

**Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Molekulare Analyse der Funktion des
TRPC6-Kanals in primären Podozyten der Maus**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von

Jana Magdalena Theresa Demleitner (geb. Neumeier)

aus

Ebersberg

2015

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. Alexander Dietrich

Zweitgutachterin bzw. Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Scherer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Februar 2016

➤ Inhaltsverzeichnis

➤ Inhaltsverzeichnis	1
➤ Abbildungsverzeichnis	4
➤ Tabellenverzeichnis	7
➤ Summary	9
➤ Zusammenfassung	10
1 Einleitung	12
1.1 Die „Superfamilie“ der TRP (transient receptor potential)-Kanäle	12
1.2 TRPC-Kanäle	15
1.3 TRPC6-Kanäle	17
1.3.1 Struktur und Lokalisation	17
1.3.2 Signalkaskaden mit Rezeptor (ROC)- oder Speicher (SOC)-operiertem Ca ²⁺ -Einstrom	19
1.3.3 Pharmakologie	21
1.4 Phosphoinositid-Phospholipase-C-Isoformen	22
1.5 PLCβ-Isoformen	25
1.6 PLCγ-Isoformen	26
1.7 PLCε-Isoform	27
1.8 Lokalisation, charakteristischer Aufbau und Funktion der Niere	28
1.9 TRP-Kanäle in der Niere	34
1.10 Fokale Segmentale Glomerulosklerose (FSGS)	36
1.11 Ziel dieser Arbeit	41
2 Material und Methoden	42
2.1 Material	42
2.1.1 Antikörper	42
2.1.2 Chemikalien	42
2.1.3 Enzyme, Kits und Marker	44
2.1.4 Geräte	45
2.1.5 Mauslinien	46
2.1.6 Bakterien, Medien und Antibiotika für Bakterienkulturen	46
2.1.7 Plasmide	48
2.1.8 Oligonukleotide (Primer)	48
2.1.9 Puffer und Lösungen	51

2.1.10	„Small hairpin“ (sh)-RNAs und „Small interfering“ (si)-RNAs	57
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	59
2.1.12	Zellen und Zellkulturmedien.....	59
2.2	Methoden.....	62
2.2.1	Bakterienkulturen, „Glycerinstocks“ und Plasmid-Isolation	62
2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	63
2.2.3	Transformation.....	64
2.2.4	Klonierungsstrategie des mTRPC6.....	65
2.2.5	<i>In-vitro</i> -Mutagenese.....	66
2.2.6	DNA-Fällung.....	69
2.2.7	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen und Phosphatase	69
2.2.8	DNA-Agarosegelelektrophorese	71
2.2.9	DNA-Gelextraktion	72
2.2.10	DNA-Ligation.....	73
2.2.11	RNA-Gewinnung	74
2.2.12	Erststrangsynthese (cDNA-Synthese).....	75
2.2.13	Quantitative RT(Reverse Transkriptase)-PCR.....	75
2.2.14	Kultivieren von Zellen	77
2.2.15	Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen	78
2.2.16	Podozyten-Isolation.....	79
2.2.17	Mesangialzell-Isolation	83
2.2.18	Immunzytochemie.....	90
2.2.19	TUNEL Apoptose Assay.....	92
2.2.20	EdU-Inkorporation zur Quantifizierung der DNA-Synthese	95
2.2.21	Aktinfaser-Anfärbung	97
2.2.22	„Immunoblotting“ („Western Blot“)	100
2.2.23	Immunpräzipitation (IP)	107
2.2.24	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-„Assay“)... ..	108
2.2.25	Bestimmung des aktiven RhoA (RhoA-GTP).....	108
2.2.26	Transfektion mittels Elektroporation	109
2.2.27	Weitere Transfektionsmethoden	110
2.2.28	Lentivirusproduktion (verändert nach tronolab.epfl.ch)	111
2.2.29	Virusnachweis mit Lenti-X-GoStix	116
2.2.30	Aufkonzentrierung von Lentiviren mit PEG-it™	116
2.2.31	Lentivirale Infektion von Zielzellen.....	117

