

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

**Die Bedeutung des Leukemia Inhibitory Factor für die Funktion
muriner und humaner Podozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Barbara Knezic

2017

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Ivo Quack

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Podozyten sind hochspezialisierte, nicht mehr teilungsfähige Zellen des Nierenfilters, deren Schädigung und daraus resultierender Verlust nicht kompensiert werden kann. Als Folge kann eine progrediente Niereninsuffizienz entstehen. Für den Erhalt einer physiologischen Nierenfunktion bei pathologischen Umgebungsstimuli ist die Identifizierung von protektiven Faktoren essenziell. Das Zytokin LIF als Mitglied der IL-6 Familie konnte bereits in vielen Studien seine protektive und regenerationsfördernde Wirkung auf zahlreiche Organsysteme zeigen. LIF wirkt sich positiv auf das Zellüberleben unter anderem in neuronalen Zellen, Kardiomyozyten und renalen Tubuluszellen aus. Unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Studien bereits eine Bedeutung der IL-6 Mitglieder OSM und CNTF für den Podozyten zeigen. Aktuelle Studien liefern erste Hinweise auf einen protektiven Effekt von LIF in Podozyten nach Exposition gegenüber hyperglykämischen Noxen.

In der vorliegenden Arbeit konnte als Basis für eine Reaktion der murinen und humanen Podozyten auf exogenes LIF der membranständige LIF-Rezeptorkomplex, bestehend aus den Untereinheiten LIFR und gp130, nachgewiesen werden. Eine Aktivierung des LIF-Rezeptorkomplexes durch LIF führte zu einer stabilen Signaltransduktion über die JAK-2/STAT3-Achse, infolgedessen die Expression des negativen Feedback-Mechanismus über SOCS3 hochreguliert wurde. Mit geringerer Intensität konnte eine Aktivierung der Signalkaskaden PI3K/AKT und ERK1/2 beobachtet werden. Exogene Stressfaktoren wie Wasserstoffperoxid und Sorbitol führten in Kombination mit LIF zu einer länger andauernden Aktivierung von STAT3. Da aktiviertes STAT3 für das Zellüberleben und die Regeneration eine Rolle spielt, könnte dessen Aktivierung durch LIF im Podozyten als protektiver Faktor gewertet werden. In funktionellen Analysen konnte kein migrationsfördernder Effekt von LIF auf Podozyten gezeigt werden. Allerdings konnte eine Reorganisation von intrazellulären Aktinfilamenten und kontraktilen Aktinstressfasern beobachtet werden. Aktinstressfasern dienen der Zellmigration und könnten durch die LIF-induzierte Reorganisation einen Reparaturmechanismus bei Podozytenverlust im glomerulären Filter darstellen.

Zusammenfassend könnte für LIF eine protektive Funktion im Podozyten diskutiert werden, diese ist möglicherweise abhängig von zusätzlichen Umgebungsstimuli. Inwieweit diese erstmalig beschriebenen Wirkungen von LIF auf die Signaltransduktion protektiven Charakter haben, wird Gegenstand zukünftiger *in vivo* Studien sein.

Abkürzungen

Δ	Differenz
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
bp	Basenpaar
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CCD	Charge-Coupled Device
CD2AP	Cluster of Differentiation 2-Associated Protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLC	Cardiotrophin-like Cytokine
cm²	Quadratcentimeter
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTFRα	Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha
CT	Cycle Threshold
CT-1	Cardiotrophin-1
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FBS	Fetal Bovine Serum
<i>for</i>	<i>forward</i>
G-Aktin	Globuläres Aktin
g	Gramm

g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	Green Fluorescent Protein
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
HRP	Horseradish Peroxidase
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL	Interleukin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
JAK	Janus-Kinase
kDa	Kilodalton
Klf4	Krüppel-like factor 4
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR	Leukemia Inhibitory Factor Receptor
LPS	Lipopolysaccharid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein-Kinase
MAPKK	Mitogen Aktivierte Protein-Kinase-Kinase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten
MEK	MAPK/ERK Kinase
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten- (<i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
n.s.	<i>non-significant</i>
NEC	Neuroepithelial Cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTC	No Template Control
OSM	Oncostatin M
p.A.	Pro Analyse
P-Cadherin	Plazentares-Cadherin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Real-Time-quantitative-Polymerase-Chain-Reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Smad1	Mothers against decapentaplegic homolog 1 Protein
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine B Isothiocyanate
Tyr	Tyrosin
U	Units
UUO	Unilaterale Ureterale Obstruktion
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLE RPMI	Very low Endotoxin Roswell Park Memorial Institute
Vrgl.	Vergleich
ZO-1	Zonula Occludens-1

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Niere im Zentrum physiologischer und pathologischer Prozesse	1
1.2	Der Podozyt als wichtiger zellulärer Bestandteil des Nierenfilters.....	2
1.3	LIF in seiner Funktion als pleiotropes Zytokin der IL-6 Familie.....	6
1.4	Die Rolle von LIF in der Niere	8
1.5	Ziele dieser Arbeit	9
2.	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Zellkultur	12
2.1.2	Antikörper.....	14
2.1.3	Primer.....	16
2.1.4	Chemikalien, Puffer und Lösungen	17
2.1.5	Sonstige Materialien, Geräte und Kits	21
2.1.6	Software und Teststatistik.....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Kultivierung von Podozyten	25
2.2.2	Proteinextraktion aus Podozyten	28
2.2.3	SDS-(PAGE) Gelelektrophorese und Western Blot.....	29
2.2.4	RNA Isolierung aus Podozyten.....	32
2.2.5	Reverse Transkription.....	33
2.2.6	Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.7	Spektralphotometrische Messungen	35
2.2.8	Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion	36
2.2.9	Migrationsanalyse von Podozyten (Wound-Scratch-Assay)	39
2.2.10	Immunfluoreszenzfärbungen	40
3.	Ergebnisse	44
3.1	Nachweis des LIF-Rezeptorkomplexes.....	44
3.1.1	Expression von LIF und CNTF in murinen Podozyten	47
3.2	LIF in der podozytären Signaltransduktion und Genregulation.....	49
3.2.1	ERK1/2 (p44/p42-MAPK)-Signaltransduktion	49
3.2.2	PI3K/AKT (PKB)-Signaltransduktion.....	58
3.2.3	p38 MAPK-Signaltransduktion	66
3.2.4	JAK-2/STAT3-Signaltransduktion	72

3.2.5	Expression von SOCS1 und SOCS3 in murinen Podozyten	91
3.2.6	Expression von PIAS1 und PIAS3 in murinen Podozyten	96
3.2.7	Expression des Transkriptionsfaktors Klf4 in murinen Podozyten	97
3.3	Funktionelle Analysen von Podozyten	99
3.3.1	Aktinzytoskelett-Organisation im Podozyten unter LIF-Stimulation.....	99
3.3.2	Einfluss von LIF auf das Migrationsverhalten humaner Podozyten <i>in vitro</i>	103
4.	Diskussion und Schlussfolgerung	107
4.1	Podozyten exprimieren den LIF-Rezeptorkomplex	108
4.2	LIF führt zu einer Signaltransduktion und Genexpression im Podozyten	110
4.3	LIF beeinflusst das Aktinzytoskelett des Podozyten.....	118
4.4	Migrationsverhalten humaner Podozyten unter LIF	119
5.	Literaturverzeichnis	121
6.	Danksagung	1

1. Einleitung

1.1 Die Niere im Zentrum physiologischer und pathologischer Prozesse

Die Niere nimmt eine zentrale Rolle in der systemischen Regulation von homöostatischen Prozessen im gesamten Organismus ein. Sie steuert den Säure-Basen-, Wasser- und Elektrolythaushalt, fördert die Ausscheidung harnpflichtiger und giftiger Stoffe und beeinflusst die Regulation des Blutdruckes, der Hämatopoese und der Hormonsynthese. Gleichzeitig ist sie, neben den primären Nephropathien, bei zahlreichen Systemerkrankungen wie der arteriellen Hypertonie, dem Diabetes mellitus, Infektionen oder Vaskulitiden sekundär betroffen. Diese Tatsachen rücken dieses lebenswichtige Organ in den Fokus vieler Studien.

Die makroskopische Gliederung der einzelnen Nierenlappen in Rinde und Mark spiegelt sich auf mikroskopischer Ebene in den komplexen Nephronsystemen, der funktionellen Einheit der Niere, wider. Die etwa eine Millionen Nephrone jeder Niere gliedern sich in je ein Nierenkörperchen und das nachgeschaltete Tubulussystem. In der Rinde befinden sich die Nierenkörperchen mit dem proximalen und distalen Konvolut des Tubulussystems, das Mark wird unter anderem von der dazwischen geschalteten Henle-Schleife und den sich dem Tubulussystem anschließenden Sammelrohren gebildet. Die Sammelrohre wiederum münden in das Nierenbeckenkelchsystem. Das Nierenkörperchen ist chronologisch gesehen die erste Station des Harn-Aufbereitungssystems und besteht aus einem anastomosierenden Kapillarknäuel (Glomerulum) und der zweischichtigen Bowman-Kapsel, die das Glomerulum umschließt. Das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel wird von den Podozyten gebildet, welche den fenestrierten Endothelzellen des Kapillarknäuels eng anliegen. Gemeinsam mit der zwischen den Endothelzellen und Podozyten liegenden glomerulären Basalmembran (GBM) setzt sich der glomeruläre Filter, den täglich 170 Liter Primärharn passieren, aus diesen drei Einheiten zusammen. Der Primärharn entsteht als Ultrafiltrat des durch das Glomerulum fließenden Blutes und wird durch das nachgeschaltete Tubulussystem aufkonzentriert, sodass am Ende nur noch etwa 1,7 Liter Urin über die harnableitenden Wege ausgeschieden werden.

Der glomeruläre Filter bildet durch die einzelnen Schichten und Komponenten eine ladungs- und gröÙenselektive Barriere, sodass in der gesunden Niere nur Moleküle mit einer Masse von bis zu 5 kDa und kationischer oder neutraler Gesamtladung frei filtriert werden können. Bei einer Schädigung des glomerulären Filters hingegen kommt es zu einem bedeutsamen Verlust von deutlich größeren oder insgesamt negativ geladenen Proteinen, die bei einer Molekülmasse von über 70 kDa und anionischer Gesamtladung normalerweise im Primärharn nicht vorkommen.

Das insgesamt negativ geladene Albumin wird mit seiner Molekülmasse von 69 kDa in der gesunden Niere in sehr geringen Mengen frei filtriert, jedoch größtenteils im proximalen Tubulussystem durch rezeptorvermittelte Endozytose oder endoluminale enzymatische Aufspaltung mit apikaler Endozytose wieder rückresorbiert und abgebaut, sodass normalerweise maximal 30 mg pro Tag im Urin ausgeschieden werden (Gekle, 2005, Jefferson et al., 2008, Stehouwer und Smulders, 2006). Über diese Menge hinaus besteht eine Proteinurie, die auf höhere Filtrationsmengen mit Sättigung der Rückresorptionsmechanismen durch glomeruläre Schädigung zurückzuführen ist. Das Ausmaß der Proteinurie deutet auf ein Fortschreiten der Nierenschädigung (Zhang und Huang, 2012). Bleibt der Proteinverlust über die Niere erhalten, kann es zu einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz kommen.

In vielen Ländern ist die diabetische Nephropathie bereits die führende Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz mit steigender Tendenz weltweit (World Health Organization, 2016). Diese Tatsache macht das besondere Interesse an der Suche nach präventiven Maßnahmen und therapeutischen Möglichkeiten deutlich.

1.2 Der Podozyt als wichtiger zellulärer Bestandteil des Nierenfilters

Der glomeruläre Filter kann durch seine zentrale Position in der Niere leicht in Mitleidenschaft gezogen werden. Hier rückt der Podozyt als einer der zellulären Hauptbestandteile des glomerulären Filters und seine Gefährdung durch diese exponierte Lage in den Vordergrund.

Primäre und sekundäre glomeruläre Erkrankungen wie unter anderem die Minimal-Change-Glomerulonephritis, die Fokal Segmentale Glomerulosklerose, die diabetische oder die hypertensive Nephropathie sind mit einer Schädigung von Podozyten assoziiert. Die physiologische Filtrationsselektivität der Niere ist abhängig von einer ungestörten Podozytenmorphologie. Dies setzt spezielle dynamische

Anpassungsmechanismen des podozytären Aktinzytoskeletts an sich ständig ändernde Umgebungsstimuli voraus.

Der Podozyt ist eine terminal differenzierte hochspezialisierte viszerale Epithelzelle mit komplexer Zytoarchitektur. Durch diese kann er seiner wichtigsten Aufgabe nachgehen: dem Erhalt der glomerulären Filterfunktion der Niere. Morphologisch unterteilt sich der Podozyt in vom Zellkörper ausgehende Primärfortsätze und etwa 600 nm breite Sekundärfortsätze (Fußfortsätze) als kleinste Einheit (Moller et al., 2009). Die Fußfortsätze ummanteln die Kapillarschlingen mit der ihnen anliegenden GBM des Nierenkörperchens und sind lückenlos miteinander verzahnt. Zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen spannt sich in den Filtrationsschlitz die glomeruläre Schlitzmembran wie ein Maschenwerk für die mechanische Ultrafiltration des Blutes aus den Kapillarschlingen auf (Kawachi et al., 2006). Die Schlitzmembran wird durch die spezialisierten transmembranären Moleküle Nephrin und P-Cadherin, sowie die ihnen intrazellulär assoziierten Moleküle Podocin, Cluster of Differentiation 2-Associated Protein (CD2AP) und Zonula Occludens-1 (ZO-1), benachbarter Fußfortsätze gebildet (Tryggvason und Wartiovaara, 2001).

Die 300-400 nm dicke azelluläre GBM entsteht aus einer Verschmelzung der Basallaminae von glomerulären Endothelzellen und Podozyten. Sie ist dreischichtig in die Laminae rarae interna und externa und die dazwischenliegende Lamina densa untergliedert und besteht hauptsächlich aus TypIV-Kollagen, Laminin 521, Nidogen und Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) (Jefferson et al., 2008, Tryggvason et al., 2006).

Über transmembranäre Adhäsionsmoleküle ($\alpha 3 \beta 1$ -Integrine, α - β -Dystroglykan) ist der Podozyt mit seinen Fußfortsätzen durch Bindung an die Moleküle Laminin und Agrin der GBM mechanisch an dieser verankert und erfüllt gleichzeitig eine nutritive Funktion für die GBM (Endlich et al., 2001). Die Zellkörper der Podozyten sind nicht fixiert und schweben somit frei im Bowman-Kapselraum. Die Adhäsionsmoleküle sind zusätzlich über intrazytoplasmatische Moleküle (Talin, Vinculin, Paxillin und Utrophin) mit dem podozytären Aktinzytoskelett verbunden, wodurch eine Interaktion stattfinden kann (Pavenstadt et al., 2003).

Für eine regelrechte Filtrationsfunktion ist dieser komplexe Aufbau des glomerulären Filtrationsapparates unabdingbar. Stressfaktoren, die zu einer Schädigung des

Podozyten mit möglichem irreversiblen Verlust der teilungsunfähigen Zellen führen können sind vielfältig.

Die Ursachen können mechanischer, metabolischer, toxischer oder osmotischer Genese sein. Dadurch kommt es kompensatorisch zu reaktiven, strukturellen Veränderungen im Podozyten als Versuch der Standhaltung gegenüber dieser schädigenden Exposition (Kriz et al., 2013). Bei den meisten Glomerulopathien führen diverse exogene oder endogene Stressfaktoren zu einer Verbreiterung der GBM und früh eintretenden, schnellen, aber noch reversiblen Retraktion der Podozytenfußfortsätze an der GBM (Seiler et al., 1975, Asanuma et al., 2005). Hierdurch verändert sich konsekutiv die Struktur der glomerulären Schlitzmembran und die Entstehung einer Proteinurie wird begünstigt. Dies ist jedoch kein Marker für das Ausmaß einer Proteinurie (van den Berg et al., 2004). Weitere beschriebene podozytäre Reaktionen auf schädigende Stimuli sind die subpodozytäre Pseudozystenbildung, die intraztoplasmatische Anhäufung von lysosomalen und autophagozytierten Produkten, die Abspaltung von Zytoplasmaanteilen und die Ausbildung von Mikrovilli (Kriz et al., 2013). Im weiteren Verlauf kommt es über eine Verbreiterung und Abflachung der Fußfortsätze schließlich zu einer Ablösung der vitalen, hypertrophierten Podozyten von der GBM. Da die Podozyten teilungsunfähige Zellen sind, geht dies mit einem irreversiblen Fortschreiten von Nephropathien wie beispielsweise der diabetischen Nephropathie einher (Pagtalunan et al., 1997, Kriz, 2002, Kriz, 1996). Die diabetische Nephropathie entsteht im Rahmen eines Diabetes mellitus als Folge einer Mikroangiopathie mit Befall der Nierenglomeruli. Chronisch erhöhte Blutglukosespiegel führen zu einer Glykosylierung von Proteinen (Makita et al., 1991). Diese lagern sich unter anderem an der glomerulären Basalmembran ab. Die daraus resultierende Verdickung der Basalmembran beeinträchtigt die glomeruläre Filtrationsfunktion durch den Verlust von negativen Ladungen. In Folge entsteht eine Proteinurie, deren Ausmaß ein wichtiger prognostischer Faktor für die Nierenerkrankung ist (Hunsicker et al., 1997). Eine durch glykosylierte Proteine verdickte Basalmembran der Kapillarknäuel von Glomeruli mindert die Sauerstoffversorgung des Nierengewebes. Der Sauerstoffmangel führt über die vermehrte Bildung von zytotoxischen reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zu intrazellulärem oxidativen Stress. Aktuell gibt es Hinweise dafür, dass ROS in der Pathogenese von einer Reihe von Krankheiten (Reuter et al., 2010) wie der

diabetischen Nephropathie (Forbes et al., 2008) eine Rolle spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen führt (Elmarakby und Sullivan, 2012).

Bleibt der Podozyt den schädigenden Einflüssen weiterhin ausgesetzt, wird er, wenn alle Fußfortsätze sich von der GBM abgelöst haben, im Urin ausgeschieden und kann dort als vitale Zelle nachgewiesen werden (Vogelmann et al., 2003). Allerdings konnte bislang nicht bewiesen werden, dass der Podozyt hierbei auch eine apoptotische Phase durchläuft.

An dieser Stelle wäre interessant zu wissen, ob es regenerationsfördernde Mechanismen oder Reparaturmechanismen gibt um den Funktionserhalt der Niere zu gewährleisten.

Bekanntere Regenerationsmechanismen sind die Proliferation und die Hypertrophie von Zellen. Da der Podozyt jedoch eine bereits ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsfähige Zelle ist und dadurch seine regenerative Kapazität durch Proliferation limitiert ist, müsste es im Podozyten einen anderen Weg der Regeneration geben. Ein geringes regeneratives Potential von Podozyten konnte in der frühen postnatalen Periode von Mäusen durch Rekrutierung von glomerulären parietalen Epithelzellen gesehen werden (Appel et al., 2009). Regeneration kann auch durch Kompensationsmechanismen wie der Zellhypertrophie eingeleitet werden, wodurch der Podozyt den Verlust von Zellen mittels Verschluss der zellfreien Lücken kompensiert (Kriz, 1997). Hypertrophie von Zellen geht jedoch meist mit einer Minderung der Funktion und höherer Vulnerabilität einher. Für teilungsunfähige Zellen in solch einer exponierten und mechanisch stark beanspruchten Position wie den Podozyten sind vielmehr protektive Mechanismen, die eine Reparatur vor allem früher Podozytenschädigung einleiten könnten, von Bedeutung.

Bereits in frühen Stadien der diabetischen Nephropathie kommt es zum Verlust von Podozyten über den Urin (Nakamura et al., 2000). Solch eine vermehrte Ausscheidung von Podozyten konnte auch in weiteren nicht-entzündlichen und entzündlichen Nierenerkrankungen wie beispielsweise der Glomerulonephritis (Hara et al., 1998) oder der Lupusnephritis (Bollain et al., 2011) beobachtet werden. Übersteigt der Podozytenverlust eine kritische Anzahl, entwickelt sich in der Folge eine Glomerulosklerose, was einem Funktionsverlust des Nephrons gleicht (Lemley et al., 2002). Da das vermehrte Ablösen der Podozyten von der Basalmembran mit der Progression der diabetischen Nephropathie zusammenhängt (Weil et al., 2012), ist die

Untersuchung von protektiven Faktoren für den Erhalt der Nierenfunktion besonders wichtig.

1.3 LIF in seiner Funktion als pleiotropes Zytokin der IL-6 Familie

Zytokine sind pro- beziehungsweise antiinflammatorische Mediatoren, die von Zellen als Reaktion auf Stimuli sezerniert werden und das Entzündungsgeschehen sowie zellbiologische Prozesse beeinflussen. Die bekannte große Zytokinfamilie, bestehend aus den Mitgliedern Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-27 (IL-27), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1) und Cardiotrophin-like Cytokine (CLC), wird auch als IL-6 Familie bezeichnet (Bauer et al., 2007). Ihnen allen gemeinsam ist die Signalübertragung über die gleiche Rezeptoruntereinheit, das Glykoprotein 130 (gp130) (Kishimoto et al., 1995). Dadurch kommen die sich zum Teil überschneidenden Wirkungen zustande (Taga und Kishimoto, 1997).

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf das Zytokin LIF, dessen differenzierungsfördernde und proliferationshemmende Wirkung auf myeloische Leukämiezelllinien namensgebend war (Metcalf, 1991). Der LIF Rezeptor besteht neben dem gp130 aus der LIF-Rezeptor-Untereinheit (LIFR) und entfaltet seine Wirkung über die intrazellulären Signalkaskaden JAK-2/STAT3 (Heinrich et al., 2003), PKB/AKT (Oh et al., 1998) und die MAP-Kinasen ERK1/2 (Schiemann und Nathanson, 1994). Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorausgehenden Studien bereits zeigen, dass andere IL-6 Mitglieder wie CNTF und OSM eine Wirkung auf den Podozyten haben.

Nach aktuellem Forschungsstand ist bekannt, dass LIF in verschiedenen Organen an einer Reihe von biologischen Regulationsprozessen beteiligt ist. Bereits während der Implantation eines Embryos zeigt sich die wichtige Anwesenheit von LIF für einen physiologischen Ablauf (Salleh und Giribabu, 2014).

LIF spielt auch eine Rolle im Entzündungsgeschehen, indem es unter anderem die Expression von weiteren Zytokinen fördert. Dies kann einerseits eine modulierende Wirkung auf die Entzündung und Immunantwort und andererseits eine aufrechterhaltende Wirkung auf den Entzündungsprozess haben (Villiger et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass der LIF-Spiegel in septischen Zuständen und beim

septischen Schock durch einen Anstieg des Zytokins Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) hochreguliert wird (Waring et al., 1992, Jansen et al., 1996).

Eine weitere Aufgabe von LIF liegt in der Regulation von zellbiologischen Vorgängen wie der Differenzierung, dem Überleben und der Wachstumskontrolle. Letzteres begründet seine Präsenz in der Krebsforschung.

Abhängig von Umgebungsfaktoren, dem Zustand beziehungsweise Typ der jeweiligen Zelle und den aktivierten molekularen Mechanismen innerhalb der Zelle imponiert LIF mit einer pleiotropen Wirkung. Es konnte gezeigt werden, dass LIF einerseits für den Erhalt der Pluripotenz von murinen embryonalen Stammzellen und andererseits für die Differenzierung von adulten Stammzellen in der Niere verantwortlich ist (Raz et al., 1999, Hishikawa et al., 2005). In hämatopoetischen Zellreihen zeigt LIF ebenfalls einen Effekt, indem es unter anderem die Megakaryozyten- und Thrombozytenzahl steigern kann (Metcalf et al., 1990).

In zahlreichen Studien konnten protektive Eigenschaften von LIF beobachtet werden. In Photorezeptorzellen der Retina schützt LIF die Zellen nach schädlichem Lichteinfluss vor einer Degeneration und verlängert das Überleben von geschädigten Photorezeptorzellen (Joly et al., 2008, Burgi et al., 2009). Chollangi und Kollegen konnten in Photorezeptorzellen der Retina nach Inkubation mit einer exogenen Lichtquelle eine höhere Expression unter anderem von LIF-mRNA mit Aktivierung der STAT3-Signalkaskade beobachten (Chollangi et al., 2009). Die STAT-3 Aktivierung kann auf eine Stimulation des LIFR zurückgeführt werden. Hierunter zeigte sich nach zusätzlicher Stimulation mit einer stresserzeugenden Lichtquelle eine protektive Komponente auf das Zellüberleben nach Vorinkubation mit dem exogenen Licht. Diese wird dem LIF zugeschrieben und konnte ebenfalls in durch biomechanischen Stress geschädigten murinen Kardiomyozyten beobachtet werden (Hirota et al., 1999). Auch in neuronalen Zellen wie den Oligodendrozyten konnte ein protektiver Effekt von LIF auf die Zytotoxizität durch Interferon- γ nachgewiesen werden (Emery et al., 2006).

LIF hat neben dieser protektiven Funktion auch ein regeneratives Potential beispielsweise in verletzter Skelettmuskulatur von Mäusen (Kurek et al., 1997). In murinen Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass LIF eine proliferative Wirkung auf die Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt hat und die Neovaskularisation durch Sekretion des Proteins Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) fördert (Zou et al.,

2003). Zusammenfassend ist somit auch ein möglicher protektiver Effekt von LIF im geschädigten Podozyten denkbar.

1.4 Die Rolle von LIF in der Niere

LIF spielt sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen biologischen Prozessen eine Rolle. Neben zahlreichen anderen Organen und Systemen ist LIF auch für die Niere und die Nephrogenese von Bedeutung (Plisov et al., 2001). LIF kann in der adulten Niere als Antwort auf proinflammatorische Stimuli synthetisiert werden. Dies ist Ausdruck seiner Teilhabe am Entzündungsgeschehen in der Niere (Morel et al., 2000).

Hartner und Kollegen konnten zeigen, dass Zytokine wie das Interleukin-1 β (IL-1 β) und das TNF- α , sowie das Lipopolysaccharid (LPS) die Expression von LIF in Mesangiumzellen von Nierenkörperchen induzieren können und dass Mesangiumzellen auch eine Reaktion auf LIF zeigen (Hartner et al., 1994, Hartner et al., 1995). Diese spezialisierten Zellen des glomerulären Apparates befinden sich in direkter räumlicher Nähe zu den Podozyten und bieten somit eine Grundvoraussetzung für die Interaktion mit LIF. Durch eine LIF-induzierte vorübergehende Hochregulation von Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) mRNA in kultivierten Mesangiumzellen von Ratten konnte in einer Studie von 1997 auch eine chemotaktische Wirkung von LIF beobachtet werden (Hartner et al., 1997). Dies könnte durch die Rekrutierung von Monozyten zur Immunabwehr beitragen.

LIF konnte nicht nur bei Nephropathien, sondern auch in akuten Phasen wie der Transplantatabstoßungsreaktion im Urin nachgewiesen werden (Taupin et al., 1992). Eine Überexpression von LIF führt im Mausmodell zu der Entwicklung einer Mesangioproliferativen Glomerulonephritis (Shen et al., 1994).

Interessanterweise ist für LIF auch in der Niere ein protektives Potential beschrieben worden. In vorausgehenden Studien konnte mittels kontinuierlicher Infusion von LIF in Ratten eine signifikant verminderte Proteinurie nach experimentell induzierter Anti-GBM-Antikörper-Glomerulonephritis im Vergleich zu Kontrolltieren ohne LIF-Infusion festgestellt werden (Tang et al., 1996). Die LIF-Infusion hat jedoch keinen direkten Effekt auf die Bindung von Anti-GBM-Antikörper an die GBM und den Pathomechanismus. Tang und Kollegen schlussfolgerten, dass die LIF-Infusion als ein protektiver Mechanismus anzusehen sei, da sie neben der verminderten Proteinurie mit

einer verminderten Einwanderung von Makrophagen und reduzierten IL-1 und TNF- α Expression einhergeht.

Darüber hinaus scheint LIF möglicherweise nicht nur eine protektive Rolle in den Glomeruli, sondern auch eine regenerative Funktion für das nachgeschaltete Tubulussystem einzunehmen. In einer neueren Studie von 2003 konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass die LIF-mRNA in der Regenerationsphase nach einem ischämisch herbeigeführten akuten Nierenversagen hochreguliert wird (Yoshino et al., 2003). In Einklang dazu führte die Neutralisation von endogenem LIF in der Regenerationsphase zu einer signifikanten Reduktion der überlebenden Zellzahl *in vitro*.

Aktuelle Daten zeigen, dass LIF nicht nur in der Lage ist eine Myokardfibrose nach Infarkt zu mindern (Wang et al., 2002, Zou et al., 2003, Berry et al., 2004), sondern auch in der Niere die Fibrose im Unilateralen Ureterobstruktions (UUO)-Mausmodell zu reduzieren scheint (Yu et al., 2015). Fibrotischer Umbau eines Gewebes stellt eine Art Anpassung an chronifizierte Umgebungsstimuli dar, die mit einem Funktionsverlust des Gewebes einhergeht und die Endstrecke vieler chronischer Erkrankungen darstellt.

Kürzlich publizierte Daten geben erste Hinweise auf eine Reaktion von Podozyten auf LIF. *In vivo* und *in vitro* Versuche an Mäusen beschreiben einen apoptotischen Effekt von Glukose-induzierten ROS auf Podozyten (Susztak et al., 2006, Eid et al., 2009, Liu et al., 2013). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass eine Vorbehandlung von kultivierten murinen Podozyten mit 1 bis 5 ng/ml LIF die durch hohe Glukosekonzentrationen erhöhten ROS-Spiegel und die Apoptoserate senken kann (Xu et al., 2012). Diese Daten demonstrieren zum ersten Mal einen protektiven Effekt von LIF im Podozyten. Über den genauen zugrundeliegenden molekularen Mechanismus im Podozyten ist hingegen bislang wenig bekannt.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die meisten Nierenerkrankungen, die in eine chronische Niereninsuffizienz münden, haben ihren Ursprung in der begrenzten Anzahl an Nierenkörperchen, welche nach irreversibler Schädigung der Podozyten keine Möglichkeiten zur Regeneration besitzen (Kriz et al., 2013).

Seit den vergangenen Jahren wächst das Interesse an protektiven Mechanismen für den Podozyten, da dessen frühe Ablösung von der GBM an der Progression der

Niereninsuffizienz beteiligt ist (Kriz, 2002). Ein bereits bekannter exogener protektiver Faktor bei Podozytenschädigung ist das orale Antidiabetikum Metformin (Zhai et al., 2015). An dieser Stelle wäre interessant zu wissen, ob es auch endogene protektive oder regenerationsfördernde Mechanismen gibt, die durch einen glomerulären Schaden aktiviert werden, um diesen zu beheben.

Für das Zytokin LIF ist bislang eine Reihe regulatorischer und protektiver Eigenschaften in verschiedenen Organsystemen bekannt. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von LIF-mRNA bei einer durch Minderperfusion herbeigeführten tubulären Schädigung hochreguliert wird und dies somit zur Regeneration der Epithelzellen beiträgt (Yoshino et al., 2003). Weitere Studien zeigen, dass LIF auch an der Reparatur zentralnervöser Schäden beteiligt ist und kultivierte Stammzellen von Mäusen pluripotent hält. Basierend auf diesen Studien könnte vermutet werden, dass LIF nach Verlust einer intakten glomerulären Filtrationsbarriere eine Rolle für die Regeneration von Podozyten spielen könnte und somit die Filtrationsfunktion wiederherstellen könnte. Bisher gibt es keine Studien über mögliche Regenerationsprozesse des Podozyten nach einem reversiblen oder irreversiblen Schaden. Neuere Daten geben erste Hinweise auf ein protektives Potential von LIF in hyperglykämischem Stress ausgesetzten Podozyten.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage gibt es für Podozyten Grund zur Annahme eines regulatorischen Effektes von LIF auf molekularer Ebene, welcher bislang kaum erforscht wurde. Unsere Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit bereits einen Effekt von OSM und CNTF auf Podozyten zeigen.

Aus diesen Daten resultieren die vorliegenden Untersuchungen von Signalwegen und Zielgenen, die durch LIF in humanen und murinen immortalisierten Podozyten aktiviert werden. Hierzu wurden die Podozyten nach verschiedenen Zeit- und Konzentrationskinetiken mit LIF stimuliert. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Abhängigkeit der intrazellulären molekularen Antwort muriner Podozyten von hyperosmolarem Stress durch extrazelluläres Sorbitol und oxidativem Stress durch extrazelluläres Wasserstoffperoxid gelegt. Diese Stressfaktoren simulieren eine Exposition der Podozyten gegenüber hohen Glucosekonzentrationen, wie es beim Diabetes mellitus der Fall ist. Eine durch Hyperglykämie erzeugte hyperosmolare Umgebung entzieht der Zelle Wasser durch einen osmotischen Gradienten (Vinkemeier, 2004), wodurch es zu einer Störung des physiologischen Gleichgewichtes

biochemischer zellulärer Prozesse kommt. In einer gemeinsamen Endstrecke steigen folglich die intrazellulären zytotoxischen ROS-Spiegel.

Darüber hinaus wurde der funktionelle Einfluss von LIF auf das Migrationsverhalten von humanen immortalisierten Podozyten untersucht. Ein migrationsförderndes Potential von LIF könnte zum strukturellen Verschließen von im glomerulären Filter entstandenen Lücken nach Ablösung von Podozyten führen. Zusätzlich wurde die Morphologie des Aktinzytoskelettes humaner und muriner Podozyten in Gegenwart von LIF beobachtet.

1. Exprimiert der Podozyt den spezifischen Rezeptorkomplex für LIF?
2. Hat exogen appliziertes LIF eine Auswirkung auf wichtige Signalwege des Podozyten?
3. Reguliert exogenes LIF die Gentranskription des Podozyten?
4. Beeinflusst exogenes LIF die zelluläre Physiologie des Podozyten?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Zelllinien

Murine immortalisierte Podozyten, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Mundel, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

Humane immortalisierte Podozyten, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. M. Saleem, University of Bristol, Bristol, Großbritannien

Nachfolgend aufgeführte Tabellen zeigen eine Auflistung der in der Zellkultur verwendeten Materialien.

Nährmedien, Medienzusätze und Lösungen

Produkt	Hersteller	Cat. No.
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin	FG1415
FBS Superior	Biochrom AG, Berlin	S0615
Trypsin 0,05% / EDTA 0,02%	Biochrom AG, Berlin	L2143
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin	L1825
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin	A2213
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin	K0283
Insulin-Transferrin-Selenium	Gibco, Darmstadt	41400-045
Interferon- γ from mouse	Roche, Mannheim	11276905001
Kollagen Typ I, Rat Tail	BD Biosciences, Heidelberg	354236
DMSO	Sigma, Steinheim	D2650

Tabelle 2.1: Übersicht über Nährmedien, Medienzusätze und Lösungen für die Kultivierung von Podozyten mit Bezugsquellen.

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Produkt	Hersteller	Cat. No.
6 Well Zellkulturplatten	Costar, Corning, NY, USA	3506
12 Well Zellkulturplatten	Costar, Corning, NY, USA	3512
Deckgläser 12 mm Ø	VWR, Darmstadt	631-1577
Rasterschalen, 2×2 mm, 8,8 cm ²	Nunc, Roskilde, Dänemark	174926
Kulturflaschen T75 beschichtet	Nunc, Roskilde, Dänemark	156499
Kulturflaschen T75 unbeschichtet	Nunc, Roskilde, Dänemark	156800
Zählkammer für Zellen, Neubauer	Laboroptik, Lancing, Großbritannien	
Inversmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen	
Objektiv A-Plan 10x/0.25 Ph1-	Zeiss, Oberkochen	
Adapter Coolpix 9xx	Zeiss, Oberkochen	
Adapter Video V25 C 1" 1.0x	Zeiss, Oberkochen	
Universal Digital Camera Adapter d30 M37/52x0.75	Zeiss, Oberkochen	
Digitalkamera Coolpix 4500	Nikon, Düsseldorf	
Zentrifuge Rotixa/RP (Rotor 4294)	Hettich, Tuttlingen	
Wasserbad	GFL, Burgwedel	
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Scientific, Dreieich	
Zellinkubator Hera Cell 150	Thermo Scientific, Dreieich	
Pipetten Pipetman Classic™	Gilson, Middleton, WI, USA	
Filterspitzen für Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht	
Serologische Pipetten, einzeln verpackt	Costar, Corning, NY, USA	

Tabelle 2.2: Übersicht über Verbrauchsmaterialien und Geräte in der Zellkultur mit Bezugsquellen.

Die in den Zellversuchen eingesetzten Agenzien werden in den folgenden Tabellen dargestellt.

Stimulanzen

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Leukemia Inhibitory Factor	Sigma, Steinheim	L5158
rekombinantes humanes und murines TNF- α	PeptoTech®, Rocky Hill, NJ, USA	300-01A, 315-01A
Wasserstoffperoxid Lösung 30%	Sigma, Steinheim	H1009
D-Sorbitol	Sigma, Steinheim	S3889

Tabelle 2.3: Übersicht über Stimulanzen für Zellversuche mit Bezugsquellen.

Inhibitoren

Produkt	Hersteller	Cat. No.
AG490 InSolution™	Calbiochem, Darmstadt	658411
U0126	Calbiochem, Darmstadt	662005
LY294002	Alomone Labs, Jerusalem, Israel	L-300

Tabelle 2.4: Übersicht über Inhibitoren für Zellversuche mit Bezugsquellen.

2.1.2 Antikörper

Folgende spezifische monoklonale (mAb) und polyklonale Antikörper kamen bei den Analysen zum Einsatz.

Primärantikörper

Cell Signaling, Leiden, Niederlande	Verdünnung
anti-STAT3 #9132 (Produktion wurde eingestellt)	1:750
anti-STAT3 (D3Z2G) Rabbit mAb #12640	1:1.000
anti-Phospho-STAT3 (Tyr705) #9131	1:1.000
anti-Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP® Rabbit mAb #9145	1:2.000
anti-AKT #9272	1:1.300
anti-Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb #4060	1:1.750
anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) #9102	1:750

anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) #9101	1:1.300
anti-p38 MAPK #9212	1:750
anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP [®] Rabbit mAb #4511	1:1.000
anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) #9211	1:1.000
<hr/>	
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Verdünnung
anti-LIFR (H-220), Cat. No. sc-20752	1:50
<hr/>	
Sigma, Steinheim	Verdünnung
anti- β -Aktin, mAb, Cat. No. A5316	1:20.000

Tabelle 2.5: Übersicht über Primärantikörper, ihre eingesetzten Verdünnungen und Bezugsquellen. (sortiert nach Bezugsquelle)

Antikörper für Western Blot Analysen wurden entsprechend dem jeweiligen Versuchsaufbau mit Proteinwaschpuffer verdünnt und mehrfach verwendet (Lagerung bei 4°C). Für Immunfluoreszenzanalysen wurden die Antikörper je nach Versuchsreihe mit PBS oder 1% BSA/PBS verdünnt.

Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Cat. No.
anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare, Freiburg	NA934V
anti-Maus, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg	P0447
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen, Karlsruhe	A11034

Tabelle 2.6: Übersicht über Sekundärantikörper mit Bezugsquellen.

Die Sekundärantikörper sind speziesspezifisch und für Western Blot Analysen gekoppelt an das katalysierende Enzym Horseradish Peroxidase. Sie wurden in einer Verdünnung von 1:10.000 mit Proteinwaschpuffer eingesetzt. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper mit Alexa Fluor[®] verwendet.

2.1.3 Primer

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Sie wurden gemäß Herstellerangabe in sterilem Wasser aufgelöst und haben dann eine Konzentration von 100 pmol/μl. Unter kontinuierlicher Verwendung wurden sie bei 4°C gelagert, wenn keine Arbeiten stattfanden bei -20°C. Die optimale Real Time Temperatur der Primer für die Fluoreszenzmessung wurde vor Gebrauch individuell bestimmt.

Primer für murine Podozyten

Oligoname	Sequenz 5' → 3'	bp	RT-Temp
SOCS1	<i>for</i> GAC AGT CGC CAA GGG AAC T <i>rev</i> GAA AAG GCA GTC GAA GGT CTC	132	81-83,5°C
SOCS3	<i>for</i> TGA CGC TCA ACG TGA AGA AG <i>rev</i> TGC AGG AGA GCG GAT TCT AC	132	81°C
PIAS1	<i>for</i> TAC AAA ACC TTG CAG CCT TCC <i>rev</i> GTG GAC AAT CGG ACA AGT GAG	108	76°C
PIAS3	<i>for</i> GTT TCG ATG CTG CCC TTT ATC <i>rev</i> TCA TCA CAA TCC GAA CAG GAA	145	76°C
LIF	<i>for</i> GCC AAT GCT CTC TTC ATT TCC <i>rev</i> ATC CGA TAC AGC TCC ACC AAC	150	76°C
LIFRβ	<i>for</i> GGA AGT CCG TGC TCC ATC AA <i>rev</i> AAA GGA CCA CCC TCC TCC ATT A	90	76°C
gp130	<i>for</i> CAC CCA GCC CCT GCT AGA CT <i>rev</i> TCT CAT CCC CAC CGT CTA CAC T	77	81°C
CNTF	<i>for</i> CAG ACC TGA CTG CTC TTA TGG A <i>rev</i> GGT AAG CCT GGA GGT TCT CTT G	156	79°C
Klf4	<i>for</i> AAA GAA CAG CCA CCC ACA CTT G <i>rev</i> TAA GGT TTC TCG CCT GTG TGA G	106	78°C
GAPDH	<i>for</i> GGT CAT CCA TGA CAA CTT TGG TAT CG <i>rev</i> GTC GCT GTT GAA GTC AGA GGA GAC	384	

Tabelle 2.7: Übersicht über Primer für murine Podozyten mit Primersequenzen (Vorwärts- und Rückwärts), Länge der Primer in Basenpaaren und der optimalen Temperatur für Fluoreszenzmessungen in der Real Time PCR.

Als endogenes Referenzgen diente der QuantiTect Primer Assay für murine 18S rRNA, Cat. No. QT00324940 von Qiagen (Hilden).

2.1.4 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe pro Analyti (p.A.) eingesetzt. Sie sind in der folgenden Tabelle alphabetisch zusammengefasst.

Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe	2267.4
APS	Biomol, Hamburg	50404
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim	B5525
BSA, protease free	VWR BDH Prolabo, Lutterworth, Großbritannien	422361V
Complete Mini [®] Tabletten	Roche, Mannheim	11836153001
Coumarinsäure	Sigma, Steinheim	C9008
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Merck, Darmstadt	6574
Disodium EDTA Dihydrat	Merck, Darmstadt	1.08421
DTT	Biomol, Hamburg	04010
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe	6755.2
Ethanol	Merck, Darmstadt	1.11727
Ethidiumbromidlösung 0,025%	Roth, Karlsruhe	HP47.1
Ficoll 400	Pharmacia Biotech	17-0400-01
Formalin	Sigma, Steinheim	F-1635
Glycerin	Merck, Darmstadt	104094
Glycin	AppliChem, Darmstadt	A1377
steriles H ₂ O	VWR Prolabo Chemicals, Lutterworth, Großbritannien	83650.320
Isopropanol 100%	Apotheke Uniklinik Düsseldorf	

Kaliumchlorid	Sigma, Steinheim	P9541
Kaliumdihydrogenphosphat	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande	0240
Luminol	Fluka, Buchs, Schweiz	09253
Methanol	Panreac, Castellar del Vallés, Spanien	131091
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt	A2942
Natriumorthovanadat	Sigma, Steinheim	450243
Orange G	Fluka, Buchs, Schweiz	75380
Paraformaldehyd 4%	Morphisto, Frankfurt a. M.	11762
PMSF	Sigma, Steinheim	P-7626
RNase Away [®]	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA	7005-11
Rotiphorese [®] Gel 30%	Roth, Karlsruhe	3029.2
SDS	Biomol, Hamburg	04051.1
TEMED 99%	Roth, Karlsruhe	2367
TRIS Base	Roth, Karlsruhe	4855.2
TRIS HCl	Sigma, Steinheim	T5941
Triton [®] X-100	Sigma, Steinheim	T9284
Tween [®] 20	Merck, Darmstadt	8.17072.1000
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe	8070.2

Tabelle 2.8: Übersicht über verwendete Chemikalien mit Bezugsquellen.

Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in demineralisiertem Wasser, auch VE-Wasser, (Otto Fischar, Saarbrücken) gelöst. Alle Rezepte zur Herstellung von Puffern sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen

PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl
	2,68 mM KCl
	4,29 mM Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O
	1,47 mM KH ₂ PO ₄
1% Triton X-100 Lysispuffer	20 mM Tris HCl pH 7,5

	150 mM KCl
	1% Triton X-100
	1 mM EDTA
	1 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)
	1 Tablette Complete Mini [®]
	0,044 mM PMSF (Zugabe kurz vor Gebrauch)
4 × Laemmli-Probenpuffer	160 mM Tris HCl pH 6,8
	6,4% SDS
	32% Glycerol
	0,32% Bromphenolblau
	200 mM DTT
Trenngelpuffer (pH 8,8)	360 mM Tris HCl
	1140 mM Tris Base
	0,4% SDS
Sammelgelpuffer (pH 6,9)	484 mM Tris HCl
	16 mM Tris Base
	0,4% SDS
Polyacrylamidgellösung	
<i>Für 2 Trenngele 10%</i>	3 ml Rotiphorese [®]
	1,5 ml VE-Wasser
	4,5 ml Trenngelpuffer
	90 µl 10% APS
	15 µl TEMED
<i>Für 2 Sammelgele</i>	0,535 ml Rotiphorese [®]
	1,135 ml VE-Wasser
	1,665 ml Sammelgelpuffer
	40 µl 10% APS
	5µl TEMED
Laufpuffer für SDS-PAGE	191,8 mM Glycin
	23,9 mM Tris Base

	0,1% SDS
Transferpuffer für Tank Blot	31 mM Tris Base 240 mM Glycin 20% Methanol
Proteinwaschpuffer	12,9 mM Tris pH 7,5 129 mM NaCl 0,13 % Tween 20
BSA-Blocklösung 5%	2,5 g BSA in 50 ml Proteinwaschpuffer
Chemolumineszenz-Nachweis	
<i>ECL-Lösung A</i>	100 mM Tris pH 8,5 0,4 mM Coumarinsäure (in DMSO gelöst) 2,5 mM Luminol (in DMSO gelöst)
<i>ECL-Lösung B</i>	100 mM Tris pH 8,5 5,87 mM H ₂ O ₂

Tabelle 2.9: Übersicht über Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen. Chemikalien der Rezepte sind in den jeweiligen Endkonzentrationen dargestellt.

