sup>98,99</sup> oder die Dedifferenzierung der Podozyten induzieren. Letztere zeichnet sich durch einen Verlust Podozyten-spezifischer Marker wie Nephrin, WT-1 oder Podocalyxin aus, während mesenchymale Marker wie SNAIL, SLUG, FSP-1 und N-Cadherin verstärkt exprimiert werden <sup>100,101</sup>. Des Weiteren führt eine Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts zu einem



Effacement der Podozyten-Fußfortsätze, einer Schädigung der Schlitzmembran und einem Verlust der apikal-basalen Polarität<sup>102,103</sup>. Neben phänotypischen Veränderungen weisen dedifferenzierte Podozyten außerdem eine erhöhte Motilität und proliferative Eigenschaften auf<sup>104,105</sup>.

Eine Schädigung der Podozyten führt letztendlich zu einer Verringerung der Podozytenzahl (Podozytopenie), welche eine Vernarbung des Glomerulus nach sich zieht (Glomerulosklerose)<sup>8</sup>. Damit einher geht eine graduelle Abnahme der glomerulären Filtrationsleistung. Anhand von Untersuchungen an Ratten geht man davon aus, dass sich ein Verlust von mindestens 20 % aller Podozyten in einer milden Proteinurie manifestiert<sup>106,107</sup>. Ab einem Schwund von mehr als 60 % ist keine selektive Filtration mehr gegeben, sodass ein Nierenversagen im Endstadium (ESRD) unausweichlich ist.

#### **1.4.2. Behandlung chronischer Nierenerkrankungen**

Für die Behandlung chronischer Nierenerkrankungen steht derzeit nur eine limitierte Anzahl an Wirkstoffen (Glukokortikoide, Calcineurin-Inhibitoren, Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und monoklonale anti-CD20-Antikörper Rituximab) zur Verfügung<sup>108</sup>. Als Mittel erster Wahl werden Glukokortikoide eingesetzt, welche neben globalen Effekten auch direkt auf Podozyten wirken. So führt die Behandlung kultivierter Podozyten mit Dexamethason zu einer vermehrten Expression und Phosphorylierung von Nephtrin<sup>109,110</sup>. Außerdem wirkt es antiapoptotisch durch Regulation des PI3K-AKT-Signalweges sowie der Bcl3- und p53-Expression<sup>111</sup>. Sein antientzündlicher Effekt resultiert aus der Repression des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und der damit einhergehenden COX-2-Verringerung<sup>112</sup>. Die Therapie chronischer Nierenerkrankungen mit Glukokortikoiden wird durch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Osteoporose, das Cushing-Syndrom, einen steroidinduzierten Diabetes oder gar durch eine komplette Steroidresistenz limitiert. In diesen Fällen ist der Einsatz der Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin A und Tacrolimus empfohlen<sup>113</sup>. Ihre antiproteinurische Wirkung ist sowohl ihrem immunsuppressiven Wirkmechanismus als auch ihrem direkten Effekt auf den Podozyten zuzuschreiben<sup>114</sup>. Allerdings ist auch der Einsatz der Calcineurin-Inhibitoren aufgrund eines erhöhten Tumorrisikos und einer Langzeit-Nephrotoxizität ebenfalls problematisch<sup>115</sup>.

Um das Fortschreiten einer CKD bestmöglich zu verhindern, ist die konsequente Behandlung zugrundeliegender Begleiterkrankungen unerlässlich. Eine der Hauptursachen für die Entstehung einer CKD ist Diabetes mellitus. Neben den klassischen Antidiabetika wie Insulin, Metformin und Glibenclamid wird auch der Insulin-Sensitizer Pioglitazon zur Senkung des Blutzuckerspiegels eingesetzt. Es verstärkt nach Aktivierung des PPAR $\gamma$ -Rezeptors die Wirkung von Insulin<sup>116</sup>. Unter proteinurischen Bedingungen im Tiermodell steigert

Pioglitazon die Wirkung von Glukokortikoiden<sup>110</sup>. Außerdem wirkt es auf kultivierte Podozyten antiapoptotisch und fördert die Expression von Differenzierungsmarkern<sup>117</sup>.

Schätzungsweise 80 % aller CKD-Patienten entwickeln im Laufe der Zeit einen Vitamin D-Mangel<sup>118</sup>, welcher seinerseits das Fortschreiten der Erkrankung beschleunigt<sup>119</sup>. In diesen Fällen wird die Supplementation mit Vitamin D<sub>3</sub> oder synthetischen Analoga wie Paricalcitol empfohlen<sup>113</sup>. In seiner biologisch aktiven Form, dem 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol), bindet Vitamin D<sub>3</sub> an den zytosolischen Vitamin D-Rezeptor, welcher mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) interagiert. Anschließend transloziert dieses Heterodimer in den Zellkern und beeinflusst nach Bindung an das Vitamin D Response Element (VDRE) die Expression verschiedener Gene<sup>120</sup>. *In vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass der protektive Effekt von Vitamin D<sub>3</sub> auf den Podozyten auf die vermehrte Expression von Nephrin zurückgeführt werden kann<sup>121-123</sup>. Dabei scheint die Aktivierung des PI3K-AKT- und des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges eine zentrale Rolle zu spielen<sup>122,124,125</sup>. Darüber hinaus wird die antiproteinurische Wirkung des Vitamin D<sub>3</sub> mutmaßlich auch durch globale Effekte wie einer Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, einer Modulation des Immunsystems und einer vermehrten Insulin-Sekretion bedingt<sup>124,126</sup>.

### 1.4.3. Entwicklung podozytenspezifischer Therapien

Obwohl eine Reihe altbewährter Arzneimittel für die Behandlung einer CKD zur Verfügung steht, belegt die stetig wachsende Anzahl dialysepflichtiger Patienten in Deutschland<sup>127</sup>, dass der Erfolg dieser Therapien unzureichend ist. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe blieb aufgrund gescheiterter klinischer Studien bisher jedoch aus<sup>9</sup>. Deswegen gibt es seit Kurzem ein wachsendes Interesse daran, die Identifikation neuer Arzneimittel bereits in der präklinischen Phase stärker zu forcieren.

Eine Möglichkeit die renale Wirksamkeit und Toxizität von Substanzen und niedermolekularen Verbindungen (Small molecules) *in vivo* zu untersuchen, bieten verschiedene Tiermodelle wie der Zebrafisch (*Danio rerio*)<sup>128</sup>, der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*)<sup>129</sup> oder die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*)<sup>130</sup>. Diese Organismen bieten gegenüber murinen Modellen den Vorteil, dass aufgrund des kurzen Generationswechsels und der hohen Nachkommenzahl eine Vielzahl an Wirkstoffen getestet werden kann. Des Weiteren besitzen sie eine hohe genetische Konservierung<sup>130,131</sup>, welche eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen erhoffen lässt, und sind für genetische Veränderungen leicht zugänglich. Problematisch ist hingegen, dass die Anzahl der gescreenteten Wirkstoffe aufgrund der experimentellen Handhabung nach wie vor limitiert ist. Außerdem können die Tierversuche zum Teil durch die jeweiligen nationalen, rechtlichen Auflagen beschränkt sein.

Deswegen wurden verschiedene *in vitro*-Assays entwickelt, welche für das Hochdurchsatz-Screening (High-Throughput-Screening, HTS) geeignet sind. Die erste Screening-Methode etablierten Yamauchi *et al.*<sup>132</sup>. Sie nutzten murine, immortalisierte Reporterpodozyten, welche unter der Kontrolle des Nephritin-Promoters die sekretierte, alkaline Phosphatase (SEAP) exprimierten. Anhand der SEAP-Aktivität gelang es ihnen die endogenen Nephritin-Regulatoren Dexamethason, all-trans-Retinsäure und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> zu identifizieren. Ein weiterer Assay stammt von Widmeier *et al.*, welche in einem HTS-Screening den Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf die Migrationsrate humaner, immortalisierter Podozyten untersuchten<sup>133</sup>.

Während diese beiden Verfahren auf der Änderung funktioneller Eigenschaften des Podozyten beruhen, gibt es aber auch verschiedene Ansätze, phänotypische Charakteristika als Auslesekriterium zu verwenden. So nutzten bspw. Lee *et al.* morphologische Merkmale wie die Zellform, die Organisation des Aktin-Zytoskletts oder die Anzahl der Fokalkontakte, um den protektiven Effekt von Wirkstoffen auf Puromycin-Aminonukleosid-behandelte murine Podozyten zu beurteilen<sup>134</sup>. Ein ähnliches Verfahren beschrieben außerdem Lal *et al.*, welche humane, immortalisierte Podozyten mit Palmitat und hohen Glukose-Konzentrationen initial schädigten<sup>108</sup>. Den therapeutischen Effekt der koinkubierten Screening-Substanzen evaluierten sie dann anhand der Apoptose-Marker Caspase 3 und Caspase 7. Unterstützend bezogen sie außerdem Veränderungen der Zellmorphologie und des Aktin-Zytoskletts in die Auswertung mit ein.

Allen bisher beschriebenen Verfahren ist die Verwendung immortalisierter, kultivierter Podozyten gemein, welche im Vergleich zu Podozyten in ihrem physiologischen Umfeld jedoch stark morphologisch und funktionell verändert sind. So bilden sie keine typischen Primärfortsätze, Fußfortsätze und Schlitzmembranen aus. Des Weiteren ist die Expression podozytenspezifischer Differenzierungsmarker wie bspw. Nephritin und Podocin deutlich verringert<sup>135</sup>. Darüber hinaus beeinflussen sich Podozyten und andere glomeruläre Zelltypen (bspw. Mesangium- und Endothelzellen) gegenseitig über parakrine Mechanismen und tragen so zur Regulation der glomerulären Funktion bei<sup>136</sup>. In Zellkultur sind diese Signalwege ebenso wie die Existenz einer Filtrationsbarriere jedoch nicht gegeben. Deswegen ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse Zell-basierter Assays auf *in vivo*-Modelle bisher fraglich. Es wäre daher wünschenswert, den Effekt von Wirkstoffen und niedermolekularen Verbindungen anhand terminal differenzierter Podozyten zu untersuchen.

## 1.5. Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, den GlomAssay zu entwickeln, mit welchem Effekte pharmakologischer Substanzen auf die Podozytendifferenzierung *in situ* untersucht werden können. Dazu wurden Glomeruli eines *Nephrin::CFP*-Mausstamms, dessen Podozyten in Abhängigkeit von der Promoteraktivität des Differenzierungsmarkers Nephrin das cyanfluoreszierende Protein (CFP) exprimieren, isoliert und kultiviert. Die Podozyten isolierter Glomeruli beginnen in Zellkultur spontan zu dedifferenzieren, was mit einem Verlust des Differenzierungsmarkers und Schlitzmembranproteins Nephrin einhergeht. Da CFP nephrinabhängig gebildet wird, dient die Intensität des Fluoreszenzreporters als Maß für die Podozytendifferenzierung.

Um wichtige Signalwege der Podozytendifferenzierung zu identifizieren, wurden die zeitabhängigen Veränderungen des glomerulären Transkriptoms und Proteoms in Zellkultur mittels Next Generation Sequencing (NGS) bzw. UPLC-MS/MS-Analyse untersucht.

Die experimentelle Validierung des GlomAssays erfolgte mit den podozytenprotektiven Substanzen Dexamethason, all-trans-Retinsäure,  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  und Pioglitazon als auch mit den Podozyten-Noxen Daunorubicin und Vinblastin. Anschließend wurde der Einfluss neuer Substanzen wie BDNF, ANA-12, GNF-5837 und Hämopexin auf die Podozytendifferenzierung untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Primer für die PCR

Alle verwendeten Primer wurden von Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bezogen.

**Tab. 1** Verwendete Primer

Zielgen	Forward-Primer (5' → 3')	Reverse-Primer (5' → 3')	Produktgröße
<b>Nephrin</b>	GCC ACC ACC TTC ACA CTG AC	AGA CCA CCA ACC GCA AAG AG	233 bp
<b>CFP</b>	GGG CAC AAG CTG GAG TAC AA	CTC AGG TAG TGG TTG TCG GG	194 bp
<b>β-Aktin</b>	GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG	GGA TGG CTA CGT ACA TGG C	153 bp

#### 2.1.2. Verwendete Antikörper

**Tab. 2** Für den Western Blot verwendete Primärantikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Firma
<b>Anti-CFP, JL-8</b>	Maus	1:20000	Clontech, Mountain View, USA
<b>Anti-GAPDH, sc-25778</b>	Kaninchen	1:4000	Santa Cruz, Dallas, USA
<b>Anti-Nephrin, GP-N2</b>	Meerschwein	1:8000	Progen, Heidelberg

**Tab. 3** Für den Western Blot verwendete, HRP-gekoppelte Sekundärantikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Firma
<b>Anti-guinea pig, sc-2438</b>	Ziege	1:10000	Progen, Heidelberg
<b>Anti-mouse, sc-2005</b>	Ziege	1:10000	Clontech, Mountain View, USA
<b>Anti-rabbit, sc-2030</b>	Ziege	1:17500	Santa Cruz, Dallas, USA

**Tab. 4 Für die Immunfluoreszenz verwendete Primärantikörper**

Name	Spezies	Verdünnung	Firma
<b>Anti-Nephrin, GP-N2</b>	Meerschwein	1:100	Progen, Heidelberg
<b>Anti-Podocin, P0372</b>	Kaninchen	1:100	Sigma Aldrich, München
<b>Anti-WT1, C-19</b>	Kaninchen	1:50	Santa Cruz, Dallas, USA

**Tab. 5 Für die Immunfluoreszenz verwendete, Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper**

Name	Spezies	Verdünnung	Firma
<b>Cy<sup>TM</sup>3 AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG</b>	Esel	1:250	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA
<b>Cy<sup>TM</sup>3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG</b>	Ziege	1:250	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA

### 2.1.3. Verwendete Software

DAVID Bioinformatics Resources 6.7	Leidos Biomedical Research Inc., Frederick, MD, USA
Elucidator Software Paket	Ceiba Solutions Inc., Boston, MA, USA
Glomc	Eigenentwicklung auf Basis von OpenCV
GraphPad Prism 5.0	Software, San Diego, CA, USA
LifeScope <sup>TM</sup> Software v2.5.1.	Life Technologies <sup>TM</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microsoft® Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
R Version 3.1.2. (31.10.2014)	GNU GPL, Free Software Foundation, Boston, MA, USA
Velocity 6.3	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

### 2.1.4. Pharmakologische Substanzen

Mit Ausnahme des TrkB-Fc Fusionsproteins, welches von der Firma Alomone Labs (Jerusalem, Israel) vertrieben wurde, wurden alle verwendeten Substanzen von Sigma Aldrich bezogen (München).

**Tab. 6 Verwendete pharmakologische Substanzen und Konzentrationen**

<b>Substanz</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Konzentration</b>
<b>1<math>\alpha</math>,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub></b>	DMSO	0,1–10 $\mu$ M
<b>All-trans-Retinsäure</b>	DMSO	1–30 $\mu$ M
<b>ANA-12</b>	DMSO	1–100 $\mu$ M
<b>BDNF, human</b>	Wasser	0,01–1 $\mu$ g/ml
<b>Cyclotraxin B</b>	Wasser	0,01–10 $\mu$ M
<b>Daunorubicin</b>	DMSO	0,05–10 $\mu$ M
<b>Dexamethason</b>	Wasser	2,5–25 $\mu$ M
<b>Hämopexin</b>	Wasser	1–700 $\mu$ g/ml
<b>Pioglitazon</b>	DMSO	1–10 $\mu$ M
<b>TrkB-Fc Fusionprotein, human</b>	Wasser	0,2– 2 $\mu$ g/ml
<b>Vinblastin</b>	DMSO	0,001–100 $\mu$ M

### 2.1.5. Versuchstiere

Für die Versuche wurden transgene *Nephrin::CFP*-Mäuse verwendet, welche eine modifizierte Variante des cyan-fluoreszierenden Proteins (CFP) unter der Kontrolle eines Nephrin-Promoter-Fragments exprimieren. Dieser Stamm wurde 2005 von Cui *et al.* durch die Subklonierung der CFP cDNA in die EcoR1-Sequenz eines NPXRS Nephrin Konstrukts generiert<sup>137</sup>.

Die Versuchstierzucht oblag der „Zentrale Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere“ der Universität Greifswald. Für die Zucht wurden ICR-Mäuse als genetischer Hintergrund verwendet. Die anschließende Haltung der *Nephrin::CFP*-Mäuse erfolgte im Tierstall des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universitätsmedizin Greifswald unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 21 °C, Luftfeuchtigkeit 60 %, 12 h Tag/Nacht-Rhythmus, Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum*.). Für die Experimente wurden adulte Mäuse im Alter von 6 Monaten verwendet. Die Haltung sowie alle Versuche mit Tieren entsprachen den Anforderungen des Tierschutzgesetzes.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Glomeruli-Isolation aus Mäusenieren**

Mit Ausnahme der Perfusion und der Organentnahme wurden alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte zur Isolation der Glomeruli unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

#### **2.2.1.1. Siebmethode**

Für die Isolation der Glomeruli mittels der Siebmethode wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Anschließend wurden die Nieren mit sterilem Präparationsbesteck entnommen und nach dem Entfernen der Fettreste und der Bindegewebskapseln mit einem Skalpell zerkleinert. Das Gewebe wurde vorsichtig durch ein 250 µm Sieb gedrückt, welches mehrfach mit kaltem PBS gespült wurde. Danach wurde die erhaltene Suspension durch ein 150 µm Sieb filtriert, welches von den Glomeruli jedoch nicht von größeren Tubulusfragmenten passiert werden kann. Die angereicherten Glomeruli wurden anschließend in einem 70 µm Sieb aufgefangen. Dieses wurde kopfüber auf ein 50 ml Falcon gesetzt und die Glomeruli mit 37 °C warmen RPMI 1640-Medium heraus gespült. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 560 × g) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in RPMI 1640-Medium resuspendiert.

#### **2.2.1.2. Kollagenase A-Methode**

Analog zur Siebmethode wurden die Mäuse mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und die Nieren entnommen. Die entkapselten und zerkleinerten Nieren wurden dann bei 37 °C für 45 min mit 2 ml Kollagenase A (Konzentration 1 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücken durch ein 100 µm Sieb gedrückt, die Suspension erneut durch ein 100 µm Sieb filtriert und die festen Bestandteile in einem 70 µm Sieb aufgefangen. Die Rückstände wurden dann mit 37 °C warmen RPMI 1640-Medium aus dem 70 µm Sieb in ein 50 ml Falcon überführt und 10 min bei 560 × g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Sediment in RPMI 1640-Medium resuspendiert.



### 2.2.1.3. Dynabeads-Methode

Die Glomeruli-Isolation mit magnetischen Dynabeads erfolgte wie zuvor von Takemoto *et al.* beschrieben und basiert auf der gröÙenselektiven Akkumulation der 4,5 µm großen Dynabeads in den Kapillarschlingen der Glomeruli innerhalb der Niere<sup>138</sup>.

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg) narkotisiert und nach Erreichen des Toleranzstadiums auf einer Styroporplatte fixiert. Anschließend wurden Haut und Bauchwand geöffnet, die Baueingeweide stumpf verlagert und die *Aorta abdominalis* und die *Vena cava* freigelegt. Letztere wurden dann knapp oberhalb der Aortenbifurkation abgeklemmt. Nach der möglichst blutungsarmen Öffnung des Thoraxraums wurde eine Flügelkanüle in den *Ventriculus cordis sinister* eingeführt und eine Inzision des *Atrium dextrum* vorgenommen. Anschließend wurde die Maus mit etwa 20 ml PBS gefolgt von 20 ml Dynabeads® M-450 Epoxy (Endkonzentration  $8 \times 10^6$  Dynabeads/ml) perfundiert. Die Nieren wurden entnommen und in 4°C steriles PBS überführt. Unter der Sterilwerkbank wurden Fettreste und die Bindegewebskapsel entfernt, die Nieren halbiert und das Nierenmark separiert und verworfen. Die glomerulihaltige Nierenrinde wurde zerkleinert und für 45 min bei 37 °C mit Kollagenase A (Konzentration 1 mg/ml) inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde vorsichtig durch ein 100 µm Sieb gedrückt, mit 50 ml PBS gespült und zentrifugiert ( $230 \times g$ , 7 min). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das erhaltene Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspension wurde dann in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und die Glomeruli mittels eines magnetischen Partikelkonzentrators (MPK) am Gefäßrand akkumuliert. Der Überstand, welcher Tubulus- und Gewebsfragmente enthält, wurde abgenommen und verworfen. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die gesamte Suspension aufgebraucht war. Anschließend wurde das Falcon mit 2 ml PBS gespült und die darin verbliebenen Glomeruli ebenfalls mittels des MPK separiert und das Isolat in RPMI 1640-Medium resuspendiert.

### 2.2.2. Kultivierung und Visualisierung isolierter Glomeruli

Die isolierten Glomeruli wurden in Abhängigkeit von der Ausbeute in 1–2 ml phenolrotfreiem RPMI-1640 Medium (supplementiert mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit einem Gesamtvolumen von 50 µl/ Kavität auf einen Kollagen-IV-beschichteten Kammer-Objektträger (µ-Slide Angiogenesis von ibidi®) aufgeteilt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

Die Visualisierung der Glomeruli erfolgte mit Hilfe des Leica TCS SP5 konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Da CFP ein bimodales Emissionsspektrum mit einem Hauptpeak bei

475 nm und einer Schulter bei 503 nm zeigt, wurde der Wellenlängenbereich zwischen 450 nm und 515 nm detektiert.

### **2.2.3. Zellviabilitäts-Assay**

Zur Untersuchung der Zellviabilität wurde Propidiumiodid (PI) verwendet. Dieser Farbstoff passiert die perforierte Membran geschädigter Zellen und interkaliert dort zwischen die Basen der DNA. Die Fluoreszenz des DNA-PI-Komplexes kann anschließend bei 617 nm detektiert werden. Zur Untersuchung der Zellviabilität wurden die Glomeruli mit einer Endkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  PI versetzt und für 15 min inkubiert. Die Auswertung wurde mit dem Leica TCS SP5 konfokalen Laser-Scanning Mikroskop vorgenommen.

### **2.2.4. Quantifizierung der Fluoreszenzintensität**

#### **2.2.4.1. Generierung von z-Stapeln**

Für die Quantifizierung der CFP-Intensität wurden 3 Blickfelder je Kavität im Durchlichtkanal ausgewählt, welche eine repräsentative Anzahl der im Well enthaltenen Glomeruli umfasste (keine Mehrfachaufnahmen derselben Glomeruli). Unter Verwendung des 20.0  $\times$  0.70 IMM UV Immersionsobjektivs wurde dann für jedes der ausgewählten Blickfelder ein z-Stapel generiert. Dazu wurde über eine z-Distanz von 100  $\mu\text{m}$  alle 5  $\mu\text{m}$  je ein Durchlicht- und ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden alle Aufnahmen eines Experiments mit denselben mikroskopischen Einstellungen vorgenommen.

#### **2.2.4.2. Fluoreszenzquantifizierung mittels Glomc**

Für die Analyse der z-Stapel wurde ein in der Programmiersprache C++ geschriebenes Programm (Glomc) verwendet, welches OpenCV zur Bildanalyse verwendet. Für die Segmentierung der Glomeruli wurde eine kombinierte Analyse der Durchlicht- und Fluoreszenzbilder durchgeführt. Dazu wurde aus allen Durchlichtbildern mittels Fourier-Transformation die schärfste Ebene ermittelt. Das dazugehörige Bild wurde mit dem summierten, invertierten Fluoreszenzbild überlagert, mit der Otsu Methode binarisiert und die einzelnen Glomeruli durch Kantenerkennung segmentiert. Um eine Detektion freier Dynabeads und verbliebener Zelltrümmer zu verhindern, wurden alle Objekte mit einer Fläche unter 50  $\mu\text{m}^2$  für die weitere Analyse ausgeschlossen. Die extrahierten Glomeruli wurden durch minimal umliegende Kreise maskiert (MUK) und ihre Anzahl bestimmt ( $n_{\text{Glom}}$ ).

Mit Hilfe einer grafischen Nutzeroberfläche konnten manuelle Korrekturen vorgenommen werden. Anschließend wurden die einzelnen Fluoreszenzbilder eines z-Stapels summiert und die Fluoreszenzintensität ( $FI_{\text{Glom}}$ ) in den zuvor definierten MUKs sowie deren eingeschlossene Fläche ( $A_{\text{Glom}}$ ) ermittelt. Darüber hinaus wurde eine Glomeruli-freie Region zur Bestimmung der durchschnittlichen Hintergrundintensität (DHI) definiert. Anhand dieser Daten konnte dann die hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität ( $FI_{\text{Korr}}$ ) mittels der folgenden Formel berechnet werden:

$$FI_{\text{Korr}} = FI_{\text{Glom}} - (A_{\text{Glom}} \times \text{DHI})$$

Danach wurde die  $FI_{\text{Korr}}$  auf die Anzahl der im Bild enthaltenen Glomeruli bezogen und so die durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Glomerulus (DFG) ermittelt. Die DFGs der drei pro Kavität aufgenommenen Blickfelder wurden anschließend gemittelt. Da die DFG von verschiedenen Faktoren wie bspw. der glomerulären Größe (kortikale Glomeruli sind kleiner als juxtamedulläre) oder der Qualität der Isolation abhängt und folglich als absolute Größe nur schwer interpretierbar ist, wurde die DFG auf eine interne Kontrolle (in der Regel die Lösungsmittelkontrolle) normalisiert.

### **2.2.5. Pharmakologische Behandlung isolierter Glomeruli**

Um den Effekt pharmakologisch aktiver Substanzen auf die Differenzierung der Podozyten zu untersuchen, wurden die Glomeruli direkt nach der Isolation mit verschiedenen Wirkstoffen inkubiert und, sofern nicht anders angegeben, für 6 d kultiviert. Darüber hinaus wurde für jedes Experiment eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Nach dem Ablauf dieser Zeitspanne wurde die CFP-Intensität wie unter 2.2.4 beschrieben quantifiziert. Die im Assay untersuchten Substanzen und die jeweiligen Verdünnungen können Tab. 6 entnommen werden.

#### **2.2.5.1. Datenanalyse und statistische Auswertung**

Für die Analyse und statistische Auswertung der erhobenen Daten wurden die Programme Microsoft® Excel und Graph Pad Prism 5.01 verwendet. Wie bereits unter 2.2.4.2. beschrieben wurde die DFG behandelter Glomeruli auf eine jeweils mitgeführte Lösungsmittelkontrolle bezogen. Anschließend wurden die Daten der biologischen Replikate gemittelt und sind im Folgenden als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert.

Um die Varianzhomogenität der Daten zu beurteilen, wurde ein Bartlett's-Test angewandt. Die statistischen Unterschiede zwischen den Datensätzen wurden mittels einer

einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way ANOVA-Test) ermittelt. Unterschritt der dabei erhaltene F-Wert eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, so wurde als *post hoc*-Test der Bonferroni-Test durchgeführt. Mit einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen.

Die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) erfolgte mittels GraphPad Prism 5.01. Dazu wurde mittels nichtlinearer Regression eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve ermittelt, die letztlich zur Bestimmung der  $IC_{50}$  diente.

### **2.2.6. Probengewinnung für die Transkriptom- und Proteomanalyse**

Für die Analyse des Transkriptoms und Proteoms wurden die isolierten Glomeruli einer Maus in 800  $\mu$ l phenolrotfreiem RPMI-Medium (mit 10 % FBS) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf 4 Kavitäten (je 200  $\mu$ l/Kavität) einer NUNC<sup>TM</sup> 4-Well Zellkulturplatte aufgeteilt und kultiviert. Die Ernte der Glomeruli erfolgte nach 0 d, 3 d, 6 d und 9 d. Dazu wurden 50  $\mu$ l des glomerulihaltigen Mediums für die Gewinnung der Proteinproben abgenommen. Die Glomeruli wurden 2-mal mit PBS gespült und in 10  $\mu$ l Urea/Thiourea-Puffer aufgenommen. Das restliche Medium wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und die Kavität 2-mal mit 500  $\mu$ l PBS gespült, welches anschließend mit dem Medium vereint wurde. Nach dem Entfernen des Medium/PBS-Überstandes wurden die Glomeruli in 125  $\mu$ l TRI-Reagenz aufgenommen.

Um eine für die weiteren Analysen ausreichende RNA- und Proteinmenge zu erhalten, wurden pro Replikat die Proben von 8 Mäusen (stets 4 weibliche und 4 männliche Tiere) gepoolt. Insgesamt wurden 3 biologische Replikate generiert. Die RNA- und Proteinisolation erfolgte wie unter 2.2.7.1 und 2.2.8.1 beschrieben.

### **2.2.7. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.7.1. Isolation der RNA**

Für die Isolation der RNA wurden die Glomeruli 3x mit PBS gespült und mit 1 ml TRI-Reagenz versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vollständig lysiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Das phenolhaltige Zellysate wurde mit 330  $\mu$ l Chloroform versetzt, 15 s geschwenkt, 15 min inkubiert und zentrifugiert (12 000  $\times$  g, 4 °C). Anschließend wurde die wässrige RNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die verbliebene

DNA-haltige Interphase und die untere proteinreiche Phenol-Chloroform-Phase wurden verworfen.

Durch Zugabe von 750 µl Isopropanol wurde die RNA für 2 h bei -20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 min, 12 000 × g, 4 °C) sedimentiert und der Isopropanol-Überstand verworfen. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurde das erhaltene Pellet in 1,5 ml 75 %-igem Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert (15 min, 12 000 × g, 4 °C). Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt.

Nachdem alle Rückstände des Ethanols bestmöglich mit einer Pipette entfernt wurden, wurde das RNA-Pellet bis zur Durchsichtigkeit unter der Sterilwerkbank getrocknet. Anschließend wurde es in 10 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder längerfristig bei -80 °C gelagert.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch mittels des BioPhotometers. Für die Messung wurde 1 µl der gelösten RNA in 99 µl RNase-freiem Wasser in einer UV-Küvette verdünnt und luftblasenfrei durchmischt. Neben der Konzentration der RNA wurden auch die Reinheitsquotienten  $OD_{260/280}$  und  $OD_{260/230}$  bestimmt. Diese Werte lassen auf eine Kontamination mit Proteinen, Kohlenhydraten und/oder Phenolrückständen schließen. Beide Quotienten sollten möglichst nahe bei 2,0 liegen.

### **2.2.7.2. RT-PCR**

#### 2.2.7.2.1. cDNA-Synthese

Da nur DNA als Matrize für die DNA-Polymerase der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dienen kann, wurde die isolierte RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit verwendet. Im 1. Schritt wurde 1 µg RNA mit PCR-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt, mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer versetzt und für 4 min bei 42 °C inkubiert, um eventuell vorhandene genomische DNA zu eliminieren. Anschließend wurden Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix und Quantiscript Reverse Transcriptase in den Tab. 7 zu entnehmenden Volumina ergänzt.

Es wurden stets 2 Negativkontrollen mitgeführt: eine RNA-freie Probe, welche nur PCR-Wasser enthielt, sowie eine RNA-haltige Probe, welcher keine Reverse Transkriptase zugesetzt wurde.

**Tab. 7 Reaktionsansatz der Reversen Transkription (20 µl)**

---

	<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen je 20 µl Ansatz</b>
<b>DNase-Verdau</b>	RNA	Variabel (entspricht 1 µg)
	gDNA Wipeout Buffer	2 µl
	PCR-Wasser	Ad 14 µl
<b>Reverse Transkription</b>	Quantiscript RT Buffer	4 µl
	RT Primer Mix	1 µl
	Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl

---

Nach einer 15-minütigen Inkubation der Proben bei 42 °C, wurde die Reverse Transkriptase durch Erwärmen auf 95 °C für 5 min deaktiviert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.7.2.2. RT-PCR

Die PCR dient der Amplifizierung spezifischer Nukleotidsequenzen *in vitro*. Für die PCR wurde die Phire<sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase verwendet. Diese wird erst bei einer Temperatur von 95 °C aktiviert, wodurch eventuelle Fehlhybridisierungen bei niedrigeren Temperaturen verhindert werden.

Der entsprechende Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil der PCR können Tab. 8 und Tab. 9 entnommen werden. Als Negativkontrolle wurde PCR-Wasser mitgeführt.

Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch mittels eines 2 %-igen Agarosegels (versetzt mit 1 µl Ethidiumbromid pro 50 ml Gel) aufgetrennt. Dazu wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl 6x DNA Loading Buffer vermischt und in die dafür vorgesehenen Probenaschen eingebracht. Als Größenstandard wurden 10 µl des 100 bp DNA Ladder aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 mV für circa 45 min. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit UV-Licht visualisiert und mittels der Software INTAS Gel Jet ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software ImageJ. Als Referenzgen wurde *Actb* herangezogen.

Tab. 8 Reaktionsansatz der PCR (20 µl)

Bestandteil	Volumen je 20 µl Ansatz
cDNA, 50 µg/µl	1 µl
Phire Reaction Buffer, 5x	4 µl
dNTPs, 10 mM	0,4 µl
Forward-Primer, 10 µM	0,5 µl
Reverse-Primer, 10 µM	0,5 µl
Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0,4 µl
PCR-Wasser	13,2 µl

Tab. 9 Temperaturprofil der PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiation	98 °C	5 min	1x
Denaturierung	98 °C	10 s	} 30x
Annealing	64 °C	15 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	5 min	1x
Kühlphase	4 °C	∞	

### 2.2.7.3. Transkriptomanalyse

Das mRNA-Expressionsprofil der Glomeruli wurde mittels des Next Generation Sequencing untersucht. Dazu wurden RNA-Proben von frisch isolierten Glomeruli und nach 3 d, 6 d und 9 d in Kultur gewonnen (wie unter 2.2.6 beschrieben).

Alle im Nachfolgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. rer. nat. Andreas W. Kuss am Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt.

#### 2.2.7.3.1. Probenaufarbeitung und Sequenzierung

Zur Kalibration der Messung wurden 5 µg Gesamt-RNA jeder Probe mit einem Ambion® ERCC spike-in Kontroll-Mix versetzt. Anschließend erfolgte die Entfernung der rRNA unter Verwendung des Ribo-Zero rRNA Removal Kits nach den Vorgaben des Herstellers. Die verbliebene mRNA wurde mittels chemischer Hydrolyse fragmentiert, phosphoryliert und aufgereinigt. Danach wurde eine reverse Transkription der RNA-Fragmente, welche zuvor mit Adaptoren ligiert wurden, durchgeführt. Nach einer weiteren Aufreinigung wurde die

erhaltene cDNA 2x mit dem Agencourt® AMPure® XP Kit unter Verwendung magnetischer Beads größenabhängig selektiert und anschließend unter Verwendung von Primern, welche mit einer einmaligen Sequenz, dem sogenannten Barcode, markiert sind, amplifiziert (12 PCR-Zyklen). Nach der Bestimmung der Größe und Konzentration mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer wurden die cDNA-Fragmente äquimolar gepoolt und auf eine Endkonzentration von 76 pg/µl (500 pM) verdünnt. Von diesem Ansatz wurden 50 µl mit einer Ölemulsion, welche entsprechend dem E80 Scale Protokoll des Herstellers aus den Reagenzien P1 und P2 sowie den P1 Beads frisch angesetzt wurde, vermengt. Die Emulsions-PCR wurde anschließend mit dem SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier durchgeführt unter Verwendung der E80-Einstellungen. Im Anschluss wurden die Beads, an deren Oberfläche die amplifizierte DNA gebunden war, mit SOLiD™ EZ Bead™ Enricher angereichert und auf einen SOLiD™ 6-Lane Flowchip aufgetragen. Dieser wurde für 1 h kopfüber bei 37 °C inkubiert, bevor er in den SOLiD™ 5500xl Genetic Analyzer eingebracht wurde. Die Einstellungen für die Sequenzierung wurden so gewählt, dass jeweils 75 Nukleotide in die 3'-Leserichtung und 35 Nukleotide in die entgegengesetzte Richtung sequenziert wurden (Paired-End-Sequenzierung).

### 2.2.7.3.2. Read Mapping und Datenanalyse

Die gelesenen Fragmente, welche nachfolgend als Reads bezeichnet werden, wurden mit Hilfe des Protokolls „whole.transcriptome.pe“ LifeScope-v2.5.1-r0 dem murinen Referenzgenom GRCm38/mm10 zugeordnet. Anschließend wurden die Reads bezüglich des GC-Gehalts innerhalb einer Probe und zwischen den Proben mit dem DeSeq2-Paket von Bioconductor normalisiert. Selbiges wurde auch zur Analyse der differentiellen Expression genutzt. Für die Bewertung der statistischen Signifikanz wurde mittels des Wald-Tests und nachfolgender multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg ein  $q$ -Wert berechnet. Das Ergebnis wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn der  $q$ -Wert unter einem Wert von 0,05 lag.

## 2.2.8. Proteinanalytische Methoden

### 2.2.8.1. Isolation des Gesamtproteins

Für die Isolation des Gesamtproteins wurden die Glomeruli geerntet, 2x mit PBS gewaschen und in 8 M Urea/ 2 M Thiourea aufgenommen. Das Lysat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei 30 °C aufgetaut. Um einen vollständigen Aufschluss der Probe zu erzielen, wurden diese Einfrier-Auftau-Zyklen noch weitere 4x wiederholt. Nach



einem Zentrifugationsschritt ( $20\,000 \times g$ , 1 h,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und das Sediment verworfen.

### **2.2.8.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Diese beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Comassie Brilliant Blue G-250 durch die Bindung von Proteinen im sauren Milieu bathochrom von  $470\text{ nm}$  hin zu  $595\text{ nm}$  verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei  $570\text{ nm}$  kann anschließend kolorimetrisch erfasst werden und dient der Bestimmung des Proteingehalts.

Für die Messung wurden je  $2\text{ }\mu\text{l}$  der Probe oder des BSA Standards jeweils in Doppelbestimmung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit  $18\text{ }\mu\text{l}$  Aqua dest. und  $300\text{ }\mu\text{l}$  Bradford Reagenz, welches zuvor 1:5 mit Aqua dest. verdünnt wurde, versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Absorption der Lösung bei  $595\text{ nm}$  mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers gemessen. Zur Quantifizierung der Proben wurde parallel eine Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA, Konzentrationsbereich  $0\text{--}2,8\text{ mg/ml}$ ) mitgeführt. Die Proteinkonzentration wurde dann anhand dieser mittels linearer Regression ermittelt (Microsoft<sup>®</sup> Excel, 2010).

### **2.2.8.3. Western Blot-Analyse**

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurde das Western Blot-Verfahren angewandt. Dazu wird das Proteingemisch zunächst elektrophoretisch in Abhängigkeit des Molekulargewichts aufgetrennt und mittels des Semidry Blot-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend werden die Zielproteine immunologisch detektiert.