2.2.32	Mikroskopie	118
2.2.33	Auswertung und Statistik	119
3	Ergebnisse.....	121
3.1	Identifikation von primären Podozyten	121
3.1.1	Nachweis von Podozytenmarkern auf mRNA-Ebene durch quantitative RT-PCR.....	122
3.1.2	Nachweis von Podozytenmarkern auf Proteinebene durch Immunzytochemie	123
3.1.3	Nachweis von Podozytenmarkern auf Proteinebene durch „Western Blot“	130
3.2	Funktionelle Charakterisierung der primären Podozyten	135
3.2.1	Quantitative RT-PCR zur Analyse der TRPC-Expression.....	135
3.2.2	Quantitative RT-PCR zur Analyse der PLC-Expression	139
3.2.3	DNA-Synthese (Proliferation)	141
3.2.4	Quantifizierung der Apoptoserate	142
3.2.5	Quantifizierung von Aktinstressfasern	144
3.2.6	Bestimmung des aktiven RhoAs (RhoA-GTP)	148
3.3	Koimmunpräzipitation von TRPC6 mit PLCε.....	149
3.4	In-vitro Mutagenese der TRPC6-cDNA und Klonierung in Expressionsvektoren	152
3.5	Expression des mTRPC6 und der M131T-Mutation in Hek293	156
3.6	Analyse der intrazellulären Lokalisation der TRPC6-Mutanten in Hek293	156
3.7	Transfektion primärer Podozyten mit Plasmiden zur Expression des murinen TRPC6-Kanals und seiner Mutanten.....	158
3.7.1	Nicht-virale Methoden	158
3.7.2	Lentivirale Transfektion.....	158
3.8	Elektrophysiologische Untersuchung von primären Podozyten	160
3.9	Funktionstest der „small hairpin“ (=sh)-RNAs und „small interference“ (=si)-RNAs	162
3.10	Elektrophysiologische Untersuchung der TRPC6-PLCε- und der TRPC6-M131T-PLCε-Interaktion in Hek293-Zellen.....	165
4	Diskussion.....	170
4.1	Charakterisierung der primären Podozyten.....	170
4.2	Funktionelle Charakterisierung der primären Podozyten	173
4.3	Analyse der TRPC6-PLCε-Interaktion.....	178
4.4	Expression des TRPC6-Kanals und seiner TRPC6-M131T-Mutation in primär isolierten murinen Podozyten	180
4.5	Analyse von TRPC6-Kanälen und der TRPC6-M131T-Kanalmutante in Hek293-Zellen	181
5	Ausblick.....	182
6	Anhang.....	183

➤ Abkürzungen	183
➤ Plasmidkarten	186
➤ Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
➤ Publikationen während der Doktorarbeit	190
➤ Literaturverzeichnis	191
➤ Eidesstattliche Versicherung	209
➤ Danksagung	210

➤ **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie.....	13
Abbildung 2: Struktur der TRP-Kanäle.....	14
Abbildung 3: Proteinstruktur der N- und C-Termini unterschiedlicher TRP-Familien.	15
Abbildung 4: Bildung funktioneller TRPC-Kanäle aus gleichen oder unterschiedlichen Untereinheiten.	17
Abbildung 5: TRPC6 Proteinstruktur.....	18
Abbildung 6: Signaltransduktionskaskaden für die Regulation von TRPC6-Kanälen.....	20
Abbildung 7: Aktivierung und Funktion der verschiedenen PLC-Isoformen.	23
Abbildung 8: PLC-Isoformen und Spleißvarianten.....	24
Abbildung 9: Aufbau der Niere.....	29
Abbildung 10: Nephron mit Darstellung der filtrierenden Einheit (Glomerulus).	30
Abbildung 11: Darstellung eines Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole.....	31
Abbildung 12: Schematischer Aufbau der Podozytenfortsätze.....	32
Abbildung 13: Aufkonzentrierung des Harns.....	34
Abbildung 14: Expression von TRP-Kanäle im humanen Nephron.	35
Abbildung 15: Histologische Aufnahme von Glomeruli mit dem Krankheitsbilde einer FSGS.....	37
Abbildung 16: TRPC6-Mutationen im TRPC6-Gen von FSGS-Patienten.	39
Abbildung 17: Starke Ödembildung bei einer jungen FSGS-Patientin.	40
Abbildung 18: Aminosäuresequenz-Vergleich des humanen und murinen TRPC6.	66
Abbildung 19: Prinzip der Mutagenese.....	67
Abbildung 20: Jungtier nach Eröffnung der Haut.....	81
Abbildung 21: Podozyten im Phasenkontrastmikroskop.	83
Abbildung 22: Herausgetrennter Nierenverbund vor der Wendung.	87
Abbildung 23: a) Separator, b) Pipettierschema zur magnetischen Separation.....	88
Abbildung 24: a) Glomeruli nach der Isolation mit „Dynabeads“, b) Mesangialzellen wt # 6.....	90
Abbildung 25: Detektion der Apoptose mittels “Click-it TUNEL Alexa Flour 488-Assay”.....	93
Abbildung 26: Nachweis der DNA-Synthese mittels EdU-Click-Reaktion.....	96
Abbildung 27: a) Knollenblätterpilz Amanita Phalloides, b) Phalloidin Strukturformel.....	98
Abbildung 28: Ponceau-Färbung.....	104
Abbildung 29: Immunpräzipitation.....	107
Abbildung 30: Prinzip des RhoA „Assays“.....	109

