

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

# Die Bedeutung des Ciliary Neurotrophic Factor für die Funktion des Podozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Judith Knaup

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: PD Dr. med. Ivo Quack

Korreferent: PD Dr. med. Sven Schinner

## **Zusammenfassung**

Der Podozyt ist maßgeblich am Aufbau des glomerulären Filters beteiligt und durch seine exponierte Lage im Glomerulum zahlreichen schädlichen Faktoren ausgesetzt, welche bei zu großem Podozytenverlust zu Niereninsuffizienz führen können. Schützende Faktoren sind folglich für das Überleben des Podozyten und damit für die Funktion der Niere von großer Bedeutung. CNTF, ein in Neuronen beschriebenes protektives Zytokin, ist bislang hinsichtlich einer vergleichbaren Wirkung auf Podozyten nicht untersucht worden. Für eine Bedeutung „neuronaler“ Faktoren wie CNTF für den Podozyten sprechen zahlreiche molekulare Gemeinsamkeiten sowohl auf proteinbiochemischer Ebene als auch hinsichtlich der zellulären Architektur zwischen neuronalen Zellen und Podozyten. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass der Podozyt den CNTF-Rezeptor-Komplex, bestehend aus gp130, LIFR $\beta$  und CNTFR $\alpha$ , exprimiert. CNTF aktivierte im Podozyten die JAK2/STAT3-Signalkaskade, was zu einer signifikanten Hochregulation von SOCS-3 führte. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit CNTF gerade in den ersten Tagen der Differenzierung der Podozyten zu einer gesteigerten Expression der podozytären Reifungsmarker WT-1 und Synaptopodin als Nachweis beschleunigter zellulärer Differenzierung führt, woraus sich die Hypothese ableiten lässt, dass CNTF zu Reparaturmechanismen nach Dedifferenzierung bei verschiedenen Nephropathien beitragen kann. Abschließend konnte ein dynamischer Effekt von CNTF auf die Migration von Podozyten demonstriert werden, was ebenfalls eine Bedeutung für Reparaturvorgänge in der Niere haben könnte. In der Zusammenschau der Ergebnisse könnte CNTF einen protektiven Effekt für die Funktion des Podozyten haben. Die Testung bei verschiedenen Krankheitsmodellen wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCL-2	B-Cell Lymphoma-2
BSA	Bovine Serum Albumin
CD2AP	Cluster of Differentiation 2 Associated Protein
cDNA	Complementary Desoxyribonuclein Acid
CLC	Cardiotrophin-like Cytokine
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTFR	Ciliary Neurotrophic Factor Receptor
CT-1	Cardiotrophin-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein Acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
FSGS	Fokal Segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
gp 130	Glykoprotein 130
HIVAN	Human Immunodeficiency Virus-Associated Nephropathy
IL-6	Interleukin 6
IL-11	Interleukin 11
$\gamma$ -IFN	$\gamma$ -Interferon
JAK	Janus Kinase
LIFR $\beta$	Leukemia-Inhibitory-Factor-Receptor-beta
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonuclein Acid
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institut-Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat

## Abkürzungsverzeichnis

---

SOCS 3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SV-40-LT-Antigen	Simian Virus-40-Large Tumor-Antigen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
Wnt 5a	Wingless Type MMTV Integration Site Family Member 5a
ZO-1	Zonula Occludens-1

## **Inhaltsverzeichnis:**

### **1. Einleitung**

- 1.1 Anatomie und Physiologie der Niere
- 1.2 Nephropathien/Schädigung der Podozyten
- 1.3 CNTF und sein Rezeptor
- 1.4 Was spricht für eine Bedeutung von „neuronalen“ Faktoren wie CNTF für den Podozyten?
- 1.5 Ziele der Doktorarbeit

### **2. Material und Methoden**

- 2.1 Materialien und Lösungen
  - 2.1.1 Zellkultur
  - 2.1.2 Stimulantien und Inhibitoren
  - 2.1.3 Immunfluoreszenz
  - 2.1.4 Zellyse
  - 2.1.5 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot
  - 2.1.6 RNA-Isolierung, Reversen Transkription, PCR und Real-Time qPCR
  - 2.1.7 Antikörper
- 2.2 Methoden
  - 2.2.1 Kultivierung der Podozyten
  - 2.2.2 Stimulation und Inhibition der Podozyten
  - 2.2.3 Immunfluoreszenz
  - 2.2.4 Proteingewinnung und Westernblot
  - 2.2.5 RNA-Isolierung, Reverse Transkription, PCR und Real-Time quantitative PCR
  - 2.2.6 Differenzierungsversuche
  - 2.2.7 Migrationsassay

### **3. Ergebnisse**

- 3.1 Der CNTF-Rezeptorkomplex wird im Podozyten exprimiert
- 3.2 JAK2 und STAT3 werden im Podozyten exprimiert
- 3.3 CNTF aktiviert den JAK2/STAT3-Signalweg im Podozyt
- 3.4 JAK2- und STAT3- Inhibitorversuche

3.5 AKT- und MEK-Inhibitionsversuche

3.6 CNTF-induzierte Genexpression im Podozyt:  
SOCS-3, WNT5 und Bcl-2

3.7 CNTF fördert die Differenzierung der Podozyten

3.8 CNTF induziert einen migratorischen Phänotyp

**4. Diskussion**

**5. Literatur**

**6. Danksagung**

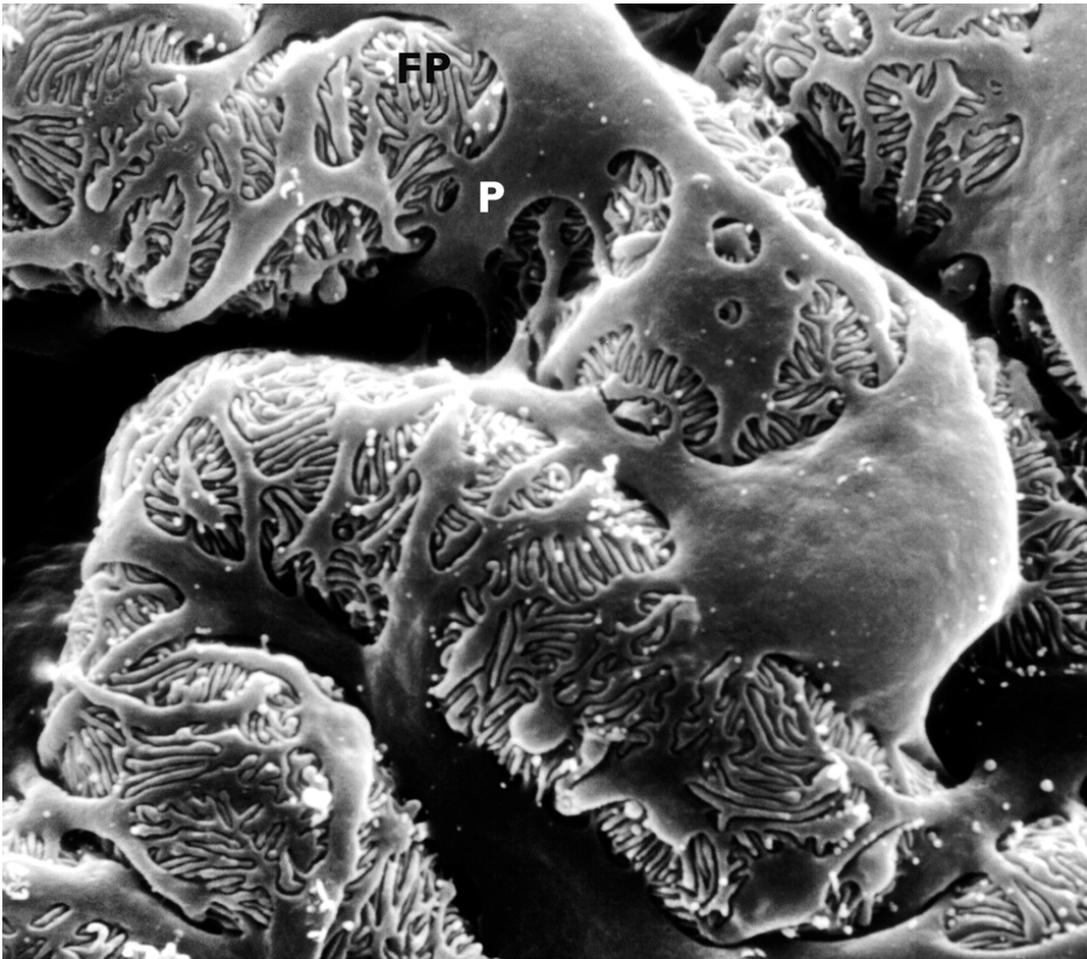
**7. Eidesstattliche Versicherung**

## 1. Einleitung

### 1.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Niere erfüllt einige überlebenswichtige Aufgaben. Sie kontrolliert den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt, sorgt für die Ausscheidung von Stickstoffendprodukten und Fremdstoffen und vermittelt endokrine Funktionen. Die Niere gliedert sich in circa eine Million Nephrone, welche die zentrale funktionelle Untereinheit darstellen (Tryggvason and Wartiovaara 2001). Ein Nephron besteht aus einem Glomerulum, einem proximalen und distalen Tubulus mit der dazwischen liegenden Henle-Schleife und dem Sammelrohr. Das Glomerulum ist ein Knäuel aus anastomosierenden Kapillaren, umgeben von der Bowmann'schen Kapsel. Aus dem Blut, das durch diese Kapillaren strömt, wird das Ultrafiltrat, der sogenannte Primärharn, abgepresst, von dem täglich 180 l produziert werden. Der größte Teil dieser Flüssigkeit wird im Tubulussystem rückresorbiert, so dass pro Tag etwa 1,5 l Endharn über die Nieren ausgeschieden werden. Die Filtrationsbarriere des Glomerulums ist für die Größen- und Ladungsselektivität verantwortlich. Weder Zellen noch Proteine, die größer als 70 kDa sind, was in etwa der Größe von Albumin entspricht, können diese Membran passieren. Zudem werden Anionen schlechter filtriert als Kationen oder ungeladene Moleküle. Die Filtrationsbarriere besteht aus drei Komponenten: dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten (Tryggvason and Wartiovaara 2001; Kawachi, Miyauchi et al. 2006). Die GBM setzt sich aus der Lamina densa, einem Kollagen 4-Gerüst, und beidseits anliegenden Proteoglykanen und Glykoproteinen, den Laminae rarae externa und interna, zusammen. Der Podozyt ist eine hochspezialisierte, nicht mehr teilungsfähige, viszerale Epithelzelle und bildet Primärfortsätze, von denen wiederum sekundäre Fortsätze ausgehen. Diese sogenannten Fußfortsätze, die dem Podozyt seinen Namen geben, greifen mit den Fußfortsätzen der benachbarten Podozyten reißverschlussartig ineinander, wodurch ein dichtes Netzwerk um die Kapillaren des Glomerulums entsteht. Zwischen den Fußfortsätzen liegt der Filtrationsschlitz, der von der 30-40 nm dünnen Schlitzmembran überbrückt

wird (Pavenstadt 2000; Tryggvason and Wartiovaara 2001). Der Podozyt ist nur über seine Sekundärfortsätze, die über  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin in der Lamina rara externa der GBM fixiert sind, mechanisch verankert und wird auch nur über seine basalen Membrananteile ernährt. Die Schlitzmembran ist eine modifizierte *adherens junction* (Reiser, Kriz et al. 2000) und wird aus spezialisierten Proteinen benachbarter Fußfortsätze aufgebaut. Diese Proteine sind unter anderem Nephrin, Podocin, P-Cadherin, Cluster of Differentiation 2-Associated Protein (CD2AP) und Zonula Occludens-1 (ZO-1). (Schnabel, Anderson et al. 1990; Kestila, Lenkkeri et al. 1998; Ruotsalainen, Ljungberg et al. 1999; Shih, Li et al. 1999; Boute, Gribouval et al. 2000; Reiser, Kriz et al. 2000; Schwarz, Simons et al. 2001) Der extrazelluläre Anteil des transmembranösen 180 kDa großen Nephrins interagiert mit dem Nephrin der Nachbarzelle, sodass ein Maschenwerk entsteht (Tryggvason 1999). Die Proteine der Schlitzmembran sind in *Lipid rafts* organisiert, spezialisierten Membranmikrodomänen, die reich an Cholesterin und Glykosphingolipiden sind und Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine enthalten (Simons, Schwarz et al. 2001; Bacia, Scherfeld et al. 2004). Zudem sind im Podozyten verschiedene Gene bekannt, die im Rahmen der zellulären Differenzierung vermehrt exprimiert werden und als podozytäre Reifungsmarker gelten, darunter Wilms Tumor Suppressor Gen (WT-1) und Synaptopodin (Shankland, Pippin et al. 2007). WT-1 ist essentiell für die urogenitale Entwicklung (Morrison, Viney et al. 2008) und verschiedene Mutationen dieses Gens führen zu unterschiedlichen Nephropathien (Morrison, Viney et al. 2008). Synaptopodin ist ein Actin-assoziiertes Protein, welches in neuralen Zellen sowie in Podozyten vorkommt und an der Organisation des Zytoskeletts sowie an der Zellmigration beteiligt ist (Mundel, Heid et al. 1997; Mundel, Reiser et al. 1997; Pavenstadt 2000; Kreidberg 2003; Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2006).



**Abbildung 1** : Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums einer Ratte. P=Podozyt  
FP=Fußfortsatz (Pavenstadt, Kriz et al. 2003).

## **1.2 Nephropathien / Schädigung der Podozyten**

Glomeruläre Erkrankungen gehen häufig mit einem nephrotischen Syndrom einher und sind assoziiert mit Schädigungen der Podozyten (Kriz 1997; Somlo and Mundel 2000; Shankland 2006). Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem die Minimal-Change-Glomerulonephritis, die Fokal Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und die membranöse Glomerulonephritis (Patrakka, Lahdenkari et al. 2002; Mathieson 2007). Auch Diabetes mellitus und Amyloidose führen zu Proteinurie und Schädigung des Podozyten (Dikman, Churg et al. 1981; Hoshi, Shu et al. 2002). Zudem ist der Podozyt hohen hydrostatischen Druckgradienten ausgesetzt, welche die glomeruläre Architektur zerstören können (Kriz 1996; Endlich, Kress et al. 2001). Eine

genetische oder erworbene Schädigung des Podozyten verursacht eine Retraktion der Fußfortsätze, die Pseudo-Fußfortsatzverschmelzung, die mit einer Änderung der Struktur der Schlitzmembran einhergeht (Kriz 1997). Eine weitere Schädigung kann zu einer Ablösung des noch vitalen Podozyten von der GBM oder unmittelbar zur Apoptose führen. Der Podozyt ist eine terminal differenzierte Zelle und gilt damit als nicht mehr teilungsfähig. Kommt es zu einem Zelluntergang, kann der Verlust folglich nicht durch Zellteilung ersetzt werden. Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass in juvenilen Mäusen parietale Epithelzellen rekrutiert werden und sich in Podozyten umwandeln können (Appel, Kershaw et al. 2009), galt bislang die Zellhypertrophie als einziger Weg für Podozyten, den zellulären Verlust auszugleichen, wobei häufig multinukleäre Zellen entstehen. Eine Hypertrophie der Zelle steigert jedoch auch andererseits die Anfälligkeit gegenüber schädigenden Stimuli im Sinne eines Circulus vitiosus (Kriz 1996). Durch den Verlust von Podozyten ist die GBM an einigen Stellen „nackt“. Dort kommt es zur Adhäsion von parietalen Epithelzellen der Bowman'schen Kapsel und in der Folge zu einer fehlgeleiteten Filtration von Flüssigkeit aus den Kapillaren ins Interstitium. Die Podozyten am Rand der Läsion werden ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen, es kommt zu degenerativen Veränderungen und schließlich zu weiterem Podozytenverlust. Die Kapillaren kollabieren oder werden durch hyalines Material oder Mikrothromben verstopft (Kriz 1997; Kriz, Gretz et al. 1998). Auf diese Weise führt schon eine geringe Abnahme der Podozytenzahl zu der Entwicklung einer Glomerulosklerose, zu Proteinurie und systemischer Hypertension. Die Abnahme der Podozytenzahl korreliert dabei mit der Progression des Nierenversagens (Kriz 1996; Kriz, Gretz et al. 1998), wobei das Ansprechen der nephrotischen Proteinurie auf immunsuppressive Therapie mit Glucocorticoiden, Cyclosporinen und Alkylantien einen inflammatorischen Pathomechanismus nahelegt (Camici 2007). Glucocorticoide bilden die Grundlage der anti-inflammatorischen Therapie, obwohl über den genauen Wirkmechanismus bisher nur wenig bekannt ist. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide auch einen direkten Effekt auf den Podozyten haben. Podozyten besitzen den Glucocorticoidrezeptor, der unter Behandlung mit Dexamethason in den Zellkern wandert (Yan, Kudo et al. 1999). So schützt in murinen Podozyten die Behandlung mit Dexamethason durch Stabilisation

der Actinfilamente vor Puromycin Aminonucleoside (PAN) - induzierter Verletzung (Ransom, Lam et al. 2005). In humanen Podozyten führte Dexamethason zu einer erhöhten Expression von Nephrin und zu gesteigertem Überleben (Xing, Saleem et al. 2006). In einer differentiellen proteomischen Analyse dexamethasonbehandelter Podozyten konnten fünf Proteine identifiziert werden, deren Expression signifikant erhöht war (Ransom, Vega-Warner et al. 2005). Eines dieser Proteine war der Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), der ursprünglich als neurotrophischer Faktor entdeckt und charakterisiert wurde. Über die Rolle von CNTF für die Nierenentwicklung und -funktion ist bisher nur wenig bekannt. Erste Hinweise für eine Bedeutung von CNTF in der Niere stammen aus einem Screening auf CNTF-Aktivität in Organen der Ratte, in dem eine hohe Expression dieses Gens in der Niere gemessen werden konnte (Ebendal 1987). Darüber hinaus konnte in einem Ischämiemodell der Niere eine gesteigerte Expression von CNTF und seinem Rezeptor Ciliary Neurotrophic Factor Receptor  $\alpha$  (CNTFR $\alpha$ ) in der Niere gezeigt werden (Yang, Lim et al. 2001). Eine erhöhte Aktivität von CNTF wurde in diesem Zusammenhang vor allem in den proximalen Tubulusabschnitten beobachtet, in denen es zur Regeneration kam. Dies könnte als Hinweis für eine protektive Rolle des CNTF als Wachstumsfaktor für die tubuläre Epithelzelle gedeutet werden.