#### **2.2.8.3.1. Probenvorbereitung**

Für die Vorbereitung der Proben wurden je  $2\text{ }\mu\text{g}$  Protein mit Aqua dest. auf ein Volumen von  $15\text{ }\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit  $3\text{ }\mu\text{l}$  6x Auftragslösung versetzt. Die Auftragslösung enthielt Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol, welche zur Denaturierung und Reduktion der Proteine dienten. Darüber hinaus wurden die Proben zusätzlich durch Hitze denaturiert ( $5\text{ min}$ ,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.2.8.3.2. SDS-PAGE

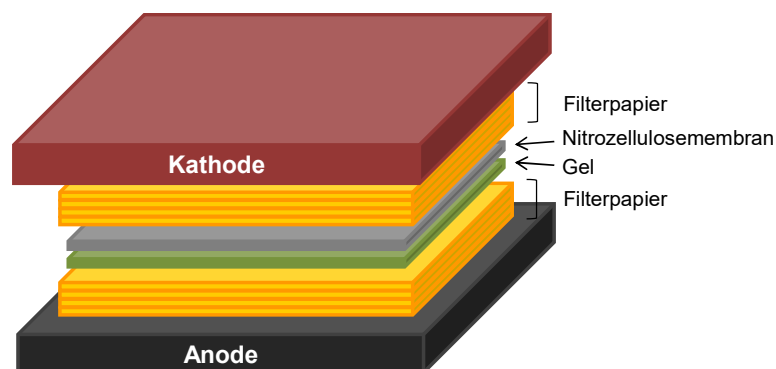
Anschließend wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei werden die Proteine, deren Eigenladung durch die negative Ladung des SDS maskiert wird, durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Das Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt, die Kammer mit 1x Rotiphorese<sup>®</sup> Laufpuffer befüllt und die vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen eingebracht. Als Marker wurde der Precision Plus Protein<sup>™</sup> All Blue Standard mitgeführt, um später eine Bestimmung des Molekulargewichts der Zielproteine zu ermöglichen.

Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde für etwa 10 min eine Spannung von 120 V angelegt, welche anschließend für weitere 30 min auf 200 V erhöht wurde. Nachdem die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels passiert hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt.

### 2.2.8.3.3. Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine mittels des Semidry-Transfers auf eine hydrophobe Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2  $\mu\text{M}$ ) übertragen. Dafür wurde zuerst die Nitrozellulosemembran sowie zwei Stapel vorgefertigter Filterpapiere mit 100 ml 1x Transfer Puffer für 5 min äquilibriert. Anschließend wurde der Sandwich-Blot wie in Abb. 6 dargestellt luftblasenfrei zusammengesetzt. Der Semidry-Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 1,3 A für 8 min mit dem Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Blotting System.



**Abb. 6 Schematischer Aufbau des Sandwich-Blots**

#### 2.2.8.3.4. Immundetektion

Der spezifische Nachweis der Zielproteine erfolgte mittels indirekter Immundetektion. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss an den Semidry-Transfer 3x mit TBST gewaschen und nachfolgend für 1 h mit Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver in TBST) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 5 min wurde der Blot dann über Nacht mit dem Primärantikörper versetzt (siehe Tab. 2). Anschließend wurde der Blot 3x für je 5 min mit TBST gewaschen und für 45 min mit den entsprechenden Merrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert (siehe Tab. 3). Nach erneutem Waschen mit TBST (3x, 5 min) erfolgte die Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz-Nachweis in der Dunkelkammer bei Rotlichtbeleuchtung. Dazu wurde das Pierce<sup>TM</sup> ECL Western Blotting Substrate verwendet. Der Blot wurde für 5 min mit der Substratslösung inkubiert, bestehend aus je 500 µl Detektionsreagenz 1 (Peroxid Lösung) und Detektionsreagenz 2 (Luminol Verstärker Lösung) und anschließend in eine Klarsichtfolie eingeschlagen. Das durch die Oxidation des Luminols entstehende Chemilumineszenzsignal wurde durch das Auflegen eines Super RX-N Röntgenfilms detektiert. Zur Visualisierung der Banden wurde der Fotofilm mit Entwickler- und Fixierlösung behandelt und nach dem Spülen mit Aqua dest. getrocknet. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mittels ImageJ. Als Referenzprotein wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

#### 2.2.8.4. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung an Kryostatschnitten

Für immunhistochemische Färbungen wurden Kryostatschnitte von Mäusenieren und isolierten Glomeruli angefertigt. Dazu wurden die Nieren von Mäusen, welche zuvor mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet wurden, entnommen, entkapselt, halbiert und für 10 min (Nephrin-Nachweis) bzw. 2 h (CFP-Nachweis) mit 2 % PFA fixiert. Die Glomeruli wurden nach der Isolation 1x mit 2 ml PBS gewaschen und für 10 min mit 2 % PFA fixiert. Die Proben wurden in Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T.<sup>TM</sup> Compound Einbettmedium eingebracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Anschließend wurden Serienschritte (Schichtdicke 20 µm) der gefrorenen Proben mittels des Kryostat 2800 Frigocut N angefertigt und auf Objektträger gezogen. Die Schnitte wurden für 15 min bei RT luftgetrocknet, bevor sie für 1,5 h mit Blockierungslösung inkubiert wurden, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend wurde ein gegen das Zielprotein gerichteter Primärantikörper (siehe Tab. 4) auf den Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 4 °C belassen. Dann wurde der Primärantikörper durch Waschen mit PBS (3x 3 min) entfernt und die Schnitte wurden für 45 min bei RT mit einem entsprechenden

fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (siehe Tab. 5). Die Schnitte wurden 3x mit PBS gespült, bevor eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (100 µg/ml, 1:250 in PBS, 5 min) durchgeführt wurde. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit dem Leica TCS SP5 konfokalen Laser-Scanning Mikroskop.

### **2.2.8.5. Proteomanalyse**

Die Proteom-Analyse wurde am Institut für funktionelle Genomforschung der Universitätsmedizin Greifswald von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Uwe Völker durchgeführt. Als Methode wurde das UPLC-MS/MS Verfahren angewandt.

#### 2.2.8.5.1. Probenvorbereitung

Für die Untersuchung des Proteoms wurde das Gesamtprotein der Glomeruli nach 0 d, 3 d, 6 d und 9 d in Kultur wie unter 2.2.6 beschrieben gewonnen. Jede Probe der drei biologischen Replikate wurde in einer Doppelbestimmung untersucht.

Je Probe wurden 3 µg Gesamtprotein durch Inkubation mit 2,5 mM Dithiothreitol (60 °C, 1 h) reduziert und mit 10 mM Iodacetamid (30 min, 37 °C) alkyliert. Eine vollständige Proteolyse der Probe wurde durch die Zugabe der Proteasen LysC (1:100, 3 h, 37 °C) und Trypsin (über Nacht, 37 °C) erreicht, deren proteolytische Aktivität dann durch den Zusatz von Essigsäure (Endkonzentration 1 %) gestoppt wurde. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe von ZipTip-µC18 Pipettenspitzen entsalzen, in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und in 0,1 % Essigsäure/ 2 % Acetonitril aufgenommen.

#### 2.2.8.5.2. UPLC-MS/MS

Die Auftrennung des tryptischen Peptidgemisches erfolgte mittels einer Umkehrphasenchromatografie. Dazu wurde eine Reverse-Phase nanoACQUITY UPLC Säule mit einem Innendurchmesser von 100 µm, einer Länge von 100 mm und einer C18 Partikelgröße von 1,7 µm verwendet. Es wurde eine 90-minütige, nichtlineare Gradientenelution mit einer Flussrate von 0,3 µl/min durchgeführt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch zweier Puffer verwendet (Puffer A: 0,1 % Essigsäure/ 2 % Acetonitril in Wasser, Puffer B: 0,1 % Essigsäure in 100 % Acetonitril), deren zeitabhängige Zusammensetzung Tab. 10 entnommen werden kann.

**Tab. 10 Zeitabhängige Zusammensetzung der mobilen Phase während der UPLC**

Zeit	0 min	10 min	70 min	75 min	77 min	82 min	85 min
<b>Anteil Puffer A</b>	98 %	75 %	60 %	10 %	10 %	98 %	98 %
<b>Anteil Puffer B</b>	2 %	25 %	40 %	90 %	90 %	2 %	2 %

Direkt im Anschluss an die UPLC wurde die Probe mittels des Elektrospray-Verfahrens ionisiert. Die datenabhängige Aufnahme der Ionenspektren erfolgte anschließend mit dem LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer.

#### 2.2.8.5.3. Proteinidentifikation, Quantifizierung und statistische Analyse

Die erhaltenen MS/MS-Spektren wurden mittels der Elucidator Software ausgewertet und dann mittels des Sequest Algorithmus mit der UniProtKB/Swiss-Prot mouse database Version 2014\_01 abgeglichen. Dabei wurden die folgenden Einstellungen genutzt: Verwendung von Trypsin als Spaltungsenzym, Proteolyse aller Spaltstellen, Methioninoxidation als variable Modifikation und Carbamidomethylierung als statische Modifikation. Alle Peptide, die eine False Discovery Rate (FDR) von  $< 0,01$  erreichten, wurden zur Proteinannotation herangezogen. Ein Protein galt als identifiziert, wenn ihm mindestens zwei einmalige Peptidsequenzen zugeordnet werden konnten und gleichzeitig die Peptid-Teller-Wahrscheinlichkeit, welche sich durch Kombination der Wahrscheinlichkeiten der richtigen Zuordnung der Einzelpeptide ergibt, über 0,9 lag. Die Rohdaten wurden anschließend einer Log<sub>10</sub>-Transformation und einer Median-Normalisierung unterzogen. Die statistischen Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mittels des Welch's t-Tests und anschließender multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem  $p$ - bzw.  $q$ -Wert von  $< 0,05$  angenommen.

#### 2.2.8.5.4. Bioinformatische Datenanalyse

Die bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte mit DAVID Bioinformatic Resources 6.7<sup>139</sup>. Es wurden die folgenden Vergleiche durchgeführt: 3 d vs. 0 d, 6 d vs. 0 d, 9 d vs. 0 d. In die Analyse einbezogen wurden alle Proteine, welche um mindestens 50 % reguliert waren und einen  $q$ -Wert von  $< 0,05$  aufwiesen. Diese Proteine wurden dann anhand verschiedener Datenbanken (bspw. Gene Ontology, InterPro, KEGG PATHWAY Database, BioCarta und weitere) funktionell annotiert und mittels des "DAVID Gene Functional Annotation"-Tools in biologisch ähnliche Gruppen kategorisiert. Als nächstes wurden

funktionelle Annotations-Tabellen generiert, welche zur Identifikation der überrepräsentierten biologischen Funktionen dienen. Der bei diesem Verfahren ermittelte Anreicherungsfaktor (AF) gilt dabei als Parameter für die Stärke der Anreicherung. Für die Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde der mittels exaktem Fisher-Test und multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg bestimmte  $q$ -Wert herangezogen. Alle biologischen Funktionen mit einem  $AF \geq 1,5$  und einem  $q$ -Wert  $< 0,05$  wurden in die Auswertung einbezogen.

Um die Redundanz der überrepräsentierten biologischen Funktionen weiter zu reduzieren und dadurch die wesentlichen biologischen Prozesse herauszuarbeiten, wurden funktionelle Annotations-Cluster (FACI) erstellt. Ein solches FACI repräsentiert eine Gruppe ähnlicher Annotationen auf der Basis ihrer co-assoziierten Proteine. Nur FACI, welche einen  $AF \geq 1,5$  erreichten und statistische Signifikanz ( $q < 0,05$ ) aufwiesen, wurden in der Auswertung berücksichtigt.

### **2.2.9. Elektronenmikroskopie**

#### **2.2.9.1. Probengewinnung**

Ultrastrukturelle Veränderungen der Podozyten während der Kultivierung wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Dazu wurden die isolierten Glomeruli von 3 Mäusen direkt nach der Isolation gepoolt und in Zellkulturschalen aufgeteilt. Im Anschluss wurden die Glomeruli nach verschiedenen Zeitspannen in Kultur (0 d, 4 d und 9 d) geerntet, 2x mit 1 ml PBS gewaschen und wie im Folgenden beschrieben ausgearbeitet.

#### **2.2.9.2. Rasterelektronenmikroskopie**

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden die Glomeruli nach der Isolation auf einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von  $0,2 \mu\text{m}$  aufgebracht. Dieser wurde dann in die Fixierlösung (2,5 % Glutaraldehyd in PBS) überführt und dort für 1 h bei RT und weiteren 12 h bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  belassen. Alle weiteren Präparationsschritte sowie die Mikroskopie der Proben wurde am Imaging Zentrum des Instituts für Biologie der Universitätsmedizin und der Universität Greifswald von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. rer. nat. Rabea Schlüter durchgeführt.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Proben mit 1 % Osmiumtetroxid in PBS für 60 min nachfixiert und durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert. Nach der kritischen Punkttrocknung wurden die Proben auf einen Aluminiumhalter aufgebracht und mit einer

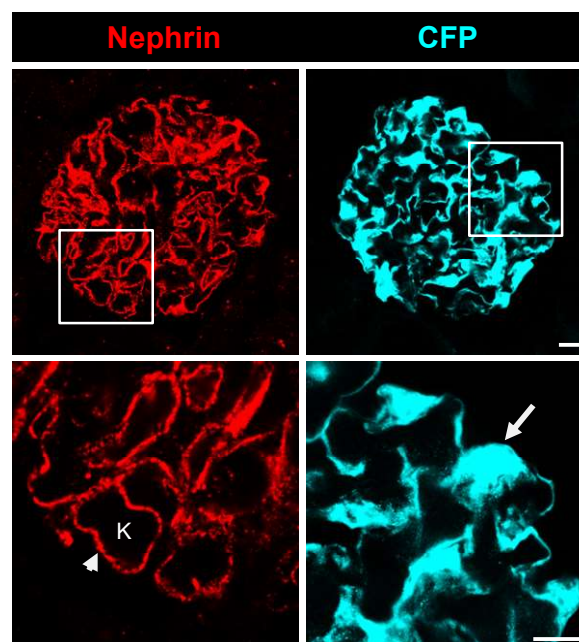
Gold-Palladium-Mischung bedampft. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem EVO LS10 Rasterelektronenmikroskop.

### **2.2.9.3. Transmissionselektronenmikroskopie**

Die Glomeruli wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M HEPES für 1 h bei Raumtemperatur fixiert und dann über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Einbettung der Probe in Agarose, welche nach dem Erkalten in kleinere Stücke zerteilt wurde. Die Probe wurde mit 2 % Osmiumtetroxid behandelt (2 h bei 4 °C) und durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert. Nach der Einbettung in Epon wurden mit dem Ultracut UCT Ultramikrotom Ultradünnschnitte (Dicke 70 nm) angefertigt und auf ein Kupfergitter überführt. Anschließend erfolgte eine Kontrastierung der Schnitte mit 5 % Uranylacetat und Bleicitrat. Die Proben wurden mit dem LIBRA 120 Transmissionselektronenmikroskop dargestellt.

### 3. Ergebnisse

Die nachfolgenden Experimente dienten zur Verifikation der podozytenspezifischen Expression von Nephrin und dem unter einem Nephrin-Promoter-Fragment gebildeten cyan-fluoreszierendem Protein (CFP). Die Darstellung erfolgte immunhistochemisch an Kryostatschnitten unbehandelter Mäusenieren (Abb. 7). Für den Nachweis des Nephrins wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primär- und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Der Fluoreszenzreporter CFP wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) visualisiert.



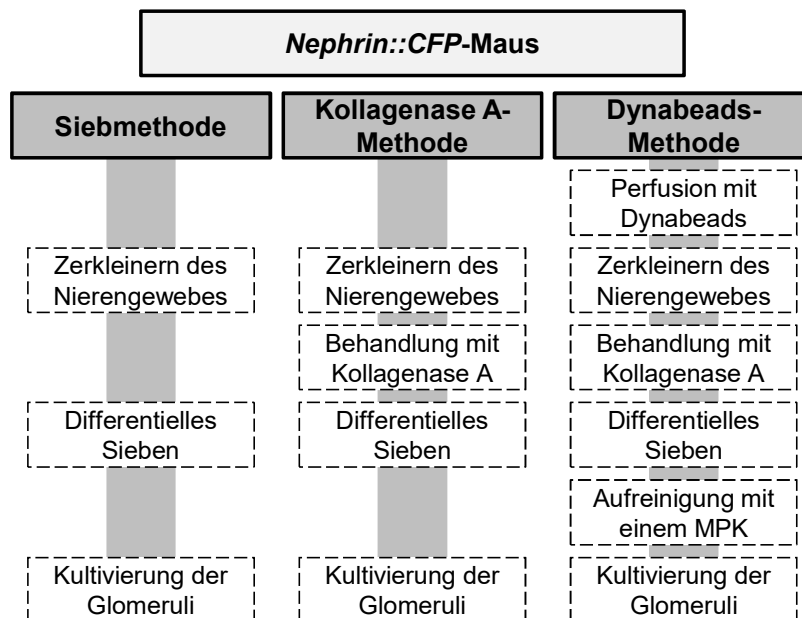
**Abb. 7 Darstellung von Nephrin und dem cyan-fluoreszierenden Protein (CFP) an Kryostatschnitten von Mäusenieren.** Nephrin (rot) wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primär- und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Das podozytenspezifische Nephrin ist hauptsächlich in den Schlitzmembranen der Fußfortsätze (Pfeilkopf), welche die Kapillaren (K) umgeben, lokalisiert. Die Darstellung des CFPs (cyan) erfolgte direkt mittels LSM. Das zytosolisch lokalisierte CFP ist sowohl in den Podozytenkörpern (Pfeil), als auch in Primär- und Fußfortsätzen detektierbar. Messbalken = 10  $\mu\text{m}$

Sowohl das Schlitzmembranprotein Nephrin als auch das unter dem Nephrin-Promoter exprimierte CFP zeigten eine podozytenspezifische Expression. Beide Proteine konnten insbesondere im Bereich der Fußfortsätze, welche den Kapillaren des Glomerulus aufsitzen, detektiert werden. Der Fluoreszenzreporter CFP war aufgrund seiner Lokalisation im Zytosol auch in den Podozytenkörpern und Primärfortsätzen nachweisbar.



### 3.1. Isolation intakter Glomeruli

Die Dedifferenzierung von Podozyten sollte anhand isolierter Glomeruli untersucht werden. Deswegen war es notwendig, ein geeignetes Verfahren für die Isolation der Glomeruli zu etablieren, mit welchem die Integrität der Podozyten und folglich die Reproduzierbarkeit des GlomAssays gewährleistet werden konnte. Es wurden drei in der Literatur beschriebene Methoden – Siebmethode<sup>140,141</sup>, Kollagenase A-Methode<sup>142</sup> und Dynabeads-Methode<sup>138</sup> – getestet und bezüglich der folgenden Kriterien verglichen: CFP-Intensität der Podozyten, Ausbeute an Glomeruli, tubuläre Rückstände und verursachter Zellschaden. Anschließend sollte anhand dieser Kriterien die geeignetste Methode für die Isolation intakter Glomeruli ausgewählt werden. Eine schematische Übersicht über die Durchführung der einzelnen Verfahren gibt Abb. 8.



**Abb. 8 Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der Sieb-, Kollagenase A- und Dynabeads-Methode zur Isolation von Glomeruli.** MPK - magnetischer Partikelkonzentrator

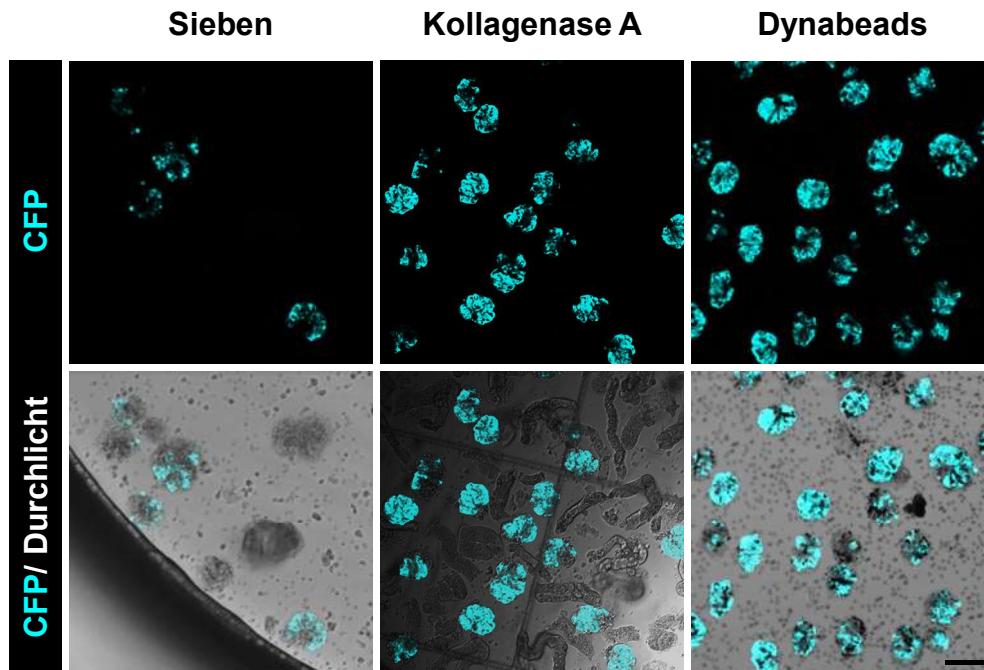
#### 3.1.1. Siebmethode

Die Siebmethode beruht auf dem Einsatz von Sieben unterschiedlicher Maschenweite, die von Glomeruli passiert werden können, jedoch Tubulusfragmente und Debris zurückhalten. Durchschnittlich konnten mit dieser Methode  $183 \pm 37$  Glomeruli je Versuch isoliert werden. Bezogen auf die absolute Anzahl an Glomeruli je Maus, welche sich auf rund 24 000 beläuft<sup>143,144</sup>, entspricht dies einer Ausbeute von 0,8 %.

### 3. Ergebnisse

---

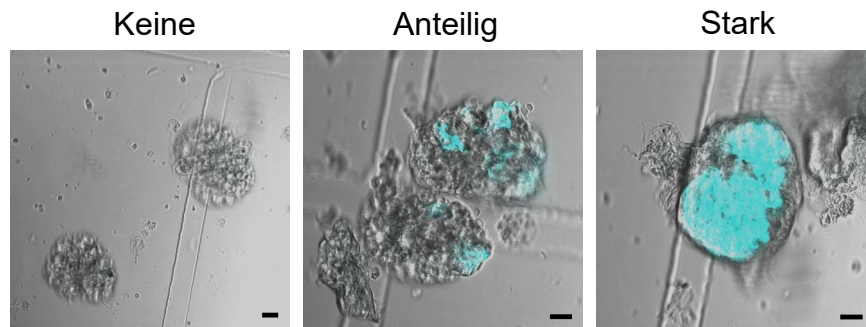
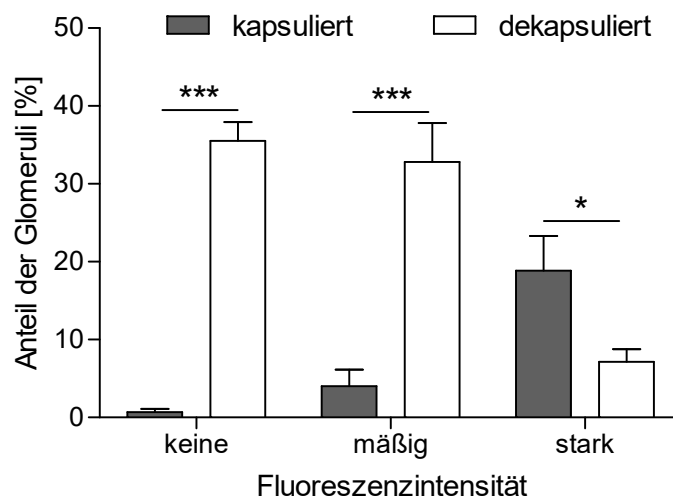
Im Anschluss an die Isolation wurden die Podozyten anhand ihrer spezifischen CFP-Expression mittels LSM dargestellt. Dabei zeigte sich, dass das CFP-Signal der gesiebten Glomeruli stark variierte (Abb. 9, Abb. 10).



**Abb. 9 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der angewandten Isolationsmethode.**

Dargestellt sind die CFP-Fluoreszenz und die Überlagerung mit der dazugehörigen Durchlichtaufnahme. Während CFP in vielen gesiebten Glomeruli nicht oder nur anteilig detektierbar war, wiesen die mittels Kollagenase A und Dynabeads isolierten, meist dekapulierten Glomeruli ein einheitlicheres Fluoreszenzsignal auf. Jedoch war das mit der Kollagenase A-Methode erhaltene Isolat mit vielen tubulären Rückständen kontaminiert, die jedoch durch den Einsatz magnetischer Dynabeads entfernt werden konnten. Messbalken = 100  $\mu\text{m}$

Um eine detaillierte Beurteilung zu ermöglichen, wurden die Glomeruli in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenzintensität und dem Vorhandensein der äußeren Bowman-Kapsel kategorisiert und ausgezählt. Die dafür gewählte Abstufung kann Abb. 10A entnommen werden. Insgesamt wiesen 26 % aller Glomeruli noch ein starkes CFP-Signal auf, während 37 % nur noch anteilig und weitere 36 % gar nicht fluoreszierten. Außerdem zeigte sich, dass stark fluoreszierende Glomeruli signifikant häufiger von der äußeren Bowman-Kapsel umgeben waren, während anteilig oder gar nicht fluoreszierende Glomeruli zumeist dekapuliert vorlagen (Abb. 10B).

**A Einteilung der Fluoreszenzintensität:****B**

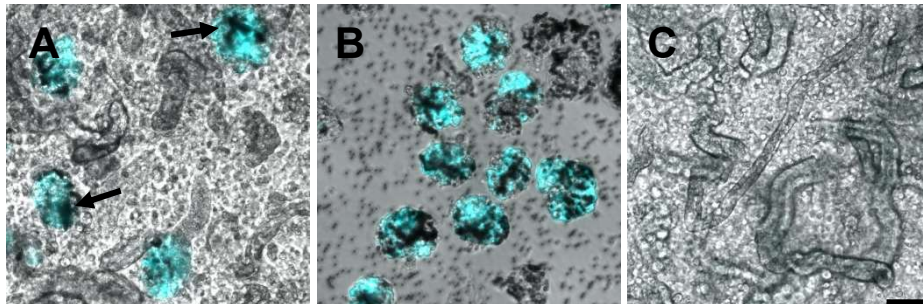
**Abb. 10 Fluoreszenzintensität und Kapsulierung der mittels der Siebmethode erhaltenen Glomeruli.** Direkt im Anschluss an die Isolation wurden die Glomeruli in Abhängigkeit ihres CFP-Signals und der Kapsulierung ausgezählt. **A** Exemplarische Darstellung zur Einteilung der Fluoreszenzintensität der Glomeruli. **B** Nicht oder anteilig fluoreszierende Glomeruli waren zumeist dekapsuliert, während stark fluoreszierende Glomeruli häufiger von der äußeren Bowman Kapsel umgeben waren. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way ANOVA-Test und *post hoc* Bonferroni-Korrektur (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ),  $n = 4$ . Messbalken = 10  $\mu\text{m}$

**3.1.2. Kollagenase A-Methode**

Bei dieser Methode ging dem differentiellen Sieben ein 45-minütiger enzymatischer Verdau des Gewebes mit Kollagenase A voran. Durch diesen zusätzlichen Arbeitsschritt konnte die Ausbeute auf etwa 10 000 Glomeruli je Isolation erhöht werden, was etwa 41 % aller Glomeruli einer Maus entspricht. Die mikroskopische Betrachtung zeigte, dass die Podozyten der dekapsuliert vorliegenden Glomeruli ein einheitliches, starkes CFP-Signal aufwiesen (Abb. 9). Jedoch war das Isolat durch zahlreiche Tubulusfragmente kontaminiert.

#### 3.1.3. Dynabeads-Methode

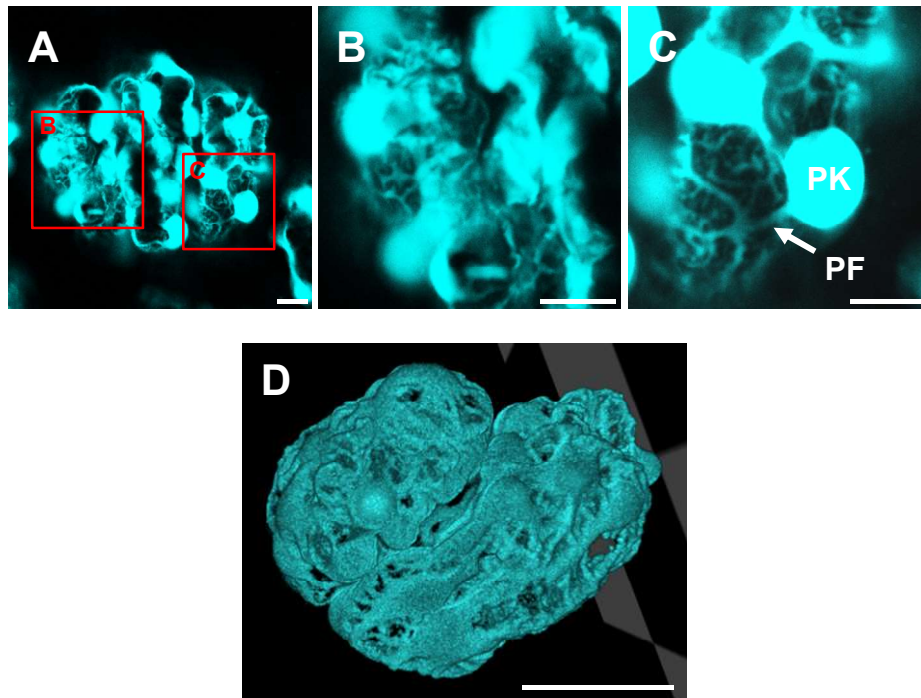
Bei dieser Methode wurden die Mäusenieren mit superparamagnetischen Sphärokolloiden ( $\varnothing$  4,5  $\mu\text{m}$ ) perfundiert, welche gröÙenselektiv in den Kapillaren der *Corpuscula renalia* akkumulieren. Nach einer enzymatisch-mechanischen Desaggregation des Gewebes, wurden die Glomeruli anschließend mit einem magnetischen Partikelkonzentrator (MPK) von verbliebenen Tubulusfragmenten und Geweberesten separiert (Abb. 11).



**Abb. 11 Glomeruli-Isolation mit magnetischen Dynabeads. A–C** Durch die Akkumulation magnetischer Dynabeads (Pfeile) konnten die Glomeruli (B) mit einem magnetischen Partikelkonzentrator aus dem desaggregierten Gewebe (A) separiert werden, während Tubulusfragmente zurückblieben (C). Messbalken = 50  $\mu\text{m}$

Mit der Dynabeads-Methode konnten, ähnlich wie bei der Kollagenase A-Methode, etwa 10 000 Glomeruli pro Isolation gewonnen werden. Allerdings wurde eine tubuläre Kontamination des Isolats durch die zusätzliche magnetische Separation weitestgehend vermieden (Abb. 9, Abb. 11).

Die Podozyten der größtenteils dekapsulierten Glomeruli wiesen bei der Betrachtung mittels LSM eine intakte Fluoreszenz auf. Darüber hinaus waren Podozytenkörper sowie Primärfortsätze deutlich sichtbar (Abb. 12A–C). Eine 3-dimensionale Rekonstruktion eines z-Stacks bestätigte, dass die typische, verzweigte Morphologie der Podozyten auch nach der Isolation erhalten blieb (Abb. 12D).

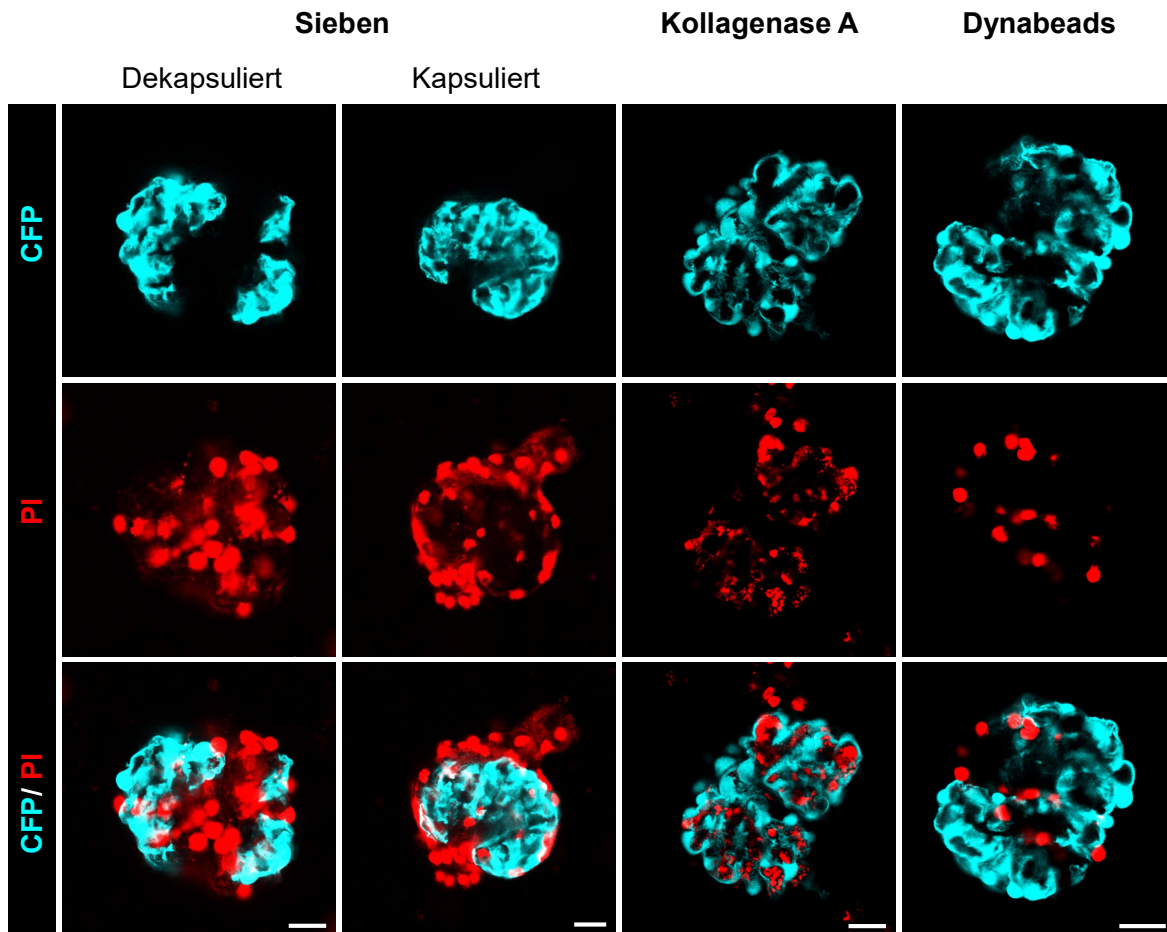


**Abb. 12 Morphologie der mit Dynbeads isolierten Glomeruli.** Die Darstellung der Glomeruli erfolgte im Anschluss an die Isolation mittels LSM. **A–C** Die komplexe, verzweigte Morphologie der Podozyten wurde nicht durch das Isolationsverfahren beeinträchtigt (A). In den vergrößerten Arealen (B, C) konnten die Podozytenkörper (PK) klar von den sich abzweigenden Primärfortsätzen (PF) abgegrenzt werden. **D** Die 3-dimensionale Rekonstruktion eines z-Stacks eines Glomerulus bestätigte die gut erhaltene Morphologie der Podozyten. Messbalken = 50  $\mu\text{m}$  (A, D), 10  $\mu\text{m}$  (B, C)

### 3.1.4. Untersuchung der Zellviabilität isolierter Glomeruli

Um eine durch die verschiedenen Methoden verursachten Schädigung der Glomeruli beurteilen zu können, wurde direkt im Anschluss an die Isolation ein Propidiumiodid (PI)-Assay durchgeführt. Dieser beruht darauf, dass der Phenanthridinfarbstoff PI nur die perforierte Membran beschädigter Zellen passieren kann und so in deren DNA interkaliert. Der DNA-PI-Komplex kann dann mittels Fluoreszenzanregung dargestellt werden.

Unabhängig von der Isolationsmethode zeigte sich, dass keine Kolokalisation CFP-positiver Podozyten und PI-positiver Zellkerne nachweisbar war (Abb. 13).



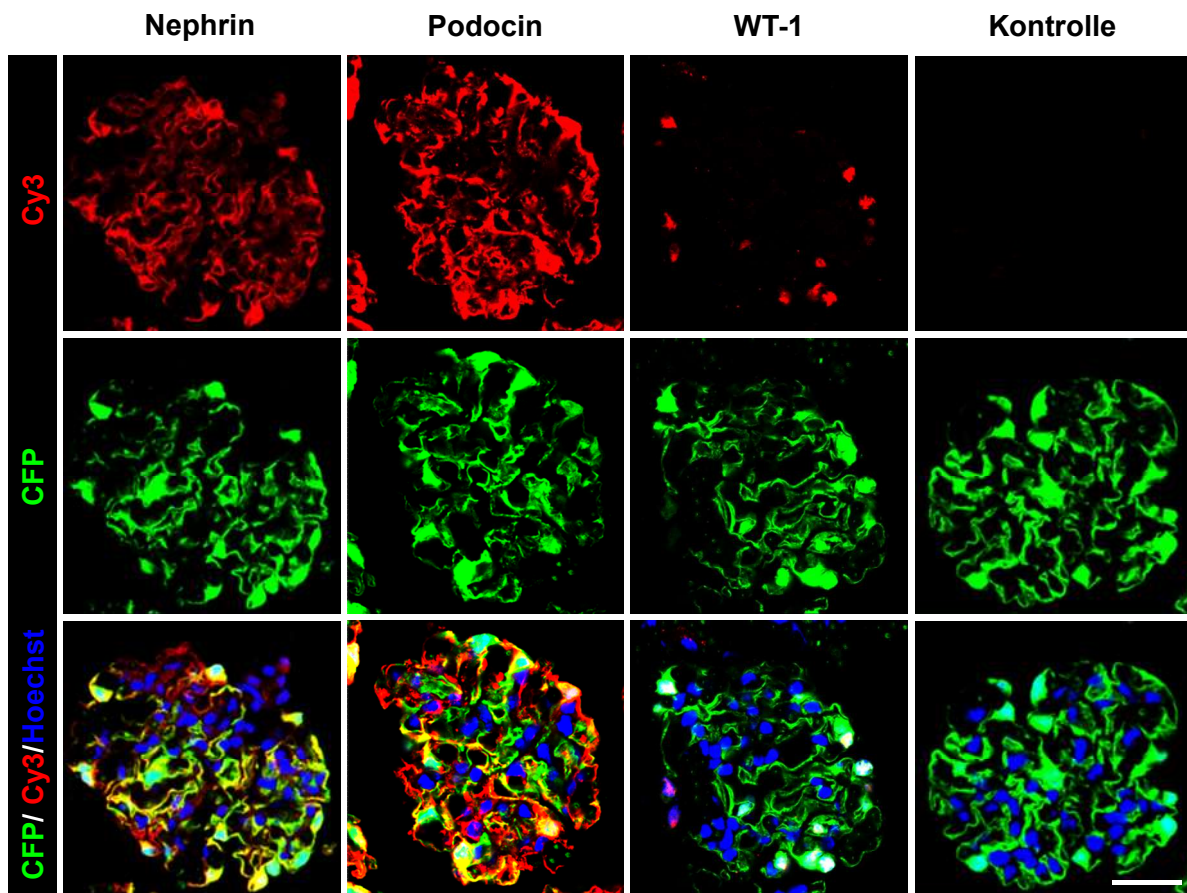
**Abb. 13 Propidiumiodid-Assay zur Untersuchung der Zellviabilität isolierter Glomeruli.** Zum Nachweis geschädigter Zellen wurde das membranimpermeablen Propidiumiodid (PI, rot) verwendet. Es konnte keine Kolokalisation CFP- und PI-positiver Zellen detektiert werden, deren Überlagerung sich als weiße Färbung darstellt. Während in den gesiebten Glomeruli zahlreiche geschädigte Zellen detektiert wurden, war der zelluläre Schaden durch die Kollagenase A- und die Dynabeads-Methode deutlich geringer. Messbalken = 25  $\mu$ m

Die stärksten Schäden wurden in Glomeruli detektiert, welche mittels der Siebmethode isoliert worden waren. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Lokalisation der PI-gefärbten Zellen in Abhängigkeit vom Verbleib der äußeren Bowman-Kapsel. Während in den dekapsulierten Glomeruli diverse glomeruläre Zelltypen durch PI gefärbt waren, beschränkte sich das PI-Signal in den bekapselten Glomeruli hauptsächlich auf die parietalen Epithelzellen der äußeren Bowman-Kapsel und Zellen des Gefäß- und Harnpols. Durch den Einsatz von Kollagenase A konnte die Anzahl geschädigter Zellen im Glomerulus deutlich gesenkt werden. Die Dynabeads-Methode verursachte den geringsten Zellschaden.