Abbildung 31: Herstellung rekombinanter Lentiviren.....	112
Abbildung 32: Calciumphosphatpartikel.....	115
Abbildung 33: Lenti-X-GoStix.....	116
Abbildung 34: Nachweis von Nephtrin-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten und Nierencortex.....	123
Abbildung 35: Nachweis von Nephtrin durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	124
Abbildung 36: Nachweis von Nephtrin (grün) und Aktin (rot) durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären WT-Podozyten im lockeren (a) und dichten (b) Zellverband.....	125
Abbildung 37: Nachweis von Podocin durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	126
Abbildung 38: Nachweis von WT1 durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	127
Abbildung 39: Nachweis von Synaptopodin durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	128
Abbildung 40: Nachweis von CD144 durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	129
Abbildung 41: Nachweis von α -sma durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	130
Abbildung 42: Nachweis von Nephtrin durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	131
Abbildung 43: Nachweis von Podocin durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	132
Abbildung 44: Nachweis von WT1 durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	133
Abbildung 45: Nachweis von Synaptopodin durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	134
Abbildung 46: Nachweis von CD144 durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.....	135
Abbildung 47: Nachweis von TRPC1-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten. .	136
Abbildung 48: Nachweis von TRPC3-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten. .	137
Abbildung 49: Nachweis von TRPC4-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten. .	138
Abbildung 50: Nachweis von TRPC6-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten. .	138
Abbildung 51: Nachweis von PLC β_1 -, PLC β_2 - und PLC ϵ -mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.....	139
Abbildung 52: Nachweis von PLC β_3 -, PLC β_4 -, PLC γ_1 - und PLC γ_2 -mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.....	140
Abbildung 53: Analyse der DNA-Synthese in WT-Podozyten.....	141
Abbildung 54: Nachweis der DNA-Syntheserate in Podozyten verschiedener Genotypen.	142
Abbildung 55: Analyse der Apoptoserate in primären TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten.	143
Abbildung 56: Nachweis der Apoptoserate in Podozyten verschiedener Genotypen.	144
Abbildung 57: Nachweis der Aktinpolymerisation durch Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin bei WT-Podozyten.....	145
Abbildung 58: Nachweis der Aktinpolymerisation durch Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin bei TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten.	145
Abbildung 59: Nachweis der Aktinpolymerisation durch Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin bei PLC ϵ $^{-/-}$ -Podozyten.	146

Abbildung 60: Beispielbild für die quantitative Auswertung der Aktinstressfaserpolymerisation.	146
Abbildung 61: Quantifizierung der Aktinstressfaserpolymerisation in primären Podozyten.....	147
Abbildung 62: Quantifizierung der Aktinstressfaserpolymerisation in primären Podozyten vor und nach Rezeptoraktivierung durch Zugabe von Angiotensin II (AngII).....	148
Abbildung 63: Quantifizierung des aktiven RhoA (RhoA-GTP) in primären Podozyten.....	149
Abbildung 64: PLC ϵ -Nachweis in einer Koimmunpräzipitation mit α -PLC ϵ und α -HA aus 6HA+PLC ϵ exprimierenden Hek293-Zellen.....	150
Abbildung 65: HA-Nachweis in einer Koimmunpräzipitation mit α -PLC ϵ und α -HA aus 6HA+PLC ϵ exprimierenden Hek293-Zellen.....	151
Abbildung 66: TRPC6-Nachweis in einer Koimmunpräzipitation mit α -PLC ϵ und α -GFP-Antikörpern im Nierencortex.....	152
Abbildung 67: Darstellung von DNA-Fragmenten eines Verdaus des pcDNA3-TRPC6-M131T-eGFP-Plasmids mit spezifischen Restriktionsenzymen im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.....	153
Abbildung 68: Darstellung von DNA-Fragmenten eines Verdaus des pWPXL-TRPC6-M131T-eGFP-Plasmids mit spezifischen Restriktionsenzymen im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.....	154
Abbildung 69: Sequenzierung der Mutationen in pWPXL und Sequenzvergleich mit mTRPC6.....	155
Abbildung 70: Lentiviraler Vektor pWPXL mit mTRPC6-eGFP-cDNA und den jeweiligen Mutationen.....	155
Abbildung 71: TRPC6-Nachweis in Hek293-Zellen, die mit mTRPC6 oder mTRPC6-M131T transfiziert wurden.....	156
Abbildung 72: Nachweis der Oberflächenexpression von TRPC6-M131T-eGFP in Hek293-Zellen.	157
Abbildung 73: Expression fluoreszierender Protein nach lentivirale Transfektions in verschiedenen Zelltypen.....	159
Abbildung 74: Transfektion primärer Podozyten mit mTRPC6 (WT)- und mTRPC6-M131T-Lentiviren.....	160
Abbildung 75: Elektrophysiologische Analysen von GTP γ S- und Flufenamat-induzierten Strömen in primären Podozyten.....	161
Abbildung 76: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR mit PLC β_1 (links)-und PLC ϵ (rechts)-spezifischen Oligonukleotiden.....	163
Abbildung 77: Nachweis von PLC β_1 -Protein in HEK293-Zellen, die TRPC6-HA (=Hämagglutinin) stabil exprimieren (6HA) und mit einer si-RNA gegen PLC β_1 transfiziert wurden.....	164
Abbildung 78: Nachweis von PLC ϵ -Protein in HEK293-Zellen, die TRPC6-HA (=Hämagglutinin) stabil exprimieren (6HA) und mit einer sh-RNA gegen PLC ϵ transfiziert wurden.....	164
Abbildung 79: Elektrophysiologische Analyse der TRPC6-PLC ϵ -Interaktion in Hek293-Zellen die TRPC6 stabil exprimieren.....	166
Abbildung 80: Ca ²⁺ -Stromverläufe in Hek293-Zellen mit TRPC6.....	167
Abbildung 81: Elektrophysiologische Analyse der TRPC6-M131T-PLC ϵ -Interaktion in Hek293-Zellen die TRPC6-M131T stabil exprimieren.....	168
Abbildung 82: Ca ²⁺ -Stromverläufe in Hek293-Zellen mit TRPC6-M131T.....	169
Abbildung 83: Plasmidkarte pcDNA3 (www.invitrogen.com).....	186
Abbildung 84: Plasmidkarte pmaxGFP (www.lonza.com).....	186
Abbildung 85: Plasmidkarte pMD2.G (www.addgene.com).....	187
Abbildung 86: Plasmidkarte psPAX2 (www.addgene.com).....	188
Abbildung 87: Plasmidkarte pWPXL (www.addgene.com).....	189