Puffer und Lösungen für Analysen von Genexpression

TAE-Elektrophoresepuffer	39,96 mM Tris Base 19,97 mM Eisessig 2 mM Na ₂ EDTA · 2H ₂ O
TAE 5 × Orange G-Ladepuffer	0,25% Orange G 15% Ficoll 400 15% Glycerin
Agarose-Gel, 1,5%	1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufkochen bis zur vollständigen Lösung (dann Lagerung bei 60°C) + 4 Tropfen Ethidiumbromid auf 100 ml

Tabelle 2.10: Übersicht über Puffer und Lösungen für Analysen von Genexpression. Chemikalien der Rezepte sind in den jeweiligen Endkonzentrationen dargestellt.

2.1.5 Sonstige Materialien, Geräte und Kits

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die für diese Arbeit wichtigen Geräte.

Geräte

Bezeichnung	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank Function Line	Heraeus, Hanau
Eismaschine AF 80	Scotsman [®] , Mailand, Italien
Elektrophoresekammer Agagel	Biometra, Göttingen
Imager FluorChem [®] FC2	Biozym, Hess. Oldendorf
Laborschüttler HS 260 control	IKA [®] , Staufen
Laborwaage	Bizerba, Balingen
Laborwaage für Agarose, Modell 572	Kern & Sohn, Balingen
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle NN-E202CB	Panasonic, Wiesbaden
Netzteil Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia
Netzteil Power Pac 300	Bio-Rad, München
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Real Time PCR System 7300	Applied Biosystems, Darmstadt
Shaker Mini See-Saw Rocker SSM4	Stuart, Staffordshire, Großbritannien
Shaker Rocking Platform	VWR, Darmstadt
Spectrophotometer NanoDrop 2000c	Peqlab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermostat DryBlockHeating BioTDB-100	Biosan, Riga, Lettland
Vakuumpumpe PC3012 Vario	Vacuubrand [®] , Wertheim
Module zur Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot	
Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad, München
PowerPac [™] Universal	Bio-Rad, München

Pipetten	
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Multipette [®] stream	Eppendorf, Hamburg
Research plus (0,1-2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reference (2-20; 50-200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reference 2 (0,1-2,5; 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	
Centrifuge 5417R (Rotor F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg
Pico 21 Centrifuge (Rotor 75003424)	Heraeus, Hanau

Tabelle 2.11: Übersicht über verwendete Geräte mit Typbezeichnungen und Bezugsquellen. (sortiert nach Geräteart)

Kits

Bezeichnung	Hersteller	Cat. No.
RNeasy [®] Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden	74136
QuantiTect [®] Reverse Transcription	Qiagen, Hilden	205313
HotStarTaq [®] DNA Polymerase	Qiagen, Hilden	203205
Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt	4367659
Super Signal [®] ELISA Femto	Thermo Scientific, Dreieich	37075

Tabelle 2.12: Übersicht über verwendete Kits mit Bezugsquellen.

Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Pasteurpipetten	Rotiolab, Dreieich	2600111
Combitips advanced [®] 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030089.782
SafeSeal Gefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht	

Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030121.023
Tubes (15; 50 ml), PP, conical bottom, sterile	Greiner Bio-One, Frickenhausen	
Küvetten UVette®	Eppendorf, Hamburg	0030106.318
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Dualfilter 10 µl M	Eppendorf, Hamburg	0030077.512
96-Well PCR Platten	Starlab, Hamburg	I1402-9700
Klebefolie für 96-Well PCR Platten	BIOplastics, Landgraaf, Niederlande	157300
Nitrocellulose Membran	Whatman Protran, Dassel	10401196
Blotting-Papier	Whatman, Dassel	10426892

Tabelle 2.13: Übersicht über Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquellen.

Weitere für die Versuche verwendete Pipettenspitzen und Serologische Pipetten wurden von Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Material für Immunfluoreszenzanalysen

Immunfluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer.Z1

Objektiv EC Plan-Neofluar 63×/1,25 Oil

Filtersatz 49 DAPI shift free (EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50)

Filtersatz 38 HE eGFP shift free (EX BP 470/40, BS FT 495, EM BP 525/50)

Filtersatz 43 HE Cy 3 shift free (EX BP 550/25, BS FT 570, EM BP 605/70)

Kamera Spot Pursuit 1.4 MPixel, Visitron Systems, Puchheim

Immersionöl Immersol™ 518F, Zeiss, Oberkochen

Objektträger, Cat. No. 0703010, Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen

Phalloidin-TRITC, Cat. No. P1951, Sigma, Steinheim

Eindeckmedien

IS Mounting Medium, Cat. No. SCR-38447, Dianova, Hamburg

IS Mounting Medium DAPI, Cat. No. SCR-38448, Dianova, Hamburg

Tabelle 2.14: Übersicht über Materialien für Immunfluoreszenzanalysen und ihre Bezugsquellen.

Alle für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Filter, Objektive inklusive dem Inversmikroskop stammen von Zeiss (Oberkochen).

Weitere Materialien

Produkt	Hersteller
Laborglasflaschen	Schott, Mainz
96-Well Platten-Gestell	Applied Biosystems, Darmstadt
Eisblöcke für Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Gießapparatur für Agarosegele	Bio-Rad, München
Proteinmarker, 7-175 kDa, Cat. No. P7708	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
100 bp Marker, Cat. No. N3231	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
dNTP	
Zellspachtel	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 2.15: Übersicht über weitere Materialien mit Bezugsquellen.

2.1.6 Software und Teststatistik

Eine Übersicht über alle verwendeten Softwareprogramme gibt folgende Tabelle.

Verwendete Software

Bezeichnung	Anwendung
7300 System SDS Software Version 1.4	Bedienung des Real Time PCR Gerätes
AlphaEase FC Version 6.0.0	densitometrische Auswertung von Banden
EndNote X7	Erstellen von Literaturangaben
FluorChem FC2 Version 6.0.2	Bedienung des Imaging-Systems
ImageJ	Bildbearbeitung
Microsoft Excel 2007	Diagramme und statistische Auswertung
NanoDrop 2000/2000c Version 1.4.2	Bedienung des Spectrophotometers
VisiView Version 2.0.4	Bedienung des Fluoreszenzmikroskopes
Wimasis Image Analysis (WimScratch)	Auswertung von Wound-Scratch-Assays

Tabelle 2.16: Übersicht über verwendete Software mit Bezeichnung und Anwendungsgebiet.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Podozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Zelllinien von Podozyten verschiedener Spezies untersucht. Die von Herrn Dr. Mundel zur Verfügung gestellten immortalisierten murinen Podozyten wurden aus der Niere der Immortomaus generiert. Humane immortalisierte Podozyten der Zelllinie AB 8/13 wurden von Prof. Saleem zur Verfügung gestellt und stammen aus der menschlichen Niere.

Die hochspezialisierten, enddifferenzierten Podozyten proliferieren *in vivo* normalerweise nicht. *In vitro* hängt die Fähigkeit zur Proliferation und anschließenden Ausdifferenzierung der adhärennten immortalisierten Podozyten von beeinflussbaren Umgebungsfaktoren ab. Grund dafür ist das in das podozytäre Genom retroviral eingefügte temperatursensitive Genkonstrukt SV40-tsA58-Large-Tumor-Antigen (TAg). Es wird bei 33°C, 5% CO₂ und in Gegenwart von Interferon- γ (nur für murine Podozyten) von den Zellen exprimiert und befähigt sie zur Proliferation in einem wenig differenzierten Zustand. Ein Temperaturwechsel auf 37°C, 5% CO₂ und der Entzug von Interferon- γ (nur für murine Podozyten) lässt sie den Zellzyklus verlassen und ausdifferenzieren. Dieser Temperaturanstieg bewirkt den Abbau von verbleibendem transgenen TAg. Das fehlende Interferon- γ führt in murinen Podozyten zusätzlich zur Inaktivierung des H-2Kb-Promotors, einem murinen MHC Klasse I Gen, der für die Expression des transgenen TAg wichtig ist (Shankland et al., 2007). Die humane Podozytenlinie wurde außerdem mit einem Telomerase-Gen transfiziert. Bei jeder mitotischen Teilung humaner Zellen verlieren Chromosomen kurze repetitive DNA Sequenzen (Telomere), wodurch ihre mitotische Kapazität begrenzt wird. Das Enzym Telomerase wirkt dem entgegen und stellt an den Telomerenden verlorene Sequenzen wieder her (Saleem et al., 2002).

In terminal differenzierten Podozyten können eine Reihe podozytenspezifischer Marker (Nephrin, Podocin, Synaptopodin, WT-1 u.a.) nachgewiesen werden.

Alle Arbeitsschritte zur Kultivierung der immortalisierten Podozyten und Durchführung von Versuchen in der Zellkultur erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse Zwei von Thermo Scientific (Dreieich). Um sterile Bedingungen zu gewährleisten,

wurden Arbeitsflächen und Materialien vor jedem Kontakt mit den Zellen mit 70%igem Isopropanol gereinigt oder autoklaviert. Nährmedien, ihre Zusätze und Trypsin/EDTA wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Murine Podozyten erhielten VLE RPMI 1640 Medium (mit 300 mg/l stabilem L-Glutamin und 2 g/l Natriumhydrogenkarbonat) mit 10% fetalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS Superior) und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin (alle von Biochrom AG, Berlin). Die Zugabe von Antibiotika stellte einen Schutz der Zellen vor Kontamination mit Bakterien dar. Für humane Podozyten wurde das VLE RPMI 1640 Medium (mit 300 mg/l stabilem L-Glutamin und 2 g/l Natriumhydrogenkarbonat) mit 10% fetalem Kälberserum und 1% ITS (10 µg/ml Insulin, 5,5 µg/ml Transferrin und 6,7 ng/ml Sodium Selenite) (Gibco, Darmstadt) versetzt. Insulin begünstigt die Aufnahme von Glucose in die Zellen. Selenium als Kofaktor der Glutathionperoxidase und Transferrin schützen die Zellen als Antioxidantien vor freien Radikalen. Freie Radikale entstehen bei der Zellatmung und können Membranlipide oder die DNA durch Oxidation schädigen, wodurch die Zellen apoptotisch werden können. FBS als Supplement enthält unter anderem viele für das Zellwachstum, den Stoffwechsel und die Proliferation notwendige Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und Vitamine. Da diese aus Feten gewonnene Seren in ihrer Zusammensetzung schwanken, wurde jede neue Charge vor Gebrauch getestet.

Die immortalisierten Podozyten wurden zur Proliferation bei 33°C und 5% CO₂ in 10 ml Nährmedium mit Zusatz von 10 U/ml Interferon- γ (Roche, Mannheim) (nur für murine Podozyten) in T75 Kulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) kultiviert. Humane Podozyten wurden in oberflächenbehandelten T75 Kulturflaschen geführt. Um Adhäsion und Proliferation muriner Podozyten in T75 Kulturflaschen zu verbessern, wurde ihre 75 cm² große Kulturfläche vor Gebrauch mit 0,1 mg/ml Kollagen Typ I (BD Biosciences, Heidelberg) beschichtet. Hierfür wurde das Kollagen je nach Konzentration der gelieferten Flasche in 0,02 M Essigsäure verdünnt. 6 ml der Kollagenlösung wurden auf jede T75 Kulturflasche verteilt bis der Boden bedeckt war. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Lösung abgesaugt, die T75 Kulturflaschen einmal mit sterilem PBS (Biochrom AG, Berlin) gewaschen und für weitere 60 Minuten bei 37°C getrocknet. Die Kollagen-beschichteten T75 Kulturflaschen wurden bis zur Verwendung senkrecht bei 33°C, 5% CO₂ gelagert. Die 12 bis 14 tägige Ausdifferenzierungsphase der Subkultur erfolgte im Nährmedium bei

37°C und 5% CO₂ in 8,8 cm² durchmessenden Rasterschalen (Nunc, Roskilde, Dänemark), 6 Well und 12 Well Zellkulturplatten (Costar, Corning, NY, USA). Hierfür war keine vorherige Kollagenbeschichtung notwendig.

Zur Subkultivierung wurden die Podozyten bei 70-80%iger Konfluenz passagiert. Nach Absaugen des alten Mediums und einem Waschschrift mit 7 ml sterilem PBS, wurden die Zellen in 3,5 ml Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% (Biochrom AG, Berlin) für drei bis fünf Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde im Phasenkontrast-Mikroskop von Zeiss (Oberkochen) beobachtet, ob sich die adhärenen Zellen von der Kulturfläche gelöst haben und dies eventuell durch leichtes Beklopfen der T75 Kulturflasche unterstützt. Abgelöste Zellen schwammen abgerundet in der Trypsinierungslösung. Die Zugabe von 7 ml Nährmedium beendete die Trypsinaktivität durch das darin enthaltene Serum. Um das Trypsin/EDTA zu entfernen wurde die Zell-Trypsin-Medium Suspension in ein 50 ml Greiner Tube überführt und bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt und das durch die Zellen entstandene Pellet nach leichtem Beklopfen des Tubes in 5 bis 6 ml Nährmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde für die Erhaltungskultur in Verdünnungen von 1:2 bis 1:4 in neue T75 Kulturflaschen mit vorgelegtem Nährmedium überführt und bei 33°C, 5% CO₂ inkubiert. Bei erneuter Konfluenz von 70-80% erfolgte wieder eine Subkultivierung, dabei bekamen murine Podozyten alle 48 Stunden neues Interferon- γ .

Aus der restlichen Suspension konnten Zellen für Versuche ausgesät und zur terminalen Differenzierung für 12 bis 14 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert werden. Die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer von Laboroptik (Lancing, Großbritannien) ermöglichte ein standardisiertes Aussäen von vordefinierten Zellzahlen. Dafür wurden in zwei Mal 10 μ l Suspension jeweils vier Quadrate ausgezählt und das arithmetische Mittel für ein Quadrat berechnet. Die Multiplikation mit dem Kammerfaktor 10.000 ergab die Anzahl der Zellen in einem Milliliter Suspension. Je nach Mikrotiterplatte und Schale wurde dann die gewünschte Verdünnung berechnet und auf die Vertiefungen verteilt. In 6 Well Zellkulturplatten wurden 25.000 (human) oder 30.000 (murin) Zellen pro Vertiefung in 2 ml Nährmedium ausgesät, wobei jeweils 1 ml Medium vorgelegt wurde. 12 Well Zellkulturplatten für Immunfluoreszenzfärbungen wurden zunächst mit einem runden Deckgläschen (VWR, Darmstadt) pro Vertiefung ausgestattet und dann 5.000 (human)

oder 9.000 (murin) Zellen auf jede Vertiefung in 1 ml Nährmedium verteilt. Rasterschalen für Migrationsanalysen enthielten 160.000 (human) oder 200.000 (murin) Zellen in 2 ml Nährmedium. Dieses Vorgehen diente nicht nur der Standardisierung, sondern ermöglichte auch ein optimales Wachstum der Zellen. Im Laufe der Ausdifferenzierung verändern sich Aussehen und Größe der Zellkörper, was ausreichend Platz voraussetzt. Dennoch darf der Zellrasen nicht zu dünn ausgesät werden, da so der Wachstumsreiz fehlen würde. Ein zu dichter Zellrasen induziert durch Kontakthemmung ein Versiegen des Wachstums.

Ein Wechsel des Nährmediums wurde drei Mal pro Woche durchgeführt. Tägliches Mikroskopieren der Erhaltungskultur und Subkultur machte eine frühzeitige Erkennung von Kontaminationen mit Mikroorganismen und das Beobachten von Wachstum und Morphologie möglich. Makroskopische Hinweise für Kontaminationen können eine Trübung oder Verfärbung des Mediums sein. Außerdem wurde in regelmäßigen Abständen der Überstand nach einem Mediumwechsel durch PCR auf Mykoplasmen untersucht.

Für Versuche wurden Zellen der Passage 18 bis maximal 30 verwendet. 12 bis 24 Stunden vor Beginn jedes Versuches wurden die Zellen nach einem Waschschrift in je 1 ml vorgewärmtem serumfreiem Hungermedium (VLE RPMI 1640 Medium mit zusätzlich 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin für murine Podozyten) pro Vertiefung bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Durch den somit eingeleiteten Mangel an Wachstumsfaktoren gingen die Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus über, wodurch standardisierte Ausgangsbedingungen geschaffen wurden. Bei längeren Stimulationszeiten wurde alle 24 Stunden das Hungermedium mit dem Agens erneuert.

2.2.2 Proteinextraktion aus Podozyten

Die Isolation von Proteinen aus Podozyten ist essenziell für eine anschließende Detektion von Zielproteinen im Western Blot. Nach Beendigung der entsprechenden Stimulationszeit eines Versuches in einer 6 Well Zellkulturplatte wurde die Exposition gegenüber Stimulanzen und Inhibitoren durch Absaugen des Agens-haltigen Hungermediums und Spülen mit wenigen Milliliter 4°C kaltem PBS (Rezept siehe Tabelle 2.9) gestoppt. Dabei wurde der Ablauf des Versuches immer so geplant, dass alle Vertiefungen zur selben Zeit bearbeitet werden konnten. Die Zellmembranlyse wurde nach Entfernen des PBS eingeleitet durch Zugabe von je 50 µl vorgekühltem

1%igem Triton X-100 Lysispuffer (Rezept siehe Tabelle 2.9) auf die Zellen. Das PMSF (gelöst in Isopropanol 100%), ein Protease-Inhibitor, musste jedes Mal frisch zum Lysispuffer hinzugefügt werden, da es in wässriger Lösung instabil und rasch zersetzt wird. Nach mechanischer Ablösung der Zellen mit Zellspachteln (TPP, Trasadingen, Schweiz), gefolgt von Abpipettieren des die Zellen enthaltenen Lysispuffers in vorbeschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße (SafeSeal Gefäß, Sarstedt, Nümbrecht), wurde die Lyse für 20 bis 30 Minuten auf Eis fortgesetzt. Durch anschließende Zentrifugation der Zelllysate bei 4°C und 14.000 rpm für 15 Minuten konnten Proteine im Überstand von Zelltrümmern getrennt und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden.

2.2.3 SDS-(PAGE) Gelelektrophorese und Western Blot

Die aus den Podozyten bei der Ernte gewonnenen Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese nach Molekülgröße in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert um dort immunologisch dargestellt werden zu können. Die dafür benötigten Module wurden von Bio-Rad (München) bezogen.

Zuerst wurden die Proteinlysate jeweils im Verhältnis 1:4 mit $4 \times$ Laemmli-Probenpuffer (Rezept siehe Tabelle 2.9) versetzt und für fünf Minuten bei 95°C im Thermomixer von Eppendorf (Hamburg) inkubiert, wodurch die Proteine denaturierten und Proteasen inaktiviert wurden. Nach kurzem Anzentrifugieren und weiterer Kühlung auf Eis, konnten die fertigen Proben sofort weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

Nun wurde nach standardisiertem Schema ein 10%iges 0,75 mm oder 1 mm dickes SDS Gel gegossen, welches aus einem Trenngel und einem Sammelgel bestand. Hierfür wurden Dichtungsmatten in ein Gelgießgestell gelegt und die mit VE-Wasser gereinigte Spacerplatte mit der Glasplatte in der Gelplattenklemme im Gelgießgestell fixiert. Das Trenngel wurde nach obigem Rezept (Tabelle 2.9) hergestellt, wobei kurz vor dem Gießen APS und TEMED hinzukamen. Jeweils 3,9 ml der Lösung wurden mit einer Stabpipette langsam senkrecht zu den Platten zwischen Spacerplatte und Glasplatte möglichst frei von Blasen pipettiert und sofort mit 100%igem Isopropanol beschichtet um die Oberfläche zu glätten. Das Trenngel war je nach Außentemperatur nach etwa 20 Minuten auspolymerisiert. Nun wurde das 100%ige Isopropanol weggegossen, mit VE-Wasser ausgespült und mit Filterpapier gut trocken getupft. Für das Sammelgel wurde

ähnlich wie für das Trenngel verfahren. Etwa 1 ml des Gemisches wurde bis zum Glasplattenrand mit einer 1000er Pipettenspitze zwischen Spacerplatte und Glasplatte pipettiert und sofort die Kämme (10 Well oder 15 Well) dazwischengeschoben. Nach Auspolymerisierung der Gele wurden diese mit der Glasplatte nach innen in die Elektrophoresekammer gespannt. Die Kammer wurde bis zur entsprechenden Markierung und zwischen den Platten bis zum oberen Rand mit Laufpuffer (Rezept siehe Tabelle 2.9) befüllt. Nach dem Ziehen der Kämme wurden pro Gel einmal 6-10 μ l Proteingrößenmarker (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) und je 15 μ l der Proben pro Tasche auf das Sammelgel aufgetragen. Durch Anlage einer konstanten Spannung von 70 Volt für 30 Minuten wurden die Proteine aufkonzentriert und wanderten gleichermaßen Richtung Anode, wo sie dann auf das Trenngel stießen und im elektrischen Feld bei konstanter Stromstärke von 20 mA pro Gel für eine Stunde und 30 Minuten aufgetrennt wurden. Das im Überschuss vorhandene negativ geladene SDS lagerte sich proportional zur Molekülmasse um die Proteine und spaltete ihre Sekundär- und Tertiärstruktur, so dass nur nach Größe aufgetrennt wurde. Die Poren in der Polyacrylamidmatrix ließen die SDS-Protein-Komplexe unterschiedlich weit wandern, da kleinere Proteine weniger Widerstand hatten und schneller wanderten. Als Indikator für die Lauffront diente das im neutralen und alkalischen Bereich blaue Bromphenolblau aus dem Probenpuffer, woran man den Fortschritt der Auftrennung erkennen konnte.

Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt mit dem Ziel einer dauerhaften Fixierung der aufgetrennten Proteine auf einer Nitrocellulosemembran (Whatman Protran, Dassel). Für das Tank Blot Verfahren (Towbin et al., 1979) wurden zunächst die Nitrocellulosemembran, das Blottingpapier (Whatman, Dassel), die Schwämme und das vom Sammelgel getrennte Trenngel in Transferpuffer (Rezept siehe Tabelle 2.9) getränkt. Das darin enthaltene Methanol aktivierte die Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran. Die Schichtung in der Gelhalterkassette setzte sich von Schwarz nach Farblos in der Reihenfolge Schwamm, Blottingpapier, Trenngel, Nitrocellulosemembran, Blottingpapier, Schwamm zusammen. Noch eventuell vorhandene Luftblasen wurden vorsichtig von einer Seite zur anderen mit der Hand weggestrichen. Die fertig zusammengebaute Gelhalterkassette wurde in die Blotkammer gespannt und diese bis oben hin mit Transferpuffer befüllt. Damit die Temperatur nicht anstieg, wurde kurz vorher ein Eisblock in die Kammer gelegt und dann zwei Stunden

bei 200 mA Richtung Anode geblottet. Die Membran wurde anschließend mit 5%igem bovinen Serumalbumin (BSA) entweder eine Stunde bei 37°C auf dem Shaker (Stuart, Staffordshire, Großbritannien) geblockt oder bei 4°C über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Hierdurch wurden freie Bindungsstellen abgesättigt, um unspezifische Antikörperreaktionen zu verhindern. Nach kurzem Schwenken in Proteinwaschpuffer (Rezept siehe Tabelle 2.9) wurde die Membran im jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf dem Shaker (VWR, Darmstadt) oder im Fall von anti- β -Aktin für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler (IKA[®], Staufen) inkubiert (Primärantikörperliste in Tabelle 2.5). Es folgte ein vier Mal fünf Minuten Waschvorgang mit Proteinwaschpuffer, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, und die einstündige Inkubation mit Horseradish Peroxidase (HRP) markierten Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler (Sekundärantikörperliste in Tabelle 2.6). Nitrocellulosemembranen mit vorheriger Aktinfärbung wurden im anti-Maus Sekundärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler inkubiert. Der vier Mal fünf Minuten Waschvorgang wurde nun wiederholt und die Membran danach mit 2 ml der wie in Tabelle 2.9 hergestellten ECL Lösung (1 ml Lösung A + 1 ml Lösung B) beschichtet in den Imager FluorChem[®] FC2 (Biozym, Hess. Oldendorf) gelegt. Die Horseradish Peroxidase als Konjugat des Sekundärantikörpers diente der Sichtbarmachung gebundener Antikörper, indem sie die Oxidation des Luminols aus der ECL Lösung katalysierte, wodurch messbare Chemilumineszenz entstand. Durch die entstandene Lichtemission konnte die Position geringster Proteinmengen mit einer UV-sensitiven CCD-Kamera digitalisiert werden. Für die Messung wurden die Membranen sieben Minuten lang aufgenommen. Aktin-gefärbte Membranen wurden aufgrund des starken Signals für nur 90 Sekunden entwickelt.

Die Intensität der Banden wurde densitometrisch mit dem Programm AlphaEase FC ausgemessen. Zur relativen Quantifizierung wurden für jeden Versuch getrennte Membranen mit dem Gesamt-Protein-Antikörper und dem phosphorylierten Protein-Antikörper inkubiert und ihre Banden-Intensitäten zueinander ins Verhältnis gesetzt (Phospho-Protein : Gesamt-Protein). Die berechneten Quotienten wurden auf die mitgeführte Negativkontrolle normalisiert und in einem Diagramm dargestellt.

2.2.4 RNA Isolierung aus Podozyten

Bevor RNA aus Podozyten in Form von cDNA weiteren Analysen unterzogen werden konnte, bedurfte es ihrer vorherigen Aufbereitung. Dies geschah mit Hilfe des RNeasy® Plus Mini Kits von Qiagen (Hilden).

Idealerweise verliefen die folgenden Arbeitsschritte zur Analyse von Genexpression in Podozyten unter RNase-freien Bedingungen. Um das zu erreichen wurden Handschuhe, Arbeitsflächen, Gegenstände und Materialien fortlaufend mit RNase Away® (Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA) dekontaminiert. Es wurden ausschließlich RNase- und DNase-freie Verbrauchsmaterialien und Filterspitzen der Firmen Qiagen, Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht) und Costar (Corning, NY, USA) verwendet.

Nach beendeter Stimulation in 6 Well Zellkulturplatten wurde das Stimulans-haltige Hungermedium abgesaugt, die Podozyten mit einigen Milliliter 4°C kaltem, sterilen PBS gespült und sofort in je 350 µl RLT Plus Puffer aus dem Kit geerntet. Der RLT Plus Puffer war nicht nur für die Zellmembranlyse verantwortlich, er inaktivierte auch RNasen durch seine denaturierenden Eigenschaften. Wie bei der Proteinextraktion dienten auch hier mit RNase Away® gereinigte Zellspachtel der mechanischen Ablösung der Zellen vom Untergrund. Anschließend wurden die Zellysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und konnten auf Eis gekühlt direkt weiterverwendet werden. Alle folgenden Arbeitsschritte bis zur Isolierung der RNA wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und sollten daher zügig ablaufen. Die Proben eines Versuches wurden alle im gleichen Schub behandelt.

Eine zweiminütige Zentrifugation bei $21.000 \times g$ diente der Entfernung von Zelltrümmern, die sich als Pellet am Boden der Reaktionsgefäße absetzten. Nach Überführen des Überstandes auf spezielle gDNA Eliminierungssäulen aus dem Kit folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei $8.000 \times g$ für 15 Sekunden. Die Säule mit gebundener gDNA wurde verworfen und das von gDNA befreite aufgefangene Lysat mit je 350 µl RNase-freiem 70%igen Ethanol vermischt. Dadurch konnten Bindungseigenschaften der RNA verbessert werden. Im Zuge der RNA-Extraktion wurde dieses Gemisch nun auf spezielle RNA Säulen aus dem Kit pipettiert, gefolgt von erneutem Zentrifugieren bei $8.000 \times g$ für 15 Sekunden. Die darauffolgenden Schritte dienten der Aufreinigung von an die Membran der Säule gebundener RNA. Nach Verwerfen der aufgefangenen Flüssigkeit erfolgten zunächst ein Waschschrift mit 700

μl RW1-Puffer und im Anschluss zwei Waschschriffe mit je 500 μl Ethanol-haltigem RPE-Puffer aus dem Kit. Dabei wurden die Säulen zwischen jedem Waschvorgang für 15 Sekunden bei $8.000 \times g$ zentrifugiert und die aufgefangene Flüssigkeit verworfen. Um die Membranen mit gebundener RNA für die Elution komplett von RPE-Puffer und Ethanol zu befreien, wurden die Säulen nun in neue 2 ml AuffanggefäÙe überführt und eine Minute lang bei $21.000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurden die Säulen in 1,5 ml ReaktionsgefäÙe aus dem Kit überführt und die RNA mit je 30 μl RNase-freiem Wasser bei $8.000 \times g$ für eine Minute aus der Membran eluiert und direkt auf Eis gekühlt. Um einen Ausgangswert für den späteren Vergleich von noch vorhandener gDNA-Verunreinigung zu erhalten, wurden nun 0,5 μl jeder RNA-Probe entnommen.

2.2.5 Reverse Transkription

Nach der Isolierung musste die im Eluat gewonnene RNA in Vorbereitung für die Quantifizierung mittels Real Time Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion, PCR) zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde weiterhin unter RNase-freien Bedingungen das QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet.

In den folgenden Schritten wurden RNA-Proben und Bestandteile des Kits zum Schutz vor Degradation von Molekülen durchgehend in Eisblöcken von Eppendorf (Hamburg) kühl gehalten. Für die Umschreibung wurden 12 μl jeder RNA-Probe eingesetzt. Zwecks Eliminierung von noch vorhandener gDNA wurde zuerst ein Verdau mit je 2 μl gDNA Wipeout Buffer (7 \times) aus dem Kit für drei Minuten bei 42°C im Thermostat von Biosan (Riga, Lettland) durchgeführt. An dieser Stelle wurden jeder Probe 0,5 μl zur späteren Kontrolle der vollständigen gDNA Eliminierung entnommen. Das Endvolumen von 14 μl wurde durch Zugabe von je 0,5 μl RNase-freiem Wasser ausgeglichen. Hiernach konnte die RNA-abhängige Synthese der komplementären Einzelstrang-DNA (single-stranded DNA, ssDNA) mittels Reverser Transkriptase aus dem Kit durchgeführt werden. Dieses rekombinant hergestellte Enzym stammte in dem Fall aus Escherichia coli-Bakterien. Neben der DNA-Polymerase-Aktivität besaÙ es außerdem eine RNase H (hybrid-abhängige Exoribonuclease) -Aktivität, wodurch spezifisch bereits umgeschriebene RNA degradiert wurde, sodass am Ende nur noch einzelsträngige cDNA vorlag. Zur Vereinfachung und homogeneren Vermengung der einzelnen Volumina wurde ein sogenannter Mastermix vorgemischt, bestehend aus 4 μl

Quantiscript RT Buffer (5×) (enthält dNTPs), 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase (enthält RNase-Inhibitor) und 1 µl RT Primer Mix für den 14 µl-Verdauansatz jeder RNA-Probe. Die anschließende cDNA Synthese in den 20 µl-Ansätzen erfolgte nach kurzem Anzentrifugieren im Eppendorf Mastercycler für 25 Minuten bei 42°C, gefolgt von 3 Minuten und 30 Sekunden langer Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95°C. Auch hier wurden nach kurzem Anzentrifugieren wieder 0,5 µl von jeder Probe entnommen um den Erfolg der cDNA Synthese zu überprüfen. Die gewonnenen cDNA-Proben konnten nun in der Real Time PCR als Matrize eingesetzt werden. Je nach Menge der zu untersuchenden Parameter wurden sie vorher mit je 11,5 µl sterilem Wasser verdünnt, sodass schlussendlich maximal 30 µl cDNA-Probe zur Verfügung standen. Die Proben wurden bei Verwendung für kurze Zeiträume bei 4°C gelagert und für längere bei -20°C.

2.2.6 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Um die vollständige Eliminierung von gDNA aus isolierter Podozyten-RNA und den Erfolg der Reversen Transkription mittels konventioneller PCR zu überprüfen, wurde zuletzt die bereits erwähnte Kontrolle mit dem HotStarTaq[®] DNA Polymerase Kit von Qiagen durchgeführt. Hierfür wurden 0,5 ml Safe-Lock Tubes von Eppendorf verwendet, da sie bei starker Hitze kein Verdunsten der Ansätze erlauben.

Im Prozess der Verarbeitung von podozytärer RNA zu cDNA wurden von verschiedenen Stadien der selben Proben kleine Volumina entnommen (siehe 2.2.4 und 2.2.5). Der Einsatz von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als in Eukaryoten ubiquitär vorkommendes konstitutiv exprimiertes Gen diente dabei der relativen Semiquantifizierung von DNA-Molekülen. Ein hierfür vorpipettierter Mastermix enthielt folgende Komponenten pro 0,5 µl-Ansatz: 16,78 µl steriles H₂O, 2 µl PCR Buffer (10×) (enthält 15 mM MgCl₂), 0,4 µl dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 0,1 µl GAPDH Rückwärtsprimer, 0,1 µl GAPDH Vorwärtsprimer und 0,12 µl HotStarTaq-DNA-Polymerase. Somit ergab sich ein Endvolumen von je 20 µl. Eine Negativkontrolle bestehend aus dem Mastermix ohne Probe wurde mitgeführt. Der gesamte Ansatz wurde nach kurzem Anzentrifugieren für die Amplifikation in den Mastercycler gesetzt und die HotStarTaq-DNA-Polymerase zuerst für 15 Minuten bei 95°C hitzeaktiviert, gefolgt von 40 Zyklen mit je drei Schritten 95°C, 30 sek. (Denaturierung) / 58°C, 30 sek. (Primer-Annealing) / 72°C, 30 sek. (Elongation) mit

abschließenden fünf Minuten bei 72°C (finale Elongation). Nach Ende des Durchlaufes kühlte der Cycler die PCR-Produkte auf 4°C ab.

Inzwischen konnte nach obigem Rezept (Tabelle 2.10) ein 1,5%iges Agarose-Gel gegossen werden, in dem die Kontroll-PCR-Produkte nach Basenpaarlänge aufgetrennt wurden und durch das Ethidiumbromid aus dem Gel sichtbar gemacht werden konnten. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und verändert auf diese Weise seine Fluoreszenzintensität bei Anregung mit einer UV-Lampe. Dies konnte bereits nach wenigen Sekunden Exposition mit der UV-sensitiven CCD-Kamera im Imaging-System digital erfasst werden. Nach 20-30 Minuten war das Gel ausgehärtet und konnte von der Gießstation (Bio-Rad) in die Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen), die mit TAE-Elektrophoresepuffer (Rezept siehe Tabelle 2.10) gefüllt war, überführt werden. Die PCR-Produkte wurden zur Sichtbarmachung der Lauffront und Beschwerung in den Geltaschen mit je 2 µl 5× Orange G-Ladepuffer (Rezept siehe Tabelle 2.10) versetzt und kurz anzentrifugiert. Auf das mit TEA-Elektrophoresepuffer bedeckte Gel wurden pro Reihe in die Geltaschen 6 µl 100-bp-Marker (New England Biolabs, Frankfurt a.M.), gefolgt von je 9 µl PCR-Produkt und zuletzt 6 µl 100-bp-Marker aufgetragen. Unter Anlage einer konstanten Spannung von meist 85 V wanderten die negativ geladenen DNA Moleküle bei 350 mA im elektrischen Feld Richtung Anode. Da das Ethidiumbromid der DNA entgegengesetzt wandert, musste der Lauf in Abhängigkeit von der Spannung regelmäßig beobachtet werden und eventuell zwischendurch Aufnahmen zur Beurteilung des Fortschrittes gemacht werden. Bei konstanten 85 V reichten oft 35-40 Minuten aus und es konnte ein endgültiges Bild im Imaging-System gemacht werden. Erwartet wurden vereinzelte Banden in der RNA vor dem gDNA-Verdau, keine Banden in der RNA nach dem gDNA-Verdau (spricht für vollständige Eliminierung der gDNA), ebenfalls keine Bande in der Negativkontrolle und kräftige, gleichmäßige Banden in der cDNA.

2.2.7 Spektralphotometrische Messungen

Das photometrische Messen von Extinktionen der cDNA-Proben erfolgte zur Abschätzung von möglichen Verunreinigungen mit Proteinen (bei 280 nm) und Zuckern (bei 230 nm) und der Menge an vorhandener cDNA (bei 260 nm). Die gemessene Konzentration lag meist um 1.500 µg/ml (im Nanodrop etwa 1.000 ng/µl). Zum Einsatz kamen dabei entweder Küvetten (Eppendorf) mit 1:70 verdünnter Probe in sterilem

Wasser bei Verwendung des Biophotometers von Eppendorf oder es wurde direkt 1 μ l Probe auf den Messsockel des Nanodrops (Peqlab, Erlangen) gegeben. Die Eichung mit einem Leerwert (RNase-freies Wasser) wurde vor Beginn jeder Messreihe durchgeführt.

2.2.8 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion

Ein gut etabliertes Verfahren zur Analyse von relativer Genexpression auf mRNA-Ebene ist die quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR). Die Methode beruht auf einer exponentiellen Vervielfältigung von gezielten Sequenzabschnitten auf einer DNA-Kopievorlage. Als Kopievorlage diente hier, wie in 2.2.5 beschrieben, die aus isolierter Podozyten-RNA gewonnene cDNA. Durch den Einsatz von SYBR Green I, einem an doppelsträngige DNA unspezifisch bindenden Cyanin-Farbstoff, konnte proportional zur amplifizierten Menge akkumulierender Produkte nach jedem Zyklus ein Signal detektiert werden, das in Form einer Graphik (Amplifikationskurven) dargestellt wurde. Das Signal entstand durch die stärkere Fluoreszenzintensität von gebundenem SYBR Green I nach Anregung mit einer Lichtquelle. In den Amplifikationskurven war die gemessene Fluoreszenz gegen die PCR-Zykluszahl aufgetragen und es konnten verschiedene Phasen voneinander abgegrenzt werden. Vor dem Anstieg von signifikant messbarer Farbstoff-Fluoreszenz dominierte etwa bis zum 15. Zyklus eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz (sogenannte *Baseline*) mit niedriger Intensität. Um ihren störenden Einfluss auf die gemessene Farbstoff-Fluoreszenz der Amplifikate und die nachfolgende Auswertung zu reduzieren, wurde sie von den Amplifikationskurven subtrahiert. Der sogenannte Schwellenzyklus (C_T , *cycle threshold*) war dabei der erste Zyklus bei dem das Fluoreszenzsignal über der *Baseline* lag und eine konstante exponentielle Verdopplung begann (exponentielle Phase). Niedrige C_T -Werte sprachen für ein frühes Erreichen der stabilen exponentiellen Amplifikation und folglich für eine hohe Menge vorhandener PCR-Produkte und umgekehrt. Bei steigender Akkumulation der Amplifikate und Erschöpfung der Reaktoren wurden die Kurven durch langsamere Amplifikation flacher und gingen in die lineare Phase über, gefolgt von der noch flacheren Plateau-Phase. Anhand der Schmelzkurvenanalyse, die einmalig nach jeder Amplifikation durchgeführt wurde, konnten Primerdimere von PCR-Produkten unterschieden und zusätzliche unspezifische Amplifikationen (mehrere Peaks) erkannt werden. Primerdimere sind kleinere Fragmente und haben niedrigere Schmelztemperaturen als die größeren PCR-

Produkte. Auch bei diesem methodischen Vorgehen war sauberes Arbeiten zum Ausschluss von Kontamination mit fremder DNA wichtig. Es wurden ausschließlich PCR-reine Verbrauchsmaterialien und geeignete Dekontaminationsmittel verwendet. Der SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde bei kontinuierlicher Verwendung bei 4°C gelagert, für längere Zeiträume bei -80°C. Alle verwendeten Produkte, inklusive der cDNA-Proben, wurden fortlaufend in Eisblöcken gekühlt. Nach Planung des Verteilungsmusters auf der 96-Well Platte (Starlab, Hamburg) und Programmierung des Real Time PCR Gerätes (Applied Biosystems, Darmstadt), wurden zuerst die einzelnen Primer-Mixe für den Gesamt-Ansatz ohne cDNA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorbereitet. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

Real Time PCR Ansatz

Produkt	QuantiTect Primer (18S)	eigene Primer
steriles Wasser	7 µl	8,5 µl
SYBR Green Master Mix	10 µl	10 µl
Primer	2 µl	0,25 µl Rückwärtsprimer 0,25 µl Vorwärtsprimer
cDNA	+ 1 µl	+ 1 µl

Tabelle 2.17: Übersicht über den Real Time PCR Ansatz für je 20 µl. Für den Mix des endogenen Referenzgens 18S rRNA wurden die Komponenten anderes zusammengesetzt (mittlere Spalte) als für die übrigen Primer.

Jeder Probenreihe schloss sich eine Negativkontrolle (*No Template Control*, NTC) bestehend aus dem Primer-Mix ohne cDNA, stattdessen mit 1µl sterilem Wasser, an. Für jede Probe wurden Doppelwerte generiert. Um spätere Fluoreszenz-Messungen nicht zu beeinträchtigen, wurde die 96-Well Platte zur Vermeidung von Bodenkontakt in ein spezielles Gestell (Applied Biosystems, Darmstadt) gelegt. Nun wurden für möglichst gleiche Volumina und geringen Einfluss auf die Hintergrundfluoreszenz je 19 µl der Primer-Mixe mit einer Multipette (Eppendorf) in die 96-Well Platte vorgelegt, wobei das erste Volumen immer zurück in das Reaktionsgefäß verworfen wurde und die NTCs meist manuell mit einer üblichen Pipette (Eppendorf) hineingegeben wurden. Die Zugabe der cDNA erfolgte mit speziellen PCR-reinen Pipettenspitzen von Eppendorf. Dies ergab ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz. Nach Anbringen der Klebefolie

(BIOplastics, Landgraaf, Niederlande) mit einem großen Schaber auf die 96-Well Platte, ohne ihre Oberfläche dabei zu berühren, wurde sie nach kurzem Anzentrifugieren waagrecht in den Thermoblock des Real Time PCR Gerätes gelegt. Anschließend wurde das Programm gestartet und die 7300 System SDS Software durchlief das vorgeschichtete Protokoll. Im ersten Schritt wurden für 15 Minuten bei 95°C die Hot Start DNA-Polymerase (im SYBR Green Master Mix enthalten) hitzeaktiviert und Wasserstoffbrückenbindungen von doppelsträngigen DNA- und Primer-Molekülen gespalten (initiale Denaturierung). Es folgten zur Amplifikation 40 Zyklen mit je vier Schritten in der Reihenfolge 95°C, 15 sek (Denaturierung) / 58°C, 30 sek (Primer-Annealing) / 72°C, 30 sek (Elongation 5'→3') / variable Real Time Primer-Temperatur (siehe Tabelle 2.7), 32 sek. Dabei dienten die letzten 32 Sekunden der Fluoreszenzmessung, da bei erneutem Denaturieren der neu gebildeten Doppelstränge das SYBR Green I freigesetzt wird und die Fluoreszenz dann stark abnimmt. Die Temperatur wurde vorher individuell anhand von Schmelzkurven bestimmt, sodass möglichst alle Primerdimere aufgeschmolzen waren aber noch viel Farbstoff-Fluoreszenz der PCR-Produkte detektiert werden konnte. Nach erfolgreicher Amplifikation schloss sich als letzter Schritt einmalig die Schmelzkurvenanalyse an mit den Schritten 95°C, 15 sek / 60°C, 30 sek / 95°C 15 sek. Nach Ende des Laufes erhielt man die Amplifikationskurven, für die C_T -Werte und *Baseline* automatisch bestimmt und verrechnet wurden. Ein manuelles Bestimmen der C_T -Werte erfolgte nur wenn dies automatisch nicht durchführbar war aufgrund von unterschiedlich frühem Erreichen der Plateau-Phase. Dabei wurde versucht die threshold-Linie möglichst in die Mitte der exponentiellen Phase zu setzen. Nach Vergleich der C_T -Doppelwerte und Schmelzkurvenanalyse, wurden die Daten in eine Excel-Datei exportiert. Wichen die Doppelwerte sehr stark voneinander ab, wurde nach Fehleranalyse entweder ein Mittelwert verwendet, die Real Time PCR wiederholt oder die Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse aufgetrennt.