### **1.3 CNTF und sein Rezeptor**

CNTF ist ein natürlich vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kDa (Sleeman, Anderson et al. 2000), welches erstmals 1979 aus dem Ganglion ciliare eines Hühnerembryos isoliert wurde und eine überlebensfördernde Wirkung auf lokale Neurone vermittelt (Adler, Landa et al. 1979). Seitdem wurde in zahlreichen Untersuchungen festgestellt, dass CNTF ein entscheidender Faktor für das Überleben und die Differenzierung vieler neuronaler Zelltypen ist (Louis, Magal et al. 1993; Oyesiku and Wigston 1996; Jo, Wang et al. 1999; Sleeman, Anderson et al. 2000). CNTF-defiziente Mäuse sind zwar lebensfähig, weisen aber deutliche Defizite bei der Reparatur geschädigter neuraler Strukturen auf. So zeigen CNTF-defiziente Mäuse mit

experimenteller autoimmuner Enzephalitis, einem Modell für Multiple Sklerose, einen schwereren und längeren Krankheitsverlauf als die Vergleichsgruppe (Linker, Maurer et al. 2002). Die Ausschaltung der CNTF-Genexpression führt zu einer progressiven Atrophie von Motoneuronen und zu einer schwachen, aber signifikanten Reduktion der Muskelkraft in Mäusen (Masu, Wolf et al. 1993). Auch bei vielen nichtneuronalen Zellen wie Oligodendrozyten, Mikroglia, Leber-, Insel- und Skelettmuskelzellen spielt CNTF eine wichtige Rolle und reguliert unter anderem Apoptose, Hypertrophie oder proinflammatorische Zytokinausschüttung (Louis, Magal et al. 1993; Sleeman, Anderson et al. 2000; Rezende, Vieira et al. 2009). CNTF gehört zu der Familie der Interleukin-6 (IL-6) verwandten Zytokine, zu welcher daneben auch IL-6, Interleukin-11 (IL-11), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1) und Cardiotrophin-like Cytokine (CLC) gehören. Ihre Zielgene sind involviert in Differenzierung, Überleben, Apoptose und Proliferation (Heinrich, Behrmann et al. 2003). Die Effekte von CNTF werden durch einen dreiteiligen Rezeptorkomplex vermittelt, wobei CNTF zunächst spezifisch an CNTFR $\alpha$  bindet (Davis, Aldrich et al. 1993). CNTFR $\alpha$  kommt in löslicher oder in membrangebundener Form vor. Die membrangebundene Form hat weder einen transmembranösen noch einen zytoplasmatischen Anteil, sondern ist über eine Glycosyl-phosphatidylinositol-Verbindung an die Zelloberfläche gebunden (Sleeman, Anderson et al. 2000). Der Komplex aus CNTF und CNTFR $\alpha$  rekrutiert Glykoprotein 130 (gp130), die gemeinsame Untereinheit der IL-6-Zytokine. Dieser neue Komplex ist zunächst noch inaktiv. Erst durch die anschließende Bindung von Leukemia-Inhibitory-Factor-Rezeptor- $\beta$  (LIFR $\beta$ ) an diesen Komplex entsteht ein heterodimerer Komplex, welcher zur Signaltransduktion führt (Davis, Aldrich et al. 1993). Die Signalvermittlung verläuft über die Aktivierung der Janus-Kinase 2 (JAK2), die zur Phosphorylierung von Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) führt. STAT3 dimerisiert mit sich selbst oder mit anderen STAT-Proteinen und transloziert in den Zellkern. Dort bindet es an spezifische DNA-Sequenzen und stimuliert die Transkription verschiedener Zielgene wie Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS-3), B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2) und Wingless Type MMTV Integration Site Family Member 5a (Wnt5a) (Sleeman, Anderson et al. 2000; Heinrich, Behrmann et al. 2003; Katoh 2007;

Rezende, Stoppiglia et al. 2007; Rezende, Vieira et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass CNTF über SOCS-3 und BCL-2 das Überleben von Inselzellen der Ratte fördert (Rezende, Stoppiglia et al. 2007; Rezende, Vieira et al. 2009), wobei SOCS-3 die JAK2/STAT3-Kaskade im Sinne eines klassischen Feedback-Mechanismus inhibiert (Heinrich, Behrmann et al. 2003). In einer Arbeit mit Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass sowohl akute als auch chronische inflammatorische Prozesse in SOCS-3-/dvav Mäusen zum Tod der Tiere führen. Bei gleichzeitiger Ausschaltung von IL-6, einem proinflammatorischen Zytokin, in IL6-/-/SOCS-3-/Dvav Mäusen kam es nicht zum Tod der Tiere, woraus zu schließen ist, dass die Anwesenheit von SOCS-3 notwendig ist für das Überleben während inflammatorischer Prozesse und dass SOCS-3 ein Regulator von IL-6 *in vivo* ist (Crocker, Kiu et al. 2012). SOCS-3 hat zudem einen Einfluss auf die Apoptose, wobei festgestellt wurde, dass SOCS-3 in  $\beta$ -Zellen vor TNF $\alpha$ -induziertem Zelltod durch Inhibierung der TNF $\alpha$ -induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen schützen kann (Bruun, Heding et al. 2009). Eine andere Arbeit konnte zeigen, dass CNTF über den STAT3-SOCS-3 Signalweg in Inselzellen des Pankreas der Ratte die Zytokin-induzierte Apoptose verhindert (Rezende, Vieira et al. 2009), wodurch sich zusammenfassend bezüglich SOCS-3 das Bild eines das Zellüberleben fördernden Faktors ergibt, welcher potentiell auch einen Einfluss auf die Podozytenhomöostase ausüben könnte.

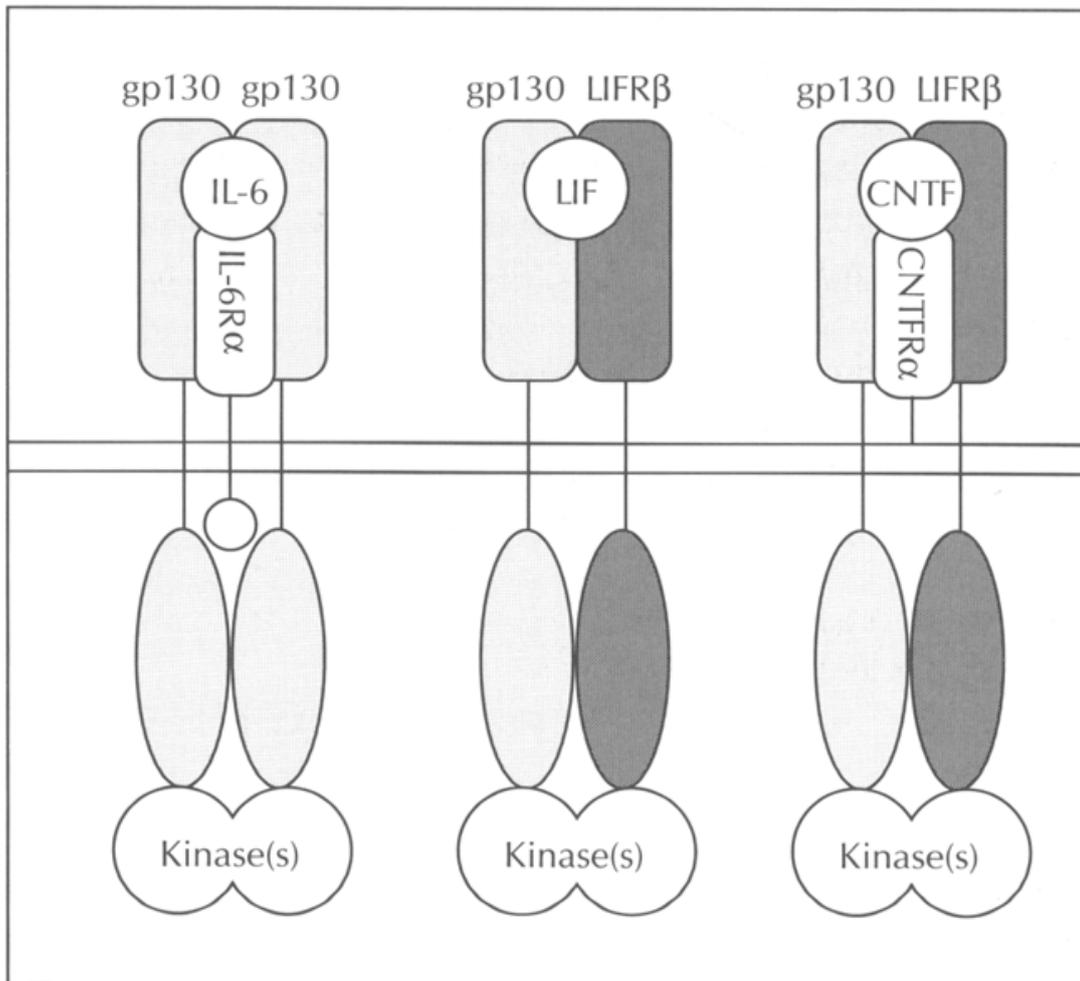


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe von IL-6, LIF und CNTF (Davis and Yancopoulos 1993)

#### 1.4 Was spricht für eine Bedeutung von „neuronalen“ Faktoren wie CNTF für den Podozyten?

Zwischen neuronalen Zellen und Podozyten bestehen zahlreiche molekulare Gemeinsamkeiten auf sowohl proteinbiochemischer Ebene als auch hinsichtlich der zellulären Architektur: Unter anderem konnte gezeigt werden, dass zuvor als neuronenspezifisch betrachtete Vesikelstrukturen auch von Podozyten gebildet werden und dass es molekulare zytoskelettäre Gemeinsamkeiten zwischen Podozytenausläufern und Dendriten telenzephaler Neurone gibt (Mundel, Heid et al. 1997; Rastaldi, Armelloni et al. 2006). Darüber hinaus konnte auch bewiesen werden, dass in beiden Zellarten die Entstehung von

Zellausläufern auf ähnlichen molekularen Prozessen basiert, wobei die beteiligten Proteine an übereinstimmenden subzellulären Lokalisationen gefunden wurden (Kobayashi 2002). Schließlich ist der Podozyt über Integrine und Dystroglykane mit der GBM verbunden, wobei sich diese Proteine auch an der neuromuskulären Synapse finden lassen (Jung, Yang et al. 1995; Regele, Fillipovic et al. 2000).

### **1.5 Ziele der Doktorarbeit**

Über die Rolle von CNTF und seines Rezeptors für die Nierenentwicklung und -funktion ist bislang nur wenig bekannt. Die Hypothese dieser Arbeit lautete, dass CNTF eine protektive Wirkung auf den Podozyten hat. Ziel dieser Arbeit war daher die Klärung der Bedeutung von CNTF für die Funktion und Zellhomöostase des Podozyten, wobei in diesem Zusammenhang folgende Fragen geklärt werden sollten:

1. Welche Signalkaskaden werden durch CNTF im Podozyten aktiviert?
2. Welche Gene werden durch CNTF reguliert?
3. Welchen Einfluss hat CNTF auf die zelluläre Physiologie, im speziellen die Migration und die Differenzierung von Podozyten?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Lösungen

#### 2.1.1 Zellkultur

- Konditionale immortalisierte Zelllinie aus murinen Podozyten (Prof. Peter Mundel, MGH, Harvard, Boston, USA)
- Konditionale immortalisierte Zelllinie aus humanen Podozyten (Prof. Moin Saleem, University of Bristol, Bristol, UK)
- Nährmedium für murine Podozyten:
  - 500 ml VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin, Biochrom AG, Berlin
  - Penicillin 100 U/ml / Streptomycin 100 µg/ml, Biochrom AG, Berlin
  - 50 ml fetales Kälberserum (FCS), Biochrom AG, Berlin
- Nährmedium für humane Podozyten:
  - 500 ml VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin
  - 5,5 ml Insulin-Transferrin-Selenium (ITS), Invitrogen, Karlsruhe
  - 50 ml FCS
- Hungermedium für murine Podozyten :
  - 500ml VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin
  - Penicillin 100 U/ml / Streptomycin 100 µg/ml
- Hungermedium für humane Podozyten
  - 500ml VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin
- Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 10 U/ml, Roche, Mannheim
- 0,05% Trypsin - 0,02% Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in phosphate buffered saline (PBS), Biochrom AG, Berlin
- PBS Dulbecco ohne Calcium, ohne Magnesium, Biochrom AG, Berlin
- Kollagen Typ I, R&D Systems, Wiesbaden
- Essigsäure (Eisessig), Roth, Karlsruhe
- 6-Well Platten, Corning, Berlin
- 12-Well Platten, Corning, Berlin
- Rasterschalen, Corning, Berlin
- T75 Zellkulturflaschen, Nunc, Wiesbaden

- T75 Zellkulturflaschen, Nunc, Wiesbaden
- Zellinkubator, Heraeus, Hanau

### 2.1.2. Stimulantien und Inhibitoren

Stimulantien:

- CNTF (aus der Ratte, in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt), R&D Systems, Wiesbaden
- IFN- $\gamma$ , 100 ng/ml

Inhibitoren:

- JAK2-Inhibitor AG490, 500  $\mu$ M , Calbiochem, Darmstadt
- STAT3 Inhibitor VII, 1 nM, Calbiochem, Darmstadt
- AKT-Inhibitor LY 294002, 10  $\mu$ M, Calbiochem, Darmstadt
- MEK-Inhibitor U0126, 20  $\mu$ M, Calbiochem, Darmstadt

Substanzpuffer:

- PBS Dulbecco ohne Calcium, ohne Magnesium
- Dimethyl-Sulphoxide (DMSO), Sigma-Aldrich, Hamburg

### 2.1.3 Immunfluoreszenz

- PBS
- Antikörperpuffer:
  - 4 g BSA
  - ad 100ml PBS

• 20% Aceton

• 80% Methanol

Aceton und Methanol als Gemisch eingesetzt

- 10% neutral gepufferte Formalinlösung
- 0,01% Triton-Puffer
- IS Mounting Medium, Dianova, Hamburg
- IS Mounting Medium mit 4'-6-diamidino-2-phenylindol (Dapi), Dianova, Hamburg

Das Medium mit Dapi wurde 1:20 mit dem Medium ohne Dapi vermischt.