➤ Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anteile der einzelnen PLC-Isoformen in der Niere (Suh et al. 2008)	25
Tabelle 2: Klassifikation der FSGS	38
Tabelle 3: Antikörper für Immunzytochemie	42
Tabelle 4: Antikörper für „Western Blot“ und Immunpräzipitation	42
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien	42
Tabelle 6: Enzyme, Kits und Marker	44
Tabelle 7: Geräte	45
Tabelle 8: Mauslinien	46
Tabelle 9: Verwendete, kommerziell erhältliche, chemisch kompetente Bakterien	47
Tabelle 10: Plasmide	48
Tabelle 11: Murine (m) Mutagenese Oligonukleotide	49
Tabelle 12: Humane (h) q-PCR-Oligonukleotide	49
Tabelle 13: Murine (m) q-PCR-Oligonukleotide	50
Tabelle 14: Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung	50
Tabelle 15: sh-RNA-, „forward“ gegen PLC ϵ	57
Tabelle 16: sh-RNA-, „reverse“ gegen PLC ϵ	58
Tabelle 17: sh-RNA-control-, „forward“	58
Tabelle 18: sh-RNA-control-, „reverse“	58
Tabelle 19: si-RNA „smart-pool“ gegen PLC β_1	58
Tabelle 20: si-RNA „nontargeting –pool“	58
Tabelle 21: Verbrauchsmaterialien	59
Tabelle 22: Zellen	59
Tabelle 23: Zellkulturlösungen und Zusätze	60
Tabelle 24: Podozytenmedium (verändert nach Rastaldi et al. 2006)	60
Tabelle 25: Mesangialzellmedium für die Passage # 0-# 5	60
Tabelle 26: Mesangialzellmedium ab Passage # 6	61
Tabelle 27: Medium für Hek293 und ISO-HAS	61
Tabelle 28: Medium für TRPC6-HA-Hek293 (6HA)	61
Tabelle 29: Medium für Lenti-X TM -293 Zellen	61
Tabelle 30: Material zu Bakterienkultivierung, „Glycerinstocks“ und Plasmid-Isolation	62
Tabelle 31: Material zur Herstellung kompetenter Bakterien	63
Tabelle 32: Nötige Kontrollen bei der Transformation	64
Tabelle 33: Material zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien	65
Tabelle 34: Humane und murine Pendants der Mutationen	67
Tabelle 35: Material zur Mutagenese	68
Tabelle 36: Pipettierschema der <i>In-vitro</i> -Mutagenese	68
Tabelle 37: Mutagenese-PCR	68
Tabelle 38: Material zur DNA-Fällung	69
Tabelle 39: Material zum DNA-Restriktionsverdau	70
Tabelle 40: Pipettierreihenfolge des Restriktionsverdau	70
Tabelle 41: Simultaner Phosphataseverdau	70
Tabelle 42: Material zur DNA-Agarosegelelektrophorese	71
Tabelle 43: Material zur DNA-Gelextraktion	72
Tabelle 44: Material zur DNA-Ligation	73
Tabelle 45: Sticky-End-Ligation	74