Die statistische Auswertung der im Real Time PCR Gerät detektierten Fluoreszenz von an Amplifikaten gebundenem SYBR Green I erfolgte anhand der gemessenen C_T -Werte nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Hierbei wurden die gemittelten C_T -Doppelwerte zunächst durch Subtraktion (C_T (Zielgen) - C_T (Referenzgen)) auf das endogene Referenzgen 18S normalisiert (ΔC_T) um ungleiche Mengen der eingesetzten Proben auszugleichen. Die Expression des 18S ist als konstant anzusehen, da sie nicht

reguliert wird. Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wurde dann die Differenz aus den ΔC_T -Werten der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrollprobe gebildet ($\Delta C_T \text{ (stimuliert)} - \Delta C_T \text{ (unstimuliert)} = \Delta\Delta C_T$). Diese relative Genexpression wurde durch Berechnung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Ratio als ein Vielfaches der Expression in der Kontrollprobe dargestellt. Für die unbehandelte Kontrollprobe ergibt sich dabei ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert von null ($\Delta C_T \text{ (unstimuliert)} - \Delta C_T \text{ (unstimuliert)}$) und folglich der Wert eins nach Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Formel. Daraus resultiert ein Anstieg der Expression von Zielgenen bei Ratios > 1 , ein Abfall bei Ratios < 1 und ein gleiches Expressionslevel wie in der unstimulierten Kontrollprobe bei Ratios $= 1$ (arbiträre Einheiten).

Die relativen, normalisierten Genexpressions-Ratios wurden als arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen in einem Diagramm dargestellt. Die statistische Signifikanz zwischen den Genexpressions-Ratios in stimulierten und unstimulierten Podozyten wurde anhand des zweiseitigen t-Tests nach *Student* für ungepaarte Stichproben überprüft. Die Unterschiede in der Genexpression sind signifikant bei einem $p \leq 0,05$.

2.2.9 Migrationsanalyse von Podozyten (Wound-Scratch-Assay)

Mit dem Wound-Scratch-Assay (Wundheilungsassay, Migrationsassay) ist es möglich den funktionellen Effekt von LIF auf das Migrationsverhalten von immortalisierten Podozyten *in vitro* nach Erzeugung eines Schadens in den Zellrasen zu beobachten. Dafür wurden die Podozyten wie in 2.2.1 beschrieben in Rasterschalen mit $8,8 \text{ cm}^2$ Durchmesser dicht ausgesät und bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ ausdifferenziert. Das Gitternetz auf der Kulturfläche der Schalen mit $2 \times 2 \text{ mm}$ großen Quadraten ermöglichte eine Orientierung innerhalb des Zellrasens. Die Versuche wurden am 11. oder 12. Tag der Ausdifferenzierung begonnen. Dabei wurde eine homogene Konfluenz des Zellrasens von etwa 90% angestrebt um gleiche Voraussetzungen für die Migration der Podozyten und eine ebenmäßige Wundfläche zu erzeugen. Nach 12-24 Stunden auf Hungermedium wurden unter der sterilen Sicherheitswerkbank mechanisch drei separate längliche Wundflächen parallel zueinander entlang der Gitternetzspalten mit sterilen $0,5\text{-}20 \mu\text{l}$ Filterspitzen (Sarstedt) pro Rasterschale in den Zellrasen gekratzt. Das Kratzen einer Linie erfolgte nahezu senkrecht zur Kulturfläche von oben nach unten.

Das Zell-freie Areal sollte möglichst mittig in einer Kästchen-Spalte liegen, sodass links und rechts innerhalb der Kästchen noch Zellen zu sehen waren. Ein behutsames Schwenken der Rasterschalen mit Wechsel des Hungermediums ermöglichte die Beseitigung von entstandenen Zelltrümmern. In getrennten 15 ml Greiner Tubes wurden je 2 ml vorgewärmtes Hungermedium entweder mit LIF in Endkonzentration (1 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml) oder sterilem PBS für die Negativkontrolle vorbereitet und nach Absaugen des gewechselten Hungermediums mit 1000 μ l Filterspitzen (Sarstedt) vorsichtig in die entsprechenden Rasterschalen hineintropfen lassen. Die ersten Fotos in zehnfacher Vergrößerung wurden im Anschluss an die begonnene Stimulation (Zeitpunkt Null) über einen separaten Zugang am Inversmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung mit einer Nikon Coolpix Digitalkamera aufgenommen. Dabei wurden jeweils drei Kästchen pro Rasterschale zur Beobachtung ausgewählt und zu späteren Zeitpunkten (10h, 13h, 16h Stimulation) erneut fotografiert. Die Kästchen sollten möglichst zentrale und ähnlich breite Wundflächen mit vergleichbar dichten und großen Zellarealen links und rechts haben. Zwischen den Fotoaufnahmen wurden die Rasterschalen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Auswertung der Zellmigration über die Zell-bedeckte Fläche (in %) wurden die aufgenommenen Bilddateien auf der Analyse-Plattform der Firma Wimasis GmbH (München) hochgeladen (WimScratch). Die per Email zugesandten Ergebnisse wurden dann wie folgt statistisch weiterverarbeitet. Das bei der Bildanalyse ermittelte prozentuale Wundflächenareal wurde zunächst jeweils auf die Größe der Ausgangswundfläche (0 h) normalisiert (definiert als 100%). Anschließend wurden aus den Daten voneinander unabhängig durchgeführter Versuche einer Versuchsreihe arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und in einem Diagramm dargestellt. Die Differenz zwischen der Ausgangsgröße von 100% (0 h) und der jeweiligen Wundflächengröße nach den Inkubationszeiten entspricht der durchschnittlichen Reduktion der Wundfläche durch das Migrieren der Zellen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben eingesetzt. Ein $p \leq 0,05$ zeigt signifikante Unterschiede an.

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Visualisierung von LIF-induzierten endogenen Prozessen und Verteilungsmustern in immortalisierten Podozyten kamen immunzytochemische Analysen zum Einsatz.

Die Podozyten wurden, wie in 2.2.1 beschrieben, in 12 Well Zellkulturplatten auf runde Deckgläschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ ausdifferenziert. Alle Reaktionen fanden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt. Bei jedem Schritt wurde darauf geachtet, dass die Deckgläschen ausreichend mit Flüssigkeit bedeckt waren und dass nach dem Absaugen kein Austrocknen stattfand. Nach beendeter Stimulation nach verschiedenen Schemata, wurde das Stimulans-haltige Hungermedium abgesaugt und die Platte drei Mal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Ab diesem Schritt gab es dann drei unterschiedliche Protokolle für die Phalloidin-TRITC-, LIF-Rezeptor- und STAT3/Phospho-STAT3-Färbung, die nachfolgend einzeln beschrieben werden.

Phalloidin-TRITC-Färbung

Phalloidin, ein Toxin aus der Gruppe der Phallotoxine, stammt aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) und bindet irreversibel an intrazelluläre Aktinfilamente (F-Aktin). Konjugiert an den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-B-Isothiocyanat (TRITC), aus der Gruppe der Rhodamine, konnten diese Aktinfilamente sichtbar gemacht werden.

Die Podozyten wurden nun, nach Absaugen des PBS, für zehn Minuten in 10%igem Formalin fixiert, gefolgt von drei Waschsritten mit kaltem PBS. Die Permeabilisierung der Zellmembranen für die Zugänglichkeit von Phalloidin-TRITC erfolgte für fünf Minuten mit 0,3%igem Triton X-100 Lysispuffer (in PBS gelöst). Nach drei erneuten Waschsritten mit kaltem PBS wurden die Deckgläschen für die Aktinzytoskelett-Färbung mit je 350 µl Phalloidin-TRITC (Sigma, Steinheim) in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBS unter Lichtschutz für 30 Minuten inkubiert.

anti-LIF-Rezeptor-Färbung

Zur Darstellung des LIF-Rezeptorkomplexes wurden die Podozyten nach Entfernen des PBS in 4%igem Paraformaldehyd für zehn Minuten auf den Deckgläschen fixiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit kaltem PBS und Permeabilisierung mit 0,3%igem Triton X-100 Lysispuffer (in PBS gelöst) für fünf Minuten. Danach wurde die 12 Well Zellkulturplatte erneut drei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Für die spezifische Primärantikörper-Bindung wurden die Deckgläschen zunächst abgedunkelt über Nacht bei 4°C in je 300 µl anti-LIFR (1:50 in PBS) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) inkubiert, gefolgt von drei weiteren Waschsritten mit kaltem

PBS. Anschließend erfolgte für 45 Minuten ebenfalls unter Lichtschutz die Inkubation mit je 350 µl des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (1:7.500 in PBS) (Invitrogen, Karlsruhe). Deckgläschen für Negativkontrollen wurden nur im Sekundärantikörper inkubiert.

anti-STAT3/Phospho-STAT3-Färbung

Bei dieser Färbung wurden die Podozyten nach Absaugen des PBS mit 4%igem Paraformaldehyd (Morphisto, Frankfurt a. M.) für 15 Minuten bei 37°C fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit kaltem PBS und die Zellmembranlyse mit 0,2%igem Triton X-100 Lysispuffer (in PBS gelöst) für 15 Minuten. Nach drei weiteren Waschschrten mit kaltem PBS wurden die Deckgläschen nun für 30 Minuten in 1%iger BSA Blocklösung (in PBS gelöst) zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen inkubiert. Ohne zusätzliche Waschschrte erfolgte danach die spezifische Primärantikörper-Reaktion mit je 300 µl anti-STAT3 (#12640, 1:1.000 in 1% BSA/PBS) oder anti-Phospho-STAT3 (Tyr 705, #9131, 1:100 in 1% BSA/PBS) (beide von Cell Signaling, Leiden, Niederlande) abgedunkelt bei 4°C über Nacht. Deckgläschen für Negativkontrollen wurden über Nacht in PBS belassen. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen (bis auf Negativkontrollen) erneut drei Mal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend für die fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper-Bindung abgedunkelt für 45 Minuten in je 300 µl anti-Kaninchen Alexa Fluor® (1:7.500 in PBS) (Invitrogen) inkubiert.

Die nächsten Schritte erfolgten für alle Färbungen nach gleichem Prinzip. Zur Vermeidung von Photobleichung, die durch permanente Anregung mit Licht zum Verlust von Farbstoff-Fluoreszenz führen kann, wurden alle nachfolgenden Schritte unter Lichtschutz durchgeführt und spezielle Eindeckmedien von Dianova (Hamburg) verwendet.

Die Deckgläschen wurden im Anschluss an die jeweiligen Inkubationszeiten drei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte das Eindeckeln der Deckgläschen auf getrennten Objektträgern (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen) mit je 10 µl 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) haltigem Antifading-Mounting-Medium in einer Verdünnung von 1:20 mit Antifading-Mounting-Medium. Zur besseren Darstellung von Prozessen im Zellkern wurde bei der anti-STAT3/Phospho-STAT3-Färbung auf die

Gegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Anlagerung an DNA) verzichtet und direkt mit je 10 µl Antifading-Mounting-Medium eingedeckelt. Hierzu wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette aus dem PBS rausgenommen, kurz an der Luft angetrocknet und dann unter Vermeidung von Luftbläschen mit der Oberseite Richtung Objektträger auf das vorgelegte Eindeckmedium gelegt. Zum Trocknen der Eindeckmedien wurden die Objektträger eine Nacht bei Raumtemperatur waagrecht in abgedunkelten Mappen gelagert. Danach erfolgte die Lagerung bis zur Fluoreszenzmikroskopie bei 4°C. Über einen Zugang am Inversmikroskop Axio Observer.Z1 (Zeiss) für die Spot Pursuit Digitalkamera (Visitron Systems, Puchheim) wurden die Podozyten in einem dunklen Raum in 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl (Zeiss) unter Verwendung verschiedener Filtersätze (siehe Tabelle 2.14) fotografiert. Dabei wurden je nach Fluoreszenzintensität nach Anregung mit einer integrierten Lichtquelle unterschiedliche Belichtungszeiten gewählt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass möglichst Podozyten ähnlicher Morphologie und Größe fotografiert werden, um gleiche Voraussetzungen für einen direkten Vergleich der Zellen in unterschiedlichen Präparaten zu ermöglichen. Das Programm VisiView diente der Steuerung von Funktionen am Fluoreszenzmikroskop.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis des LIF-Rezeptorkomplexes

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der LIF Rezeptorkomplex, bestehend aus den beiden Untereinheiten LIF-Rezeptor (LIFR) und Glykoprotein 130 (gp130), in immortalisierten humanen und murinen Podozyten auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Gleichzeitig wurde der Einfluss von LIF auf die Änderung der Expression der einzelnen Untereinheiten in murinen Podozyten untersucht. Für die Stimulation der immortalisierten Podozyten kam rekombinantes LIF (gelöst in PBS) von Sigma zum Einsatz.

Die Zellen wurden hierzu wie in 2.2.1 beschrieben kultiviert und ausdifferenziert. Parallel zur LIF-Stimulation (10 ng/ml) für 2 h, 4 h und 8 h wurde für jede Stimulationsdauer eine Negativkontrolle mit PBS mitgeführt. Nach beendeter Stimulation wurde die podozytäre RNA isoliert (siehe 2.2.4) und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.5). Anschließend wurde eine Kontrolle der Arbeitsschritte mittels konventioneller PCR und Semiquantifizierung in der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.2.6). Die Daten sind als relative, normalisierte Ratio der Expression (arbiträre Einheiten) in einem Diagramm dargestellt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sowohl die LIFR- als auch die gp130-mRNA unabhängig von der LIF-Stimulation in humanen (Abb. 3.1) und murinen (Abb. 3.2) Podozyten exprimiert wird.

In humanen Podozyten ist die Expression der LIFR-mRNA nach 2 h unter LIF um den Faktor $1,44 \pm 0,35$ ($p = 0,09$), nach 4 h um den Faktor $1,04 \pm 0,17$ ($p = 0,65$) und nach 8 h um den Faktor $0,79 \pm 0,24$ ($p = 0,18$) von der Expression in der Negativkontrolle verschieden. Für die gp130-mRNA konnte in den humanen Podozyten nach 2 h eine relative Expression von Faktor $1,41 \pm 0,33$ ($p = 0,09$), nach 4 h von Faktor $0,98 \pm 0,16$ ($p = 0,85$) und nach 8 h Faktor $0,83 \pm 0,22$ ($p = 0,22$) unter LIF-Stimulation gemessen werden.

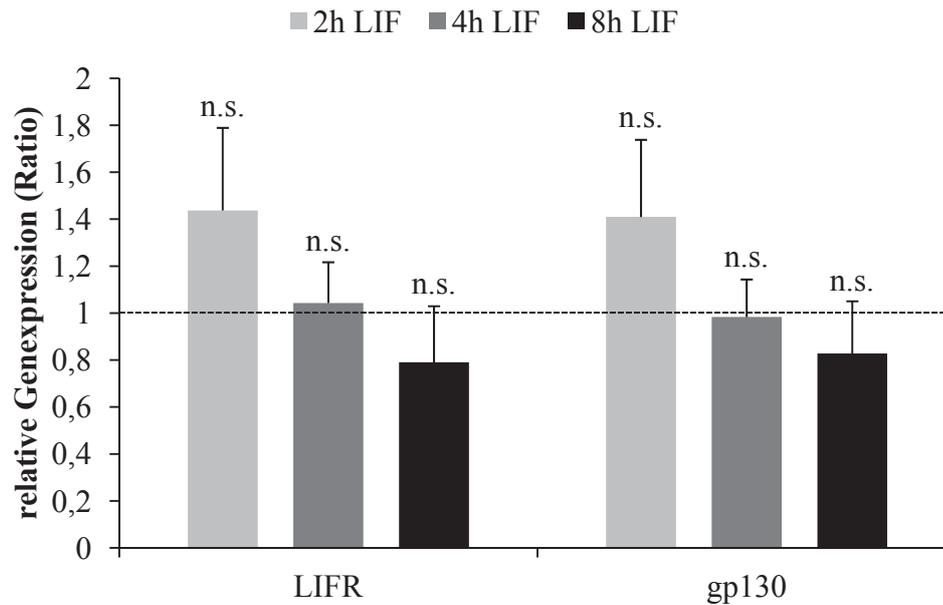


Abb. 3.1: Zeitabhängige mRNA-Expression der LIF-Rezeptor-Untereinheiten LIFR und gp130 in immortalisierten humanen Podozyten unter LIF. Stimulation mit 10 ng/ml LIF (Negativkontrollen mit PBS) in Serum-freiem Medium für 2h, 4h und 8h. Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Linke Seite: LIFR. Rechte Seite: gp130. Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 4).

Es stellt sich heraus, dass die Expression der LIFR-mRNA in murinen Podozyten nach 2 h unter Stimulation mit LIF im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS um den Faktor $0,65 \pm 0,24$ ($p = 0,06$) und nach 4 h um den Faktor $0,87 \pm 0,32$ ($p = 0,47$) reduziert ist. Unter achtstündiger LIF-Stimulation kann die Expression der LIFR-mRNA im Vergleich zur 2 h-Stimulation durchschnittlich verdoppelt werden und liegt beim $1,20 \pm 0,47$ -fachen ($p = 0,45$) der Negativkontrolle. Die mRNA-Expression der signalübertragenden Rezeptoruntereinheit gp130 ist in den murinen Podozyten bereits nach 2 h LIF-Stimulation um den Faktor $1,83 \pm 0,93$ ($p = 0,17$) höher als in der Negativkontrolle. Im Verlauf der längeren Stimulationsdauer nimmt die gp130-mRNA-Expression langsam ab und ist nach 4 h um den Faktor $1,49 \pm 0,40$ ($p = 0,09$) und nach 8 h noch um den Faktor $1,27 \pm 0,30$ ($p = 0,17$) erhöht. Diese Veränderungen sind jedoch statistisch nicht signifikant.

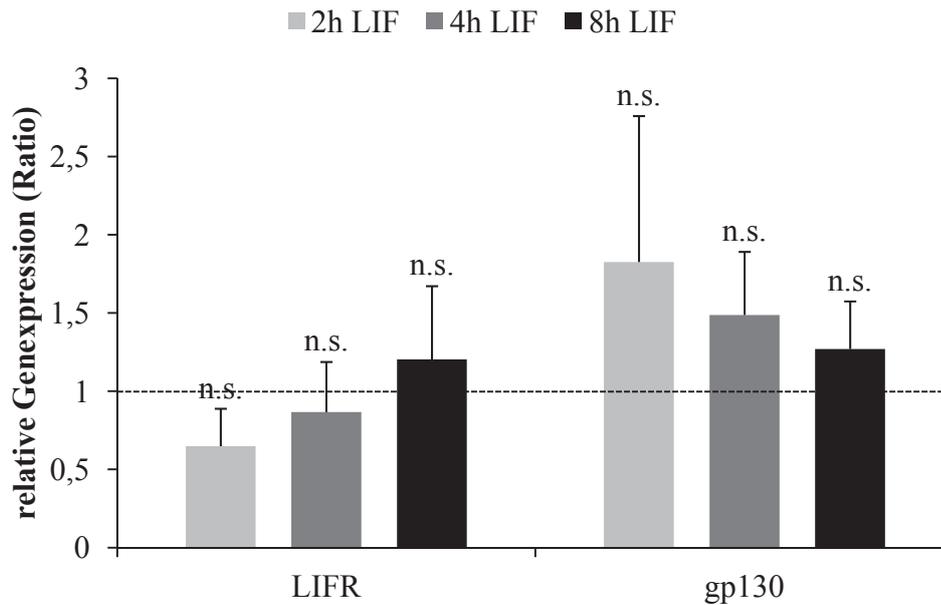


Abb. 3.2: Zeitabhängige mRNA-Expression der LIF-Rezeptor-Untereinheiten LIFR und gp130 in immortalisierten murinen Podozyten unter LIF. Stimulation mit 10 ng/ml LIF (Negativkontrollen mit PBS) in Serum-freiem Medium für 2h, 4h und 8h. Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Linke Seite: LIFR. Rechte Seite: gp130. Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 4).

Nachdem der Nachweis der Expression des LIF-Rezeptors bereits auf RNA-Ebene erfolgt ist, soll nun die Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Stimulation mit LIF eine Auswirkung auf Expression und/oder Lokalisation des Rezeptors hat. Die Kultivierung der Podozyten erfolgte hierzu bis zur Ausdifferenzierung wie in 2.2.1 beschrieben auf Deckgläsern in 12 Well Zellkulturplatten. Humane und murine immortalisierte Podozyten wurden mit 10 ng/ml LIF in einer Zeitkinetik von 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. stimuliert. Darüber hinaus wurde eine mit PBS inkubierte Negativkontrolle jeweils mit (*ohne LIF*) und ohne (*neg. Kontrolle ohne LIF*) Primärantikörper-Inkubation mitgeführt. Die anschließenden Färbungen wurden nach beendeter Stimulation wie in 2.2.10 beschrieben durchgeführt, gefolgt von der Immunfluoreszenzmikroskopie. Dabei konnte unabhängig von der LIF-Stimulationsdauer in beiden Zelllinien das Vorhandensein der LIF-bindenden transmembranären Rezeptoruntereinheit (LIFR, grüne Fluoreszenz) ohne Änderung von Expressionsintensität und intrazellulärer Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 3.3).

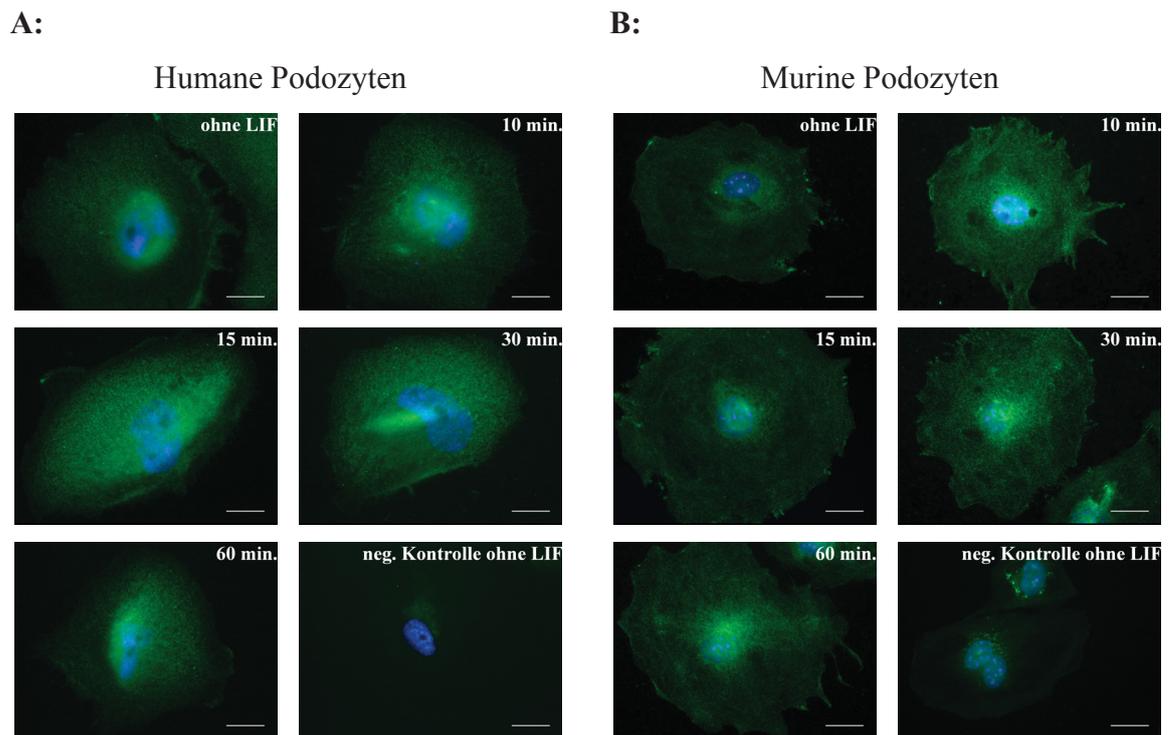


Abb. 3.3: Repräsentative Aufnahmen der LIF-Rezeptor-Untereinheit von immortalisierten Podozyten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nach zeitabhängiger Stimulation mit LIF. Stimulation der humanen (A) und murinen (B) Podozyten mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. Inkubation der Negativkontrollen mit PBS mit (*ohne LIF*) und ohne (*neg. Kontrolle ohne LIF*) Primärantikörper-Inkubation. Färbung mit anti-LIFR (H-220) / anti-Kaninchen Alexa Fluor[®] 488 (grüne Fluoreszenz); DAPI Kernfärbung (blaue Fluoreszenz). Aufnahmen mit Filtersatz 38 HE eGFP shift free (grün; Expositionszeit 2.000 ms) und Filtersatz 49 DAPI shift free (blau; Expositionszeit 500 ms für murine Podozyten, 200 ms für humane Podozyten) in 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Maßstab 20 μ m.

3.1.1 Expression von LIF und CNTF in murinen Podozyten

Zusätzlich wurde der Einfluss der LIF-Stimulation für einen längeren Zeitraum auf die endogene LIF- und Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)-mRNA-Expression in immortalisierten murinen Podozyten untersucht. Zum einen sollte damit herausgefunden werden, ob die Gegenwart von LIF in Podozyten einen regulatorischen Effekt im Sinne eines endogenen Feedbackmechanismus mit autokriner oder parakriner LIF-mRNA-Expression auslöst und zum anderen ob auch ein Effekt auf andere IL-6-Familienmitglieder wie die CNTF-mRNA-Expression existiert. Hierzu wurden die Podozyten wie im Methodenteil beschrieben vorbereitet, mit 10 ng/ml LIF für 2 h, 4 h und 8 h stimuliert und nach der RNA-Isolierung und Reversen Transkription in der Real Time PCR analysiert.

Die relative LIF-mRNA-Expression zeigt mit einer Standardabweichung von $1,00 \pm 0,55$ nach 2 h LIF-Stimulation ($p = 1,00$) keinen Unterschied zur Negativkontrolle mit PBS. Eine wesentliche Änderung des Expressionsniveaus kann durch die Stimulation mit LIF über einen längeren Zeitraum nicht festgestellt werden (Abb. 3.4), nach 4 h liegt eine Reduktion um den Faktor $0,90 \pm 0,26$ ($p = 0,50$) und nach 8 h um den Faktor $0,95 \pm 0,24$ ($p = 0,72$) vor.

In der CNTF-mRNA kann ebenfalls kein Expressionsunterschied zur Negativkontrolle gemessen werden. Es zeigt sich eine relative Expression um den Faktor $0,99 \pm 0,33$ ($p = 0,96$) für die zweistündige, um den Faktor $0,93 \pm 0,43$ ($p = 0,75$) für die vierstündige und um den Faktor $1,02 \pm 0,18$ ($p = 0,84$) für die achtstündige LIF-Stimulation.

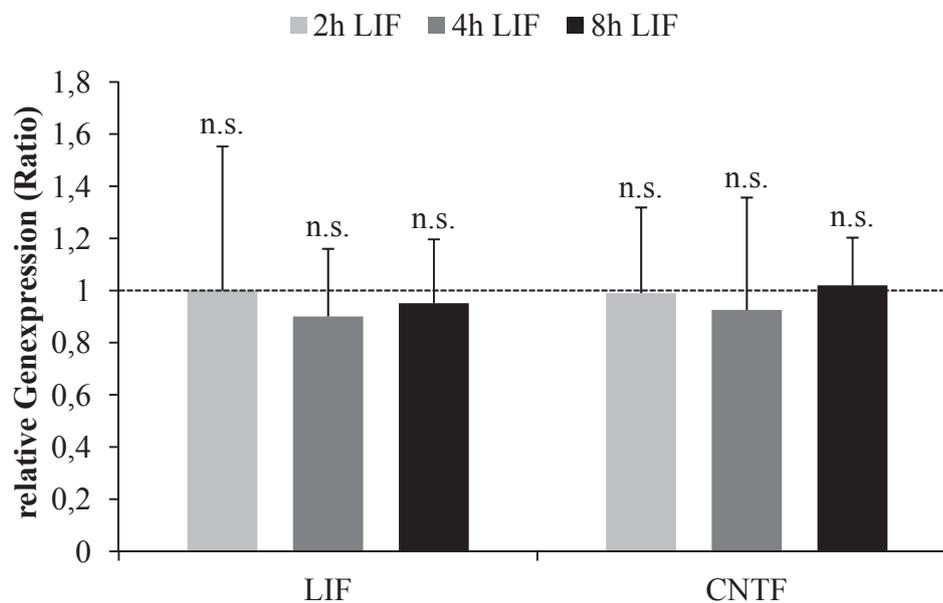


Abb. 3.4: Zeitabhängige Expression der LIF- und CNTF-mRNA in immortalisierten murinen Podozyten unter LIF. Stimulation mit 10 ng/ml LIF (Negativkontrollen mit PBS) in Serum-freiem Medium für 2h, 4h und 8h. Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Linke Seite: LIF. Rechte Seite: CNTF. Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 4$).

3.2 LIF in der podozytären Signaltransduktion und Genregulation

Der nächste Teil dieser Arbeit besteht aus Untersuchungen von immortalisierten humanen und murinen Podozyten zum Einfluss von LIF auf die Signaltransduktion und die Änderung der Genexpression. Die Zellen wurden wie in 2.2.1 beschrieben kultiviert und ausdifferenziert. Um zu beweisen, dass die zugeführten Stimulanzen und Inhibitoren für die Reaktionen verantwortlich waren, wurde in jedem Versuch eine Negativkontrolle mit den jeweiligen Lösungsmitteln inkubiert.

Nach Isolation von Proteinen aus den stimulierten Podozyten (2.2.2) wurden diese im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert (2.2.3). Für die relative Quantifizierung der Protein-Phosphorylierung wurden die densitometrisch gemessenen Werte für die Menge an Phospho-Protein ins Verhältnis gesetzt zu den Werten für die Menge an Gesamt-Protein. Im Anschluss wurden diese berechneten Quotienten auf die Negativkontrolle normalisiert, welcher die Einheit eins zugeordnet wurde. Die Negativkontrolle diente als Ausgangswert für den Vergleich des Phosphorylierungsniveaus, da hier kein Effekt der Agenzien erwartet wurde und somit maximal die Grundphosphorylierung der Zielproteine sichtbar war.

Für die Untersuchung von Genexpressionen wurde nach der Isolierung der RNA (2.2.4) und dem Umschreiben in cDNA (2.2.5) mit der Kontroll-PCR (2.2.6) eine Analyse mittels Real Time PCR (2.2.8) durchgeführt.

Für die statistische Auswertung wurde der t-Test nach *Student* herangezogen. Zuvor wurde das Signifikanzniveau festgelegt. Signifikante Unterschiede in der Phosphorylierung beziehungsweise Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle bestanden bei einem $p \leq 0,05$.

3.2.1 ERK1/2 (p44/p42-MAPK)-Signaltransduktion

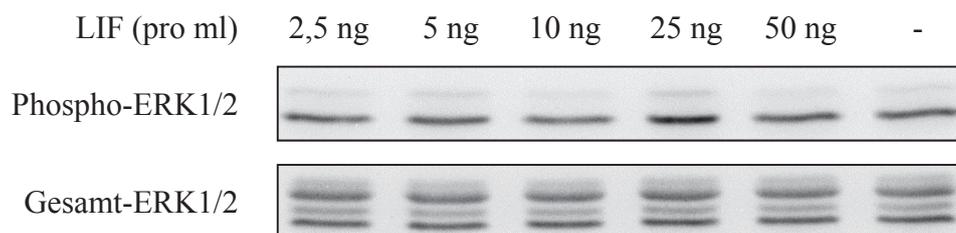
Als Erstes wurde der Effekt von LIF auf die ERK1/2 (p44/p42-MAPK)-Signaltransduktion in immortalisierten humanen und murinen Podozyten untersucht. In einer Konzentrationskinetik wurden die Zellen zunächst für 15 Minuten mit 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml LIF stimuliert um auszutesten, bei welcher Konzentration die maximale ERK1/2-Aktivierung zu messen ist.

Humane Podozyten: ERK1/2-Signalkaskade

Konzentrationskinetik

In humanen Podozyten (Abb. 3.5) konnte durch Zugabe von 2,5 ng/ml LIF im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS keine Steigerung des Phosphorylierungsniveaus (Faktor $0,99 \pm 0,14$ ($p = 0,96$)) nachgewiesen werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade durch Stimulation mit höheren Konzentrationen von 5 ng/ml LIF auf das $1,15 \pm 0,10$ -Fache ($p = 0,12$), bei 10 ng/ml LIF auf das $1,21 \pm 0,34$ -Fache ($p = 0,40$) und durch 25 ng/ml LIF maximal um ein $1,46 \pm 0,41$ -Faches ($p = 0,19$) gegenüber der Negativkontrolle gesteigert werden kann. Bei 50 ng/ml LIF zeigte sich hingegen nur noch eine geringe ERK1/2-Aktivierung (Faktor $1,09 \pm 0,11$ ($p = 0,31$)).

A:



B:

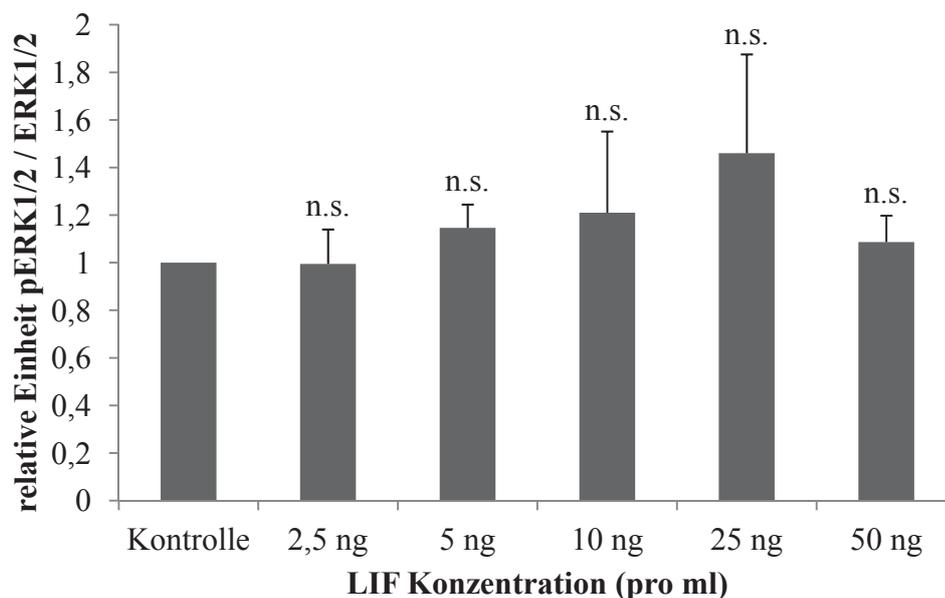


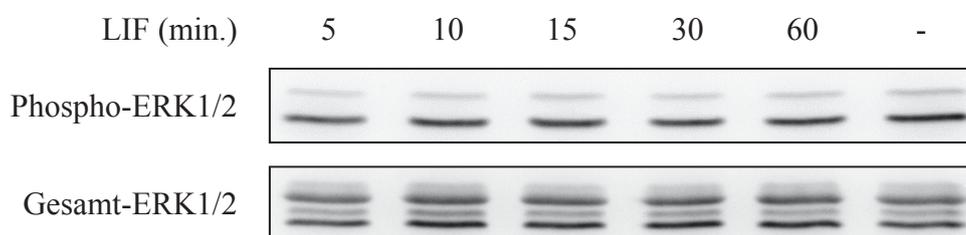
Abb. 3.5: Konzentrationskinetik der ERK1/2-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Untere Zeile: Gesamt-ERK1/2. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

Zeitkinetik

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade in den immortalisierten Podozyten durch Stimulation mit LIF existiert. Hierfür wurden die Podozyten mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. stimuliert. Für die Stimulation wurde die niedrigste aktivierende Dosis aus der Konzentrationskinetik gewählt, um möglichst im physiologischen Bereich zu bleiben.

In humanen Podozyten konnte in der statistischen Auswertung von drei Versuchen nur nach 15 minütiger LIF-Stimulation eine Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung um den Faktor $1,21 \pm 0,40$ ($p = 0,46$) im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS gemessen werden. Dieser geringe Effekt spiegelt sich bei Betrachtung der Banden im Western Blot nicht wider (Abb. 3.6). Während die LIF-Stimulation nach 5 Minuten (Faktor $0,91 \pm 0,44$ ($p = 0,75$)), 10 Minuten (Faktor $0,94 \pm 0,29$ ($p = 0,76$)) und 30 Minuten (Faktor $0,90 \pm 0,17$ ($p = 0,39$)) kaum Unterschiede im Phosphorylierungsniveau zur Negativkontrolle zeigte, sank die ERK1/2-Phosphorylierung nach 60 minütiger Stimulation mit LIF ab auf das $0,79 \pm 0,13$ -Fache ($p = 0,11$) der Negativkontrolle.

A:



B:

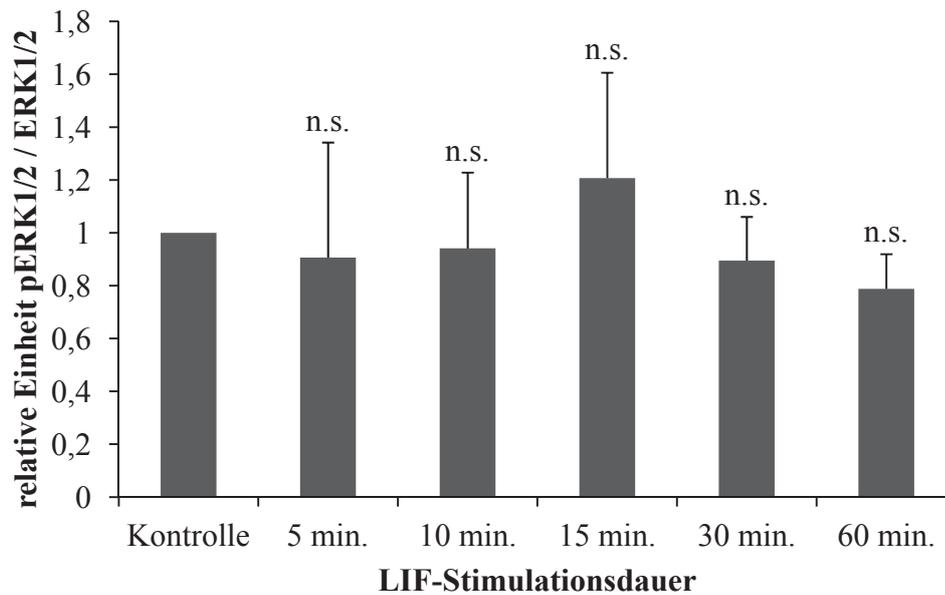
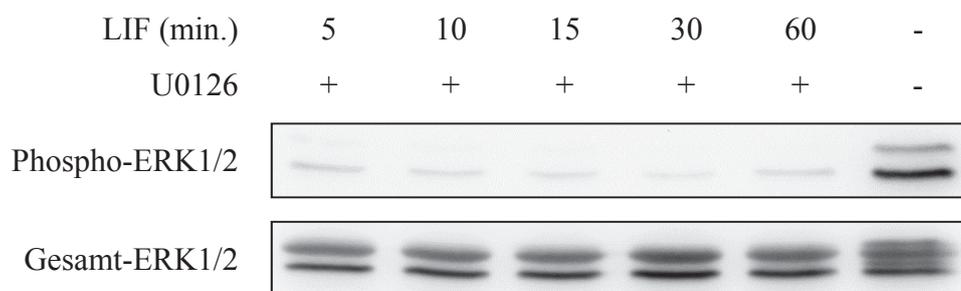
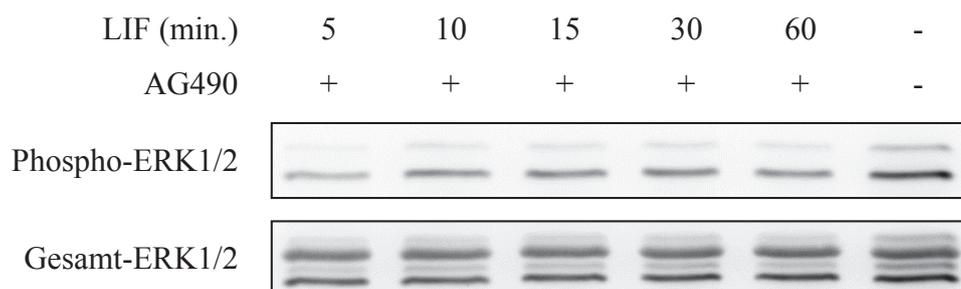


Abb. 3.6: Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Untere Zeile: Gesamt-ERK1/2. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

Differenzierung der Signalübertragung

Anschließend sollte untersucht werden, ob die LIF-abhängige zu einer direkten Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen führt oder ob diese über Umwege über andere Signalkaskaden, sogenannten „Crosstalk“ passiert. Hierfür wurden verschiedene Hauptsignalwege durch etablierte pharmakologische Inhibitoren gehemmt. Folgende Inhibitoren wurden verwendet: U0126 (10 μ M, gelöst in DMSO), AG490 (500 μ M, gelöst in DMSO), beide von Calbiochem (Darmstadt), und LY294002 (25 μ M, gelöst in Ethanol) von Alomone Labs (Jerusalem, Israel). U0126 unterbindet die Aktivierung von ERK1/2 durch spezifische Inhibition der vorgeschalteten MEK1/2 (MAPKK)-Kinasen. AG490 unterbricht als Inhibitor der Rezeptor-assoziierten Januskinase-2 die STAT3-Signalkaskade. Die Signalübertragung durch AKT wird gehemmt durch den PI3-Kinase-Inhibitor LY294002.

Die zeitabhängige Stimulation der immortalisierten humanen Podozyten für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. erfolgte mit 10 ng/ml LIF nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor. Eine Negativkontrolle wurde mit PBS und DMSO bzw. Ethanol inkubiert, um mögliche Effekte der Lösungsmittel auszuschließen. Die Ergebnisse im Western Blot sind nach Inkubation mit den spezifischen Antikörpern Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und Gesamt-ERK1/2 in Abbildung 3.7 dargestellt. Dabei zeigte sich nach Koinkubation mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 im Vergleich zur Negativkontrolle eine nahezu komplette und von der LIF-Stimulationsdauer unabhängige Minderung der ERK1/2-Aktivierung. Eine Blockierung der ERK1/2-Phosphorylierung war hingegen durch Koinkubation mit AG490 oder LY294002 nicht möglich.

A:**B:**

C:

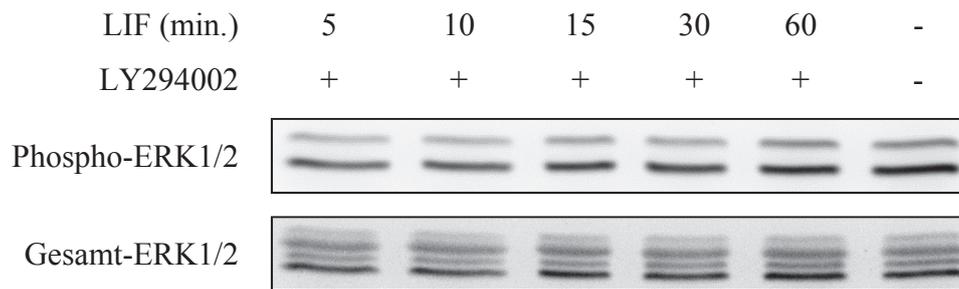


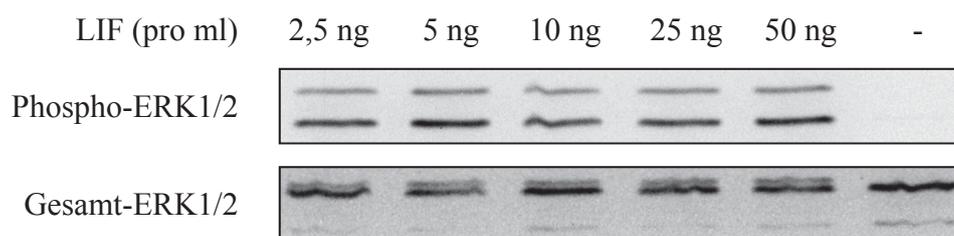
Abb. 3.7: Auswirkung von Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren auf die zeitabhängige ERK1/2-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit LIF. Dargestellt sind die Banden im Western Blot. Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor. Die mit PBS stimulierte Negativkontrolle wurde 30 Minuten vorher mit dem Lösungsmittel des Inhibitors inkubiert. A: Vorinkubation mit 10 μ M U0126. B: Vorinkubation mit 500 μ M AG490. C: Vorinkubation mit 25 μ M LY294002. Obere Zeile: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Untere Zeile: Gesamt-ERK1/2.

Murine Podozyten: ERK1/2-Signalkaskade

Konzentrationskinetik

In murinen Podozyten wurde bei gleichem Versuchsaufbau in der konzentrationsabhängigen Stimulation mit LIF nach 15 Minuten bereits nach Zugabe der geringsten Konzentration von 2,5 ng/ml LIF eine Verdoppelung der ERK1/2-Phosphorylierung um den Faktor $2,06 \pm 0,82$ ($p = 0,15$) im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen. Diese nahm bei Stimulation mit 5 ng/ml LIF weiter auf das $2,63 \pm 0,78$ -Fache ($p = 0,07$) der Negativkontrolle zu und erreichte bei 10 ng/ml eine signifikante Steigerung um den Faktor $2,75 \pm 0,46$ ($p = 0,02$). Höhere Konzentrationen führten zu weiteren signifikanten Zunahmen der Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen um den Faktor $2,78 \pm 0,37$ ($p = 0,01$) bei Stimulation mit 25 ng/ml LIF und um den Faktor $3,21 \pm 0,67$ ($p = 0,03$) bei Verwendung von 50 ng/ml LIF. Abbildung 3.8 illustriert diese Ergebnisse in einem Diagramm und zeigt einen repräsentativen Western Blot zu den Daten.