#### 2.1.4. Zellyse

- PBS:
  - 136 mM NaCl, AppliChem, Darmstadt
  - 2,7 mM KCl, Merck, Darmstadt
  - 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, Merck, Darmstadt
  - 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck, Darmstadt
- 1% Triton-Lyse-Puffer:
  - 1% Triton X 100, Sigma-Aldrich, Hamburg
  - 20 mM TRIS pH 7,5, Sigma-Aldrich, Hamburg
  - 150 mM KCl
  - 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich, Hamburg
  - 100 nM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, Biochemica, Wiesbaden
  - Complete Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette, Roche, Mannheim
  - 0,25 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) kurz vor Einsatz dazugeben
- 4 x Laemmli Stock Solution:
  - 50 mM TRIS-HCl pH 6,8, Sigma-Aldrich, Hamburg
  - 8% Sodium dodecyl sulphate (SDS) –Lösung, Biomol, Hamburg
  - 10% Glycerol, Sigma-Aldrich, Hamburg
  - 0,4g/100ml Bromphenol Blau, Sigma-Aldrich, Hamburg
- 4 x Laemmli/DTT-Puffer:
  - 4 x Laemmli Stock Solution
  - 50mM Dithiothreitol (DTT), Biomol, Hamburg

#### 2.1.5. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese und Westernblot

10%-ige Polyacrylamidgele (SDS-PAGE):

- Für 2 Trenngele:
  - 3 ml 30%-iges Acrylamid (Rotiphere), Roth, Karlsruhe
  - 1,5 ml Aqua dest
  - 4,5 ml Trenngelpuffer
  - 90 µl 10% Ammoniumperoxiddisulfat (APS), Biomol, Hamburg

- 15  $\mu$ l N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED), Roth, Karlsruhe
- Für 2 Sammelgele:
  - 0,535 ml 30%-iges Acrylamid
  - 1,135 ml Aqua dest
  - 1,665 ml Sammelgelpuffer
  - 40  $\mu$ l 10%-iges APS
  - 5  $\mu$ l TEMED
- Trenngelpuffer (pH 8,8):
  - 360mM TRIS HCl, Sigma-Aldrich, Hamburg
  - 1140mM TRIS Base, Sigma-Aldrich, Hamburg
  - 14mM SDS, Biomol, Hamburg
  - Aqua dest
- Sammelgelpuffer (pH 6,9):
  - 484mM TRIS HCl
  - 16mM TRIS Base
  - 14mM SDS
  - Aqua dest
- Laufpuffer (10 x):
  - 3,5 mM SDS
  - 247,7 mM TRIS
  - 191,8 mM Glycin, AppliChem, Darmstadt1:10 verdünnt eingesetzt
- Transferpuffer (10 x):
  - 247,7 mM TRIS Base
  - 3,5 mM SDS
  - 187,8 mM Glycin
  - 20 Vol% Methanol, AppliChem, Darmstadt
  - Aqua dest1:10 verdünnt eingesetzt
- Proteinwaschpuffer (25 x):
  - 680 ml 5 M NaCl
  - 34 ml Tween-20, Roth, Karlsruhe

- 340 ml 1 M TRIS pH 7,5  
1:25 verdünnt eingesetzt
- Blockpuffer:
  - 5% Bovine Serum Albumin (BSA), VWR, in Proteinwaschpuffer
- Enhanced chemiluminescence (ECL):
  - Lösung A:
    - 100 mM TRIS Base pH 8,8
    - 2,5 mM Luminol, Fluka, Hamburg
    - 0,4 mM Coumarinsäure, Sigma-Aldrich, Hamburg
    - Aqua dest
  - Lösung B:
    - Aqua dest
    - 100 mM TRIS Base pH 8,8
    - 1,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Roth, Karlsruhe

Gebrauchslösung: unmittelbar vor der Anwendung eine Mischung aus Lösung A und B 1+1 ansetzen.

- Größenmarker: Prestained low bred Protein Ladder, New England Biolabs, Frankfurt
- Nitrocellulosemembran, Porengröße 0,45µl, Whatman Protran, Dassel
- Tank-Blot , Biorad, München
- Gießstation, Biorad, München
- Imager, FluorChem FC2, Biozym mit A Ease Software 6.0, A Innotech, Ziesar

### **2.1.6 RNA-Isolierung, Reverse Transkription, PCR und Real-Time quantitative PCR**

- RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Hilden
- QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Hilden
- HotStar Taq DNA Polymerase Kit, Qiagen, Hilden
- Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Darmstadt
- Tris Acetat EDTA (TAE)-Puffer (50 x):
  - 424 g Tris-Base

- 57,1 ml Essigsäure
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8
- Aqua dest ad 1000ml
- 1 :50 verdünnt eingesetzt
- 1,5% Agarosegel :
  - Agarose, Roth, Karlsruhe
  - TAE-Puffer (1 x)
  - 0,025% Ethidiumbromid 3Trpf auf 100 ml
- Größenmarker :
  - 5 µl Lambda DNA-BstEII-Digest, New England Biolabs, Frankfurt
  - 5 µl 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0kb), New England Biolabs, Frankfurt
  - 5 µl 100bp DNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt
- Thermocycler, Biometra, Göttingen

### 2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper:

- Anti-JAK2 Antibody (1:100), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-phospho JAK2 Antibody (1:100), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-STAT3 Antibody (im Westernblot 1:1000; in IF 1:100), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-phospho STAT3 (Tyr 705) Antibody (im WB 1:1000; in IF 1:100), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-STAT1 Antibody (1:1000), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-phospho STAT1 (Tyr 701) Antibody (1:1000), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-AKT Antibody (1:1000), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-phospho AKT Antibody (1:1000), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-ERK Antibody (1:1000), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-phospho ERK Antibody (1:1000), Cell Signaling, Leiden, Niederlande
- Anti-CNTF Antidody (1:100), Santa Cruz, Heidelberg
- Anti-CNTFR Antibody (1:100), Santa Cruz, Heidelberg

- Anti-LIFR Antibody (1:250), Santa Cruz, Heidelberg
- Anti-gp130 Antibody (1:100), Santa Cruz, Heidelberg

Sekundäre Antikörper:

- Anti-rabbit IgG (1:10.000) , GE Healthcare UK limited, München
- Anti-rabbit 555 (1:1000), Alexa Fluor, Karlsruhe
- Anti-goat 488 (1:1000), Alexa Fluor, Karlsruhe

## 2.2. Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Podozyten

Für diese Arbeit wurden zum einen konditional-immortalisierte, murine Podozyten verwendet, die uns freundlicherweise von Prof. Peter Mundel, MGH, Harvard, Boston, USA, zur Verfügung gestellt wurden und aus der Niere einer Immortomus stammen. Zum anderen wurden konditional-immortalisierte, humane Podozyten verwendet, welche uns von Prof. Moin Saleem, Bristol, UK, zur Verfügung gestellt wurden. Zur Herstellung dieser Zelllinie wurden Podozyten aus der Niere eines dreijährigen Kindes mit Hydronephrose und nur 10%-iger Nierenfunktion gewonnen. Histologisch zeigte sich in dieser Niere eine Glomerulosklerose mit tubulärer Atrophie und vernarbten, erweiterten Calices ohne den Nachweis von Dysplasie oder Hinweis auf eine primäre glomeruläre Erkrankung. Man kann dementsprechend davon ausgehen, dass die Schäden ursächlich auf eine obstruktive Nephropathie zurückzuführen sind und dass die aus dieser Niere gewonnenen Podozyten normal ausgebildet sind (Saleem, O'Hare et al. 2002).

Die konditionale Immortalisierung der murinen sowie der humanen Podozyten wurde durch Insertion einer thermosensiblen Variante des SimianVirus-40-Large Tumor-Antigens in das Genom erzeugt. Die thermosensible Variante basiert auf der Mutation des temperature sensitive Antigene 58 (tsA58). Ist das SV-40-Large T-Antigen bei einer Temperatur von 33 °C aktiv, proliferieren die Zellen. Diese Proliferation wird bei den murinen Podozyten durch Zugabe von IFN- $\gamma$  über eine Aktivierung eines zusätzlich eingebauten IFN- $\gamma$ -driven H-2Kb-

Promotors weiter gesteigert (Saleem, O'Hare et al. 2002; Shankland, Pippin et al. 2007). In diesem Zustand werden die Zellen kultiviert. Erhöht man die Temperatur bei murinen sowie humanen Podozyten auf 37 °C und entfernt zusätzlich das Interferon bei den murinen Podozyten, wird das SV-40-Large T-Antigen in der jeweiligen Zellreihe inaktiviert und die Zellen gehen von der Proliferationsphase in die Differenzierungsphase über. Nach etwa 12 Tagen *in vitro* Differenzierung konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Mundel alle bisher in *in vivo* Podozyten beschriebenen Proteine in den murinen Podozyten nachweisen, so unter anderem CD2AP, Nephrin, P-Cadherin, Podocin, Synaptopodin und WT-1 (Mundlos, Pelletier et al. 1993; Mundel, Heid et al. 1997; Shankland, Pippin et al. 2007). Die Arbeitsgruppe um Prof. Saleem konnte ebenfalls diese Markerproteine in den ausdifferenzierten humanen Podozyten nachweisen (Saleem, O'Hare et al. 2002). Im Unterschied zu den murinen Podozyten ist die Zugabe von IFN- $\gamma$  zur Differenzierung der humanen Podozyten nicht notwendig, da der IFN- $\gamma$ -driven H-2Kb-Promotor, welcher von der Arbeitsgruppe um Prof. Mundel eingesetzt wurde, bei Prof. Saleem in der Herstellung der humanen Podozyten-Zellreihe keine Anwendung fand. Die genaue Zusammensetzung der Nährmedien für murine und humane Podozyten ist unterschiedlich und der Auflistung im Abschnitt 2.1.1 (Materialien und Lösungen; Zellkultur) zu entnehmen. Die Kultivierung beider Zellreihen erfolgte in kollagenbeschichteten T-75 Zellkulturflaschen. Die Beschichtung der Flaschen mit Kollagen erfolgte bis zu einem Tag vor Aussaat mit Kollagen I, das in 0,02 N Essigsäure gelöst wurde. Von dieser Lösung wurden 5 ml in jede T-75 Flasche gegeben, die für eine Stunde bei 37 °C im Zellinkubator inkubiert, danach einmal mit PBS gespült und für eine weitere Stunde zum Trocknen bei 37 °C inkubiert wurde. Zur Aktivierung der Proliferation wurde dem Nährmedium der murinen Podozyten 10 U/ml IFN- $\gamma$  zugesetzt. Beide Zellreihen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 33 °C in einem Zellinkubator kultiviert. Unter diesen Bedingungen zeigten beide Zellreihen eine undifferenzierte pflastersteinartige Morphologie und ein proliferatives Wachstum. Bei Erreichen einer Zelldichte von circa 70% wurden die Zellen für die Grundkolonie im Verhältnis 1:3 bis 1:4 passagiert. Dazu wurde das jeweilige Nährmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 3,5 ml Trypsin-EDTA dazugegeben und die Zellkulturflasche für 5

Minuten bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im jeweiligen Nährmedium aufgenommen und für 5 Minuten bei 1100 rpm abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in Nährmedium resuspendiert und auf neue kollagenbeschichtete Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden in insgesamt 10 ml Nährmedium, im Fall der murinen Podozyten zusätzlich mit IFN- $\gamma$ , pro Zellkulturflasche kultiviert. Für die Experimente wurden ausdifferenzierte Podozyten verwendet. Für die Ausdifferenzierung wurden die Zellen in 6-Well- und 12-Well-Platten ausgesät und in Nährmedium ohne IFN- $\gamma$  bei 37,5 °C im Zellinkubator kultiviert. Die Ausdifferenzierungszeit betrug für beide Zellreihen 12-14 Tage. Die Zellzahl betrug in den 6-Well-Platten 30000 murine Zellen pro Well, beziehungsweise 25000 humane Zellen pro Well und in den 12-Well-Platten 9000 murine Zellen pro Well, beziehungsweise 5000 humane Zellen pro Well. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Das jeweilige Nährmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Unter dieser Voraussetzung stellten die Podozyten die Proliferation ein und bildeten ihre charakteristischen Fußfortsätze. Für die Experimente wurden nur Podozyten der Passagen 20 bis 29 verwendet.

### **2.2.2 Stimulations- und Inhibitionsversuche**

Alle Experimente an ausdifferenzierten Podozyten wurden nach 12-14 Tagen der Differenzierung durchgeführt. Am Abend vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf Hungermedium (siehe Abschnitt 2.1.1 Materialien und Lösungen; Zellkultur) gesetzt. So kann einer Aktivierung diverser Signalwege durch FCS oder ITS vorgebeugt werden. Die Zellen wurden mit CNTF in verschiedenen Konzentrationen und in unterschiedlicher Dauer stimuliert, indem CNTF direkt in die Wells pipettiert wurde. Für die Zeit der Stimulation wurden die Zellen weiterhin im Zellinkubator inkubiert. Als Positivkontrolle wurde PMA, als Negativkontrolle der jeweilige Puffer verwendet, in dem die Stimulantien bzw. Inhibitoren gelöst waren (PBS und DMSO). Die Inhibitoren (AG 490, STAT3, LY294002, U0126) wurden jeweils eine Stunde vor der längsten Stimulation auf die Zellen gegeben.

### **2.2.3 Immunfluoreszenz**

Mit der Immunfluoreszenz werden Proteine mittels Antikörper, die mit einem Fluorochrom versehen sind, sichtbar gemacht. Auf diese Weise kann ein Protein in einem Gewebe oder in einem Zellkompartiment lokalisiert werden. Für die Experimente wurden humane und murine Podozyten auf Glasplättchen in 12-Well Platten kultiviert. Nach 14 Tagen der Differenzierung wurden die Zellen mit CNTF stimuliert und anschließend gefärbt. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Methanol, Aceton oder 10%-igem neutralgepufferten Formalin fixiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Zellen mit primärem Antikörper, welcher in Antikörperpuffer gelöst war, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das Epitop des zu lokalisierenden Proteins. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde 0,01%-iges Triton dem primären Antikörper hinzugefügt. Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut dreimalig gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in Antikörperpuffer angesetzt war, für eine Stunde inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und bindet an den Fc-Teil des primären Antikörpers. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Glasplättchen mit den Zellen aus den Wells entnommen und auf einen Objektträger aufgebracht. Zum Eindeckeln wurde ein dapihaltiges Fluoreszenzeindeckmittel benutzt. Das Glasplättchen diente dabei als Deckglas. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.4 Proteinisolierung und Westernblot**

Zur Proteinisolierung wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und anschließend in 50 µl 1%-Triton-Lyse-Puffer mit einem Zellschaber gekratzt, in Eppendorf-Röhrchen überführt und zur Lyse für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 4 x Lämmli/DTT-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, wodurch die Proteine denaturiert wurden. Die denaturierten Proteine wurden mittels SDS-

Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt. SDS sorgt dafür, dass die Proteine eine negative Gesamtladung erhalten und nur ihrer Größe nach aufgetrennt werden, wobei die kleinsten Proteine am schnellsten das Gel durchwandern. Die Taschen des SDS-Gels wurden jeweils mit 15 µl Probe, was etwa 8 µg Protein entspricht, beziehungsweise mit 10 µl Proteinmaker beladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer und dauerte insgesamt zwei Stunden. Für die Sammelphase wurde für 30 Minuten eine Spannung von 70 V und für die Trennphase eine Stromstärke von 20 mA pro Gel für 90 Minuten eingestellt. Als nächstes wurden die Proteine aus den Gelen mittels Tank-Blot-Verfahren im Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde über 120 Minuten eine Stromstärke von 200 mA angelegt. Die auf die Membran übertragenen Proteine können anschließend durch gezielte Antikörpernachweisreaktionen sichtbar gemacht werden. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde bei 37 °C in Blockpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in einem spezifischen Primärantikörper bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Danach erfolgten drei fünfminütige Waschschriffe mit Waschpuffer, wodurch überschüssiger Primärantikörper entfernt wurde. Anschließend wurde die Membran für 45 Minuten mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit Meerrettichperoxidase markiert. Nach drei weiteren Waschschriffen wurde die Membran für eine Minute in ECL-Visualisierungslösung, in der Luminol und Wasserstoffperoxid enthalten sind, inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Reaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophtalat und Licht. Dieses Licht wird als Chemilumineszenz bezeichnet und konnte mittels Imager detektiert werden. Die Auswertung erfolgte mittels Densitometriemessungen.

### **2.2.5 RNA-Isolierung, Reverse Transkription PCR und Real-Time quantitative PCR**

Für die Experimente wurden humane Podozyten in 6-Well Platten kultiviert und je nach Versuchsaufbau während der Differenzierungsphase oder nach Ausdifferenzierung mit 100 ng/ml CNTF stimuliert.

#### **RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe eines Kits der Firma Qiagen, das auf der Single Step Methode nach Chomczynski und Sacchi basiert (Chomczynski and Sacchi 1987). Die Zellen wurden mit RNase-freiem PBS gewaschen, mit 350 µl RLT-Puffer versetzt, mit einem Zellschaber gekratzt und in sterile Eppendorf-Röhrchen überführt. Der RLT-Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, ein chaotropes Salz, das Proteine denaturiert. Zudem werden durch den RLT-Puffer RNasen inaktiviert. Um die genomische DNA (gDNA) zu eliminieren, wurde das Lysat auf eine gDNA-Säule überführt und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat mit 350 µl Ethanol vermischt, auf eine RNA-Säule gegeben und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Das Ethanol fördert die Bindung der RNA an die Membran der RNA-Säule. Als nächstes folgten drei Waschschriffe: Zuerst wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Danach wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Der zweite Waschschriff wurde wiederholt. Im Anschluss wurde eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit (21.100 g) zentrifugiert, um den Waschpuffer vollständig aus der Säule zu entfernen. Als letztes erfolgte die Elution, bei der die RNA aus der Säule gelöst und in einem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen wird. Dazu wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und eine Minute bei 8000 g zentrifugiert.