Tabelle 46: Blunt-End-Ligation	74
Tabelle 47: Material zur q-PCR	76
Tabelle 48: Mastermix zur q-PCR.....	76
Tabelle 49: „Light Cycler“ Programm bei der q-PCR	77
Tabelle 50: Material zum Teilen von Zellen	77
Tabelle 51: Material zur Kryokonservierung	78
Tabelle 52: Material zur Podozyten-Isolation	80
Tabelle 53: Material zur Mesangialzellisolierung durch ex-vivo-Perfusion	84
Tabelle 54: Material zur Durchführung der Immunofluoreszenz.....	91
Tabelle 55: Material zur Durchführung des „TUNEL-Assays“	93
Tabelle 56: DNase I-Lösung (Positivkontrolle) für 2 Deckgläschen	94
Tabelle 57: TdT-Reaktionsgemisch für 2 Deckgläschen	94
Tabelle 58: „Click-it“ Reaktionsgemisch für 2 Deckgläschen.....	95
Tabelle 59: Material zur EdU-DNA-Synthese-Messung.....	96
Tabelle 60: EdU „Click-it“- Reaktionscocktail	97
Tabelle 61: Material zur Aktinfaser-Anfärbung.....	98
Tabelle 62: Material zur Durchführung des „Western Blots“	100
Tabelle 63: SDS Trenngel (für je 1 Gel)	102
Tabelle 64: SDS Sammelgel (für je 1 Gel).....	102
Tabelle 65: Material zur Immunpräzipitation.....	107
Tabelle 66: Verwendete Programme bei der „NEON“-Transfektion von Podozyten	110
Tabelle 67: Verwendete Programme bei der Amaxa-Transfektion von Podozyten	110
Tabelle 68: Plasmide zur Lentivirusproduktion	112
Tabelle 69: Material zur Lentivirusproduktion mittels Calciumphosphatpräzipitation	113
Tabelle 70: Material zur Aufkonzentrierung von Lentiviren	116
Tabelle 71: Material zur lentiviralen Infektion von Zielzellen.....	118
Tabelle 72: Transfektionseffizienz nicht-viraler Transfektionsmethoden in primäre Podozyten	158
Tabelle 73: Abkürzungen	183

➤ Summary

Seven TRPC (for „classical (or canonical) transient receptor potential) channels which are located in the cell membrane were identified in recent years. These channels take part in a variety of physiological functions in the body.

In several patients, suffering from an autosomal dominant form of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), mutations of TRPC6-channels were identified. These mutations are gain-of-function-mutations, leading to channel hyperactivity. Some FSGS patients however, express loss-of-function-mutations in Phospholipase C ϵ (PLC ϵ) instead of gain-of-function-mutations of TRPC6. These data raise the intriguing possibility that both proteins interact and might work in the same signalling pathway as well are important targets for pharmacological intervention in patients with FSGS. Moreover, while TRPC6 activation by PLC β and PLC γ isozymes was extensively studied, the role of PLC ϵ in TRPC6 activation remains elusive.

The phenotype of FSGS is a perturbation of the glomerular filtration process in the kidney, leading to proteinuria. In most cases FSGS leads to end stage renal disease (ESRD) with acute renal failure. Glomeruli are the filtrating unit of the kidney. The filter, inside of the glomeruli, is composed out of podocytes, endothelial cells and the intermediary basal membrane. Because TRPC6 is expressed in podocytes, excess Ca²⁺-influx through mutated TRPC6 channels in podocytes may be responsible for the FSGS phenotype.

Therefore, podocytes from wild-type (WT), TRPC6 (TRPC6^{-/-})- and PLC ϵ (PLC ϵ ^{-/-})-deficient podocytes were isolated and extensively characterized by identification of podocyte-specific marker proteins. Cell functions like proliferation, formation of actin stress fibers, RhoA- and TRPC6-activity were analyzed in cells of all three genotypes. Although TRPC6 was co-immunoprecipitated with PLC ϵ in murine kidney cortex, PLC ϵ ^{-/-}-podocytes were undistinguishable from WT-podocytes in their DNA-synthesis rate, angiotensin II-induced formation of actin stress fibers as well as their GTP γ S-induced TRPC6 activation, pointing to a redundant role of PLC ϵ -mediated TRPC6 activation. Thus, PLC activation of TRPC6 may be masked by much higher expression levels of another PLC-isoform PLC β ₁ at least in podocytes.

Expression of cloned TRPC6-FSGS-mutants in primary isolated wild-type and TRPC6-deficient podocytes was lethal emphasizing the pathogenicity of an increased TRPC6-induced Ca²⁺-influx for these cells and kidney glomeruli of FSGS-patients. Along these line specific TRPC6-inhibitors may serve as therapeutic option to decrease symptoms in FSGS patients in the future.