A:



B:

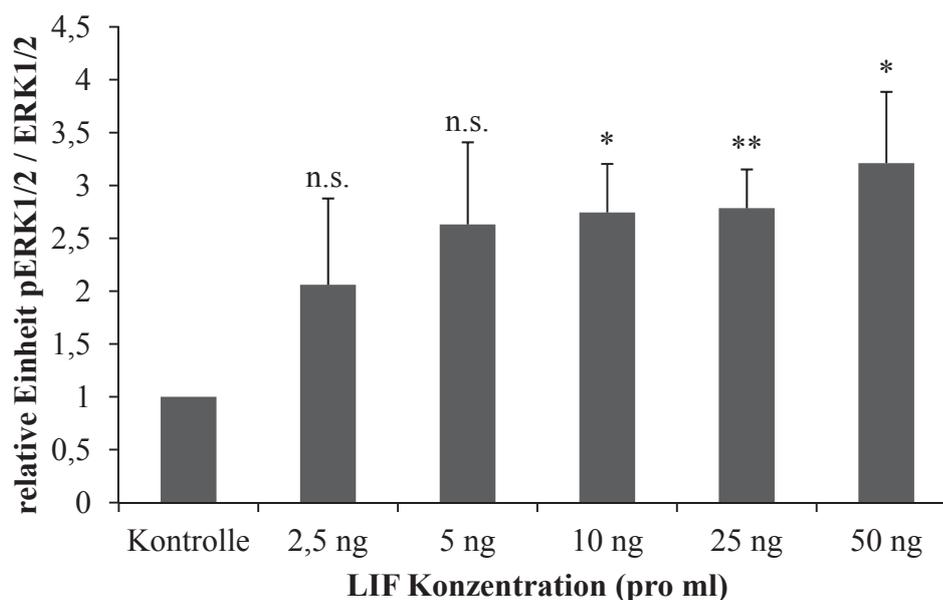


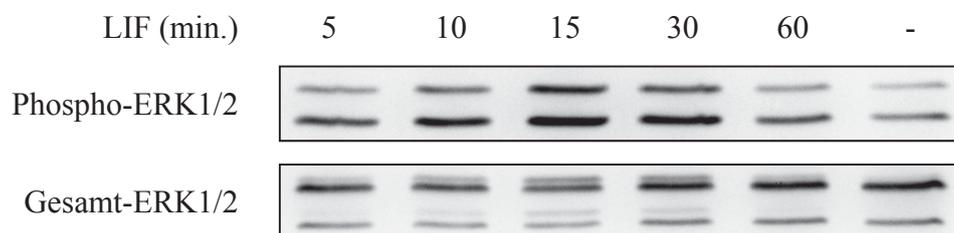
Abb. 3.8: Konzentrationskinetik der ERK1/2-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Untere Zeile: Gesamt-ERK1/2. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 3$).

Zeitkinetik

Nach zeitabhängiger Stimulation von murinen Podozyten (Abb. 3.9) wurde im Vergleich zu humanen Podozyten ein stärkerer Effekt von LIF (10 ng/ml) auf die ERK1/2-Signalkaskade beobachtet. Bereits nach 5 Minuten konnte in murinen Podozyten durch die Zugabe von LIF in oben genannter Konzentration die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS um

den Faktor $1,57 \pm 0,40$ ($p = 0,06$) gesteigert werden. Nach weiterem Anstieg um den Faktor $1,63 \pm 0,64$ ($p = 0,15$) nach 10 minütiger Stimulation, konnte nach 15 Minuten eine signifikante Aktivitätssteigerung auf das $2,45 \pm 0,90$ -Fache ($p = 0,05$) der Negativkontrolle erzielt werden. Im weiteren Verlauf der Stimulationsdauer ging das ERK1/2-Phosphorylierungsniveau nach diesem Maximum wieder langsam zurück. Bei 30 minütiger LIF-Stimulation lag die Aktivierung noch auf dem $2,07 \pm 0,44$ -Fachen ($p = 0,02$) der Negativkontrolle und nach 60 Minuten nur noch bei Faktor $1,27 \pm 0,17$ ($p = 0,05$).

A:



B:

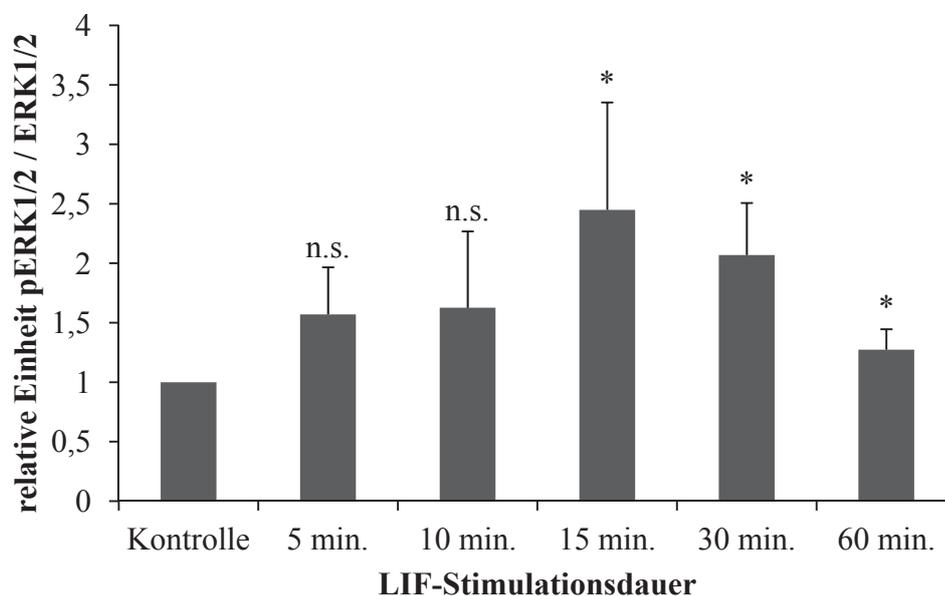


Abb. 3.9: Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Untere Zeile: Gesamt-ERK1/2. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq$

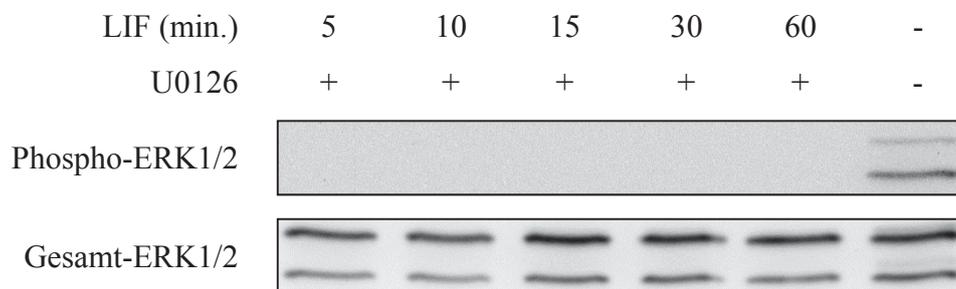
0,05 im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 4).

Differenzierung der Signalübertragung

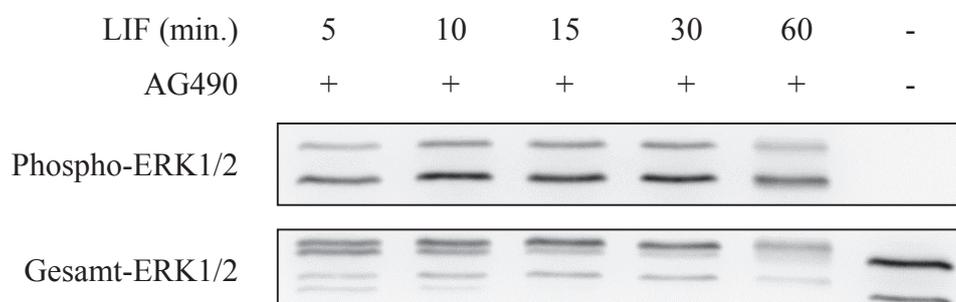
Die zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2-Kinasen durch LIF konnte in immortalisierten murinen Podozyten durch Koinkubation mit dem MEK1/2-Inhibitor spezifisch blockiert werden (Abb. 3.10). In dieser Versuchsreihe wurden die gleichen Inhibitoren wie für die immortalisierten humanen Podozyten eingesetzt.

Nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor wurden die murinen Podozyten für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. mit 10 ng/ml LIF stimuliert. Eine Negativkontrolle wurde mit PBS und DMSO bzw. Ethanol inkubiert. Während die Koinkubation mit dem Inhibitor AG490 beziehungsweise LY294002 keine Minderung der LIF-abhängigen ERK1/2-Aktivierung induzieren konnte, wurde nach Koinkubation mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 eine vollständige Aktivitätsminderung der ERK1/2-Kinasen im Western Blot erreicht.

A:



B:



C:

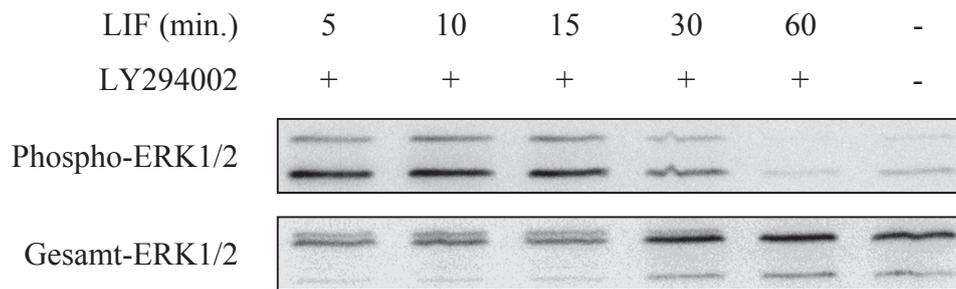


Abb. 3.10: Auswirkung von Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren auf die zeitabhängige ERK1/2-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit LIF. Dargestellt sind die Banden im Western Blot. Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor. Die mit PBS stimulierte Negativkontrolle wurde 30 Minuten vorher mit dem Lösungsmittel des Inhibitors inkubiert. A: Vorinkubation mit 10 μ M U0126. B: Vorinkubation mit 500 μ M AG490. C: Vorinkubation mit 25 μ M LY294002. Obere Zeile: Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Untere Zeile: Gesamt-ERK1/2.

3.2.2 PI3K/AKT (PKB)-Signaltransduktion

Im Anschluss wurde die LIF-abhängige Aktivierung der PI3K/AKT (PKB)-Kaskade in immortalisierten humanen und murinen Podozyten untersucht. Dabei wurde zunächst, ähnlich wie für den ERK1/2-Signalweg, eine Stimulation der Podozyten mit verschiedenen Konzentrationen LIF in aufsteigender Reihe durchgeführt, um herauszufinden welche LIF-Konzentration die stärkste Aktivierung der Signalkaskade hervorruft.

In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass für die Aktivierung des AKT-Signalweges in humanen Podozyten sehr niedrige Konzentrationen ausreichen. Diese Daten werden hier nicht aufgeführt.

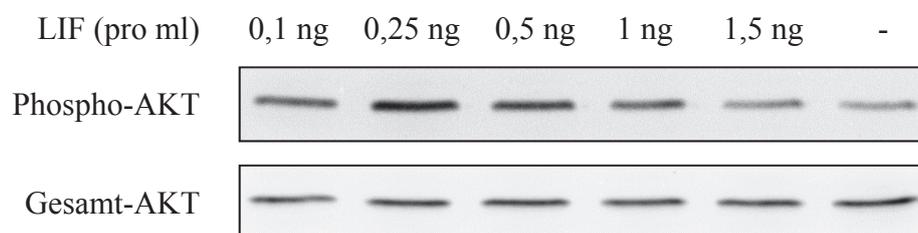
Humane Podozyten: PI3K/AKT (PKB)-Signalkaskade

Konzentrationskinetik

Abbildung 3.11 veranschaulicht die Ergebnisse für die Stimulation humaner Podozyten mit 0,1 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml und 1,5 ng/ml LIF für 15 Minuten. Bei Stimulation mit der niedrigsten LIF Konzentration von 0,1 ng/ml stieg die AKT-Phosphorylierung bereits signifikant auf das Doppelte der Negativkontrolle mit PBS an (Faktor $2,15 \pm 0,23$ ($p = 0,01$)). Ein noch höherer und signifikanter Anstieg des

Phosphorylierungsgrades um den Faktor $2,53 \pm 0,32$ ($p = 0,01$) konnte durch Stimulation mit 0,25 ng/ml LIF erzielt werden. Weitere Erhöhungen der LIF-Konzentration führten dann zu einem stetigen Rückgang des Phosphorylierungsniveaus, bei 0,5 ng/ml LIF auf Faktor $1,74 \pm 0,32$ ($p = 0,06$) und bei 1 ng/ml LIF auf Faktor $1,59 \pm 0,16$ ($p = 0,02$). Nach Stimulation mit 1,5 ng/ml LIF war die AKT-Aktivierung im Vergleich zur Zugabe von 0,25 ng/ml LIF nur noch halb so stark (Faktor $1,23 \pm 0,21$ ($p = 0,19$)).

A:



B:

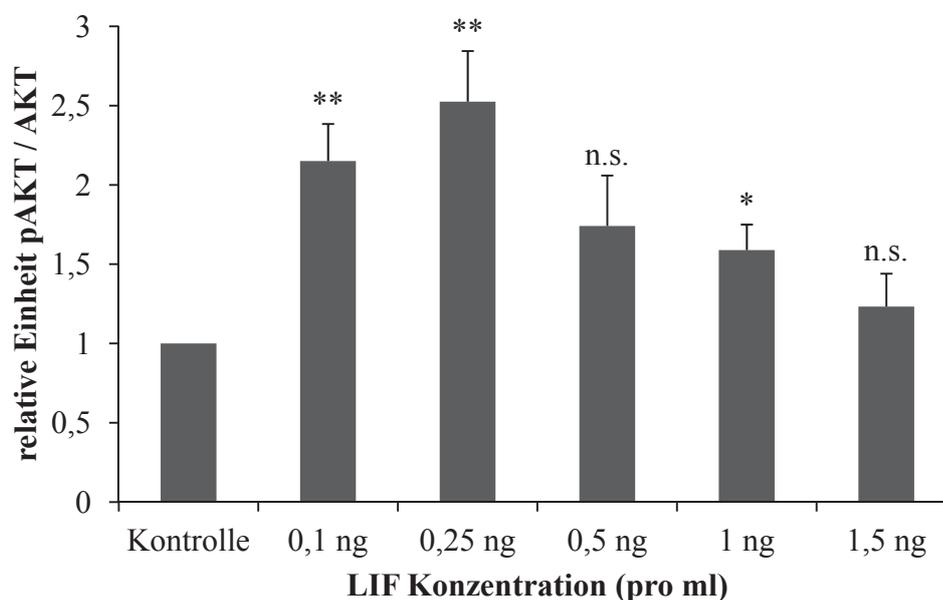
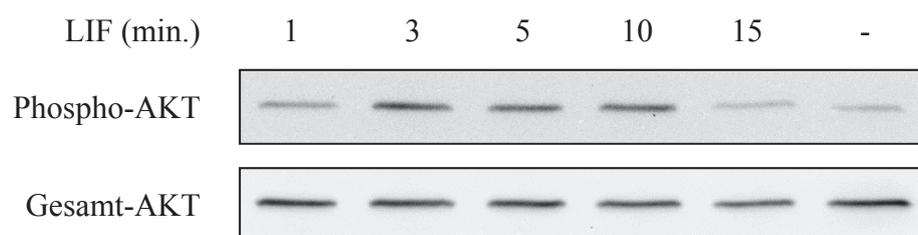


Abb. 3.11: Konzentrationskinetik der AKT-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-AKT (Ser473). Untere Zeile: Gesamt-AKT. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-AKT zu Gesamt-AKT als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 3$).

Zeitkinetik

Im nächsten Schritt wurden die immortalisierten Podozyten unter Verwendung einer konstanten LIF-Konzentration in unterschiedlicher Dauer stimuliert.

Wegen schlechter Handhabung der sehr geringen LIF-Konzentrationen, die zu der starken Aktivierung der AKT-Signalkaskade führten (Abb. 3.11), wurden die humanen Podozyten hierzu mit LIF in einer Konzentration von 1 ng/ml stimuliert. Aus Vorversuchen, die hier nicht gezeigt werden, ging hervor, dass der AKT-Signalweg in humanen Podozyten bereits nach sehr kurzer Stimulationsdauer aktiviert wird. Aus diesem Grund wurden sie mit 1 ng/ml LIF für 1 min., 3 min., 5 min., 10 min. und 15 min. stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 veranschaulicht. Nach nur einer Minute stieg die Intensität der AKT-Phosphorylierung im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS signifikant um den Faktor $1,40 \pm 0,07$ an ($p = 0,002$). Über einen weiteren signifikanten Anstieg um den Faktor $1,54 \pm 0,27$ ($p = 0,03$) nach 3 minütiger LIF-Stimulation, erreichte die Aktivierung der AKT-Signalübertragung nach 5 Minuten ein signifikantes Maximum von Faktor $1,72 \pm 0,32$ ($p = 0,02$) und nach 10 Minuten von Faktor $1,69 \pm 0,42$ ($p = 0,04$). Nach 15 Minuten war das Phosphorylierungsniveau im Vergleich zur Negativkontrolle noch immer $1,29 \pm 0,05$ -fach ($p = 0,001$) höher.

A:

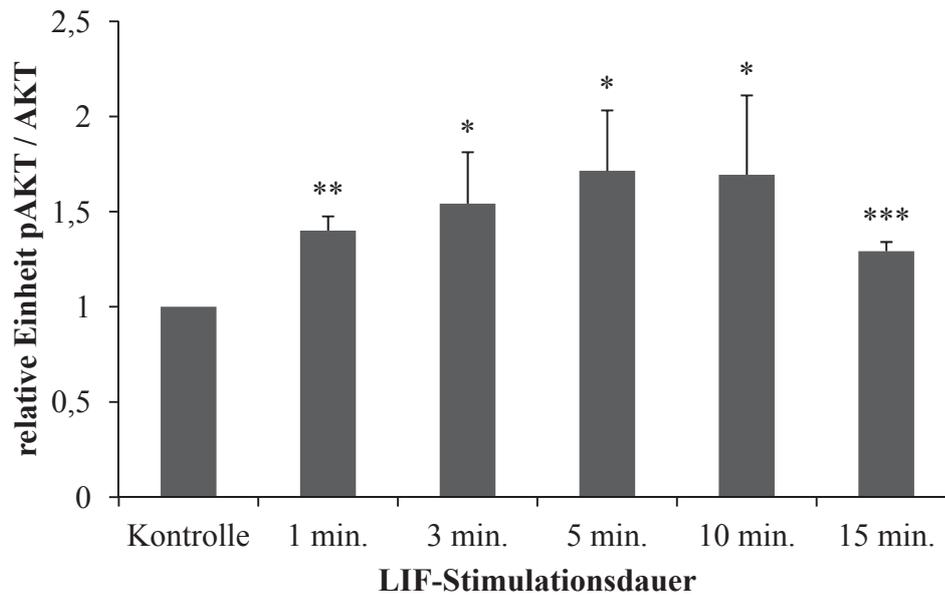
B:

Abb. 3.12: Zeitkinetik der AKT-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit 1 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-AKT (Ser473). Untere Zeile: Gesamt-AKT. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-AKT zu Gesamt-AKT als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, *** = $p \leq 0,001$ im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 4$).

Differenzierung der Signalübertragung

Im Anschluss wurde untersucht, ob eine Inhibition der zeitabhängigen Aktivierung des AKT-Signalweges in immortalisierten Podozyten möglich war. Dazu wurden die in 3.2.1 beschriebenen Inhibitoren in angegebener Konzentration eingesetzt.

Humane Podozyten wurden nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor mit 1 ng/ml LIF für 1 min., 3 min., 5 min., 10 min. und 15 min. stimuliert. Die Negativkontrolle wurde wie in 3.1.1 beschrieben mit den jeweiligen Lösungsmitteln inkubiert. Während die LIF-abhängige AKT-Phosphorylierung mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 (10 μ M) und dem JAK-2-Inhibitor AG490 (500 μ M) nicht gehemmt werden konnte, war sie durch Koinkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (25 μ M) vollständig aufhebbar. Diese Effekte sind in Abbildung 3.13 im Western Blot dargestellt.

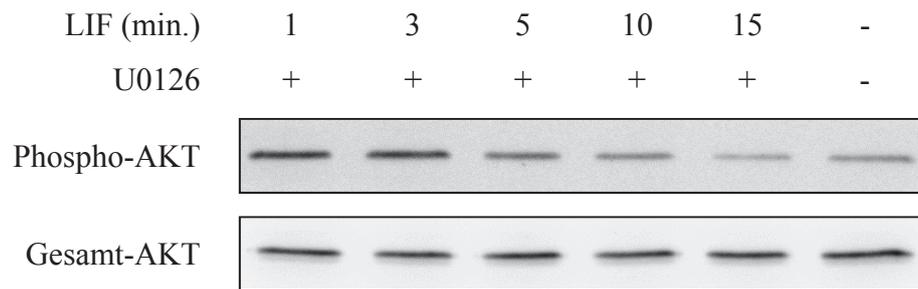
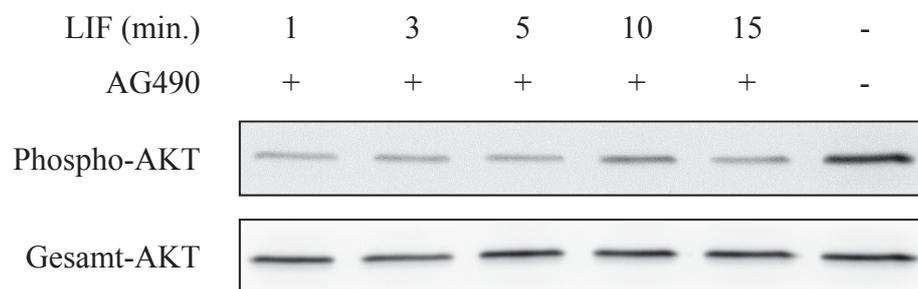
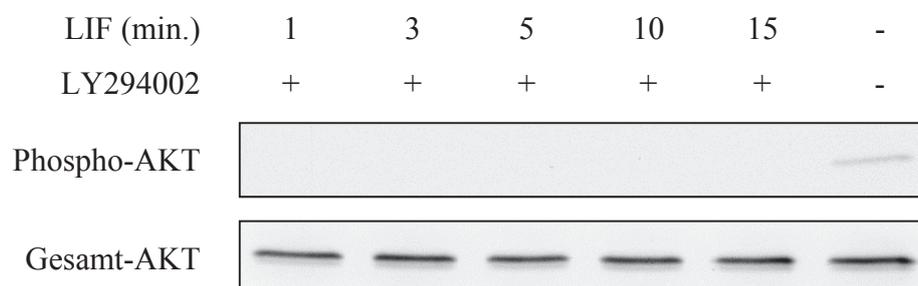
A:**B:****C:**

Abb. 3.13: Auswirkung von Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren auf die zeitabhängige AKT-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit LIF. Dargestellt sind die Banden im Western Blot. Stimulation mit 1 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 1 min., 3 min., 5 min., 10 min. und 15 min. nach 30-minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor. Die mit PBS stimulierte Negativkontrolle wurde 30 Minuten vorher mit dem Lösungsmittel des Inhibitors inkubiert. A: Vorinkubation mit 10 μ M U0126. B: Vorinkubation mit 500 μ M AG490. C: Vorinkubation mit 25 μ M LY294002. Obere Zeile: Phospho-AKT (Ser473). Untere Zeile: Gesamt-AKT.

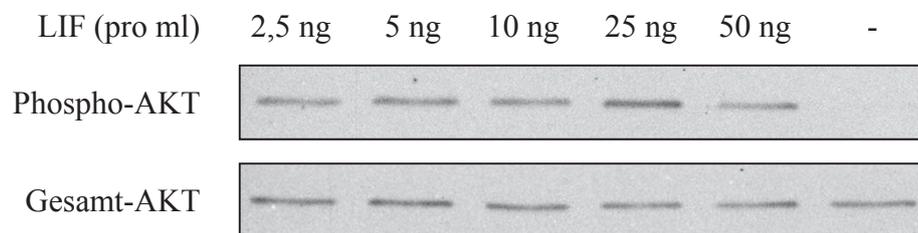
Murine Podozyten: PI3K/AKT (PKB)-Signalkaskade

Konzentrationskinetik

Die konzentrationsabhängige Stimulation von murinen Podozyten erfolgte mit 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml LIF für 15 Minuten (Abb. 3.14).

Dabei zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS eine Erhöhung der AKT-Phosphorylierung um den Faktor $1,45 \pm 0,48$ ($p = 0,24$) nach Stimulation mit 2,5 ng/ml LIF. Nach Zugabe von 5 ng/ml LIF konnte eine signifikante Steigerung der AKT-Phosphorylierung um den Faktor $1,48 \pm 0,20$ ($p = 0,02$) gemessen werden. Unter Verwendung von 10 ng/ml und 25 ng/ml LIF ließen sich weitere Steigerungen auf das $1,66 \pm 0,54$ -Fache für 10 ng/ml ($p = 0,13$) und auf das $1,88 \pm 0,76$ -Fache für 25 ng/ml ($p = 0,15$) beobachten. Nach diesem Höchstwert fiel die Aktivitätssteigerung der AKT-Signalkaskade unter Zugabe von 50 ng/ml LIF wieder auf den Ausgangswert von Faktor $1,50 \pm 0,36$ ($p = 0,09$) zurück.

A:



B:

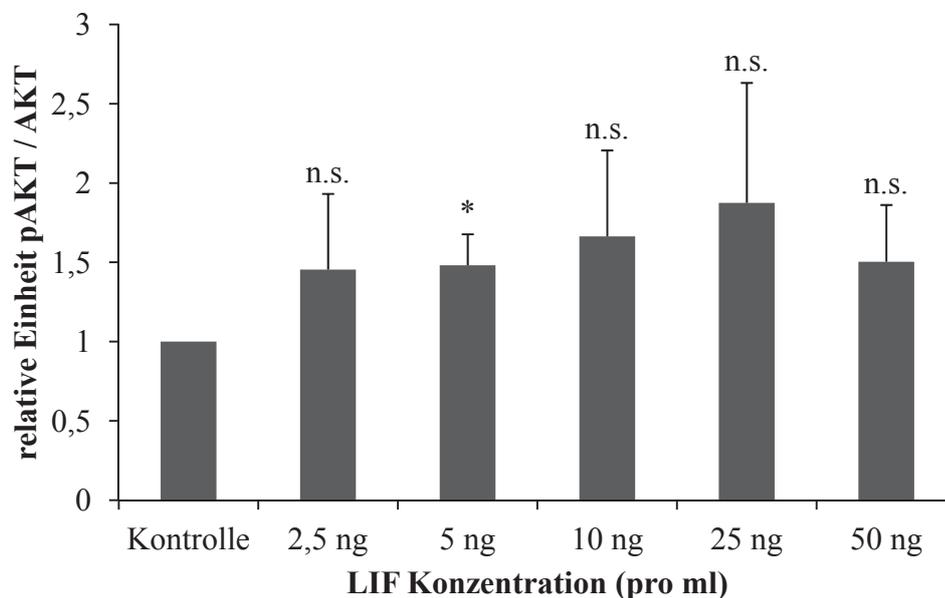


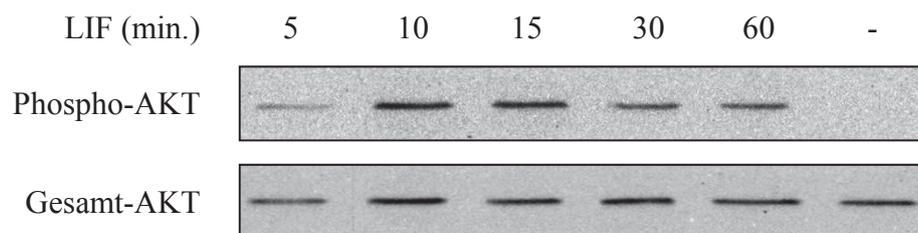
Abb. 3.14: Konzentrationskinetik der AKT-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-AKT (Ser473). Untere Zeile: Gesamt-AKT. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-AKT zu Gesamt-AKT als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische

Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 4).

Zeitkinetik

In murinen Podozyten wurde eine höhere Konzentration für die Aktivierung der AKT-Signalkaskade benötigt. Dies wurde in hier nicht aufgeführten Vorversuchen herausgefunden, in denen es unter Verwendung von 10 ng/ml zu keiner zeitabhängigen Aktivierung der AKT-Signalkaskade kam. Die murinen Podozyten wurden in folgender Versuchsreihe mit je 25 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. stimuliert (Abb. 3.15). Dabei zeigte sich bereits nach 5 Minuten im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS ein signifikanter Anstieg der AKT-Phosphorylierung um Faktor $1,32 \pm 0,09$ ($p = 0,03$). Nach Verdoppelung der Stimulationsdauer auf 10 Minuten konnte das Phosphorylierungsniveau signifikant auf das $1,86 \pm 0,26$ -Fache ($p = 0,03$) gesteigert werden. Eine Verdreifachung der Ausgangs-Stimulationsdauer auf 15 Minuten führte dann zu einem Rückgang der Aktivierung auf das $1,67 \pm 0,45$ -Fache ($p = 0,12$) der Negativkontrolle. Nach längeren Stimulationen von 30 und 60 Minuten Dauer war das Ausgangsniveau von Faktor $1,36 \pm 0,18$ ($p = 0,08$) für 30 Minuten und von Faktor $1,33 \pm 0,35$ ($p = 0,25$) für 60 Minuten wieder erreicht.

A:



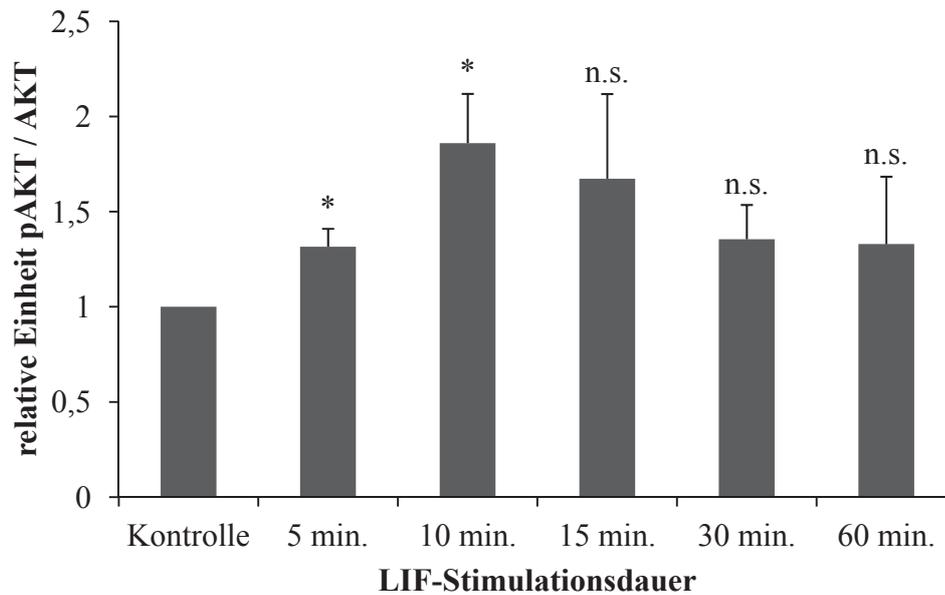
B:

Abb. 3.15: Zeitkinetik der AKT-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit 25 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-AKT (Ser473). Untere Zeile: Gesamt-AKT. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-AKT zu Gesamt-AKT als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

Differenzierung der Signalübertragung

Eine spezifische Hemmung der LIF-abhängigen Aktivierung der AKT-Signalkaskade war in immortalisierten murinen Podozyten durch den PI3K-Inhibitor LY294002 möglich. Für diese Versuchsreihe wurden, wie in 3.2.1 beschrieben, verschiedene Inhibitoren verwendet. Murine Podozyten wurden nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor in einer Zeitkinetik mit 25 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min., und 60 min. stimuliert. Die Negativkontrolle wurde mit den jeweiligen Lösungsmitteln inkubiert. Eine Koinkubation mit dem Inhibitor U0126 beziehungsweise AG490 hatte keinen Effekt auf die LIF-abhängige AKT-Aktivierung. Unter Verwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 konnte die LIF-induzierte AKT-Phosphorylierung jedoch vollständig blockiert werden (Abb. 3.16). Die Gesamt-AKT Bande nach 60 Minuten Koinkubation mit LIF und AG490 war schwach ausgeprägt, da AG490 laut Hersteller apoptotisch auf Zellen wirken kann.

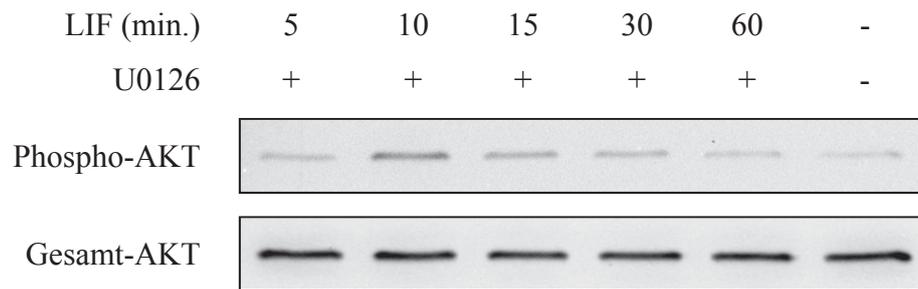
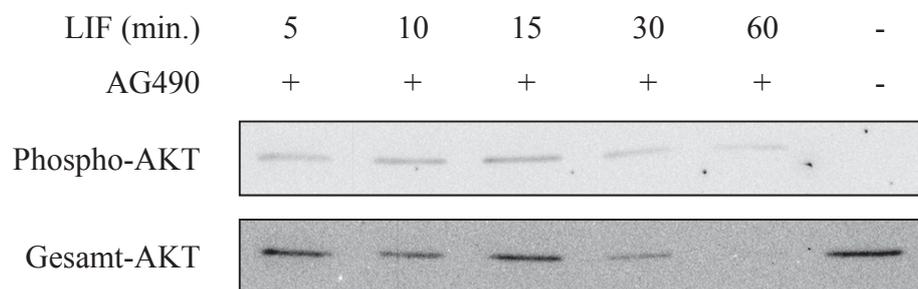
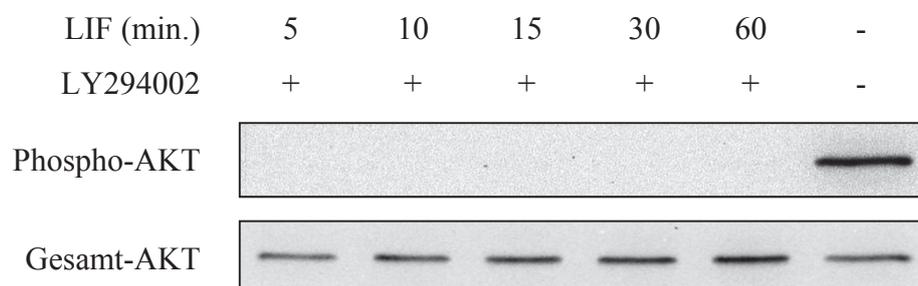
A:**B:****C:**

Abb. 3.16: Auswirkung von Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren auf die zeitabhängige AKT-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit LIF. Dargestellt sind die Banden im Western Blot. Stimulation mit 25 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor. Die mit PBS stimulierte Negativkontrolle wurde 30 Minuten vorher mit dem Lösungsmittel des Inhibitors inkubiert. A: Vorinkubation mit 10 μ M U0126. B: Vorinkubation mit 500 μ M AG490. C: Vorinkubation mit 25 μ M LY294002. Obere Zeile: Phospho-AKT (Ser473). Untere Zeile: Gesamt-AKT.

3.2.3 p38 MAPK-Signaltransduktion

In weiteren Untersuchungen sollte herausgefunden werden, ob die p38 MAPK-Signalkaskade in immortalisierten humanen und murinen Podozyten ebenfalls durch LIF aktiviert werden kann. Hierfür wurden die Zellen zunächst für 15 Minuten mit 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml LIF stimuliert. Zur Veranschaulichung

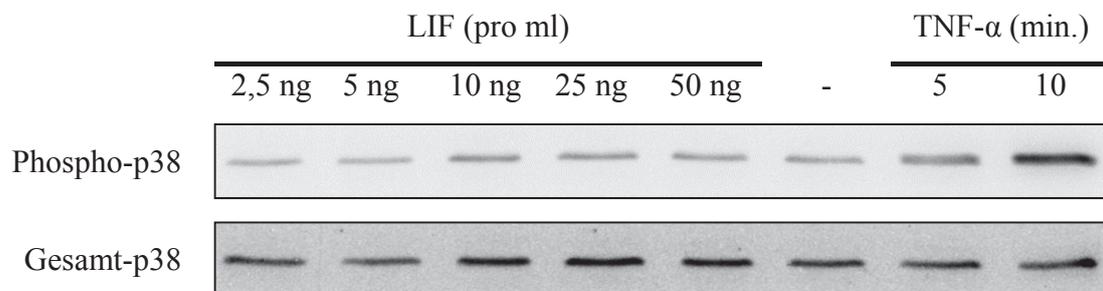
der Ergebnisse wurden außerdem Positivkontrollen mit je 20 ng/ μ l rekombinantem humanen bzw. murinen Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) von PeproTech® für 5 und 10 Minuten stimuliert. Das Zytokin TNF- α führt in immortalisierten Podozyten zu einer Aktivierung der p38-Signaltransduktion.

Humane Podozyten: p38 MAPK-Signalkaskade

Konzentrationskinetik

In humanen Podozyten konnte im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS und VE-Wasser keine konzentrationsabhängige Steigerung der p38-Phosphorylierung durch LIF nachgewiesen werden (Abb. 3.17). Die Stimulation mit TNF- α für 5 Minuten hingegen ergab im Vergleich zur Negativkontrolle eine durchschnittliche Aktivitätssteigerung um den Faktor $1,26 \pm 0,39$ ($p = 0,37$) und nach 10 Minuten um den Faktor $1,90 \pm 1,00$ ($p = 0,26$), wobei es in einem der drei Versuche bei der statistischen Auswertung einen Ausreißer nach unten gab, der den hohen Fehlerbalken bei der 10 minütigen TNF- α -Stimulation verursacht.

A:



B:

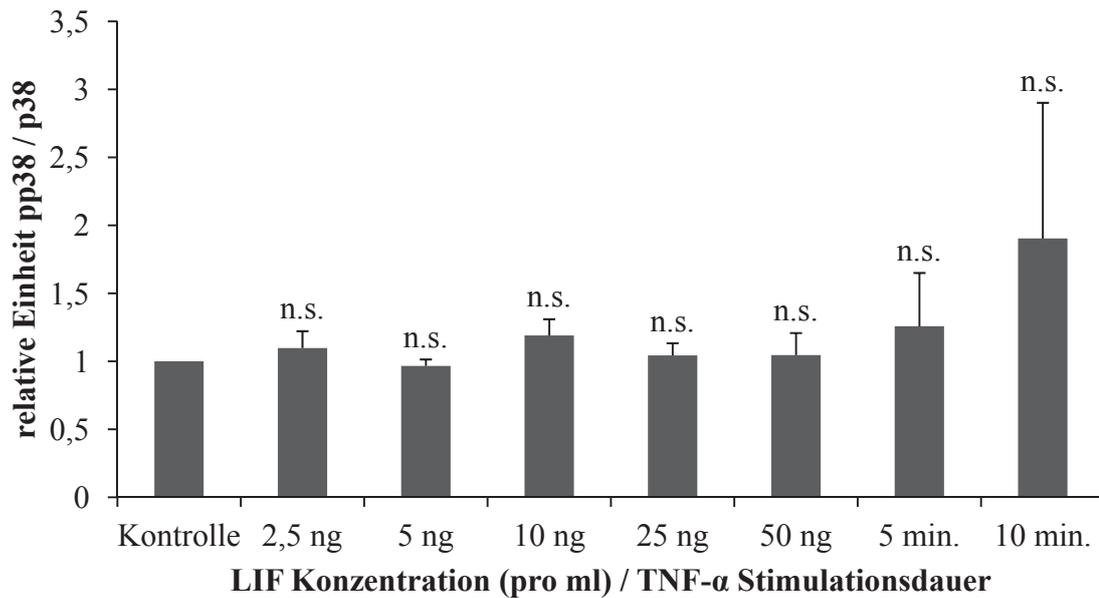
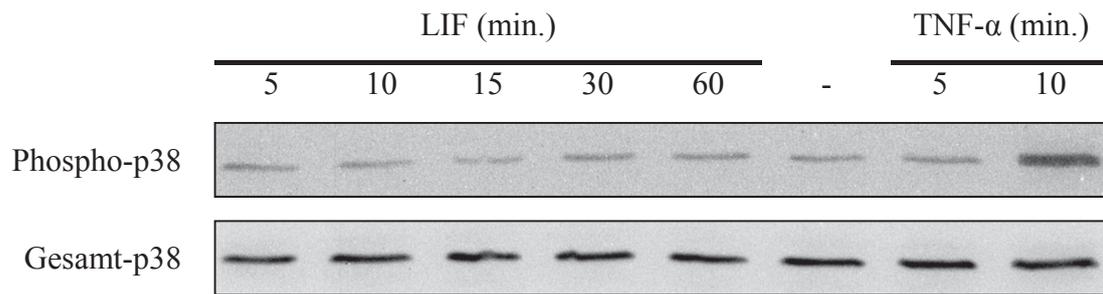


Abb. 3.17: Konzentrationskinetik der p38-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten im Vergleich zur Stimulation mit 20 ng/ μ l TNF- α für 5 und 10 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) #9211. Untere Zeile: Gesamt-p38. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-p38 zu Gesamt-p38 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

Zeitkinetik

Auch in der zeitabhängigen Stimulation der humanen Podozyten mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS und VE-Wasser kein Effekt von LIF auf die p38-Signalkaskade (Abb. 3.18). Im Gegensatz dazu stieg die p38-Phosphorylierung nach 5 minütiger TNF- α -Stimulation (20 ng/ μ l) im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor $1,56 \pm 1,06$ ($p = 0,46$) und nach 10 Minuten auf mehr als das Doppelte der Negativkontrolle (Faktor $2,40 \pm 0,84$ ($p = 0,10$)). Die hohen Fehlerbalken der Positivkontrollen mit TNF- α -Stimulation sind auf Schwankungen der absoluten Werte in der statistischen Auswertung zurückzuführen.

A:



B:

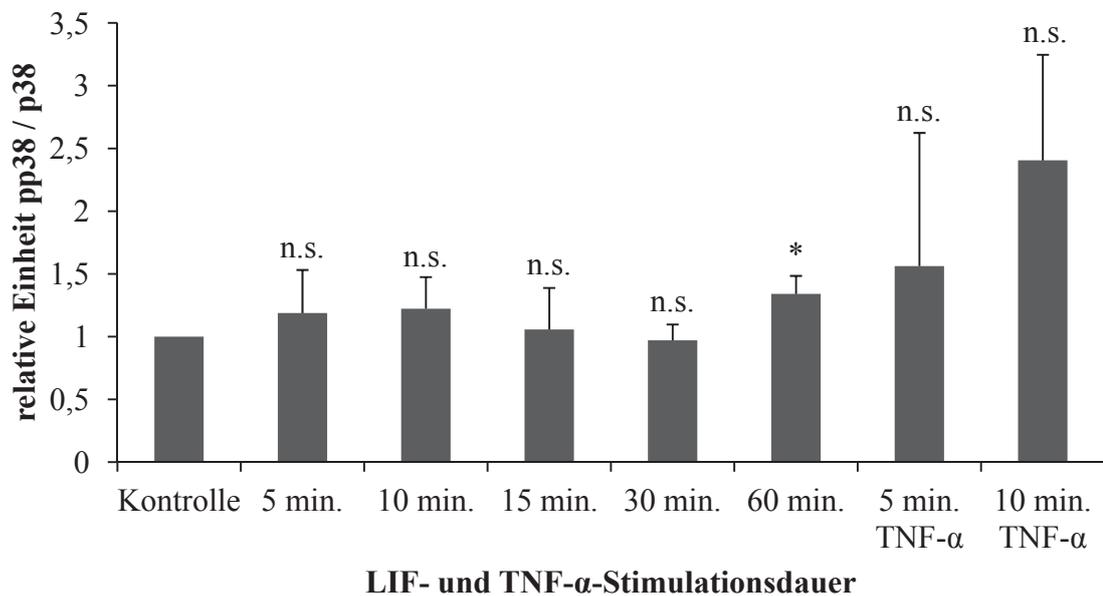


Abb. 3.18: Zeitkinetik der p38-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium im Vergleich zur Stimulation mit 20 ng/μl TNF-α für 5 und 10 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) #9211. Untere Zeile: Gesamt-p38. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-p38 zu Gesamt-p38 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

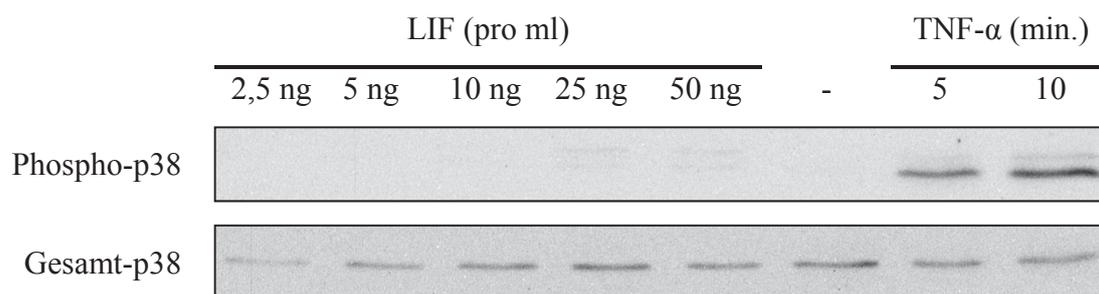
Murine Podozyten: p38 MAPK-Signalkaskade

Konzentrationskinetik

Murine Podozyten wurden analog zu den humanen Podozyten mit LIF beziehungsweise TNF-α (20 ng/μl) behandelt. In der konzentrationsabhängigen LIF-Stimulation der

murinen Podozyten mit 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml für 15 Minuten konnte im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS und VE-Wasser ebenfalls kein Effekt auf die p38-Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Wurden die Podozyten hingegen mit TNF- α stimuliert, konnte nach 5 Minuten eine Steigerung der p38-Phosphorylierung um den Faktor $1,55 \pm 0,46$ ($p = 0,17$) und nach 10 Minuten eine signifikante Steigerung um den Faktor $2,22 \pm 0,36$ ($p = 0,03$) beobachtet werden.