## **Reverse Transkription**

Für die Anwendung der PCR ist es notwendig aus der RNA cDNA herzustellen. Dies geschieht mithilfe der Reversen Transkriptase, einem Enzym, das zu einem RNA-Strang einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Für diese Methode wurde ein Kit der Firma Qiagen genutzt. Im ersten Schritt wurde restliche noch vorhandene genomische DNA entfernt. Dazu wurde 10µl RNA (max. 1 µg) mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer und 2 µl RNase-freiem Wasser vermischt und für 3 Minuten bei 42 °C inkubiert. An dieser Stelle wurde ein Aliquot von 0,5 µl für eine gDNA-Verdau-Kontrolle entnommen. Im zweiten Schritt erfolgte die Reverse Transkription. Hierzu wurde 1µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 4 µl Quantiscript RT-Puffer und 1 µl RT Primer zu der Probe gegeben und das Gemisch für 25 Minuten bei 42 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur binden die Primer an den mRNA-Strang (*Annealing*) und die Reverse Transkriptase beginnt einen komplementären DNA-Strang zu dem mRNA-Strang zu synthetisieren. Das Enzym hat eine weitere Fähigkeit: Es besitzt eine RNase H Aktivität. Das bedeutet, dass es spezifisch die RNA in einem RNA-DNA-Hybrid zerschneiden kann und somit der cDNA-Strang freigesetzt wird. Um die Reverse Transkriptase am Ende der cDNA-Synthese zu inaktivieren, wurde die Probe für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die cDNA und das nach dem Verdau entnommene Aliquot einer Kontroll-PCR mit 40 Zyklen (GAPDH) unterzogen.

## **Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR)**

Die PCR dient der Vervielfältigung der DNA *in vitro*. Sie wurde mithilfe des HotStarTaq DNA Polymerase Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Zunächst wurde ein sogenannter Master Mix aus 2 µl 10x PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,4 µl dNTP Mix (je 100mM), 0,1 µl je Primer (100 pM), 0,14 µl HotStarTaq Polymerase und 16,76 µl Aqua dest hergestellt und in PCR-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurde 0,5 µl cDNA (300 ng) hinzugegeben. Die PCR-Röhrchen wurden in einen Thermocycler gegeben. Die PCR verlief nach folgendem Protokoll: Zur Aktivierung der HotStar Taq DNA-Polymerase

wurde der Ansatz für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nun folgten 40 Zyklen bestehend aus drei Schritten. Im ersten Schritt wurde der Ansatz für 30 Sekunden auf 95 °C erhitzt. Dies führt zur Denaturierung der DNA-Stränge. Im zweiten Schritt (*Annealing*) wurde der Ansatz für 30 Sekunden auf eine für die Primer optimale Temperatur gesenkt, bei der die Primer an die DNA binden. Die optimale Temperatur wurde in einer separaten Gradienten-PCR ausgetestet. Im dritten Schritt (Elongation) wurde der Ansatz für 30 Sekunden auf 72 °C erhitzt. Hierbei synthetisiert die HotStar Taq-Polymerase beginnend am Primer den komplementären DNA-Strang. Nach 40 Zyklen wurde zur abschließenden Elongation die Probe für 10 Minuten auf 72 °C erhitzt und bis zur Entnahme aus dem Thermocycler bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf ein 1,5%-iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen und in einer horizontalen, mit TAE-Puffer-gefüllten Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 90 V über 30 Minuten ihrer Größe nach aufgetrennt. Ethidiumbromid ist ein Fluorochrom, welches in den DNA-Doppelstrang interkaliert. Dadurch wird sein Anregungsspektrum so verändert, dass es unter Anregung durch UV-Licht verstärkt leuchtet. So konnte die aufgetrennte DNA mittels Imager visualisiert werden.

### **Real-Time quantitative PCR**

Die Real-Time quantitative PCR (Real-Time qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Der Ansatz für die Real-Time qPCR bestand aus 10 µl Power SYBR Green PCR Master Mix, 0,25 µl 100 p-molaren Primer, 1 µl cDNA und 8,5 µl Aqua dest. SYBR Green ist ein Fluorochrom, das in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Fluoreszenz kann von einer Kamera im Thermocycler detektiert werden. Die PCR verlief nach folgendem Protokoll: Aktivierung der Taq-Polymerase und gleichzeitige Denaturierung der Doppelstränge im ersten Zyklus 15 Minuten bei 95 °C, ab dem zweiten Zyklus 15 Sekunden, *Annealing* 30 Sekunden bei 58 °C, Elongation 30 Sekunden bei 72 °C. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz des SYBR Greens über 34 Sekunden bei 77 °C gemessen und graphisch dargestellt. Aus diesem Graphen wurden die sogenannten Cycle Threshold-Werte (CT-Werte) bestimmt. Als

Referenzgen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Dies ist ein sog. *housekeeping gene*, dessen Expression in den untersuchten Proben konstant ist. Bei jeder PCR und jeder Real-Time qPCR wurde zusätzlich eine Probe ohne DNA (Aqua dest) als Negativkontrolle mitgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte unter Verwendung der sogenannten  $\Delta\Delta$  CT-Methode.

### **2.2.6 Differenzierungsversuche**

Um den Einfluss von CNTF auf die Podozyten während ihrer Entwicklung zu untersuchen, wurden undifferenzierte Podozyten in 6-Well Platten ausgesät und mit 100 ng/ml CNTF stimuliert. Am Tag 3, Tag 7 und Tag 13 wurde jeweils die RNA der stimulierten Zellen sowie der Kontrollgruppe isoliert und mithilfe der Real-Time qPCR die Genexpression der Markerproteine WT-1 und Synaptopodin untersucht.

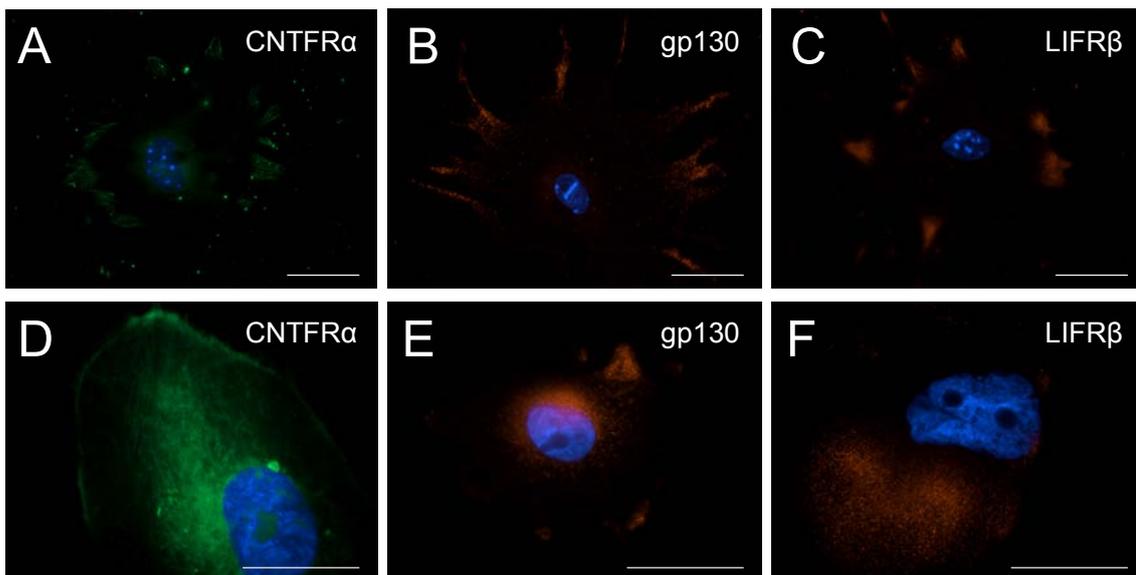
### **2.2.7 Migrationsassay**

Im Migrationsassay betrachtet man die Einwanderung von Zellen in einen künstlich erzeugten „Wundspalt“. Hierzu wurden die Podozyten in einer Rasterschale ausgesät und nach Abschluss der Differenzierung wurde mit einer Pipettenspitze ein standardisierter Spalt durch den Zellrasen gekratzt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml CNTF stimuliert und zu Beginn (Zeitpunkt 0 Stunden) sowie nach 6, 12 und 24 Stunden mit Hilfe eines Lichtmikroskops fotografiert. Die Kontrollgruppe erhielt PBS. Zur Auswertung wurden die in den Spalt gewanderten Zellen gezählt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Der CNTF-Rezeptorkomplex wird im Podozyten exprimiert

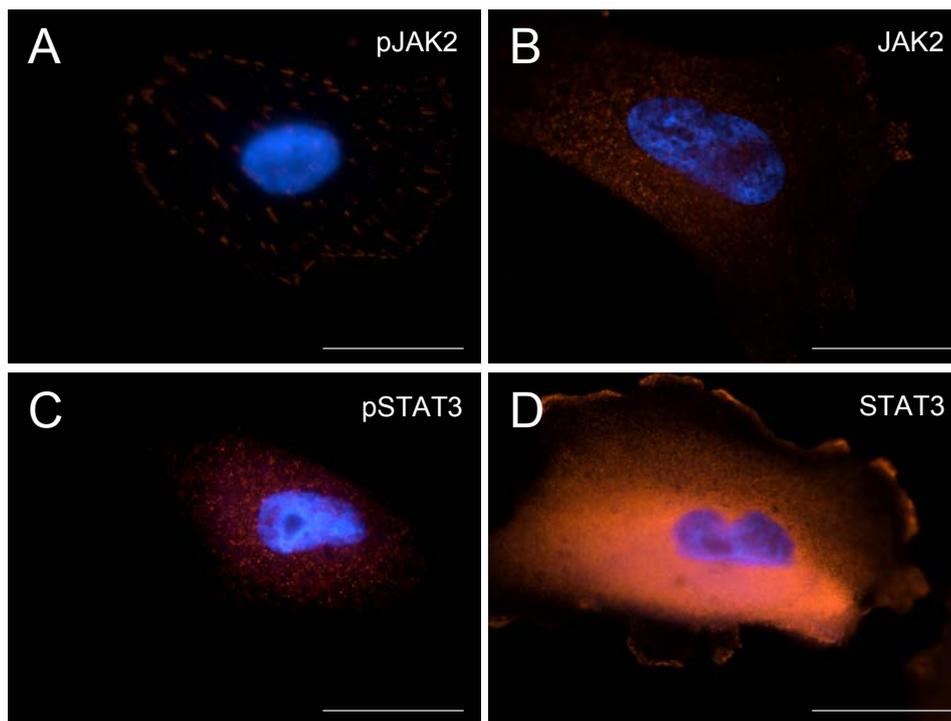
Die Effekte von CNTF werden durch einen dreiteiligen Rezeptorkomplex, bestehend aus gp130, LIFR und CNTFR $\alpha$ , vermittelt. Um zu untersuchen, ob der CNTF-Rezeptorkomplex im Podozyten exprimiert wird, wurden gp130, LIFR und CNTFR $\alpha$  mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierbei wurden murine und humane Podozyten wie im Methodenteil beschrieben kultiviert, immunzytochemisch angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Es zeigte sich bei beiden Zelltypen, dass vor allem in der Peripherie der Fußfortsätze der murinen Podozyten gp130, LIFR und CNTFR $\alpha$  angefärbt werden konnten (Abb. 3).



**Abbildung 3 : Immunzytochemische Analyse ausdifferenzierter Podozyten. (A,B,C) CNTFR $\alpha$ , gp130 und LIFR $\beta$  in den peripheren Fußfortsätzen muriner Podozyten. (D,E,F) CNTFR $\alpha$ , gp130 und LIFR $\beta$  in den peripheren Fußfortsätzen humaner Podozyten. Maßstab 10 $\mu$ m.**

### 3.2 JAK2 und STAT3 werden im Podozyten exprimiert

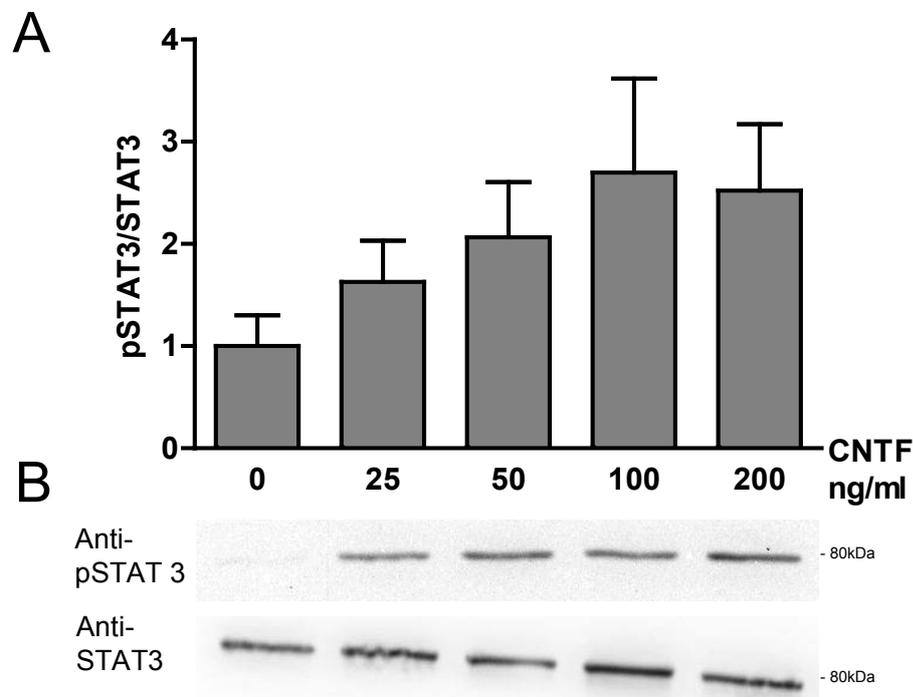
Es folgten Experimente, in denen die Proteine der JAK2/STAT3-Kaskade pJAK2, JAK2, pSTAT3 und STAT3 im humanen Podozyten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurden. Man erkennt ein unterschiedliches Verteilungsmuster dieser Proteine im Podozyten: Die aktivierten Formen pJAK2 und pSTAT3 zeigen ein scholliges Verteilungsmuster, JAK2 und STAT3 zeigen ein eher flächiges Verteilungsmuster. Man erkennt außerdem, dass pSTAT3 vor allem in Zellkernnähe nachweisbar ist und STAT3 sich besonders um den Zellkern sowie an der Zellmembran nachweisen lässt. Die im Westernblot nachgewiesenen Unterschiede nach Stimulation mit CNTF konnten in der Immunfluoreszenz nicht gezeigt werden (Daten daher nicht abgebildet; Abb. 4).



**Abbildung 4 : Immunzytochemische Analyse humaner Podozyten. (A) pJAK2 (B) JAK2 (C) pSTAT3 (D) STAT3. Maßstab 10µm.**

### 3.3 CNTF aktiviert den JAK2/STAT3-Signalweg im Podozyt

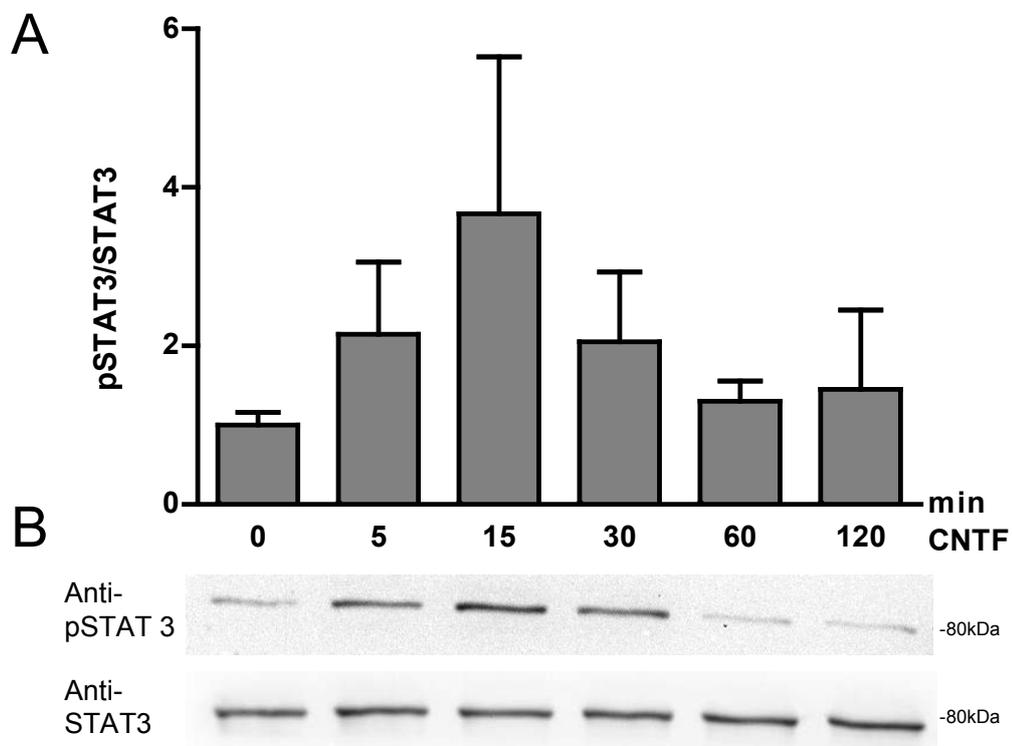
In den folgenden Experimenten wurde die Aktivierung der JAK2/STAT3-Kaskade nach CNTF-Stimulation in Podozyten untersucht. Hierzu wurden Podozyten wie im Methodenteil beschrieben kultiviert, mit CNTF stimuliert und die Proteine mittels Westernblot nachgewiesen. Zunächst wurden Titrationsexperimente zur Ermittlung einer geeigneten experimentellen CNTF-Konzentration durchgeführt. Hierzu wurden die Podozyten für 15 Minuten mit ansteigender CNTF-Konzentration stimuliert und pSTAT3 und STAT3 mittels Westernblot nachgewiesen. Es zeigte sich, dass in humanen Podozyten eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 bereits ab einer CNTF-Konzentration von 25 ng/ml nachweisbar ist (pSTAT3/STAT3-Ratio=1,627 ± 0,405) (Abb. 5). Eine weitere Erhöhung der CNTF-Konzentration führte zu einer stärkeren Phosphorylierung mit einem Maximum bei 100 ng/ml CNTF (pSTAT3/STAT3-Ratio=2,699 ± 0,918), sodass für alle folgenden Experimente eine Dosis von 100 ng/ml CNTF eingesetzt wurde.