➤ Zusammenfassung

Bisher wurden sieben verschiedene TRPC-Kanäle (für „classical (oder canonical) transient receptor potential“) beschrieben, die in der Plasmamembran tierischer Zellen lokalisiert sind. Diese Kanäle gehören zu einer von sieben Familien der TRP-Ionenkanäle, deren Mitglieder an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen im Körper beteiligt sind.

Im Jahr 2005 konnten in Patienten, die an einer autosomal dominant vererbten Form der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) leiden, Mutationen der TRPC6-Kanäle identifiziert werden, die zu einer Überaktivität dieser Kanäle führen (sog. „gain-of-function“-Mutationen). Etwas später (2006) wurden aber auch einige FSGS Patienten entdeckt, die keine „gain-of-function“-Mutationen im TRPC6 sondern funktionslose, sog. „loss of function“-Mutationen der Phospholipase C ϵ (PLC ϵ) exprimierten. Diese Daten deuten auf eine funktionelle Interaktion zwischen TRPC6 und PLC ϵ in Zellen der Niere hin, die bisher noch nicht näher untersucht worden ist. Beide Proteine könnten sich auch als Zielstrukturen für eine Pharmakotherapie der FSGS eignen.

Die FSGS äußert sich durch eine Störung des glomerulären Filtrationsprozesses in der Niere, wodurch es unter anderem zu einer Proteinurie kommt. In vielen Fällen führt die FSGS terminal zur ESRD („end stage renal disease“), also zu einem akuten Nierenversagen.

Glomeruli bilden die filtrierende Einheit der Niere, wobei der eigentliche Filter, welcher im Inneren des Glomerulus lokalisiert ist, aus Podozyten, Endothelzellen und der dazwischen befindlichen Basalmembran besteht. Da TRPC-Kanäle unter anderem in Podozyten exprimiert werden, liegt die Annahme nahe, dass diese Zellen durch den vermehrten Ca²⁺-Einstrom mutierter Kanäle bei der FSGS krankhaft verändert sein könnten.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Podozyten aus Wildtyp (WT)-Mäusen sowie TRPC6 (TRPC6^{-/-})- und PLC ϵ (PLC ϵ ^{-/-})-gendifizienten Tieren isoliert und umfangreich durch den Nachweis podozytenspezifischer Markerproteine charakterisiert. Zellfunktionen wie Proliferation, Aktinstressfaserbildung, RhoA- und TRPC6-Aktivität wurden vergleichend in den Zellen der verschiedenen Genotypen analysiert. Es zeigte sich, dass PLC ϵ zwar mit TRPC6 in Zellen des Nierenkortex interagieren kann, aber PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten funktionell in ihrer Angiotensin II-induzierten Aktinstressfaserbildung und GTP γ S-induzierten TRPC6-Aktivierung nicht von Wildtyp-Podozyten unterschieden werden konnten, was auf eine redundante Funktion der PLC ϵ -vermittelten TRPC6-Aktivierung hindeutet. Eine Aktivierung von TRPC6 durch PLC ϵ wird wahrscheinlich durch die Stimulation der wesentlich stärker exprimierten anderen PLC-Isoform PLC β ₁, zumindest in Podozyten, überdeckt.

Eine Expression der klonierten murinen TRPC6-FSGS-Mutanten in primär isolierten Wildtyp- und TRPC6-defizienten Podozyten war für die Zellen lethal, wodurch die Pathogenität eines erhöhten

TRPC6-induzierten Ca^{2+} -Einstroms für diese Zellen und damit den gesamten Nierenglomerulus in FSGS-Patienten noch einmal nachgewiesen werden konnte. In Zukunft könnten deswegen spezifische TRPC6-Inhibitoren eine Therapieoption zur Linderung der Symptome bei FSGS-Patienten sein.

1 Einleitung

In vielzelligen Organismen werden alle lebenswichtigen Prozesse durch Botenstoffe (sog. „second messenger“) wie Hormone, Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Ionen (z.B. Ca^{2+}) oder Neurotransmitter koordiniert. Dabei werden sowohl Informationen zwischen verschiedenen Zellen ausgetauscht, als auch innerhalb von Zellen von einem Ort zu einem anderen weitergeleitet. Jede Zelle reagiert dabei auf zahlreiche Signale, die von Nachbarzellen ausgesandt oder weitervermittelt werden. Signale können nur empfangen werden, wenn die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Dies stellt sicher, dass Zellen nur auf spezifische Reize reagieren. Wird ein Rezeptor aktiviert, löst er eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade aus, was zu einer Reaktion der Zelle, wie zum Beispiel Kontraktion, Proliferation, Migration oder Apoptose führt.

Die Erforschung von Rezeptoren und anderen Proteinen sowie Botenstoffen, die an diesen Signalkaskaden beteiligt sind, ermöglichen es sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse besser zu verstehen und Krankheiten wirkungsvoller zu therapieren.