### 3.1.5. Nachweis podozytenspezifischer Proteine in isolierten Glomeruli

Da die Dynabeads-Methode eine große Anzahl an Glomeruli mit intakten Podozyten lieferte, sollte geprüft werden, ob die Expression der podozytenspezifischen Proteine Nephrin, Podocin und WT-1 durch das Isolationsverfahren beeinträchtigt wird. Dazu wurden Kryostatschnitte frisch isolierter Glomeruli angefertigt und immunhistochemisch gefärbt (Abb. 14).



**Abb. 14** Immunfluoreszenzfärbung podozytenspezifischer Proteine an Kryostatschnitten von Glomeruli isoliert mit magnetischen Dynabeads. Dargestellt sind die Podozyten-Marker Nephrin, Podocin und WT-1 mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (rot) und die CFP-Fluoreszenz (grün, Falschfarbendarstellung zur besseren Visualisierung der Kolo-kalisation). Eine Überlagerung stellt sich als gelbe Färbung dar. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Die Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin waren in den Fußfortsätzen der Podozyten nachweisbar, während der Transkriptionsfaktor WT-1 in den Zellkernen detektiert wurde. Alle Proteine wiesen eine Kolo-kalisation mit dem podozytenspezifischen CFP auf. Messbalken = 25 µm

In Übereinstimmung mit den zuvor untersuchten Gewebeschnitten von Mäusenieren (Vgl. Abb. 7), wurde der Fluoreszenzreporter CFP in den Zellkörpern, Primär- und Fußfortsätzen der Podozyten isolierter Glomeruli detektiert. Im Bereich der Fußfortsätze war darüber hinaus eine Kollokalisierung mit den Schlitzmembranproteinen Nephrin und Podocin, welche ein intaktes Expressionsmuster aufwiesen, nachweisbar. Der Transkriptionsfaktor WT-1 war in Zellkernen (gefärbt mit Hoechst 33342) zu finden, welche aufgrund der umgebenden CFP-positiven Zellkörper eindeutig Podozyten zugeordnet werden konnten. Zusammenfassend konnte für keines der untersuchten Proteine eine Veränderung der Expression durch das Isolationsverfahren nachgewiesen werden.

#### 3.1.6. Auswahl einer geeigneten Isolationsmethode

Abschließend sollten die untersuchten Methoden noch einmal bezüglich ihrer Ergebnisse gegenübergestellt und die Eignung für weitere Experimente beurteilt werden. Ein entsprechender Überblick über die erzielten Resultate liefert Tab. 11.

**Tab. 11 Überblick über die mit den verschiedenen Isolationsmethoden erzielten Resultate**

	<b>Siebmethode</b>	<b>Kollagenase A-Methode</b>	<b>Dynabeads-Methode</b>
<b>Dauer</b>	0,5 h	1 h	2 h
<b>Ausbeute</b>	+	+++	+++
<b>CFP-Signal</b>	+	+++	+++
<b>Kontamination</b>	++	+++	+
<b>Zellviabilität</b>	+	+++	+++

+ = gering, ++ = mäßig, +++ = hoch

Der Vergleich der drei Methoden zeigt, dass die Dynabeads-Methode die besten Ergebnisse lieferte. So konnte mittels dieses Verfahrens eine hohe Ausbeute an Glomeruli mit intakten Podozyten isoliert werden bei gleichzeitiger Minimierung der tubulären Kontamination. Deswegen wurden alle Glomeruli für weitere Experimente mittels der Dynabeads-Methode gewonnen.



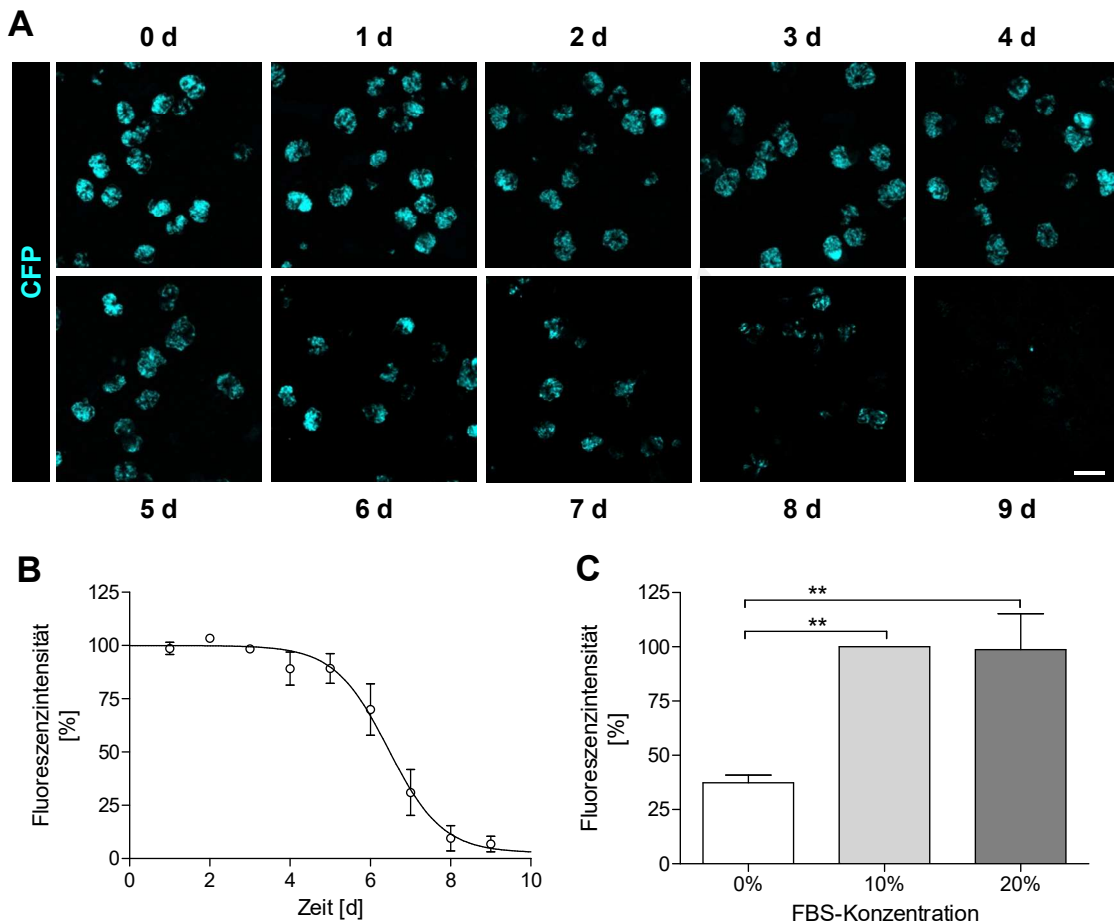
## **3.2. Verringerung der Nephrin-abhängigen CFP-Expression während der Dedifferenzierung von Podozyten**

### **3.2.1. Dedifferenzierung der Podozyten isolierter Glomeruli in Zellkultur**

Die Podozyten isolierter Glomeruli durchlaufen in Zellkultur eine spontane Dedifferenzierung<sup>135,145</sup>, welche mit einem Verlust des Differenzierungsmarkers Nephrin einhergeht. Da der für den GlomAssay verwendete Mausstamm unter der Kontrolle eines Nephrin-Promoter Fragments den Fluoreszenzreporter CFP exprimiert, sollte im Folgenden geprüft werden, ob die CFP-Intensität somit Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der Podozyten zulässt.

Zu diesem Zweck wurde die zeitabhängige Abnahme des CFP-Signals untersucht. Die isolierten Glomeruli wurden in RPMI-1640 kultiviert und alle 24 h erfolgte eine Quantifizierung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität pro Glomerulus (DFG) (Abb. 15A). Die für den jeweiligen Zeitpunkt ermittelte DFG wurde anschließend zur internen Normalisierung auf die DFG nach der Isolation (0 d) bezogen. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz der Podozyten für etwa 5 d konstant blieb, bevor es zu einem fortschreitenden Abfall des CFP-Signals kam. Nach 9 d waren letztlich nur noch 10 % der initialen CFP-Intensität nachweisbar (Abb. 15B).

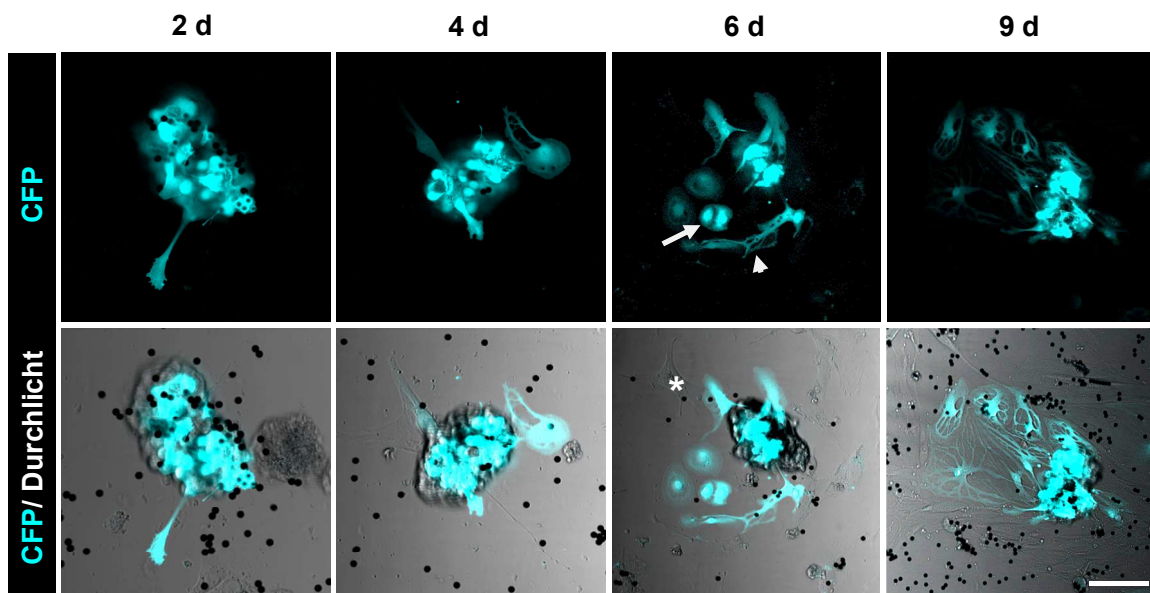
Des Weiteren sollte der Einfluss der FBS-Konzentration auf die Dedifferenzierung der Podozyten in Zellkultur betrachtet werden. Dazu wurden die isolierten Glomeruli mit 0 %, 10 % oder 20 % FBS kultiviert und nach 5 d erfolgte die Quantifizierung der Fluoreszenz. Zur internen Normalisierung wurde die DFG der mit 10 % FBS kultivierten Glomeruli herangezogen. Wie sich zeigte, führte die Erhöhung der FBS-Konzentration auf 20 % zu keinem Anstieg der CFP-Intensität der Glomeruli, während die Kultivierung mit 0 % FBS einen signifikanten Abfall der Fluoreszenzintensität auf  $37 \% \pm 4 \%$  bedingte (Abb. 15C). Folglich erwies sich der Zusatz von 10 % FBS als geeignet, um einen vorzeitigen Abfall des CFP-Signals zu verhindern. Dementsprechend erfolgten alle weiteren Experimente unter Zusatz von 10 % FBS zum Kulturmedium.



**Abb. 15 Zeit- und FBS-abhängiger Abfall der CFP-Intensität kultivierter Glomeruli. A–B** Isolierte Glomeruli wurden in RPMI-1640 Medium mit 10 % FBS kultiviert und die CFP-Intensität alle 24 h quantifiziert. **A** Exemplarisch dargestellt sind summierte z-Stacks isolierter Glomeruli über einen Zeitraum von 9 d. Im Laufe der Kultivierung verringerte sich das Fluoreszenzsignal der einzelnen Glomeruli deutlich. **B** Anhand der CFP-Intensität wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Glomerulus (DFG) berechnet und in Relation zu Tag 0 aufgetragen. Anfänglich verringerte sich die DFG nur geringfügig, fiel dann jedoch ab Tag 5 deutlich ab. **C** Untersucht wurde die Veränderung der DFG bei verschiedenen FBS-Konzentrationen (0 %–20 %) nach 5 d in Kultur. Die Werte wurden auf die 10 % FBS-Kontrolle bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way ANOVA-Test und *post-hoc* Bonferroni-Korrektur (\*\*  $p < 0,01$ ),  $n = 3$ . Messbalken = 100  $\mu$ m

Bereits nach 2-tägiger Kultivierung sowie zu allen späteren Zeitpunkten konnten bei etwa 10 % der Glomeruli auswachsende Podozyten (sog. Primärpodozyten) beobachtet werden (Abb. 16). So wurden neben verzweigten, spindelförmigen auch unverzweigte, „Pflasterstein-ähnliche“ Zellen gefunden. Des Weiteren stellten die Primärpodozyten auch in Bezug auf die CFP-Intensität eine heterogene Population fluoreszierender und nicht

fluoreszierender Zellen dar. Insbesondere Zellen, die sich gänzlich vom Glomerulus lösten und auf dem Substrat adhärirten, wiesen meist kein CFP-Signal mehr auf.

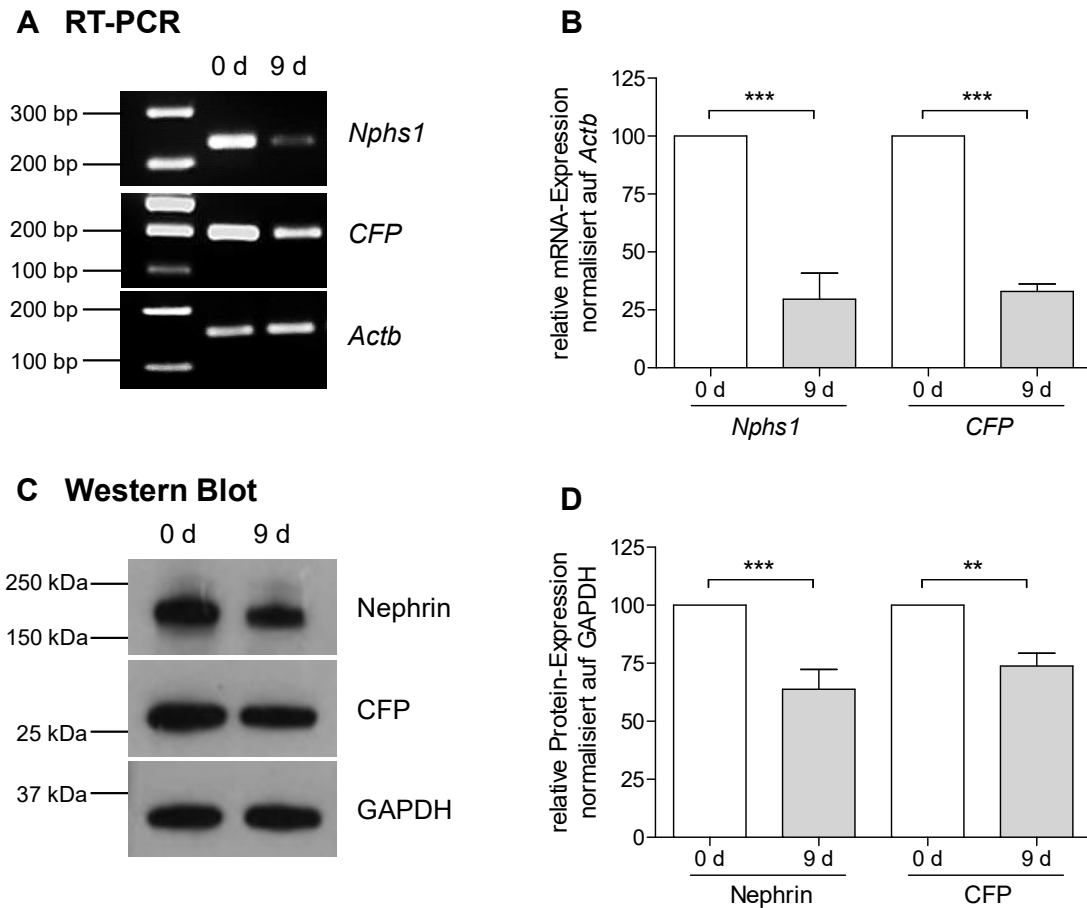


**Abb. 16 Auswachsene Podozyten isolierter Glomeruli.** Dargestellt ist die CFP-Fluoreszenz allein und in Kombination mit dem dazugehörigen Durchlichtbild. Die ersten auswachsenden Podozyten waren nach 2 d in Kultur detektierbar. Phänotypisch konnten sie in spindelartige (Pfeilkopf) und „Pflasterstein-ähnliche“ (Pfeil) Zellen unterteilt werden. Während einige Podozyten noch CFP exprimierten, konnte in einem Großteil der ausgewachsenen Podozyten keine Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden (Asterisk). Messbalken = 25  $\mu$ m

### 3.2.2. Nachweis der abnehmenden Nephrin- und CFP-Expression in kultivierten Glomeruli mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse

Als nächstes sollte mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse verifiziert werden, dass sich die Dynamik der Nephrin-Expression in einer entsprechend veränderten CFP-Expression widerspiegelt. Dazu wurden RNA- und Proteinproben von frisch isolierten und für 9 d kultivierten Glomeruli generiert und untersucht.

Mittels RT-PCR konnte für Nephrin (*Nphs1*) eine spezifische Bande bei 233 bp, für CFP bei 194 bp und für das Referenzgen  $\beta$ -Aktin (*Actb*) bei 153 bp detektiert werden (Abb. 17A). Die *Nphs1*-Expression der für 9 d kultivierten Glomeruli war signifikant auf 30 %  $\pm$  11 % verringert im Vergleich zu den frisch isolierten Glomeruli (Abb. 17B). Diese Abnahme zeigte sich auch für die CFP-Expression, welche nach 9 d signifikant auf 33 %  $\pm$  3 % abfiel. Das Referenzgen *Actb* hingegen zeigte keine Regulation.



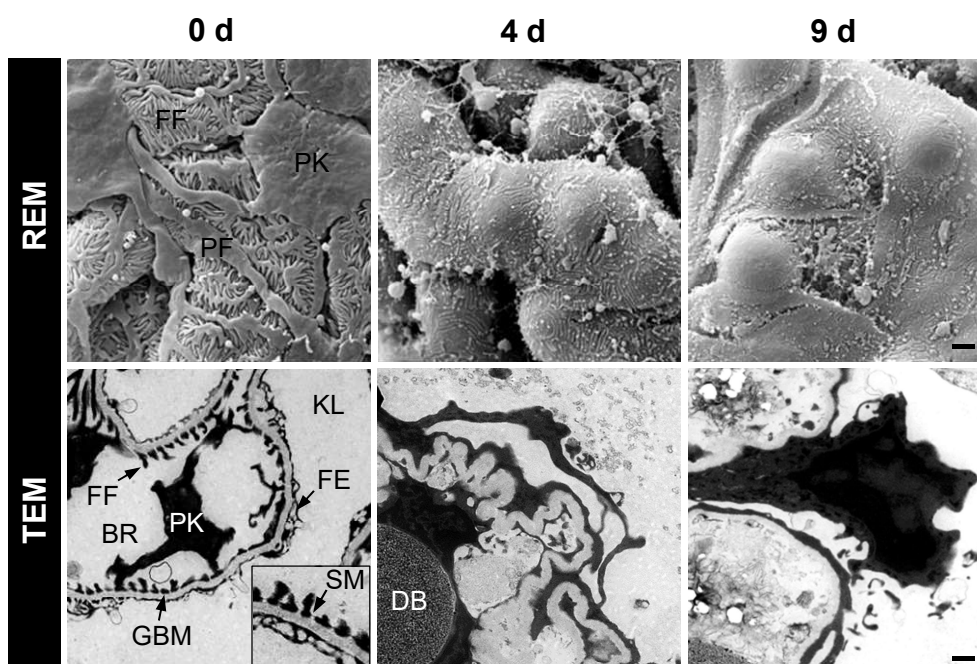
**Abb. 17 Nachweis des zeitabhängigen Abfalls der Nephrin- und CFP-Expression auf mRNA- und Proteinebene.** Verglichen wurde die Nephrin- und CFP-Expression frisch isolierter und 9 d kultivierter Glomeruli. **A** Mittels RT-PCR wurde eine spezifische Nephrin- (*Nphs1*, 233 bp) und *CFP*-Bande (194 bp) detektiert. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Aktin (*Actb*, 153 bp) amplifiziert. **B** Nach 9-tägiger Kultivierung zeigte sich ein signifikanter Abfall der *Nphs1*- und der *CFP*-Expression. **C** Mittels Western Blot wurde eine spezifische Bande für Nephrin (180 kDa) und *CFP* (31 kDa) detektiert. Als Referenzprotein wurde GAPDH herangezogen. **D** Auch auf Proteinebene wurde nach 9-tägiger Kultivierung ein signifikanter Abfall der Nephrin- und *CFP*-Expression nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way ANOVA-Test und *post hoc* Bonferroni-Korrektur (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ),  $n = 3$  (A, B), 4 (C, D)

Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Dabei ergab sich für Nephrin eine spezifische Bande mit einer Größe von 180 kDa und für *CFP* eine Bande bei 31 kDa (Abb. 17C). Als Referenzprotein wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gewählt, welche bei 37 kDa detektiert wurde. Auch anhand der Western Blot-Analyse ließ sich ein signifikanter Abfall der Nephrin-Expression auf  $64 \% \pm 9 \%$  und der *CFP*-Expression auf  $74 \% \pm 6 \%$  nach 9-tägiger Kultivierung belegen (Abb. 17D). Das Referenzprotein GAPDH zeigte zu allen Zeitpunkten eine stabile

Expression. Insgesamt fiel die auf Proteinebene nachweisbare Verringerung der Nephrin- und CFP-Expression geringer aus als auf mRNA-Ebene.

### 3.2.3. Ultrastrukturelle Veränderungen kultivierter Glomeruli über die Zeit

Um die ultrastrukturellen Veränderungen der Glomeruli während der Kultivierung zu beurteilen, wurde die Transmissions- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) genutzt. Dazu wurden Glomeruli nach 0 d, 4 d und 9 d in Zellkultur geerntet, elektronenmikroskopisch aufgearbeitet und dargestellt.



**Abb. 18 Raster (REM)- und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) kultivierter Glomeruli.**

Isolierte Glomeruli wurden nach 0 d, 4 d und 9 d in Kultur elektronenmikroskopisch untersucht. Nach der Isolation waren die interdigitierenden Fußfortsätze, welche von einer Schlitzmembran (Insert) überbrückt wurden, gut erhalten. Nach 4 d jedoch zeigte sich ein Fußfortsatz-Effacement. Das anfänglich gut erhaltene, fenestrierte Endothel war nach 9 d verschwunden. PK - Podozytenkörper, PF - Primärfortsatz, FF - Fußfortsatz, SM - Schlitzmembran, FE - fenestriertes Endothel, GBM - glomeruläre Basalmembran, BR - Bowman-Raum, KL - Kapillarlumen, DB - Dynabead, Messbalken = 2 µm

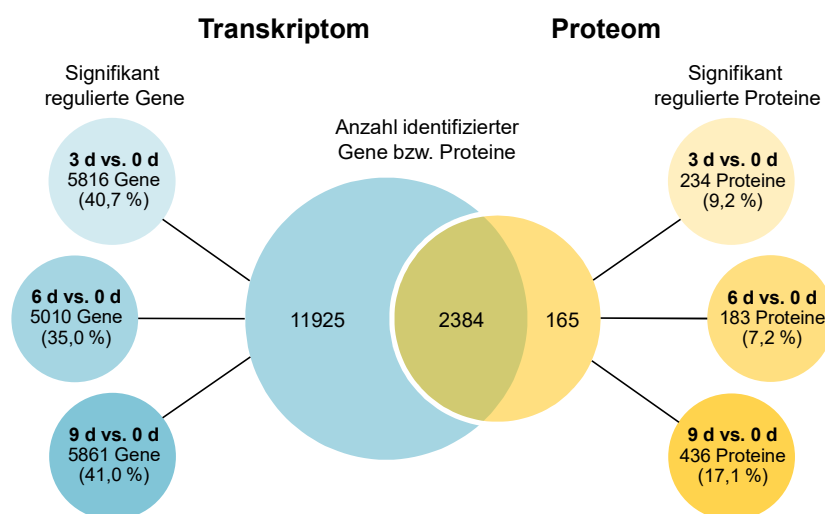
Beide Methoden zeigten, dass die Podozyten der Glomeruli auch nach der Isolation noch eine einwandfreie Ultrastruktur aufwiesen, welche sich durch die interdigitierenden Fußfortsätze auszeichnet (Abb. 18). Darüber hinaus waren die Fußfortsätze benachbarter Podozyten durch eine intakte Schlitzmembran verbunden, welche sich im TEM als dünne Linie darstellte. Die glomeruläre Basalmembran (GBM) wies eine ebene Struktur und

Dicke auf und wurde auf der intravasalen Seite durch ein gut erhaltenes, fenestriertes Endothel bedeckt.

In Kultur war sowohl nach 4 d als auch nach 9 d ein Effacement der Podozyten-Fußfortsätze sichtbar. Dieses manifestierte sich morphologisch in einer Abflachung und Verbreiterung der Fußfortsätze sowie einem Verlust der Schlitzmembran. Darüber hinaus wies die GBM strukturelle Unregelmäßigkeiten auf. Auch das anfänglich gut erhaltene Endothel war nach 9-tägiger Kultivierung vollständig verschwunden.

### 3.3. Zeitabhängige Veränderungen des Transkriptoms und Proteoms von Glomeruli in Zellkultur

Um tiefere Einblicke in den Prozess der Podozytendifferenzierung zu erhalten, wurde eine Transkriptom- und Proteomanalyse durchgeführt. Dazu wurden RNA- und Proteinproben isolierter Glomeruli gewonnen, welche für 0 d, 3 d, 6 d und 9 d kultiviert wurden. Anschließend wurde das Transkriptom mit Hilfe des Next Generation Sequencing (NGS) und das Proteom mittels UPLC-MS/MS-Analyse untersucht.



**Abb. 19 Ergebnisse der Transkriptom- und Proteomanalyse.** Untersucht wurde das Transkriptom und Proteom von Glomeruli nach 0 d, 3 d, 6 d und 9 d in Kultur. Von den 14309 identifizierten Genen und den 2549 detektierten Proteinen konnten 2384 Gene/Proteine mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Über die Zeit waren zwischen 35,0 %–41,0 % der Gene und 7,2 %–17,1 % der Proteine signifikant gegenüber Tag 0 reguliert.

Insgesamt konnten 14309 transkribierte Gene und 2549 Proteine identifiziert werden, von welchen 2384 sowohl im Transkriptom als auch im Proteom nachweisbar waren (Abb. 19). Ein Vergleich der Tage 3, 6 und 9 zu Tag 0 zeigte, dass der Anteil signifikant regulierter

Gene mit 35,0 %–41,0 % deutlich höher war als der Anteil signifikant regulierten Proteine, welcher zwischen 7,2 %–17,1 % lag.

### 3.3.1. Analyse podozytenrelevanter Gene und Proteine

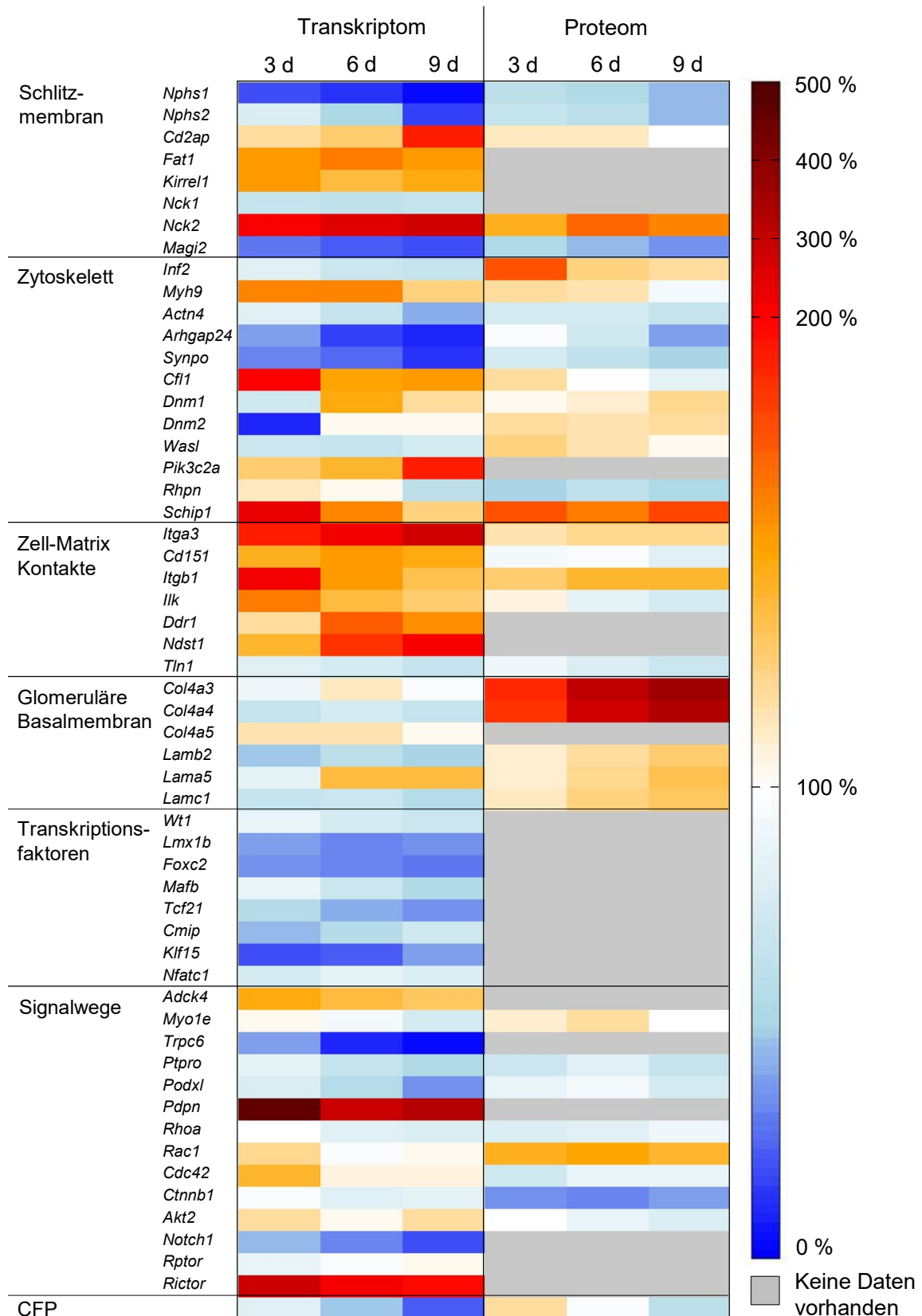
Um die Veränderung der Podozyten in Zellkultur beurteilen zu können, wurden ausgewählte Gene bzw. Proteine betrachtet, welche für den Podozyten funktionell relevant und teils spezifisch sind (Vgl. 7.2.). Die Marker wurden zunächst aufgrund ihrer Lokalisation und/oder Funktion verschiedenen Kategorien zugeteilt (bspw. Schlitzmembran, Zytoskelett, Zell-Matrix-Kontakte). Anschließend wurde dann die relative Expression der Gene bzw. Proteine nach 3-, 6- und 9-tägiger Kultivierung im Vergleich zu Tag 0 (als 100 % definiert) ermittelt und als Heatmap visualisiert (Abb. 20). Von den insgesamt 55 ausgewählten Markern waren alle im Transkriptom nachweisbar, aber nur 35 Gene konnten zusätzlich auch im Proteom detektiert werden.

Alle aufgeführten Schlitzmembranproteine sind (mit Ausnahme des NCK1 und NCK2) innerhalb der Niere podozytenspezifisch. Wie schon bereits zuvor mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse demonstriert werden konnte, zeigte sich auch in der Transkriptom- und Proteomanalyse ein zeitabhängiger Abfall der Nephrin (*Nphs1*)- und CFP-Expression. Die Regulation fiel auf RNA-Ebene stärker aus als auf Proteinebene (Vgl. 3.2.2). Des Weiteren war auch für die Schlitzmembranproteine Podocin (*Nphs2*) und MAGI-2 ein gradueller Expressionsabfall nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurden CD2AP, FAT-1, NCK1 und NEPH-1 (*Kirrel1*) vermehrt exprimiert.

Von den Zytoskelett-assoziierten Markern waren Arhgap24 und Synaptopodin (*Synpo*) am stärksten herunter und Myh9, Cofilin-1 (*Cfl1*), Pik3c2a sowie Schip1 am stärksten hochreguliert.

Die Komponenten der Zell-Matrix-Kontakte wurden alle mit Ausnahme von Talin-1 (*Tln1*) gegenüber dem Isolationszeitpunkt vermehrt exprimiert. Ein ähnliches Muster zeigt sich auch für die Bestandteile der glomerulären Basalmembran, deren Expression insbesondere auf Proteinebene deutlich anstieg. Dabei wiesen vor allem das Alpha-3-Typ-IV-Kollagen (*Col4a3*) und Alpha-4-Typ-IV-Kollagen (*Col4a4*), welche ebenso wie das Alpha-5-Typ-IV-Kollagen (*Col4a5*) spezifisch von den Podozyten gebildet werden, eine Erhöhung der Proteinmenge um das 3,5-fache auf. Die RNA-Expression hingegen war nur geringfügig verändert.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 20 Heatmap podozytenrelevanter Gene und Proteine.** Dargestellt ist die glomeruläre Expression ausgewählter Gene und Proteine, welche funktionelle Relevanz für den Podozyten besitzen, nach 3-, 6- und 9-tägiger Kultivierung im Vergleich zu Tag 0 (auf 100 % gesetzt). Den stärksten Abfall auf mRNA- und Proteinebene zeigten die Schlitzmembranproteine Nephrin (*Nphs1*),



Podocin (*Nphs2*) und MAGI-2 sowie die Zytoskelett-assoziierten Proteine Arhgap24 und Synaptopodin (*Synpo*). Dementgegen waren mit Ausnahme von Talin-1 (*Tln1*) die Komponenten der Zell-Matrix-Kontakte sowie das Schlitzmembran-assoziierte Protein NCK2 und das Zytoskelett-regulierende Schip1 deutlich hochreguliert. Dargestellt sind Mittelwerte, n = 3.

Alle ausgewählten Transkriptionsfaktoren waren in der Transkriptomanalyse detektierbar und zeigten einen zeitabhängigen Abfall des Expressionsniveaus. Auf Proteinebene hingegen konnte keiner der Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

Eine sehr heterogene Regulation zeigte sich für die Gene bzw. Proteine, welche Bestandteil verschiedener zellulärer Signalwege sind. So wurden bspw. das podozytenspezifische Podoplanin (*Pdpn*) sowie das Gen *Rictor* während der Kultivierung vermehrt exprimiert. Die ebenfalls podozytenspezifischen Marker PTPRO und Podocalyxin (*Podxl*) als auch die nicht podozytenspezifischen Gene *Trpc6* und *Notch1* hingegen zeigten eine verringerte Expression. Alle weiteren untersuchten Gene bzw. Proteine wurden über die Zeit nur schwach reguliert.

### 3.3.2. Analyse charakteristischer Gene und Proteine verschiedener renaler Zelltypen

Des Weiteren sollte die zeitabhängige Veränderung weiterer renaler Zelltypen betrachtet werden. Dabei waren insbesondere Mesangium- und Endothelzellen von Interesse, die neben den Podozyten am Aufbau des Glomerulus beteiligt sind, aber auch parietale Epithel- und Tubuluszellen, welche als Verunreinigung in der Probe verblieben sein können. Für die verschiedenen Zelltypen wurden spezifische Marker ausgewählt und deren relative Expression bezogen auf Tag 0 (entspricht 100 %) in einer Heatmap dargestellt (Abb. 21).

Alle untersuchten Mesangium-Marker wiesen nach 9-tägiger Kultivierung ein geringeres Expressionsniveau auf als zum Isolationszeitpunkt. Lediglich für *Acta2* und *Pdgfra* konnte nach 3 d und 6 d ein initialer Anstieg der Expression beobachtet werden, welcher jedoch nach 9 d nicht mehr nachweisbar war.

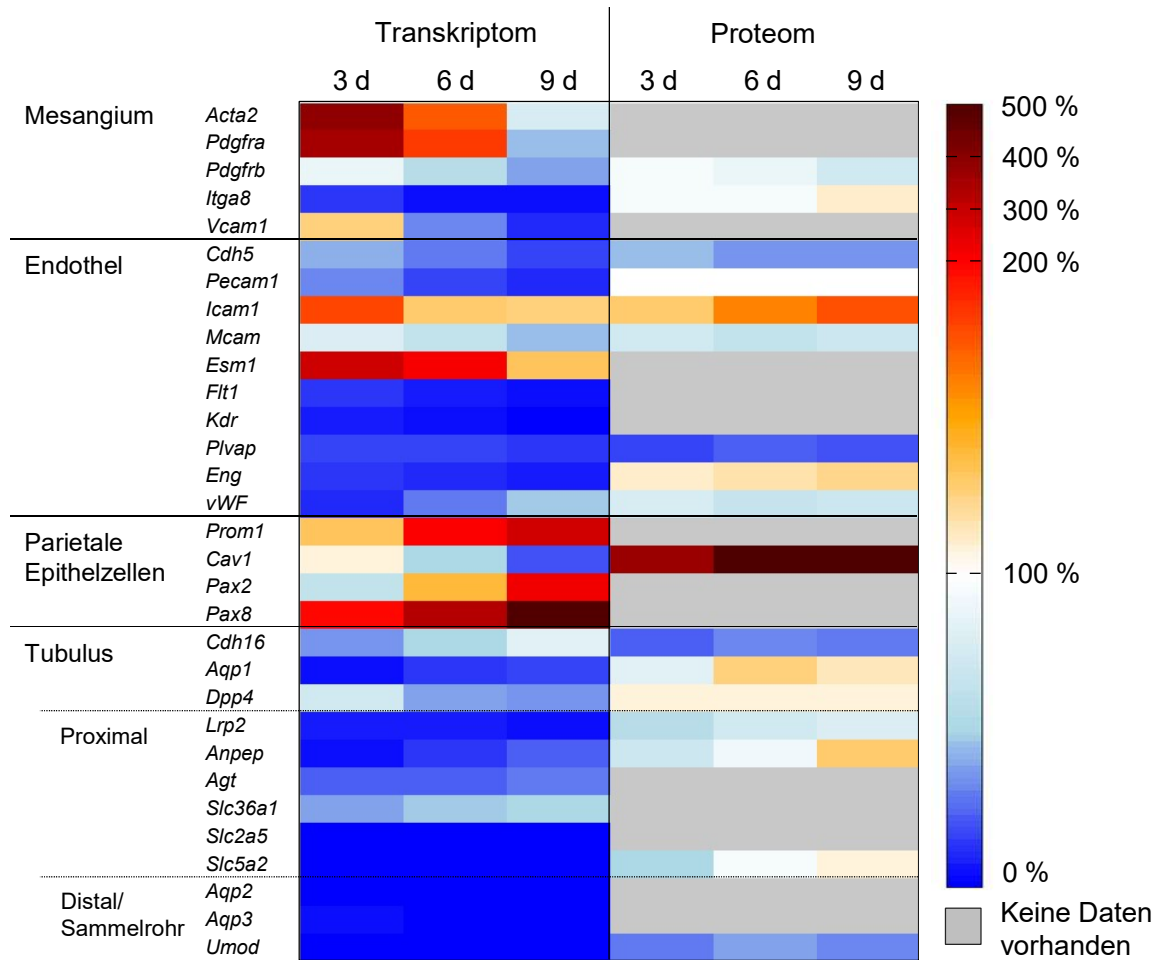
Eine ähnliche Tendenz zeigte sich darüber hinaus auch für die endothelspezifischen Gene bzw. Proteine, deren Expression mit Ausnahme von *Icam1* und *Esm1* bereits nach 3 d in Kultur stark abfiel.