**Abbildung 5 : Konzentrationskinetik pSTAT3/STAT3 nach CNTF-Stimulation humaner Podozyten mittels Westernblot. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT3/STAT3-Ratio nach Stimulation mit CNTF in aufsteigender Konzentration für 15 min (n=5). Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM. (B) Repräsentativer Westernblot.**

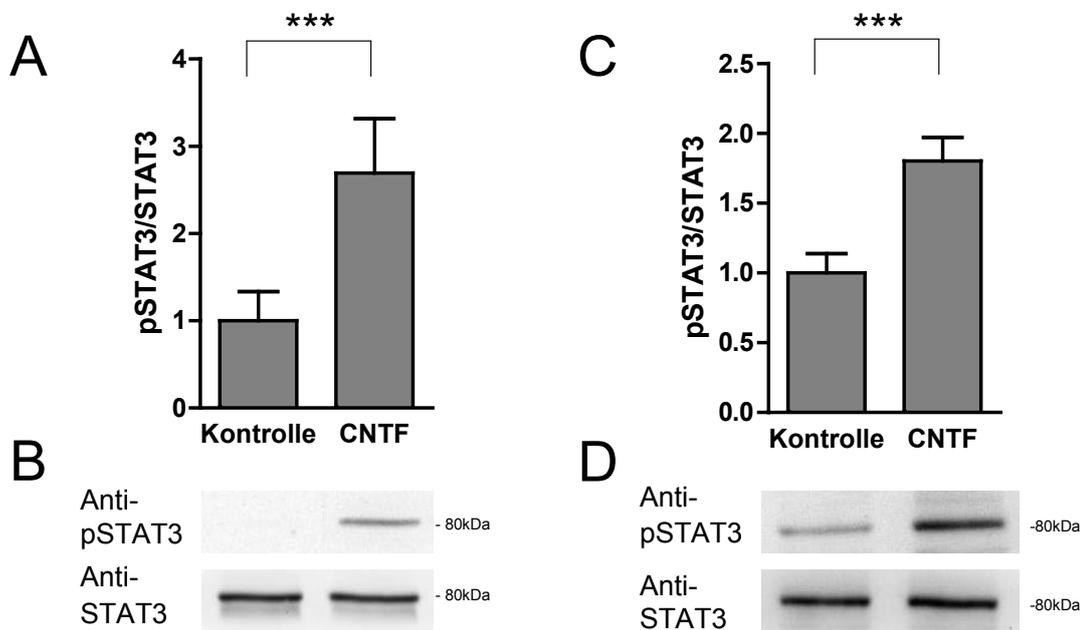
## Ergebnisse

Als nächstes folgten Titrationsexperimente zur Ermittlung einer geeigneten experimentellen CNTF-Stimulationsdauer. Hierzu wurden die Podozyten mit 100 ng/ml CNTF für 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten stimuliert und pSTAT3 und STAT3 mittels Westernblot nachgewiesen. Hierbei zeigte sich, dass in humanen Podozyten die Phosphorylierung von STAT3 bereits nach 5 Minuten ( $p\text{STAT3}/\text{STAT3}\text{-Ratio}=2,146 \pm 0,913$ ) nachweisbar ist. Nach 15 Minuten ist die maximale Phosphorylierung erreicht ( $p\text{STAT3}/\text{STAT3}\text{-Ratio}=3,667 \pm 1,979$ ) und nimmt danach kontinuierlich ab. Nach 60 Minuten ist der Aktivierungsgrad wieder auf seinen Ausgangswert zurückgegangen (Abb. 6).



**Abbildung 6 : Zeitkinetik pSTAT3/STAT3 nach CNTF-Stimulation humaner Podozyten mittels Westernblot. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT3/STAT3-Ratio nach Stimulation mit 100ng/ml CNTF über die Zeit (n=3). Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM. (B) Repräsentativer Westernblot.**

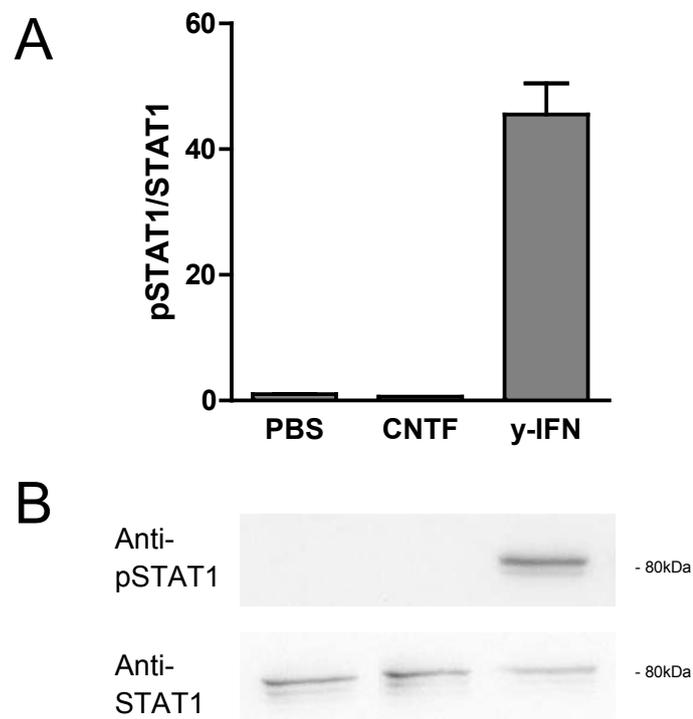
Es folgten Experimente, in denen humane und murine Podozyten mit 100 ng/ml CNTF für 15 Minuten stimuliert wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert, pSTAT3 und STAT3 mittels Westernblot nachgewiesen und das Verhältnis von pSTAT3 zu STAT3 ermittelt. Im gepaarten T-Test zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der pSTAT3/STAT3-Ratio der stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, sowohl in den humanen Podozyten ( $p=0,0007$ ) mit einer Steigerung der pSTAT3/STAT3-Ratio um 2,69, als auch in den murinen Podozyten ( $p=0,0003$ ) mit einer Steigerung um 1,80 (Abb. 7).



**Abbildung 7 : Phosphorylierung von STAT3 nach CNTF-Stimulation humaner und muriner Podozyten. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT3/STAT3-Ratio im humanen Podozyten nach Stimulation mit 100 ng/ml CNTF für 15 min mittels gepaartem T-Test ( $n=20$ ,  $p=0,0007$ ). (B) Repräsentativer Westernblot der humanen Podozyten. (C) Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von STAT3 im murinen Podozyten nach Stimulation mit 100 ng/ml CNTF für 30 min mittels gepaartem T-Test ( $n=16$ ,  $p=0,0003$ ). (D) Repräsentativer Westernblot der murinen Podozyten. Darstellung der Daten als Mittelwerte $\pm$ SEM.**

## Ergebnisse

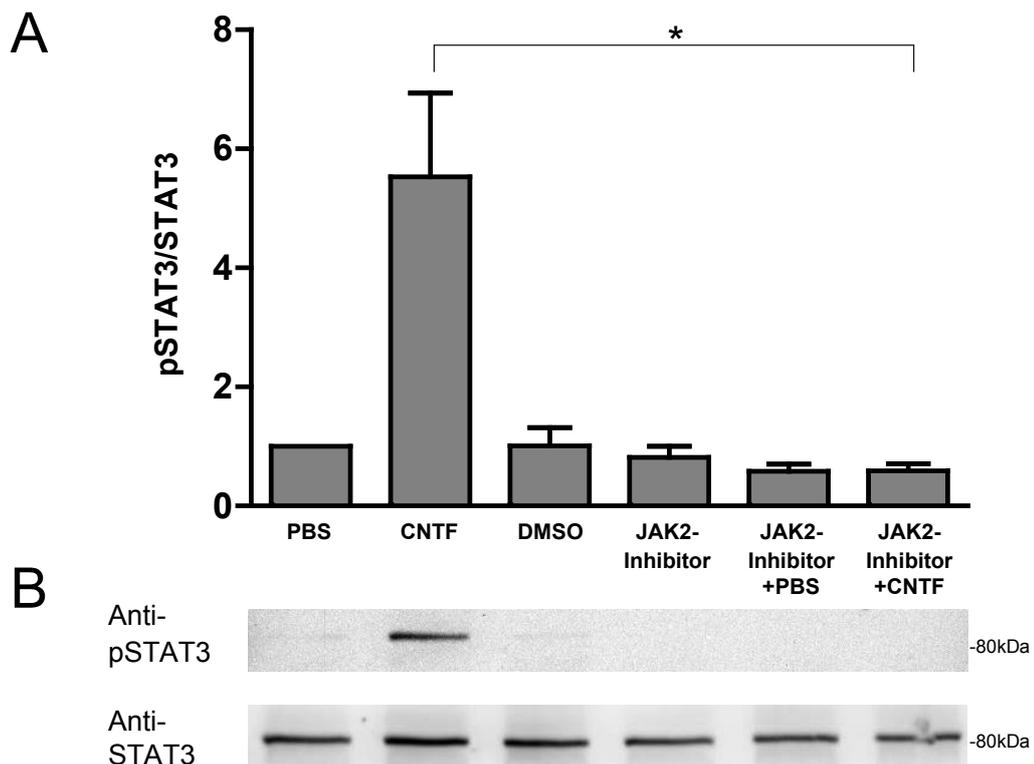
Ein weiteres Experiment sollte klären, ob die Stimulation der Podozyten mit CNTF neben der Phosphorylierung von STAT3 auch zu einer Phosphorylierung anderer STAT-Proteine wie STAT1 führt. Dazu wurden murine Podozyten über eine Dauer von 30 min mit 100 ng/ml CNTF stimuliert, pSTAT1 und STAT1 mittels Westernblot nachgewiesen, densitometrisch ausgewertet und das Verhältnis von pSTAT1 zu STAT1 ermittelt. Als Negativkontrolle diente PBS, als Positivkontrolle wurde 100 ng/ml IFN- $\gamma$  verwendet. Hierbei ließ sich keine Aktivierung von STAT1 durch Stimulation mit CNTF nachweisen (Abb. 8).



**Abbildung 8 : Phosphorylierung von STAT1 unter CNTF in murinen Podozyten. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT1/STAT1-Ratio nach Stimulation mit 100 ng/ml CNTF (n=2). Darstellung der Daten als Mittelwerte $\pm$ SEM. (B) Repräsentativer Westernblot.**

### 3.4 JAK2- und STAT3-Inhibitionsversuche

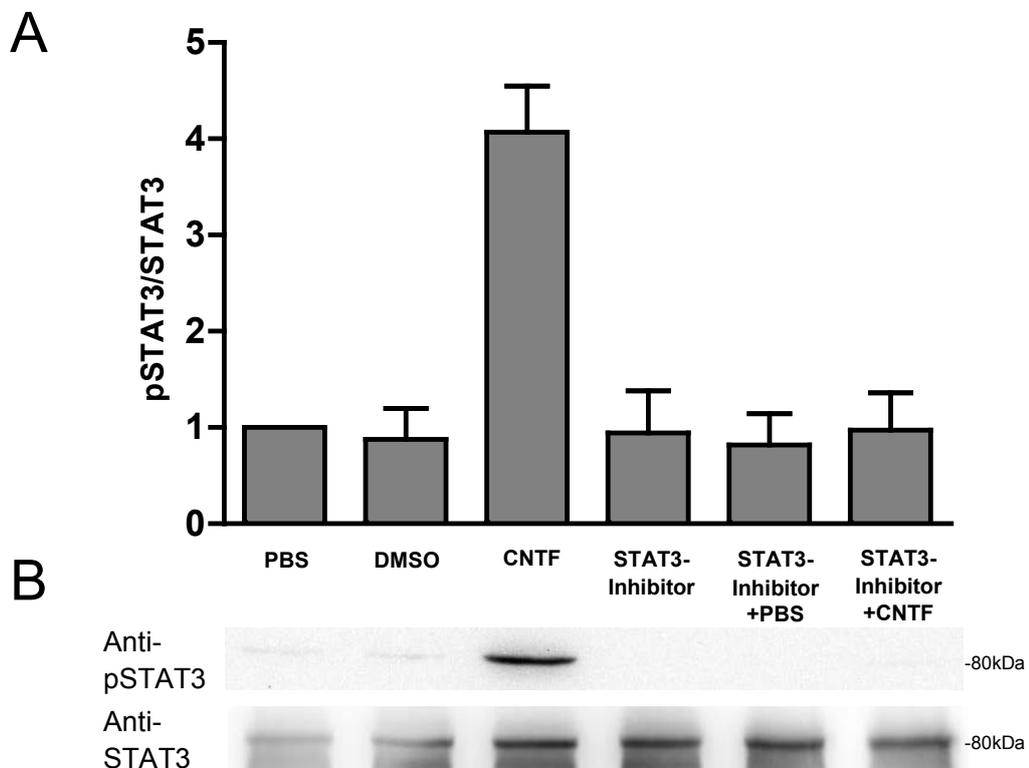
Um zu zeigen, dass die Aktivierung von STAT3 im Podozyten über die Aktivierung von JAK2 vermittelt wird, wurden Experimente mit einem JAK2-Inhibitor durchgeführt. Hierzu wurden die humanen Podozyten eine Stunde vor Beginn der Stimulation mit dem JAK2-Inhibitor AG490 behandelt und anschließend für 15 Minuten mit 100 ng/ml CNTF stimuliert. Mittels Westernblot wurden pSTAT3 und STAT3 nachgewiesen und densitometrisch ausgewertet. Die normalisierte pSTAT3/STAT3-Ratio lag nach CNTF-Stimulation bei  $5,529 \pm 1,407$  und nach vorheriger JAK2-Inhibition und CNTF-Stimulation bei  $0,5909 \pm 0,116$  und zeigte damit einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der pSTAT3/STAT3-Ratio durch JAK2-Inhibition vor CNTF-Stimulation (Abb. 9).