1.1 Die „Superfamilie“ der TRP (transient receptor potential)-Kanäle

Der Name **TRP** (für „transient receptor potential“) beruht auf dem Phänotyp einer *Drosophila melanogaster* Mutante, die 1969 von Cosens und Manning näher beschrieben wurde. Die Photorezeptoren dieser Mutante reagierten auf Lichtreize lediglich mit schnell inaktivierten, also transienten, Strömen. Im Vergleich dazu wurde der Stromfluss bei Wildtyp-Fruchtfliegen aufrechterhalten, solange Lichtreize den Photorezeptor stimulierten (Cosens & Manning 1969). Etwa 20 Jahre später wurde von Montell und Rubin das erste Gen der **TRP**-Kanäle identifiziert. Inzwischen wurden diverse weitere, ähnliche Ionenkanäle beschrieben, die sich in 7 Familien einteilen lassen und insgesamt wegen ihrer großen Anzahl (28) als „Superfamilie“ bezeichnet werden können (Montell & Rubin 1989, Wes & Chevesich et al. 1995). Eine Familie der **TRP**-Kanäle wird von den **TRPC**-Kanälen (für „classical“ oder „canonical“) repräsentiert, auf deren einzelne Vertreter in dieser Arbeit noch näher eingegangen wird. Neben diesen existieren noch **TRPV**-Kanäle (für „vanilloid“), deren bedeutendster Vertreter TRPV1 unter anderem durch Vanilloide wie Capsaicin aktiviert wird, welches z.B. in Chilischoten enthalten ist und für das Auslösen des Schärfeempfindens verantwortlich ist. TRPV1-Kanäle fungieren dabei als Nocizeptoren und werden besonders stark an freien Nervenendigungen exprimiert. Außerdem wird der Kanal durch Hitzeeinwirkung geöffnet, was die Korrelation von scharfem Essen und dem dabei entstehenden Hitzeempfinden erklärt (zusammengefasst in Clapham 2003). **TRPP**-(für „polycystic kidney disease“), **TRPA**-(für „ankyrin

rich“), **TRPN**-(für „no mechanoreceptor potential C“), **TRPML**-(für „Mucolipin“) , und schließlich **TRPM**-Kanäle (für „Melastatin“), stellen weitere Familien dar. Ein wichtiger Vertreter der **TRPM**-Kanäle ist TRPM8, welcher durch Substanzen wie Menthol und Eukalyptusöl oder dem synthetischen Agonisten Icilin aktivierbar ist, was ein minziges, erfrischend kaltes Empfinden hervorruft (zusammengefasst in Clapham 2003, zusammengefasst in Venkatachalam & Montell 2007). **TRP**-Kanäle spielen jedoch bei vielen weiteren Körperfunktionen eine Rolle. In Abbildung 1 werden die 28 einzelnen Kanäle zusammen mit den zugehörigen Familien dargestellt (zusammengefasst in Venkatachalam & Montell 2007).

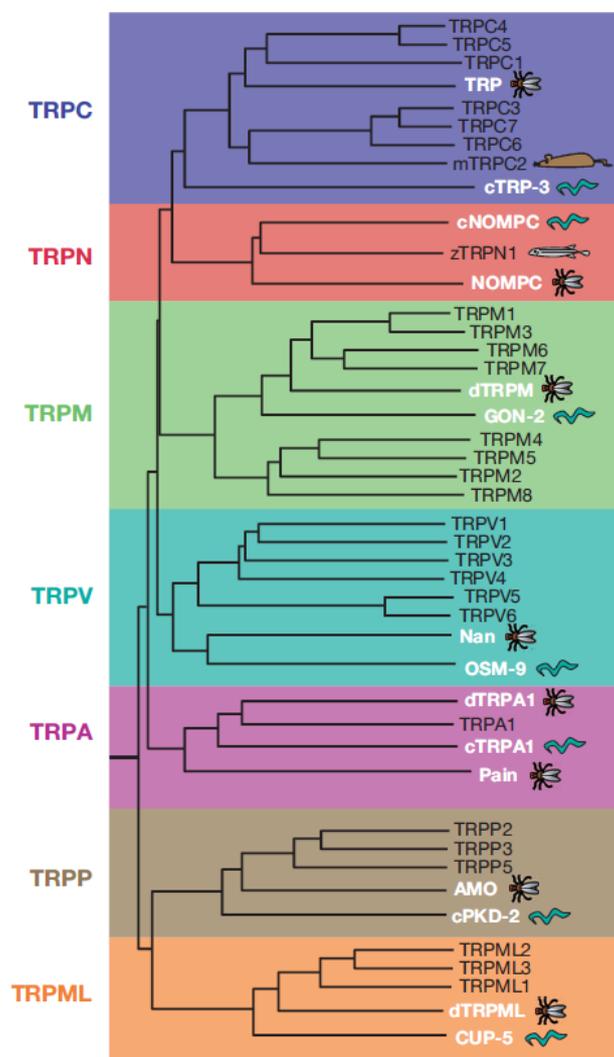


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie.