Die für parietale Epithelzellen typischen Gene *Prom1*, *Pax2* und *Pax8* zeigten über die Zeit eine ansteigende Expression. Lediglich die *Cav1*-mRNA-Expression sank nach 9-tägiger Kultivierung auf 19 % ± 3 %, während die Proteinexpression hingegen deutlich erhöht war.

Des Weiteren wurden ausgewählte Tubulusmarker betrachtet, welche teils ubiquitär im Tubulussystem exprimiert werden oder spezifisch dem proximalen Tubulus bzw. dem

### 3. Ergebnisse

distalen Tubulus und dem Sammelrohr zugeordnet werden können. Unabhängig von ihrer Lokalisation war für alle Gene ein drastischer Abfall im Transkriptom nachweisbar. Die Regulation auf Proteinebene war hingegen deutlich geringer.



**Abb. 21 Heatmap charakteristischer Gene und Proteine renaler Zelltypen.** Dargestellt ist die Expression zelltypischer Markergene/-proteine über die Zeit. Das Expressionsniveau in frisch isolierten Glomeruli entspricht 100 %. Während die meisten Mesangium-, Endothel- und Tubulusmarker über die Zeit stark herunter reguliert wurden, stieg die Expression der für parietale Epithelzellen typischen Gene/Proteine deutlich an. Dargestellt sind Mittelwerte, n = 3.

#### 3.3.3. Bioinformatische Analyse des Proteoms

Die bioinformatische Auswertung der Proteomdaten wurde mit DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatic Resources 6.7 durchgeführt. Für die Vergleiche wurde jeweils die Proteinexpression nach 3-, 6- und 9-tägiger Kultivierung gegenüber Tag 0 betrachtet. Dabei wurden nur die Proteine in die Analyse mit einbezogen, welche im Vergleich zum Tag 0 um mindestens 50 % reguliert waren und einen  $q$ -Wert  $< 0,05$  erreichten. Diese Kriterien erfüllten an Tag 3 181 Proteine,

an Tag 6 158 Proteine und an Tag 9 363 Proteine (Tab. 12). Folglich waren zwischen 6 und 14 % aller 2549 identifizierten Proteine signifikant um mindestens 50 % reguliert.

Die selektierten Proteine wurden dann mit Hilfe des "DAVID Gene Functional Annotation"-Tools funktionell annotiert und verschiedenen biologischen Kategorien zugeordnet. Anschließend wurden anhand von funktionellen Annotations-Tabellen die am stärksten überrepräsentierten, biologischen Funktionen identifiziert. Das Ausmaß der Anreicherung kann anhand der Höhe des Anreicherungsfaktors (AF) bewertet werden, welcher jeder biologischen Funktion zugeordnet wurde. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde mittels des exakten Fisher-Tests und multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg ein  $q$ -Wert berechnet. Alle biologischen Funktionen, welche einen  $AF \geq 1,5$  und einen  $q$ -Wert  $< 0,05$  erreichten, wurden als überrepräsentiert betrachtet. Nach 3 d konnten insgesamt 132, nach 6 d 105 und nach 9 d 271 überrepräsentierte, biologische Funktionen identifiziert werden.

**Tab. 12 Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung der Proteomdaten mit DAVID Bioinformatic Resources 6.7.**

	3 d vs. 0 d	6 d vs. 0 d	9 d vs. 0 d
<b>Um 50 % regulierte Proteine (<math>q &lt; 0,05</math>)</b>	181	158	363
<b>Mit DAVID annotierte Proteine</b>	173	153	351
<b>Überrepräsentierte, biologische Funktionen</b>	132	105	271
<b>Funktionelle Annotations-Cluster</b>	9	12	25

Um die relevanten biologischen Prozesse noch weiter eingrenzen zu können, wurden funktionelle Annotations-Cluster (FACI) erstellt, welche Gruppen ähnlicher Annotation basierend auf ihren co-assoziierten Proteinen zusammenfassen. Alle Cluster, die einen  $AF \geq 1,5$  aufwiesen, wurden in die Auswertung mit einbezogen. Im Vergleich zu Tag 0 konnten nach 3 d insgesamt 9 FACI, nach 6 d 12 FACI und nach 9 d 25 FACI identifiziert werden. Alle Cluster sowie die dazugehörigen Annotationen können dem Anhang 7.3. entnommen werden. Darüber hinaus bietet Tab. 13 einen Überblick über die 10 Cluster, welche zu den jeweiligen Zeitpunkten den höchsten AF aufwiesen.

Insbesondere Cluster, die mit Ribosomen, der Proteinsynthese und metabolischen Prozessen assoziiert waren, erreichten zu allen Zeitpunkten einen hohen AF. Nach 6- und 9-tägiger Kultivierung waren darüber hinaus FACI wie "LIM-Domänen", "Aktin-Organisation" und "Aktin-Zytoskelett" angereichert. Des Weiteren konnten nach 9 d FACI identifiziert werden, die mit Prozessen wie Zellverbindungen und Zelladhäsion in Verbindung stehen.

**Tab. 13 Identifikation funktioneller Annotations-Cluster mit DAVID Bioinformatic Resources 6.7.** Dargestellt sind die 10 funktionellen Annotations-Cluster (FACI), welche jeweils nach 3 d, 6 d und 9 d (verglichen mit Tag 0) den höchsten Anreicherungsfaktor (AF) erreichten. Zur Vereinfachung wurden die zu einem Cluster zugehörigen Annotationen unter einem thematischen Oberbegriff zusammengefasst.

	3 d vs. 0 d		6 d vs. 0 d		9 d vs. 0 d	
	FACI	AF	FACI	AF	FACI	AF
<b>1</b>	Ribosomen	14,94	Ribosomen	12,72	Ribosomen	17,28
<b>2</b>	Mitochondrien	2,99	Ribosomale Untereinheiten	3,67	LIM-Domänen	6,22
<b>3</b>	Proteinsynthese	2,71	LIM-Domänen	2,89	Zellverbindungen	5,03
<b>4</b>	Metabolische Prozesse	2,64	rRNA	2,46	Proteinsynthese	4,40
<b>5</b>	Elektronentransport	1,71	Proteinsynthese	1,99	Vesikel	4,18
<b>6</b>	Mitochondriales Lumen	1,70	Aktin-Organisation	1,99	Endoplasmatisches Retikulum	3,95
<b>7</b>	Lipidmetabolismus	1,67	Thrombospondin 1	1,64	Aktin-Zytoskelett	3,28
<b>8</b>	Aerobe Energiegewinnung	1,64	Aktin-Zytoskelett	1,61	Metabolische Prozesse	2,89
<b>9</b>	Glutathion S-Transferasen	1,51	Metabolische Prozesse	1,59	Aktin-Organisation	2,77
<b>10</b>			Oxidoreduktasen	1,59	Lysosomen	2,58

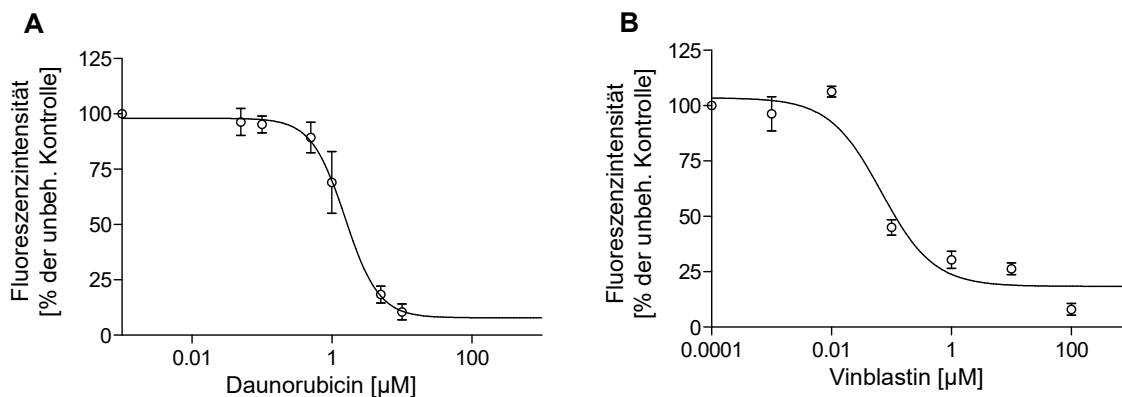
### 3.4. Modulation der CFP-Intensität durch Pharmaka

Durch die nachfolgenden Experimente sollte die Veränderung der CFP-Dynamik unter dem Einfluss verschiedener Substanzen untersucht und die Eignung des GlomAssays als Screening-Verfahren belegt werden.

#### 3.4.1. Inkubation der Glomeruli mit Daunorubicin und Vinblastin

Die Substanzen Daunorubicin und Vinblastin wurden gewählt, da sie zur Induktion von Podozytenschäden in Tiermodellen genutzt werden<sup>146–148</sup>.

Dazu wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (Daunorubicin 0,05–10  $\mu\text{M}$ , Vinblastin 0,001–100  $\mu\text{M}$ ) direkt nach der Isolation dem Kulturmedium beigefügt und so für den gesamten Zeitraum des Experiments belassen. Anschließend wurde nach 6 d in Kultur die DFG bestimmt und auf die jeweils mitgeführte, unbehandelte Lösungsmittel-Kontrolle normalisiert.



**Abb. 22 Abfall der CFP-Intensität nach 6-tägiger Inkubation der Glomeruli mit Daunorubicin und Vinblastin.** Dargestellt ist die CFP-Intensität der behandelten Glomeruli im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle nach 6 d. Beide Substanzen führten zu einer konzentrationsabhängigen Senkung des CFP-Signals. Für Daunorubicin (**A**, 0,05–10  $\mu\text{M}$ ) ergab sich eine  $\text{IC}_{50}$  von 1,55  $\mu\text{M}$  und für Vinblastin (**B**, 0,001–100  $\mu\text{M}$ ) von 87,82 nM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

Wie sich zeigte, beschleunigten beide untersuchten Substanzen konzentrationsabhängig den Abfall der CFP-Intensität nach 6 d (Abb. 22). Aus den erhaltenen Dosis-Wirkungskurven wurde die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) bestimmt. Für Daunorubicin wurde eine  $\text{IC}_{50}$  von 1,55  $\mu\text{M}$  und für Vinblastin von 87,82 nM ermittelt.

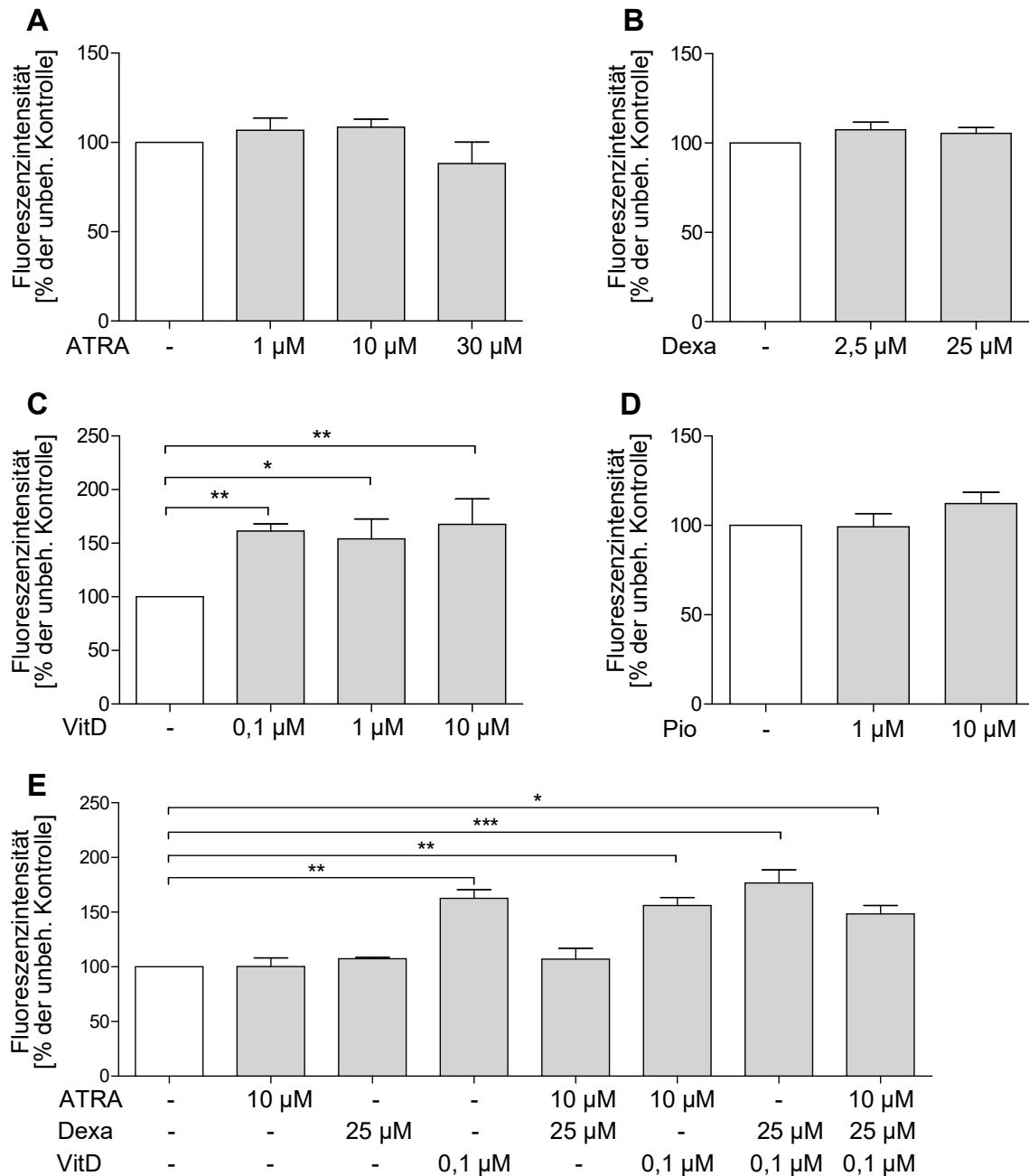
#### 3.4.2. Inkubation der Glomeruli mit Dexamethason, all-trans-Retinsäure, 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> und Pioglitazon

Anhand muriner Reporter-Zelllinien, welche durch eine stabile Transfektion immortalisierter, muriner Podozyten generiert wurden, konnten Yamauchi *et al.* 2008 die Substanzen Dexamethason (Dexa), all-trans-Retinsäure (ATRA) und 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (im Folgenden nur als Vitamin D bezeichnet, VitD) als Aktivatoren des Nephripromoters identifizieren<sup>132</sup>. In den folgenden Experimenten sollte deswegen untersucht werden, ob eine Inkubation der isolierten Glomeruli mit Dexamethason, ATRA und Vitamin D (zusammen als VRAD-Komponenten bezeichnet) im GlomAssay zu einer Steigerung der Nephrin-abhängigen CFP-Expression der Podozyten führt. Als weiterer potentieller Differenzierungs-Induktor wurde außerdem der PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon (Pio) untersucht, für welchen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein protektiver Effekt auf geschädigte Podozyten nachgewiesen wurde<sup>149,150</sup>.

Die Glomeruli wurden für 6 d mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen (ATRA 1–30  $\mu$ M, Dexamethason 2,5–25  $\mu$ M, Vitamin D 0,1–10  $\mu$ M, Pioglitazon 1–10  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend wurde die DFG ermittelt und auf eine unbehandelte Lösungsmittel-Kontrolle normalisiert (Abb. 23).

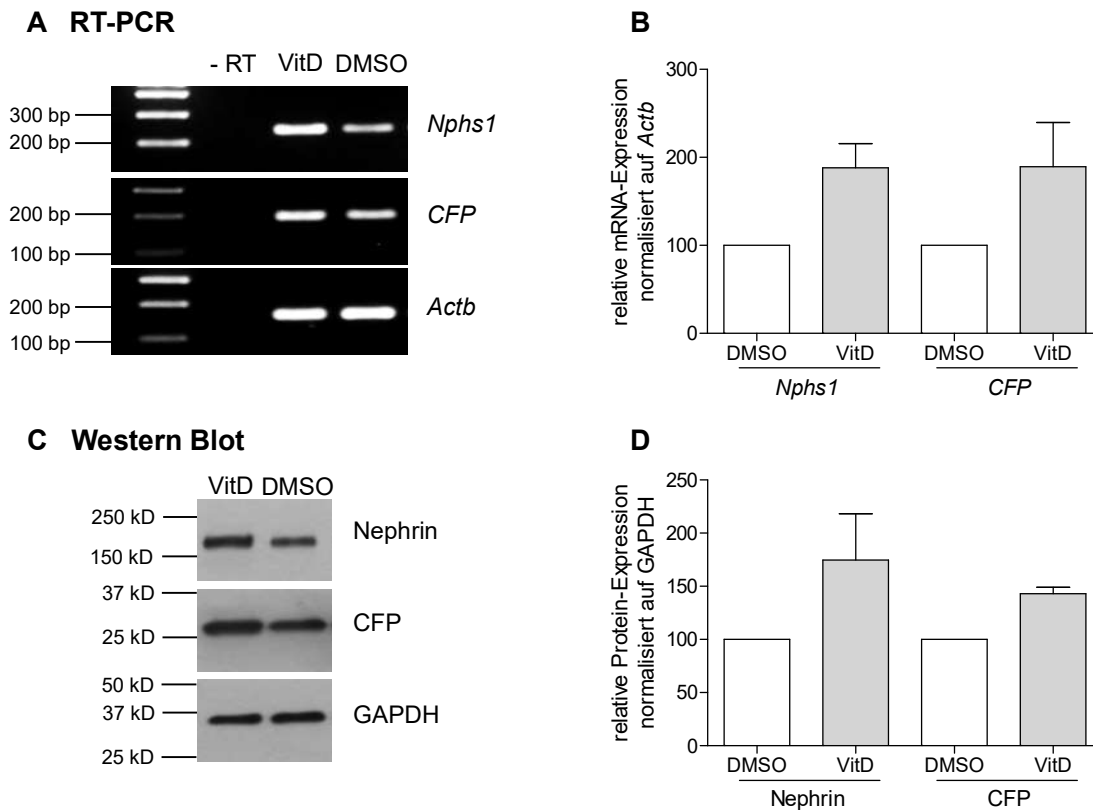
Für ATRA, Dexamethason und Pioglitazon konnte in den untersuchten Konzentrationsbereichen kein Einfluss auf die CFP-Intensität nachgewiesen werden (Abb. 23A, B, D), während die Inkubation der Glomeruli mit Vitamin D zu einem signifikanten Anstieg der CFP-Intensität führte (Abb. 23C). Bereits bei einer Konzentration von 100 nM war das CFP-Signal auf 161 %  $\pm$  7 % erhöht. Dieser Effekt zeigte sich auch bei höheren Dosierungen, konnte jedoch nicht weiter gesteigert werden.

Der Anstieg der Nephrin- und CFP-Expression nach 6-tägiger Inkubation mit 100 nM Vitamin D wurde außerdem mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse verifiziert. Wie bereits zuvor unter 3.2.2. beschrieben, konnte mit Hilfe der RT-PCR und nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese eine spezifische Bande für Nephrin (*Nphs1*, 233 bp), CFP (194 bp) und das Referenzgen  $\beta$ -Aktin (*Actb*, 153 bp) detektiert werden (Abb. 24A). Die *Nphs1*-Expression stieg nach 6-tägiger Vitamin D-Behandlung auf 188 %  $\pm$  28 % und die CFP-Expression auf 189 %  $\pm$  50 % an, während *Actb* nicht reguliert war (Abb. 24B). Auch im Western Blot konnten Nephrin (180 kDa), CFP (31 kDa) und das Referenzprotein GAPDH (37 kDa) spezifisch detektiert werden (Abb. 24C). Übereinstimmend mit den Befunden auf mRNA-Ebene, wurde Nephrin nach 6-tägiger Inkubation mit Vitamin D verstärkt exprimiert (Anstieg auf 174 %  $\pm$  44 %) ebenso wie CFP (Anstieg auf 143 %  $\pm$  6 %) (Abb. 24D).



**Abb. 23 Untersuchungen zum Einfluss von ATRA, Dexamethason, Vitamin D und Pioglitazon auf die CFP-Expression der Podozyten.** Nach 6-tägiger Inkubation der Glomeruli wurde die DFG quantifiziert und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. **A–D** Während für ATRA (A, 1–30  $\mu\text{M}$ ), Dexamethason (B, 2,5–25  $\mu\text{M}$ ) und Pioglitazon (D, 1–10  $\mu\text{M}$ ) kein Einfluss auf die CFP-Expression nachgewiesen werden konnte, war die Fluoreszenzintensität unter dem Einfluss von Vitamin D (C, 0,1–10  $\mu\text{M}$ ) signifikant erhöht. **E** Der protektive Effekt des Vitamin D konnte durch Koinkubation mit Dexamethason und/oder ATRA nicht weiter gesteigert werden. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way ANOVA-Test und *post hoc* Bonferroni-Korrektur (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ),  $n = 6$  (A, C), 5 (B, D), 3 (E).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 24 Anstieg der Neph1- und CFP-Expression nach Vitamin D-Behandlung.** Die Glomeruli wurden für 6 d mit 100 nM Vitamin D bzw. 1 % DMSO behandelt. **A** Nachweis der Neph1 (*Nphs1*)- und *CFP*-Expression sowie des Referenzgens  $\beta$ -Aktin (*Actb*) mittels RT-PCR. **B** Sowohl die *Nphs1* als auch die *CFP*-Expression stieg im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle an. **C** Detektion von Neph1, CFP und dem Referenzprotein GAPDH im Western Blot. **D** Auch auf Proteinebene war eine erhöhte Neph1 und CFP-Expression nachweisbar. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way ANOVA-Test und *post hoc* Bonferroni-Korrektur, n = 3 (A–B), 4 (C–D).

In ihrer Publikation postulieren Yamauchi *et al.* darüber hinaus, dass die Kombination von ATRA, Dexamethason und Vitamin D zu einer synergistischen Wirkerrhöhung führt. Deswegen sollte untersucht werden, ob sich dieser Befund auch anhand des GlomAssays belegen lässt. Dazu wurden die isolierten Glomeruli erneut für 6 d mit ATRA (10  $\mu$ M), Dexamethason (25  $\mu$ M) und Vitamin D (100 nM) alleine als auch mit allen möglichen Kombinationen der Substanzen inkubiert (Abb. 23E).

Wie schon bereits in den vorhergehenden Experimenten demonstriert wurde, führte die Inkubation der Glomeruli mit Vitamin D alleine zu einem signifikanten Anstieg der CFP-Intensität, während unter dem Einfluss von ATRA und Dexamethason keine Veränderungen beobachtet werden konnten. Anhand der Koinkubationsuntersuchungen zeigte sich, dass der Effekt des Vitamin D weder durch Koadministration von Dexamethason

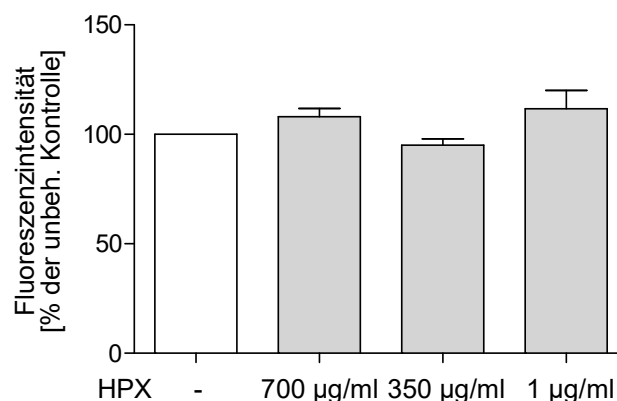


noch von ATRA gesteigert werden konnte. Auch die Kombination aller drei Substanzen führte zu keinem synergistischen Effekt über die Einzelwirkung des Vitamin D hinaus.

### 3.4.3. Untersuchungen zur Wirkung von Hämopexin

Im Jahr 2005 gelang es Bakker *et al.* eine erhöhte Aktivität des Glykoproteins Hämopexin im Serum von Patienten nachzuweisen, welche an einer Minimal-Change-Glomerulopathie (MCGP) erkrankt waren und einen Rückfall erlitten hatten<sup>151</sup>. In einer weiteren Studie demonstrierten sie außerdem anhand von Ratten, dass eine unilaterale renale Perfusion mit rekombinantem Hämopexin zu einem Krankheitsbild führt, welches Charakteristika der MCGP aufwies<sup>152</sup>. Folglich sollte untersucht werden, ob Hämopexin möglicherweise die Dedifferenzierung von Podozyten kultivierter Glomeruli beeinflusst.

Dazu wurden diese für 6 d mit 1–700 µg/ml Hämopexin behandelt und anschließend die DFG bestimmt. Wie sich zeigte, hatte Hämopexin in dem untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die DFG (Abb. 25).



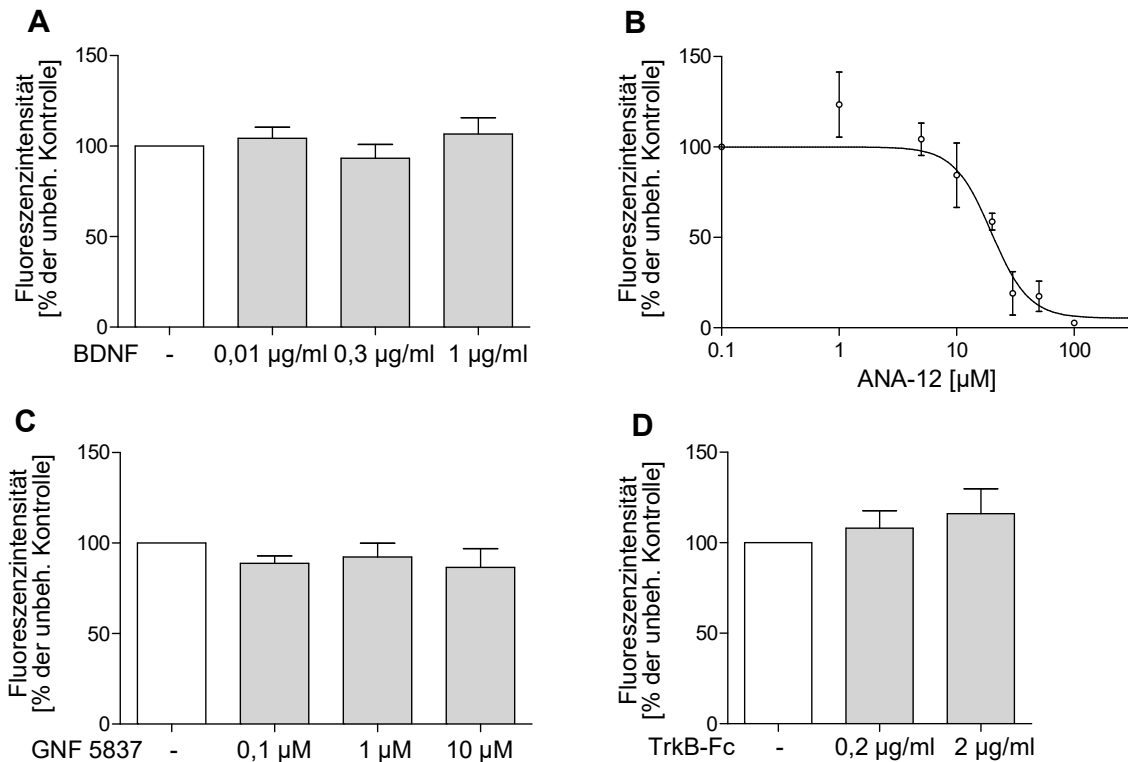
**Abb. 25 Behandlung der Glomeruli mit Hämopexin.** Die Glomeruli wurden für 6 d mit Hämopexin (1–700 µg/ml) behandelt. Es konnte kein Unterschied der DFG Hämopexin-behandelter Glomeruli und der Kontrolle festgestellt werden. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way ANOVA-Test und *post hoc* Bonferroni-Korrektur, n = 3.

### 3.4.4. Einfluss von BDNF und TrkB-Inhibitoren auf die CFP-Intensität

Kürzlich konnte in verschiedenen Spezies für den Brain derived neurotrophic factor (BDNF) ein positiver Effekt auf den Podozyten nach Induktion einer Nephropathie mit Adriamycin nachgewiesen werden<sup>153</sup>. Anhand von *in vitro* und *in vivo* Gen-Silencing-Experimenten wurde darüber hinaus belegt, dass die Wirkung des BDNF auf einer Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B (TrkB)-vermittelten Signaltransduktion beruht. Auch in

### 3. Ergebnisse

Experimenten am Institut für Anatomie und Zellbiologie wurde demonstriert, dass sich ein Knockout von BDNF in Zebrafischlarven in einer beeinträchtigten glomerulären Filtration und einem Verlust von Podozyten manifestiert<sup>154</sup>.



**Abb. 26 Modulation der CFP-Intensität durch BDNF und TrkB-Inhibitoren.** Nach 5- (A) oder 6-tägiger (B–D) Inkubation der Glomeruli wurde die DFG bestimmt und in Relation zu einer unbehandelten Kontrolle dargestellt. **A** BDNF (0,01–1 µg/ml) zeigte keine Wirkung auf die CFP-Intensität. **B** Der TrkB-Inhibitor ANA-12 (1–100 µM) bedingte nach 6-tägiger Inkubation einen Abfall der Fluoreszenz mit einer  $IC_{50}$  von 19,74 µM. **C–D** Unter dem Einfluss des TrkB-Inhibitors Cyclotraxin B (Cyclo B, 0,1–10 µM) sowie eines humanen TrkB-Fc Fusionsproteins (0,2–2 µg/ml) war keine Veränderung der DFG nachweisbar. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-Way ANOVA-Test und *post hoc* Bonferroni-Korrektur,  $n = 3$  (A), 5 (B), 4 (C–D).

Um den Effekt des Neutrophins im GlomAssay zu untersuchen, wurden die Glomeruli für 5 d mit BDNF (0,01–1 µg/ml) inkubiert. Bei der Bestimmung der DFG zeigte sich, dass BDNF keinen Einfluss auf die zeitabhängige Dedifferenzierung der Podozyten hatte (Abb. 26A). Um auszuschließen, dass eventuell im FBS enthaltenes BDNF zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt, wurde ein TrkB-Fc Fusionprotein verwendet, welches sich aus der extrazellulären Bindungsdomäne des humanen TrkB-Rezeptors und der Fc-Domäne des humanen IgG-Antikörpers zusammensetzt. Wie von Shelton *et al.* belegt werden konnte, ist

dieses chimäre Protein in der Lage, freies BDNF zu binden und so dessen biologische Aktivität zu blockieren<sup>155</sup>. Für die Versuche wurde das TrkB-Fc Fusionsprotein (0,2–2 µg/ml) für 6 d auf den Glomeruli belassen. Jedoch war nach der Behandlung kein Unterschied der CFP-Intensität nachweisbar (Abb. 26D).

Als nächstes sollte herausgefunden werden, ob sich durch Inhibition des TrkB-Rezeptors, welcher durch BDNF aktiviert wird, eine Modulation der CFP-Expression erreichen lässt. Dazu wurden die beiden TrkB-Inhibitoren ANA-12 (1–100 µM) und Cyclotraxin B (Cyclo B, 0,1–10 µM) ausgewählt und untersucht. Nach 6 d in Kultur führte ANA-12 zu einem konzentrationsabhängigen Abfall des CFP-Signals (Abb. 26B). Als mittlere inhibitorische Konzentration ergab sich ein Wert von 19,74 µM. Für Cyclotraxin B hingegen konnte kein Unterschied zwischen der DFG behandelten Glomeruli und der DFG unbehandelten Glomeruli detektiert werden (Abb. 26C).

### 4. Diskussion

Der Podozyt ist für eine intakte glomeruläre Filtration unverzichtbar. Dabei ist seine Funktion eng an seine morphologischen Besonderheiten wie die Ausbildung interdigitierender Fußfortsätzen und der dazwischen befindlichen Schlitzmembranen gebunden. Jedoch sind zahlreiche Nierenerkrankungen mit einer Dedifferenzierung dieser hochspezialisierten, postmitotischen Zellen assoziiert, infolge derer es zu einem Verlust ihrer einzigartigen Zellarchitektur und zur Entstehung einer Proteinurie kommt<sup>100,156–158</sup>. Nach den derzeitigen Erkenntnissen ist dieser Prozess meist irreversibel und kann durch die momentan zur Verfügung stehenden Wirkstoffe nicht aufgehalten oder gar umgekehrt werden<sup>108</sup>.

Deswegen wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Screening-Verfahren entwickelt, welche immortalisierte Podozytenzelllinien nutzen, um neue podozytenspezifische Pharmaka zu identifizieren. Jedoch weisen Podozyten in Zellkultur eine veränderte mRNA- und Proteinexpression auf und verlieren die für sie typische Morphologie, sodass ihre Eignung für das Substanzscreening limitiert ist<sup>135,159</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen ein neues Screening-Verfahren entwickelt, mit welchem der Effekt von Wirkstoffen auf die Differenzierung von Podozyten isolierter Glomeruli *in situ* untersucht werden kann.

#### 4.1. Glomeruli-Isolation

Für den Assay wurden die Glomeruli eines *Nephrin::CFP*-Mausstamms isoliert, welcher unter der Kontrolle eines Nephrin-Promoter-Fragments das cyan-fluoreszierende Protein (CFP) exprimiert. Der Nachweis der podozytenspezifischen Nephrin- und CFP-Expression erfolgte immunhistochemisch anhand von Kryostatschnitten unbehandelter Mäusenieren. Das Schlitzmembranprotein Nephrin war erwartungsgemäß im Bereich der Podozytenfußfortsätze visualisierbar, während das im Zytosol lokalisierte CFP in Übereinstimmung mit den Befunden von Cui *et al.* zusätzlich in den Podozytenzellkörpern detektiert werden konnte<sup>137</sup>. Eine Kolokalisation beider Proteine war aus methodischen Gründen nicht darstellbar, da die für den Nephrin-Nachweis erforderliche Fixierung mit 2 % PFA für 10 min keine CFP-Detektion ermöglichte. Andererseits blieb unter den für den CFP-Nachweis erforderlichen Bedingungen (2 % PFA für 2 h) eine Bindung des Nephrin-Antikörpers aus. Dass der Nachweis zytosolischer Fluoreszenzproteine stark von der Art und Dauer der Fixierung abhängt, wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen berichtet<sup>160–162</sup>.

Die Differenzierung der Podozyten sollte anhand isolierter Glomeruli untersucht werden. Deswegen wurden drei verschiedene Methoden – die Siebmethoden, die Kollagenase A-Methode und die Dynabeads-Methode – bezüglich ihrer Eignung zur Isolation von Glomeruli mit intakten Podozyten verglichen. Alle diese Methoden werden standardmäßig für die Generierung von Primärpodozyten als auch zur Probengewinnung im Rahmen von Gen-Arrays und Proteomanalysen genutzt<sup>140–142,163–165</sup>.

Die Zellviabilität der Podozyten wurde mit Hilfe von Propidiumiodid beurteilt. Dabei zeigte sich unabhängig von der angewandten Methode, dass Schädigungen der Podozyten unmittelbar mit einem Verlust des CFP-Signals einhergingen. Folglich wurde in allen nachfolgenden Experimenten anhand der CFP-Fluoreszenz direkt auf die Integrität der Podozyten rückgeschlossen.

Von den drei untersuchten Isolationsmethoden erwies sich die in vielen Laboren verwendete Siebmethode als das ungeeignetste Verfahren. So gelang es mit dieser Methode nur eine geringe Menge an Glomeruli zu isolieren, deren Podozyten jedoch teils beträchtliche Schädigungen aufwiesen. Damit übereinstimmend berichteten auch Ishikawa und Kitamura, dass etwa 80 % der Podozyten gesiebter Glomeruli spontan in Apoptose gehen<sup>166</sup>. Bemerkenswert war darüber hinaus, dass die Podozyten bekapselter Glomeruli weniger Zellschäden aufwiesen als die Zellen unbekapselter Glomeruli. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Verlust der CFP-Fluoreszenz durch die mechanische Beanspruchung der Podozyten verursacht wurde, welche aufgrund ihrer ungeschützten Lokalisation an der Außenseite der Kapillaren verstärkt geschädigt werden. Gestützt wird diese Hypothese durch Ergebnisse von Yaoita *et al.*, dass eine verringerte mechanische Belastung während des Siebens mit einem vermehrten Auswachsen der Podozyten einhergeht<sup>167</sup>. Dass mechanischer Stress nicht nur als Nekrose- sondern auch als Apoptose-Induktor fungiert, wurde außerdem für Podozyten und Myozyten nachgewiesen<sup>168,169</sup>.

Bei der Kollagenase A-Methode geht dem differentiellen Sieben ein enzymatischer Verdau des zerkleinerten Nierengewebes mit Kollagenase A voraus. Dadurch konnte sowohl die Ausbeute als auch die CFP-Fluoreszenz der Podozyten deutlich erhöht werden. Jedoch wurde das Verfahren aufgrund der starken Kontamination mit Tubulusfragmenten für die Isolation der Glomeruli als ungeeignet bewertet.

Die erstmals von Takemoto *et al.* beschriebene Dynabeads-Methode beruht darauf, dass eine kardiale Perfusion der Versuchstiere mit superparamagnetischen Sphärokolloiden zu deren selektiver Akkumulation in den Kapillaren der Glomeruli führt. Diese können dann im Anschluss an die enzymatisch-mechanische Disaggregation des Gewebes mit Hilfe eines magnetischen Partikelkonzentrators separiert werden<sup>165</sup>. Mit der Dynabeads-Methode wurde eine hohe Ausbeute reiner, dekapsulierter Glomeruli erhalten. Gleichzeitig verursachte sie von allen getesteten Verfahren die geringsten Zellschäden. Anhand immunhistochemischer

Untersuchungen von Kryostatschnitten frisch isolierter Glomeruli konnte außerdem belegt werden, dass die Expression und Lokalisation der podozytenspezifischen Differenzierungsmarker Nephrin, Podocin und WT-1 nicht durch die Isolationsprozedur beeinträchtigt wurde. Mit Hilfe transmissions- und rasterelektronenmikroskopischer Bilder wurde außerdem die Unversehrtheit der Podozyten-Fußfortsätze und der Schlitzmembranen verifiziert. Da mit der Dynabeads-Methode somit die höchste Ausbeute an reinen Glomeruli mit intakten Podozyten gewonnen werden konnte, wurden alle Glomeruli für die im Folgenden beschriebenen Experimente mit diesem Verfahren isoliert.