**Abbildung 9 : Phosphorylierung von STAT 3 humaner Podozyten nach Inhibition von JAK2 und Stimulation durch CNTF mittels Westernblot. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT3/STAT3-Ratio nach JAK2-Inhibition und 15-minütiger Stimulation mit 100 ng/ml CNTF mittels Friedman Analyse und anschließendem Dunn' Multiple Comparison Test ( $n=3$ ,  $p < 0,05$ ). Darstellung der Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM. (B) Repräsentativer Westernblot.**

## Ergebnisse

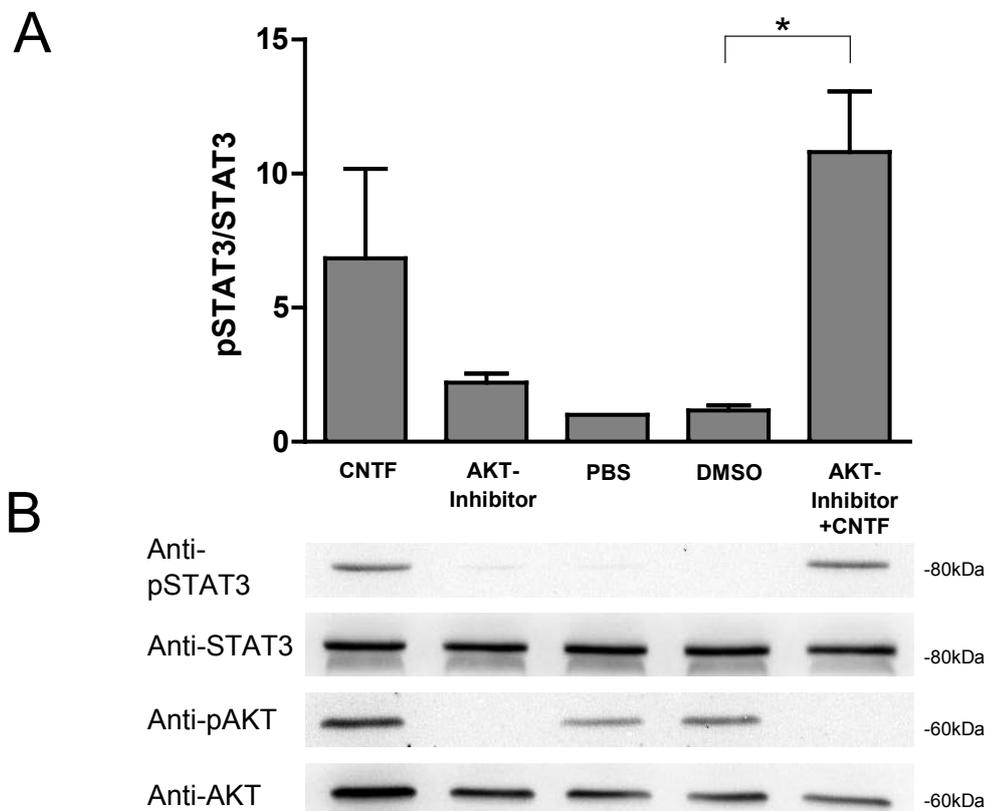
Anschließend wurde die STAT3-Phosphorylierung nach STAT3-Inhibition untersucht, indem humane Podozyten mit einem STAT3-Inhibitor behandelt und für 15 Minuten mit 100 ng/ml CNTF stimuliert wurden. Mittels Westernblots wurden pSTAT3 und STAT3 nachgewiesen und anschließend densitometrisch ausgewertet. Die normalisierte pSTAT3/STAT3-Ratio lag nach CNTF-Stimulation bei  $4,070 \pm 0,478$  und nach vorheriger STAT3-Inhibition und CNTF-Stimulation bei  $0,9731 \pm 0,387$ . Es zeigte sich, dass eine vorherige STAT3-Inhibition die CNTF-vermittelte STAT3-Aktivierung verhindert (Abb. 10).



**Abbildung 10 : Phosphorylierung von STAT 3 humaner Podozyten nach Inhibition von STAT3 und Stimulation durch CNTF mittels Westernblot. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT3/STAT3 nach STAT3-Inhibition und 15-minütiger Stimulation mit 100 ng/ml CNTF (n=3). Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM. (B) Repräsentativer Westernblot.**

### 3.5 AKT- und MEK-Inhibitionsversuche

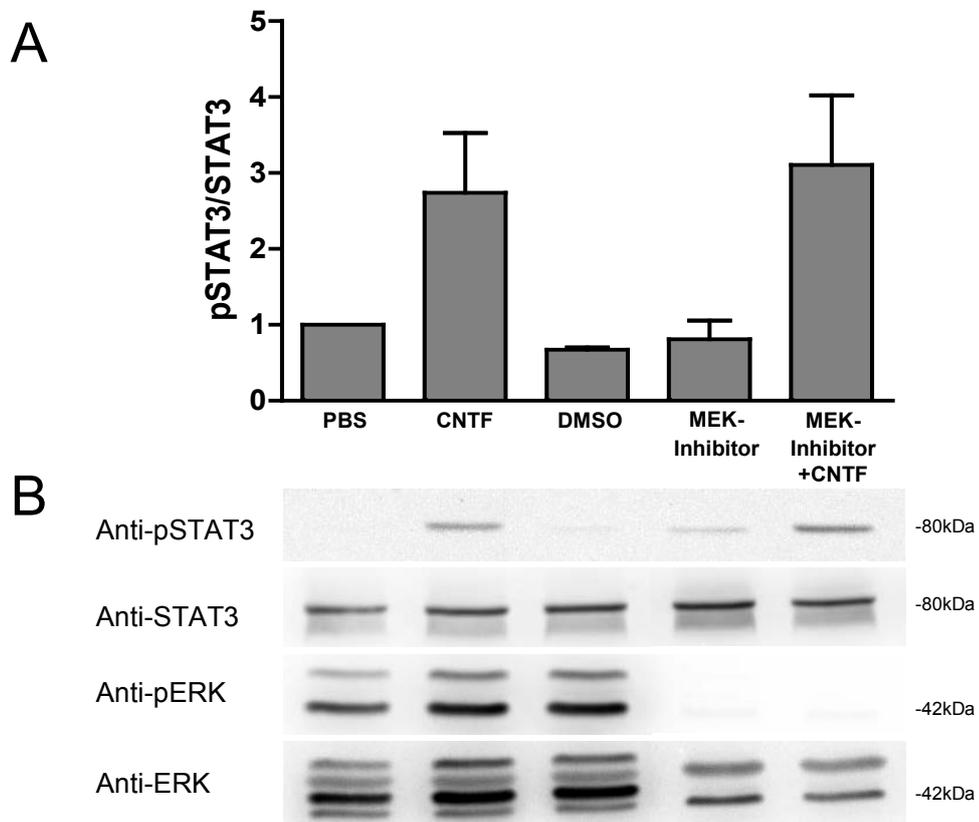
Um zu zeigen, dass die CNTF-vermittelte STAT3-Aktivierung spezifisch über die JAK2/STAT3-Kaskade verläuft, folgten Experimente, in denen weitere Kandidaten wie die Proteinkinase B (AKT) und die MAP-Kinase MEK, die zu einer STAT3-Aktivierung führen könnten, inhibiert wurden. Zunächst wurde die STAT3-Phosphorylierung nach AKT-Inhibition und Stimulation mit 100 ng/ml CNTF in humanen Podozyten mittels Westernblot untersucht. Hierbei lag die normalisierte pSTAT3/STAT3-Ratio nach CNTF-Stimulation bei  $6,843 \pm 3,341$  und unterschied sich damit nicht von der AKT-inhibierten, CNTF-stimulierten Gruppe ( $10,80 \pm 2,265$ ). Eine CNTF-Stimulation führte trotz AKT-Inhibition zu einer signifikanten Steigerung der STAT3-Phosphorylierung ( $p < 0,05$ ), woraus sich schließen lässt, dass die AKT-Inhibition die CNTF-induzierte STAT3-Aktivierung nicht verhindert. Des Weiteren ließ sich kein Effekt von CNTF auf die Phosphorylierung von AKT nachweisen (Abb. 11).



**Abbildung 11 : Phosphorylierung von STAT 3 humaner Podozyten nach AKT-Inhibition und CNTF-Stimulation mittels Westernblot. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT3/STAT3 nach AKT-Inhibition und 15-minütiger Stimulation mit 100 ng/ml CNTF mittels Friedman-Analyse und Dunn's Multiple Comparison Test ( $n=3$ ;  $p < 0,05$ ). Darstellung der Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM. (B) Repräsentativer Westernblot.**

## Ergebnisse

Zudem wurde die Phosphorylierung von STAT3 nach MEK-Inhibition untersucht, wobei humane Podozyten eine Stunde vor Beginn der Stimulation mit dem MEK-Inhibitor behandelt und anschließend für 15 min mit 100 ng/ml CNTF stimuliert wurden. Mittels Westernblots wurden pSTAT3 und STAT3 nachgewiesen und densitometrisch ausgewertet. Die normalisierte pSTAT3/STAT3-Ratio lag nach CNTF-Stimulation bei  $2,74 \pm 0,785$  und nach MEK-Inhibition und CNTF-Stimulation bei  $3,105 \pm 0,918$ . Eine MEK-Inhibition führte folglich zu keiner Abnahme der pSTAT3/STAT3-Ratio im Vergleich zu einer Einzelstimulation mit CNTF. Des Weiteren ließ sich kein Effekt von CNTF auf die Phosphorylierung von ERK nachweisen (Abb. 12).



**Abbildung 12 : Phosphorylierung von STAT 3 humaner Podozyten nach MEK-Inhibition und CNTF-Stimulation mittels Westernblot. (A) Densitometrische Auswertung der pSTAT3/STAT3-Ratio nach MEK-Inhibition und 15-minütiger Stimulation mit 100 ng/ml CNTF (n=4). Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM. (B) Repräsentativer Westernblot.**

### 3.6 CNTF-induzierte Genexpression im Podozyten: SOCS-3, BCL-2, Wnt5a

Um die CNTF-induzierte Genexpression im Podozyten zu untersuchen, wurden humane Podozyten mit CNTF stimuliert und die Expression einiger relevanter Zielgene untersucht, darunter zunächst SOCS-3. Hierzu wurden humane Podozyten für 5, 15, 30, 45, 60 und 120 Minuten mit 100 ng/ml CNTF stimuliert, die RNA isoliert, die Expression von SOCS-3 mittels Real-time qPCR gemessen und statistisch ausgewertet. Dabei zeigte sich eine Steigerung der Expression von SOCS-3 bereits nach 30-minütiger CNTF-Stimulation ( $7,028 \pm 1,543$ ). Nach 45-minütiger CNTF-Stimulation kam es zu einer weiteren, signifikanten ( $p < 0,05$ ) Expressionssteigerung auf  $9,027 \pm 2,978$ . Die Expressionssteigerung von SOCS-3 erreichte nach 60-minütiger CNTF-Stimulation ein Maximum ( $10,71 \pm 3,566$ ) und zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zur Kontrolle ( $p < 0,005$ ). Nach 120-minütiger CNTF-Stimulation befand sich die relative Expression von SOCS-3 wieder auf dem Ausgangsniveau und unterschied sich damit signifikant von der Expression nach 60-minütiger Stimulation ( $p < 0,05$ ; Abb. 13).

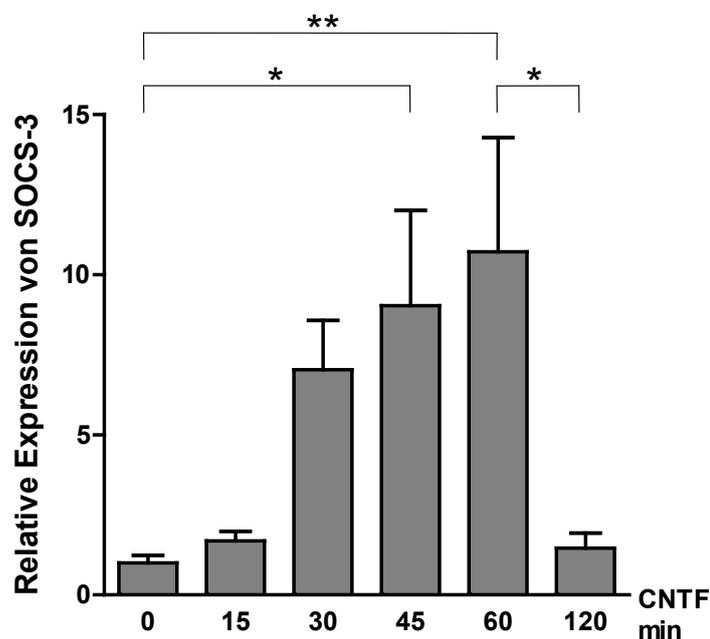
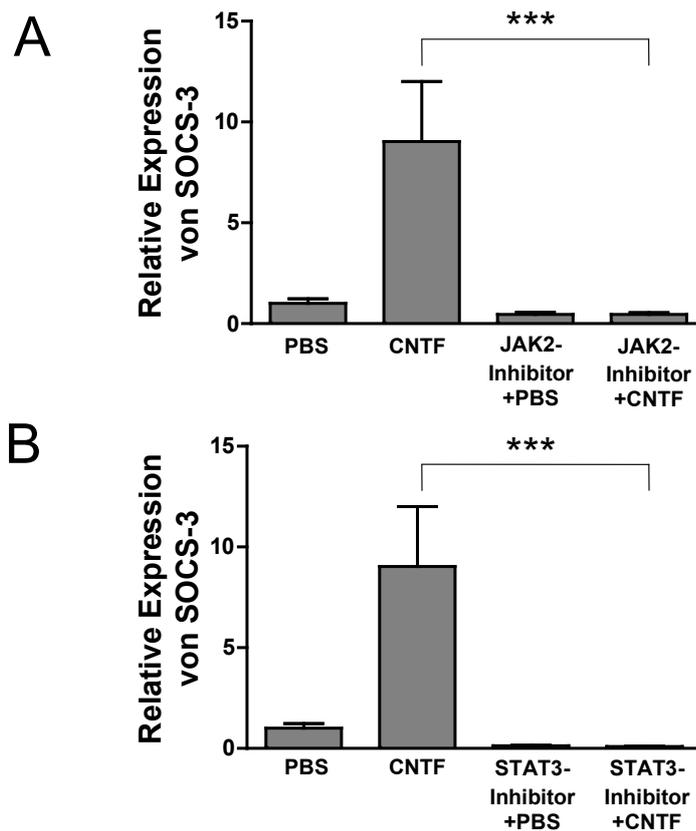


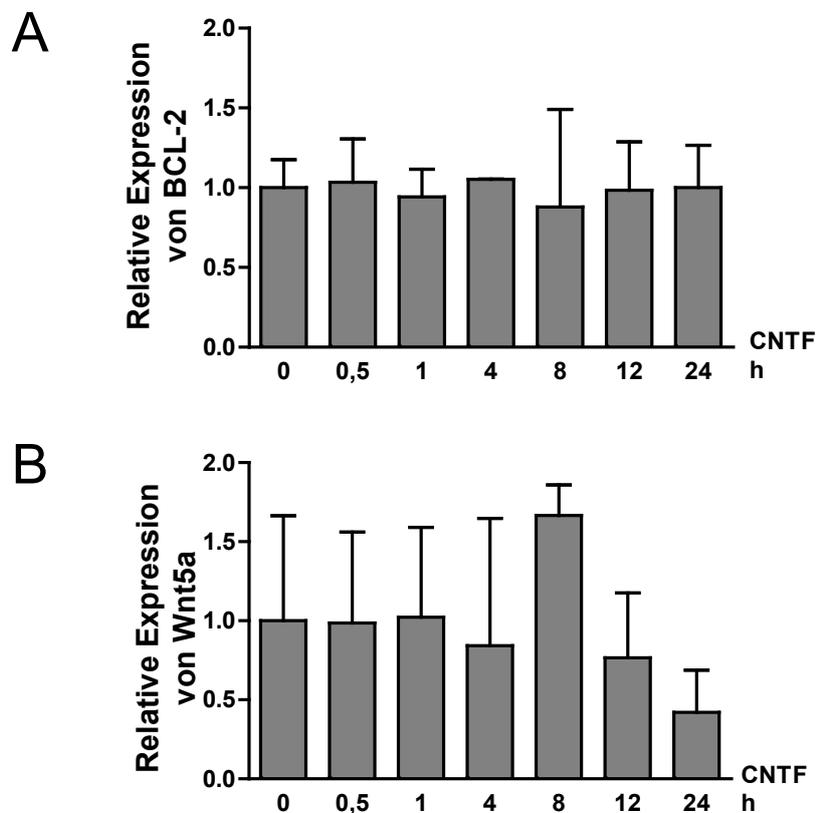
Abbildung 13 : Zeitkinetik der relativen Expression von SOCS-3 nach CNTF-Stimulation humaner Podozyten mittels Real-time qPCR. Statistische Auswertung der relativen Expression von SOCS-3 nach Stimulation mit 100 ng/ml CNTF über die Zeit bezogen auf GAPDH mittels One-way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test ( $n=7$ ). Darstellung der Daten als Mittelwerte $\pm$ SEM.

Da es unter Stimulation mit CNTF zu einer signifikanten Expressionssteigerung von SOCS-3 kam, wurde die Expression dieses Zielgens weiter untersucht. Hierzu wurden humane Podozyten eine Stunde vor Stimulationsbeginn zum einen mit dem JAK2-Inhibitor und zum anderen mit dem STAT3-Inhibitor behandelt, für 45 Minuten mit 100 ng/ml CNTF stimuliert, mit RLT-Puffer lysiert und die Genexpression von SOCS-3 mittels Real-time qPCR gemessen und wie im Methodenteil beschrieben ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass eine vorherige JAK2-Inhibition die CNTF-induzierte relative Expressionssteigerung von SOCS-3 verhindert ( $0,4573 \pm 0,08268$ ), wobei sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,0005$ ) ergab. Ebenso verhinderte eine vorherige STAT3-Inhibition die CNTF-induzierte relative Expressionssteigerung von SOCS-3 ( $0,09313 \pm 0,0132$ ) hochsignifikant ( $p < 0,0005$ ) (Abb. 14).