A:



B:

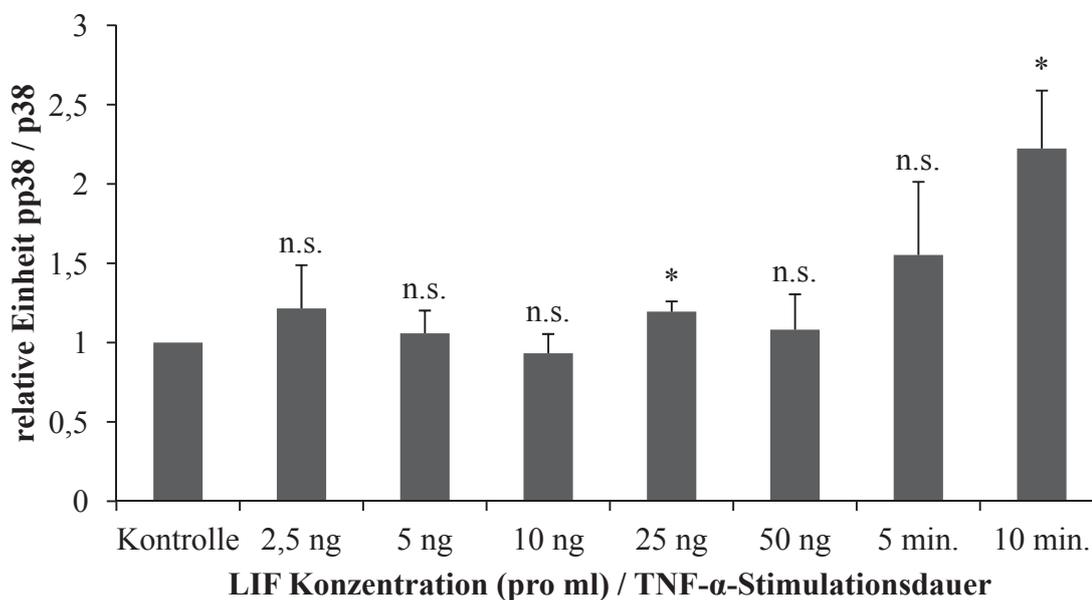


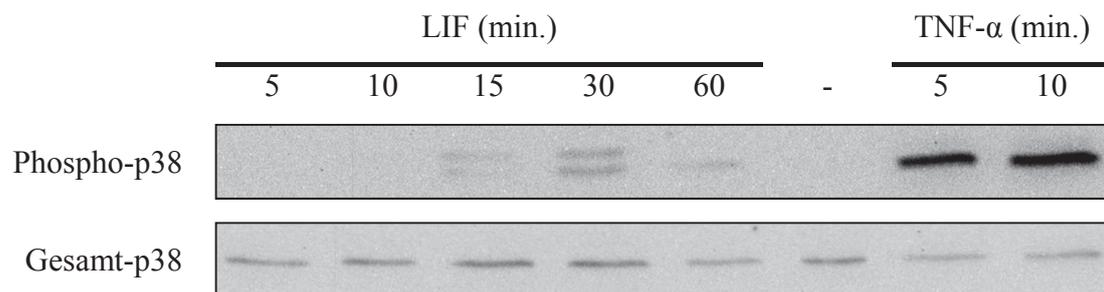
Abb. 3.19: Konzentrationskinetik der p38-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten im Vergleich zur Stimulation mit 20 ng/ μ l TNF- α für 5 und 10 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) #4511. Untere Zeile: Gesamt-p38. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-p38 zu Gesamt-p38 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle,

n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

Zeitkinetik

Abbildung 3.20 zeigt Ergebnisse der zeitabhängigen Stimulation von murinen Podozyten mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. beziehungsweise 20 ng/ μ l TNF- α für 5 und 10 Minuten. Unter Zugabe von LIF konnte auch in dieser Versuchsreihe im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS und VE-Wasser keine Zunahme der p38-Phosphorylierung in der statistischen Auswertung nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu wurde die p38-Phosphorylierung durch die 5 minütige Stimulation mit TNF- α im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor $1,58 \pm 0,58$ ($p = 0,14$) und nach 10 Minuten signifikant um den Faktor $2,35 \pm 0,75$ ($p = 0,04$) gesteigert.

A:



B:

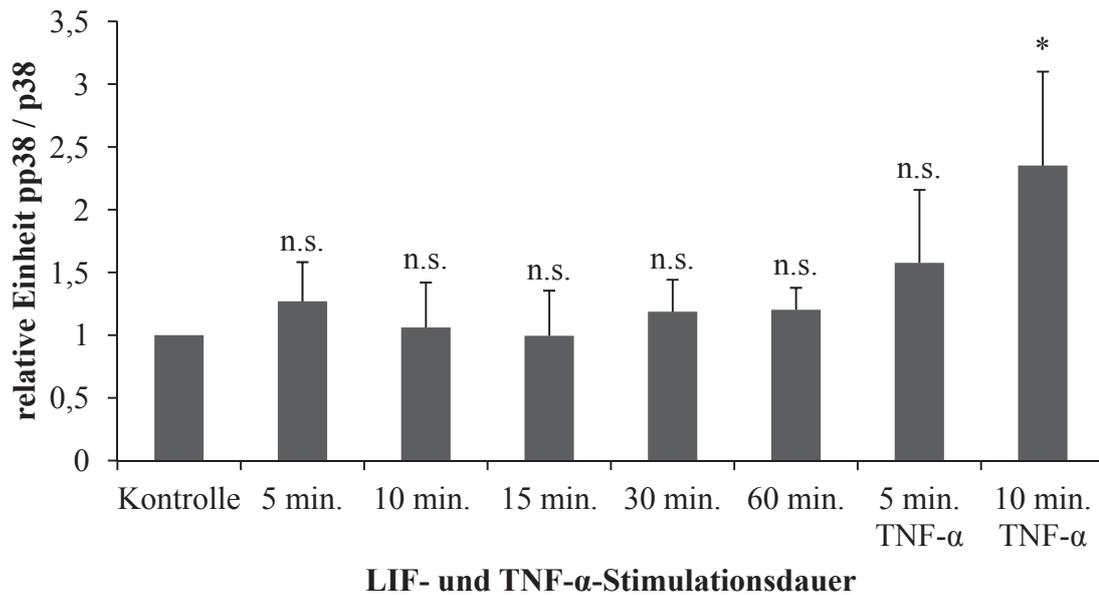


Abb. 3.20: Zeitkinetik der p38-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium im Vergleich zur Stimulation mit 20 ng/μl TNF-α für 5 und 10 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-p38 (Thr180/Tyr182) #4511. Untere Zeile: Gesamt-p38. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-p38 zu Gesamt-p38 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 4).

3.2.4 JAK-2/STAT3-Signaltransduktion

Zuletzt wurden die Auswirkungen der LIF-Stimulation auf die konzentrations- und zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten humanen und murinen Podozyten untersucht.

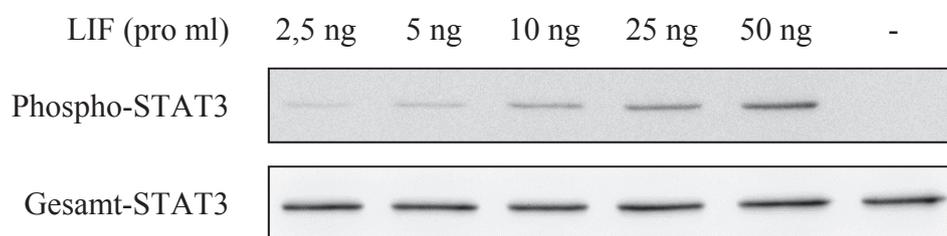
Humane Podozyten: JAK-2/STAT3-Signalkaskade

Konzentrationskinetik

Für die konzentrationsabhängige Versuchsreihe wurden zunächst humane Podozyten für 15 Minuten mit LIF in Konzentrationen von 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml stimuliert. Die Daten hierzu sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das STAT3-Phosphorylierungsniveau in humanen Podozyten

parallel zur Menge an zugeführtem LIF signifikant ansteigt. Während die Stimulation mit 2,5 ng/ml LIF bereits eine signifikante STAT3-Aktivitätssteigerung um den Faktor $1,30 \pm 0,06$ ($p = 0,02$) und mit 5 ng/ml LIF eine weitere signifikante Steigerung um den Faktor $1,66 \pm 0,27$ ($p = 0,05$) auslöst, steigt die STAT3-Phosphorylierung ebenfalls signifikant nach Zugabe von 10 ng/ml LIF auf das Doppelte der Negativkontrolle mit PBS an (Faktor $2,01 \pm 0,16$ ($p = 0,01$)). Weitere Erhöhungen der LIF Konzentration auf 25 ng/ml führten zu noch höheren und signifikanten Aktivitätssteigerungen um den Faktor $2,38 \pm 0,16$ ($p = 0,004$) und unter Zugabe von 50 ng/ml um den Faktor $2,55 \pm 0,51$ ($p = 0,03$).

A:



B:

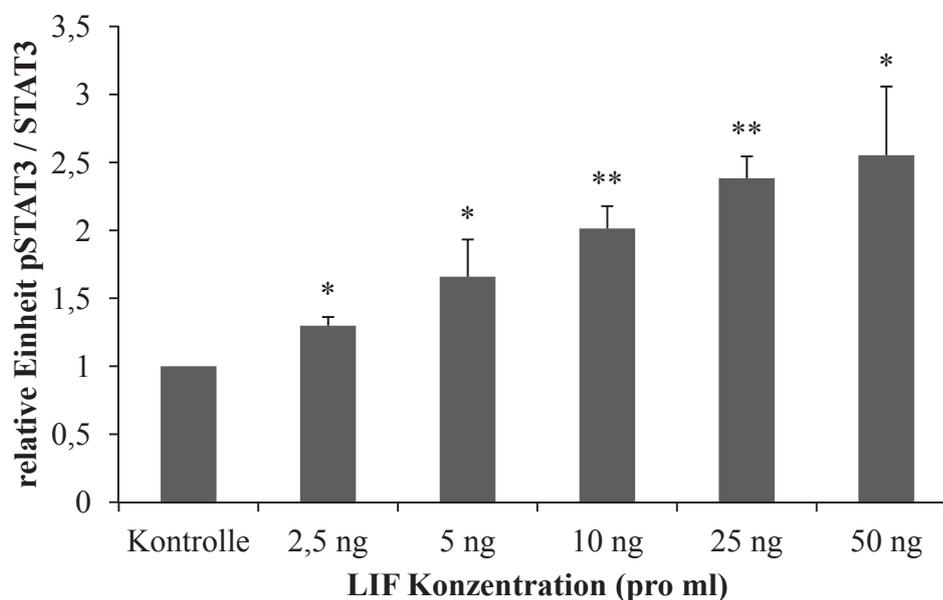


Abb. 3.21: Konzentrationskinetik der STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705). Untere Zeile: Gesamt-STAT3. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-STAT3 zu Gesamt-STAT3 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1)

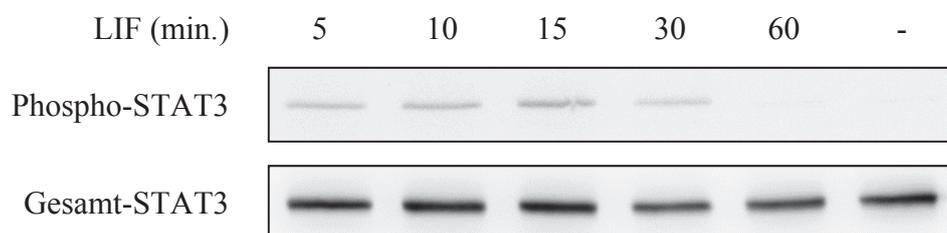
(statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 3$).

Zeitkinetik

Als Nächstes wurden die humanen Podozyten mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. stimuliert, um auch eine zeitabhängige STAT3-Aktivierung zu untersuchen (Abb. 3.22). Hierzu wurde nicht die LIF-Konzentration der stärksten STAT3-Phosphorylierung aus der Konzentrationskinetik (Abb. 3.21) verwendet, da eine physiologische LIF-Konzentration von 10 ng/ml bereits einen zeitabhängigen Effekt auf die STAT3-Achse verursachte.

Die 5 minütige LIF-Stimulation erhöhte die STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS um den Faktor $1,36 \pm 0,31$ ($p = 0,18$). Über eine signifikante Steigerung der STAT3-Phosphorylierung um den Faktor $1,75 \pm 0,28$ ($p = 0,04$) nach 10 Minuten, konnte nach 15 Minuten eine maximale und ebenso signifikante Aktivitätssteigerung um den Faktor $2,24 \pm 0,28$ ($p = 0,02$) erreicht werden. Längere Stimulation mit LIF bewirkte dann einen langsamen Rückgang der STAT3-Aktivierung. Eine Verdoppelung der Stimulationsdauer auf 30 Minuten führte immer noch im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer signifikanten Steigerung der STAT3-Phosphorylierung um den Faktor $1,73 \pm 0,31$ ($p = 0,05$) und eine weitere Verdoppelung auf 60 Minuten noch um den Faktor $1,29 \pm 0,12$ ($p = 0,06$).

A:



B:

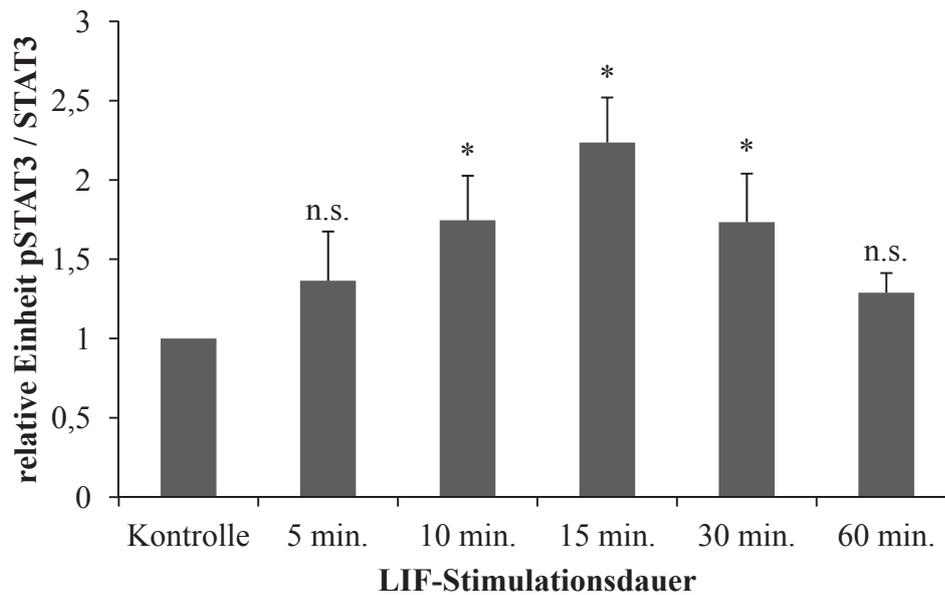


Abb. 3.22: Zeitkinetik der STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705). Untere Zeile: Gesamt-STAT3. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-STAT3 zu Gesamt-STAT3 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 3$).

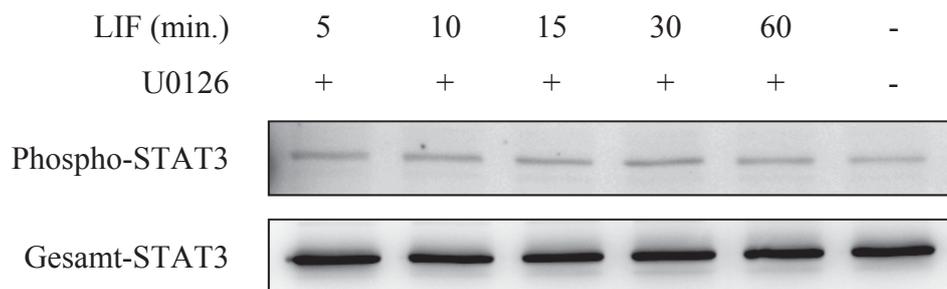
Differenzierung der Signalübertragung

Danach sollte herausgefunden werden, ob der zeitabhängige Einfluss von LIF auf die STAT3-Signalkaskade in immortalisierten Podozyten mit verschiedenen Inhibitoren gehemmt werden kann.

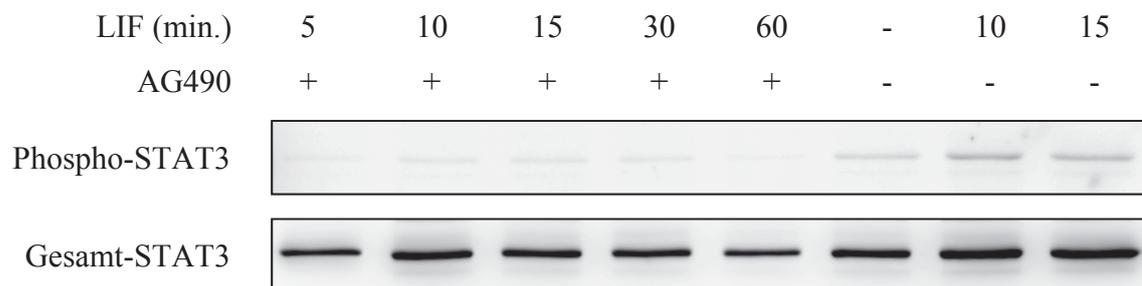
Hierzu wurden zunächst humane Podozyten mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. stimuliert, nachdem sie jeweils 30 Minuten vorher mit dem entsprechenden Inhibitor (siehe 3.2.1) inkubiert wurden (Abb. 3.23). Die Negativkontrolle wurde mit PBS und dem Lösungsmittel des eingesetzten Inhibitors inkubiert. Die Aufnahme der Banden aus den Western Blot-Analysen nach Inkubation der Nitrocellulosemembranen mit Gesamt-STAT3 beziehungsweise Phospho-STAT3 (Tyr705) erfolgte im Imaging-System unter Einsatz des Super Signal[®] ELISA Femto Kits von Thermo Scientific (Dreieich).

Unter Verwendung von 500 μ M des JAK-2-Inhibitors AG490 konnte die Aktivierung der STAT3-Signalachse durch LIF gemindert werden. In Gegenüberstellung dazu ist in diesem Versuchsaufbau zusätzlich die STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF für 10 und 15 Minuten ohne Inhibitor dargestellt. Die Koinkubation mit den Inhibitoren U0126 oder LY294002 hatte keinen Einfluss auf die LIF-abhängige STAT3-Phosphorylierung.

A:



B:



C:

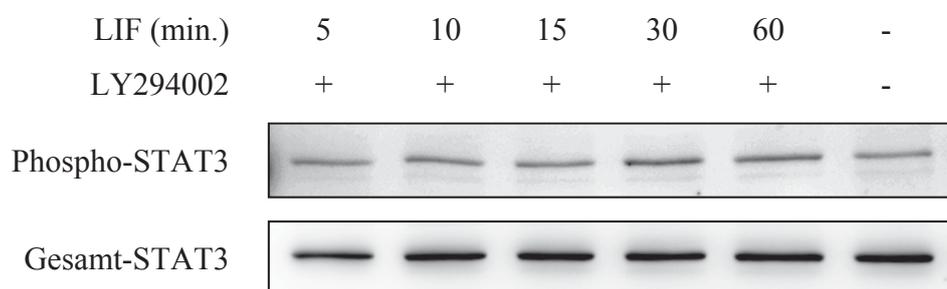


Abb. 3.23: Auswirkung von Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren auf die zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten humanen Podozyten nach Stimulation mit LIF. Dargestellt sind die Banden im Western Blot. Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor beziehungsweise für 10 und 15 min. ohne Inhibitor (B). Die mit PBS stimulierte Negativkontrolle wurde 30 Minuten vorher mit dem Lösungsmittel des Inhibitors inkubiert. A:

Vorinkubation mit 10 μ M U0126. B: Vorinkubation mit 500 μ M AG490. C: Vorinkubation mit 25 μ M LY294002. Obere Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705) #9145. Untere Zeile: Gesamt-STAT3 #12640.

Parallel zu den Western Blot Analysen zur Aktivierung der JAK-2/STAT3-Signalkaskade in immortalisierten humanen Podozyten, sollte die LIF-abhängige Phosphorylierung von STAT3 nachfolgend mit spezifischen Antikörpern gegen Gesamt-STAT3 und Phospho-STAT3 (Tyr 705) ebenfalls in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Da phosphorylierte STAT3-Dimere in den Zellkern wandern, um dort ihre Wirkung als Transkriptionsfaktor zu entfalten, wird bei stattgefundenener Aktivierung von STAT3 ein stärkeres Fluoreszenzsignal (grün) im Zellkern erwartet. Um diesen Prozess genauer beobachten zu können, wurden die Zellkerne der Podozyten hierzu nicht mit DAPI gegengefärbt.

Die Podozyten wurden wie in 2.2.1 beschrieben vorbereitet. Zunächst wurden die humanen immortalisierten Podozyten in einer Zeitkinetik mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. stimuliert (Abb. 3.24). Eine mit PBS inkubierte Kontrolle wurde mit (*ohne LIF*) und ohne (*neg. Kontrolle ohne LIF*) Primärantikörper-Inkubation mitgeführt. Außerdem erfolgte eine 60-minütige Stimulation einer weiteren Kontrolle mit 10 ng/ml LIF ohne Primärantikörper-Inkubation (*neg. Kontrolle 60 min.*). Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte wie in 2.2.10 beschrieben.

Die Phosphorylierung von STAT3 durch die Einwirkung von LIF konnte in den vorliegenden Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden. In den Aufnahmen ist erkennbar, dass die Fluoreszenz von Phospho-STAT3 unter LIF bereits nach 5 min. im Zytoplasma des Podozyten sichtbar wird, sich nach 15 min. dann nahezu vollständig in den Zellkern verlagert und im weiteren Verlauf der Stimulation sich wieder ins Zytoplasma rückverlagert. Im Vergleich dazu sind in den Kontrollen der Phospho-STAT3 Färbung im Zellkern und Zytoplasma der Podozyten deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten nachweisbar.

Dieser Effekt konnte auch für die Gesamt-STAT3 Färbung beobachtet werden. Während sich das Gesamt-STAT3 zu Beginn der LIF-Stimulation nach 5 min., genau wie in der unstimulierten Kontrolle, noch im Zytoplasma des Podozyten befindet, wandert es nach längerer Stimulationsdauer in den Zellkern und zeigt dort, verglichen mit dem Zytoplasma, nach 15 min. das stärkste Fluoreszenzsignal. Nach 60 min. unter LIF ist das Gesamt-STAT3 wieder im Zytoplasma des Podozyten zu sehen. Die

Kontrollen ohne Gesamt-STAT3-Inkubation weisen hingegen nur geringe Fluoreszenzintensitäten auf.

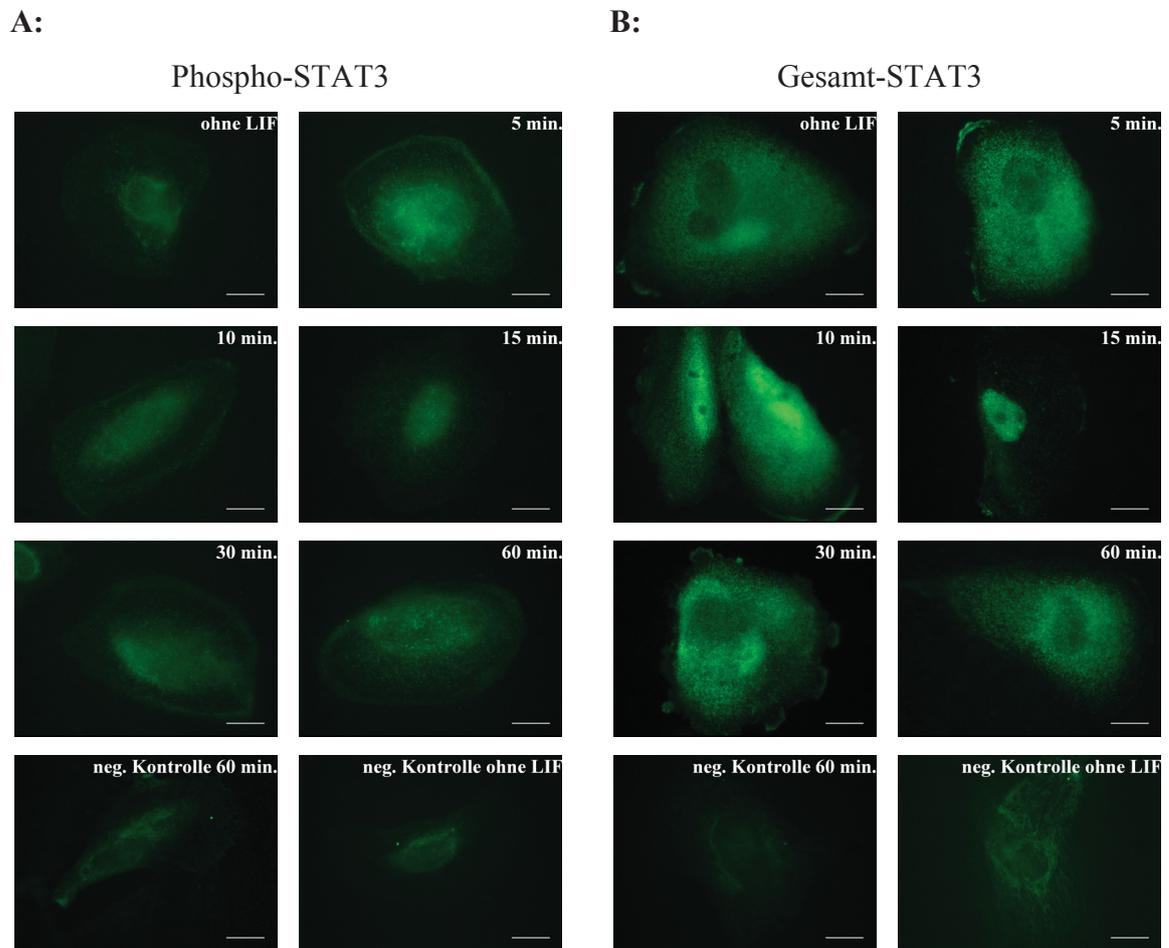
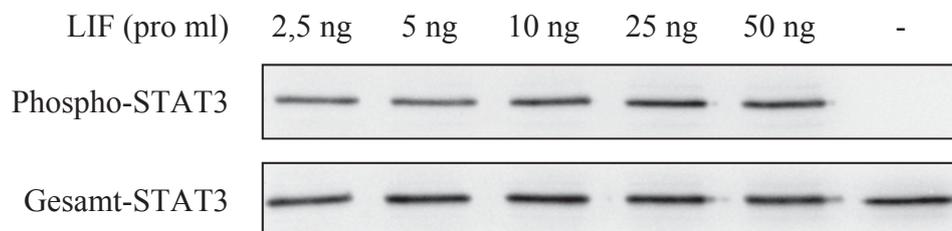


Abb. 3.24: Repräsentative Aufnahmen von Phospho-STAT3 und Gesamt-STAT3 in immortalisierten humanen Podozyten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nach zeitabhängiger Stimulation mit LIF. Stimulation der Podozyten mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. Inkubation der Negativkontrollen mit PBS mit (*ohne LIF*) und ohne (*neg. Kontrolle ohne LIF*) Primärantikörper-Inkubation. Zusätzliche Negativkontrolle ohne Primärantikörper-Inkubation nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF für 60 min. (*neg. Kontrolle 60 min.*). Färbung mit Phospho-STAT3 (Tyr705) # 9145 (A) bzw. Gesamt-STAT3 # 12640 (B) / anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (grüne Fluoreszenz). Aufnahmen mit Filtersatz 38 HE eGFP shift free (Expositionszeit 2.000 ms) in 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Maßstab 20 µm.

Unter gleichen Bedingungen wurde nun auch der konzentrations- und zeitabhängige Einfluss von LIF auf die STAT3-Signalkaskade in immortalisierten murinen Podozyten im Western Blot untersucht.

Murine Podozyten: JAK-2/STAT3-SignalkaskadeKonzentrationskinetik

Zuerst wurden murine Podozyten für 15 Minuten in einer Konzentrationskinetik (Abb. 3.25) mit 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml LIF stimuliert. Dabei zeigte sich unabhängig von der LIF-Konzentration, aber abhängig von der LIF-Zugabe, eine signifikante und starke Aktivierung der STAT3-Signalübertragung. Eine Konzentration von nur 2,5 ng/ml LIF bewirkte bereits im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS eine signifikant höhere STAT3-Phosphorylierung um den Faktor $3,89 \pm 0,78$ ($p = 0,02$) und eine Konzentration von 5 ng/ml eine signifikante Erhöhung um den Faktor $3,64 \pm 0,53$ ($p = 0,01$). Unter Stimulation mit 10 ng/ml LIF konnte eine signifikante STAT3-Aktivierung um den Faktor $3,95 \pm 0,94$ ($p = 0,03$) nachgewiesen werden und unter 25 ng/ml LIF eine ebenfalls signifikante Aktivierung auf über das Vierfache der Negativkontrolle (Faktor $4,30 \pm 1,08$ ($p = 0,03$)). Nach Zugabe von 50 ng/ml LIF war die STAT3-Phosphorylierung noch immer $4,12 \pm 1,15$ -fach ($p = 0,04$) höher als in der Negativkontrolle.

A:

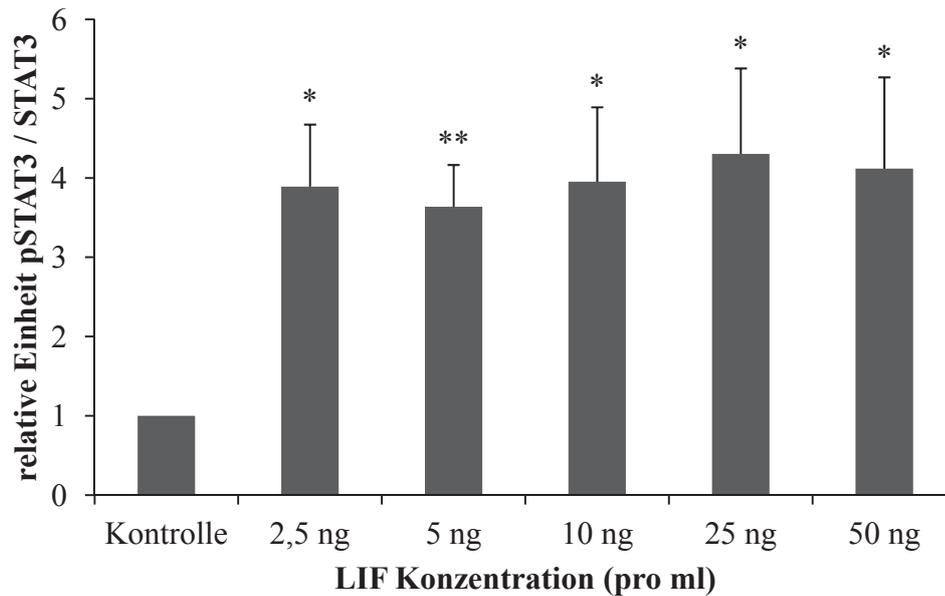
B:

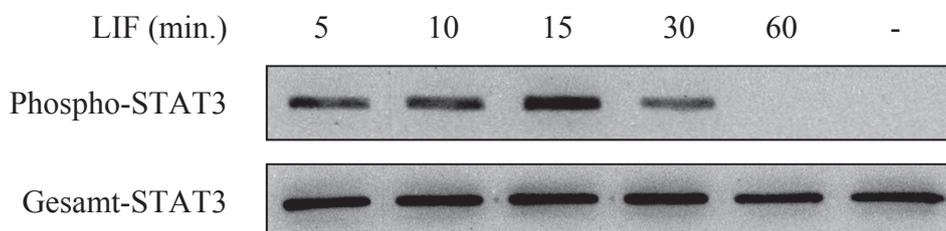
Abb. 3.25: Konzentrationskinetik der STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit LIF in Serum-freiem Medium für 15 Minuten. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705). Untere Zeile: Gesamt-STAT3. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-STAT3 zu Gesamt-STAT3 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 3$).

Zeitkinetik

Danach wurden murine Podozyten in einer Zeitkinetik (Abb. 3.26) mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. stimuliert. Nach 5 Minuten stieg die STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS bereits signifikant um den Faktor $4,57 \pm 2,65$ ($p = 0,04$) an. Die Stimulation mit LIF führte nach 10 Minuten zu einer weiteren signifikanten Erhöhung der STAT3-Aktivierung um den Faktor $5,27 \pm 2,56$ ($p = 0,02$) bis hin zu einer maximalen und signifikanten Erhöhung um den Faktor $5,94 \pm 2,37$ ($p = 0,01$) nach 15 Minuten. Auch nach 30 minütiger LIF-Stimulation war noch eine signifikante Aktivierung der STAT3-Signalkaskade um den Faktor $4,27 \pm 2,36$ ($p = 0,04$) nachweisbar. Diese fiel nach 60 Minuten ab auf eine signifikante Aktivierung um den Faktor $1,81 \pm 0,47$ ($p = 0,02$). Die hohen Fehlerbalken sind auf die statistische Auswertung der Banden im Western Blot in zwei der fünf Versuche zurückzuführen, in denen die absoluten, auf die

Negativkontrolle normalisierten Werte niedriger sind, aber dennoch relativ innerhalb des Versuches den gleichen Effekt von LIF zeigen.

A:



B:

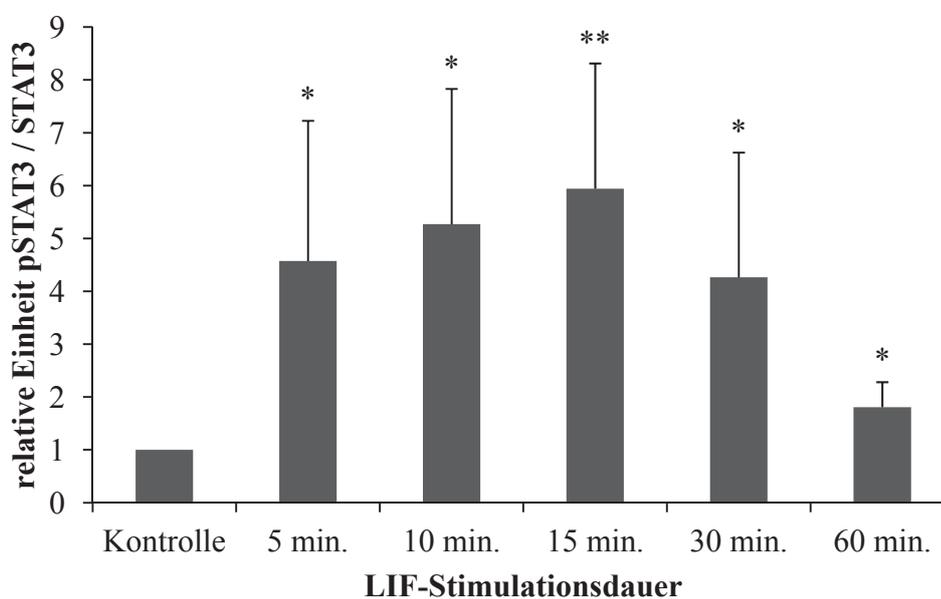
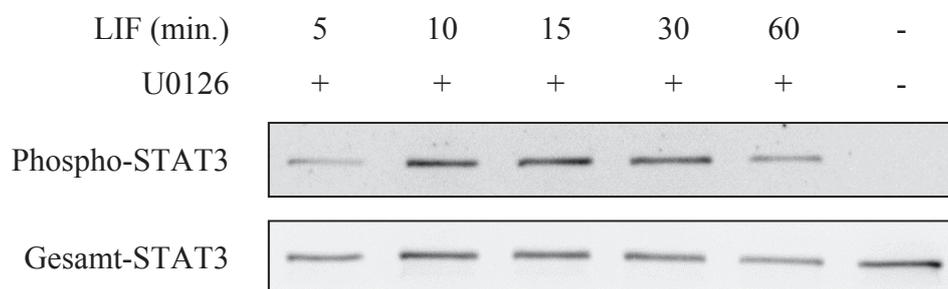
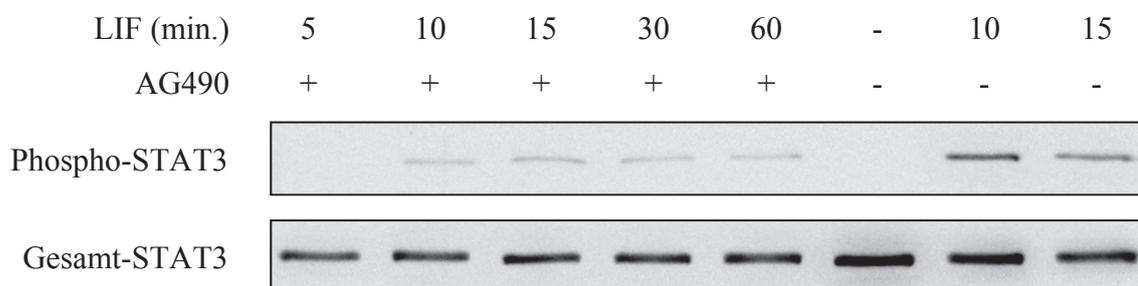


Abb. 3.26: Zeitkinetik der STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium. A: Repräsentativer Western Blot. Obere Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705). Untere Zeile: Gesamt-STAT3. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-STAT3 zu Gesamt-STAT3 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 5$).

Differenzierung der Signalübertragung

In immortalisierten murinen Podozyten wurde ebenfalls eine Hemmung der zeitabhängigen STAT3-Phosphorylierung durch LIF unter Koinkubation mit den in 3.2.1 beschriebenen Inhibitoren untersucht.

Die murinen Podozyten wurden zuerst für 30 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert und danach für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. mit 10 ng/ml LIF stimuliert. Die Negativkontrolle wurde mit PBS und dem Lösungsmittel des verwendeten Inhibitors inkubiert. Eine Inhibition der LIF-abhängigen STAT3-Phosphorylierung war durch Koinkubation mit U0126 oder LY294002 nicht möglich (Abb. 3.27). Wurde hingegen der JAK-2-Inhibitor AG490 (500 μ M) eingesetzt, war die STAT3-Phosphorylierung durch LIF reduziert. Zur Veranschaulichung wird in diesem Versuch ebenfalls die Stimulation mit 10 ng/ml LIF für 10 und 15 Minuten ohne Inhibitor gezeigt.

A:**B:**

C:

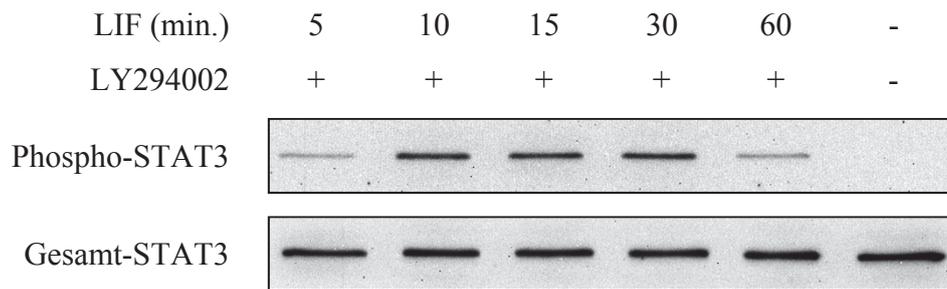


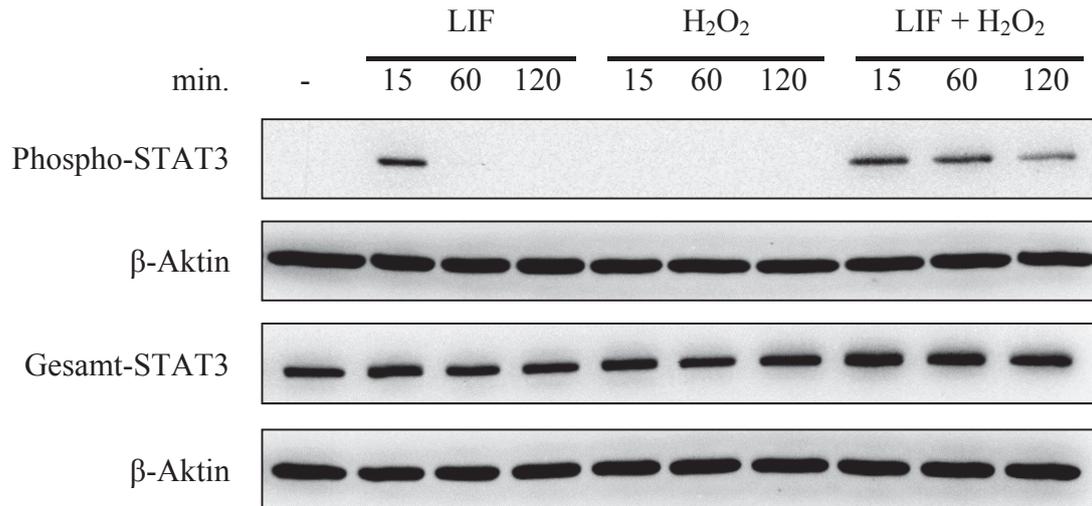
Abb. 3.27: Auswirkung von Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren auf die zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten nach Stimulation mit LIF. Dargestellt sind die Banden im Western Blot. Stimulation mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor beziehungsweise für 10 und 15 min. ohne Inhibitor (B). Die mit PBS stimulierte Negativkontrolle wurde 30 Minuten vorher mit dem Lösungsmittel des Inhibitors inkubiert. A: Vorinkubation mit 10 μ M U0126. B: Vorinkubation mit 500 μ M AG490. C: Vorinkubation mit 25 μ M LY294002. Obere Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705). Untere Zeile: Gesamt-STAT3.

Im nächsten Schritt wurde im Western Blot die zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (Sigma, Steinheim) in Zusammenhang mit der LIF-induzierten STAT3-Aktivierung untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 15 min., 60 min, und 120 min. entweder mit 10 ng/ml LIF, 1 mM H₂O₂ oder einer Kombination aus LIF + H₂O₂ in angegebener Konzentration stimuliert (Abb. 3.28). Die Negativkontrolle wurde mit PBS und VE-Wasser inkubiert.

Die Stimulation mit LIF für 15 Minuten ergab im Vergleich zur Negativkontrolle eine rasche und signifikante STAT3-Aktivitätssteigerung um den Faktor $4,53 \pm 1,43$ ($p = 0,05$). Diese fiel nach 60 minütiger LIF-Stimulation ab auf den Faktor $1,39 \pm 0,33$ ($p = 0,18$). Nach 120 Minuten LIF-Stimulation war in der STAT3-Phosphorylierung kein Unterschied zur Negativkontrolle messbar (Faktor $1,05 \pm 0,12$ ($p = 0,54$)). Die Stimulation mit H₂O₂ führte im Vergleich zur Negativkontrolle nach keiner Stimulationsdauer zu einer Aktivierung des STAT3-Signalweges. Die STAT3-Phosphorylierung lag nach 15 Minuten H₂O₂-Stimulation bei Faktor $1,06 \pm 0,15$ ($p = 0,56$), nach 60 Minuten H₂O₂-Stimulation bei Faktor $1,02 \pm 0,18$ ($p = 0,88$) und nach 120 Minuten H₂O₂-Stimulation bei Faktor $1,03 \pm 0,05$ ($p = 0,42$). Die simultane Stimulation mit LIF und H₂O₂ induzierte eine länger andauernde aber insgesamt geringere STAT3-Phosphorylierung im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit LIF. Im Vergleich zur Negativkontrolle war die STAT3-Aktivierung nach 15 Minuten

Stimulation mit LIF + H₂O₂ signifikant um den Faktor $2,40 \pm 0,28$ ($p = 0,01$) höher. Eine noch höhere und zugleich signifikante Aktivierung um den Faktor $2,98 \pm 0,52$ ($p = 0,02$) konnte nach 60 Minuten Stimulation mit LIF + H₂O₂ erzielt werden. Auch nach 120 Minuten Stimulation mit LIF + H₂O₂ war die STAT3-Phosphorylierung noch immer doppelt so hoch wie in der Negativkontrolle (Faktor $2,10 \pm 0,41$ ($p = 0,04$)).