### **4.2. Dedifferenzierung der Podozyten isolierter Glomeruli in Zellkultur**

Die Kultivierung isolierter Glomeruli wurde erstmals 1954 von Krankower und Greenspon beschrieben und dient seither zur Gewinnung von Primärpodozyten und immortalisierten Podozytenzelllinien<sup>141,170</sup>. Außerdem wurde in der Vergangenheit demonstriert, dass die Podozyten isolierter Glomeruli in Zellkultur spontan dedifferenzieren<sup>171</sup>. Dies wiederum führt sowohl zu einer morphologischen Umgestaltung der Zellen wie bspw. dem Verlust der Fußfortsätze und Schlitzmembranen als auch zu funktionellen Veränderungen. Letztere äußern sich insbesondere in einer verringerten Expression podozytenspezifischer Proteine wie dem Schlitzmembran Nephrin<sup>135,145</sup>, welches darüber hinaus auch mit der Entstehung verschiedener Glomerulopathien assoziiert ist<sup>86,87,172,173</sup>. Der unter der Kontrolle eines Nephrin-Promoters-Fragments gebildete Fluoreszenzreporter CFP bot somit eine hervorragende Möglichkeit, die Podozytendifferenzierung *in situ* auf nicht-destruktive, wiederholbare Art und Weise zu verfolgen. Dass die Nutzung eines Fluoreszenzreporters als Auslesekriterium zur Untersuchung von Expressionsunterschieden durchaus geeignet ist, belegen bereits verschiedene Verfahren<sup>174-176</sup>.

Um die CFP-Intensität der Glomeruli zu quantifizieren, wurden z-Stapel der Glomeruli generiert und die hintergrundkorrigierte, durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Glomerulus (DFG) mit dem eigens für den GlomAssay entwickelten Programm „Glomc“ semi-automatisch bestimmt. Die DFG verhält sich proportional zur Anzahl der differenzierten Podozyten eines Glomerulus. Allerdings wird sie von verschiedenen Faktoren wie der glomerulären Größe, welche intraindividuell zwischen kortikalen und juxtamedullären Glomeruli variiert<sup>177</sup>, oder der Qualität der Isolation beeinflusst und ist somit als absolute Größe nur schwer interpretierbar. Deswegen wurde die DFG stets in Relation zu einer internen Kontrolle betrachtet.

Bei der Aufnahme der z-Stacks wurden neben den Glomeruli auch auswachsende Primärpodozyten erfasst. Diese konnten frühestens nach 2-tägiger Kultivierung beobachtet werden und wiesen in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen eine für

sie typische, heterogene Morphologie auf<sup>141,145,167,171</sup>. So waren sowohl verzweigte, spindelförmige als auch "Pflasterstein-ähnliche" Primärpodozyten zu finden. Nur wenige ausgewachsene Zellen exprimierten noch den Fluoreszenzreporter CFP. Auffälligerweise handelte es sich dabei meist um Zellen, welche noch teils auf dem Glomerulus adhärerten. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine intakte glomeruläre Zell-Zell-Kommunikation zum Erhalt der Podozytendifferenzierung beiträgt<sup>136,178</sup>. Der Großteil der Primärpodozyten wies jedoch keine CFP-Expression mehr auf, sodass ihr Ausschluss bei der Ermittlung der DFG nicht erforderlich war.

Die Untersuchungen der CFP-Dynamik über die Zeit dienten dazu, einen geeigneten Zeitpunkt für das spätere Substanzscreening zu ermitteln. Dazu wurde die DFG über eine Dauer von 9 d alle 24 h bestimmt. Die CFP-Intensität blieb für etwa 5 d stabil, bevor sie graduell abfiel und nach 9 d nur noch 10 % der initialen Intensität erreichte. Dass die Abnahme der Nephtrin-Expression sich unmittelbar in einer verringerten CFP-Expression widerspiegelt, wurde mittels RT-PCR, Western Blot-, Transkriptom- und Proteomanalyse verifiziert. Folglich stellt die CFP-Intensität ein geeignetes Auslesekriterium zur Beurteilung der Podozytendifferenzierung dar. Jedoch ist es kritisch anzumerken, dass der Expressionsabfall des Nephtrins und CFPs auf Proteinebene geringer ausfiel als auf mRNA-Ebene, wie es ebenfalls von Tsuchida *et al.* im Zusammenhang mit der von ihnen generierten Nephtrin-EGFP-Maus beschrieben wurde<sup>179</sup>. Ursächlich für diese Diskrepanz könnte eine kürzere Halbwertszeit (HWZ) der mRNA gegenüber dem Protein sein, sodass sich transkriptionelle Änderungen erst verzögert auf Proteinebene manifestieren<sup>180</sup>. So beläuft sich die HWZ des Nephtrin-Proteins auf 4,5 h<sup>181</sup>, während für CFP mit Hilfe induzierbarer Reportersysteme eine HWZ von 72 min bzw. 2,5 h ermittelt wurde<sup>182,183</sup>. Nach Inhibition der zellulären Transkription und Translation durch Cycloheximid liegt die CFP-HWZ sogar bei 29,5 h<sup>184</sup>. Jedoch ist die Eignung dieser Methode zur Bestimmung der HWZ kritisch zu hinterfragen, da die Hemmung der Proteinbiosynthese ebenfalls mit einer verlangsamten Proteindegradation einhergeht<sup>185</sup>. Für die HWZ der Nephtrin- und CFP-mRNA gibt es derzeit leider keine experimentellen Daten, welche einen beschleunigten Abbau der mRNA gegenüber dem Protein einwandfrei belegen würden. Jedoch zeigen Studien, dass die HWZ einer mRNA von ihrer physiologischen Funktion abhängt und bspw. Proteine, welche die Differenzierung beeinflussen, oftmals eine mRNA mit kurzer HWZ besitzen<sup>186-188</sup>.

Um eine optimale Kultivierung der Glomeruli zu gewährleisten, wurde der Einfluss verschiedener FBS-Konzentrationen auf die DFG betrachtet. Dabei zeigte sich, dass eine Supplementation von 10 % FBS einen signifikanten Anstieg der DFG bedingte im Vergleich

zu FBS-freien Kultivierung. Dieser Effekt konnte durch eine Erhöhung der FBS-Konzentration auf 20 % jedoch nicht weiter gesteigert werden, sodass eine Supplementation von 10 % für alle weiteren Versuche als geeignet erachtet wurde.

Die Veränderungen der Podozyten-Ultrastruktur in Zellkultur wurden mittels transmissions- und rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen beurteilt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass die Morphologie der Fußfortsätze und die Existenz der Schlitzmembran nicht durch das Isolationsverfahren beeinträchtigt wurden<sup>137,165,189,190</sup>. Des Weiteren konnten keine Veränderungen der glomerulären Basalmembran und des fenestrierten Endothels beobachtet werden. Bereits nach 4-tägiger Kultivierung der Glomeruli war eine deutliche Abflachung sowie ein Verschmelzen der Podozyten-Fußfortsätze und ein Verlust der Schlitzmembranen zu verzeichnen. Dieser Befund wird durch vorhergehende Befunde von Nørgaard und Andrews gestützt, welche ein Effacement der Podozyten-Fußfortsätze innerhalb der ersten Tage in Zellkultur beschrieben<sup>191,192</sup>. Darüber hinaus beschreibt Andrews, dass die Kultivierung isolierter Glomeruli zum Verschwinden der endothelialen Fenestrationsen und zu Veränderungen der glomerulären Basalmembran führt<sup>192</sup>. Diese Beobachtungen konnte durch die vorliegenden Experimente ebenfalls bestätigt werden.

### 4.3. Transkriptom- und Proteomanalyse

Es gibt bereits eine Reihe von Studien, welche sich mit Veränderungen des Podozyten-Transkriptoms und/oder Proteoms in verschiedenen Krankheitsmodellen oder während der Nephrogenese befassen<sup>193–196</sup>. Die Dedifferenzierung von Podozyten isolierter Glomeruli wurde jedoch erstmalig im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dazu wurde das glomeruläre Transkriptom und Proteom nach 3-, 6- und 9-tägiger Kultivierung mit Hilfe des Next Generation Sequencing bzw. der UPLC-MS/MS-Analyse bestimmt. Insgesamt konnten 14309 Gene und 2549 Proteine identifiziert werden. Dass die Anzahl der identifizierten Proteine deutlich geringer ausfällt als die der identifizierten Gene, lässt sich auf methodische Ursachen zurückführen und wird bspw. von Sun *et al.* bestätigt<sup>197</sup>. Erfreulich war jedoch, dass mit 93,5 % die Mehrheit der Proteine auch im Transkriptom nachgewiesen wurden. Bei der Betrachtung der signifikant regulierten Gene bzw. Proteine zeigte sich, dass die Veränderungen auf mRNA-Ebene deutlich stärker ausfielen als auf Proteinebene. Allerdings wies die Regulation des Transkriptoms keine zeitabhängige Dynamik auf. Im Proteom hingegen waren nach 9-tägiger Kultivierung fast doppelt so viele Proteine signifikant reguliert wie nach 3- oder 6-tägiger Kultivierung. Entsprechend scheinen sich transkriptionelle Veränderungen erst verzögert im Proteom zu manifestieren.



Es ist kritisch anzumerken, dass es sich bei den untersuchten Glomeruli um ein Gemisch verschiedener Zelltypen handelt. Folglich spiegelt das Transkriptom bzw. Proteom nicht nur die Veränderung der Podozyten wider, sondern ebenfalls die der Tubulus-, der Mesangium-, der Endothel- und der parietalen Epithelzellen (PECs). Anhand ausgewählter, zelltypspezifischer Markerproteine lässt sich jedoch vermuten, dass insbesondere die Endothel- und die Tubuluszellen hierbei eher eine untergeordnete Rolle spielen und bereits frühzeitig absterben. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der Propidiumiodid-Färbungen (Daten nicht dargestellt), welche eine Apoptose dieser Zelltypen belegen. Die erhöhte Expression verschiedener Mesangiums- und PEC-Marker hingegen weist auf eine Proliferation dieser Zelltypen unter den gegebenen Kulturbedingungen hin, sodass diese maßgeblich an den Veränderungen des Transkriptoms bzw. Proteoms beteiligt sein könnten.

Um trotzdem eine Aussage über die Podozytendendifferenzierung treffen zu können, wurde eine Auswahl podozytenrelevanter Gene/Proteine betrachtet, welche zum Teil auch podozytenspezifisch sind. Deren jeweilige Funktion im Podozyten sowie bisher publizierte *in vivo* Befunde können der Tabelle im Abschnitt 7.2. des Anhangs entnommen werden.

Die aufgeführten Schlitzmembranproteine sind für die Aufrechterhaltung der selektiven Filtrationsleistung essentiell. Aus ihrem Verlust resultiert unweigerlich ein Effacement der Podozyten-Fußfortsätze und der Schlitzmembran<sup>30</sup>. Da sie mit Ausnahme von NCK1 und NCK2 alle spezifisch für den Podozyten sind<sup>198</sup>, lassen sie direkt Rückschlüsse auf die Differenzierung des Podozyten zu. Übereinstimmend mit den Ergebnisse der PCR- und Western Blot-Analyse ließ sich auch im Transkriptom und im Proteom ein zeitabhängiger Abfall der Nephrin und CFP-Expression nachweisen. Außerdem zeigte sich abermals, dass die Effekte auf Proteinebene schwächer waren und leicht verzögert auftraten im Vergleich zur Regulation auf mRNA-Ebene. Außer Nephrin waren auch die Schlitzmembranproteine Podocin (*Nphs2*), NCK1 und MAGI-2 herunterreguliert, während CD2AP, FAT-1, NEPH-1 (*Kirrel1*) und NCK2 verstärkt exprimiert wurden. Folglich könnte die Dedifferenzierung des Podozyten nicht nur durch einen Verlust der Schlitzmembranproteine, sondern auch durch eine Umgestaltung dieses Zell-Zellkontakts bedingt sein. In diesem Zusammenhang sei außerdem darauf hingewiesen, dass das elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Effacement der Podozyten-Fußfortsätze und der Verlust der Schlitzmembranen nach 4-tägiger Kultivierung sich erst verzögert im Proteom manifestierten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die ultrastrukturellen Veränderungen der Podozyten-Morphologie zu Beginn der Kultivierung hauptsächlich durch posttranslationale Proteinmodifikationen vermittelt werden<sup>181,199,200</sup>.

Neben der Schlitzmembran spielen auch die zytoskelettalen Proteine eine entscheidende Rolle für die Morphologie des Podozyten und dessen daraus resultierender Funktion.

Insbesondere das Aktin-Zytoskelett ist für die Ausbildung der Fußfortsätze von entscheidender Bedeutung<sup>198,201</sup>. Von den in der Heatmap aufgeführten Zytoskelett-Proteinen sind die Aktin-regulierenden Proteine Synaptopodin (*Synpo*) und Arhgap24 am stärksten herunterreguliert. Beide sind innerhalb der Niere podozytenspezifisch und ihre Mutationen sind mit der Entstehung nephrotischer Erkrankungen assoziiert<sup>85,202,203</sup>. Die am stärksten hochregulierten Gene bzw. Proteine waren Cofilin-1 (*Cfl1*), Pik3c2a und Schip1. Während Cofilin-1 und Pik3c2a auch in Mesangiumszellen exprimiert sind und somit deren Expressionsänderung nicht alleinig auf die Podozyten zurückgeführt werden kann, handelt es sich bei Schip1 innerhalb der Niere um ein podozytenspezifisches Protein. Es ist in den Fußfortsätzen lokalisiert und moduliert nach Stimulation durch PDGF das Aktin-Zytoskelett über eine Interaktion mit dem Nherf2/Ezrin-Komplex<sup>204</sup>. Der Knockdown von Schip1 in Zebrafischlarven manifestiert sich in einer Desorganisation der Podozyten-Fußfortsätze und einer damit einhergehenden Proteinurie. Ein ähnliches klinisches Bild zeigte sich außerdem in Schip1<sup>-/-</sup>PDGFrβ<sup>+/-</sup>-Mäusen<sup>205</sup>.

Der Kontakt zwischen der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten-Fußfortsätzen wird durch verschiedene transmembranäre Adhäsionsmoleküle wie bspw. die Integrine oder die Tetraspanine gebildet<sup>206</sup>. Über die Rekrutierung von Adaptor- und Effektormolekülen sind diese Proteine in der Lage, das Aktin-Zytoskelett und damit die Podozytenmorphologie zu beeinflussen<sup>206-208</sup>. Interessanterweise waren die untersuchten Komponenten der Zell-Matrix-Kontakte mit Ausnahme von Talin-1 (*Tln1*) insbesondere auf mRNA-Ebene stark hochreguliert, während die Veränderungen auf Proteinebene eher gering ausfielen. Jedoch lassen sich diese Daten insgesamt nur schwer interpretieren, da die Zell-Matrix-Komponenten ubiquitär in verschiedenen glomerulären Zelltypen exprimiert werden. Dass sie allerdings einen direkten Einfluss auf die Adhäsion, Fußfortsatzbildung und Differenzierung der Podozyten haben, konnte bereits vielfach experimentell belegt werden<sup>207,209</sup>.

Augenscheinlich widersprüchliche Ergebnisse lieferten die Bestandteile der GBM, deren Proteinlevel trotz einer verringerten mRNA-Expression stark erhöht waren. Da Podozyten jedoch nicht nur an der Synthese der GMB-Komponenten beteiligt sind, sondern auch deren Degradation regulieren<sup>210</sup>, deutet diese Diskrepanz möglicherweise auf einen verlangsamten Abbau der GBM-Proteine durch dedifferenzierende Podozyten hin. Dieser Zusammenhang wurde bereits anhand TGF-β-überexprimierender Podozyten und in Zusammenhang mit der diabetischen Nephropathie demonstriert<sup>210,211</sup>.

Die ausgewählten Transkriptionsfaktoren sind mit Ausnahme von *Cmip* und *Nfatc1* für die Aufrechterhaltung der Podozytendifferenzierung essentiell<sup>102,212</sup>. Erwartungsgemäß konnte während der Dedifferenzierung in Zellkultur ihre abfallende mRNA-Expression verifiziert

werden. Ein Nachweis der Transkriptionsfaktoren im Proteom war aufgrund ihrer niedrigen Expression hingegen nicht möglich.

Die Rolle der verschiedenen Signalmoleküle lässt sich aufgrund ihrer teils unspezifischen Expression oder widersprüchlicher bzw. fehlender Transkriptom- und Proteomdaten nur schwer abschätzen. Erwähnt sei an dieser Stelle jedoch, dass die mRNA des podozytenspezifischen Podoplanins (*Pdpr*), dessen Verlust mit der Entstehung einer Proteinurie assoziiert ist<sup>89</sup>, in dedifferenzierenden Podozyten überraschenderweise stark erhöht ist. Diese Beobachtung kann jedoch leider nicht durch entsprechende Proteomdaten gestützt werden. Des Weiteren wurde das Migration-regulierende Protein Rac1 verstärkt exprimiert. Wie experimentell belegt werden konnte, führt dessen konstitutive Aktivierung zu einer erhöhten Podozyten-Motilität und einem Fußfortsatz-Effacement und damit einhergehender Proteinurie<sup>213,214</sup>. Interessanterweise konnte außerdem ein Abfall des Rac1-inaktivierenden Arhgap24 verifiziert werden<sup>203</sup>, sodass die Regulation von Rac1 potentiell für die erhöhte Motilität der Podozyten verantwortlich sein könnte.

Eine tiefgreifende bioinformatische Analyse des Proteoms wurde mit Hilfe von DAVID Bioinformatic Resources 6.7 vorgenommen. Dabei wurden co-assoziierte Proteine einer übergeordneten biologischen Funktion zugeordnet und als funktionelle Annotations-Cluster (FACI) zusammengefasst. Es zeigte sich, dass unspezifische Cluster, welche mit dem Auf- und Abbau von Proteinen bzw. metabolischen Vorgängen in Zusammenhang standen, einen hohen Anreicherungsfaktor erreichten. Erst zu späteren Zeitpunkten konnten auch FACI identifiziert werden, welche auf Veränderungen des aktinhaltigen Podozyten-Zytoskletts hindeuten. Ein besonderes Augenmerk gilt dem LIM-Domänen-FACI, welches nach 9-tägiger Kultivierung den zweithöchsten Anreicherungsfaktor aufwies. Zu den LIM-Domänen enthaltenden Proteinen zählt bspw. das Protein Wilm's Tumor Interacting Protein (WTIP), das wiederum zur Regulation des Aktin-Zytoskletts als auch zur Aufrechterhaltung der Zellkontakte beiträgt<sup>215</sup>.

#### 4.4. Substanzscreening

Die Validierung des GlomAssays erfolgte mit Hilfe der podozytenprotektiven Substanzen Dexamethason, all-trans-Retinsäure (ATRA), 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (im Folgenden vereinfacht als Vitamin D bezeichnet) und Pioglitazon sowie der podozytenschädigenden Agenzien Daunorubicin und Vinblastin.

Das Zytostatikum Daunorubicin wird zur Induktion einer Nephropathie in Nagern eingesetzt<sup>146,147,216,217</sup>, welche sich in einem Verlust der Podozyten-Fußfortsätze und der Schlitzmembranen manifestiert<sup>218</sup>. Auch im GlomAssay führte Daunorubicin zu einem Abfall

der DFG mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von 1,55  $\mu$ M. Diese ist im Vergleich zu den  $IC_{50}$ -Konzentrationen in verschiedenen Tumorzelllinien, welche im Bereich zwischen 3 nM und 60 nM liegen, deutlich erhöht<sup>219-223</sup>. Die geringere Potenz von Daunorubicin in Podozyten könnte jedoch auf dessen Wirkmechanismus zurück geführt werden, da Daunorubicin durch Interkalation in die DNA und Inhibition der Topoisomerase II die Zellteilung blockiert<sup>224</sup>. Somit wirkt es möglicherweise stärker toxisch auf schnell proliferierende Tumorzellen<sup>225</sup> als auf postmitotische, nichtproliferierende Podozyten.

Das Vinca-Alkaloid Vinblastin verhindert über eine Bindung von Tubulin dessen Polymerisation und folglich die Entstehung von Mikrotubuli<sup>226</sup>. Beim Podozyten führt dies zu Veränderungen der Primärfortsätze, welche von Mikrotubuli und Intermediärfilamenten durchzogen sind<sup>102</sup>, während die Architektur der aktinreichen Fußfortsätze unverändert bleibt<sup>146,147,192</sup>. Im GlomAssay bedingte Vinblastin einen Abfall der nephrinabhängigen CFP-Intensität mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von 87,82 nM. Dies ist bemerkenswert, da bisher noch kein Einfluss von Vinblastin auf die Nephrin-Expression beschrieben worden ist. Stattdessen lieferten Ergebnisse von Saleem *et al.* sogar Hinweise darauf, dass ein Verlust der Mikrotubuli durch Demecolcin keine veränderte Translokation von Nephrin nach sich zieht<sup>227</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen jedoch, dass eine Behandlung mit Vinblastin eine Abnahme der Nephrin-Expression bedingt.

Als podozytenprotektive Pharmaka wurden Dexamethason, ATRA und Vitamin D gewählt, welche von Yamauchi *et al.* als endogene Nephrin-Modulatoren identifiziert wurden<sup>132</sup> und seither als Bestandteil des sogenannten VRAD-Mediums (**V**itamin D, **A**TRA, **D**examethason) zur Induktion der Podozytendifferenzierung in Zellkultur eingesetzt werden<sup>228,229</sup>. Darüber hinaus wurde auch der PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon untersucht, da dessen positiver Effekt auf den Podozyten sowohl in Tiermodellen<sup>149,150</sup> als auch in Studien mit Typ II-Diabetikern belegt werden konnte<sup>230,231</sup>.

Vitamin D führte als einzige der Substanzen zu einem Anstieg der nephrinabhängigen CFP-Expression, welche auch mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse verifiziert werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigt bereits publizierte *in vitro* und *in vivo* Befunde, welche den podozytenprotektiven Effekt des Vitamin D auf eine verstärkte Nephrin-Expression zurückführen<sup>122,132,179,232,233</sup>. Die Inkubation der Glomeruli mit ATRA, Dexamethason oder Pioglitazon hingegen führte zu keiner Veränderung der CFP-Intensität, obwohl für alle Substanzen ein Einfluss auf die Nephrin-Expression experimentell belegt ist<sup>149,150,234-237</sup>. Auch der von Yamauchi *et al.* berichtete Synergismus der VRAD-Komponenten spiegelte sich nicht in den Ergebnissen des GlomAssays wider<sup>132</sup>. Dass mit den beiden Screening-Verfahren unterschiedliche Resultate erzielt wurden, lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass kultivierte Podozyten gegenüber differenzierten Podozyten eine

stark veränderte mRNA- und Proteinexpression aufweisen<sup>159</sup>. Deswegen könnten Podozyten isolierter Glomeruli ein verändertes Ansprechen gegenüber den untersuchten Substanzen zeigen.

Der GlomAssay wurde auch für das Screening neuer Substanzen verwendet. Zu diesen zählte das Glykoprotein Hämopexin, welches mit der Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGP) in Zusammenhang gebracht wird<sup>151</sup>. So weist Hämopexin eine erhöhte Aktivität im Serum von Patienten auf, welche an einer MCGP erkrankt waren und einen Rückfall erlitten. In einer weiteren Studie zeigte sich außerdem, dass eine unilaterale, renale Perfusion von rekombinantem oder humanem Hämopexin in Ratten zu einem Krankheitsbild führt, welches Charakteristika der MCGP aufwies<sup>238</sup>. Im GlomAssay konnte jedoch kein Effekt von Hämopexin auf den Podozyten nachgewiesen werden. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Lennon *et al.*, die von einer nephrinabhängigen Aktin-Reorganisation nach Inkubation kultivierter Podozyten mit Hämopexin berichten<sup>239</sup>. Außerdem beobachteten Cheung *et al.* nach Injektion von Hämopexin in Ratten ein Effacement der Podozyten-Fußfortsätze<sup>238</sup>. Allerdings erwies sich dieser Effekt als reversibel und konnte im Falle der kultivierten Podozyten durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren oder durch Preinkubation mit humanem Plasma inhibiert werden. Somit könnte der Umstand, dass Hämopexin zwar zu schnellen, aber nur temporären Veränderungen der Podozyten führt, erklären, warum kein Effekt im GlomAssay beobachtet werden konnte. Auch demonstrierten Lennon *et al.*, dass die Wirkung des Hämopexins an die Expression von Nephrin gebunden ist. Die Podozyten der isolierten Glomeruli weisen nach 6-tägiger Kultivierung jedoch eine verringerte Nephrin-Expression auf, wie anhand der RNA-Seq- und der Proteomdaten belegt ist, und sind somit möglicherweise gegenüber Hämopexin unempfindlicher.

Als weitere Testsubstanz wurde der Brain derived neurotrophic factor (BDNF) untersucht, welcher kürzlich als neuer prognostischer Biomarker im Urin von CKD-Patienten identifiziert wurde<sup>154</sup>. Außerdem verifizieren Zebrafisch- und Mausexperimente, dass BDNF essentiell für die glomeruläre Entwicklung und die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere ist<sup>153,240</sup>. Die Inkubation der Glomeruli mit BDNF beeinflusste die Podozytendifferenzierung jedoch nicht. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Li *et al.*, welche in kultivierten Podozyten ebenfalls keine veränderten Nephrin-Level nach Behandlung mit BDNF feststellen konnten<sup>153</sup>. Um auszuschließen, dass im FBS enthaltenes BDNF zu einer Verfälschung der Ergebnisse führte<sup>241</sup>, wurden die Glomeruli mit einem TrkB-Fc Fusionsprotein inkubiert, welches freies BDNF bindet<sup>242</sup>. Doch auch diese Maßnahme führte zu keiner Veränderung der DFG. Es sei jedoch erwähnt, dass die Anwendung des TrkB-Fc Fusionsproteins bereits zuvor paradoxe Ergebnisse lieferte. So berichten Croll *et al.*, dass die Bindung von BDNF

durch das TrkB-Fc Fusionsprotein entgegen der Erwartungen sogar zu einer verbesserten Aufnahme des neurotrophen Faktors im murinen Hippocampus führte<sup>243</sup>. Folglich ist die zu erwartende Wirksamkeit des TrkB-Fc Fusionsproteins im GlomAssay eher fragwürdig.

Die Daten von Li *et al.* belegen darüber hinaus, dass der Effekt von BDNF im Podozyten durch eine Aktivierung des Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B (TrkB)-Rezeptors vermittelt wird<sup>153</sup>. Deswegen wurde der Rezeptor durch die TrkB-Rezeptor-Antagonisten ANA-12 und Cyclotraxin B selektiv inhibiert<sup>244,245</sup>. Die 6-tägige Inkubation der Glomeruli mit ANA-12 führte zu einem Abfall der DFG mit einer IC<sub>50</sub> von 19,74 µM, während durch die Behandlung mit Cyclotraxin B keine Veränderungen der DFG hervorgerufen wurden. Ursächlich für diese Diskrepanz könnte der Umstand sein, dass die allosterische Hemmung des TrkB-Rezeptors durch Cyclotraxin B nur zu dessen partieller Inhibition führt. Außerdem belegen die Daten von Cazorla *et al.*, dass die Anwesenheit von BDNF, welches im FBS enthalten sein könnte, eine Wirkminderung des Cyclotraxin B nach sich zieht<sup>244</sup>. Durch die Bindung des p75 Neutrophin Rezeptors (p75NTR) an den TrkB-Rezeptor hingegen wird seine Wirkung verstärkt. Wie anhand der Ergebnisse der RNA-Seq-Analyse belegt werden kann, ist p75NTR jedoch nicht in Podozyten exprimiert. Somit wäre es denkbar, dass Cyclotraxin den TrkB-Rezeptor nicht ausreichend blockiert, um einen messbaren Effekt auf die Podozytendifferenzierung zu bedingen. Die Wirkung des ANA-12 hingegen gibt Grund zur Annahme, dass BDNF über einen TrkB-vermittelten Mechanismus für die Differenzierung von Podozyten essentiell ist. Gestützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass der Knockdown von BDNF in Zebrafischlarven unter anderem einen Podozytenverlust und einen Defekt der Filtrationsbarriere nach sich zieht<sup>246</sup>.

### 4.5. Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren etabliert, mit welchem künftig der Effekt pharmakologischer Substanzen auf die Podozytendifferenzierung *in situ* untersucht werden kann. Der GlomAssay ist leicht durchführbar und die nicht-destruktive Fluoreszenzquantifizierung sowie die semi-automatische Datenauswertung ermöglichen eine schnelle und wiederholbare Messung über mehrere Tage. Zukünftig soll sogar eine Vollautomatisierung der Screeningmethode realisiert werden, sodass das Verfahren auch für das Hochdurchsatzscreening genutzt werden kann.

Da die Übertragbarkeit der mit dem GlomAssay ermittelten Ergebnisse auf *in vivo* Bedingungen verifiziert werden konnte, bietet dieser eine hervorragende Möglichkeit *in vivo* Experimente teilweise zu ersetzen und so die Anzahl an Versuchstieren drastisch zu reduzieren. Nichtsdestotrotz wäre eine weitere Miniaturisierung des Verfahrens

erstrebenswert, um die Zahl der pro Versuchstier durchführbaren Messungen weiter zu erhöhen.

Von den untersuchten Substanzen erwies sich insbesondere Vitamin D als vielversprechendes Agens, das der zeitabhängigen Dedifferenzierung der Podozyten entgegenwirkte. Ob die durch Vitamin D verstärkte Expression des Nephrin auch eine Verbesserung der Podozyten-Morphologie nach sich zieht, könnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen untersucht werden. Des Weiteren würde eine Analyse des Transkriptoms und Proteoms Aufschlüsse über die Regulation Podozyten-relevanter Gene und Proteine liefern. Anhand kultivierter Podozyten wäre es außerdem möglich herauszufinden, ob Vitamin D ebenfalls die Motilität und das Migrationsverhalten von Podozyten beeinflusst. Weiterführende Arbeiten am Institut für Anatomie und Zellbiologie adressieren außerdem die Frage, ob die VRAD-Komponenten eine Transdifferenzierung parietaler Epithelzellen in Podozyten-ähnliche Zellen induzieren. Des Weiteren könnten Experimente mit Zebrafischlarven dazu dienen, den Einfluss der VRAD-Komponenten in einem weiteren, etablierten Krankheitsmodell zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Etwa jeder zehnte Deutsche leidet an einer chronischen Nierenerkrankung (CKD), deren Entstehung zu etwa zwei Drittel auf eine Schädigung der Podozyten zurückgeführt werden kann. Die Funktion der Podozyten für die Aufrechterhaltung der selektiven glomerulären Filtration ist eng an ihre einzigartigen Morphologie interdigitierender Fußfortsätze gebunden. Deren Zwischenräume werden von einer Schlitzmembran überbrückt, die aus spezifischen Proteinen wie Nephtrin besteht. Im Falle einer CKD kommt es jedoch zu einer Dedifferenzierung der Podozyten, welche einen Verlust ihrer komplexen dreidimensionalen Struktur und damit eine Proteinurie nach sich zieht. Da dieser Prozess durch die derzeit zur Verfügung stehenden Pharmaka wie Glukokortikoide oder Calcineurin-Inhibitoren nur unzureichend therapiert werden kann, ist eine Dialysepflichtigkeit und/oder Nierentransplantation für die meisten Patienten unausweichlich.

Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit der GlomAssay entwickelt und für das Screening podozytenspezifischer Wirkstoffe genutzt. Dazu wurden die Glomeruli eines transgenen *Nephtrin::CFP*-Mausstammes isoliert, welcher unter der Kontrolle des Nephtrin-Promoters den Fluoreszenzreporter CFP exprimiert. Anschließend wurden die Glomeruli kultiviert und der durch die zeitabhängige Dedifferenzierung der Podozyten bedingte Nephtrin-Abfall anhand der CFP-Fluoreszenzintensität *in situ* quantifiziert.

Beim Vergleich verschiedener Isolationsmethoden erwies sich die Glomeruli-Isolation mit magnetischen Dynabeads als geeignetstes Verfahren. Die Unversehrtheit der Podozyten wurde mittels Laser-Scanning-, Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie sowie durch Immunfluoreszenzfärbungen der Podozytenmarker Nephtrin, Podocin und WT-1 verifiziert. Die spontane Dedifferenzierung der Podozyten in Zellkultur führte zu einem graduellen Abfall der CFP-Fluoreszenz über 9 Tage. Dass die sinkende CFP-Fluoreszenzintensität dabei unmittelbare Rückschlüsse auf eine verringerte Nephtrin-Expression zulässt, wurde mittels RT-PCR, Western Blot-, Transkriptom- und Proteomanalyse belegt. Ein Effacement der Podozyten-Fußfortsätze und ein Verlust der Schlitzmembranen wurde anhand transmissions- und rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen nachgewiesen.

Um die Mechanismen der Podozytendedifferenzierung genauer zu verstehen, wurde das glomeruläre Transkriptom und Proteom nach 3-, 6- und 9-tägiger Kultivierung analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass außer den Schlitzmembranproteinen auch bspw. die Komponenten des Zytoskeletts, der Zell-Matrix-Kontakte oder der glomerulären Basalmembran von Bedeutung sind für die Podozytendedifferenzierung.

Die Validierung des GlomAssays erfolgte mit Hilfe verschiedener podozytenprotektiver und -schädigender Substanzen. Die Podozyten-Noxen Daunorubicin und Vinblastin



bedingten dabei erwartungsgemäß einen Abfall der CFP-Fluoreszenzintensität mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von 1,55  $\mu$ M bzw. 87,82 nM. Von den untersuchten podozytenprotektiven Pharmaka Dexamethason, all-trans-Retinsäure, Pioglitazon und  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  führte nur die Behandlung mit Letzterem zu einer Reduktion der Podozytendedifferenzierung. Die damit einhergehende, erhöhte Nephrin- und CFP-Expression wurde mittels RT-PCR und Western Blot-Analyse nachgewiesen.

Anschließend wurde der GlomAssay für das Screening neuer Substanzen verwendet. Dabei wurde zum einen das Glykoprotein Hämopexin untersucht, welches mit der Entstehung der Minimal-Change-Glomerulonephritis in Zusammenhang gebracht wird. Es zeigte jedoch keinen Effekt auf die Podozytendedifferenzierung. Zum anderen wurde der Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) getestet, welcher als prognostischer Marker im Urin von CKD-Patienten dient und für die Entwicklung und Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere essentiell ist. Jedoch beeinflusste weder die Inkubation der Glomeruli mit BDNF noch mit dem BDNF-bindenden TrkB-Fc Fusionsproteins die Differenzierung der Podozyten. Die Blockade des Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B (TrkB)-Rezeptors, welcher durch Interaktion mit BDNF aktiviert wird, durch den nichtkompetitiven Inhibitor ANA-12 bewirkte hingegen einen vorzeitigen Abfall der CFP-Fluoreszenz mit einer  $IC_{50}$ -Konzentration von 19,74  $\mu$ M. Mit dem allosterischen TrkB-Inhibitor Cyclotraxin B ließen sich diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen. Nichtsdestotrotz belegen die mit ANA-12 erzielten Resultate die Relevanz des BDNF für Podozytendifferenzierung.

Insgesamt gelang es mit dem GlomAssay ein neue *in vitro* Methode zu etablieren, um den Effekt pharmakologischer Substanzen auf die Podozytendifferenzierung schnell, nicht-destruktiv und wiederholbar zu untersuchen. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, das Screening podozytenprotektiver Wirkstoffe bereits in der präklinischen Phase stärker zu forcieren und so zukünftig die Entwicklung neuer Therapieoptionen zur Behandlung von CKDs voranzutreiben.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Brück K, Stel VS, Gambaro G, et al. CKD prevalence varies across the European general population. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(7):2135-2147. doi:10.1681/ASN.2015050542.
2. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A. The Prevalence of Renal Failure. *Dtsch Aerzteblatt Online*. 2016. doi:10.3238/arztebl.2016.0085.
3. Parving H-H, de Zeeuw D, Cooper ME, et al. ACE gene polymorphism and losartan treatment in type 2 diabetic patients with nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(4):771-779. doi:10.1681/ASN.2007050582.
4. Zagury A, Oliveira AL De, Montalvão JAA, et al. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children: long-term follow-up and risk factors for end-stage renal disease. *J Bras Nefrol Órgão Of Soc Bras e Latino-Americana Nefrol*. 2013;35(21):191-199. doi:10.5935/0101-2800.20130031.
5. Chandna SM, Da Silva-Gane M, Marshall C, Warwicker P, Greenwood RN, Farrington K. Survival of elderly patients with stage 5 CKD: comparison of conservative management and renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(5):1608-1614. doi:10.1093/ndt/gfq630.
6. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JLR. How great is the survival advantage of transplantation over dialysis in elderly patients? *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(4):945-951. doi:10.1093/ndt/gfh022.
7. Sayin A, Mutluay R, Sindel S. Quality of life in hemodialysis, peritoneal dialysis, and transplantation patients. *Transplant Proc*. 2007;39(10):3047-3053. doi:10.1016/j.transproceed.2007.09.030.
8. Wiggins R-C. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int*. 2007;71(12):1205-1214. doi:10.1038/sj.ki.5002222.
9. Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D. Novel drugs and intervention strategies for the treatment of chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76(4):536-550. doi:10.1111/bcp.12195.
10. Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE. Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(9):1529-1533. doi:10.1007/s00467-011-1843-8.
11. Boels MGS, Avramut MC, Koudijs A, et al. Atrasentan Reduces Albuminuria by Restoring the Glomerular Endothelial Glycocalyx Barrier in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2016;65(8).

12. Kriz W, Kaissling B. Structural Organization of the Mammalian Kidney. In: *Seldin and Giebisch's The Kidney*. Elsevier; 2008:479-563. doi:10.1016/B978-012088488-9.50023-1.
13. Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A, Kok RJ, Goldschmeding R. Targeting podocyte-associated diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62:1325-1336. doi:10.1016/j.addr.2010.08.012.
14. Iversen BM, Kvam FI, Matre K, et al. Effect of mesangiolytic on autoregulation of renal blood flow and glomerular filtration rate in rats. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1992;262(3).
15. Schlondorff D. Roles of the mesangium in glomerular function. *Kidney Int*. 1996;49:1583-1585. doi:10.1038/ki.1996.229.
16. Wartiovaara J, Ofverstedt L-G, Khoshnoodi J, et al. Nephric strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1475-1483. doi:10.1172/JCI22562.
17. Lefevre GM, Patel SR, Kim D, Tessarollo L, Dressler GR. Altering a Histone H3K4 Methylation Pathway in Glomerular Podocytes Promotes a Chronic Disease Phenotype. van Heyningen V, ed. *PLoS Genet*. 2010;6(10):e1001142. doi:10.1371/journal.pgen.1001142.
18. Regoli M, Bendayan M. Alterations in the expression of the  $\alpha 3\beta 1$  integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1997;40(1):15-22. doi:10.1007/s001250050637.
19. Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, et al. Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev Biol*. 2008;316(2):288-301. doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.022.
20. Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP, Ekblom P. Distribution of Dystroglycan in Normal Adult Mouse Tissues. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(4):449-457. doi:10.1177/002215549804600404.
21. Kojima K, Davidovits A, Poczewski H, et al. Podocyte flattening and disorder of glomerular basement membrane are associated with splitting of dystroglycan-matrix interaction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):2079-2089. doi:10.1097/01.ASN.0000133531.43177.21.
22. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5(OCT):1-17. doi:10.3389/fendo.2014.00160.
23. Kaplan JM, H Kim S, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding  $\alpha$ -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*. 2000;24(3):251-256. doi:10.1038/73456.