**Abbildung 14 : Relative Genexpression von SOCS-3 nach Stimulation mit 100ng/ml CNTF für 45 min und vorheriger JAK2-Inhibition bzw. STAT3-Inhibition humaner Podozyten mittels Real-Time qPCR bezogen auf GAPDH. (A) Statistische Auswertung der relativen Expression von SOCS-3 nach JAK2-Inhibition und CNTF-Stimulation mittels One-way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test. (B) Statistische Auswertung der relativen Expression von SOCS-3 nach STAT3-Inhibition und CNTF-Stimulation mittels One-way ANOVA und Bonferroni's Multiple Comparison Test. Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM.**

Als nächstes wurde die Expression zweier weiterer in anderen Zellarten beschriebenen Zielgene von CNTF, von BCL-2 und Wnt5a, untersucht. Dazu wurden humane Podozyten für 30 Minuten, 1 Stunde, 4 Stunden, 8 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden mit 100 ng/ml CNTF stimuliert, die RNA isoliert, die Expression von BCL-2 und Wnt5a mittels Real-time qPCR gemessen und wie im Methodenteil beschrieben ausgewertet. Dabei zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von BCL-2 und Wnt5a durch Stimulation mit CNTF (Abb. 15).



**Abbildung 15 : Zeitkinetik der Genexpression von BCL-2 und Wnt5a nach CNTF-Stimulation humaner Podozyten mittels Real-time qPCR. (A) Statistische Auswertung der relativen Expression von BCL-2 nach Stimulation mit 100 ng/ml CNTF über die Zeit bezogen auf GAPDH. (B) Statistische Auswertung der relativen Expression von Wnt5a nach Stimulation mit 100ng/ml CNTF über die Zeit bezogen auf GAPDH. Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM.**

### 3.7 CNTF beschleunigt die Differenzierung der Podozyten

Um den Einfluss von CNTF auf die Differenzierungsphase der Podozyten zu untersuchen wurden humane Podozyten während der Differenzierung mit 100 ng/ml CNTF stimuliert, an den Tagen 3, 7 und 13 die RNA isoliert und die relative Expression der Differenzierungsmarker Synaptopodin und WT-1 mittels Real-time qPCR gemessen und statistisch ausgewertet. Es zeigte sich an Tag 3 eine CNTF-induzierte relative Expressionssteigerung sowohl von Synaptopodin ( $2,517 \pm 0,893$ ) als auch von WT-1 ( $2,221 \pm 0,686$ ) gegenüber der Kontrolle (PBS). An Tag 7 fand sich kein Unterschied zwischen der CNTF-behandelten Gruppe und der Kontrolle. An Tag 13 war die relative Expression sowohl von Synaptopodin ( $0,321 \pm 0,051$ ) als auch von WT-1 ( $0,332 \pm 0,103$ ) in der CNTF-behandelten Gruppe geringer als in der Kontrollgruppe (Abb. 16).

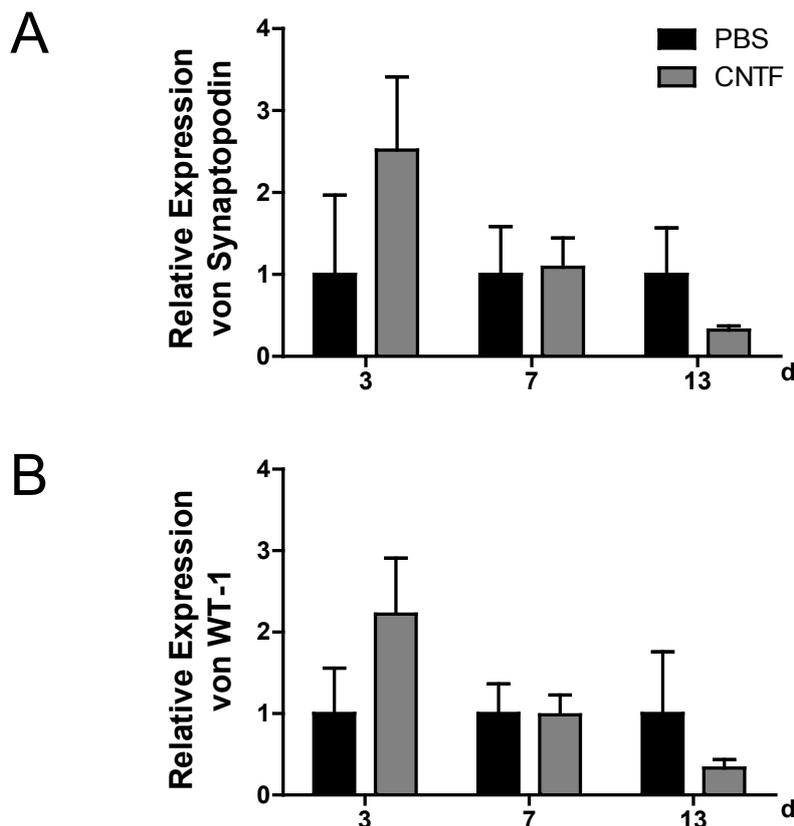


Abbildung 16 : Relative Expression von Differenzierungsmarkern während der Differenzierung humaner Podozyten unter Stimulation mit 100 ng/ml CNTF mittels Real-Time qPCR bezogen auf GAPDH. (A) Relative Expression von Synaptopodin (n=5). (B) Relative Expression von WT-1 (n=5). Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM.

### 3.8 CNTF unterstützt einen migratorischen Phänotyp

Um die Migration der Podozyten unter CNTF-Stimulation zu testen, wurden humane Podozyten wie im Methodenteil beschrieben ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml CNTF stimuliert und zu Beginn (Zeitpunkt 0 Stunden) sowie nach 6, 12 und 24 Stunden fotografiert und die in den Wundspalt gewanderten Zellen gezählt. Die Kontrollgruppe erhielt PBS. In beiden Gruppen kam es zu einer Migration der humanen Podozyten in den Wundspalt. Nach 6 Stunden zeigte sich, dass die stimulierten Zellen weniger schnell in den Wundspalt wanderten, nach 12 Stunden wanderten die stimulierten Zellen genauso schnell wie die Kontrolle und nach 24 Stunden wanderten die mit CNTF stimulierten Zellen vermehrt in den Wundspalt (Abb. 17). Allerdings erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz.

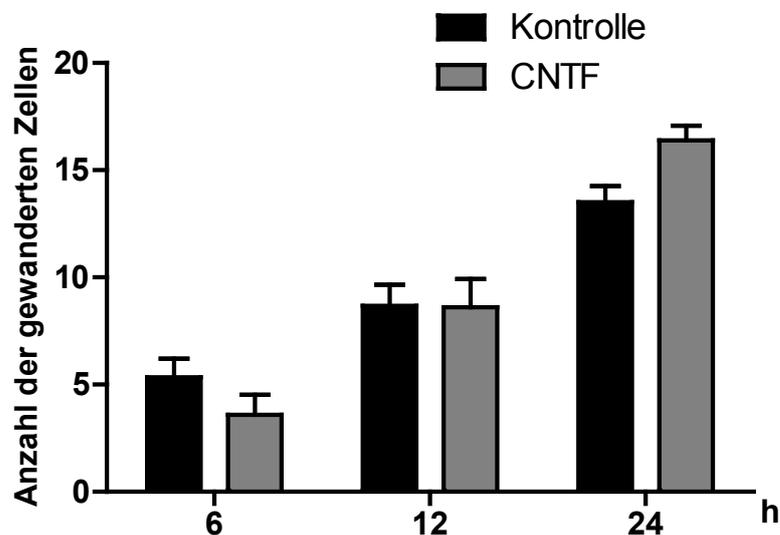


Abbildung 17 : Migrationsassay humaner Podozyten unter Stimulation mit 100ng/ml CNTF (n=6) im Vergleich zur Kontrolle (PBS). Darstellung der Daten als Mittelwerte±SEM.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal folgendes gezeigt werden:

1. Der CNTF-Rezeptorkomplex wird im Podozyten exprimiert
2. CNTF-Stimulation führt zu einer Aktivierung der JAK2/STAT3-Signalkaskade im Podozyten
3. CNTF-Stimulation führt zu einer Steigerung der Genexpression von SOCS-3 im Podozyten
4. CNTF hat einen Einfluss auf die Differenzierung und das Migrationsverhalten des Podozyten

Der Podozyt ist maßgeblich am Aufbau des glomerulären Filters beteiligt (Kawachi, Miyauchi et al. 2006) und durch seine exponierte Lage im Glomerulum zahlreichen schädlichen Faktoren ausgesetzt, welche bei zu großem Podozytenverlust zu Niereninsuffizienz führen können (Kriz 1997; Somlo and Mundel 2000; Patrakka, Lahdenkari et al. 2002; Shankland 2006; Mathieson 2007). Schützende Faktoren sind folglich für das Überleben des Podozyten und damit für die Funktion der Niere von großer Bedeutung. In transgenen Mäusen wurde mittels 5-Flucytosin ein Nierenschaden mit Proteinurie induziert, was innerhalb der ersten Wochen zu Pseudofußfortsatzverschmelzung mit Abnahme von WT-1, Synaptopodin, Nephrin und Podocin, zu Apoptose und zu fokaler Glomerulosklerose führte (Wang, Tang et al. 2012). Nach einigen Wochen kam es jedoch wieder zu einer Erholung und die Expression von WT-1, Synaptopodin, Nephrin und Podocin befand sich wieder auf ihrem Ausgangsniveau. Dies zeigt, dass das Glomerulum ein gewisses Potential zur Regeneration besitzt, solange der Podozyt noch nicht irreversibel geschädigt ist, weswegen ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Signalmechanismen neue therapeutische Ansatzpunkte liefern wird (Durvasula and Shankland 2006). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide, welche in der Therapie der nephrotischen Proteinurie eingesetzt werden, einen direkten, schützenden

Effekt auf den Podozyten haben (Ransom, Lam et al. 2005; Xing, Saleem et al. 2006). In einer weiteren ähnlichen Arbeit wurde zur genaueren Untersuchung der Wirkung von Glukokortikoiden auf den Podozyten eine differentielle proteomische Analyse dexamethasonbehandelter Podozyten durchgeführt, bei der sich eine signifikante Expressionssteigerung von fünf Proteinen, darunter CNTF, zeigte (Ransom, Vega-Warner et al. 2005). Auch andere Arbeiten legen nahe, dass CNTF einen Einfluss auf die Nierenfunktion haben könnte (Ebendal 1987; Yang, Lim et al. 2001), wobei die genaue Wirkung von CNTF auf den Podozyten jedoch bisher kaum untersucht wurde.

### **Der CNTF-Rezeptorkomplex wird im Podozyten exprimiert**

In verschiedenen Zelltypen wurde gezeigt, dass die Wirkung von CNTF über einen CNTF-Rezeptorkomplex, bestehend aus den Proteinen gp130, LIFR $\beta$  und CNTFR $\alpha$  vermittelt wird (Davis, Aldrich et al. 1993; Sleeman, Anderson et al. 2000; Heinrich, Behrmann et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass der Podozyt den CNTF-Rezeptor-Komplex exprimiert, wobei alle drei Proteinen (gp130, LIFR $\beta$  und CNTFR $\alpha$ ) auf Proteinniveau nachweisbar waren. Hinsichtlich der subzellulären Lokalisation zeigte sich in der Immunfluoreszenz, dass die oben genannten Rezeptorproteine überwiegend in der Peripherie der Fußfortsätze vorhanden sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Signaltransduktion im Podozyten über diesen Komplex verläuft, wobei jedoch prinzipiell auch andere Möglichkeiten der Signalvermittlung, beispielsweise über bislang unbekannte Rezeptoren, denkbar sind.

### **CNTF aktiviert spezifisch den JAK2/STAT3-Signalweg im Podozyt**

Die klassische Signalvermittlung von CNTF verläuft über die Aktivierung der JAK2/STAT3-Kaskade (Sleeman, Anderson et al. 2000; Heinrich, Behrmann et al. 2003; Rezende, Vieira et al. 2009), deren Präsenz und Aktivierung in dieser Studie nachgewiesen werden konnte. Nach Aktivierung von STAT3 über den CNTF-Rezeptorkomplex und JAK2 in Zellmembrannähe dimerisiert es mit sich selbst oder mit anderen STAT-Proteinen und transloziert in den Zellkern. In dieser Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass STAT3 besonders in der Nähe der Zellmembran sowie um den Zellkern herum nachweisbar war; pSTAT3 fand sich dabei vor allem in Zellkernnähe. Die Stimulation der Podozyten mit CNTF führt zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung von STAT3 im Westernblot, mit Nachweis einer Aktivierung dieses Proteins bereits nach fünfminütiger Stimulation und Maximum nach 15 Minuten. Wird die Janus-Kinase 2 durch den in dieser Studie verwendeten JAK2-Inhibitor AG 490 gehemmt, findet keine Aktivierung von STAT3 statt, was darauf hindeutet, dass STAT3-Aktivierung durch CNTF auch im Podozyten JAK2-vermittelt ist. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine Stimulation mit CNTF neben der Aktivierung von STAT3 zu einer Aktivierung anderer STAT-Proteine wie STAT1 führt, wobei sich dies nicht bestätigte. In anderen Arbeiten zeigte sich, dass CNTF neben dem JAK2/STAT3-Signalweg auch über Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K) (Ikeda, Tatsuno et al. 2004; Ott, Fasshauer et al. 2004) oder über die Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MAPK/ERK) wirken kann (Goureau, Rhee et al. 2004). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht, ob CNTF in Podozyten diese Signalwege aktiviert. Dabei ließ sich kein Effekt von CNTF auf die Phosphorylierung von AKT oder ERK nachweisen. Auch eine Inhibition von AKT und ERK wirkte sich nicht auf die CNTF-vermittelte STAT3-Phosphorylierung aus. In einer Untersuchung der Inselzellen des Pankreas der Ratte ergab sich ein ähnliches Bild. Hier führte CNTF ebenfalls zu einer Aktivierung der JAK/STAT3-Kaskade, wobei ein Einfluss von CNTF auf den PI3K- oder den MAPK/ERK-Signalweg ebenso wenig nachgewiesen werden konnte (Rezende, Vieira et al. 2009).

### **CNTF-induzierte Genexpression im Podozyten: SOCS-3, BCL-2, Wnt5a**

Nach Aktivierung dimerisiert STAT3 mit sich selbst oder mit anderen STAT-Proteinen und transloziert in den Zellkern, wo es zu einer Hochregulation spezifischer Zielgene führt. Bisher beschriebene Zielgene von STAT3 sind unter anderem SOCS-3, BCL-2 und Wnt5a (Sleeman, Anderson et al. 2000; Heinrich, Behrmann et al. 2003; Katoh 2007; Rezende, Stoppiglia et al. 2007; Rezende, Vieira et al. 2009). SOCS-3 ist ein Protein, welches in der Regulation der proinflammatorischen Zytokinausschüttung, der Apoptose und der Zellhypertrophie eine Rolle spielt (Bruun, Heding et al. 2009; Rezende, Vieira et al. 2009; Croker, Kiu et al. 2012). In dieser Arbeit wurde nun nachgewiesen, dass CNTF im Podozyten zu einer signifikanten Hochregulation von SOCS-3 über die JAK2/STAT3-Signalkaskade führt. Der Einsatz von JAK2- und STAT3-Inhibitoren verhinderte nicht nur eine Zunahme der Expression von SOCS-3, sondern führte sogar zu ihrer Abnahme, möglicherweise durch eine Reduktion der Grundaktivität von JAK2/STAT3. SOCS-3 ist eines der Zielgene von STAT3 und inhibiert die JAK2/STAT3-Kaskade im Sinne einer negativen Rückkopplung (Heinrich, Behrmann et al. 2003), was sich auch im Westernblot zeigte. Hier fand sich nach 60-minütiger CNTF-Stimulation ein Abfall der STAT3-Aktivierung auf das Ausgangsniveau. Ein anderes bekanntes Zielgen von CNTF ist BCL-2, für welches ein positiver Effekt auf das Überleben von Inselzellen der Ratte demonstriert wurde (Rezende, Stoppiglia et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit hingegen führte CNTF nicht zu einer relevanten Änderung der Genexpression von BCL-2. Ein weiteres bekanntes Zielgen der JAK/STAT3-Kaskade ist Wnt5a, welches unter anderem in embryonalen Stammzellen, kardialen Myozyten und synovialen Fibroblasten über diesen Signalweg durch Angehörige der IL-6-Familie hochreguliert wird und an der Regulation chronischer Inflammation beteiligt ist (Katoh 2007). Auch bezüglich dieses Gens ließ sich in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von CNTF auf die Genexpression im Podozyten nachweisen.