A:



B:

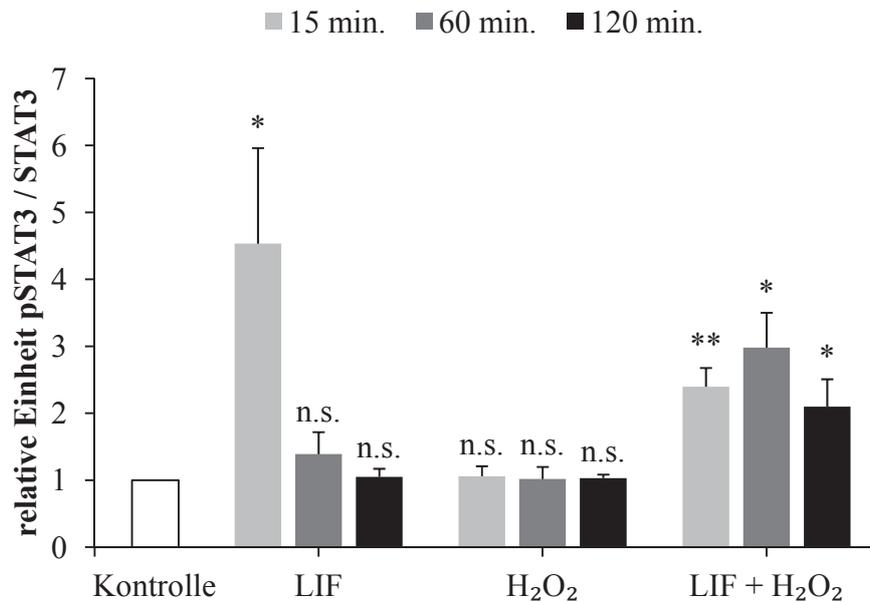


Abb. 3.28: Auswirkung von oxidativem Stress durch Koinkubation mit H₂O₂ auf die LIF induzierte zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten. Stimulation mit 10 ng/ml LIF, 1 mM H₂O₂ oder LIF + H₂O₂ in Serum-freiem Medium für 15 min., 60 min. und 120 min. A:

Repräsentativer Western Blot. Erste Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705). Zweite und vierte Zeile: β -Aktin (Ladekontrolle gleicher Proteinmengen). Dritte Zeile: Gesamt-STAT3 #12640. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-STAT3 zu Gesamt-STAT3 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

Zusätzlich wurde in den murinen immortalisierten Podozyten mittels Immunfluoreszenzanalysen die LIF-abhängige STAT3-Phosphorylierung mit nachfolgender Translokation der STAT3-Dimere in den Zellkern in Zusammenhang mit oxidativem Stress durch H_2O_2 untersucht.

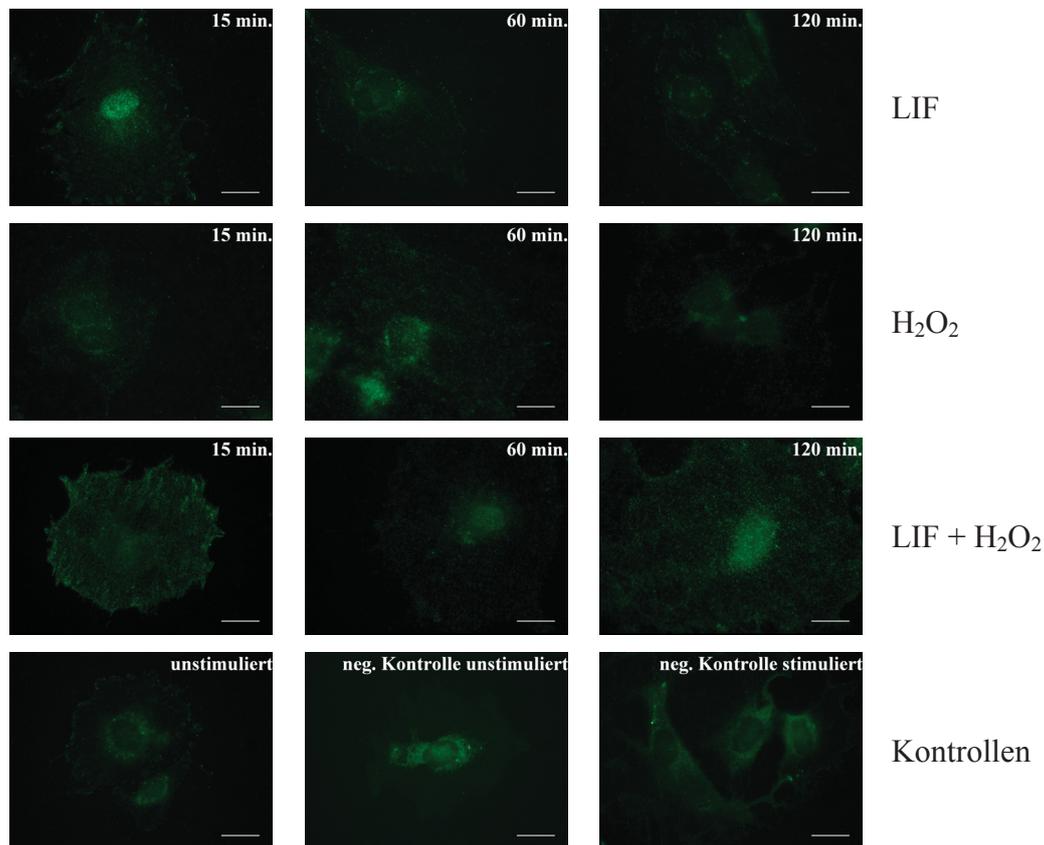
Hierzu wurden die murinen Podozyten, nach der wie in 2.2.1 beschriebenen Vorbereitung, zunächst mit 10 ng/ml LIF, 1 mM H_2O_2 oder einer Kombination aus LIF und H_2O_2 für 15 min., 60 min. und 120 min. stimuliert. Eine Kontrolle mit PBS- und VE-Wasser-Inkubation wurde mit (*unstimuliert*) und ohne (*neg. Kontrolle unstimuliert*) Primärantikörper mitgeführt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Primärantikörper für 120 min. mit LIF und H_2O_2 stimuliert (*neg. Kontrolle stimuliert*). Die darauffolgende Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach Protokoll (siehe 2.2.10).

Die Ergebnisse aus den Western Blot Untersuchungen konnten auch hier bestätigt werden. In der alleinigen Stimulation mit LIF konnte für die Phospho-STAT3 Fluoreszenz nur nach 15 min. ein positives Signal im Zellkern des Podozyten beobachtet werden (Abb. 3.29). Die Stimulation mit H_2O_2 führte auch in der Immunfluoreszenzanalyse zu keiner sichtbaren STAT3-Phosphorylierung. Ausgehend von einer begonnenen, und somit verzögerten, LIF-abhängigen STAT3-Phosphorylierung nach 15 min. Kostimulation mit LIF und H_2O_2 , die gleichermaßen im Zytoplasma und im Zellkern des Podozyten zu sehen ist, führt die längere Kostimulation für 60 min. zu einer Verlagerung der phosphorylierten STAT3 Proteine in den Zellkern. Auch nach 120 min. unter Kostimulation hält die STAT3-Phosphorylierung weiter an, was an der noch immer vorhandenen Fluoreszenz im Zellkern und teilweise wieder im Zytoplasma zu erkennen ist. Die Kontrollen mit und ohne Phospho-STAT3-Inkubation zeigen dagegen kein verstärktes Fluoreszenzsignal im Zellkern und im Zytoplasma des Podozyten.

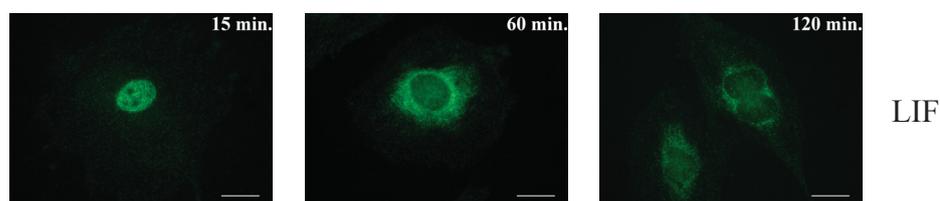
Ähnliche Beobachtungen konnten für die Gesamt-STAT3 Färbung gemacht werden. Nach Stimulation mit LIF für 15 min. befand sich das Gesamt-STAT3 bereits vollständig im Zellkern des Podozyten, wohingegen die LIF-Stimulation für 60 und 120

min., ebenso wie die alleinige Stimulation mit H_2O_2 keine Gesamt-STAT3 Fluoreszenz im Zellkern zeigte. In der Kostimulation mit LIF und H_2O_2 wiederum konnte nach 15 min. beobachtet werden, dass im Zellkern und umliegenden Zytoplasma des Podozyten Gesamt-STAT3 Proteine lokalisiert sind. Diese wandern nach 60 min. Kostimulation vermehrt in den Zellkern und sind auch nach 120 min. noch überwiegend dort zu sehen, wobei dann auch wieder im Zellkern-nahen Zytoplasma mehr Gesamt-STAT3 beobachtet werden konnte. In der unstimulierten Kontrolle zeigte sich kein Gesamt-STAT3 Fluoreszenzsignal im Zellkern. In den Kontrollen ohne Gesamt-STAT3-Inkubation ist weder im Zellkern noch im Zytoplasma Gesamt-STAT3 zu sehen, hier imponiert lediglich die leichte Eigenfluoreszenz der Podozyten.

A: Phospho-STAT3



B: Gesamt-STAT3



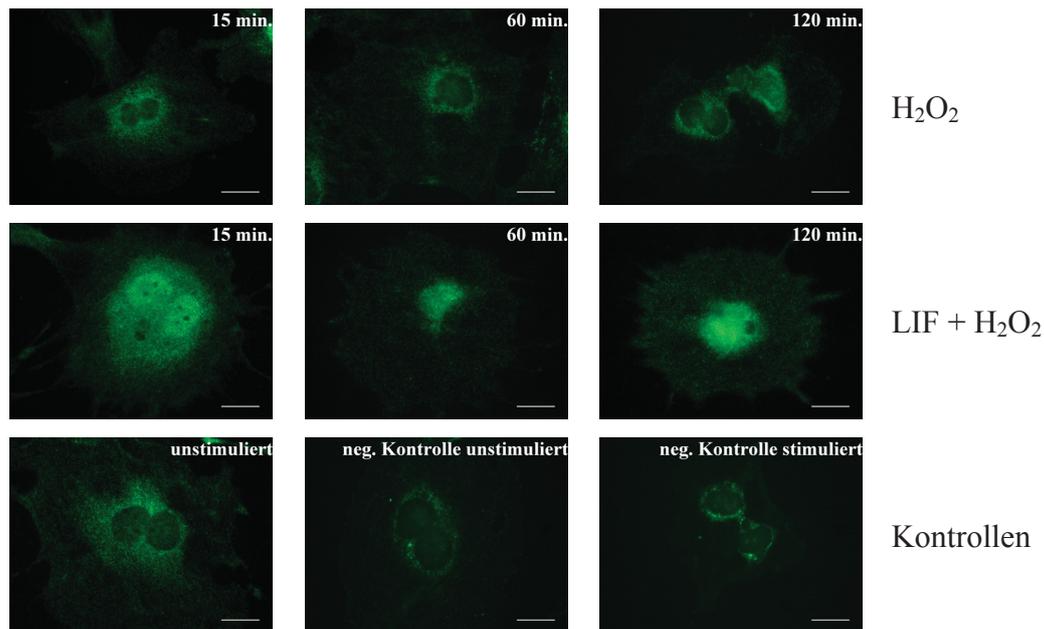
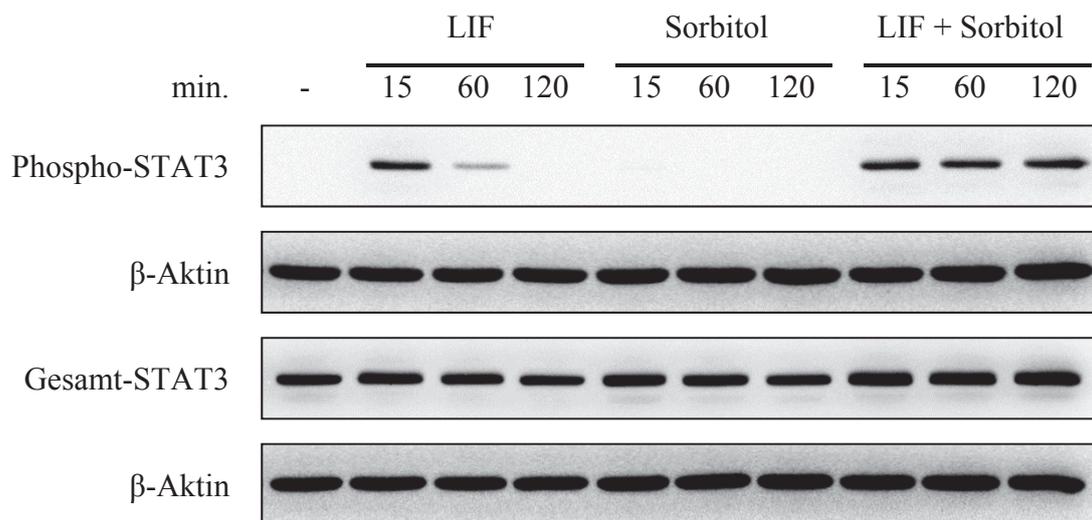


Abb. 3.29: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Auswirkung von oxidativem Stress durch Koinkubation mit H_2O_2 auf die LIF induzierte zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten. Stimulation mit 10 ng/ml LIF, 1 mM H_2O_2 oder LIF + H_2O_2 in Serum-freiem Medium für 15 min., 60 min. und 120 min. Inkubation der Negativkontrollen mit PBS und VE-Wasser mit (*unstimuliert*) und ohne (*neg. Kontrolle unstimuliert*) Primärantikörper. Zusätzliche Negativkontrolle ohne Primärantikörper nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF und 1 mM H_2O_2 für 120 min. (*neg. Kontrolle stimuliert*). Färbung mit Phospho-STAT3 (Tyr705) # 9131 (A) bzw. Gesamt-STAT3 # 12640 (B) / anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (grüne Fluoreszenz). Aufnahmen mit Filtersatz 38 HE eGFP shift free (Expositionszeit 2.000 ms) in 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Maßstab 20 μ m.

Zuletzt sollte untersucht werden, ob durch hyperosmolaren Stress unter Sorbitol (Sigma, Steinheim) in immortalisierten murinen Podozyten im Western Blot ebenfalls eine Verzögerung der zeitabhängigen LIF-induzierten STAT3-Phosphorylierung möglich war. Hierfür wurden die Zellen für 15 min., 60 min, und 120 min. entweder mit 10 ng/ml LIF, 0,5 M Sorbitol oder einer Kombination aus LIF + Sorbitol in angegebener Konzentration stimuliert (Abb. 3.30). Das Sorbitol wurde dabei jedes Mal vor Beginn eines Versuches neu in Hungermedium aufgelöst. Die Negativkontrolle wurde mit PBS und Hungermedium inkubiert.

Eine signifikante Steigerung der STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor $6,70 \pm 1,24$ ($p = 0,02$) konnte nach 15 Minuten Stimulation mit LIF nachgewiesen werden. Nach 60 Minuten Stimulation mit LIF war noch eine Aktivierung um den Faktor $1,94 \pm 0,60$ ($p = 0,11$) und nach 120 Minuten Stimulation mit LIF um den Faktor $1,35 \pm 0,04$ ($p = 0,005$) möglich. Das Niveau der STAT3-Phosphorylierung unter Verwendung von Sorbitol war im Vergleich zur Negativkontrolle sehr schwach ausgeprägt. Eine Aktivierung um den Faktor 1,12 war

sowohl unter 15 minütiger Stimulation mit Sorbitol ($\pm 0,12$ ($p = 0,24$)), als auch unter 60 minütiger Stimulation mit Sorbitol ($\pm 0,22$ ($p = 0,45$)) möglich. Eine kaum höhere Steigerung um den Faktor $1,26 \pm 0,09$ ($p = 0,04$) war nach 120 Minuten Stimulation mit Sorbitol nachweisbar. Nach 15 minütiger Kostimulation mit LIF und Sorbitol war die STAT3-Aktivierung im Vergleich zur Negativkontrolle durchschnittlich um den Faktor $5,74 \pm 2,18$ ($p = 0,06$) gesteigert. Im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit LIF beziehungsweise Sorbitol zeigte die Kostimulation für 60 Minuten eine anhaltende und signifikante Aktivierung der STAT3-Signalkaskade um den Faktor $6,03 \pm 1,94$ ($p = 0,05$). Die STAT3-Phosphorylierung hielt nach 120 Minuten Stimulationsdauer mit LIF + Sorbitol weiter an und war signifikant um den Faktor $6,23 \pm 2,18$ ($p = 0,05$) gesteigert.

A:

B:

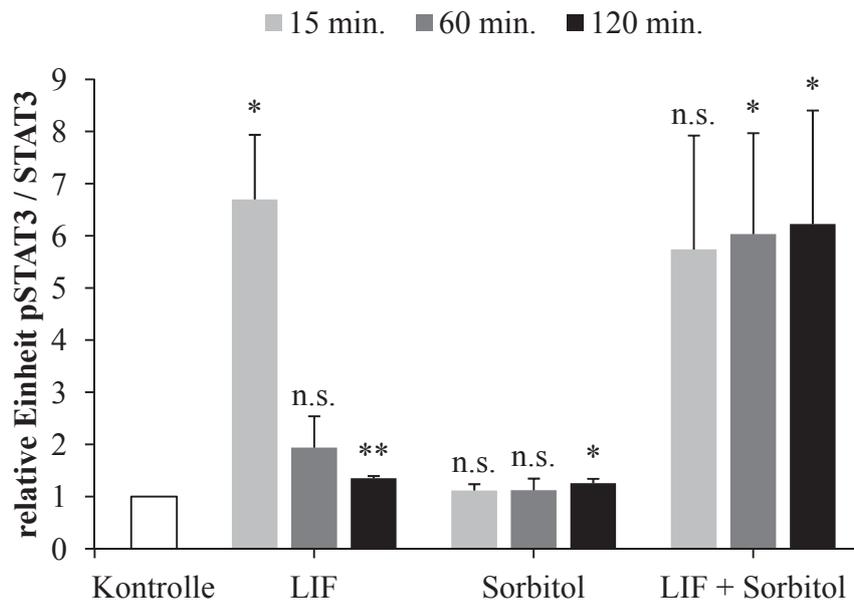


Abb. 3.30: Auswirkung von hyperosmolarem Stress durch Koinkubation mit Sorbitol auf die LIF induzierte zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten. Stimulation mit 10 ng/ml LIF, 0,5 M Sorbitol oder LIF + Sorbitol in Serum-freiem Medium für 15 min., 60 min. und 120 min. A: Repräsentativer Western Blot. Erste Zeile: Phospho-STAT3 (Tyr705). Zweite und vierte Zeile: β -Aktin (Ladekontrolle gleicher Proteinmengen). Dritte Zeile: Gesamt-STAT3 #12640. B: Densitometrische Auswertung der Banden im Western Blot. Dargestellt ist das Verhältnis von Phospho-STAT3 zu Gesamt-STAT3 als arithmetischer Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle (Einheit 1) (statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 3$).

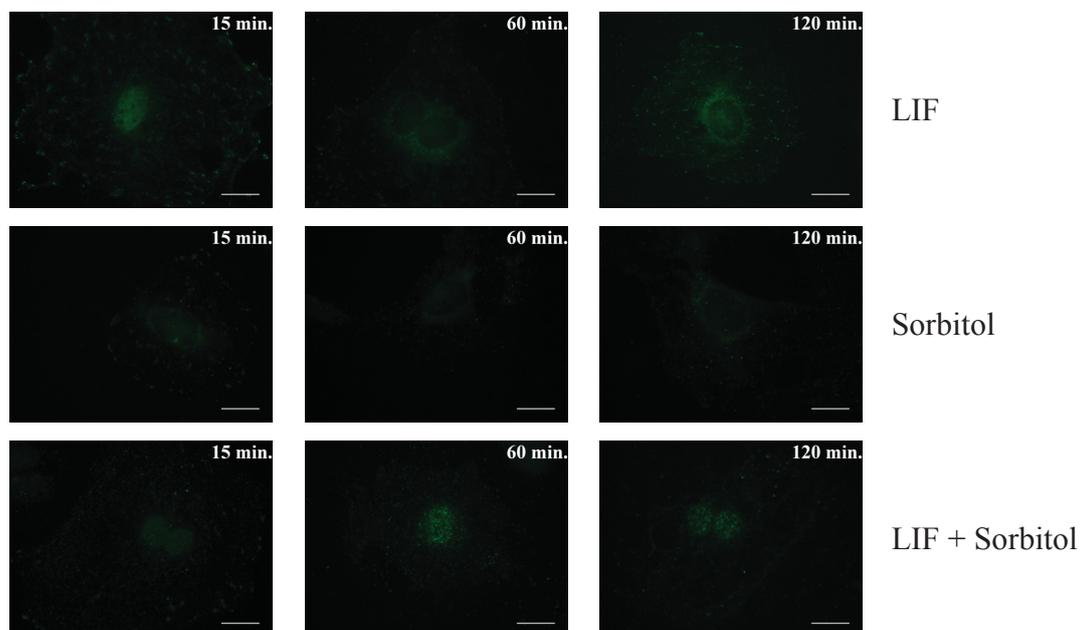
Zusätzlich wurden Immunfluoreszenzanalysen von murinen Podozyten durchgeführt, um die Translokation von durch LIF aktivierten STAT3-Dimeren in den Zellkern unter hyperosmolaren Bedingungen nachzuweisen. Für diese Untersuchung wurden die murinen Podozyten ebenfalls für 15 min., 60 min. und 120 min. stimuliert mit entweder 10 ng/ml LIF, 0,5 M Sorbitol oder LIF + Sorbitol. Die Kontrollen wurden analog zu den oben beschriebenen Kontrollen der Versuche zu oxidativem Stress hier mit Sorbitol und seinem Lösungsmittel (Hungermedium) durchgeführt.

Auch hier konnte zum wiederholten Mal die STAT3-Phosphorylierung, die sich durch ein starkes Fluoreszenzsignal im Zellkern des Podozyten zeigt, unter alleiniger LIF-Stimulation nach 15 min. nachgewiesen werden (Abb. 3.31). Die LIF-Stimulation für 60 und 120 min. hingegen führte auch hier zu keiner sichtbaren STAT3-Phosphorylierung. Das Gleiche gilt für die alleinige Stimulation mit Sorbitol, hier konnte ebenfalls keine

Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden. Wurden die murinen Podozyten mit LIF und Sorbitol stimuliert, zeigte sich durch die starke Fluoreszenz im Zellkern eine bereits nach 15 min. vorhandene und über 60 und 120 min. hin andauernde STAT3-Phosphorylierung. In den Kontrollen konnte dagegen keine Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden.

Passend zu diesen Ergebnissen konnten ähnliche Effekte in der Gesamt-STAT3 Untersuchung festgestellt werden. Nach 15 min. unter LIF war das Gesamt-STAT3 im Zellkern des Podozyten lokalisiert. Im weiteren Verlauf der alleinigen LIF-Stimulation und in der gesamten alleinigen Sorbitol-Stimulation konnte kein Gesamt-STAT3 im Zellkern, stattdessen aber im Zytoplasma des Podozyten beobachtet werden. In der Kostimulation mit LIF und Sorbitol zeigte sich zu jedem der beobachteten Zeitpunkte ein starkes Fluoreszenzsignal im Zellkern des Podozyten, welches dem Gesamt-STAT3 und der anhaltenden STAT3-Aktivierung entspricht. In der unstimulierten Kontrolle befand sich das Gesamt-STAT3 im Zytoplasma des Podozyten. Die Kontrollen ohne Gesamt-STAT3-Inkubation zeigten im Zellkern und Zytoplasma kein verstärktes Fluoreszenzsignal, allerdings konnte die vorhandene Eigenfluoreszenz beobachtet werden.

A: Phospho-STAT3



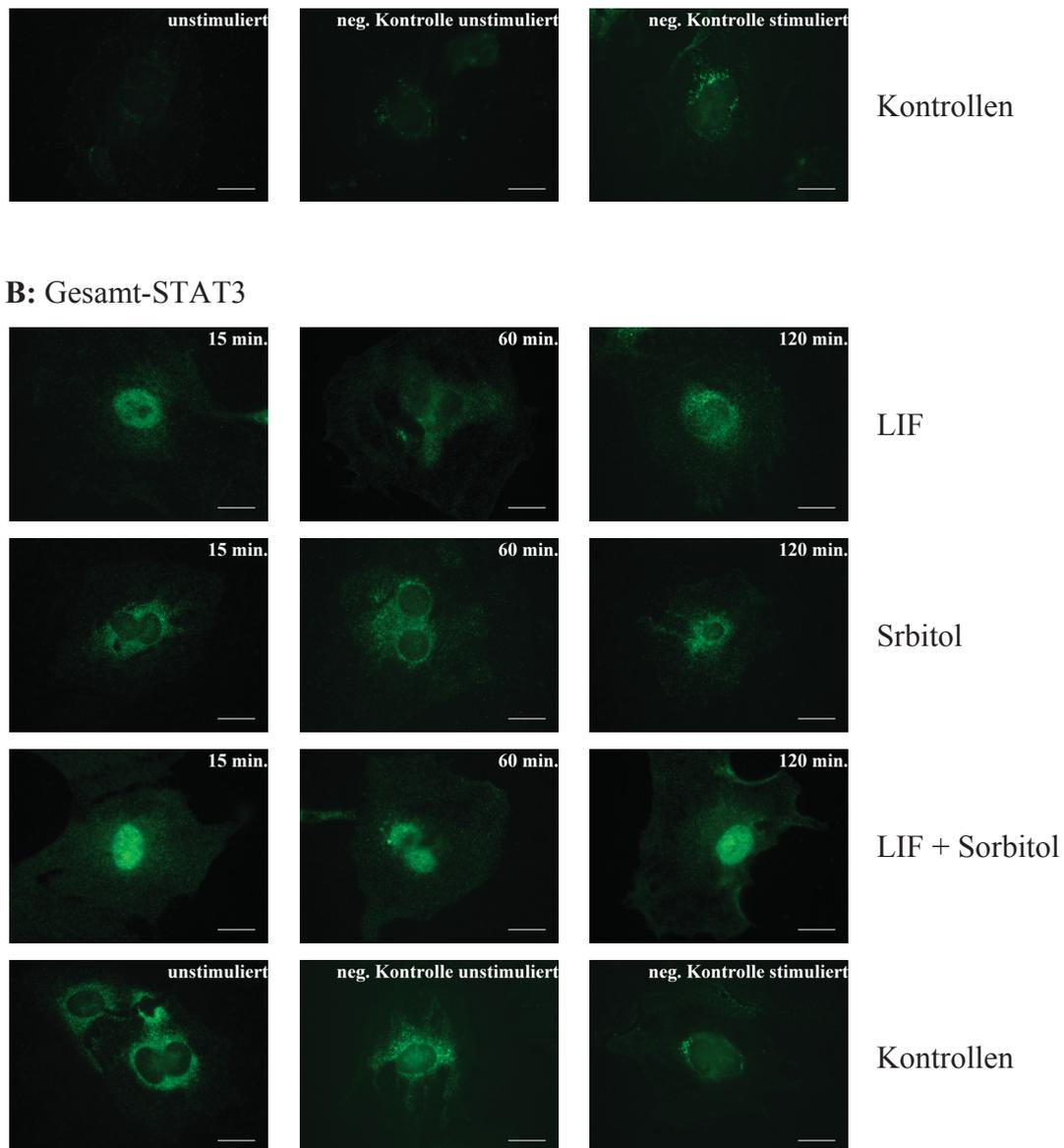


Abb. 3.31: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Auswirkung von hyperosmolarem Stress durch Koinkubation mit Sorbitol auf die LIF induzierte zeitabhängige STAT3-Phosphorylierung in immortalisierten murinen Podozyten. Stimulation mit 10 ng/ml LIF, 0,5 M Sorbitol oder LIF + Sorbitol in Serum-freiem Medium für 15 min., 60 min. und 120 min. Inkubation der Negativkontrollen mit PBS und Hungermedium mit (*unstimuliert*) und ohne (*neg. Kontrolle unstimuliert*) Primärantikörper. Zusätzliche Negativkontrolle ohne Primärantikörper nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF und 0,5 M Sorbitol für 120 min. (*neg. Kontrolle stimuliert*). Färbung mit Phospho-STAT3 (Tyr705) # 9131 (A) bzw. Gesamt-STAT3 # 12640 (B) / anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (grüne Fluoreszenz). Aufnahmen mit Filtersatz 38 HE eGFP shift free (Expositionszeit 2.000 ms) in 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Maßstab 20 µm.

3.2.5 Expression von SOCS1 und SOCS3 in murinen Podozyten

Das Ziel der nächsten Versuchsreihe war die Expression der SOCS1- und SOCS3-mRNA in immortalisierten murinen Podozyten unter LIF-Stimulation in Real Time PCR Analysen zu untersuchen. Die Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-Familie ist eine Gruppe von inhibierenden Proteinen, die in Zellen für einen negativen

Rückkopplungsmechanismus nach Zytokinstimulation verantwortlich ist. Wird die JAK-2/STAT3-Signaltransduktion durch ein rezeptorgebundenes Zytokin aktiviert, wandern phosphorylierte STAT3-Dimere in den Nukleus und steigern dort als Transkriptionsfaktor wirkend unter Anderem die Expression der SOCS-mRNA. So wird beispielsweise durch gleichzeitige Bindung von SOCS3-Proteinen an intrazelluläres, phosphoryliertes Tyrosin der Rezeptoruntereinheit gp130 und die katalytische Domäne der Rezeptor-assoziierten Januskinase-2 die weitere Zytokin-induzierte JAK-2/STAT3-Signalübertragung blockiert.

Hierzu wurden immortalisierte murine Podozyten für 2 h, 4 h und 8 h mit LIF in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Für die Untersuchung der mRNA-Expression von SOCS3 wurden die Podozyten zusätzlich für längere Zeiträume von 12 h, 24 h und 48 h mit 10 ng/ml LIF stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.32 in einem Diagramm zusammengefasst.

Für die SOCS1-mRNA kann nach 2 h unter LIF beobachtet werden, dass die Expression im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS um den Faktor $0,85 \pm 0,32$ ($p = 0,42$) niedriger ist. Nach 4 h liegt eine signifikante Reduktion der relativen SOCS1-mRNA-Expression um den Faktor $0,74 \pm 0,03$ ($p = 0,001$) vor. Die achtstündige LIF-Stimulation führt zu einem durchschnittlichen Anstieg der SOCS1-mRNA-Expression um den Faktor $1,21 \pm 0,25$ ($p = 0,19$).

Im Gegensatz zu SOCS1 kann für SOCS3 ein hohes und über einen längeren Zeitraum hinweg stabiles mRNA-Expressionsniveau gemessen werden. Während sich das mRNA-Expressionslevel von SOCS3 unter 2 h LIF ($p = 0,94$) und das der Negativkontrolle im Durchschnitt nicht voneinander unterscheiden (Standardabweichung $\pm 0,33$), steigt die Expression nach 4 h signifikant auf das $1,59 \pm 0,11$ -fache ($p = 0,002$) der Negativkontrolle an. Die LIF-Stimulation für 8 h führt zu einer weiteren und zugleich signifikanten Steigerung der SOCS3-mRNA-Expression um den Faktor $4,72 \pm 1,19$ ($p = 0,01$). Nach 12 h wurde dann ein signifikanter Peak von $6,51 \pm 3,90$ -facher ($p = 0,03$) Steigerung beobachtet. Nach 24 h ist die SOCS3-mRNA noch signifikant um den Faktor $5,71 \pm 1,22$ ($p = 0,001$) höher exprimiert als in der Negativkontrolle. Ein signifikanter relativer Expressionsunterschied von Faktor $4,57 \pm 0,76$ ($p = 0,0005$) kann auch nach 48 h noch erzielt werden.

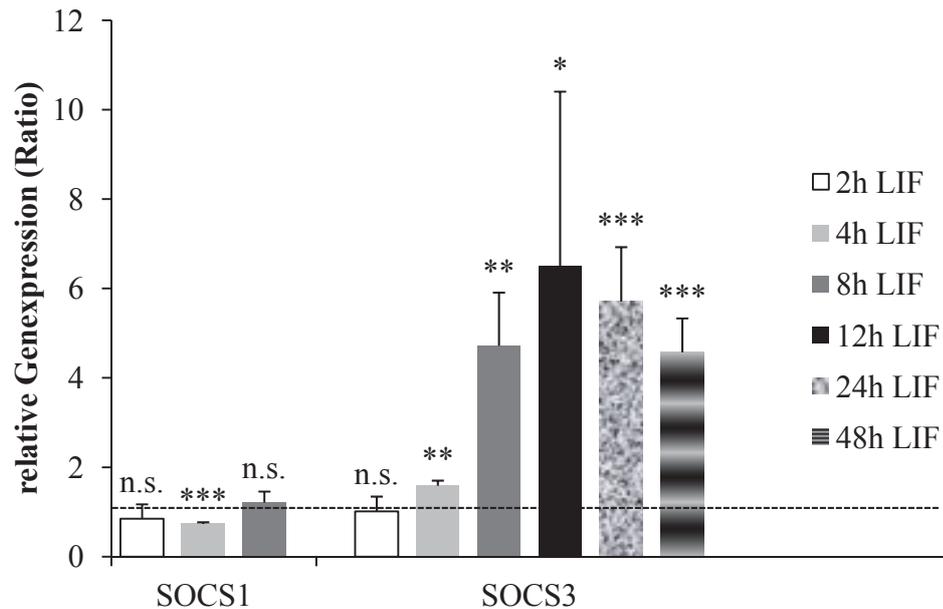


Abb. 3.32: Zeitabhängige Expression der SOCS1- und SOCS3-mRNA in immortalisierten murinen Podozyten unter LIF in Serum-freiem Medium. Linke Seite: SOCS1 (Stimulation mit 10 ng/ml LIF für 2h, 4h und 8h). Rechte Seite: SOCS3 (Stimulation mit 10 ng/ml LIF für 2h, 4h, 8h, 12h, 24h und 48h). Die Inkubation der Negativkontrollen erfolgte mit PBS. Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, *** = $p \leq 0,001$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 4$, für die Stimulation mit 12h, 24h und 48h: $n=5$).

Parallel zu den Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen der LIF-abhängigen STAT3-Phosphorylierung in murinen immortalisierten Podozyten unter oxidativem Stress mit H_2O_2 (siehe 3.2.4), wurde in diesem Abschnitt unter gleichen Bedingungen die Expression des negativen Feedbackmechanismus über SOCS3 auf mRNA-Ebene untersucht. Die murinen Podozyten wurden für 15 min., 60 min. und 120 min. jeweils mit 10 ng/ml LIF, 1 mM H_2O_2 oder LIF + H_2O_2 stimuliert. Die Inkubation der Negativkontrollen erfolgte mit PBS und VE-Wasser. Die Ergebnisse der relativen Genexpressionsanalysen sind in Abbildung 3.33 dargestellt.

Nach nur 15 min. Stimulation mit LIF ist die SOCS3-mRNA-Expression bereits signifikant um den Faktor $12,62 \pm 3,11$ ($p = 0,02$) höher als in der Negativkontrolle. Mit 60-minütiger LIF-Stimulation kann eine signifikante und maximale Steigerung der Expression um den Faktor $74,07 \pm 13,03$ ($p = 0,01$) erreicht werden, die nach 120 min. noch das $2,47 \pm 0,61$ -Fache ($p = 0,05$) der Negativkontrolle beträgt.

Der fehlenden STAT3-Aktivierung nach alleiniger H₂O₂-Stimulation im Western Blot entsprechend, kann auch auf mRNA-Ebene keine erhöhte Expression von SOCS3 gemessen werden. Nach einem Ausgangslevel der SOCS3-mRNA-Expression von Faktor $0,95 \pm 0,03$ ($p = 0,11$) nach 15 min. H₂O₂-Stimulation, kann im Verlauf der weiteren Stimulation nach 60 min. durchschnittlich eine signifikante Reduktion um den Faktor $0,79 \pm 0,08$ ($p = 0,05$) und nach 120 min. um den Faktor $0,60 \pm 0,11$ ($p = 0,02$) gemessen werden.

In Gegenwart von LIF und H₂O₂ kann die SOCS3-mRNA-Expression entgegen der anhaltenden STAT3-Phosphorylierung in den Western Blot Analysen nicht gesteigert werden. Das Expressionsniveau liegt im Vergleich zur Negativkontrolle nach 15 min. Kostimulation mit LIF und H₂O₂ bei Faktor $1,12 \pm 0,22$ ($p = 0,45$), nach 60 min. bei Faktor $0,96 \pm 0,19$ ($p = 0,78$) und nach 120 min. bei Faktor $1,11 \pm 0,27$ ($p = 0,57$).

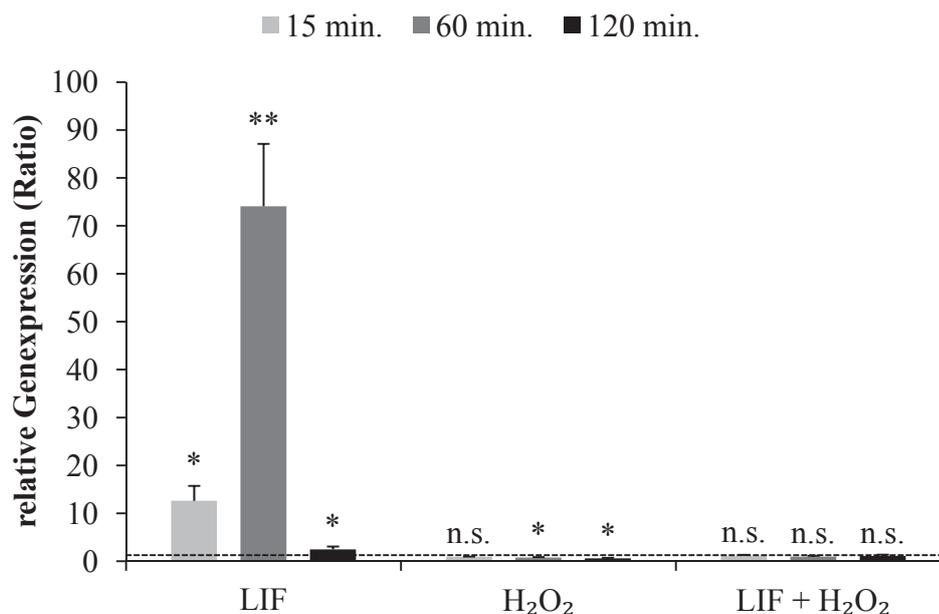


Abb. 3.33: Auswirkung von oxidativem Stress durch Koinkubation mit H₂O₂ auf die LIF induzierte zeitabhängige SOCS3-mRNA Expression in immortalisierten murinen Podozyten. Stimulation mit 10 ng/ml LIF, 1 mM H₂O₂ oder LIF + H₂O₂ in Serum-freiem Medium für 15 min., 60 min. und 120 min. (Negativkontrollen mit PBS und VE-Wasser). Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 3$).

Eine Genexpressionsanalyse für die SOCS3-mRNA wurde in immortalisierten murinen Podozyten in gleicher Weise für die in 3.2.4 beschriebene LIF-abhängige STAT3-Aktivierung unter hyperosmolaren Bedingungen durch Sorbitol durchgeführt. Hierzu wurden die Podozyten mit 10 ng/ml LIF, 0,5 M Sorbitol oder einer Kombination aus LIF + Sorbitol für die Zeiträume von 15 min., 60 min. und 120 min. stimuliert (Abb. 3.34). Die Negativkontrollen wurden mit PBS und Hungermedium inkubiert. Das Sorbitol wurde vor jedem neuen Versuch frisch in Hungermedium gelöst.

Auch hier kann unter alleiniger LIF-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle schon nach 15 min. eine signifikante Steigerung der SOCS3-mRNA-Expression um den Faktor $18,79 \pm 4,21$ ($p = 0,02$) beobachtet werden. Ein signifikanter Peak von durchschnittlich $101,97 \pm 13,71$ -facher ($p = 0,01$) Hochregulation der Expression zeigt sich nach 60 min. unter LIF. Nach 120-minütiger LIF-Stimulation ist die SOCS3-mRNA noch signifikant um den Faktor $3,67 \pm 0,13$ ($p = 0,001$) höher exprimiert als in der Negativkontrolle.

Passend zu der im Western Blot ausbleibenden STAT3-Aktivierung in der Sorbitol-Stimulationsgruppe, wurden auch keine erhöhten Expressionslevel der SOCS3-mRNA unter Sorbitol gemessen. Die Stimulation mit Sorbitol für 15 min. ($p = 1,00$) führt im Vergleich zur Negativkontrolle zu keiner Änderung des SOCS3-mRNA-Expressionsniveaus (Standardabweichung $\pm 0,33$). Nach 60 min. unter Sorbitol kann eine signifikante Reduktion der SOCS3-mRNA-Expression um den Faktor $0,71 \pm 0,09$ ($p = 0,03$) beobachtet werden und nach 120 min. um den Faktor $0,88 \pm 0,45$ ($p = 0,69$). Bei der Kostimulation mit LIF und Sorbitol bleibt zunächst auch eine relative Expressionssteigerung aus. Nach 15- und 60-minütiger Kostimulation ist das SOCS3-mRNA-Expressionsniveau mit der Negativkontrolle vergleichbar, nach 15 min. liegt es bei Faktor $0,95 \pm 0,18$ ($p = 0,69$) und nach 60 min. bei Faktor $1,17 \pm 0,35$ ($p = 0,49$). Es konnte herausgefunden werden, dass sich die Expression der SOCS3-mRNA nach 120 min. LIF + Sorbitol-Stimulation durchschnittlich um den Faktor $4,91 \pm 5,72$ ($p = 0,36$) erhöht, wobei die hohe Standardabweichung zeigt, dass es in einem der drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuche einen Ausreißer der Ratio nach oben gibt.

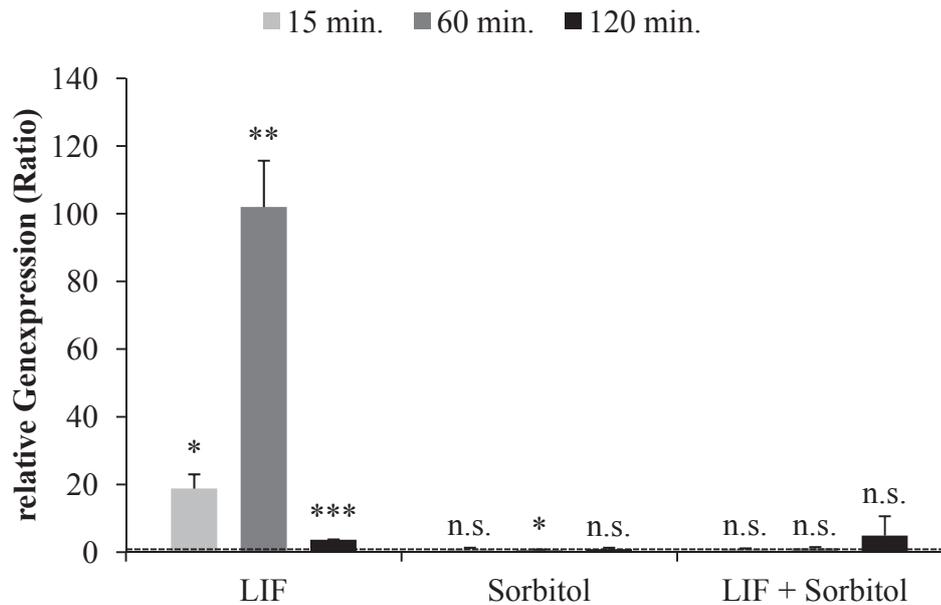


Abb. 3.34: Auswirkung von hyperosmolarem Stress durch Koinkubation mit Sorbitol auf die LIF induzierte zeitabhängige SOCS3-mRNA Expression in immortalisierten murinen Podozyten. Stimulation mit 10 ng/ml LIF, 0,5 M Sorbitol oder LIF + Sorbitol in Serum-freiem Medium für 15 min., 60 min. und 120 min (Negativkontrollen mit PBS und Hungermedium). Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, *** = $p \leq 0,001$ im Vrgl. zur Kontrolle, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (n = 3).

3.2.6 Expression von PIAS1 und PIAS3 in murinen Podozyten

Eine andere Protein-Familie, die über einen negativen Feedbackmechanismus die JAK-2/STAT3-Signaltransduktion in ihrer Endstrecke hemmen kann ist die Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS), dessen Vertreter PIAS1 und PIAS3 in diesem Abschnitt auf mRNA-Ebene in immortalisierten murinen Podozyten untersucht wurden. Die PIAS-Proteine interagieren mit Zytokin-abhängig aktivierten STAT3-Dimeren und inhibieren als Kofaktor die Aktivierung der Transkription durch STAT3.

Die murinen Podozyten wurden hierfür mit 10 ng/ml LIF für 2 h, 4 h und 8 h stimuliert (Abb. 3.35). Dabei konnte weder für PIAS1 noch für PIAS3 im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS ein erhöhtes mRNA-Expressionslevel beobachtet werden.

Unter 2 h LIF zeigt sich für PIAS1 eine Reduktion der relativen Expression um den Faktor $0,83 \pm 0,27$ ($p = 0,28$). Nach 4 und 8 h ist die Expression der PIAS1-mRNA, mit einer Standardabweichung von $\pm 0,20$ für 4 h ($p = 1,00$) und von $\pm 0,22$ für 8 h ($p = 0,82$), vergleichbar mit der Expression in der Negativkontrolle.

Während die Expression der PIAS3-mRNA im Vergleich zur Negativkontrolle nach 2 h LIF um den Faktor $0,62 \pm 0,28$ ($p = 0,07$) reduziert ist, kann nach 4 h ein durchschnittliches Expressionsniveau von Faktor $0,97 \pm 0,19$ ($p = 0,76$) und nach 8 h von Faktor $0,85 \pm 0,20$ ($p = 0,24$) gemessen werden.