24. Kos CH, Le TC, Sinha S, et al. Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest*. 2003;111(11):1683-1690. doi:10.1172/JCI17988.
25. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol*. 1997;139(1):193-204.
26. Asanuma K, Kim K, Oh J, et al. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1188-1198. doi:10.1172/JCI23371.
27. Endlich N, Schordan E, Cohen CD, et al. Palladin is a dynamic actin-associated protein in podocytes. *Kidney Int*. 2009;75(2):214-226. doi:10.1038/ki.2008.486.
28. Mathieson PW. The podocyte cytoskeleton in health and in disease. *Clin Kidney J*. 2012;5(6):498-501. doi:10.1093/ckj/sfs153.
29. Karnovsky MJ, Ainsworth SK. The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1972;2:35-60.
30. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier (Review Article). *Nephrology*. 2006;11(4):274-281. doi:10.1111/j.1440-1797.2006.00583.x.
31. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*. 1974;60(2):423-433.
32. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;1(4):575-582. doi:10.1016/S1097-2765(00)80057-X.
33. Kriz W. Biologie des Podozyten. *Der Nephrol*. 2006;1(3):144-152. doi:10.1007/s11560-006-0026-2.
34. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2000;24(4):349-354. doi:10.1038/74166.
35. Roselli S, Gribouval O, Boute N, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol*. 2002;160(1):131-139. doi:10.1016/S0002-9440(10)64357-X.
36. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol*. 2001;21(14):4829-4836. doi:10.1128/MCB.21.14.4829-4836.2001.
37. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(1):1-8.

38. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int.* 2001;59(3):1003-1012. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590031003.x.
39. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol.* 1990;111(3):1255-1263.
40. Kurihara H, Anderson JM, Farquhar MG. Diversity among tight junctions in rat kidney: glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(15):7075-7079. doi:10.1073/pnas.89.15.7075.
41. Ihara K-I, Asanuma K, Fukuda T, Ohwada S, Yoshida M, Nishimori K. MAGI-2 Is Critical for the Formation and Maintenance of the Glomerular Filtration Barrier in Mouse Kidney. *Am J Pathol.* 2014;184(10):2699-2708. doi:10.1016/j.ajpath.2014.06.019.
42. Fukasawa H, Bornheimer S, Kudlicka K, Farquhar MG. Slit diaphragms contain tight junction proteins. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1491-1503. doi:10.1681/ASN.2008101117.
43. Palmén T, Ahola H, Palgi J, et al. Neph rin is expressed in the pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 2001;44(10):1274-1280. doi:10.1007/s001250100641.
44. Zanone MM, Favaro E, Doublier S, et al. Expression of neph rin by human pancreatic islet endothelial cells. *Diabetologia.* 2005;48(9):1789-1797. doi:10.1007/s00125-005-1865-5.
45. Åström E, Rinta-Valkama J, Gylling M, et al. Neph rin in human lymphoid tissues. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(4):498-504. doi:10.1007/s00018-005-5498-0.
46. Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine neph rin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet.* 2001;10(1):1-8.
47. Li M, Armelloni S, Ikehata M, et al. Neph rin expression in adult rodent central nervous system and its interaction with glutamate receptors. *J Pathol.* 2011;225(1):118-128. doi:10.1002/path.2923.
48. Liu L, Aya K, Tanaka H, Shimizu J, Ito S, Seino Y. Neph rin is an important component of the barrier system in the testis. *Acta Med Okayama.* 2001.
49. Wagner N, Morrison H, Pagnotta S, et al. The podocyte protein neph rin is required for cardiac vessel formation. *Hum Mol Genet.* 2011;20(11):2182-2194. doi:10.1093/hmg/ddr106.

50. Sohn RL, Huang P, Kawahara G, et al. A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(23):9274-9279. doi:10.1073/pnas.0904398106.
51. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):7962-7967.
52. Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt L-G, et al. Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2337-2346. doi:10.1016/S0002-9440(10)63590-0.
53. Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin – a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med*. 2007;13(9):396-403. doi:10.1016/j.molmed.2007.06.006.
54. Gagliardini E, Conti S, Benigni A, Remuzzi G, Remuzzi A. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(12):2081-2089. doi:10.1681/ASN.2010020199.
55. Ahvenainen EK, Hallman N, Hjelt L. Nephrotic syndrome in newborn and young infants. *Ann Paediatr Fenn*. 1956;2(3):227-241.
56. Huttunen NP. Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients. *Arch Dis Child*. 1976;51(5):344-348.
57. Holmberg C, Jalanko H. Congenital nephrotic syndrome and recurrence of proteinuria after renal transplantation. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(12):2309-2317. doi:10.1007/s00467-014-2781-z.
58. Kestila M, Mannikko M, Holmberg C, et al. Congenital Nephrotic Syndrome of the Finnish Type Maps to the Long Arm of Chromosome 19. *Am J Hum Genet*. 1994;54:757-764.
59. Holmberg C, Antikainen M, Rönholm K, Ala Houhala M, Jalanko H. Management of congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. *Pediatr Nephrol*. 1995;9(1):87-93.
60. Savage JM, Jeverson JA, Maxwell AP, Hughes AE, Shanks JH, Gill D. Improved prognosis for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type in Irish families. *Arch Dis Child*. 1999;80:466-469.
61. Tryggvason K, Kouvalainen K. Number of nephrons in normal human kidneys and kidneys of patients with the congenital nephrotic syndrome. A study using a sieving method for counting of glomeruli. *Nephron*. 1975;15(1):62-68.
62. Autio-Harmainen H, Rapola J. Renal pathology of fetuses with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. A qualitative and quantitative light microscopic study. *Nephron*. 1981;29(3-4):158-163.

63. Jalanko H. Congenital nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(11):2121-2128. doi:10.1007/s00467-007-0633-9.
64. Autio-Harmainen H. Renal pathology of fetuses with congenital nephrotic syndrome of the finnish type. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A Pathol.* 2009;89A(1-6):215-222. doi:10.1111/j.1699-0463.1981.tb00212.x.
65. Patrakka J, Kestila M, Wartiovaara J, et al. Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): Features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int.* 2000;58:972-980. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00254.x.
66. Hamano Y, Grunkemeyer JA, Sudhakar A, et al. Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J Biol Chem.* 2002;277(34):31154-31162. doi:10.1074/jbc.M204806200.
67. Rantanen M, Palmén T, Pätäri A, et al. Nephrin TRAP mice lack slit diaphragms and show fibrotic glomeruli and cystic tubular lesions. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(6):1586-1594. doi:10.1097/01.ASN.0000016142.29721.22.
68. Grahammer F, Wigge C, Schell C, et al. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI Insight.* 2016;1(9). doi:10.1172/jci.insight.86177.
69. Juhila J, Lassila M, Roozendaal R, et al. Inducible nephrin transgene expression in podocytes rescues nephrin-deficient mice from perinatal death. *Am J Pathol.* 2010;176(1):51-63. doi:10.2353/ajpath.2010.080843.
70. Martin CE, Jones N. Nephrin signaling in the podocyte: An updated view of signal regulation at the slit diaphragm and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9(JUN). doi:10.3389/fendo.2018.00302.
71. Lahdenkari A-T, Kestilä M, Holmberg C, Koskimies O, Jalanko H. Nephrin gene (NPHS1) in patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS). *Kidney Int.* 2004;65(5):1856-1863. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00583.x.
72. Shono A, Tsukaguchi H, Kitamura A, et al. Predisposition to relapsing nephrotic syndrome by a nephrin mutation that interferes with assembly of functioning microdomains. *Hum Mol Genet.* 2009;18(16):2943-2956. doi:10.1093/hmg/ddp232.
73. Koziell A, Grech V, Hussain S, et al. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet.* 2002;11(4):379-388.
74. Santín S, García-Maset R, Ruíz P, et al. Nephrin mutations cause childhood- and adult-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2009;76(12):1268-1276. doi:10.1038/ki.2009.381.
75. Narita I, Goto S, Saito N, et al. Genetic polymorphism of NPHS1 modifies the clinical manifestations of Ig A nephropathy. *Lab Invest.* 2003;83(8):1193-1200.

76. Topham PS, Kawachi H, Haydar SA, et al. Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest.* 1999;104(11):1559-1566. doi:10.1172/JCI7728.
77. Kawachi H, Koike H, Kurihara H, et al. Cloning of rat nephrin: Expression developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int.* 2000;57(5):1949-1961. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00044.x.
78. Takeuchi K, Naito S, Kawashima N, et al. New Anti-Nephrin Antibody Mediated Podocyte Injury Model Using a C57BL/6 Mouse Strain. *Nephron.* 2017;138(1):71-87. doi:10.1159/000479935.
79. Luimula P, Sandström N, Novikov D, Holthöfer H. Podocyte-associated molecules in puromycin aminonucleoside nephrosis of the rat. *Lab Invest.* 2002;82(6):713-718. doi:10.1097/01.LAB.0000017168.26718.16.
80. Fukuda A, Fujimoto S, Iwatsubo S, Kawachi H, Kitamura K. Effects of mineralocorticoid and angiotensin II receptor blockers on proteinuria and glomerular podocyte protein expression in a model of minimal change nephrotic syndrome. *Nephrology.* 2010;15(3):321-326. doi:10.1111/j.1440-1797.2009.01256.x.
81. Aaltonen P, Luimula P, Aström E, et al. Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest.* 2001;81(9):1185-1190.
82. Kim J-J, Li JJ, Jung D-S, et al. Differential expression of nephrin according to glomerular size in early diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8):2303-2310. doi:10.1681/ASN.2006101145.
83. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(4):946-956.
84. Furness PN, Hall LL, Shaw J a., Pringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:1234-1237. doi:10.1093/ndt/14.5.1234.
85. Srivastava T, Whiting JM, Garola RE, et al. Podocyte proteins in Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(12):1022-1029. doi:10.1007/s004670100018.
86. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, et al. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol.* 2001;158(5):1723-1731. doi:10.1016/S0002-9440(10)64128-4.
87. Huh W, Kim DJ, Kim M-K, et al. Expression of nephrin in acquired human glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:478-484.



88. Wang S-X, Rastaldi MP, Pätäri A, Ahola H, Heikkilä E, Holthöfer H. Patterns of nephrin and a new proteinuria-associated protein expression in human renal diseases. *Kidney Int.* 2002;61(1):141-147. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00114.x.
89. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2063-2071. doi:10.1097/01.ASN.0000078803.53165.C9.
90. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2003;52:1023.
91. Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2004;65(6):2193-2200. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00636.x.
92. Toyoda M, Suzuki D, Umezono T, et al. Expression of human nephrin mRNA in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:380-385. doi:10.1093/ndt/gfg545.
93. Mao J, Zhang Y, Du L, Dai Y, Yang C, Liang L. Expression profile of nephrin, podocin, and CD2AP in Chinese children with MCNS and IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2006;21:1666-1675. doi:10.1007/s00467-006-0218-z.
94. Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, et al. Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(2):289-296.
95. Guan N, Ding J, Zhang J, Yang J. Expression of nephrin, podocin,  $\alpha$ -actinin, and WT1 in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(11):1122-1127. doi:10.1007/s00467-003-1240-z.
96. Hingorani SR, Finn LS, Kowalewska J, McDonald RA, Eddy AA. Expression of nephrin in acquired forms of nephrotic syndrome in childhood. *Pediatr Nephrol.* 2004;19(3):300-305. doi:10.1007/s00467-003-1346-3.
97. Kriz W, Gretz N, Lemley K V, et al. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int.* 1998;54(3):687-697. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00044.x.
98. Kim NH. Podocyte hypertrophy in diabetic nephropathy. *Nephrology.* 2005;10(s2):S14-S16. doi:10.1111/j.1440-1797.2005.00450.x.
99. Lee SH, Moon SJ, Paeng J, et al. Podocyte hypertrophy precedes apoptosis under experimental diabetic conditions. *Apoptosis.* 2015;20(8):1056-1071. doi:10.1007/s10495-015-1134-0.
100. Herman-Edelstein M, Thomas MC, Thallas-Bonke V, Saleem M, Cooper ME, Kantharidis P. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor-beta: A model for diabetic podocytopathy. *Diabetes.* 2011;60:1779-1788. doi:10.2337/db10-1110.

101. Nishad R. Epithelial – mesenchymal Transition of Glomerular Podocytes : Implications in Proteinuria. :26-34.
102. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83(1):253-307. doi:10.1152/physrev.00020.2002.
103. May CJ, Saleem M, Welsh GI. Podocyte dedifferentiation: a specialized process for a specialized cell. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:148. doi:10.3389/fendo.2014.00148.
104. Griffin S V, Petermann AT, Durvasula R V, Shankland SJ. Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 6:vi8-13.
105. Harris JJ, McCarthy HJ, Ni L, et al. Active proteases in nephrotic plasma lead to a podocin-dependent phosphorylation of VASP in podocytes via protease activated receptor-1. *J Pathol.* 2013;229(5):660-671. doi:10.1002/path.4149.
106. Kim YH, Goyal M, Kurnit D, et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int.* 2001;60(3):957-968. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.060003957.x.
107. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, et al. Podocyte Depletion Causes Glomerulosclerosis: Diphtheria Toxin-Induced Podocyte Depletion in Rats Expressing Human Diphtheria Toxin Receptor Transgene. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):2941-2952. doi:10.1681/ASN.2005010055.
108. Lal MA, Young KW, Andag U. Targeting the podocyte to treat glomerular kidney disease. *Drug Discov Today.* 2015;20(10):1228-1234. doi:10.1016/j.drudis.2015.06.003.
109. Yu M, Ren Q, Yu SY. Role of nephrin phosphorylation induced by dexamethasone and angiotensin II in podocytes. *Mol Biol Rep.* 2014;41:3591-3595. doi:10.1007/s11033-014-3222-6.
110. Agrawal S, Chanley M a., Westbrook D, et al. Pioglitazone Enhances the Beneficial Effects of Glucocorticoids in Experimental Nephrotic Syndrome. *Sci Rep.* 2016;6(May):24392. doi:10.1038/srep24392.
111. Yu-Shengyou, Li Y. Dexamethasone inhibits podocyte apoptosis by stabilizing the PI3K/Akt signal pathway. *Biomed Res Int.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/326986.
112. Agrawal S, Guess AJ, Chanley MA, Smoyer WE. Albumin-induced podocyte injury and protection are associated with regulation of COX-2. *Kidney Int.* 2014;86(6):1150-1160. doi:10.1038/ki.2014.196.
113. Cattran DC, Feehally J, Cook HT, et al. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl.* 2012;2(2):139-274. doi:10.1038/kisup.2012.9.

114. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med*. 2008;14(9):931-938. doi:10.1038/nm.1857.
115. Campbell KN, Tumlin JA. Protecting Podocytes: A Key Target for Therapy of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am J Nephrol*. 2018;47(1):14-29. doi:10.1159/000481634.
116. Smith U. Pioglitazone: Mechanism of action. In: *International Journal of Clinical Practice, Supplement.*; 2001:13-18.
117. Miglio G, Rosa AC, Rattazzi L, Grange C, Camussi G, Fantozzi R. Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on human podocytes: Proposed mechanisms of action. *Br J Pharmacol*. 2012;167:641-653. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02026.x.
118. Gois PHF, Wolley M, Ranganathan D, Seguro AC. Vitamin D deficiency in chronic kidney disease: Recent evidence and controversies. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(8). doi:10.3390/ijerph15081773.
119. Kim SM, Choi HJ, Lee JP, et al. Prevalence of Vitamin D Deficiency and Effects of Supplementation With Cholecalciferol in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Ren Nutr*. 2014;24(1):20-25. doi:10.1053/j.jrn.2013.07.003.
120. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al. The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. *J Bone Miner Res*. 1998;13(3):325-349. doi:10.1359/jbmr.1998.13.3.325.
121. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, Deb DK, Kong J, Yan CL. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: Blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(41):15896-15901. doi:10.1073/pnas.0803751105.
122. Trohatou O, Tsilibary E-F, Charonis A, Iatrou C, Drossopoulou G. Vitamin D3 ameliorates podocyte injury through the nephrin signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2017;21(10):2599-2609. doi:10.1111/jcmm.13180.
123. Shi W, Guo L, Liu G, et al. Protective effect of calcitriol on podocytes in spontaneously hypertensive rat. *J Chinese Med Assoc*. 2018;81(8):691-698. doi:10.1016/j.jcma.2018.01.010.
124. Li YC. Podocytes as Target of Vitamin D. *Curr Diabetes Rev*. 2011;7(1):35-40. doi:10.2174/157339911794273964.
125. Song Z, Guo Y, Zhou M, Zhang X. The PI3K/p-Akt signaling pathway participates in calcitriol ameliorating podocyte injury in DN rats. *Metabolism*. 2014;63(10):1324-1333. doi:10.1016/j.metabol.2014.06.013

126. Deng X, Cheng J, Shen M. Vitamin D improves diabetic nephropathy in rats by inhibiting renin and relieving oxidative stress. *J Endocrinol Invest*. 2016;39(6):657-666. doi:10.1007/s40618-015-0414-4.
127. Scholten N, Ohnhaeuser T, Schellartz I, et al. Multidimensional analysis of factors responsible for the low prevalence of ambulatory peritoneal dialysis in Germany (MAU-PD): A cross-sectional Mixed-Methods Study Protocol. *BMJ Open*. 2019;9(4). doi:10.1136/bmjopen-2018-025451.
128. Poureetezadi SJ, Wingert RA. Little fish, big catch: zebrafish as a model for kidney disease. *Kidney Int*. 2016;89(6):1204-1210. doi:10.1016/j.kint.2016.01.031.
129. Müller R-U, Zank S, Fabretti F, Benzing T. Caenorhabditis elegans, a model organism for kidney research: from cilia to mechanosensation and longevity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(4):400-408. doi:10.1097/MNH.0b013e3283471a22.
130. Dow JAT, Romero MF. Drosophila provides rapid modeling of renal development, function, and disease. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2010;299(6).
131. Bachmann S. From fish to nephrology: modelling glomerular function in *Danio rerio* larvae. *Acta Physiol*. 2017;220(1):16-18. doi:10.1111/apha.12833.
132. Yamauchi K, Takano Y, Kasai A, et al. Screening and identification of substances that regulate nephrin gene expression using engineered reporter podocytes. *Kidney Int*. 2006;70:892-900. doi:10.1038/sj.ki.5001625.
133. Widmeier E, Tan W, Airik M, Hildebrandt F. A small molecule screening to detect potential therapeutic targets in human podocytes. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2017;312(1):F157-F171. doi:10.1152/ajprenal.00386.2016.
134. Lee HW, Khan SQ, Faridi MH, et al. A Podocyte-Based Automated Screening Assay Identifies Protective Small Molecules. *J Am Soc Nephrol*. 2015:1-12. doi:10.1681/ASN.2014090859.
135. Chittiprol S, Chen P, Petrovic-Djergovic D, Eichler T, Ransom RF. Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(3):F660-71. doi:10.1152/ajprenal.00234.2011.
136. Lennon R, Hosawi S. Glomerular cell crosstalk. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016;25(3):187-193. doi:10.1097/MNH.0000000000000221.
137. Cui S, Li C, Ema M, Weinstein J, Quaggin SE. Rapid isolation of glomeruli coupled with gene expression profiling identifies downstream targets in Pod1 knockout mice. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3247-3255. doi:10.1681/ASN.2005030278.
138. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol*. 2002;161:799-805. doi:10.1016/S0002-9440(10)64239-3.

139. Huang DW, Lempicki R a, Sherman BT. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57. doi:10.1038/nprot.2008.211.
140. Kreisberg JI, Hoover RL, Karnovsky MJ. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int.* 1978;14(1):21-30. doi:10.1038/ki.1978.86.
141. Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthöfer H, Kriz W, Endlich K. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int.* 2004;66(1):91-101. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00711.x.
142. Striker GE, Killen PD, Farin FM. Human glomerular cells in vitro: isolation and characterization. *Transplant Proc.* 1980;12(3 Suppl 1):88-99.
143. Baldelomar EJ, Charlton JR, Beeman SC, et al. Phenotyping by magnetic resonance imaging nondestructively measures glomerular number and volume distribution in mice with and without nephron reduction. *Kidney Int.* 2016;89(2):498-505. doi:10.1038/ki.2015.316.
144. Rytand DA. The number and size of mammalian glomeruli as related to kidney and to body weight, with methods for their enumeration and measurement. *Am J Anat.* 1938;62:507-520.
145. Kabgani N, Grigoleit T, Schulte K, et al. Primary cultures of glomerular parietal epithelial cells or podocytes with proven origin. *PLoS One.* 2012;7(4). doi:10.1371/journal.pone.0034907.
146. Andrews PM. The effect of vinblastine-induced microtubule loss on kidney podocyte morphology. *Am J Anat.* 1977;150(1):53-61. doi:10.1002/aja.1001500104.
147. Tyson GE. Scanning electron microscopic study of the effect of vinblastine on podocytes of rat kidney. *Virchows Arch B, Cell Pathol.* 1977;25(2):105-115.
148. Lu Y, Deng A, Li N, Song M, Yang X, Liu J. Changes in angiotensin expression in glomeruli involved in glomerulo-sclerosis in rats with daunorubicin-induced nephrosis 1. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27(5):579-587. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00289.x.
149. Agrawal S, Guess AJ, Benndorf R, Smoyer WE. Comparison of direct action of thiazolidinediones and glucocorticoids on renal podocytes: protection from injury and molecular effects. *Mol Pharmacol.* 2011;80(3):389-399. doi:10.1124/mol.111.071654.
150. Zuo Y, Yang H-C, Potthoff SA, et al. Protective effects of PPAR $\gamma$  agonist in acute nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(1):174-181. doi:10.1093/ndt/gfr240.
151. Bakker WW, van Dael CML, Pierik LJWM, et al. Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(10):1410-1415. doi:10.1007/s00467-005-1936-3.

152. Bakker WW, Borghuis T, Harmsen MC, et al. Protease activity of plasma hemopexin. *Kidney Int.* 2005;68(2):603-610. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00438.x.
153. Li M, Armelloni S, Zennaro C, et al. BDNF repairs podocyte damage by microRNA-mediated increase of actin polymerization. *J Pathol.* 2015;235(5):731-744. doi:10.1002/path.4484.
154. Endlich N, Lange T, Kuhn J, et al. *BDNF*: mRNA expression in urine cells of patients with chronic kidney disease and its role in kidney function. *J Cell Mol Med.* 2018;22(11):5265-5277. doi:10.1111/jcmm.13762.
155. Shelton D, Sutherland J, Gripp J, et al. Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci.* 1995;15(1).
156. Alqaumi M, Soos TJ, Barisoni L, Nelson PJ. Collapsing glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(10):2854-2863. doi:10.1681/ASN.2006030225.
157. D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(3):271-281. doi:10.1097/MNH.0b013e3282f94a96.
158. Mukhi D, Nishad R, Menon RK, Pasupulati AK. Novel Actions of Growth Hormone in Podocytes: Implications for Diabetic Nephropathy. *Front Med.* 2017;4:102. doi:10.3389/fmed.2017.00102.
159. Warsow G, Endlich N, Schordan E, et al. PodNet, a protein-protein interaction network of the podocyte. *Kidney Int.* 2013;84(1):104-115. doi:10.1038/ki.2013.64.
160. Kusser KL, Randall TD. Simultaneous Detection of EGFP and Cell Surface Markers by Fluorescence Microscopy in Lymphoid Tissues. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51(1):5-14.
161. Morris L, Klanke C, Lang S, Lim F-Y, Crombleholme T. TdTomato and EGFP identification in histological sections: insight and alternatives. *Biotech Histochem.* 2010;85(6):379-387. doi:10.3109/10520290903504753.
162. Dauner JG, Chappell CP, Williams IR, Jacob J. Perfusion fixation preserves enhanced yellow fluorescent protein and other cellular markers in lymphoid tissues. *J Immunol Methods.* 2009;340(2):116-122. doi:10.1016/j.jim.2008.10.010.
163. Misra RP. Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving. *Am J Clin Pathol.* 1972;58(2):135-139.
164. Helwig JJ, Zachary D, Bollack C. Isolation of glomeruli and tubular fragments from rabbit kidney. *Urol Res.* 1974;2(2):55-59. doi:10.1007/BF00554587.
165. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol.* 2002;161(3):799-805. doi:10.1016/S0002-9440(10)64239-3.

166. Ishikawa Y, Kitamura M. Spontaneous apoptosis of podocytes in explanted glomeruli: Technical note. *Kidney Int.* 1998;54(6):2008-2013. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00206.x.
167. Yaoita E, Kurihara H, Sakai T, Ohshiro K, Yamamoto T. Phenotypic modulation of parietal epithelial cells of Bowman's capsule in culture. *Cell Tissue Res.* 2001;304(3):339-349.
168. Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2247-2259. doi:10.1172/JCI118280.
169. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, et al. Mechanical forces and TGF $\beta$ 1 reduce podocyte adhesion through  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin downregulation. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(9):2645-2655. doi:10.1093/ndt/gfp204.
170. Krakower CA, Greenspon SA. Factors leading to variation in concentration of nephrotoxic antigen(s) of glomerular basement membrane. *AMA Arch Pathol.* 1954;58(5):401-432.
171. Mundel P, Reiser J, Kriz W. Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(5):697-705.
172. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, Pringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(5):1234-1237.
173. Kwok C, Shannon MB, Miner JH, Shaw A. Pathogenesis of Nonimmune Glomerulopathies. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2006;1(1):349-374. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100119.
174. Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(2):344-347.
175. Steff A-M, Fortin M, Arguin C, Hugo P. Detection of a decrease in green fluorescent protein fluorescence for the monitoring of cell death: An assay amenable to high-throughput screening technologies. *Cytometry.* 2001;45(4):237-243. doi:10.1002/1097-0320(20011201)45:4<237::AID-CYTO10024>3.0.CO;2-J.
176. Soboleski MR, Oaks J, Halford WP. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J.* 2005;19(3):440-442. doi:10.1096/fj.04-3180fje.
177. Newbold KM, Sandison A, Howie AJ. Comparison of size of juxtamedullary and outer cortical glomeruli in normal adult kidney. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420(2):127-129. doi:10.1007/BF02358803.

178. Sison K, Eremina V, Baelde H, et al. Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(10):1691-1701. doi:10.1681/ASN.2010030295.
179. Tsuchida J, Matsusaka T, Ohtsuka M, et al. Establishment of Nephrin Reporter Mice and Use for Chemical Screening. Chatziantoniou C, ed. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157497. doi:10.1371/journal.pone.0157497.
180. Houser JR, Ford E, Chatterjea SM, Maleri S, Elston TC, Errede B. An improved short-lived fluorescent protein transcriptional reporter for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2012;29(12):519-530. doi:10.1002/yea.2932.
181. Tossidou I, Himmelseher E, Teng B, Haller H, Schiffer M. SUMOylation determines turnover and localization of nephrin at the plasma membrane. *Kidney Int*. 2014;86(6):1161-1173. doi:10.1038/ki.2014.198.
182. Hackett EA, Esch RK, Maleri S, Errede B. A family of destabilized cyan fluorescent proteins as transcriptional reporters in *S. cerevisiae*. *Yeast*. 2006;23(5):333-349. doi:10.1002/yea.1358.
183. Bisicchia P, Botella E, Devine KM. Suite of novel vectors for ectopic insertion of GFP, CFP and IYFP transcriptional fusions in single copy at the amyE and bglIS loci in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*. 2010;64(3):143-149. doi:10.1016/J.PLASMID.2010.06.002.
184. Corre G, Stockholm D, Arnaud O, et al. Stochastic Fluctuations and Distributed Control of Gene Expression Impact Cellular Memory. MacArthur BD, ed. *PLoS One*. 2014;9(12):e115574. doi:10.1371/journal.pone.0115574.
185. Dai C-L, Shi J, Chen Y, Iqbal K, Liu F, Gong C-X. Inhibition of protein synthesis alters protein degradation through activation of protein kinase B (AKT). *J Biol Chem*. 2013;288(33):23875-23883. doi:10.1074/jbc.M112.445148.
186. Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, et al. Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol*. 2001;2(10):RESEARCH0041.
187. Hollams EM, Giles KM, Thomson AM, Leedman PJ. mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res*. 2002;27(10):957-980.
188. Sharova L V, Sharov AA, Nedorezov T, Piao Y, Shaik N, Ko MSH. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res*. 2009;16(1):45-58. doi:10.1093/dnares/dsn030.
189. Liu X, Fan Q, Yang G, et al. Isolating glomeruli from mice: A practical approach for beginners. *Exp Ther Med*. 2013;5(5):1322-1326. doi:10.3892/etm.2013.1000.



190. Maezawa Y, Onay T, Scott RP, et al. Loss of the podocyte-expressed transcription factor Tcf21/Pod1 results in podocyte differentiation defects and FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(11):2459-2470. doi:10.1681/ASN.2013121307.
191. Nørgaard JO. Retraction of epithelial foot processes during culture of isolated glomeruli. *Lab Invest*. 1978;38(3):320-329.
192. Andrews PM. Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus. *Kidney Int*. 1981;20(5):549-562.
193. Takemoto M, He L, Norlin J, et al. Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J*. 2006;25(5):1160-1174. doi:10.1038/sj.emboj.7601014.
194. Brunskill EW, Georgas K, Rumballe B, Little MH, Potter SS. Defining the molecular character of the developing and adult kidney podocyte. *PLoS One*. 2011;6(9):e24640. doi:10.1371/journal.pone.0024640.
195. Boerries M, Grahammer F, Eiselein S, et al. Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. *Kidney Int*. 2013;83(6):1052-1064. doi:10.1038/ki.2012.487.
196. Grgic I, Hofmeister AF, Genovese G, et al. Discovery of new glomerular disease-relevant genes by translational profiling of podocytes in vivo. *Kidney Int*. 2014;86(6):1116-1129. doi:10.1038/ki.2014.204.
197. Sun J, Zhang GL, Li S, et al. Pathway analysis and transcriptomics improve protein identification by shotgun proteomics from samples comprising small number of cells--a benchmarking study. *BMC Genomics*. 2014;15 Suppl 9(Suppl 9):S1. doi:10.1186/1471-2164-15-S9-S1.
198. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003;83(1):253-307. doi:10.1152/physrev.00020.2002.
199. Qin X-S, Tsukaguchi H, Shono A, Yamamoto A, Kurihara H, Doi T. Phosphorylation of nephrin triggers its internalization by raft-mediated endocytosis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(12):2534-2545. doi:10.1681/ASN.2009010011.
200. Satoh D, Hirose T, Harita Y, et al. aPKC $\lambda$  maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J Biochem*. 2014;156(2):115-128. doi:10.1093/jb/mvu022.
201. Endlich N, Endlich K. Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol*. 2006;85(3-4):229-234. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.006.
202. Dai S, Wang Z, Pan X, et al. Functional analysis of promoter mutations in the ACTN4 and SYNPO genes in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(3):824-835. doi:10.1093/ndt/gfp394.

203. Akilesh S, Suleiman H, Yu H, et al. Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest*. 2011;121(10):4127-4137. doi:10.1172/JCI46458.
204. Perisic L, Rodriguez PQ, Hultenby K, et al. Schip1 Is a Novel Podocyte Foot Process Protein that Mediates Actin Cytoskeleton Rearrangements and Forms a Complex with Nherf2 and Ezrin. Rastaldi MP, ed. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122067. doi:10.1371/journal.pone.0122067.
205. Schmahl J, Raymond CS, Soriano P. PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat Genet*. 2007;39(1):52-60. doi:10.1038/ng1922.
206. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:160. doi:10.3389/fendo.2014.00160.
207. Blumenthal A, Giebel J, Ummanni R, Schlüter R, Endlich K, Endlich N. Morphology and migration of podocytes are affected by CD151 levels. *Am J Physiol Physiol*. 2012;302(10):F1265-F1277. doi:10.1152/ajprenal.00468.2011.
208. Blumenthal A, Giebel J, Warsow G, et al. Mechanical stress enhances CD9 expression in cultured podocytes. *Am J Physiol Physiol*. 2015;308(6):F602-F613. doi:10.1152/ajprenal.00190.2014.
209. De Paulo Castro Teixeira V, Blattner SM, Li M, et al. Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage. *Kidney Int*. 2005;67(2):514-523. doi:10.1111/J.1523-1755.2005.67108.X.
210. Marshall CB. Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic? *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(5):F831-F843. doi:10.1152/ajprenal.00313.2016.
211. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res*. 2012;347(1):129-140. doi:10.1007/s00441-011-1169-7.
212. Chugh SS. Transcriptional regulation of podocyte disease. *Transl Res*. 2007;149(5):237-242. doi:10.1016/j.trsl.2007.01.002.
213. Yu H, Suleiman H, Kim AHJ, et al. Rac1 Activation in Podocytes Induces Rapid Foot Process Effacement and Proteinuria. *Mol Cell Biol*. 2013;33(23):4755-4764. doi:10.1128/MCB.00730-13.
214. Brähler S, Yu H, Suleiman H, et al. Intravital and Kidney Slice Imaging of Podocyte Membrane Dynamics. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(11):3285-3290. doi:10.1681/ASN.2015121303.

215. Sedor JR, Madhavan SM, Kim JH, Konieczkowski M. Out on a LIM: chronic kidney disease, podocyte phenotype and the Wilm's tumor interacting protein (WTIP). *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2011;122:184-197.
216. Koide H, Soeda N, Ohno J. Biochemical properties of glomerular basement membrane in daunomycin nephrosis and nephrotoxic serum nephritis. *Ren Physiol.* 1981;4(2-3):102-107.
217. Kimura M, Takahasi H, Ohtake T, et al. Interstrain Differences in Murine Daunomycin-Induced Nephrosis. *Nephron.* 1993;63(2):193-198. doi:10.1159/000187182.
218. Shiraiwa K, Tsutsumi M, Konishi Y. Daunomycin-Induced Nephropathy, Rat. In: Springer, Berlin, Heidelberg; 1986:239-244. doi:10.1007/978-3-642-96956-0\_25.
219. Taatjes DJ, Fenick DJ, Koch TH. Epidoxoform: a hydrolytically more stable anthracycline-formaldehyde conjugate toxic to resistant tumor cells. *J Med Chem.* 1998;41(8):1306-1314. doi:10.1021/jm970739s.
220. Greenwald RB, Pendri A, Conover CD, et al. Drug delivery systems employing 1,4- or 1,6-elimination: poly(ethylene glycol) prodrugs of amine-containing compounds. *J Med Chem.* 1999;42(18):3657-3667. doi:10.1021/jm990166e.
221. Aligiannis N, Pouli N, Marakos P, Skaltsounis A-L, Pratsinis H. Synthesis and cytotoxic activity of a new potent daunomycinone derivative. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002;12(24):3505-3507.
222. Jiménez-Alonso S, Pérez-Lomas AL, Estévez-Braun A, et al. Bis-pyranobenzoquinones as a new family of reversal agents of the multidrug resistance phenotype mediated by P-glycoprotein in mammalian cells and the protozoan parasite *Leishmania*. *J Med Chem.* 2008;51(22):7132-7143. doi:10.1021/jm800403b.
223. Tseng C-H, Chen Y-L, Yang S-H, et al. Synthesis and antiproliferative evaluation of certain iminonaphtho[2,3-b]furan derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(14):5172-5182. doi:10.1016/j.bmc.2010.05.062.
224. Bodley A, Liu LF, Israel M, et al. DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. *Cancer Res.* 1989;49(21):5969-5978.
225. Cooper GM. *The Development and Causes of Cancer.* 2000.
226. Wilson L, Creswell KM, Chin D. The mechanism of action of vinblastine. Binding of [acetyl-3H]vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. *Biochemistry.* 1975;14(26):5586-5592.
227. Saleem MA, Ni L, Witherden I, et al. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol.* 2002;161(4):1459-1466. doi:10.1016/S0002-9440(10)64421-5.

228. Peired A, Angelotti ML, Ronconi E, et al. Proteinuria impairs podocyte regeneration by sequestering retinoic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(11):1756-1768. doi:10.1681/ASN.2012090950.
229. Ciampi O, Iacone R, Longaretti L, et al. Generation of functional podocytes from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2016;17(1):130-139. doi:10.1016/j.scr.2016.06.001.
230. Nakamura T, Ushiyama C, Osada S, Hara M, Shimada N, Koide H. Pioglitazone reduces urinary podocyte excretion in type 2 diabetes patients with microalbuminuria. *Metabolism*. 2001;50(10):1193-1196. doi:10.1053/meta.2001.26703.
231. Xing Y, Ye S, Chen Y, Hu W, Chen Y. Hydrochloride pioglitazone protects diabetic rats against podocyte injury through preserving glomerular podocalyxin expression. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(6):630-639.
232. Deb DK, Wang Y, Zhang Z, et al. Molecular mechanism underlying 1,25-dihydroxyvitamin D regulation of nephrin gene expression. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32011-32017. doi:10.1074/jbc.M111.269118.
233. Wang Y, Deb DK, Zhang Z, et al. Vitamin D Receptor Signaling in Podocytes Protects against Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(12):1977-1986. doi:10.1681/ASN.2012040383.
234. Vaughan MR, Pippin JW, Griffin S V, et al. ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo. *Kidney Int*. 2005;68(1):133-144. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00387.x.
235. Benigni a. Transcriptional Regulation of Nephrin Gene by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Agonist: Molecular Mechanism of the Antiproteinuric Effect of Pioglitazone. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(11):1624-1632. doi:10.1681/ASN.2005090983.
236. Xing C-Y, Saleem M a., Coward RJ, Ni L, Witherden IR, Mathieson PW. Direct effects of dexamethasone on human podocytes. *Kidney Int*. 2006;70:1038-1045. doi:10.1038/sj.ki.5001655.
237. Miglio G, Rosa AC, Rattazzi L, et al. The subtypes of peroxisome proliferator-activated receptors expressed by human podocytes and their role in decreasing podocyte injury. *Br J Pharmacol*. 2011;162:111-125. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01032.x.
238. Cheung PK, Klok PA, Baller JFW, Bakker WW. Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int*. 2000;57(4):1512-1520. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00996.x.
239. Lennon R, Singh A, Welsh GI, et al. Hemopexin induces nephrin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(11):2140-2149. doi:10.1681/ASN.2007080940.

240. Endlich N, Lange T, Kuhn J, et al. Bdnf: mrna expression in urine cells of patients with chronic kidney disease and its role in kidney function. *Anat Gesellschaft*. 2016;111th Annu.
241. Polacchini A, Metelli G, Francavilla R, et al. A method for reproducible measurements of serum BDNF: comparison of the performance of six commercial assays. *Sci Rep*. 2015;5:17989. doi:10.1038/srep17989.
242. Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, et al. Human trks: Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Expression of Extracellular Domain Immuno adhesins. *J Neurosci*. 1995;15(l):477-491.
243. Croll SD, Chesnutt CR, Rudge JS, et al. Co-infusion with a TrkB-Fc Receptor Body Carrier Enhances BDNF Distribution in the Adult Rat Brain. *Exp Neurol*. 1998;152(1):20-33. doi:10.1006/exnr.1998.6836.
244. Cazorla M, Jouvenceau A, Rose C, et al. Cyclotraxin-B, the First Highly Potent and Selective TrkB Inhibitor, Has Anxiolytic Properties in Mice. Kato T, ed. *PLoS One*. 2010;5(3):e9777. doi:10.1371/journal.pone.0009777.
245. Cazorla M, Prémont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1846-1857. doi:10.1172/JCI43992.
246. Endlich N, Lange T, Kuhn J, et al. BDNF: mRNA expression in urine cells of patients with chronic kidney disease and its role in kidney function. *J Cell Mol Med*. 2018. doi:10.1111/jcmm.13762.
247. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;1:575-582. doi:10.1016/S1097-2765(00)80057-X.
248. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(July):7962-7967. doi:10.1073/pnas.96.14.7962.
249. Roselli S, Heidet L, Sich M, et al. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2004;24(2):550-560. doi:10.1128/MCB.24.2.550-560.2004.
250. Mollet G, Ratelade J, Boyer O, et al. Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(10):2181-2189. doi:10.1681/ASN.2009040379.
251. Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*. 1999;286(5438):312-315.

252. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2000;279(4).
253. Shih N-Y, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP Localizes to the Slit Diaphragm and Binds to Nephrin via a Novel C-Terminal Domain. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2303-2308. doi:10.1016/S0002-9440(10)63080-5.
254. Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-Associated Protein Haploinsufficiency Is Linked to Glomerular Disease Susceptibility. *Science (80- ).* 2003;300(5623).
255. Russo LM, Srivatsan S, Seaman M, Suleiman H, Shaw AS, Comper WD. Albuminuria associated with CD2AP knockout mice is primarily due to dysfunction of the renal degradation pathway processing of filtered albumin. *FEBS Lett.* 2013;587(22):3738-3741. doi:10.1016/j.febslet.2013.09.045.
256. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int.* 2001;59(3):1003-1012. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590031003.x.
257. Ciani L, Patel A, Allen ND, French-Constant C. Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol.* 2003;23(10):3575-3582. doi:10.1128/mcb.23.10.3575-3582.2003.
258. Gee HY, Sadowski CE, Aggarwal PK, et al. FAT1 mutations cause a glomerulotubular nephropathy. *Nat Commun.* 2016;7:10822. doi:10.1038/ncomms10822.
259. Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest.* 2003;112:209-221. doi:10.1172/JCI200318242.
260. Bladt F, Aippersbach E, Gelkop S, et al. The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol.* 2003;23(13):4586-4597. doi:10.1128/MCB.23.13.4586-4597.2003.
261. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature.* 2006;440(7085):818-823. doi:10.1038/nature04662.
262. Jones N, New LA, Fortino MA, et al. Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1533-1543. doi:10.1681/ASN.2009010056.
263. Balbas MD, Burgess MR, Murali R, et al. MAGI-2 scaffold protein is critical for kidney barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(41):14876-14881. doi:10.1073/pnas.1417297111.

264. Brown EJ, Schlöndorff JS, Becker DJ, et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2010;42(1):72-76. doi:10.1038/ng.505.
265. Sun H, Schlöndorff J, Higgs HN, Pollak MR. Inverted Formin 2 Regulates Actin Dynamics by Antagonizing Rho/Diaphanous-related Formin Signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(6):917-929. doi:10.1681/ASN.2012080834.
266. Subramanian B, Sun H, Yan P, et al. Mice with mutant Inf2 show impaired podocyte and slit diaphragm integrity in response to protamine-induced kidney injury. *Kidney Int.* 2016;90(2):363-372. doi:10.1016/j.kint.2016.04.020.
267. Johnstone DB, Zhang J, George B, et al. Podocyte-specific deletion of Myh9 encoding nonmuscle myosin heavy chain 2A predisposes mice to glomerulopathy. *Mol Cell Biol.* 2011;31(10):2162-2170. doi:10.1128/MCB.05234-11.
268. Michaud J-L, Lemieux LI, Dubé M, Vanderhyden BC, Robertson SJ, Kennedy CRJ. Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1200-1211.
269. Dandapani S V, Sugimoto H, Matthews BD, et al. Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem.* 2007;282(1):467-477. doi:10.1074/jbc.M605024200.
270. Henderson JM, al-Waheeb S, Weins A, Dandapani SV, Pollak MR. Mice with altered  $\alpha$ -actinin-4 expression have distinct morphologic patterns of glomerular disease. *Kidney Int.* 2008;73(6):741-750. doi:10.1038/sj.ki.5002751.
271. Huber TB, Kwoh C, Wu H, et al. Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and synaptopodin. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1337-1345. doi:10.1172/JCI27400.
272. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol.* 2006;8(5):485-491. doi:10.1038/ncb1400.
273. Garg P, Verma R, Cook L, et al. Actin-depolymerizing Factor Cofilin-1 Is Necessary in Maintaining Mature Podocyte Architecture. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22676-22688. doi:10.1074/jbc.M110.122929.
274. Ashworth S, Teng B, Kaufeld J, et al. Cofilin-1 Inactivation Leads to Proteinuria – Studies in Zebrafish, Mice and Humans. Rappoport JZ, ed. *PLoS One.* 2010;5(9):e12626. doi:10.1371/journal.pone.0012626.
275. Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, et al. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 2010;29(21):3593-3606. doi:10.1038/emboj.2010.249.
276. Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, et al. Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4401-4411. doi:10.1172/JCI65289.

277. Schell C, Baumhagl L, Salou S, et al. N-WASP Is Required for Stabilization of Podocyte Foot Processes. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(5):713-721. doi:10.1681/ASN.2012080844.
278. Harris DP, Vogel P, Wims M, et al. Requirement for Class II Phosphoinositide 3-Kinase C2 in Maintenance of Glomerular Structure and Function. *Mol Cell Biol*. 2011;31(1):63-80. doi:10.1128/MCB.00468-10.
279. Lal MA, Andersson A-C, Katayama K, et al. Rhophilin-1 Is a Key Regulator of the Podocyte Cytoskeleton and Is Essential for Glomerular Filtration. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(3):647-662. doi:10.1681/ASN.2013111195.
280. Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*. 1996;122(11).
281. Sachs N, Kreft M, van den Bergh Weerman MA, et al. Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J Cell Biol*. 2006;175(1):33-39. doi:10.1083/jcb.200603073.
282. Sachs N, Claessen N, Aten J, et al. Blood pressure influences end-stage renal disease of Cd151 knockout mice. *J Clin Invest*. 2012;122(1):348-358. doi:10.1172/JCI58878.
283. Kanasaki K, Kanda Y, Palmsten K, et al. Integrin beta1-mediated matrix assembly and signaling are critical for the normal development and function of the kidney glomerulus. *Dev Biol*. 2008;313(2):584-593. doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.047.
284. El-Aouni C, Herbach N, Blattner SM, et al. Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(5):1334-1344. doi:10.1681/ASN.2005090921.
285. Dai C, Stolz DB, Bastacky SI, et al. Essential role of integrin-linked kinase in podocyte biology: Bridging the integrin and slit diaphragm signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(8):2164-2175. doi:10.1681/ASN.2006010033.
286. Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, et al. DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int*. 2004;66(1):102-111. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00712.x.
287. Sugar T, Wassenhove-McCarthy DJ, Esko JD, van Kuppevelt TH, Holzman L, McCarthy KJ. Podocyte-specific deletion of NDST1, a key enzyme in the sulfation of heparan sulfate glycosaminoglycans, leads to abnormalities in podocyte organization in vivo. *Kidney Int*. 2014;85(2):307-318. doi:10.1038/ki.2013.281.
288. Tian X, Kim JJ, Monkley SM, et al. Podocyte-associated talin1 is critical for glomerular filtration barrier maintenance. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1098-1113. doi:10.1172/JCI69778.



289. Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, et al. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev.* 1996;10(23):2981-2992.
290. Miner JH, Sanes JR. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol.* 1996;135(5):1403-1413.
291. Rubel D, Frese J, Martin M, et al. Collagen receptors integrin alpha2beta1 and discoidin domain receptor 1 regulate maturation of the glomerular basement membrane and loss of integrin alpha2beta1 delays kidney fibrosis in COL4A3 knockout mice. *Matrix Biol.* 2014;34:13-21. doi:10.1016/j.matbio.2014.01.006.
292. Arnold CN, Xia Y, Lin P, et al. Rapid Identification of a Disease Allele in Mouse Through Whole Genome Sequencing and Bulk Segregation Analysis. *Genetics.* 2011;187(3):633-641. doi:10.1534/genetics.110.124586.
293. Rheault MN, Kren SM, Thielen BK, et al. Mouse model of X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(6):1466-1474. doi:10.1097/01.ASN.0000130562.90255.8F.
294. Noakes PG, Miner JH, Gautam M, Cunningham JM, Sanes JR, Merlie JP. The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin  $\beta$ 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin  $\beta$ 1. *Nat Genet.* 1995;10(4):400-406. doi:10.1038/ng0895-400.
295. Jarad G, Cunningham J, Shaw AS, Miner JH. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*<sup>-/-</sup> mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J Clin Invest.* 2006;116(8):2272-2279. doi:10.1172/JCI28414.
296. Miner JH, Li C. Defective Glomerulogenesis in the Absence of Laminin  $\alpha$ 5 Demonstrates a Developmental Role for the Kidney Glomerular Basement Membrane. *Dev Biol.* 2000;217(2):278-289. doi:10.1006/dbio.1999.9546.
297. Goldberg S, Adair-Kirk TL, Senior RM, Miner JH. Maintenance of glomerular filtration barrier integrity requires laminin alpha5. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(4):579-586. doi:10.1681/ASN.2009091004.
298. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993;74(4):679-691. doi:10.1016/0092-8674(93)90515-R.
299. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development.* 1999;126(9):1845-1857.
300. Sierig R. Analysis of *Wt1* function using a conditional knock-out mouse model. *Biol Fak Friedrich-Schiller-Universität Jena.* 2009.
301. Rohr C, Prestel J, Heidet L, et al. The LIM-homeodomain transcription factor *Lmx1b* plays a crucial role in podocytes. *J Clin Invest.* 2002;109(8):1073-1082. doi:10.1172/JCI13961.

302. Miner JH, Morello R, Andrews KL, et al. Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest*. 2002;109(8):1065-1072. doi:10.1172/JCI13954.
303. Motojima M, Ogiwara S, Matsusaka T, et al. Conditional knockout of Foxc2 gene in kidney: efficient generation of conditional alleles of single-exon gene by double-selection system. *Mamm Genome*. 2016;27(1-2):62-69. doi:10.1007/s00335-015-9610-y.
304. Motojima M, Tanimoto S, Ohtsuka M, Matsusaka T, Kume T, Abe K. Characterization of Kidney and Skeleton Phenotypes of Mice Double Heterozygous for Foxc1 and Foxc2. *Cells Tissues Organs*. 2016;201(5):380-389. doi:10.1159/000445027.
305. Motojima M, Kume T, Matsusaka T. Foxc1 and Foxc2 are necessary to maintain glomerular podocytes. *Exp Cell Res*. 2017;352(2):265-272. doi:10.1016/j.yexcr.2017.02.016.
306. Sadl VS, Jin F, Yu J, et al. The Mouse Kreisler (Krm11/MafB) Segmentation Gene Is Required for Differentiation of Glomerular Visceral Epithelial Cells. *Dev Biol*. 2002;249(1):16-29. doi:10.1006/dbio.2002.0751.
307. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, et al. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol*. 2006;26(15):5715-5727. doi:10.1128/MCB.00001-06.
308. Morito N, Yoh K, Ojima M, et al. Overexpression of Mafb in podocytes protects against diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(11):2546-2557. doi:10.1681/ASN.2013090993.
309. Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, et al. The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development*. 1999;126(24):5771-5783.
310. Zhang S-Y, Kamal M, Dahan K, et al. c-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Sci Signal*. 2010;3(122):ra39. doi:10.1126/scisignal.2000678.
311. Sendeyo K, Audard V, Zhang S, et al. Upregulation of c-mip is closely related to podocyte dysfunction in membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2013;83(3):414-425. doi:10.1038/ki.2012.426.
312. Mallipattu SK, Liu R, Zheng F, et al. Kruppel-like Factor 15 (KLF15) Is a Key Regulator of Podocyte Differentiation. *J Biol Chem*. 2012;287(23):19122-19135. doi:10.1074/jbc.M112.345983.
313. Mallipattu SK, Guo Y, Revelo MP, et al. Krüppel-Like Factor 15 Mediates Glucocorticoid-Induced Restoration of Podocyte Differentiation Markers. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(1):166-184. doi:10.1681/ASN.2015060672.

314. Wang Y, Jarad G, Tripathi P, et al. Activation of NFAT Signaling in Podocytes Causes Glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(10):1657-1666. doi:10.1681/ASN.2009121253.
315. Ashraf S, Gee HY, Woerner S, et al. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5179-5189. doi:10.1172/JCI69000.
316. Krendel M, Kim S V., Willinger T, et al. Disruption of Myosin 1e Promotes Podocyte Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(1):86-94. doi:10.1681/ASN.2007111172.
317. Chase SE, Encina C V., Stolzenburg LR, Tatum AH, Holzman LB, Krendel M. Podocyte-specific knockout of myosin 1e disrupts glomerular filtration. *AJP Ren Physiol*. 2012;303(7):F1099-F1106. doi:10.1152/ajprenal.00251.2012.
318. Mao J, Wang D, Mataleena P, et al. Myo1e Impairment Results in Actin Reorganization, Podocyte Dysfunction, and Proteinuria in Zebrafish and Cultured Podocytes. Rastaldi MP, ed. *PLoS One*. 2013;8(8):e72750. doi:10.1371/journal.pone.0072750.
319. Krall P, Canales CP, Kairath P, et al. Podocyte-specific overexpression of wild type or mutant *trpc6* in mice is sufficient to cause glomerular disease. *PLoS One*. 2010;5(9):e12859. doi:10.1371/journal.pone.0012859.
320. Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, et al. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptp<sup>ro</sup>)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest*. 2000;106(10):1281-1290. doi:10.1172/JCI7236.
321. Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, et al. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med*. 2001;194(1):13-27.
322. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, et al. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*. 1997;151(4):1141-1152.
323. Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Kerjaschki D. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14 Suppl 1:9-11.
324. Zhu L, Jiang R, Aoudjit L, Jones N, Takano T. Activation of RhoA in Podocytes Induces Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1621-1630. doi:10.1681/ASN.2010111146.
325. Babelova A, Jansen F, Sander K, et al. Activation of Rac-1 and RhoA Contributes to Podocyte Injury in Chronic Kidney Disease. Rastaldi MP, ed. *PLoS One*. 2013;8(11):e80328. doi:10.1371/journal.pone.0080328.

326. Wang L, Ellis MJ, Gomez JA, et al. Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases. *Kidney Int.* 2012;81(11):1075-1085. doi:10.1038/ki.2011.472.
327. Robins R, Baldwin C, Aoudjit L, Côté J-F, Gupta IR, Takano T. Rac1 activation in podocytes induces the spectrum of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2017. doi:10.1016/j.kint.2017.03.010.
328. Scott RP, Hawley SP, Ruston J, et al. Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1149-1154. doi:10.1681/ASN.2011121206.
329. Blattner SM, Hodgin JB, Nishio M, et al. Divergent functions of the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in podocyte injury. *Kidney Int.* 2013;84(5):920-930. doi:10.1038/ki.2013.175.
330. Kato H, Gruenwald A, Suh JH, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in podocytes integrates cell adhesion, differentiation, and survival. *J Biol Chem.* 2011;286(29):26003-26015. doi:10.1074/jbc.M111.223164.
331. Canaud G, Bienaimé F, Viau A, et al. AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease. *Nat Med.* 2013;19(10):1288-1296. doi:10.1038/nm.3313.
332. Waters AM, Wu MYJ, Onay T, et al. Ectopic notch activation in developing podocytes causes glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(6):1139-1157. doi:10.1681/ASN.2007050596.
333. Niranjana T, Bielez B, Gruenwald A, et al. The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nat Med.* 2008;14(3):290-298. doi:10.1038/nm1731.
334. Sweetwyne MT, Gruenwald A, Niranjana T, Nishinakamura R, Strobl LJ, Susztak K. Notch1 and Notch2 in Podocytes Play Differential Roles During Diabetic Nephropathy Development. *Diabetes.* 2015;64(12):4099-4111. doi:10.2337/db15-0260.
335. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, et al. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2197-2209. doi:10.1172/JCI44774.
336. Inoki K, Mori H, Wang J, et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2181-2196. doi:10.1172/JCI44771.

## 7. Anhang

### 7.1. Geräte, Materialien und Lösungen

#### Laborgeräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
EASY-CAST™ Elektrophorese System	Owl Scientific Inc., Woburn, MA, USA
EVO LS10 Rasterelektronenmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Forma™ CO <sub>2</sub> -Inkubator mit Wassermantel Serie II	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus™ Biofuge Primo Zentrifuge	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
INTAS Gel Jet Imager System	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Kryostat 2800 Grigocut N	Reichert-Jung, Nussloch
Leica DMI 6000B	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Leica TCS SP5 Konfokal-Mikroskop	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
LIBRA 120 Transmissionselektronenmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mastercycler Gradient PCR-Gerät	Eppendorf, Hamburg
MC1 Analytic AC 120S Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
MC1 Laboratory LC 420 Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Mikrotiterplattenlesegerät	Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Österreich
Mini-PROTEAN® Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Perfusionspumpe MINIPULS® 3	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
PowerPac™ Basic Power Netzgerät	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Reax Control Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Reinstwassersystem TKA GenPure	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert

SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SOLiD™ EZ Bead™ Enricher	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SOLiD™ 5500xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sprout Minizentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf
System V95 vertikaler Standautoklav	System GmbH, Linden
ThermoMixer® 5436	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ultracut UCT Ultramikrotom	Leica Biosystems, Heidelberg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

### **Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	Sigma Aldrich, München
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose (LE)	Biozym, Hessisch Oldendorf
All-trans-Retinsäure	Sigma Aldrich, München
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Carl Roth, Karlsruhe
Ambion® ERCC spike-in Kontrolle	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Angiogenese-Objektträger	ibidi GmbH, München
ANA-12	Sigma Aldrich, München
Brain derived neurotrophic factor, human	Sigma Aldrich, München
Bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich, München
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München
Calciumchlorid	FLUKA Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chloroform	J.T. Baker®, Avantor™ Performance Materials Inc., Deventer, Niederlande
Daunorubicin-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, München
Dexamethason-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München
Dithiothreitol (Ultrapure)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dynabeads® M-450 Epoxy	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

EASYstrainer™ Zellsiebe	Greiner Bio-One, VWR International GmbH, Radnor, PA; USA
Einmalspritzen (10 ml, 1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalkanülen BD Microlance™ 3	BD Biosciences, Heidelberg
Einmalskalpelle	Feather SAFETY Razor co. LTD, Osaka, Japan
Epon® 812	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure (100 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (99 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, München
Falcon™-Röhrchen (50 ml, 15 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Fischgelatine	Sigma Aldrich, München
Fötales Bovines Serum (FBS)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fujifilm Super RX	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf
GBX Entwickler-Konzentrat	Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA
GBX Fixier-Konzentrat	Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, München
Glycerin	Sigma Aldrich, München
Hämopexin	Sigma Aldrich, München
HEPES	Merck KGaA, Darmstadt
High Precision Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Hoechst 33342	Sigma Aldrich, München
Iodacetamid	Sigma Aldrich, München
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ketamin (100 mg/ml)	Selectavet, Weyarn-Holzolling
Kollagen, Typ IV (Maus)	BD Biosciences, Heidelberg
Kollagenase A	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Lys-C	Promega, Madison, WI, USA
Magnesiumchlorid	FLUKA Chemie AG, Buchs, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München
Milchpulver (Blotting Grade)	Carl Roth, Karlsruhe

## 7. Anhang

---

Mini-PROTEAN® TGX™ Stain-Free Precast Gel	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mowiol	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol GmbH, Hamburg
NUNC™ 4-Well Platte	Thermo Fisher™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Osmiumtetroxid (2 % in Wasser)	Sigma Aldrich, München
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (Dulbecco) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
PCR-Wasser	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen (1 ml, 100 µl, 10 µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pioglitazon-Hydrchlorid	Sigma Aldrich, München
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, München
Reverse Phase nano-Acquity UPLC Säule	Waters GmbH, Eschborn
RPMI 1640-Medium (phenolrotfrei)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Rotilabo® Spritzenfilter (Ø 22 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese®10x TBE-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe
SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
SafeSeal® SurPhob® Filterspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
SOLiD™ 6-Lane Flowchip	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sugi® Saugtupfer	Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Thiourea	Sigma Aldrich, München
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin	Promega, Madison, WI, USA
TrkB-Fc Chimera, human	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Urea	Sigma Aldrich, München
Vinblastinsulfat	Sigma Aldrich, München
Xylasel (20 mg/ml Xylazin)	Selectavet, Weyarn-Holzolling
ZipTip® µC18 Pipettenspitzen	Merck Millipore, Darmstadt



**Lösungen**

Agarosegel (2 %)	Agarose	2 g
	1x TBE Lösung	100 ml
	Ethidiumbromid (2,5 µg/ml)	2 µl
Blocklösung (Immunhistochemie)	FBS	20 ml
	Albumin Fraktion V	20 g
	Fischgelatine	2 g
	PBS	ad 1 l
Blocklösung (Western Blot)	Magermilchpulver	5 g
	TBST	ad 100 ml
Entwicklerlösung (Western Blot)	GBX Entwickler-Konzentrat	200 ml
	Aqua dest.	800 ml
Fixierlösung (SEM)	Glutaraldehyd	2,5 g
	PBS	100 ml
Fixierlösung (Western Blot)	GBX Fixier-Konzentrat	200 ml
	Aqua dest.	800 ml
Hoechst 33342	Hoechst 33342	1 mg
	Aqua dest.	1 ml
Injektionsnarkotikum	Ketamin (100 mg/ml)	0,9 ml
	Xylasel (20 mg/ml)	0,6 ml
	isotonische NaCl-Lösung	6 ml
Kollagen, Type IV	Kollagen Typ IV (Maus)	1 mg
	PBS	35 ml
Kollagenase A	Kollagenase A	1 mg
	Aqua dest.	1 ml

## 7. Anhang

---

Mowiol	PBS	40 ml
	Mowiol	10 g
	Glycerol	20 ml
1 % Osmiumtetroxid (SEM)	Osmiumtetroxid (2 % in Wasser)	2 ml
	Aqua dest.	ad 4 ml
PAGE-Auftragslösung	Tris (0,5 M, pH 6,8)	7 ml
	SDS	1 g
	Glycerin (30 %)	3 ml
	$\beta$ -Mercaptoethanol	0,6 ml
	Bromphenolblau	1,2 g
2 % Paraformaldehyd	Paraformaldehyd	2 g
	PBS	ad 100 ml
	Natrimhydroxid (1 M)	pH 7,3 - 7,4
Popidiumiodidlösung	Propidiumiodid	1 mg
	Aqua dest.	ad 1 ml
RPMI 1640-Medium	FBS	50 ml
	Penicillin/ Streptomycin	5,5 ml
	RPMI 1640	500 ml
1x TBE-Puffer	Rotiphorese®10x TBE-Puffer	100 ml
	Aqua dest.	900 ml
10x TBS	Tris	60,6 g
	Natrimchlorid	87,7 g
	Calciumchlorid	14,7 g
	Magnesiumchlorid	2,00 g
	Aqua dest.	ad 1 l
1x TBST	10x TBS	100 ml
	Tween 20	500 $\mu$ l
	Aqua dest.	900 ml

1x Transferpuffer (Western Blot)	5x Transferpuffer	100 ml
	Ethanol (99 %)	100 ml
	Aqua dest.	800 ml
Urea/Thiourea-Puffer	Urea	1,92 g
	Thiourea	0,61 g
	Aqua dest.	ad 4 ml

### **Reaktionskits und Längenstandards**

Agencourt <sup>®</sup> AMPure <sup>®</sup> XP-Kit	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Bradford Reagenz, 5x	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Scientific <sup>™</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific <sup>™</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phire <sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase	Thermo Scientific <sup>™</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce <sup>™</sup> ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific <sup>™</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Precision Plus Protein <sup>™</sup> All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
QuantiTect <sup>®</sup> Reverse Transcription Kit	Quiagen, Venlo, Niederlande
Ribo-Zero rRNA Removal Kit	Illumina Inc., Epicentre, Madison, WI, USA
SOLID <sup>™</sup> EZ Bead <sup>™</sup> Emulsifier Oil Pack Kit	Applied Biosystems <sup>™</sup> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trans-Blot <sup>®</sup> Turbo <sup>™</sup> RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TRI-Reagenz	Sigma Aldrich, München

## 7.2. Experimentelle Befunde zu den untersuchten Podozytenmarkern

**Tab. 14 Experimentelle Befunde zu den untersuchten Podozytenmarkern.**

KO - Knock-Out, KD - Knock-Down, ZF - Zebrafisch, ÜE - Überexpression

<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b><i>In vivo</i> Befunde</b>	<b>Lit.</b>
<b><i>Nphs1</i></b>	Nephrin	Schlitzmembran	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	46,68,247,248
<b><i>Nphs2</i></b>	Podocin	Schlitzmembran	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	249,250
<b><i>Cd2ap</i></b>	CD2-associated protein	Schlitzmembran	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	251–255
<b><i>Fat1</i></b>	Fat 1 cadherin	Schlitzmembran	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	256–258
<b><i>Kirrel1</i></b>	Kin of IRRE-like protein 1	Schlitzmembran	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	36,68,259
<b><i>Nck1</i></b>	Cytoplasmic protein NCK1	Schlitzmembran	KO-Maus: ohne renalen Phänotyp Doppel-KO mit <i>Nck2</i> : Proteinurie, Effacement	260–262
<b><i>Nck2</i></b>	Cytoplasmic protein NCK2	Schlitzmembran	KO-Maus: ohne renalen Phänotyp Doppel-KO mit <i>Nck1</i> : Proteinurie, Effacement	260–262
<b><i>Magi2</i></b>	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 2	Schlitzmembran	KO-Maus: Proteinurie/Anurie, Effacement	41,263

<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b><i>In vivo</i> Befunde</b>	<b>Lit.</b>
<b><i>Inf2</i></b>	Inverted Formin-2	Zytoskelett	Knock In-Maus: Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen	264–266
<b><i>Myh9</i></b>	Myosin-9	Zytoskelett	KO-Maus: Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen	267
<b><i>Actn4</i></b>	$\alpha$ -Actinin 4	Zytoskelett	KO-Maus: Proteinurie, Effacement, verringerte Adhärenz	23,24, 268–270
<b><i>Arhgap24</i></b>	Rho GTPase-activating protein 24	Zytoskelett	Mutation in FSGS, Erhöht in differenzierten Podozyten	203
<b><i>Synpo</i></b>	Synaptopodin	Zytoskelett	KO-Maus: Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen	26,271,272
<b><i>Cfl1</i></b>	Cofilin-1	Zytoskelett	KO-Maus: Proteinurie, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen,	273,274
<b><i>Dnm1</i></b>	Dynamamin-1	Zytoskelett	Doppel-KO-Maus mit Dyn2: Proteinurie, Effacement	275,276
<b><i>Dnm2</i></b>	Dynamamin-2	Zytoskelett	Doppel-KO-Maus mit Dyn1: Proteinurie, Effacement	275,276
<b><i>Wasl</i></b>	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	Zytoskelett	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	277
<b><i>Pik3c2a</i></b>	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit $\alpha$	Zytoskelett	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	278

<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b><i>In vivo</i> Befunde</b>	<b>Lit.</b>
<b><i>Rhpn1</i></b>	Rhophilin-1	Zytoskelett	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	279
<b><i>Schip1</i></b>	Schwannomin interacting protein 1	Zytoskelett	KD-ZF: Proteinurie, Effacement	204
<b><i>Itga3</i></b>	Integrin $\alpha$ 3	Zell-Matrix-Kontakt	KO-Maus: Proteinurie, Effacement, Veränderung der GBM	280,281
<b><i>Cd151</i></b>	Cluster of Differentiation 151	Zell-Matrix-Kontakt	KO-Maus: Proteinurie, Effacement, Veränderung der GBM	281,282
<b><i>Itgb1</i></b>	Integrin $\beta$ 1	Zell-Matrix-Kontakt	KO-Maus: Proteinurie, Effacement, Veränderung der GBM	19,283
<b><i>Ilk</i></b>	Integrin-linked Kinase	Zell-Matrix-Kontakt	KO-Maus: Proteinurie, Effacement, Veränderung der GBM	284,285
<b><i>Ddr1</i></b>	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	Zell-Matrix-Kontakt	KO-Maus: Veränderung der GBM, Verlust der Schlitzmembran	286
<b><i>Ndst1</i></b>	N-Deacetylase/ N-Sulfotransferase 1	Zell-Matrix-Kontakt	KO-Maus: Effacement, verringerte Adhärenz	287
<b><i>Tln1</i></b>	Talin-1	Zell-Matrix-Kontakt	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	288
<b><i>Col4a3</i></b>	Collagen type IV $\alpha$ 3	Glomeruläre Basalmembran	KO-Maus: Proteinurie, partielles Effacement, Veränderung der GBM	289–291
<b><i>Col4a4</i></b>	Collagen type IV $\alpha$ 4	Glomeruläre Basalmembran	KO-Maus: Proteinurie, Glomerulosklerose	292

<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b><i>In vivo</i> Befunde</b>	<b>Lit.</b>
<b><i>Col4a5</i></b>	Collagen type IV $\alpha$ 5	Glomeruläre Basalmembran	KO-Maus: Proteinurie, Effacement, Veränderung der GBM	293
<b><i>Lamb2</i></b>	Laminin $\beta$ 2	Glomeruläre Basalmembran	KO-Maus: Proteinurie, Effacement, Veränderte Zusammensetzung der GBM	294,295
<b><i>Lama5</i></b>	Laminin $\alpha$ 5	Glomeruläre Basalmembran	KO-Maus: letal (E7), fehlende Kapillarisation und Fußfortsätze	296,297
<b><i>Wt1</i></b>	Wilms tumor protein homolog	Transkription	KO-Maus: letal, keine Nierenentwicklung konditionelle KO-Maus: Proteinurie, Effacement	298–300
<b><i>Lmx1b</i></b>	LIM homeobox transcription factor 1 $\beta$	Transkription	KO-Maus: fehlende Kapillarisation, gering fenestriertes Endothel, unverzweigte Podozyten	301,302
<b><i>Foxc2</i></b>	Forkhead box C2	Transkription	KO-Maus: fehlende Kapillarisation, unverzweigte Podozyten Doppel-KO mit <i>Foxc1</i> : Proteinurie, Effacement	303–305
<b><i>Mafb</i></b>	Transcription factor MafB	Transkription	KO-Maus: Effacement, Proteinurie ÜE in Mäusen: Protektiv bei STZ induzierte DN	306–308
<b><i>Tcf21</i></b>	Transcription factor 21	Transkription	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	137,190,309
<b><i>Cmip</i></b>	C-Maf inducing protein	Transkription	ÜE in Mäusen: Proteinurie	310,311

<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b><i>In vivo</i> Befunde</b>	<b>Lit.</b>
<b><i>Klf15</i></b>	Krüppel-like factor 15	Transkription	KO-Maus: Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen	312,313
<b><i>Nfatc1</i></b>	Nuclear factor of activated t-cells, cytoplasmic 1	Transkription	Konstitutive Aktivierung in Mäusen: Proteinurie, Effacement	314
<b><i>Adck4</i></b>	AarF domain containing kinase 4	Signalwege	KD-ZF: Effacement	315
<b><i>Myo1e</i></b>	Unconventional myosin-1e	Signalwege	KO-Maus: Proteinurie, Effacement; Veränderung ähnliche Ergebnisse im ZF	316–318
<b><i>Trpc6</i></b>	Short transient receptor potential channel 6	Signalwege	ÜE in Mäusen: Proteinurie, Effacement,	319
<b><i>Ptpro</i></b>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase O	Signalwege	KO-Maus: abgeflachte Primärfortsätze und verkürzte Fußfortsätze	320
<b><i>Podxl</i></b>	Podocalyxin	Signalwege	KO-Maus: Anurie, Effacement, gering fenestriertes Endothel	321
<b><i>Pdgn</i></b>	Podoplanin	Signalwege	Erhöht in PAN-induzierter Nephrose und spontan proteinurischen Dahl Salz-sensitiven Ratten	322,323
<b><i>Rhoa</i></b>	Transforming protein RhoA	Signalwege	Konstitutive Aktivierung in Mäusen: Proteinurie, Effacement Inaktivierung in Mäusen: Proteinurie, Effacement	324–326



<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>	<b><i>In vivo</i> Befunde</b>	<b>Lit.</b>
<b><i>Rac1</i></b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Signalwege	Konsituative Aktivierung in Mäusen: Proteinurie Effacement, Inhibition verringert Nierenschäden nach 5/6 Nephrektomie	213,325,327
<b><i>Cdc42</i></b>	Cell division cycle 42	Signalwege	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	328,329
<b><i>Ctnnb1</i></b>	Catenin $\beta$ 1	Signalwege	Stabilisierung durch Mutagenese in Mäusen: Proteinurie, Effacement, Veränderungen der GBM KO-Maus: Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen	330
<b><i>Akt2</i></b>	RAC-beta serine/threonine-protein kinase 2	Signalwege	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	331
<b><i>Notch1</i></b>	Notch1	Signalwege	Induktion (Tet-On-Maus): Proteinurie, Effacement, KO-Maus: geringere Empfindlichkeit für Nierenerkrankungen	332–334
<b><i>Rptor</i></b>	Regulatory associated protein of mTOR complex 1	Signalwege	KO-Maus: Proteinurie, Effacement	335,336
<b><i>Rictor</i></b>	Regulatory associated protein of mTOR complex 2	Signalwege	KO-Maus: Proteinurie, keine morphologischen Veränderungen	335

### 7.3. Funktionelle Annotations-Cluster

**Tab. 15 Funktionelle Annotations-Cluster 3 d vs. 0 d.** Um 50 % signifikant regulierte Proteine: 181, angereicherte Cluster (AF  $\geq 1,5$ ): 9, Annotations-Cluster wurden nach der Höhe ihres Anreicherungsfaktors (AF) sortiert

<b>Annotations-Cluster 1</b>		<b>AF: 14.94</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Ribosome</b>	KEGG_PATHWAY	24	13.95	16.64	1.41E-22
<b>Ribosomal protein</b>	SP_PIR_KEYWORDS	24	13.95	14.24	7.35E-20
<b>Structural constituent of ribosome</b>	GOTERM_MF_FAT	23	13.37	14.15	3.75E-19
<b>Translation</b>	GOTERM_BP_FAT	29	16.86	8.76	1.41E-18
<b>Ribosome</b>	GOTERM_CC_FAT	24	13.95	11.84	2.80E-18
<b>Ribonucleoprotein</b>	SP_PIR_KEYWORDS	26	15.12	10.27	4.69E-18
<b>Ribonucleoprotein complex</b>	GOTERM_CC_FAT	29	16.86	5.95	2.88E-14
<b>Structural molecule activity</b>	GOTERM_MF_FAT	29	16.86	5.99	2.92E-14
<b>Non-membrane-bounded organelle</b>	GOTERM_CC_FAT	41	23.84	2.02	8.06E-06
<b>Intracellular non-membrane-bounded organelle</b>	GOTERM_CC_FAT	41	23.84	2.02	8.06E-06

<b>Annotations-Cluster 2</b>		<b>AF: 2.99</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Mitochondrion</b>	SP_PIR_KEYWORDS	22	12.79	2.92	1.89E-05
<b>Mitochondrion</b>	GOTERM_CC_FAT	30	17.44	2.15	8.39E-05

<b>Mitochondrial part</b>	GOTERM_CC_FAT	17	9.88	3.07	1.15E-04
<b>Transit peptide</b>	SP_PIR_KEYWORDS	15	8.72	3.45	1.17E-04
<b>Transit peptide:Mitochondrion</b>	UP_SEQ_FEATURE	15	8.72	3.17	2.78E-04
<b>Mitochondrial lumen</b>	GOTERM_CC_FAT	9	5.23	5.23	3.13E-04
<b>Mitochondrial matrix</b>	GOTERM_CC_FAT	9	5.23	5.23	3.13E-04
<b>Organelle inner membrane</b>	GOTERM_CC_FAT	11	6.40	3.34	1.63E-03
<b>Mitochondrial inner membrane</b>	GOTERM_CC_FAT	10	5.81	3.20	3.93E-03
<b>Mitochondrial membrane</b>	GOTERM_CC_FAT	11	6.40	2.83	5.31E-03
<b>Mitochondrial envelope</b>	GOTERM_CC_FAT	11	6.40	2.66	8.02E-03
<b>Organelle envelope</b>	GOTERM_CC_FAT	13	7.56	2.28	1.11E-02
<b>Envelope</b>	GOTERM_CC_FAT	13	7.56	2.27	1.14E-02
<b>Organelle membrane</b>	GOTERM_CC_FAT	14	8.14	1.64	8.13E-02

**Annotations-Cluster 3****AF: 2.71****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine  
Abs. %****AF****q-Wert**

<b>Protein biosynthesis</b>	SP_PIR_KEYWORDS	13	7.56	9.82	8.24E-09
<b>Ligase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	11	6.40	3.98	4.52E-04
<b>Aminoacyl-tRNA synthetase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	5	2.91	13.46	4.92E-04
<b>tRNA aminoacylation for protein translation</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	10.47	1.26E-03
<b>tRNA aminoacylation</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	10.47	1.26E-03
<b>Amino acid activation</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	10.47	1.26E-03

<b>Ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related compounds</b>	GOTERM_MF_FAT	5	2.91	9.68	1.69E-03
<b>Ligase activity, forming carbon-oxygen bonds</b>	GOTERM_MF_FAT	5	2.91	9.68	1.69E-03
<b>Aminoacyl-tRNA ligase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	5	2.91	9.68	1.69E-03
<b>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</b>	KEGG_PATHWAY	5	2.91	7.35	4.35E-03
<b>"KMSKS" region</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.74	18.96	1.05E-02
<b>"HIGH" region</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.74	16.73	1.34E-02
<b>tRNA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	4.26	2.94E-02
<b>Aminoacyl-tRNA synthetase, class I, conserved site</b>	INTERPRO	3	1.74	9.50	3.92E-02
<b>Rossmann-like alpha/beta/alpha sandwich fold</b>	INTERPRO	3	1.74	8.07	5.26E-02
<b>ncRNA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	6	3.49	2.86	5.79E-02

**Annotations-Cluster 4****AF: 2.64****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine****AF****q-Wert****Abs. %****Coenzyme metabolic process**

GOTERM\_BP\_FAT

10

5.81

6.74

1.67E-05

**Glutathione metabolic process**

GOTERM\_BP\_FAT

5

2.91

20.08

9.77E-05

**Cofactor metabolic process**

GOTERM\_BP\_FAT

10

5.81

5.29

1.11E-04

**Peptide metabolic process**

GOTERM\_BP\_FAT

5

2.91

12.68

6.07E-04

<b>Glutathione metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	6	3.49	7.12	1.36E-03
<b>Sulfur metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	5.13	1.61E-02
<b>Thioredoxin fold</b>	INTERPRO	5	2.91	5.08	1.68E-02
<b>Coenzyme biosynthetic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	2.33	6.02	2.83E-02
<b>Cellular amino acid derivative metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	3.42	5.79E-02
<b>Cofactor biosynthetic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	2.33	4.24	6.76E-02

<b>Annotations-Cluster 5</b>		<b>AF: 1.71</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Generation of precursor metabolites and energy</b>	GOTERM_BP_FAT	11	6.40	4.06	3.70E-04
<b>Electron transport</b>	SP_PIR_KEYWORDS	5	2.91	5.25	1.50E-02
<b>Electron transport chain</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	4.30	2.85E-02
<b>Transport</b>	SP_PIR_KEYWORDS	10	5.81	0.67	9.67E-01