### **CNTF fördert die Differenzierung der Podozyten**

In zahlreichen Arbeiten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass CNTF einen fördernden Einfluss auf die Differenzierung neuronaler Zellen hat (Barres, Burne et al. 1996; Goureau, Rhee et al. 2004). CNTF fördert das Aussprossen spinaler Neurone (Oyesiku and Wigston 1996) und retinaler Ganglionzellen (Jo, Wang et al. 1999) sowie die Differenzierung von O2A-Progenitorzellen in Typ-2 Astrozyten (Hughes, Lillien et al. 1988). Auch beim Podozyten sind verschiedene Gene bekannt, die im Rahmen der zellulären Differenzierung vermehrt exprimiert werden: Wilms Tumor Suppressor Gene (WT-1) ist essentiell für die urogenitale Entwicklung (Morrison, Viney et al. 2008) und spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Podozytenfunktion. Eine homozygote Nullmutation dieses Gens verhindert die normale Entwicklung der Nieren und Gonaden und führt so zum Tod des Embryos. In der erwachsenen Niere wird WT-1 ausschließlich in Podozyten exprimiert. Verschiedene weitere Mutationen dieses Gens führen zu unterschiedlichen Nephropathien (Morrison, Viney et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass WT-1 direkt die Expression von Nephrin hochreguliert, indem es den Nephrin-Promotor aktiviert (Wagner, Wagner et al. 2004). Synaptopodin ist ein Actin-assoziiertes Protein in den Fußfortsätzen der Podozyten, das an der Organisation des Zytoskeletts, einschließlich der Organisation der Fußfortsätze, sowie an der Migration der Podozyten beteiligt ist (Mundel, Heid et al. 1997; Mundel, Reiser et al. 1997; Pavenstadt 2000; Kreidberg 2003; Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2006). Bei verschiedenen Nephropathien wie der FSGS und der Human Immunodeficiency Virus-Associated Nephropathy (HIVAN) kommt es zu einer Dedifferenzierung der Podozyten mit Verlust von Synaptopodin und WT-1 (Barisoni, Kriz et al. 1999; Pavenstadt 2000; Husain, D'Agati et al. 2005; Vaughan, Pippin et al. 2005). Des Weiteren wurde durch Induktion von Rho A in transgenen Mäusen eine Albuminurie mit Pseudofußfortsatzverschmelzung der Podozyten induziert, welche mit Expressionsabnahme von Synaptopodin einherging (Wang, Ellis et al. 2012). Das Ausschalten (*Silencing*) des Gens Synaptopodin in Podozyten führte zu einem Umbau des Zytoskeletts (Verlust von sogenannten *Stress Fibres*) und einer Reduktion der Fußfortsätze sowie zu einer Verminderung der Zellmigration (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al.

2006). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit CNTF gerade in den ersten Tagen der Differenzierung der Podozyten zu einer gesteigerten Expression der podozytären Reifungsmarker WT-1 und Synaptopodin als Nachweis beschleunigter zellulärer Differenzierung führt (Mundlos, Pelletier et al. 1993; Mundel, Heid et al. 1997; Pavenstadt 2000; Shankland, Pippin et al. 2007). Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass CNTF zu Reparaturmechanismen nach Dedifferenzierung bei verschiedenen Nephropathien beitragen kann, indem es die Redifferenzierung der Podozyten im Sinne einer beschleunigten Expression von Synaptopodin und WT-1 fördert. Ebenfalls kann die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass CNTF von Bedeutung in der Organogenese der Niere sein könnte.

### **CNTF induziert einen migratorischen Phänotyp**

Es ist bekannt, dass CNTF einen Einfluss auf die Migration neuronaler Zellen hat (Emsley and Hagg 2003; Yang, Qiao et al. 2010; Vernerey, Macchi et al. 2013). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass unter CNTF-Stimulation innerhalb der ersten Stunden eine Tendenz zu verminderter Migration von Podozyten in einen Wundspalt besteht, nach 24-stündiger Stimulation zeigte sich jedoch eine Tendenz zu vermehrter Migration - die Podozyten waren folglich nach 24-stündiger CNTF-Stimulation schneller in der Lage, eine Wunde zu schließen. Die Migration von Podozyten wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es ist bisher unklar, inwieweit migratorische Prozesse an der Ausbildung einer Proteinurie beteiligt sind (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007). Die Architektur des Podozyten mit Ausbildung der Fußfortsätze ist ein dynamischer Prozess, bedingt durch sich ständig ändernde Bedingungen am Glomerulum wie beispielsweise Veränderungen des jeweils herrschenden hydrostatischen Drucks (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007). Bei der Ausbildung der Fußfortsätze sowie der Zellmigration nimmt das Actin-Zytoskelett eine entscheidende Rolle ein. Löst sich ein Podozyt von der Basalmembran ab, entsteht eine Lücke, sodass es bei anhaltender Podozytenablösung zu Proteinurie kommen kann. Abgelöste

Podozyten können in der Folge über den Urin ausgeschieden werden. Die entstandenen Lücken können nicht durch Proliferation gedeckt werden, wobei jedoch denkbar ist, dass benachbarte Podozyten die entstandene Lücke durch Migration und Ausbildung neuer Fußfortsätze schließen können, sodass eine verbesserte migratorische Fähigkeit durchaus positiv gesehen werden kann. Andererseits führt eine vermehrte Migration auch zu einem erhöhten Ablösen der Podozyten von der Basalmembran und Podozyturie. Synaptopodin schützt beispielsweise vor Proteinurie, indem es die dynamischen Prozesse der Podozyten über das Actin-Zytoskelett synchronisiert, vermehrte Migration verhindert und so den Podozyten auf der Basalmembran stabilisiert (Yanagida-Asanuma, Asanuma et al. 2007). Andererseits wurde bei *Silencing* von Synaptopodin in Mäusen ein Verlust von Stress Fibres mit Retraktion der Fußfortsätze, verminderter Migration und vermehrter Proteinurie festgestellt (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2006). Zusammenfassend kann somit geschlussfolgert werden, dass CNTF über seinen Effekt auf die podozytäre Migration eine Bedeutung bei glomerulären Reparaturprozessen besitzen könnte. Inwieweit dieser Effekt positiv oder negativ zu bewerten ist, muss in zukünftigen, weiterführenden Arbeiten geklärt werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Adler, R., K. B. Landa, et al. (1979). "Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons." Science 204(4400): 1434-1436.
- Appel, D., D. B. Kershaw, et al. (2009). "Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells." J Am Soc Nephrol 20(2): 333-343.
- Asanuma, K., E. Yanagida-Asanuma, et al. (2006). "Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling." Nat Cell Biol 8(5): 485-491.
- Asanuma, K., E. Yanagida-Asanuma, et al. (2007). "The role of podocytes in proteinuria." Nephrology (Carlton) 12 Suppl 3: S15-20.
- Bacia, K., D. Scherfeld, et al. (2004). "Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes." Biophys J 87(2): 1034-1043.
- Barisoni, L., W. Kriz, et al. (1999). "The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy." J Am Soc Nephrol 10(1): 51-61.
- Barres, B. A., J. F. Burne, et al. (1996). "Ciliary Neurotrophic Factor Enhances the Rate of Oligodendrocyte Generation." Mol Cell Neurosci 8(2/3): 146-156.
- Boute, N., O. Gribouval, et al. (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." Nat Genet 24(4): 349-354.
- Bruun, C., P. E. Heding, et al. (2009). "Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis and signalling in beta cells." Mol Cell Endocrinol 311(1-2): 32-38.
- Camici, M. (2007). "The Nephrotic Syndrome is an immunoinflammatory disorder." Med Hypotheses 68(4): 900-905.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-159.
- Crocker, B. A., H. Kiu, et al. (2012). "IL-6 promotes acute and chronic inflammatory disease in the absence of SOCS3." Immunol Cell Biol 90(1): 124-129.
- Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1993). "LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor." Science 260(5115): 1805-1808.
- Davis, S. and G. D. Yancopoulos (1993). "The molecular biology of the CNTF receptor." Curr Opin Cell Biol 5(2): 281-285.
- Dikman, S. H., J. Churg, et al. (1981). "Morphologic and clinical correlates in renal amyloidosis." Hum Pathol 12(2): 160-169.
- Durvasula, R. V. and S. J. Shankland (2006). "Podocyte injury and targeting therapy: an update." Curr Opin Nephrol Hypertens 15(1): 1-7.
- Ebendal, T. (1987). "Comparative screening for ciliary neurotrophic activity in organs of the rat and chicken." J Neurosci Res 17(1): 19-24.

- Emsley, J. G. and T. Hagg (2003). "Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice." Exp Neurol 183(2): 298-310.
- Endlich, N., K. R. Kress, et al. (2001). "Podocytes respond to mechanical stress in vitro." J Am Soc Nephrol 12(3): 413-422.
- Goureau, O., K. D. Rhee, et al. (2004). "Ciliary neurotrophic factor promotes muller glia differentiation from the postnatal retinal progenitor pool." Dev Neurosci 26(5-6): 359-370.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J 374(Pt 1): 1-20.
- Hoshi, S., Y. Shu, et al. (2002). "Podocyte injury promotes progressive nephropathy in zucker diabetic fatty rats." Lab Invest 82(1): 25-35.
- Hughes, S. M., L. E. Lillien, et al. (1988). "Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture." Nature 335(6185): 70-73.
- Husain, M., V. D. D'Agati, et al. (2005). "HIV-1 Nef induces dedifferentiation of podocytes in vivo: a characteristic feature of HIVAN." AIDS 19(17): 1975-1980.
- Ikeda, K., T. Tatsuno, et al. (2004). "Ciliary neurotrophic factor protects rat retina cells in vitro and in vivo via PI3 kinase." Curr Eye Res 29(4-5): 349-355.
- Jo, S. A., E. Wang, et al. (1999). "Ciliary neurotrophic factor is an axogenesis factor for retinal ganglion cells." Neuroscience 89(2): 579-591.
- Jung, D., B. Yang, et al. (1995). "Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan." J Biol Chem 270(45): 27305-27310.
- Katoh, M. (2007). "STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review)." Int J Mol Med 19(2): 273-278.
- Kawachi, H., N. Miyauchi, et al. (2006). "Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier." Nephrology (Carlton) 11(4): 274-281.
- Kestila, M., U. Lenkkeri, et al. (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Mol Cell 1(4): 575-582.
- Kobayashi, N. (2002). "Mechanism of the process formation; podocytes vs. neurons." Microsc Res Tech 57(4): 217-223.
- Kreidberg, J. A. (2003). "Podocyte differentiation and glomerulogenesis." J Am Soc Nephrol 14(3): 806-814.
- Kriz, W. (1996). "Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis." Nephrol Dial Transplant 11(9): 1738-1742.
- Kriz, W. (1997). "Evolving role of the podocyte in chronic renal failure." Kidney Blood Press Res 20(3): 180-183.
- Kriz, W., N. Gretz, et al. (1998). "Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit?" Kidney Int 54(3): 687-697.
- Linker, R. A., M. Maurer, et al. (2002). "CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation." Nat Med 8(6): 620-624.
- Louis, J. C., E. Magal, et al. (1993). "CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death." Science 259(5095): 689-692.

- Masu, Y., E. Wolf, et al. (1993). "Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration." Nature 365(6441): 27-32.
- Mathieson, P. W. (2007). "Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis." Semin Immunopathol 29(4): 415-426.
- Morrison, A. A., R. L. Viney, et al. (2008). "New insights into the function of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in podocytes." Am J Physiol Renal Physiol 295(1): F12-17.
- Mundel, P., H. W. Heid, et al. (1997). "Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes." J Cell Biol 139(1): 193-204.
- Mundel, P., J. Reiser, et al. (1997). "Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines." Exp Cell Res 236(1): 248-258.
- Mundlos, S., J. Pelletier, et al. (1993). "Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues." Development 119(4): 1329-1341.
- Ott, V., M. Fasshauer, et al. (2004). "Ciliary neurotrophic factor influences endocrine adipocyte function: inhibition of leptin via PI 3-kinase." Mol Cell Endocrinol 224(1-2): 21-27.
- Oyesiku, N. M. and D. J. Wigston (1996). "Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons." J Comp Neurol 364(1): 68-77.
- Patrakka, J., A. T. Lahdenkari, et al. (2002). "The number of podocyte slit diaphragms is decreased in minimal change nephrotic syndrome." Pediatr Res 52(3): 349-355.
- Pavenstadt, H. (2000). "Roles of the podocyte in glomerular function." Am J Physiol Renal Physiol 278(2): F173-179.
- Pavenstadt, H., W. Kriz, et al. (2003). "Cell biology of the glomerular podocyte." Physiol Rev 83(1): 253-307.
- Ransom, R. F., N. G. Lam, et al. (2005). "Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization." Kidney Int 68(6): 2473-2483.
- Ransom, R. F., V. Vega-Warner, et al. (2005). "Differential proteomic analysis of proteins induced by glucocorticoids in cultured murine podocytes." Kidney Int 67(4): 1275-1285.
- Rastaldi, M. P., S. Armelloni, et al. (2006). "Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles." FASEB J 20(7): 976-978.
- Regele, H. M., E. Filipovic, et al. (2000). "Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis." J Am Soc Nephrol 11(3): 403-412.
- Reiser, J., W. Kriz, et al. (2000). "The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction." J Am Soc Nephrol 11(1): 1-8.
- Rezende, L. F., L. F. Stoppiglia, et al. (2007). "Ciliary neurotrophic factor promotes survival of neonatal rat islets via the BCL-2 anti-apoptotic pathway." J Endocrinol 195(1): 157-165.
- Rezende, L. F., A. S. Vieira, et al. (2009). "Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis." Cytokine 46(1): 65-71.

- Ruotsalainen, V., P. Ljungberg, et al. (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 96(14): 7962-7967.
- Saleem, M. A., M. J. O'Hare, et al. (2002). "A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression." J Am Soc Nephrol 13(3): 630-638.
- Schnabel, E., J. M. Anderson, et al. (1990). "The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium." J Cell Biol 111(3): 1255-1263.
- Schwarz, K., M. Simons, et al. (2001). "Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin." J Clin Invest 108(11): 1621-1629.
- Shankland, S. J. (2006). "The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis." Kidney Int 69(12): 2131-2147.
- Shankland, S. J., J. W. Pippin, et al. (2007). "Podocytes in culture: past, present, and future." Kidney Int 72(1): 26-36.
- Shih, N. Y., J. Li, et al. (1999). "Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein." Science 286(5438): 312-315.
- Simons, M., K. Schwarz, et al. (2001). "Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm." Am J Pathol 159(3): 1069-1077.
- Sleeman, M. W., K. D. Anderson, et al. (2000). "The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha." Pharm Acta Helv 74(2-3): 265-272.
- Somlo, S. and P. Mundel (2000). "Getting a foothold in nephrotic syndrome." Nat Genet 24(4): 333-335.
- Tryggvason, K. (1999). "Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm." J Am Soc Nephrol 10(11): 2440-2445.
- Tryggvason, K. and J. Wartiovaara (2001). "Molecular basis of glomerular permselectivity." Curr Opin Nephrol Hypertens 10(4): 543-549.
- Vaughan, M. R., J. W. Pippin, et al. (2005). "ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo." Kidney Int 68(1): 133-144.
- Vernerey, J., M. Macchi, et al. (2013). "Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain." J Neurosci 33(7): 3240-3250.
- Wagner, N., K. D. Wagner, et al. (2004). "The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1." J Am Soc Nephrol 15(12): 3044-3051.
- Wang, L., M. J. Ellis, et al. (2012). "Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases." Kidney Int 81(11): 1075-1085.
- Wang, L., Y. Tang, et al. (2012). "A novel mouse model of podocyte depletion." Nephron Exp Nephrol 121(1-2): e10-22.
- Xing, C. Y., M. A. Saleem, et al. (2006). "Direct effects of dexamethasone on human podocytes." Kidney Int 70(6): 1038-1045.
- Yan, K., A. Kudo, et al. (1999). "Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus." Kidney Int 56(1): 65-73.

- Yanagida-Asanuma, E., K. Asanuma, et al. (2007). "Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes." Am J Pathol 171(2): 415-427.
- Yang, C. W., S. W. Lim, et al. (2001). "Upregulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha in rat kidney with ischemia-reperfusion injury." J Am Soc Nephrol 12(4): 749-757.
- Yang, Z., H. Qiao, et al. (2010). "Effects of the CNTF-collagen gel-controlled delivery system on rat neural stem/progenitor cells behavior." Sci China Life Sci 53(4): 504-510

## **6. Danksagung**

Der Hilfe vieler unterstützender Hände, kluger Köpfe, aufbauender Worte, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt ein herzliches Dankeschön.

Namentlich erwähnen möchte ich:

Herrn Prof. Dr. Lars Christian Rump für die Möglichkeit in seinem Labor, in dem ein Team aus hochqualifizierten Wissenschaftlern einen rund um begleitet, meine wissenschaftliche Arbeit absolvieren zu dürfen.

Meinen Doktorvater PD Dr. Ivo Quack für das Überlassen dieses interessanten Themas und darüber hinaus für seine ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit meiner Arbeit.

Die technischen Assistentinnen, darunter vor allem Blanka Duvnjak, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand sowie Christina Schwandt und Nicola Kuhr.

Alle weiteren wissenschaftlichen Mitarbeiter und Doktoranden, darunter besonders Romy Palmer und Sebastian Potthoff.

Zu guter Letzt meine Familie und meine Freunden, die mich von Anbeginn unterstützt haben. Besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben, sowie David Kremer, der mich insbesondere in den letzten Zügen meiner Arbeit sehr unterstützt hat.

## **7. Eidesstattliche Versicherung**

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.