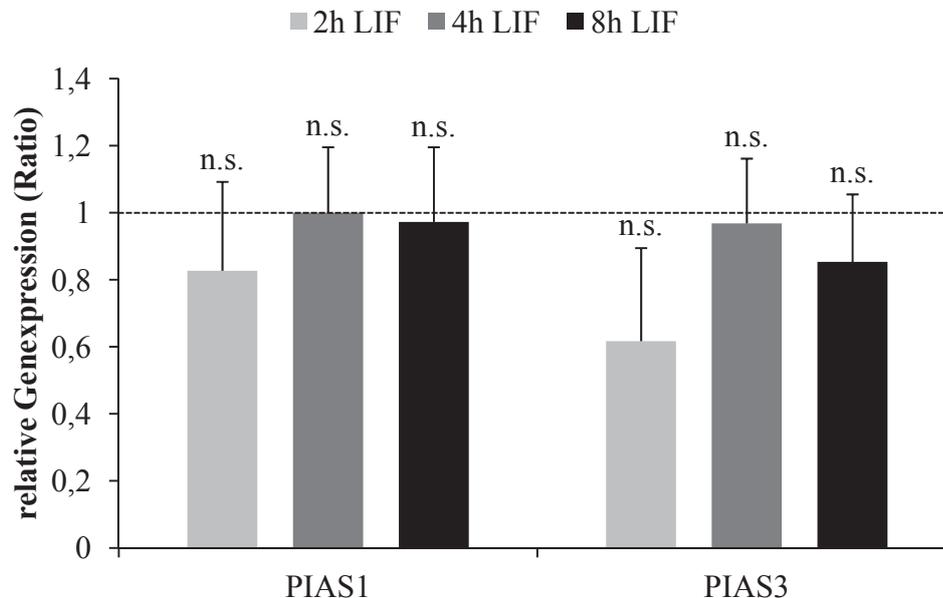


Abb. 3.35: Zeitabhängige Expression der PIAS1- und PIAS3-mRNA in immortalisierten murinen Podozyten unter LIF. Stimulation mit 10 ng/ml LIF (Negativkontrollen mit PBS) in Serum-freiem Medium für 2h, 4h und 8h. Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Linke Seite: PIAS1. Rechte Seite: PIAS3. Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 4$).

3.2.7 Expression des Transkriptionsfaktors Klf4 in murinen Podozyten

Zuletzt sollte herausgefunden werden, ob die Expression der Klf4-mRNA (Krüppel-like factor 4) unter LIF-Stimulation in murinen immortalisierten Podozyten beeinflusst werden kann. Mit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor verhindert das Klf4-Protein die Ausdifferenzierung und Proliferation beispielsweise in pluripotenten Stammzellen.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine Stimulation der murinen Podozyten mit 10 ng/ml LIF für 2 h, 4 h und 8 h durchgeführt (Abb. 3.36).

Es konnte keine statistisch signifikante Änderung der Klf4-mRNA-Expression beobachtet werden. Nach 2 h unter Stimulation mit LIF erhöhte sich die Expression im Mittel um den Faktor $1,72 \pm 1,12$ ($p = 0,29$), wobei die hohe Abweichung des

Mittelwertes durch einen Ausreißer der Ratio nach oben in einem der vier Versuche zustande kommt. Nach 4 h LIF-Stimulation ($p = 0,96$) zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle kein Unterschied im Expressionsniveau (Standardabweichung $\pm 0,32$), wohingegen eine längere Stimulation von 8 h einen geringen Anstieg um den Faktor $1,24 \pm 0,37$ ($p = 0,28$) bewirken konnte.

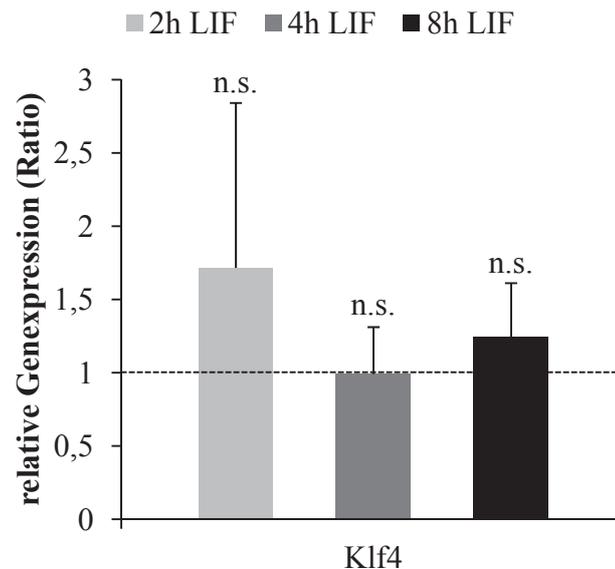


Abb. 3.36: Zeitabhängige Expression der Klf4-mRNA in immortalisierten murinen Podozyten unter LIF. Stimulation mit 10 ng/ml LIF (Negativkontrollen mit PBS) in Serum-freiem Medium für 2h, 4h und 8h. Dargestellt ist die relative, auf das endogene Referenzgen 18S normalisierte Genexpression (Ratio nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode) in Bezug auf die Negativkontrollen (Ratio von eins) als arithmetische Mittelwerte nach quantitativer Real Time PCR (arbiträre Einheiten). Die Gerade mit dem Achsenschnittpunkt (0/1) zeigt als Orientierung die Genexpression der Negativkontrollen an. Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben, n.s. = *non-significant* im Vrgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an ($n = 4$).

3.3 Funktionelle Analysen von Podozyten

Im nächsten Abschnitt wurde die funktionelle Auswirkung von LIF auf humane und murine immortalisierte Podozyten untersucht. Um die strukturelle Ebene der einzelnen Zelle zu beleuchten, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit der Darstellung des Aktinzytoskeletts durchgeführt (siehe 2.2.10). Des Weiteren wurde das Migrationsverhalten der Podozyten in Gegenwart von LIF im Wound-Scratch-Assay beobachtet (siehe 2.2.9).

3.3.1 Aktinzytoskelett-Organisation im Podozyten unter LIF-Stimulation

Für die Aufrechterhaltung der komplexen Morphologie und der Funktion des Podozyten spielt das Aktinzytoskelett die entscheidende Rolle. Es dient als strukturgebendes, wandelbares Gerüst mit Funktionen wie dem intrazellulären Transport, der Ausbildung von Zell- und Adhäsionskontakten, der Verankerung membranständiger Proteine und der Zellmigration. Die Grundlage für die Zellmotilität ist zum einen die in Migrationsrichtung gezielte Polymerisierung von G-Aktin (globuläres Aktin) zu F-Aktin (filamentäres Aktin) und zum anderen die Ausbildung von quer durch das Zellsoma verlaufenden kontraktile Aktinfibrillenbündeln (sogenannte *stress fibers*), die auf einer Interaktion mit Myosin-Proteinen basieren. Darüber hinaus sind Aktinfilamente in Fortsätzen von Zellen und damit auch in den Fußfortsätzen der Podozyten zu finden, welche *in vivo* an der Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran und der Verankerung der Podozyten an der glomerulären Basalmembran beteiligt sind.

Ob die Stimulation mit LIF mit einer Reorganisation von intrazellulären Aktinfilamenten und veränderter Ausprägung von Aktinstressfasern (*stress fibers*) einhergeht, sollte mittels direkter Immunfluoreszenz in immortalisierten humanen und murinen Podozyten untersucht werden.

Die Podozyten wurden hierfür zunächst für 15 min. mit LIF in aufsteigenden Konzentrationen von 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml stimuliert. Eine Negativkontrolle mit PBS-Inkubation wurde jeweils mitgeführt. Der Nachweis von intrazellulären Aktinfilamenten erfolgte mit Phalloidin-TRITC (orange-rote Fluoreszenz). Die Immunfluoreszenzaufnahmen beider Zelllinien sind in Abbildung 3.37 dargestellt.

Aktinzytoskelett: Konzentrationskinetik

Humane Podozyten

Während die Aktinstressfasern in der Negativkontrolle der humanen Podozyten noch dünn und kurz waren und in ihrer Anordnung zueinander kein Muster zu erkennen war, nimmt ihre Dichte, Länge und parallele Anordnung zueinander im Verlauf der Stimulation mit LIF zu. Unter 10 ng/ml LIF wird der Podozyt in seinem Durchmesser von den Aktinstressfasern von einer Seite der Plasmamembran zur gegenüberliegenden Seite durchzogen. Eine Erhöhung der LIF-Konzentration auf 25 und 50 ng/ml führte im Vergleich zur Stimulation mit 10 ng/ml LIF wieder zu einer leichten Verkürzung der Aktinstressfasern.

Murine Podozyten

In den murinen Podozyten fällt auf, dass die Aktinstressfasern in der Negativkontrolle schon relativ lang und parallel zueinander angeordnet waren. Ihre Enden erreichten jedoch nicht die Plasmamembran. In der Stimulation mit 2,5 ng/ml LIF waren die Aktinstressfasern etwas kürzer, an den Enden verdichtet und unterhalb der Plasmamembran konnte ein stärkeres Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Unter 5 ng/ml LIF wurden die Aktinstressfasern im Vergleich zur Stimulation mit 2,5 ng/ml LIF noch dichter und waren unter 10 ng/ml LIF dann in Bündeln angeordnet, kurz und dicht. Unterhalb der Plasmamembran konnte man in beiden Stimulationen (5 und 10 ng/ml LIF) sehr kurze Aktinfilamente, welche größtenteils parallel zu der Plasmamembran angeordnet waren, erkennen. Diese bildeten sich nach initialer Ausbildung in der weiteren Stimulation mit 25 ng/ml und 50 ng/ml LIF zurück und es dominierten kurze und dünnere Aktinstressfasern im Zentrum der Podozyten.

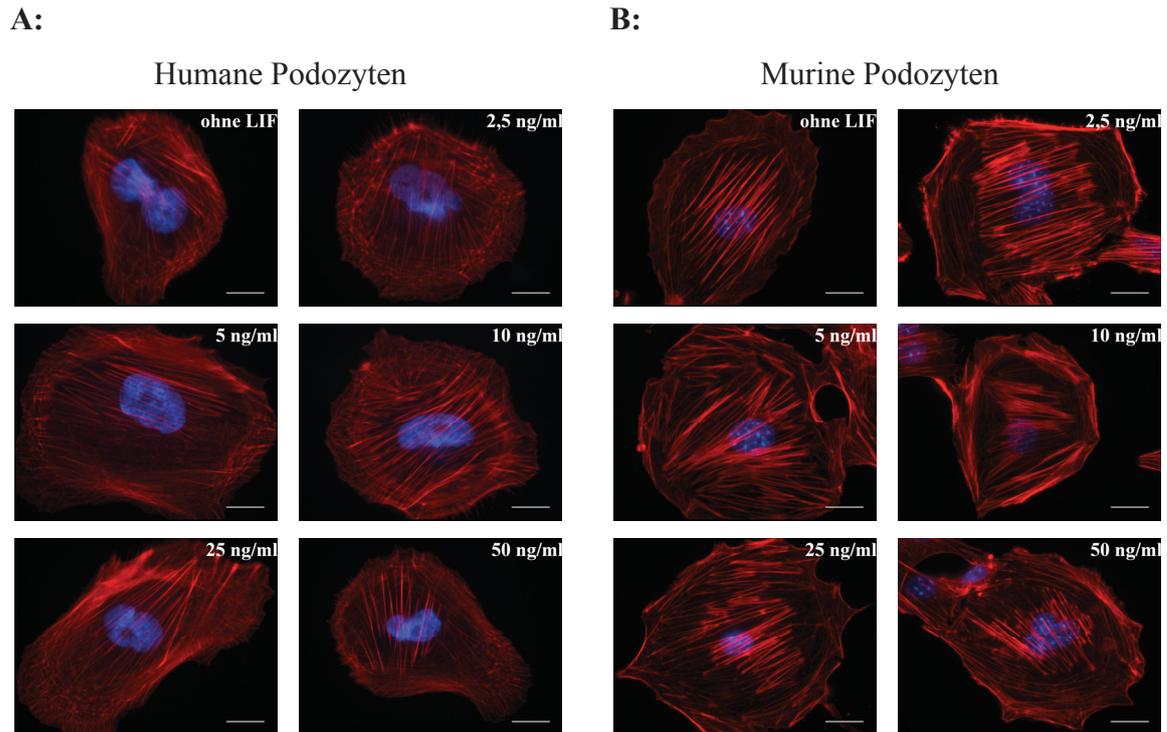


Abb. 3.37: Repräsentative Aufnahmen von intrazellulären Aktinfilamenten immortalisierter Podozyten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit LIF. Stimulation der humanen (A) und murinen (B) Podozyten mit 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 15 min. Die Inkubation der Negativkontrolle erfolgte mit PBS (*ohne LIF*). Färbung mit Phalloidin-TRITC (orange-rote Fluoreszenz); DAPI Kernfärbung (blaue Fluoreszenz). Aufnahmen mit Filtersatz 43 HE Cy 3 shift free (orange-rot; Expositionszeit 80 ms) und Filtersatz 49 DAPI shift free (blau; Expositionszeit 200 ms) in 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Maßstab 20µm.

Als Nächstes erfolgte eine zeitabhängige Stimulation der immortalisierten humanen und murinen Podozyten mit 10 ng/ml LIF für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. Die Negativkontrolle wurde jeweils mit PBS inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 zusammengefasst.

Aktinzytoskelett: Zeitkinetik

Humane Podozyten

In den humanen Podozyten erkennt man in der Negativkontrolle dünne, zueinander parallele Aktinstressfasern, die innerhalb der Zelle peripher lokalisiert sind. Nach 5 min. konnte ein auffallend intensives Fluoreszenzsignal beobachtet werden, das sehr kurze in der Peripherie gelegene Aktinstressfasern zeigte. Die Intensität des Fluoreszenzsignals nahm im Verlauf der weiteren LIF-Stimulation für 10 und 15 min. ab, die

Aktinstressfasern wurden länger und reichten von einer Seite der Plasmamembran zur gegenüberliegenden Seite. Nach 30 min. unter LIF verlagerten sich die im Vergleich zur 15-minütigen LIF-Stimulation etwas kürzeren Aktinstressfasern vermehrt in die Peripherie der Zelle und zeigten an der der Plasmamembran zugewandten Seite ein stärkeres Fluoreszenzsignal.

Murine Podozyten

In der Negativkontrolle der murinen Podozyten konnten zueinander parallele Aktinstressfasern im Zentrum der Zelle beobachtet werden, welche aber nicht bis zur Plasmamembran reichten. Nach 5 min. und 10 min. unter LIF konnte bezüglich der Morphologie der Aktinstressfasern keine Änderung im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden, lediglich das Fluoreszenzsignal war insgesamt stärker. Nach 15 min. waren die Aktinstressfasern kürzer als in der Negativkontrolle und etwas dichter. Die Stimulation mit LIF für 30 und 60 min. führte zu einer weiteren Erhöhung der Aktinstressfaser-Dichte und gleichzeitig zu ihrer Verkürzung.

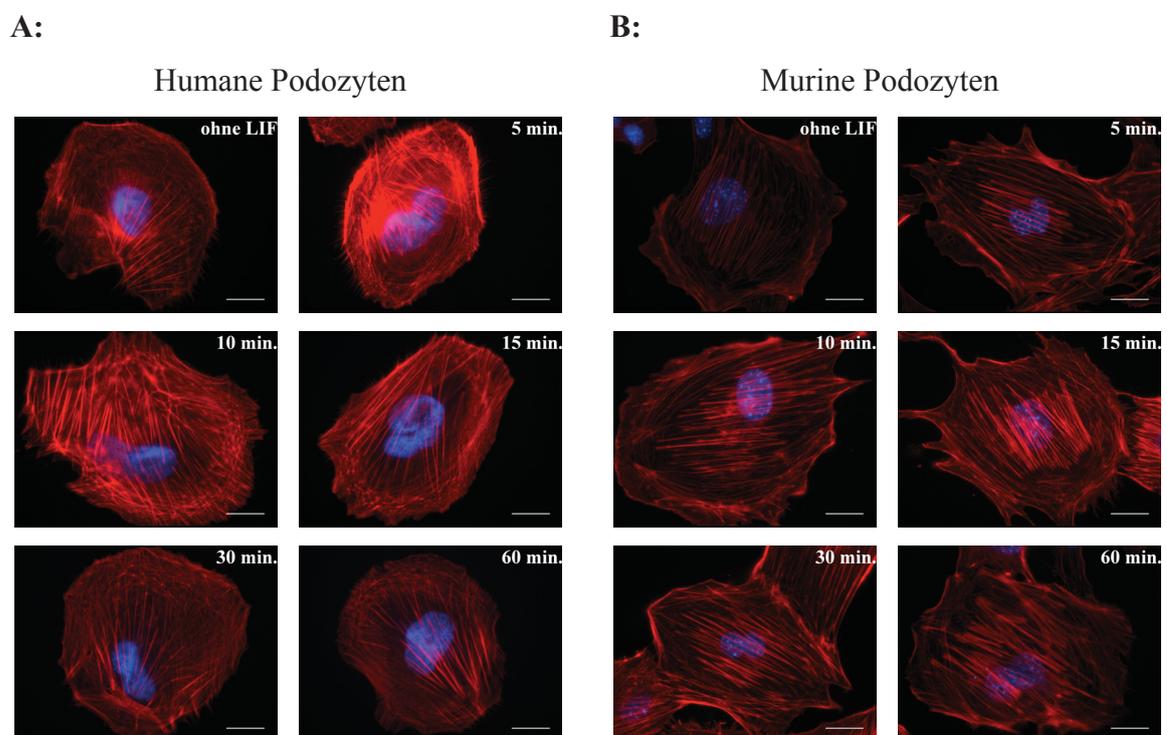


Abb. 3.38: Repräsentative Aufnahmen von intrazellulären Aktinfilamenten immortalisierter Podozyten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nach zeitabhängiger Stimulation mit LIF. Stimulation der humanen (A) und murinen (B) Podozyten mit 10 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. und 60 min. Die Inkubation der Negativkontrolle erfolgte mit PBS (*ohne LIF*). Färbung mit Phalloidin-TRITC (orange-rote Fluoreszenz); DAPI Kernfärbung (blaue

Fluoreszenz). Aufnahmen mit Filtersatz 43 HE Cy 3 shift free (orange-rot; Expositionszeit 80 ms) und Filtersatz 49 DAPI shift free (blau; Expositionszeit 200 ms) in 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Maßstab 20 μm .

3.3.2 Einfluss von LIF auf das Migrationsverhalten humaner Podozyten *in vitro*

Der Fokus dieses Abschnittes liegt auf dem Migrationsverhalten humaner immortalisierter Podozyten unter Stimulation mit LIF. Es stellte sich heraus, dass murine immortalisierte Podozyten unter experimentellen Bedingungen *in vitro* kaum Motilität zeigen. Daher wurde auf Migrationsanalysen dieser Zellen bewusst verzichtet. Die humanen Podozyten wurden hierzu wie in 2.2.1 beschrieben als nahezu konfluenter, einschichtiger Zellrasen in Rasterschalen kultiviert und ausdifferenziert. Darauf folgte die Durchführung des Wound-Scratch-Assays nach Protokoll. Als Zielparame-ter wurde die Größe der mechanisch gesetzten Wundfläche zu den Zeitpunkten 0 h, 10 h, 13 h und 16 h vermessen. Um den Effekt von LIF in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Wundheilung zu vergleichen, wurden die Podozyten jeweils mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 25 ng/ml LIF inkubiert. Außerdem wurde eine mit PBS stimulierte Negativkontrolle in gleicher Weise behandelt.

Ausgehend von einer anfänglichen Wundflächengröße von 100% konnte die Inkubation mit PBS (Negativkontrolle) nach 10 h eine signifikante Reduktion um $44,58\% \pm 8,12\%$ ($p = 0,01$), nach 13 h um $49,91\% \pm 6,70\%$ ($p = 0,01$) und nach 16 h um $47,53\% \pm 11,31\%$ ($p = 0,02$) bewirken.

Wurden die Podozyten mit 1 ng/ml LIF stimuliert, reduziert sich das Wundflächenareal im Vergleich zur Ausgangsgröße nach 10 h signifikant um $47,64\% \pm 6,60\%$ ($p = 0,001$), nach 13 h um $46,57\% \pm 11,31\%$ ($p = 0,004$) und nach 16 h um $57,51\% \pm 30,31\%$ ($p = 0,03$). Das bedeutet im Vergleich zur Negativkontrolle eine durchschnittlich stärkere Reduktion um $3,07\%$ ($p = 0,62$) nach 10 h und um $9,98\%$ ($p = 0,58$) nach 16 h durch die Stimulation mit 1 ng/ml LIF. Nach 13 h konnte in der Negativkontrolle eine höhere, aber statistisch nicht signifikante mittlere Reduktion um $3,35\%$ ($p = 0,65$) im Vergleich zur LIF-Stimulation mit 1 ng/ml gemessen werden.

Eine Erhöhung der LIF-Konzentration auf 10 ng/ml führt nach 10 h zu einer signifikanten Senkung der anfänglichen Wundflächengröße um $43,59\% \pm 13,65\%$ ($p = 0,01$), nach 13 h um $50,01\% \pm 29,82\%$ ($p = 0,04$) und nach 16 h um $58,19\% \pm 19,19\%$ ($p = 0,01$). Vergleicht man dies mit der Negativkontrolle, so wurde in der 10- und 13-

stündigen Stimulation mit 10 ng/ml LIF eine geringe Änderung der Wundflächengröße gemessen, nach 10 h eine Abnahme der Reduktion um 0,99% ($p = 0,91$) und nach 13 h eine Zunahme der Reduktion um 0,10% ($p = 1,00$). Der Effekt auf die Wundflächenreduktion ist nach 16 h Stimulation mit 10 ng/ml LIF um 10,66% ($p = 0,40$) stärker als in der Negativkontrolle.

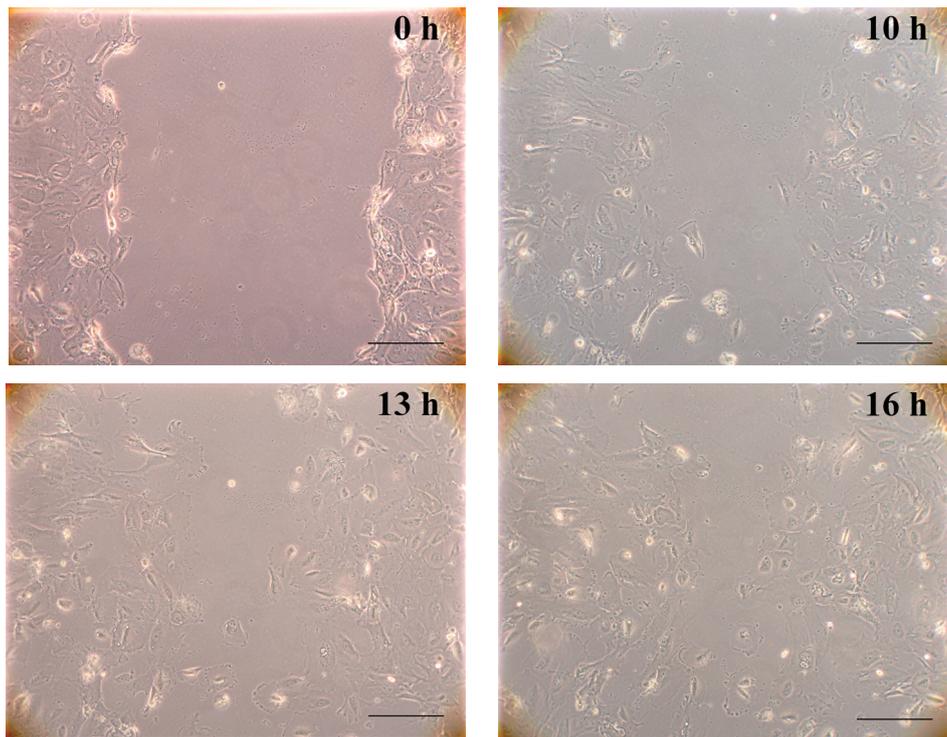
Unter Verwendung von 25 ng/ml LIF konnte die Wundfläche im Vergleich zu ihrer Größe direkt nach dem Setzen des Schadens durch das Einwandern der Zellen nach 10 h um $43,77\% \pm 6,77\%$ ($p = 0,001$), nach 13 h um $40,66\% \pm 10,60\%$ ($p = 0,005$) und nach 16 h um $57,98\% \pm 11,81\%$ ($p = 0,002$) signifikant verkleinert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle bedeutet dies eine Abnahme der Reduktion durch die Stimulation mit 25 ng/ml LIF um 0,81% ($p = 0,90$) nach 10 h und um 9,25% ($p = 0,22$) nach 13 h. Im Gegensatz dazu ist die Reduktion nach 16 h in der LIF-Stimulationsgruppe (25 ng/ml) um 10,45% ($p = 0,29$) höher als in der Negativkontrolle.

Somit hatte die Gegenwart von LIF in allen getesteten Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der humanen Podozyten. Dies konnte auch in hier nicht gezeigten Versuchen mit längeren Stimulationszeiten bestätigt werden.

Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass im Vergleich der eingesetzten LIF-Konzentrationen untereinander kein statistisch signifikanter Zusammenhang zur Intensität der Wundflächenreduktion der Podozyten existiert.

Beispielsweise ist nach 10 h unter Stimulation mit 25 ng/ml LIF die Reduktion der Wundfläche um 3,87% ($p = 0,44$) und nach 13 h um 5,90% ($p = 0,48$) geringer als unter Stimulation mit 1 ng/ml LIF. Eine Zunahme der Reduktion unter 25 ng/ml LIF um 0,47% ($p = 0,98$) konnte nach 16 h im Vergleich zur Stimulation mit 1 ng/ml LIF erzielt werden.

A:



B:

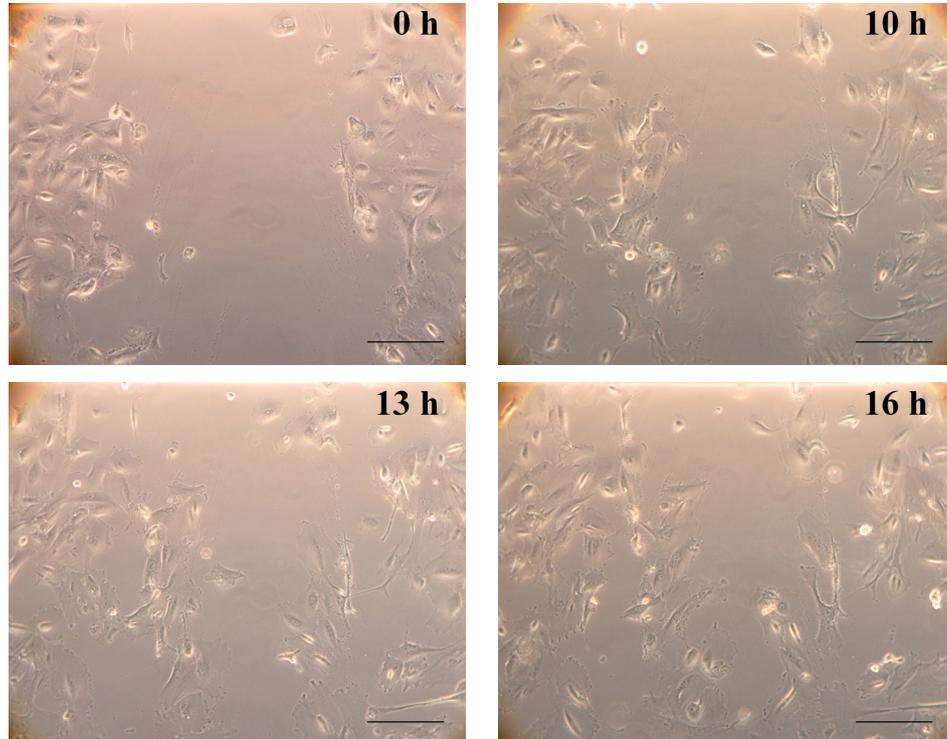


Abb. 3.39: Repräsentative Aufnahmen immortalisierter humaner Podozyten im Wound-Scratch-Assay mittels Phasenkontrast-Mikroskopie. Inkubation mit PBS (A) oder 10 ng/ml LIF (B) in Serum-freiem Medium für 0 h, 10 h, 13 h und 16 h. Der mechanisch induzierte längliche Defekt des Zellrasens

ist direkt nach dem Kratzen (Zeitpunkt 0 h) in der Mitte des jeweils ersten Bildes zu erkennen. Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung. Maßstab 100 μm .

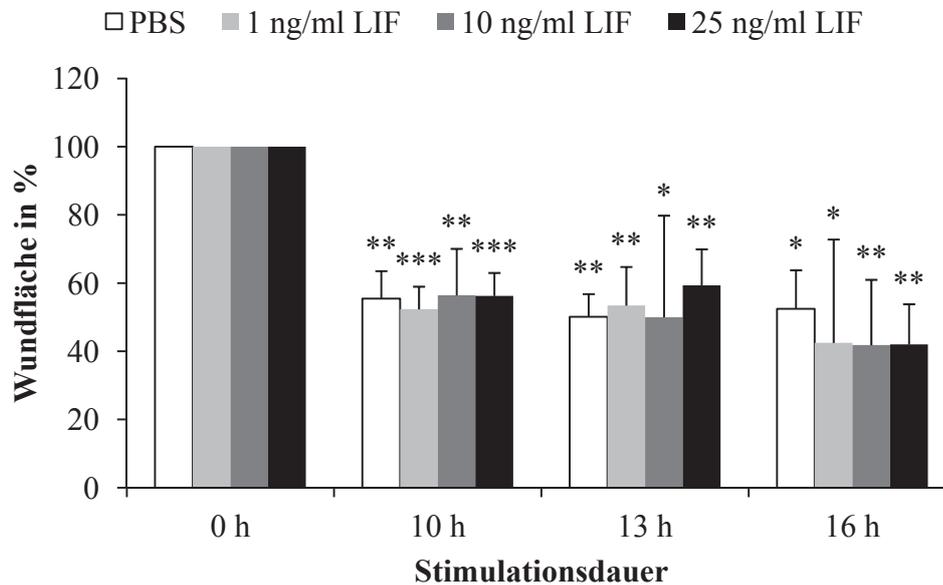


Abb. 3.40: Quantifizierung der Migration immortalisierter humaner Podozyten unter LIF-Stimulation im Wound-Scratch-Assay. Stimulation mit PBS (Negativkontrolle), 1 ng/ml, 10 ng/ml und 25 ng/ml LIF in Serum-freiem Medium für 0h, 10h, 13h und 16h. Dargestellt sind die Größen der Wundflächen in Prozent gegen die Stimulationsdauer in Stunden (Auswertung durch Wimasis GmbH). Statistische Auswertung mit dem zweiseitigen t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben; im Vergleich zum Ausgangswert (0h): * = $p \leq 0,05$ im Vrgl. zur Kontrolle, ** = $p \leq 0,01$ im Vrgl. zur Kontrolle, *** = $p \leq 0,001$ im Vrgl. zur Kontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an (Kontrolle: $n = 3$, LIF-Stimulationen: $n = 4$).

4. Diskussion und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass:

1. Immortalisierte Podozyten exprimieren die spezifischen Rezeptoren für LIF.
2. Exogenes LIF induziert eine stabile Aktivierung der JAK2/STAT3-, ERK1/2- und PI3K/AKT-Signalkaskaden.
3. Über JAK2/STAT3 führt LIF zur Regulation des SOCS3-Gens.
4. LIF hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Podozyten, induziert jedoch die Bildung von Stressfibers.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Zytokins LIF und dessen Bedeutung für die Signaltransduktion, Genregulation, Organisation des Aktinzytoskelettes und Migration in immortalisierten Podozyten. Die Untersuchungen basieren auf der Fragestellung nach potentiellen protektiven Eigenschaften von LIF zur Wiederherstellung der Podozytenfunktion nach einem schädigenden Einfluss. Kürzlich publizierte Daten von Xu und Kollegen weisen in mit LIF (für eine Stunde) vorbehandelten murinen Podozyten in Gegenwart von hohen Glukosekonzentrationen signifikant reduzierte ROS-Spiegel und eine signifikant niedrigere Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle ohne LIF-Stimulation nach (Xu et al., 2012). Dies ist ein Hinweis auf einen möglichen protektiven Einfluss von LIF im Podozyten.

Als Grundvoraussetzung für eine Interaktion von LIF mit den Podozyten konnte in der vorliegenden Arbeit der LIF-Rezeptorkomplex in humanen und murinen Podozyten auf mRNA-Ebene und in Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen werden. In Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen konnte beobachtet werden, dass LIF in humanen und murinen Podozyten mit einer selektiven Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden, jedoch einer besonders stabilen Aktivierung von STAT3, einhergeht. Infolgedessen zeigte aktiviertes STAT3 seine Transkriptionsaktivität in Real Time PCR Analysen von murinen Podozyten über eine Hochregulation von Effektorgenen. Die stärkste Wirkung konnte in der Hochregulation der SOCS3-mRNA als negativer Feedbackmechanismus für die Signalübertragung gesehen werden. Des Weiteren konnte in Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen in murinen Podozyten ein anhaltender, aktivierender Einfluss von oxidativem und hyperosmolarem Stress auf die LIF-abhängige STAT3-Signalübertragung beobachtet werden. Die LIF-Stimulation konnte

zudem in Immunfluoreszenzanalysen mit strukturellen Veränderungen des Aktinzytoskelettes von humanen und murinen Podozyten in Zusammenhang gebracht werden. Die Analyse der Motilität von humanen Podozyten im Wound-Scratch-Assay deutet hingegen auf keinen eindeutigen migrationsfördernden Effekt von LIF.

4.1 Podozyten exprimieren den LIF-Rezeptorkomplex

Das Zytokin LIF entfaltet seine biologische Wirkung über einen membranständigen Rezeptorkomplex, der von den beiden Untereinheiten LIFR und gp130 gebildet wird (Heinrich et al., 2003). Anhand der vorliegenden Daten konnte sowohl in humanen als auch in murinen Podozyten durch Immunfluoreszenzfärbungen die LIF-bindende Rezeptoruntereinheit LIFR beobachtet werden. In Real-Time-PCR Analysen von humanen und murinen Podozyten wurde ebenfalls eine Expression des LIFR und der signalübertragenden Untereinheit gp130 unabhängig von der LIF-Stimulation nachgewiesen.

In vorausgehenden Studien konnte der LIF-Rezeptorkomplex unter anderem bereits in menschlichen Oozyten (van Eijk et al., 1996) und embryonalen Stammzellen der Maus nachgewiesen werden (Ginis et al., 2004).

Das gp130 ist die gemeinsame Untereinheit aller Rezeptorkomplexe der IL-6-Familienmitglieder (Kishimoto et al., 1995). Darin begründen sich die teilweise überschneidenden biologischen Wirkungen der Zytokinfamilie auf unterschiedliche Zelltypen. Der LIF-Rezeptorkomplex kann auch durch weitere IL-6-Familienmitglieder wie dem CNTF, Cardiotrophin-like cytokine (CLC) oder dem humanen OSM aktiviert werden. Dies setzt im Fall von CNTF und CLC jedoch eine vorherige Bindung an einen Korezeptor voraus (Plun-Favreau et al., 2001).

Während das gp130 ubiquitär exprimiert wird (Hibi et al., 1990), wird die Expression des LIFR gewebespezifisch reguliert. Eine Studie von 2003 konnte zeigen, dass sowohl der LIFR, als auch das gp130 eine messbare Affinität zu LIF haben (Boulangier 2003). Allerdings ist die Affinität von LIF zum LIFR höher als die Affinität von LIF zu gp130, was auf eine primäre Interaktion von LIF mit dem LIFR deutet (Giese et al., 2005). Kommt es an der LIFR-Untereinheit zu einer Bindung von LIF, so führt dies infolgedessen zu einer Heterodimerisierung mit der signalübertragenden Untereinheit gp130 und der Übertragung eines intrazellulären Signals (Gearing, 1993). In Abwesenheit von LIF findet hingegen kaum Heterodimerisierung und somit auch keine

Signalübertragung über gp130 statt. Das macht das Vorhandensein aller drei an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten essenziell für eine zelluläre Antwort.

LIF induziert keine auto-/parakrine Expressionssteigerung von LIF- und CNTF-mRNA

In der vorliegenden Arbeit wurden die immortalisierten Podozyten durch exogen zugeführtes LIF stimuliert und ihre Antwort auf diesen Stimulus untersucht. Es stellte sich die Frage, ob es darüber hinaus noch eine auto- oder parakrine LIF-mRNA Expressionssteigerung im Podozyten zur Potenzierung der LIF-Einwirkung gibt.

Eine Induktion von weiteren Zytokinen wie dem IL-1 β , IL-6 und IL-8 ist für LIF bereits in humanen Chondrozyten und humanen Monozyten auf mRNA-Ebene beschrieben worden (Villiger et al., 1993). In diesem Rahmen sollte in Podozyten ebenfalls eine mögliche Hochregulation von CTNF-mRNA untersucht werden, da für CNTF genauso wie für LIF eine protektive Funktion, vor allem im zentralen Nervensystem (Louis et al., 1993), vermutet wird und das CNTF durch den in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersuchten Korezeptor CNTFR α über den LIF-Rezeptorkomplex wirken kann. Die Genexpressionsanalysen in murinen Podozyten haben keine verstärkte Expression der LIF- und CNTF-mRNA im Sinne einer autokrinen oder parakrinen Sekretion unter LIF-Stimulation für 2 h, 4 h und 8 h gezeigt.

Ähnliche Ergebnisse konnten in einer Studie mit Mesangiumzellen von Ratten demonstriert werden (Hartner et al., 1995). Hartner und Kollegen fanden heraus, dass LIF-mRNA zwar durch die Einwirkung von beispielsweise IL-1 β , FBS oder LPS nach 3-5 Stunden verstärkt exprimiert wird, jedoch wie in den vorliegenden Daten nicht durch die Einwirkung von exogenem LIF selbst hochreguliert werden kann. Zudem konnte in den Mesangiumzellen über einen Zeitraum von 3-5 Stunden ebenso keine Änderung in der detektierten Expression des LIF Rezeptors durch LIF beschrieben werden.

Insgesamt hat der Podozyt somit durch den LIF-Rezeptorkomplex das Potential auf LIF zu reagieren, allerdings bewirkt dies keinen auto- oder parakrinen Effekt zur Potenzierung der Wirkung. Somit sind die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Effekte von LIF auf die immortalisierten Podozyten wahrscheinlich ausschließlich auf das exogen zugeführte LIF zurückzuführen. Es bleibt aber nicht ausgeschlossen, dass weitere extrazelluläre Mediatoren oder ein verändertes Mikromilieu während

pathologischer Umgebungsvorgänge im Podozyten eine auto-/parakrine LIF-Sekretion induzieren könnten.

4.2 LIF führt zu einer Signaltransduktion und Genexpression im Podozyten

Die LIF-induzierte Heterodimerisierung des LIF-Rezeptorkomplexes führt in immortalisierten humanen und murinen Podozyten zu einer Aktivierung von nachgeschalteten Signalkaskaden und gesteigerter Expression von Effektorgenen. Es wurden die in der Literatur beschriebenen Signalkaskaden, welche von Zytokinen der IL-6-Familie aktiviert werden, untersucht. Diese sind zum einen die MAP-Kinasen ERK1/2 (Schiemann und Nathanson, 1994) und p38 (Bode et al., 2001), und zum anderen PKB/AKT (Oh et al., 1998) und JAK/STAT3 (Heinrich et al., 2003).

Durch die Stimulation der Podozyten mit LIF konnte sowohl eine Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade, als auch der PI3K/AKT-Signalkaskade gezeigt werden. Eine besonders stabile Signaltransduktion wurde in der JAK-2/STAT3-Aktivierung mit selektiver Steigerung der SOCS3-Expression zur Gegenregulation gesehen.

ERK1/2-Signaltransduktion

Das Ausmaß der ERK1/2-Aktivierung ist in den vorliegenden Western Blot Analysen in murinen immortalisierten Podozyten insgesamt höher als in den humanen immortalisierten Podozyten. Während in den humanen Podozyten kein signifikanter Effekt von LIF auf die Aktivierung der ERK1/2-Kinasen beobachtet werden konnte, war in murinen Podozyten eine signifikante, parallel zur verwendeten LIF-Konzentration ansteigende ERK1/2 Aktivierung zu beobachten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Engelbrecht und Kollegen beim Vergleich der Dexamethason-vermittelten Hemmung der ERK1/2-Aktivierung in einer Zelllinie muriner (MBA-15.4) und humaner Osteoblasten (MG-63) (Engelbrecht et al., 2003). Eine signifikante Änderung der ERK1/2-Aktivierung zeigte sich lediglich in der zeitabhängigen Dexamethason-Stimulation der murinen Osteoblasten.

Durch den Einsatz eines MEK1/2-Inhibitors konnte sowohl in humanen als auch in murinen immortalisierten Podozyten gezeigt werden, dass die zeitabhängige Aktivierung von ERK1/2 durch LIF inhibiert werden kann. Dies bedeutet, dass MEK1/2

im Folgeschritt der MAPK-Signalkaskade für die Phosphorylierung von ERK1/2 im Podozyten verantwortlich ist und es zu keiner Kreuzaktivierung durch andere Kinasen kommt.

Wang und Kollegen konnten in Hepatoma-H35-Zellen von Ratten ähnliche Ergebnisse erzielen. In einer konzentrationsabhängigen Stimulation mit LIF für 15 Minuten konnten sie im Western Blot eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2 unter 10 ng/ml LIF und eine noch stärkere unter 100 ng/ml LIF nachweisen (Wang et al., 2000). Niedrigere LIF-Konzentrationen von 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml oder 1 ng/ml LIF zeigten in den Hepatoma-Zellen nur einen geringen Effekt auf die ERK1/2-Aktivierung. Diese Ergebnisse deuten wie in der konzentrationsabhängigen LIF-Stimulation der murinen Podozyten auf eine zur LIF-Konzentration annähernd proportionale ERK1/2-Aktivierung. Wang und Kollegen konnten zusätzlich in einer zeitabhängigen Stimulation der Hepatoma-Zellen mit 100 ng/ml LIF eine rasche ERK1/2-Phosphorylierung nach 5 und 15 Minuten nachweisen, welche in der weiteren Stimulation von bis zu 120 Minuten nicht mehr nachweisbar war. Darüber hinaus fanden sie heraus, dass die Signalübertragung in die Zellen durch das gp130 limitiert wird und nicht durch die LIFR-Menge steigerbar war, was wiederum die Notwendigkeit beider Komponenten unterstreicht.

Eine Aktivierung der ERK1/2- und AKT-Signaltransduktion durch intrazellulär erhöhte ROS-Spiegel beziehungsweise extrazelluläres Angiotensin II scheint im Sinne eines Anpassungsmechanismus in Podozyten von Ratten zur Hypertrophie der Zellen beitragen zu können (Kim et al., 2006). In renalen Tubuluszellen von Mäusen konnte eine Aktivierung von ERK1/2-Kinasen zusammen mit einem erhöhten Zellüberleben unter oxidativem Stress beobachtet werden (di Mari et al., 1999). Somit könnte für die ERK1/2-Kinasen auch in den Podozyten eine insgesamt protektive Eigenschaft spekuliert werden.

Die Signalübertragung von LIF über die ERK1/2-Kinasen spielt in humanen Podozyten wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle und scheint vielmehr in den murinen Podozyten eine Funktion in der Zelle einzunehmen. Der Aktivierung von ERK1/2-Kinasen werden im Allgemeinen wichtige biologische Eigenschaften für die Regulation des Zellwachstums, des Zellüberlebens und der Differenzierung zugeschrieben, diese sind jedoch abhängig von weiteren Umgebungsfaktoren und den Zelltypen. Welche

Auswirkung die LIF-induzierte ERK1/2-Aktivierung schließlich auf die murinen Podozyten haben könnte, wird Gegenstand weiterer Studien sein.

PI3K/AKT-Signaltransduktion

Eine alternative und schnelle Signalübertragung durch LIF konnte in der Aktivierung von AKT in beiden Podozyten-Zelllinien im Western Blot beobachtet werden. Interessanterweise reagieren humane immortalisierte Podozyten im Vergleich zu den murinen immortalisierten Podozyten mit einer viel sensitiveren Aktivierung der AKT-Signaltransduktion auf exogenes LIF. In Inhibitorversuchen konnte durch die selektive Blockade der AKT-Phosphorylierung durch den Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitor LY294002 nachgewiesen werden, dass die LIF-abhängige Aktivierung von AKT im Podozyten nicht durch Kreuzaktivierungen zustande kommt.

In Oligodendrozyten von Ratten wurde eine vergleichbar intensive, jedoch später ansteigende AKT-Aktivierung durch 15 ng/ml LIF mit Beginn nach 5 Minuten und einem Maximum nach 30 Minuten beobachtet (Slaets et al., 2008). Durch die kurze Beobachtungsdauer der Oligodendrozyten für insgesamt 30 Minuten bleibt jedoch unklar, ob die AKT-Aktivierung noch weiter anhält oder wieder abfällt. Slaets und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass LIF die TNF- α induzierte Apoptoserate in Oligodendrozyten senken und die Level von 14-3-3 Proteinen, welche proapoptotische Moleküle neutralisieren können, erhöhen kann. Da die ERK1/2-Signalkaskade in den Oligodendrozyten und die Expression von SOCS-mRNA und Bcl-2-mRNA (Effektorgene von STAT3) von LIF unbeeinflusst blieben, könne der neuroprotektive Effekt von LIF möglicherweise mit der AKT-Aktivierung assoziiert sein.

Die AKT-Achse konnte in zahlreichen Studien mit einer Verbesserung des Zellüberlebens nach deren Exposition gegenüber Noxen in Zusammenhang gebracht werden und könnte somit möglicherweise auch einen protektiven Effekt in Podozyten haben. Eine Studie von Negoro und Kollegen konnte zeigen, dass die LIF-abhängige AKT-Aktivierung in Kardiomyozyten die Doxorubicin-induzierte Apoptoserate senken kann (Negoro et al., 2001). Auch für Podozyten gibt es erste Hinweise auf einen protektiven Effekt durch die Aktivierung der AKT-Signaltransduktion nach Exposition gegenüber Noxen. Eine Studie von 2005 beschreibt in kultivierten humanen Podozyten

eine verminderte Etoposid-induzierte Apoptoserate nach Aktivierung der AKT-Kaskade durch Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) (Bridgewater et al., 2005).