<b>Annotations-Cluster 6</b>		<b>AF: 1.70</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Mitochondrial lumen</b>	GOTERM_CC_FAT	9	5.23	5.23	3.13E-04
<b>Mitochondrial matrix</b>	GOTERM_CC_FAT	9	5.23	5.23	3.13E-04
<b>Intracellular organelle lumen</b>	GOTERM_CC_FAT	18	10.47	1.50	8.31E-02
<b>Organelle lumen</b>	GOTERM_CC_FAT	18	10.47	1.50	8.47E-02

<b>Membrane-enclosed lumen</b>	GOTERM_CC_FAT	18	10.47	1.45	1.06E-01
<b>Nuclear lumen</b>	GOTERM_CC_FAT	8	4.65	0.86	8.26E-01

**Annotations-Cluster 7****AF: 1.67**

<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>AMP-dependent synthetase and ligase</b>	INTERPRO	4	2.33	14.35	2.61E-03
<b>Fatty acid metabolism</b>	SP_PIR_KEYWORDS	5	2.91	8.61	2.66E-03
<b>Fatty acid metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	4	2.33	5.48	3.49E-02
<b>Lipid metabolism</b>	SP_PIR_KEYWORDS	5	2.91	3.86	4.04E-02
<b>Lipid metabolism</b>	COG_ONTOLOGY	4	2.33	3.65	8.53E-02
<b>Fatty acid metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	2.62	1.22E-01

**Annotations-Cluster 8****AF: 1.64**

<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Acetyl-CoA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	2.33	12.43	3.90E-03
<b>Citrate cycle (TCA cycle)</b>	KEGG_PATHWAY	4	2.33	7.96	1.30E-02
<b>Tricarboxylic acid cycle</b>	SP_PIR_KEYWORDS	3	1.74	16.58	1.37E-02
<b>Energy derivation by oxidation of organic compounds</b>	GOTERM_BP_FAT	5	2.91	4.92	1.85E-02
<b>Tricarboxylic acid cycle</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.74	12.57	2.31E-02
<b>Acetyl-CoA catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.74	12.05	2.51E-02

<b>Aerobic respiration</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.74	10.71	3.13E-02
<b>Coenzyme catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.74	9.97	3.57E-02
<b>Cofactor catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.74	9.03	4.27E-02
<b>Cellular respiration</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.74	4.90	1.24E-01
<b>Annotations-Cluster 9</b>		<b>AF: 1.51</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Thioredoxin fold</b>	INTERPRO	5	2.91	5.08	1.68E-02
<b>Glutathione S-transferase, C-terminal-like</b>	INTERPRO	3	1.74	10.77	3.11E-02
<b>Glutathione S-transferase/chloride channel, C-terminal</b>	INTERPRO	3	1.74	9.50	3.92E-02
<b>GST C-terminal</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.74	8.62	4.67E-02

**Tab. 16 Funktionelle Annotations-Cluster 6 d vs. 0 d.** Um 50 % signifikant regulierte Proteine: 158, angereicherte Cluster (AF  $\geq$  1,5): 12, Annotations-Cluster wurden nach der Höhe ihres Anreicherungsfaktors (AF) sortiert

<b>Annotations-Cluster 1</b>		<b>AF: 12.72</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Ribosome</b>	KEGG_PATHWAY	21	13.82	16.51	1.49E-19
<b>Translation</b>	GOTERM_BP_FAT	28	18.42	9.86	2.34E-19
<b>Ribosomal protein</b>	SP_PIR_KEYWORDS	21	13.82	13.94	3.65E-17
<b>Structural constituent of ribosome</b>	GOTERM_MF_FAT	20	13.16	14.55	7.46E-17

<b>Ribosome</b>	GOTERM_CC_FAT	21	13.82	11.59	9.61E-16
<b>Ribonucleoprotein</b>	SP_PIR_KEYWORDS	21	13.82	9.27	1.04E-13
<b>Structural molecule activity</b>	GOTERM_MF_FAT	23	15.13	5.61	7.97E-11
<b>Ribonucleoprotein complex</b>	GOTERM_CC_FAT	23	15.13	5.28	2.47E-10
<b>Intracellular non-membrane-bounded organelle</b>	GOTERM_CC_FAT	37	24.34	2.04	1.87E-05
<b>Non-membrane-bounded organelle</b>	GOTERM_CC_FAT	37	24.34	2.04	1.87E-05

**Annotations-Cluster 2****AF: 3.67****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine  
Abs. %****AF****q-Wert**

<b>Ribosome</b>	SP_PIR_KEYWORDS	6	3.95	30.64	1.20E-06
<b>Small ribosomal subunit</b>	GOTERM_CC_FAT	4	2.63	14.62	2.44E-03
<b>Ribosomal subunit</b>	GOTERM_CC_FAT	5	3.29	8.03	3.36E-03

**Annotations-Cluster 3****AF: 2.89****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine  
Abs. %****AF****q-Wert**

<b>LIM</b>	SMART	7	4.61	12.52	1.70E-05
<b>Zinc finger, LIM-type</b>	INTERPRO	7	4.61	11.51	3.13E-05
<b>LIM domain</b>	SP_PIR_KEYWORDS	7	4.61	11.26	3.54E-05
<b>LIM zinc-binding 3</b>	UP_SEQ_FEATURE	5	3.29	20.27	9.65E-05
<b>LIM zinc-binding 1</b>	UP_SEQ_FEATURE	5	3.29	10.54	1.25E-03
<b>LIM zinc-binding 2</b>	UP_SEQ_FEATURE	5	3.29	10.54	1.25E-03
<b>LIM zinc-binding 4</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.97	28.75	4.59E-03



<b>Zinc</b>	SP_PIR_KEYWORDS	14	9.21	0.87	8.19E-01
<b>Zinc ion binding</b>	GOTERM_MF_FAT	15	9.87	0.78	9.22E-01

<b>Annotations-Cluster 4</b>		<b>AF: 2.46</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>rRNA binding</b>	GOTERM_MF_FAT	5	3.29	22.88	5.84E-05
<b>rRNA-binding</b>	SP_PIR_KEYWORDS	4	2.63	31.32	2.50E-04
<b>RNA binding</b>	GOTERM_MF_FAT	11	7.24	1.80	8.24E-02
<b>RNA-binding</b>	SP_PIR_KEYWORDS	8	5.26	1.94	1.18E-01

<b>Annotations-Cluster 5</b>		<b>AF: 1.99</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Protein biosynthesis</b>	SP_PIR_KEYWORDS	14	9.21	11.83	1.75E-10
<b>Aminoacyl-tRNA synthetase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	6	3.95	18.07	1.85E-05
<b>tRNA aminoacylation for protein translation</b>	GOTERM_BP_FAT	6	3.95	14.65	5.07E-05
<b>Amino acid activation</b>	GOTERM_BP_FAT	6	3.95	14.65	5.07E-05
<b>tRNA aminoacylation</b>	GOTERM_BP_FAT	6	3.95	14.65	5.07E-05
<b>Aminoacyl-tRNA ligase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	6	3.95	13.73	6.94E-05
<b>Ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related compounds</b>	GOTERM_MF_FAT	6	3.95	13.73	6.94E-05
<b>Ligase activity, forming carbon-oxygen bonds</b>	GOTERM_MF_FAT	6	3.95	13.73	6.94E-05

<b>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</b>	KEGG_PATHWAY	6	3.95	10.00	2.80E-04
<b>Translation, ribosomal structure and biogenesis</b>	COG_ONTOLOGY	5	3.29	9.24	1.24E-03
<b>Aminoacyl-tRNA synthetase, class I, conserved site</b>	INTERPRO	4	2.63	14.31	2.65E-03
<b>tRNA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	6	3.95	5.96	3.25E-03
<b>"KMSKS" region</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.97	21.08	8.55E-03
<b>ncRNA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	3.89	9.02E-03
<b>"HIGH" region</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.97	18.60	1.09E-02
<b>Ligase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	8	5.26	3.24	1.18E-02
<b>Rossmann-like alpha/beta/alpha sandwich fold</b>	INTERPRO	3	1.97	9.12	4.22E-02
<b>Nucleotide binding</b>	GOTERM_MF_FAT	26	17.11	1.31	1.20E-01
<b>Nucleotide-binding</b>	SP_PIR_KEYWORDS	19	12.50	1.37	1.47E-01
<b>ATP-binding</b>	SP_PIR_KEYWORDS	15	9.87	1.37	2.00E-01
<b>Purine nucleotide binding</b>	GOTERM_MF_FAT	21	13.82	1.23	2.41E-01
<b>ATP</b>	UP_SEQ_FEATURE	8	5.26	1.55	2.55E-01
<b>Adenyl nucleotide binding</b>	GOTERM_MF_FAT	17	11.18	1.22	3.09E-01
<b>Purine nucleoside binding</b>	GOTERM_MF_FAT	17	11.18	1.21	3.22E-01
<b>Nucleoside binding</b>	GOTERM_MF_FAT	17	11.18	1.20	3.31E-01
<b>Ribonucleotide binding</b>	GOTERM_MF_FAT	19	12.50	1.16	3.55E-01
<b>Purine ribonucleotide binding</b>	GOTERM_MF_FAT	19	12.50	1.16	3.55E-01
<b>ATP binding</b>	GOTERM_MF_FAT	15	9.87	1.14	4.30E-01

<b>Adenyl ribonucleotide binding</b>	GOTERM_MF_FAT	15	9.87	1.13	4.48E-01
<b>ATP</b>	UP_SEQ_FEATURE	7	4.61	0.81	8.63E-01
<b>Protein kinase, core</b>	INTERPRO	3	1.97	0.74	9.13E-01
<b>Protein kinase</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.97	0.66	9.42E-01
<b>Protein kinase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	3	1.97	0.57	9.71E-01
<b>Kinase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	3	1.97	0.50	9.84E-01

<b>Annotations-Cluster 6</b>		<b>AF: 1.99</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Actin cytoskeleton organization</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	4.76	3.42E-03
<b>Actin filament-based process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	4.47	4.69E-03
<b>Cytoskeleton organization</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	2.41	6.90E-02

<b>Annotations-Cluster 7</b>		<b>AF: 1.64</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>TSP1</b>	SMART	4	2.63	8.97	9.54E-03
<b>Thrombospondin, type 1 repeat</b>	INTERPRO	4	2.63	8.25	1.24E-02
<b>TSP type-1 3</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.97	11.71	2.66E-02
<b>TSP type-1 1</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.97	8.78	4.51E-02
<b>TSP type-1 2</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	1.97	8.78	4.51E-02

<b>Annotations-Cluster 8</b>		<b>AF: 1.61</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Actin binding</b>	GOTERM_MF_FAT	9	5.92	3.43	4.58E-03
<b>Actin-binding</b>	SP_PIR_KEYWORDS	7	4.61	3.64	1.26E-02
<b>Cytoskeletal protein binding</b>	GOTERM_MF_FAT	10	6.58	2.65	1.27E-02
<b>Cytoskeleton</b>	SP_PIR_KEYWORDS	11	7.24	2.22	2.65E-02
<b>Cytoskeleton</b>	GOTERM_CC_FAT	12	7.89	1.13	4.82E-01

<b>Annotations-Cluster 9</b>		<b>AF: 1.59</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Coenzyme metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	5.50	1.67E-03
<b>Cofactor metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	4.32	5.51E-03
<b>Glutathione metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	14.04	1.88E-02
<b>Glutathione metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	4	2.63	5.38	3.65E-02
<b>Peptide metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	8.87	4.42E-02
<b>Cellular amino acid derivative metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	2.63	3.19	1.29E-01
<b>Sulfur metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	3.58	2.02E-01

<b>Annotations-Cluster 10</b>		<b>AF: 1.59</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Oxidoreductase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	12	7.89	2.46	9.43E-03
<b>Oxidation reduction</b>	GOTERM_BP_FAT	13	8.55	2.17	1.56E-02
<b>Substrate</b>	UP_SEQ_FEATURE	6	3.95	2.30	1.19E-01

<b>Annotations-Cluster 11</b>		<b>AF: 1.52</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Cytoplasmic vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	11	7.24	2.29	2.07E-02
<b>Vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	11	7.24	2.25	2.36E-02
<b>Cytoplasmic membrane-bounded vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	9	5.92	2.30	4.04E-02
<b>Membrane-bounded vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	9	5.92	2.27	4.33E-02

<b>Annotations-Cluster 12</b>		<b>AF: 1.51</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Coenzyme metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	5.50	1.67E-03
<b>Cofactor metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	4.61	4.32	5.51E-03
<b>Tricarboxylic acid cycle</b>	SP_PIR_KEYWORDS	3	1.97	18.55	1.11E-02
<b>Tricarboxylic acid cycle</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	14.65	1.73E-02
<b>Acetyl-CoA catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	14.04	1.88E-02
<b>Glyoxylate and dicarboxylate metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	3	1.97	13.12	2.08E-02

<b>Aerobic respiration</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	12.48	2.35E-02
<b>Coenzyme catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	11.62	2.69E-02
<b>Acetyl-CoA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	10.87	3.04E-02
<b>Cofactor catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	10.53	3.23E-02
<b>Energy derivation by oxidation of organic compounds</b>	GOTERM_BP_FAT	4	2.63	4.58	5.58E-02
<b>Citrate cycle (TCA cycle)</b>	KEGG_PATHWAY	3	1.97	6.77	7.03E-02
<b>Cellular respiration</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	5.71	9.57E-02
<b>Coenzyme biosynthetic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	5.26	1.10E-01
<b>Cofactor biosynthetic process</b>	GOTERM_BP_FAT	3	1.97	3.70	1.92E-01
<b>Generation of precursor metabolites and energy</b>	GOTERM_BP_FAT	5	3.29	2.15	2.00E-01

**Tab. 17 Funktionelle Annotations-Cluster 9 d vs. 0 d.** Um 50 % signifikant regulierte Proteine: 363, angereicherte Cluster (AF  $\geq$  1,5): 25, Annotations-Cluster wurden nach der Höhe ihres Anreicherungsfaktors (AF) sortiert

<b>Annotations-Cluster 1</b>		<b>AF: 17.28</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Ribosome</b>	KEGG_PATHWAY	33	9.48	11.82	1.28E-26
<b>Translation</b>	GOTERM_BP_FAT	44	12.64	6.67	3.23E-23
<b>Structural constituent of ribosome</b>	GOTERM_MF_FAT	32	9.20	10.17	2.06E-22

<b>Ribosomal protein</b>	SP_PIR_KEYWORDS	33	9.48	9.65	3.82E-22
<b>Ribonucleoprotein</b>	SP_PIR_KEYWORDS	37	10.63	7.20	2.18E-20
<b>Ribosome</b>	GOTERM_CC_FAT	33	9.48	8.02	7.01E-20
<b>Structural molecule activity</b>	GOTERM_MF_FAT	43	12.36	4.58	1.43E-16
<b>Ribonucleoprotein complex</b>	GOTERM_CC_FAT	41	11.78	4.14	2.85E-14
<b>Non-membrane-bounded organelle</b>	GOTERM_CC_FAT	74	21.26	1.80	2.73E-07
<b>Intracellular non-membrane-bounded organelle</b>	GOTERM_CC_FAT	74	21.26	1.80	2.73E-07

**Annotations-Cluster 2****AF: 6.22****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine****AF****q-Wert****Abs. %**

<b>LIM</b>	SMART	14	4.02	10.60	4.37E-10
<b>Zinc finger, LIM-type</b>	INTERPRO	14	4.02	10.12	9.73E-10
<b>LIM domain</b>	SP_PIR_KEYWORDS	14	4.02	9.92	1.23E-09
<b>LIM zinc-binding 2</b>	UP_SEQ_FEATURE	12	3.45	11.18	6.54E-09
<b>LIM zinc-binding 1</b>	UP_SEQ_FEATURE	12	3.45	11.18	6.54E-09
<b>LIM zinc-binding 3</b>	UP_SEQ_FEATURE	8	2.30	14.33	8.99E-07
<b>Zinc</b>	SP_PIR_KEYWORDS	30	8.62	0.82	9.21E-01
<b>Zinc ion binding</b>	GOTERM_MF_FAT	33	9.48	0.75	9.82E-01

<b>Annotations-Cluster 3</b>		<b>AF: 5.03</b>				
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>	
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>			
<b>Adherens junction</b>	GOTERM_CC_FAT	14	4.02	6.16	3.89E-07	
<b>Cell-substrate adherens junction</b>	GOTERM_CC_FAT	11	3.16	8.41	5.76E-07	
<b>Cell-substrate junction</b>	GOTERM_CC_FAT	11	3.16	7.78	1.23E-06	
<b>Anchoring junction</b>	GOTERM_CC_FAT	14	4.02	5.31	2.17E-06	
<b>Focal adhesion</b>	GOTERM_CC_FAT	10	2.87	8.19	2.96E-06	
<b>Basolateral plasma membrane</b>	GOTERM_CC_FAT	13	3.74	4.30	4.85E-05	
<b>Cell junction</b>	SP_PIR_KEYWORDS	19	5.46	2.51	6.32E-04	
<b>Cell junction</b>	GOTERM_CC_FAT	22	6.32	2.18	1.15E-03	
<b>Annotations-Cluster 4</b>		<b>AF: 4.40</b>				
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>	
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>			
<b>Protein biosynthesis</b>	SP_PIR_KEYWORDS	21	6.03	7.82	2.54E-12	
<b>Aminoacyl-tRNA synthetase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	9	2.59	11.94	6.40E-07	
<b>tRNA aminoacylation for protein translation</b>	GOTERM_BP_FAT	9	2.59	9.46	3.89E-06	
<b>tRNA aminoacylation</b>	GOTERM_BP_FAT	9	2.59	9.46	3.89E-06	
<b>Amino acid activation</b>	GOTERM_BP_FAT	9	2.59	9.46	3.89E-06	
<b>Ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related compounds</b>	GOTERM_MF_FAT	9	2.59	8.99	5.75E-06	



<b>Ligase activity, forming carbon-oxygen bonds</b>	GOTERM_MF_FAT	9	2.59	8.99	5.75E-06
<b>Aminoacyl-tRNA ligase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	9	2.59	8.99	5.75E-06
<b>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</b>	KEGG_PATHWAY	8	2.30	6.07	2.74E-04
<b>tRNA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	10	2.87	4.28	5.42E-04
<b>ncRNA metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	12	3.45	2.87	3.16E-03
<b>Aminoacyl-tRNA synthetase, class I, conserved site</b>	INTERPRO	5	1.44	7.87	3.53E-03
<b>"KMSKS" region</b>	UP_SEQ_FEATURE	4	1.15	12.42	3.66E-03
<b>"HIGH" region</b>	UP_SEQ_FEATURE	4	1.15	10.96	5.29E-03
<b>Rossmann-like alpha/beta/alpha sandwich fold</b>	INTERPRO	5	1.44	6.69	6.38E-03
<b>Ligase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	13	3.74	2.32	1.08E-02

<b>Annotations-Cluster 5</b>		<b>AF: 4.18</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Melanosome</b>	GOTERM_CC_FAT	12	3.45	6.59	1.81E-06
<b>Pigment granule</b>	GOTERM_CC_FAT	12	3.45	6.59	1.81E-06
<b>Cytoplasmic membrane-bounded vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	22	6.32	2.48	2.20E-04
<b>Membrane-bounded vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	22	6.32	2.44	2.68E-04
<b>Cytoplasmic vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	24	6.90	2.20	5.64E-04
<b>Vesicle</b>	GOTERM_CC_FAT	24	6.90	2.16	7.52E-04

<b>Annotations-Cluster 6</b>		<b>AF: 4.03</b>				
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>	
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>			
<b>Endoplasmic reticulum lumen</b>	GOTERM_CC_FAT	11	3.16	7.13	2.78E-06	
<b>Prevents secretion from ER</b>	UP_SEQ_FEATURE	10	2.87	7.89	4.16E-06	
<b>Endoplasmic reticulum, targeting sequence</b>	INTERPRO	8	2.30	9.95	1.33E-05	
<b>Endoplasmic reticulum part</b>	GOTERM_CC_FAT	16	4.60	3.23	1.32E-04	
<b>Endoplasmic reticulum</b>	SP_PIR_KEYWORDS	26	7.47	1.98	1.53E-03	
<b>Endoplasmic reticulum</b>	GOTERM_CC_FAT	28	8.05	1.56	2.16E-02	
<b>Annotations-Cluster 7</b>		<b>AF: 3.95</b>				
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>	
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>			
<b>Actin-binding</b>	SP_PIR_KEYWORDS	17	4.89	3.89	8.44E-06	
<b>Actin binding</b>	GOTERM_MF_FAT	20	5.75	3.33	9.28E-06	
<b>Cytoskeleton</b>	SP_PIR_KEYWORDS	28	8.05	2.49	2.55E-05	
<b>Cytoskeletal protein binding</b>	GOTERM_MF_FAT	22	6.32	2.55	1.53E-04	
<b>Cytoskeleton</b>	GOTERM_CC_FAT	33	9.48	1.37	5.56E-02	
<b>Annotations-Cluster 8</b>		<b>AF: 3.28</b>				
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>	
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>			
<b>Coenzyme metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	14	4.02	4.73	8.03E-06	
<b>Cofactor metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	15	4.31	3.99	2.46E-05	

<b>Coenzyme biosynthetic process</b>	GOTERM_BP_FAT	6	1.72	4.53	1.02E-02
<b>Cofactor biosynthetic process</b>	GOTERM_BP_FAT	6	1.72	3.19	3.98E-02
<b>Annotations-Cluster 9</b>		<b>AF: 2.89</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Actin cytoskeleton organization</b>	GOTERM_BP_FAT	12	3.45	3.52	6.23E-04
<b>Actin filament-based process</b>	GOTERM_BP_FAT	12	3.45	3.30	1.06E-03
<b>Cytoskeleton organization</b>	GOTERM_BP_FAT	16	4.60	2.37	3.14E-03
<b>Annotations-Cluster 10</b>		<b>AF: 2.77</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Lysosome</b>	SP_PIR_KEYWORDS	12	3.45	4.31	1.11E-04
<b>Lysosome</b>	GOTERM_CC_FAT	12	3.45	3.15	1.54E-03
<b>Lytic vacuole</b>	GOTERM_CC_FAT	12	3.45	3.13	1.61E-03
<b>Vacuole</b>	GOTERM_CC_FAT	12	3.45	2.74	4.42E-03
<b>Lysosome</b>	KEGG_PATHWAY	10	2.87	2.68	1.16E-02
<b>Annotations-Cluster 11</b>		<b>AF: 2.58</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Proteasome</b>	SP_PIR_KEYWORDS	15	4.31	14.38	1.21E-12
<b>Proteasome complex</b>	GOTERM_CC_FAT	15	4.31	12.07	1.28E-11

---

<b>Proteasome</b>	KEGG_PATHWAY	14	4.02	9.50	9.56E-10
<b>Protease</b>	SP_PIR_KEYWORDS	20	5.75	2.03	4.80E-03
<b>Proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	1.15	6.45	2.33E-02
<b>Proteasomal protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	1.15	6.45	2.33E-02
<b>Ubiquitin-dependent protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	8	2.30	2.74	2.68E-02
<b>Macromolecule catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	17	4.89	1.26	2.78E-01
<b>Proteolysis</b>	GOTERM_BP_FAT	25	7.18	1.17	3.01E-01
<b>Protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	14	4.02	1.22	3.62E-01
<b>Cellular protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	12	3.45	1.08	5.52E-01
<b>Cellular macromolecule catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	13	3.74	1.03	6.05E-01
<b>Proteolysis involved in cellular protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	1.00	6.67E-01
<b>Modification-dependent protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	9	2.59	0.86	8.27E-01
<b>Modification-dependent macromolecule catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	9	2.59	0.86	8.27E-01
<b>Ubl conjugation pathway</b>	SP_PIR_KEYWORDS	6	1.72	0.64	9.58E-01

<b>Annotations-Cluster 12</b>		<b>AF: 2.44</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>PINT</b>	SMART	4	1.15	14.00	2.59E-03
<b>Proteasome component region PCI</b>	INTERPRO	4	1.15	13.38	3.00E-03
<b>PCI</b>	UP_SEQ_FEATURE	4	1.15	10.35	6.25E-03

<b>Annotations-Cluster 13</b>		<b>AF: 2.38</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Cell adhesion</b>	SP_PIR_KEYWORDS	19	5.46	2.59	4.44E-04
<b>Cell adhesion</b>	GOTERM_BP_FAT	21	6.03	1.81	1.25E-02
<b>Biological adhesion</b>	GOTERM_BP_FAT	21	6.03	1.81	1.27E-02

<b>Annotations-Cluster 14</b>		<b>AF: 2.30</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Glucose metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	3.80	6.41E-04
<b>Generation of precursor metabolites and energy</b>	GOTERM_BP_FAT	15	4.31	2.78	1.04E-03
<b>Hexose metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	3.15	2.65E-03
<b>Polysaccharide metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	8	2.30	4.20	2.89E-03
<b>Energy derivation by oxidation of organic compounds</b>	GOTERM_BP_FAT	8	2.30	3.95	4.11E-03

<b>Glycogen metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	7.33	4.51E-03
<b>Glucan metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	7.33	4.51E-03
<b>Cellular glucan metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	7.33	4.51E-03
<b>Glycogen metabolism</b>	SP_PIR_KEYWORDS	4	1.15	10.89	5.46E-03
<b>Monosaccharide metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	2.78	6.37E-03
<b>Energy reserve metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	6.53	6.83E-03
<b>Cellular polysaccharide metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	5.62	1.16E-02
<b>Carbohydrate metabolism</b>	SP_PIR_KEYWORDS	6	1.72	4.25	1.33E-02
<b>Starch and sucrose metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	4	1.15	3.54	1.01E-01

**Annotations-Cluster 15****AF: 2.14****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine  
Abs. %****AF****q-Wert**

<b>NADP</b>	UP_SEQ_FEATURE	5	1.44	9.70	1.56E-03
<b>NADP</b>	SP_PIR_KEYWORDS	10	2.87	3.64	1.75E-03
<b>NADP</b>	UP_SEQ_FEATURE	4	1.15	3.05	1.42E-01

**Annotations-Cluster 16****AF: 2.11****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine  
Abs. %****AF****q-Wert**

<b>Protein folding</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	4.19	2.95E-04
<b>Molecular chaperone</b>	SP_PIR_KEYWORDS	4	1.15	14.79	2.20E-03

<b>Chaperone</b>	SP_PIR_KEYWORDS	10	2.87	3.45	2.54E-03
<b>Chaperonin-containing T-complex</b>	GOTERM_CC_FAT	3	0.86	20.00	8.89E-03
<b>Chaperone, tailless complex polypeptide 1</b>	INTERPRO	3	0.86	16.05	1.41E-02
<b>Chaperonin TCP-1, conserved site</b>	INTERPRO	3	0.86	16.05	1.41E-02
<b>Molecular chaperone t-complex-type</b>	PIR_SUPERFAMILY	3	0.86	12.16	2.35E-02
<b>Chaperonin Cpn60/TCP-1</b>	INTERPRO	3	0.86	11.46	2.72E-02
<b>Unfolded protein binding</b>	GOTERM_MF_FAT	5	1.44	3.43	5.76E-02

**Annotations-Cluster 17****AF: 2.07****Biologische Funktion****Kategorie****Proteine****AF****q-Wert****Abs. %**

<b>Zymogen</b>	SP_PIR_KEYWORDS	13	3.74	3.38	4.97E-04
<b>Endopeptidase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	20	5.75	2.28	1.30E-03
<b>Protease</b>	SP_PIR_KEYWORDS	20	5.75	2.03	4.80E-03
<b>Peptidase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	24	6.90	1.83	6.18E-03
<b>Peptidase activity, acting on L-amino acid peptides</b>	GOTERM_MF_FAT	23	6.61	1.83	7.48E-03
<b>Hydrolase</b>	SP_PIR_KEYWORDS	38	10.92	1.31	7.13E-02
<b>Proteolysis</b>	GOTERM_BP_FAT	25	7.18	1.17	3.01E-01

<b>Annotations-Cluster 18</b>		<b>AF: 1.95</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Endoplasmic reticulum, targeting sequence</b>	INTERPRO	8	2.30	9.95	1.33E-05
<b>Redox-active center</b>	SP_PIR_KEYWORDS	5	1.44	6.63	6.55E-03
<b>Intramolecular oxidoreductase activity, transposing S-S bonds</b>	GOTERM_MF_FAT	3	0.86	17.99	1.11E-02
<b>Protein disulfide isomerase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	3	0.86	17.99	1.11E-02
<b>Intramolecular oxidoreductase activity, interconverting keto- and enol-groups</b>	GOTERM_MF_FAT	3	0.86	15.99	1.41E-02
<b>Thioredoxin-like</b>	INTERPRO	4	1.15	5.94	2.91E-02
<b>Cell redox homeostasis</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	3.90	3.88E-02
<b>Thioredoxin domain</b>	INTERPRO	3	0.86	6.17	8.40E-02
<b>Intramolecular oxidoreductase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	3	0.86	3.79	1.86E-01
<b>Annotations-Cluster 19</b>		<b>AF: 1.94</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Glutathione metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	8	2.30	4.90	1.04E-03
<b>Glutathione metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	1.15	8.06	1.27E-02
<b>Sulfur metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	2.01	3.60	1.30E-02



<b>Cellular amino acid derivative metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	8	2.30	2.74	2.68E-02
<b>Peptide metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	4	1.15	5.09	4.30E-02

<b>Annotations-Cluster 20</b>		<b>AF: 1.91</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Cofactor binding</b>	GOTERM_MF_FAT	12	3.45	2.55	7.65E-03
<b>NAD or NADH binding</b>	GOTERM_MF_FAT	5	1.44	5.45	1.29E-02
<b>Coenzyme binding</b>	GOTERM_MF_FAT	9	2.59	2.70	1.86E-02

<b>Annotations-Cluster 21</b>		<b>AF: 1.86</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Basement membrane</b>	GOTERM_CC_FAT	8	2.30	5.11	9.17E-04
<b>Extracellular matrix part</b>	GOTERM_CC_FAT	8	2.30	4.06	3.50E-03
<b>Cell attachment site</b>	UP_SEQ_FEATURE	7	2.01	4.29	5.73E-03
<b>Extracellular matrix</b>	GOTERM_CC_FAT	14	4.02	2.11	1.55E-02
<b>Proteinaceous extracellular matrix</b>	GOTERM_CC_FAT	13	3.74	2.04	2.59E-02
<b>Basement membrane</b>	SP_PIR_KEYWORDS	4	1.15	6.09	2.73E-02
<b>Extracellular matrix</b>	SP_PIR_KEYWORDS	9	2.59	2.19	5.47E-02
<b>Extracellular matrix structural constituent</b>	GOTERM_MF_FAT	3	0.86	4.80	1.28E-01

<b>Annotations-Cluster 22</b>		<b>AF: 1.79</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Proteasome, subunit alpha/beta</b>	INTERPRO	4	1.15	10.70	5.78E-03
<b>Threonine protease</b>	SP_PIR_KEYWORDS	4	1.15	9.86	7.29E-03
<b>Proteasome core complex</b>	GOTERM_CC_FAT	4	1.15	9.33	8.39E-03
<b>Threonine-type endopeptidase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	4	1.15	9.14	8.94E-03
<b>Threonine-type peptidase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	4	1.15	9.14	8.94E-03
<b>Proteolysis involved in cellular protein catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	1.00	6.67E-01

<b>Annotations-Cluster 23</b>		<b>AF: 1.78</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Stress response</b>	SP_PIR_KEYWORDS	5	1.44	5.75	1.08E-02
<b>Heat shock protein 70</b>	INTERPRO	3	0.86	14.59	1.70E-02
<b>Heat shock protein Hsp70</b>	INTERPRO	3	0.86	14.59	1.70E-02
<b>Heat shock protein 70, conserved site</b>	INTERPRO	3	0.86	12.35	2.36E-02

<b>Annotations-Cluster 24</b>		<b>AF: 1.74</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Glucose metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	3.80	6.41E-04

<b>Cellular carbohydrate catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	2.01	5.64	1.43E-03
<b>Hexose metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	3.15	2.65E-03
<b>Monosaccharide metabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	11	3.16	2.78	6.37E-03
<b>Carbohydrate catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	7	2.01	4.18	6.48E-03
<b>Glucose catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	4.65	2.20E-02
<b>Hexose catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	4.65	2.20E-02
<b>Monosaccharide catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	4.48	2.49E-02
<b>Alcohol catabolic process</b>	GOTERM_BP_FAT	5	1.44	3.72	4.49E-02
<b>Glycolysis / Gluconeogenesis</b>	KEGG_PATHWAY	6	1.72	2.81	6.01E-02
<b>Carbohydrate transport and metabolism</b>	COG_ONTOLOGY	3	0.86	4.16	1.56E-01
<b>Glycolysis</b>	SP_PIR_KEYWORDS	3	0.86	3.70	1.94E-01
<b>Glycolysis</b>	GOTERM_BP_FAT	3	0.86	3.30	2.30E-01

<b>Annotations-Cluster 25</b>		<b>AF: 1.68</b>			
<b>Biologische Funktion</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Proteine</b>		<b>AF</b>	<b>q-Wert</b>
		<b>Abs.</b>	<b>%</b>		
<b>Glutathione S-transferase, C-terminal-like</b>	INTERPRO	6	1.72	10.70	2.12E-04
<b>GST C-terminal</b>	UP_SEQ_FEATURE	6	1.72	8.47	6.33E-04
<b>Glutathione metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	8	2.30	4.90	1.04E-03
<b>Glutathione S-transferase, C-terminal</b>	INTERPRO	5	1.44	9.55	1.70E-03

---

<b>Glutathione S-transferase/chloride channel, C-terminal</b>	INTERPRO	5	1.44	7.87	3.53E-03
<b>GST N-terminal</b>	UP_SEQ_FEATURE	3	0.86	6.35	7.97E-02
<b>Glutathione S-transferase, N-terminal</b>	INTERPRO	3	0.86	5.94	8.96E-02
<b>Glutathione transferase</b>	PIR_SUPERFAMILY	3	0.86	5.76	9.36E-02
<b>Glutathione transferase activity</b>	GOTERM_MF_FAT	3	0.86	5.54	1.01E-01
<b>Transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups</b>	GOTERM_MF_FAT	3	0.86	2.72	3.02E-01
<b>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</b>	KEGG_PATHWAY	3	0.86	1.45	6.16E-01
<b>Drug metabolism</b>	KEGG_PATHWAY	3	0.86	1.28	6.85E-01

---

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Greifswald, den 11.02.2021

---

Frances Kindt

## **Lebenslauf, Publikationen und wissenschaftliche Leistungen**

Aus den Ergebnissen dieser Dissertation ging das folgende Patent hervor:

Verfahren und Testkit zur Analyse potentieller Wirkstoffe für die Behandlung von Nierenerkrankungen, DE102015102445 B3, eingetragen am 20. Februar 2015

Publikationen mit Peer-Review-Verfahren:

Lange T, Artelt N, **Kindt F**, Stracke S, Rettig R, Lendeckel U, Chadjichristos CE, Kavvas P, Chatziantoniou C, Endlich K, Endlich N. MiR-21 is up-regulated in urinary exosomes of chronic kidney disease patients and after glomerular injury. *J Cell Mol Med.* 2019:jcmm.14317. doi:10.1111/jcmm.14317.

Endlich N, Lange T, Kuhn J, Klemm P, Kotb AM, Siegerist F, **Kindt F**, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Kuss AW, Nath N, Rettig R, Lendeckel U, Zimmermann U, Amann K, Stracke S, Endlich K. BDNF: mRNA expression in urine cells of patients with chronic kidney disease and its role in kidney function. *J Cell Mol Med.* 2018. doi:10.1111/jcmm.13762.

Endlich N, Kliewe F, **Kindt F**, Schmidt K, Kotb AM, Artelt N, Lindenmeyer MT; Cohen CD, Döring F, Kuss AW, Amann K, Moeller MJ, Kabgani N, Blumenthal A, Endlich K. The transcription factor Dach1 is essential for podocyte function. *J Cell Mol Med.* 2018. doi:10.1111/jcmm.13544.

**Kindt F**, Hammer E, Kemnitz S, Blumenthal A, Klemm P, Schlüter R, Quaggin SE, van den Brandt J, Fuellen G, Völker U, Endlich K, Endlich N. A novel assay to assess the effect of pharmaceutical compounds on the differentiation of podocytes. *Br J Pharmacol.* 2017;174(2):163-176. doi:10.1111/bph.13667.

Kliewe F, Kuss A, Siegerist F, Schröder S, Schordan S, Artelt N, **Kindt F**, Amann K, Endlich K, Endlich N. Studies on the role of the transcription factor Tcf21 in the transdifferentiation of parietal epithelial cells into podocyte like cell. *Cell Physiol Biochem*, in Revision

Mündliche Präsentationen:

**Kindt F**, Fuellen G, Endlich K, Endlich N. Establishment of a new method to visualize and evaluate podocyte (de)differentiation, 27th Meeting European Renal Cell Study Group Meeting, Carlingford, Irland, 2015

Posterpräsentationen:

**Kindt F**, Hammer E, Kemnitz S, Blumenthal A, Klemm P, Schlüter R, Quaggin SE, van den Brandt J, Fuellen G, Völker U, Endlich K, Endlich N. A Novel Assay to Assess the Effect of Pharmaceutical Compounds on the Differentiation of Podocytes, 96th Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Greifswald, Deutschland, 2017

**Kindt F**, Kuss AW, Quaggin SE, Endlich K, Endlich N. A Novel Assay to Study Podocyte (De)Differentiation *in situ*, 11th Podocyte International Conference, Haifa/ Jerusalem, Israel, 2016

**Kindt F**, Endlich K, Endlich N. A New Method to Study Podocyte (De)Differentiation *in situ*, NephroTools 3rd International Conference, Liverpool, Großbritannien, 2015

Abstraktbeiträge:

**Kindt F**, Endlich K, Endlich N. A New Assay to Study Podocyte (De)Differentiation, American Society of Nephrology, Kidney Week, San Diego, USA, 2015



## Danksagung

Im Zusammenhang mit der Erstellung dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank

Herrn Prof. Dr. K. Endlich, Institut für Anatomie und Zellbiologie, für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes mit den bestmöglichen Arbeitsbedingungen und die produktiven Hilfestellungen während der Entstehung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. N. Endlich, Institut für Anatomie und Zellbiologie, für die gute Zusammenarbeit, die hervorragende theoretische und praktische Betreuung sowie die zahlreichen Hilfestellungen zur Erstellung dieser Arbeit.

Dr. R. Schlüter, Imaging Zentrum des Instituts für Biologie der Universitätsmedizin und der Universität Greifswald, für die exzellenten elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dem Institut für Molekulare Humangenetik, unter der Leitung von Prof. Dr. A.W. Kuss, für die Durchführung des NGS-Analyse und deren bioinformatische Auswertung.

Dem Institut für Funktionelle Genomforschung, unter der Leitung von Prof. Dr. U. Völker, für die Aufarbeitung und Analyse der Proteomproben.

Herrn Dr. J. van den Brandt, Zentrale Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere der Universitätsmedizin Greifswald, für die Züchtung und Bereitstellung der *Nephrin::CFP*-Mäuse.

Allen Mitarbeitern des anatomischen Instituts, insbesondere Dr. A. Blumenthal, R. Maciejewski und S. Schröder, für die allzeit freundliche Arbeitsatmosphäre und die zahlreiche Unterstützung.

S. Kemnitz für die Entwicklung der Analysesoftware sowie den unverzichtbaren privaten Rückhalt.

Meinen Eltern, auf deren Beistand ich stets zählen konnte.