Generell wird die PI3K/AKT-Signaltransduktion mit einer antiapoptotischen Wirkung assoziiert (Franke et al., 1997, Amaravadi und Thompson, 2005). Die schnelle Signalübertragung von LIF über die AKT-Kaskade könnte somit für die Regulation der Podozytenfunktion in Hinblick auf das Überleben gegenüber schädigenden Einflüssen eine wichtige, wenn auch noch wenig bekannte, Rolle spielen.

p38 MAPK-Signaltransduktion

Die p38-MAPK wird meist durch Stressstimuli aktiviert. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der p38-Signalkaskade durch TNF- α nachfolgend zu einer gesteigerten LIF-mRNA-Expression in der Netzhaut des Auges führt (Agca et al., 2013). Für die Hochregulation von LIF wurde in der Netzhaut bereits eine neuroprotektive Funktion beschrieben (Leibinger et al., 2009).

Die vorliegende Arbeit zeigt keinen Effekt von exogen zugeführtem LIF auf die podozytäre p38-Signaltransduktion. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von Aubert und Kollegen, die in kultivierten Präadipozyten ebenfalls keine Aktivierung von p38 durch die Stimulation mit 10 ng/ml LIF beobachten konnten (Aubert et al., 1999). Da die p38-Signalkaskade oft in Zusammenhang mit der Entstehung von Apoptose beschrieben worden ist (Kummer et al., 1997), könnte bei der fehlenden Aktivierung durch LIF in Podozyten eher von einer vorteilhaften Reaktion ausgegangen werden, da das LIF alleine scheinbar keine Stressreaktion auslöst.

JAK-2/STAT3-Signaltransduktion

Ein wichtiger Weg der Übertragung von Signalen auf die Zelle durch LIF führt über die JAK-2/STAT3-Kaskade (Hirano et al., 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt in murinen und humanen immortalisierten Podozyten eine besonders stabile Signaltransduktion durch die Aktivierung der JAK-2/STAT3-Kaskade durch LIF. In der Präinkubation der immortalisierten Podozyten mit verschiedenen Inhibitoren konnte eine Minderung der LIF-abhängigen STAT3-Aktivierung durch den JAK-2-Inhibitor AG490 nachgewiesen

werden. Somit wird die Phosphorylierung von STAT3 ohne vorherige Kreuzaktivierung über aktiviertes JAK-2 vermittelt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie von 2008, in der eine schnelle und intensive Aktivierung von STAT3 durch LIF in Makrophagen der Maus gezeigt werden konnte (Hendriks et al., 2008). Hendriks und Kollegen interpretierten dies zusammen mit der in Gegenwart von LIF verminderten Sekretion von Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und ROS durch Makrophagen als einen möglichen protektiven Effekt von LIF in Entzündungsprozessen.

Die Daten von Kuratsune und Kollegen zeigen in Ratten nach unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) eine Aktivierung von STAT3 in Tubuluszellen und Myofibroblasten der Niere (Kuratsune et al., 2007). Dadurch komme dem STAT3 eine wichtige regulatorische Bedeutung in Regenerationsprozessen der Niere im Sinne eines fibrotischen Umbaus zu.

Eine Aktivierung von STAT3 konnte auch in murinen embryonalen Stammzellen durch die Stimulation mit 1000 U/ml LIF nachgewiesen werden (Tighe und Gudas, 2004). Die Bedeutung der STAT3-Aktivierung für die murinen embryonalen Stammzellen liegt in dem Erhalt der Pluripotenz (Matsuda et al., 1999). Falls solch ein Effekt von LIF auch im Podozyten existiert, könnte dies ein wichtiger regenerativer Mechanismus für die terminal differenzierten Podozyten und Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Die Signalübertragung über JAK-2/STAT3 ist an vielen biologischen Zellvorgängen beteiligt und kann durch verschiedene Effektoren angeregt werden. Abhängig von der Umgebung der Zelle und dem Zelltyp können dadurch unterschiedliche Funktionen für die Zellhomöostase ausgeübt werden. So ist das STAT3 beispielsweise in der frühen Embryogenese von Mäusen essenziell für das Überleben des Embryos (Takeda et al., 1997). Auch auf zellulärer Ebene spielt es durch Genregulation und Inhibition des antiapoptotischen NF-kappaB eine Rolle für das Überleben und die Apoptose der Zelle (Battle und Frank, 2002). Durch die Kontrolle von Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung kommt dem STAT3 andererseits auch eine Rolle in der Onkogenese zu. In Zusammenschau deutet die aktuelle Studienlage auf ein protektives und regeneratives Potential von aktiviertem STAT3 (Lee et al., 2004), welches auch für die biologische Funktion von LIF in Podozyten denkbar wäre.

Phosphorylierte und somit aktivierte STAT3-Dimere wandern in den Zellkern und regulieren dort nach Bindung an die DNA die Expression verschiedener Effektorgene

(Heim, 1999). In den vorliegenden Immunfluoreszenzanalysen von humanen immortalisierten Podozyten zeigt die Stimulation mit LIF eine Translokation von Gesamt-STAT3 und Phospho-STAT3 in den Zellkern. Die LIF-abhängige Translokation von aktivierten STAT3-Dimeren in den Zellkern konnte auch beispielsweise schon in Adipozyten von Ratten (Stephens et al., 1998) und olfaktorischen Rezeptorneuronen von LIF-defizienten Mäusen (Moon et al., 2002) gezeigt werden.

Zu den potentiellen Effektorgenen von aktivierten STAT3-Dimeren gehören unter anderem die Proteine der SOCS-Familie (Mertens und Darnell, 2007). SOCS-Proteine regulieren das Ausmaß der LIF-induzierten Signalübertragung durch STAT3 über ein negatives Feedback. Unter den zahlreichen SOCS-Proteinen ist vor allem das SOCS3 als Effektorgen für aktivierte STAT3-Dimere bekannt für eine hemmende Interaktion mit dem Zytokinrezeptorkomplex (Babon und Nicola, 2012).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass LIF in murinen immortalisierten Podozyten zu einer gesteigerten, nach 12 h maximalen Expression von SOCS3-mRNA führt. Im Rahmen der Versuchsreihe zu exogenem Stress (durch H₂O₂ bzw. Sorbitol) konnte zusätzlich nach 1 h ein früher Peak der SOCS3-mRNA-Expression unter LIF nachgewiesen werden. Dagegen ist die Expression von SOCS1-mRNA in den murinen immortalisierten Podozyten unter Einwirkung von LIF nicht erhöht.

In Einklang dazu zeigte eine Studie mit Oligodendrozyten von Ratten durch die Stimulation mit 10000 U/ml LIF ebenfalls keine Änderung der Expression von SOCS1-mRNA über einen Zeitraum von 0,5 - 4 h (Emery et al., 2006). Im Gegensatz dazu war die Expression der SOCS3-mRNA in den Oligodendrozyten nach 30 Minuten unter LIF maximal gesteigert und auch nach 1 h noch erhöht und nach 2 und 4 h unter LIF wieder reduziert. Durch die kürzere Beobachtungsdauer der Oligodendrozyten bleibt unklar, ob ein zweiter Anstieg der SOCS3-mRNA-Expression wie in den vorliegenden Daten zu erwarten ist. Darüber hinaus fanden Emery und Kollegen heraus, dass der protektive Effekt von LIF auf die IFN- γ -induzierte Zytotoxizität in Oligodendrozyten unabhängig von der SOCS-Expression war.

In Neuroepithelialen Zellen (Neuroepithelial Cells, NECs) der Maus konnte durch 50 ng/ml LIF nach 3 h ein Anstieg und nach 6 h ein noch höherer Anstieg der SOCS3-mRNA-Expression beobachtet werden (Fukuda et al., 2007). Das Korrelat auf

Proteinebene zeigte in den NECs zusätzlich nach 1 h noch einen frühen SOCS3-Peak. Diese zwei Peaks sahen Fukuda und Kollegen auch in der Phosphorylierung von STAT3 auf Proteinebene: Der erste Peak zeigte sich nach 30 Minuten unter LIF, ein zweiter Anstieg konnte innerhalb von 6 h beobachtet werden. Fukuda und Kollegen fanden in ihrer Studie heraus, dass LIF in SOCS3-defizienten NECs durch dauerhaft aktiviertes STAT3 und Smad1 (Mothers against decapentaplegic homolog 1 Protein) zur Ausdifferenzierung in Astrozyten führt. Die regulatorische Funktion von SOCS3 auf das Zellüberleben konnte zusätzlich in murinen embryonalen Stammzellen gezeigt werden, hier führte eine Überexpression von SOCS3 zu verminderter LIF-abhängiger Genexpression und vermehrtem Zelltod (Duval et al., 2000).

So scheint SOCS3 je nach Ausmaß der Aktivierung eine wichtige Funktion für das zelluläre Überleben zu haben und biologische Prozesse wie die Differenzierung zu beeinflussen. Die Bedeutung dieser negativen Regulationsschleife über LIF-abhängig exprimiertes SOCS3 für den Podozyten muss noch weiter untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt in murinen immortalisierten Podozyten unter Einfluss von exogenen Stressfaktoren wie Wasserstoffperoxid und Sorbitol im Western Blot im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante über einen längeren Zeitraum persistierende LIF-abhängige STAT3-Aktivierung. Gleichzeitig konnte eine anhaltende nukleäre Lokalisierung von STAT3 und Phospho-STAT3 durch die Kostimulation mit LIF und H₂O₂ bzw Sorbitol gezeigt werden. Im Gegensatz dazu führte LIF alleine zu einer raschen und vorübergehenden STAT3-Aktivierung und Translokation von STAT3 und Phospho-STAT3 in den Zellkern, wohingegen H₂O₂ bzw Sorbitol alleine keine Effekte zeigten. Die entsprechenden Real-Time-PCR Daten zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle nach 60 Minuten LIF einen signifikanten Peak in der mRNA-Expression von SOCS3. Dieser Peak erscheint in zeitlicher Latenz zu der maximalen Aktivierung von STAT3 durch LIF, was den regulatorischen Einfluss von SOCS3 auf die JAK-2/STAT3-Signalkaskade unterstreicht. Eine Studie von Bluysen und Kollegen konnte diese Latenz bereits in mit IL-6 stimulierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen zeigen (Bluysen et al., 2010). Im Gegensatz dazu konnten H₂O₂ bzw Sorbitol alleine oder die Kombination aus LIF und H₂O₂ bzw Sorbitol in dem beobachteten Zeitraum in murinen immortalisierten Podozyten keine signifikante Steigerung der SOCS3-Expression bewirken.

Kürzlich publizierte Studien zeigen ähnliche Beobachtungen in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) unter gleichen Stimulationsbedingungen (Ng et al., 2014b, Ng et al., 2014a). Im Vergleich zu den vorliegenden Daten konnten Ng und Kollegen jedoch durch die Kostimulation mit LIF und H₂O₂ eine STAT3-abhängige Expression von SOCS3 in MEF nachweisen. Dies konnte durch die Kostimulation der MEF mit LIF und Sorbitol nicht gezeigt werden.

Wie lange die in den vorliegenden Ergebnissen prolongierte STAT3-Aktivierung unter Kostimulation andauert und ob die Expression von SOCS3 mit zeitlicher Latenz noch ansteigt, müsste in weiteren Untersuchungen beobachtet werden.

Im Allgemeinen wirken H₂O₂ und Sorbitol durch die Bildung von intrazellulären ROS zytotoxisch und können den vorliegenden Ergebnissen zufolge als Stressfaktoren in Podozyten alleine keine STAT3-Aktivierung induzieren. Somit könnte der Aktivierung von STAT3 durch LIF, und besonders in Gegenwart von H₂O₂ bzw Sorbitol und somit in Situationen mit oxidativem bzw hyperosmolarem Stress, eine protektive Funktion in Podozyten zugeschrieben werden.

Die Bedeutung von prolongiert aktiviertem STAT3 scheint von zahlreichen Faktoren wie dem Zelltyp und dem Mikromilieu abhängig zu sein. So konnte in vielen humanen Krebsarten bereits ein onkogenes Potential von dauerhaft aktiviertem STAT3 beobachtet werden (Yoshimura, 2006). Neben der Förderung von Zellproliferation und Hemmung von Apoptose hat aktiviertes STAT3 in einigen Zelltypen auch proapoptotische Eigenschaften. In MEF konnte durch verlängert aktiviertes STAT3 ein proapoptotischer und wachstumshemmender Effekt von LIF beobachtet werden, wenn SOCS3 durch eine Hemmung nicht exprimiert wird (Lu et al., 2006).

Wenn aktiviertem STAT3 eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben werden kann, so könnte eine verlängerte Aktivierung als protektiver Mechanismus in Podozyten unter Stressstimuli interpretiert werden. Denkbar wäre, dass LIF und H₂O₂ beziehungsweise Sorbitol in dieser Situation möglicherweise eine synergistische oder potenzierende Wirkung haben oder dass LIF eine länger dauernde Regulation in Zellen, die unter Stress stehen, einnimmt.

Eine prolongierte Aktivierung von STAT3 zeigte sich auch bei Zellschäden, verschiedenen Krebserkrankungen und im Entzündungsgeschehen (Levy und Darnell, 2002, Jove, 2012, Garcia et al., 2001). So könnten auch für prolongiert aktiviertes

STAT3 in Podozyten während Stresssituationen durch H₂O₂ oder Sorbitol vielfältige und möglicherweise gegenteilige Effekte von LIF diskutiert werden.

Ein weiterer wichtiger negativer Regulationsmechanismus besteht in der Blockierung der DNA Bindungsaktivität von STAT3-Dimeren durch PIAS-Proteine. Die vorliegenden Daten zeigen keine Änderung der mRNA-Expression von PIAS1 und PIAS3 in murinen Podozyten durch die Stimulation mit LIF.

Klf4 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem für den Erhalt der Pluripotenz von kultivierten Stammzellen bekannt ist. Eine Studie von Li und Kollegen zeigt, dass LIF die Expression von Klf4 und SOCS3 in embryonalen Stammzellen der Maus erhöht, dabei sei das SOCS3 für die Differenzierung und das Klf4 für den Erhalt der Pluripotenz verantwortlich (Li et al., 2005). In murinen immortalisierten Podozyten konnte keine erhöhte Expression von Klf4 unter LIF-Stimulation nachgewiesen werden. Dies könnte auf den hohen Differenzierungsgrad der Podozyten zurückgeführt werden.

4.3 LIF beeinflusst das Aktinzytoskelett des Podozyten

Die Ausprägung und Modulation des Aktinzytoskeletts ist unter Anderem essenziell für die breitflächige Haftung der podozytären Fußfortsätze an der glomerulären Basalmembran, wodurch die selektive Filtrationsbarriere der glomerulären Schlitzmembran und somit die physiologische Funktion der Niere erhalten bleibt (Pavenstadt et al., 2003). So geht ein Verlust von Fußfortsätzen durch schädigende Einflüsse gleichzeitig mit einer Verdichtung und Umverteilung von Aktinfilamenten einher (Kriz et al., 2013). Koukouritaki und Kollegen konnten in ihrer Studie von 1999 zeigen, dass die Stimulation von kultivierten Ratten-Podozyten mit TNF- α zu einer Umverteilung von intrazellulären Aktinfilamenten führt (Koukouritaki et al., 1999).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die LIF-Stimulation von humanen und murinen Podozyten ebenfalls mit strukturellen Veränderungen des Aktinzytoskeletts im Sinne einer Umverteilung der Aktinfilamente und -stressfasern einhergeht.

Dass LIF einen Einfluss auf die Ausbildung von Aktinfilamenten des zellulären Zytoskeletts hat, konnten Wysoczynski und Kollegen bereits in einer Zelllinie von humanen Rhabdomyosarkomzellen zeigen (Wysoczynski et al., 2007). Des Weiteren fanden sie heraus, dass eine Hemmung des LIF-Rezeptors die chemotaktische Wirkung

auf die Rhabdomyosarkomzellen blockiert. Wysoczynski und Kollegen schlussfolgerten daraus einen direkten Zusammenhang zwischen LIF und der Migration von Rhabdomyosarkomzellen.

Durch welche Signalkaskade das Aktinzytoskelett der Podozyten in der vorliegenden Arbeit beeinflusst wird und welche biologische Funktion daraus resultieren könnte, bleibt noch unklar. Das unterschiedliche Ausprägungsmuster von kontraktilen Aktinstressfasern im Podozyten in Gegenwart von LIF könnte dabei auf eine migrationsfördernde Wirkung hinweisen. Denkbar wäre in Podozyten neben einer potenziell dynamischen Bedeutung auch eine statische Funktion im Sinne erhöhter Rigidität zur Standhaltung gegenüber schädigenden Noxen wie beispielsweise erhöhten hydrostatischen Filtrationsdrücken.

4.4 Migrationsverhalten humaner Podozyten unter LIF

Für LIF konnte bereits in kultivierten Maus-Astrozyten ein Effekt auf die Zellmigration beobachtet werden (Goldshmit et al., 2004). Goldshmit und Kollegen konnten zeigen, dass es innerhalb von 72 Stunden unter LIF, im Gegensatz zur Kontrollbedingung ohne LIF, zu einem kompletten Verschluss der *in vitro* gesetzten Wundfläche kam. Vor dem Hintergrund des irreversiblen Verlustes von Podozyten bei glomerulären Schädigungen könnte dies eine Option sein die dadurch entstandene Filtrationslücke zu schließen.

In der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus der Analyse der Zellmigration im Wound-Scratch-Assay ein gesteigertes Migrationsverhalten humaner immortalisierter Podozyten über die Beobachtungszeit hinweg. Allerdings zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit PBS zu LIF. Da LIF jedoch im Podozyten, wie oben beschrieben, zu einer Reorganisation von intrazellulären Aktinfilamenten und kontraktilen Aktinstressfasern führt, könnte hier lediglich von einer Art Behilfsmethode ausgegangen werden, die keine ausreichende migrationsfördernde Wirkung zeigt. Vorstellbar wäre an dieser Stelle eine synergistische Wirkung durch zusätzliche Faktoren.

Ob die Migration eine negative oder positive Eigenschaft von LIF für das Fortschreiten von pathologischen glomerulären Prozessen und einer Proteinurie bedeuten könnte, ist noch nicht endgültig untersucht. Ebenso wird noch immer die Kausalität von Migration der Podozyten und der Entstehung von Proteinurie diskutiert (Asanuma et al., 2007).

Letztendlich ist die erhöhte Migrationsfähigkeit der Podozyten durch LIF wahrscheinlich abhängig von weiteren Umgebungsfaktoren: bei schädigenden Einflüssen könnte sie eher förderlich sein für Reparaturprozesse, unter physiologischen Bedingungen eher ungünstig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass LIF über die Stimulation wichtiger Signalwege zu einer Veränderung der Genexpression und einer Umorganisation des Zytoskeletts führt. Sie identifizieren LIF als wichtigen Regulator der Funktion des glomerulären Filters. Die Eignung als Angriffspunkt für neue spezifischere Therapien wird jetzt Gegenstand von Untersuchungen in Modellen proteinurischer Nierenerkrankungen sein.

5. Literaturverzeichnis

- AGCA, C., GUBLER, A., TRABER, G., BECK, C., IMSAND, C., AIL, D., CAPRARA, C. & GRIMM, C. **2013**. p38 MAPK signaling acts upstream of LIF-dependent neuroprotection during photoreceptor degeneration. *Cell Death Dis*, 4, e785.
- AMARAVADI, R. & THOMPSON, C. B. **2005**. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest*, 115, 2618-24.
- APPEL, D., KERSHAW, D. B., SMEETS, B., YUAN, G., FUSS, A., FRYE, B., ELGER, M., KRIZ, W., FLOEGE, J. & MOELLER, M. J. **2009**. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 20, 333-43.
- ASANUMA, K., KIM, K., OH, J., GIARDINO, L., CHABANIS, S., FAUL, C., REISER, J. & MUNDEL, P. **2005**. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest*, 115, 1188-98.
- ASANUMA, K., YANAGIDA-ASANUMA, E., TAKAGI, M., KODAMA, F. & TOMINO, Y. **2007**. The role of podocytes in proteinuria. *Nephrology (Carlton)*, 12 Suppl 3, S15-20.
- AUBERT, J., DESSOLIN, S., BELMONTE, N., LI, M., MCKENZIE, F. R., STACCINI, L., VILLAGEOIS, P., BARHANIN, B., VERNALLIS, A., SMITH, A. G., AILHAUD, G. & DANI, C. **1999**. Leukemia inhibitory factor and its receptor promote adipocyte differentiation via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, 274, 24965-72.
- BABON, J. J. & NICOLA, N. A. **2012**. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3. *Growth Factors*, 30, 207-19.
- BATTLE, T. E. & FRANK, D. A. **2002**. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med*, 2, 381-92.
- BAUER, S., KERR, B. J. & PATTERSON, P. H. **2007**. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci*, 8, 221-32.
- BERRY, M. F., PIROLI, T. J., JAYASANKAR, V., MORINE, K. J., MOISE, M. A., FISHER, O., GARDNER, T. J., PATTERSON, P. H. & WOO, Y. J. **2004**. Targeted overexpression of leukemia inhibitory factor to preserve myocardium in a rat model of postinfarction heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128, 866-75.
- BLUYSSSEN, H. A., RASTMANESH, M. M., TILBURGS, C., JIE, K., WESSELING, S., GOUMANS, M. J., BOER, P., JOLES, J. A. & BRAAM, B. **2010**. IFN gamma-dependent SOCS3 expression inhibits IL-6-induced STAT3 phosphorylation and differentially affects IL-6 mediated transcriptional responses in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299, C354-62.
- BODE, J. G., LUDWIG, S., FREITAS, C. A., SCHAPER, F., RUHL, M., MELMED, S., HEINRICH, P. C. & HAUSSINGER, D. **2001**. The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem*, 382, 1447-53.
- BOLLAIN, Y. G. J. J., GONZALEZ-CASTANEDA, M., TORRES-DEL-MURO, F., DAZA-BENITEZ, L., ZAPATA-BENAVIDES, P., RODRIGUEZ-PADILLA, C., AVALOS-DIAZ, E. & HERRERA-ESPARZA, R. **2011**. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol*, 21, 166-71.

- BRIDGEWATER, D. J., HO, J., SAURO, V. & MATSELL, D. G. **2005**. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int*, 67, 1308-14.
- BURGI, S., SAMARDZIJA, M. & GRIMM, C. **2009**. Endogenous leukemia inhibitory factor protects photoreceptor cells against light-induced degeneration. *Mol Vis*, 15, 1631-7.
- CHOLLANGI, S., WANG, J., MARTIN, A., QUINN, J. & ASH, J. D. **2009**. Preconditioning-induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina. *Neurobiol Dis*, 34, 535-44.
- DI MARI, J. F., DAVIS, R. & SAFIRSTEIN, R. L. **1999**. MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury. *Am J Physiol*, 277, F195-203.
- DUVAL, D., REINHARDT, B., KEDINGER, C. & BOEUF, H. **2000**. Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) - dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J*, 14, 1577-84.
- EID, A. A., GORIN, Y., FAGG, B. M., MAALOUF, R., BARNES, J. L., BLOCK, K. & ABOUD, H. E. **2009**. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases. *Diabetes*, 58, 1201-11.
- ELMARAKBY, A. A. & SULLIVAN, J. C. **2012**. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther*, 30, 49-59.
- EMERY, B., BUTZKUEVEN, H., SNELL, C., BINDER, M. & KILPATRICK, T. J. **2006**. Oligodendrocytes exhibit selective expression of suppressor of cytokine signaling genes and signal transducer and activator of transcription 1 independent inhibition of interferon-gamma-induced toxicity in response to leukemia inhibitory factor. *Neuroscience*, 137, 463-72.
- ENDLICH, K., KRIZ, W. & WITZGALL, R. **2001**. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10, 331-40.
- ENGELBRECHT, Y., DE WET, H., HORSCH, K., LANGEVELDT, C. R., HOUGH, F. S. & HULLEY, P. A. **2003**. Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology*, 144, 412-22.
- FORBES, J. M., COUGHLAN, M. T. & COOPER, M. E. **2008**. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*, 57, 1446-54.
- FRANKE, T. F., KAPLAN, D. R. & CANTLEY, L. C. **1997**. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88, 435-7.
- FUKUDA, S., ABEMATSU, M., MORI, H., YANAGISAWA, M., KAGAWA, T., NAKASHIMA, K., YOSHIMURA, A. & TAGA, T. **2007**. Potentiation of astroglialogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells. *Mol Cell Biol*, 27, 4931-7.
- GARCIA, R., BOWMAN, T. L., NIU, G., YU, H., MINTON, S., MURO-CACHO, C. A., COX, C. E., FALCONE, R., FAIRCLOUGH, R., PARSONS, S., LAUDANO, A., GAZIT, A., LEVITZKI, A., KRAKER, A. & JOVE, R. **2001**. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20, 2499-513.
- GEARING, D. P. **1993**. The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Adv Immunol*, 53, 31-58.
- GEKLE, M. **2005**. Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol*, 67, 573-94.

- GIESE, B., RODERBURG, C., SOMMERAUER, M., WORTMANN, S. B., METZ, S., HEINRICH, P. C. & MULLER-NEWEN, G. **2005**. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *J Cell Sci*, 118, 5129-40.
- GINIS, I., LUO, Y. Q., MIURA, T., THIES, S., BRANDENBERGER, R., GERECHT-NIR, S., AMIT, M., HOKE, A., CARPENTER, M. K., ITSKOVITZ-ELDOR, J. & RAO, M. S. **2004**. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 269, 360-380.
- GOLDSHMIT, Y., GALEA, M. P., WISE, G., BARTLETT, P. F. & TURNLEY, A. M. **2004**. Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *J Neurosci*, 24, 10064-73.
- HARA, M., YANAGIHARA, T., TAKADA, T., ITOH, M., MATSUNO, M., YAMAMOTO, T. & KIHARA, I. **1998**. Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. *Am J Nephrol*, 18, 35-41.
- HARTNER, A., GOPPELT-STRUBE, M., HOCKE, G. M., FEY, G. H. & STERZEL, R. B. **1995**. Renal mesangial cells have the capacity to synthesize and react to leukemia inhibitory factor. *Ann N Y Acad Sci*, 762, 424-5.
- HARTNER, A., GOPPELT-STRUEBE, M., HOCKE, G. M. & STERZEL, R. B. **1997**. Differential regulation of chemokines by leukemia inhibitory factor, interleukin-6 and oncostatin M. *Kidney Int*, 51, 1754-60.
- HARTNER, A., STERZEL, R. B., REINDL, N., HOCKE, G. M., FEY, G. H. & GOPPELT-STRUEBE, M. **1994**. Cytokine-induced expression of leukemia inhibitory factor in renal mesangial cells. *Kidney Int*, 45, 1562-71.
- HEIM, M. H. **1999**. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*, 19, 75-120.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., HAAN, S., HERMANNNS, H. M., MULLER-NEWEN, G. & SCHAPER, F. **2003**. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374, 1-20.
- HENDRIKS, J. J., SLAETS, H., CARMANS, S., DE VRIES, H. E., DIJKSTRA, C. D., STINISSEN, P. & HELLINGS, N. **2008**. Leukemia inhibitory factor modulates production of inflammatory mediators and myelin phagocytosis by macrophages. *J Neuroimmunol*, 204, 52-7.
- HIBI, M., MURAKAMI, M., SAITO, M., HIRANO, T., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. **1990**. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63, 1149-57.
- HIRANO, T., ISHIHARA, K. & HIBI, M. **2000**. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 19, 2548-56.
- HIROTA, H., CHEN, J., BETZ, U. A., RAJEWSKY, K., GU, Y., ROSS, J., JR., MULLER, W. & CHIEN, K. R. **1999**. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*, 97, 189-98.
- HISHIKAWA, K., MARUMO, T., MIURA, S., NAKANISHI, A., MATSUZAKI, Y., SHIBATA, K., KOHIKE, H., KOMORI, T., HAYASHI, M., NAKAKI, T., NAKAUCHI, H., OKANO, H. & FUJITA, T. **2005**. Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 288-91.
- HUNSICKER, L. G., ADLER, S., CAGGIULA, A., ENGLAND, B. K., GREENE, T., KUSEK, J. W., ROGERS, N. L. & TESCHAN, P. E. **1997**. Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int*, 51, 1908-19.

- JANSEN, P. M., DE JONG, I. W., HART, M., KIM, K. J., AARDEN, L. A., HINSHAW, L. B., TAYLOR, F. B., JR. & HACK, C. E. **1996**. Release of leukemia inhibitory factor in primate sepsis. Analysis of the role of TNF-alpha. *J Immunol*, 156, 4401-7.
- JEFFERSON, J. A., SHANKLAND, S. J. & PICHLER, R. H. **2008**. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*, 74, 22-36.
- JOLY, S., LANGE, C., THIERSCH, M., SAMARDZIJA, M. & GRIMM, C. **2008**. Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo. *J Neurosci*, 28, 13765-74.
- JOVE, R. **2012**. Targeting JAK-STAT Signaling for Cancer Therapy. *European Journal of Cancer*, 48, S17-S17.
- KAWACHI, H., MIYAUCHI, N., SUZUKI, K., HAN, G. D., ORIKASA, M. & SHIMIZU, F. **2006**. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton)*, 11, 274-81.
- KIM, N. H., RINCON-CHOLE, H., BHANDARI, B., CHOUDHURY, G. G., ABBOUD, H. E. & GORIN, Y. **2006**. Redox dependence of glomerular epithelial cell hypertrophy in response to glucose. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290, F741-51.
- KISHIMOTO, T., AKIRA, S., NARAZAKI, M. & TAGA, T. **1995**. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86, 1243-54.
- KOUKOURITAKI, S. B., VARDAKI, E. A., PAPAKONSTANTI, E. A., LIANOS, E., STOURNARAS, C. & EMMANOUEL, D. S. **1999**. TNF-alpha induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase. *Mol Med*, 5, 382-92.
- KRIZ, W. **1996**. Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 11, 1738-42.
- KRIZ, W. **1997**. Evolving role of the podocyte in chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res*, 20, 180-3.
- KRIZ, W. **2002**. Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc Res Tech*, 57, 189-95.
- KRIZ, W., SHIRATO, I., NAGATA, M., LEHIR, M. & LEMLEY, K. V. **2013**. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304, F333-47.
- KUMMER, J. L., RAO, P. K. & HEIDENREICH, K. A. **1997**. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 272, 20490-4.
- KURATSUNE, M., MASAKI, T., HIRAI, T., KIRIBAYASHI, K., YOKOYAMA, Y., ARAKAWA, T., YORIOKA, N. & KOHNO, N. **2007**. Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Nephrology (Carlton)*, 12, 565-71.
- KUREK, J. B., BOWER, J. J., ROMANELLA, M., KOENTGEN, F., MURPHY, M. & AUSTIN, L. **1997**. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*, 20, 815-22.
- LAEMMLI, U. K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LEE, N., NEITZEL, K. L., DEVLIN, B. K. & MACLENNAN, A. J. **2004**. STAT3 phosphorylation in injured axons before sensory and motor neuron nuclei: potential role for STAT3 as a retrograde signaling transcription factor. *J Comp Neurol*, 474, 535-45.

- LEIBINGER, M., MULLER, A., ANDREADAKI, A., HAUKE, T. G., KIRSCH, M. & FISCHER, D. **2009**. Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *J Neurosci*, 29, 14334-41.
- LEMLEY, K. V., LAFAYETTE, R. A., SAFAI, M., DERBY, G., BLOUCH, K., SQUARER, A. & MYERS, B. D. **2002**. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int*, 61, 1475-85.
- LEVY, D. E. & DARNELL, J. E., JR. **2002**. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 651-62.
- LI, Y., MCCLINTICK, J., ZHONG, L., EDENBERG, H. J., YODER, M. C. & CHAN, R. J. **2005**. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, 105, 635-7.
- LIU, B. C., SONG, X., LU, X. Y., LI, D. T., EATON, D. C., SHEN, B. Z., LI, X. Q. & MA, H. P. **2013**. High glucose induces podocyte apoptosis by stimulating TRPC6 via elevation of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 1434-42.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. **2001**. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOUIS, J. C., MAGAL, E., TAKAYAMA, S. & VARON, S. **1993**. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science*, 259, 689-92.
- LU, Y., FUKUYAMA, S., YOSHIDA, R., KOBAYASHI, T., SAEKI, K., SHIRAISHI, H., YOSHIMURA, A. & TAKAESU, G. **2006**. Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem*, 281, 36683-90.
- MAKITA, Z., RADOFF, S., RAYFIELD, E. J., YANG, Z., SKOLNIK, E., DELANEY, V., FRIEDMAN, E. A., CERAMI, A. & VLASSARA, H. **1991**. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, 325, 836-42.
- MATSUDA, T., NAKAMURA, T., NAKAO, K., ARAI, T., KATSUKI, M., HEIKE, T. & YOKOTA, T. **1999**. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 18, 4261-9.
- MERTENS, C. & DARNELL, J. E., JR. **2007**. SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell*, 131, 612.
- METCALF, D. **1991**. The leukemia inhibitory factor (LIF). *Int J Cell Cloning*, 9, 95-108.
- METCALF, D., NICOLA, N. A. & GEARING, D. P. **1990**. Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood*, 76, 50-6.
- MOLLER, C. C., FLESCHE, J. & REISER, J. **2009**. Sensitizing the Slit Diaphragm with TRPC6 ion channels. *J Am Soc Nephrol*, 20, 950-3.
- MOON, C., YOO, J. Y., MATARAZZO, V., SUNG, Y. K., KIM, E. J. & RONNETT, G. V. **2002**. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9015-20.
- MOREL, D. S., TAUPIN, J. L., POTIER, M., DEMINIÈRE, C., POTAU, L., GUALDE, N. & MOREAU, J. F. **2000**. Renal synthesis of leukaemia inhibitory factor (LIF), under normal and inflammatory conditions. *Cytokine*, 12, 265-71.

- NAKAMURA, T., USHIYAMA, C., SUZUKI, S., HARA, M., SHIMADA, N., EBIHARA, I. & KOIDE, H. **2000**. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 15, 1379-83.
- NEGORO, S., OH, H., TONE, E., KUNISADA, K., FUJIO, Y., WALSH, K., KISHIMOTO, T. & YAMAUCHI-TAKIHARA, K. **2001**. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation*, 103, 555-61.
- NG, I. H., JANS, D. A. & BOGOYEVITCH, M. A. **2014a**. Hyperosmotic stress sustains cytokine-stimulated phosphorylation of STAT3, but slows its nuclear trafficking and impairs STAT3-dependent transcription. *Cell Signal*, 26, 815-24.
- NG, I. H., YEAP, Y. Y., ONG, L. S., JANS, D. A. & BOGOYEVITCH, M. A. **2014b**. Oxidative stress impairs multiple regulatory events to drive persistent cytokine-stimulated STAT3 phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 483-94.
- OH, H., FUJIO, Y., KUNISADA, K., HIROTA, H., MATSUI, H., KISHIMOTO, T. & YAMAUCHI-TAKIHARA, K. **1998**. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 273, 9703-10.
- PAGTALUNAN, M. E., MILLER, P. L., JUMPING-EAGLE, S., NELSON, R. G., MYERS, B. D., RENNKE, H. G., COPLON, N. S., SUN, L. & MEYER, T. W. **1997**. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest*, 99, 342-8.
- PAVENSTADT, H., KRIZ, W. & KRETZLER, M. **2003**. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 83, 253-307.
- PLISOV, S. Y., YOSHINO, K., DOVE, L. F., HIGINBOTHAM, K. G., RUBIN, J. S. & PERANTONI, A. O. **2001**. TGF beta 2, LIF and FGF2 cooperate to induce nephrogenesis. *Development*, 128, 1045-57.
- PLUN-FAVREAU, H., ELSON, G., CHABBERT, M., FROGER, J., DELAPEYRIERE, O., LELIEVRE, E., GUILLET, C., HERMANN, J., GAUCHAT, J. F., GASCAN, H. & CHEVALIER, S. **2001**. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J*, 20, 1692-703.
- RAZ, R., LEE, C. K., CANNIZZARO, L. A., D'EUSTACHIO, P. & LEVY, D. E. **1999**. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2846-51.
- REUTER, S., GUPTA, S. C., CHATURVEDI, M. M. & AGGARWAL, B. B. **2010**. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49, 1603-16.
- SALEEM, M. A., O'HARE, M. J., REISER, J., COWARD, R. J., INWARD, C. D., FARREN, T., XING, C. Y., NI, L., MATHIESON, P. W. & MUNDEL, P. **2002**. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*, 13, 630-8.
- SALLEH, N. & GIRIBABU, N. **2014**. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. *ScientificWorldJournal*, 2014, 201514.
- SCHIEMANN, W. P. & NATHANSON, N. M. **1994**. Involvement of protein kinase C during activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by leukemia inhibitory factor. Evidence for participation of multiple signaling pathways. *J Biol Chem*, 269, 6376-82.

- SEILER, M. W., VENKATACHALAM, M. A. & COTRAN, R. S. **1975**. Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science*, 189, 390-3.
- SHANKLAND, S. J., PIPPIN, J. W., REISER, J. & MUNDEL, P. **2007**. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int*, 72, 26-36.
- SHEN, M. M., SKODA, R. C., CARDIFF, R. D., CAMPOS-TORRES, J., LEDER, P. & ORNITZ, D. M. **1994**. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J*, 13, 1375-85.
- SLAETS, H., DUMONT, D., VANDERLOCHT, J., NOBEN, J. P., LEPRINCE, P., ROBBEN, J., HENDRIKS, J., STINISSEN, P. & HELLINGS, N. **2008**. Leukemia inhibitory factor induces an antiapoptotic response in oligodendrocytes through Akt-phosphorylation and up-regulation of 14-3-3. *Proteomics*, 8, 1237-1247.
- STEHOUWER, C. D. & SMULDERS, Y. M. **2006**. Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms. *J Am Soc Nephrol*, 17, 2106-11.
- STEPHENS, J. M., LUMPKIN, S. J. & FISHMAN, J. B. **1998**. Activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 by leukemia inhibitory factor, oncostatin-M, and interferon-gamma in adipocytes. *J Biol Chem*, 273, 31408-16.
- SUSZTAK, K., RAFF, A. C., SCHIFFER, M. & BOTTINGER, E. P. **2006**. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 55, 225-33.
- TAGA, T. & KISHIMOTO, T. **1997**. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 15, 797-819.
- TAKEDA, K., NOGUCHI, K., SHI, W., TANAKA, T., MATSUMOTO, M., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. **1997**. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3801-4.
- TANG, W. W., QI, M., VAN, G. Y., WARINER, G. P. & SAMAL, B. **1996**. Leukemia inhibitory factor ameliorates experimental anti-GBM Ab glomerulonephritis. *Kidney Int*, 50, 1922-7.
- TAUPIN, J. L., MOREL, D., MOREAU, J. F., GUALDE, N., POTAU, L. & BEZIAN, J. H. **1992**. HILDA/LIF urinary excretion during acute kidney rejection. *Transplantation*, 53, 655-8.
- TIGHE, A. P. & GUDAS, L. J. **2004**. Retinoic acid inhibits leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Cell Physiol*, 198, 223-9.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. **1979**. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TRYGGVASON, K., PATRAKKA, J. & WARTIOVAARA, J. **2006**. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 354, 1387-401.
- TRYGGVASON, K. & WARTIOVAARA, J. **2001**. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10, 543-9.
- VAN DEN BERG, J. G., VAN DEN BERGH WEERMAN, M. A., ASSMANN, K. J., WEENING, J. J. & FLORQUIN, S. **2004**. Podocyte foot process effacement is not correlated with the level of proteinuria in human glomerulopathies. *Kidney Int*, 66, 1901-6.
- VAN EIJK, M. J., MANDELBAUM, J., SALAT-BAROUX, J., BELAISCH-ALLART, J., PLACHOT, M., JUNCA, A. M. & MUMMERY, C. L. **1996**. Expression of

- leukaemia inhibitory factor receptor subunits LIFR beta and gp130 in human oocytes and preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*, 2, 355-60.
- VILLIGER, P. M., GENG, Y. & LOTZ, M. **1993**. Induction of cytokine expression by leukemia inhibitory factor. *J Clin Invest*, 91, 1575-81.
- VINKEMEIER, U. **2004**. Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit. *J Cell Biol*, 167, 197-201.
- VOGELMANN, S. U., NELSON, W. J., MYERS, B. D. & LEMLEY, K. V. **2003**. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F40-8.
- WANG, F., TRIAL, J., DIWAN, A., GAO, F., BIRDSALL, H., ENTMAN, M., HORNSBY, P., SIVASUBRAMANIAM, N. & MANN, D. **2002**. Regulation of cardiac fibroblast cellular function by leukemia inhibitory factor. *J Mol Cell Cardiol*, 34, 1309-16.
- WANG, Y., ROBLEDO, O., KINZIE, E., BLANCHARD, F., RICHARDS, C., MIYAJIMA, A. & BAUMANN, H. **2000**. Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem*, 275, 25273-85.
- WARING, P., WYCHERLEY, K., CARY, D., NICOLA, N. & METCALF, D. **1992**. Leukemia inhibitory factor levels are elevated in septic shock and various inflammatory body fluids. *J Clin Invest*, 90, 2031-7.
- WEIL, E. J., LEMLEY, K. V., MASON, C. C., YEE, B., JONES, L. I., BLOUCH, K., LOVATO, T., RICHARDSON, M., MYERS, B. D. & NELSON, R. G. **2012**. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 82, 1010-7.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2016**. *Diabetes: fact sheet* [Online]. Geneva: World Health Organization. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> [Accessed 12 Nov 2016].
- WYSOCZYNSKI, M., MIEKUS, K., JANKOWSKI, K., WANZECK, J., BERTOLONE, S., JANOWSKA-WIECZOREK, A., RATAJCZAK, J. & RATAJCZAK, M. Z. **2007**. Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res*, 67, 2131-40.
- XU, J., LI, Z., XU, P. & YANG, Z. **2012**. Protective effects of leukemia inhibitory factor against oxidative stress during high glucose-induced apoptosis in podocytes. *Cell Stress Chaperones*, 17, 485-93.
- YOSHIMURA, A. **2006**. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci*, 97, 439-47.
- YOSHINO, J., MONKAWA, T., TSUJI, M., HAYASHI, M. & SARUTA, T. **2003**. Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14, 3090-3101.
- YU, Y., WANG, Y., NIU, Y., FU, L., CHIN, E. & YU, C. **2015**. Leukemia Inhibitory Factor attenuates renal fibrosis through Stat3-miR-29c. *Am J Physiol Renal Physiol*, ajprenal.00634.2014.
- ZHAI, L., GU, J., YANG, D., WANG, W. & YE, S. **2015**. Metformin Ameliorates Podocyte Damage by Restoring Renal Tissue Podocalyxin Expression in Type 2 Diabetic Rats. *J Diabetes Res*, 2015, 231825.
- ZHANG, A. & HUANG, S. **2012**. Progress in pathogenesis of proteinuria. *Int J Nephrol*, 2012, 314251.
- ZOU, Y., TAKANO, H., MIZUKAMI, M., AKAZAWA, H., QIN, Y., TOKO, H., SAKAMOTO, M., MINAMINO, T., NAGAI, T. & KOMURO, I. **2003**.

Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction. *Circulation*, 108, 748-53.

6. Danksagung

Als Erstes danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump für die Möglichkeit in dem Forschungsgebiet der Nephrologie tätig sein zu dürfen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Ivo Quack für die Überlassung des spannenden Themas in seiner Arbeitsgruppe. Seine hervorragende Betreuung während der gesamten Phase meiner Dissertation zeichnet sich durch die Kombination aus freundlicher und zugewandter Art mit professioneller und hilfreicher Unterstützung bei jeder Fragestellung aus.

Ich danke allen Labormitgliedern für die gute Zusammenarbeit mit angenehmem Arbeitsklima. Die technischen Assistentinnen Blanka Duvnjak, Christina Schwandt und Nicola Kuhr haben durch ihre tatkräftige Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dankbar anerkennen möchte ich insbesondere die stets geduldige und hilfsbereite Art von Blanka Duvnjak bei der Planung und Umsetzung sämtlicher Versuchsreihen. Die fachlichen Diskussionen mit ihr und die konstruktive Kritik waren eine Bereicherung für meine Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranden für eine äußerst produktive und gleichzeitig unterhaltsame Zeit im Labor bedanken. Ihre verständnisvollen Ermutigungen und zahlreichen Ratschläge haben einen wesentlichen Beitrag zu der vorliegenden Arbeit geleistet. Namentlich sind insbesondere zu nennen Frau Dr. med. Eva Königshausen, Frau Dr. med. Magdalena Woznowski, Asena Uyaner, Clara Frosch und Ulf Zierhut. Die daraus entstandenen Freundschaften erachte ich als sehr wertvoll.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern Danijela und Krstan Knezic und meiner Schwester Kristijana Knezic bedanken. Ohne diese wären die vorliegende Arbeit und mein Studium nicht möglich gewesen. Sie hatten stets ein offenes Ohr für Gespräche und unterstützten mich auf jede Art und Weise während meines gesamten Lebensweges. Auch in schwierigen Phasen motivierten sie mich durch ihre aufbauenden Worte.

Ein großer Dank geht an meinen Partner Dr. med. David Latz für seine durchweg wertvolle und bedingungslose seelische und, nicht zu unterschätzende, technisch-fachliche Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

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

10.08.2017, Barbara Knezic