Die unterschiedlichen TRP-Familien sind farblich gekennzeichnet. 26 der dargestellten TRPs werden beim Menschen exprimiert (schwarze Buchstaben). Der TRPC2-Kanal wird in der Maus exprimiert, existiert beim Menschen jedoch nur als Pseudogen. Der TRPN1 wird lediglich im Zebrafisch, sowie in manchen Fröschen und Nematoden exprimiert. Die Kanäle in weißer Schrift werden nicht im Menschen aber in anderen Organismen exprimiert, was in der Grafik zusätzlich bildlich illustriert wird (Abbildung Venkatachalam & Montell 2007).

TRP-Kanäle sind entwicklungsgeschichtlich sehr alt, die genaue Funktion ist bei den meisten Kanälen jedoch weitgehend ungeklärt. Allen TRP-Kanälen gemeinsam ist, dass sie 6 Transmembrandomänen (1-6) besitzen, die in der Plasmamembran verankert sind. Zwischen Domäne 5 und 6 befindet sich ein „Loop“ bildender Bereich, der als Porenregion bezeichnet wird (Abbildung 2). Man vermutet, dass TRP-Kanäle funktionell Tetramere bilden, indem sich die Porenregionen der einzelnen Kanäle aneinander lagern und eine gemeinsame Pore bilden. Diese Pore ist bei allen TRP-Kanälen durchlässig für positiv geladene Ionen (Kationen) wie zum Beispiel Ca^{2+} -Ionen (zusammengefasst in Woudenberg-Vrenken et al. 2009). Es sind sowohl Homotetramere (vier gleiche Untereinheiten) als auch Heterotetramere (Tetramere aus mehreren verschiedenen Untereinheiten), vorwiegend aus der gleichen TRP-Familie, möglich (Vgl. Kapitel 1.2 und Abbildung 4).

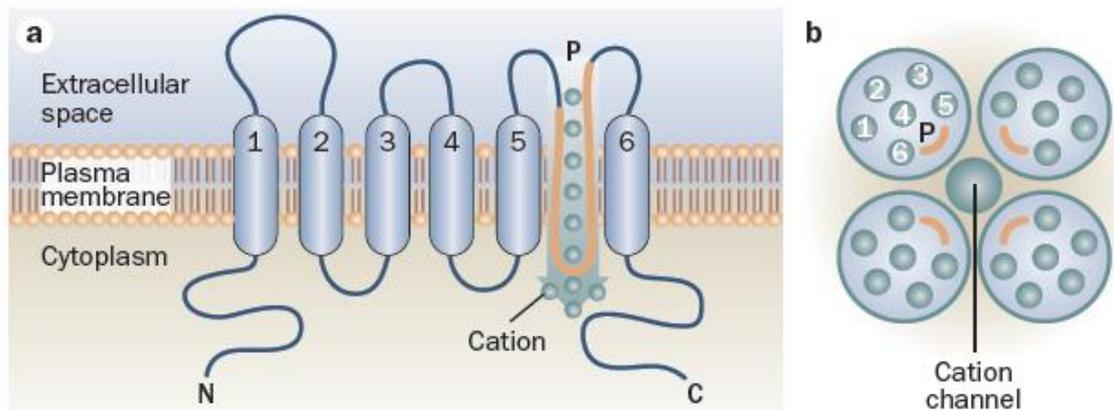


Abbildung 2: Struktur der TRP-Kanäle.

a) TRP-Kanäle bestehen aus 6 Transmembrandomänen (1–6). Zwischen Domäne 5 und 6 befindet sich eine porenformende Region (P). Der Carboxyl(C)- und der Amino(N)-Terminus befinden sich jeweils intrazellulär. b) TRP-Kanäle liegen in der Plasmamembran als Tetramere vor und bilden zusammen eine funktionelle Pore (Abbildung Woudenberg-Vrenken et al. 2009).

Der Carboxy (C)-und der Amino (N)-Terminus der TRP-Kanäle variieren bei den verschiedenen Kanalfamilien in der Länge und der Anzahl der verschiedenen Domänen (Abbildung 3). Die Ankyrin-Domänen am Amino-Terminus, die vermutlich zur Tetramerisierung und Stabilisierung beitragen, sind zum Beispiel nur bei der TRPC-, TRPV- und TRPA-Subfamilie existent. Die stark konservierte TRP-Domäne ist nur in den TRPC-, TRPV- und TRPM-Subfamilien vorhanden (zusammengefasst in Moran 2011, zusammengefasst in Clapham 2003, zusammengefasst in Venkatachalam & Montell 2007). TRPN-Kanäle werden in Abbildung 3 nicht dargestellt, da bis dato sehr wenig über diese Kanäle bekannt ist. Einer Hypothese nach besitzen sie mehrere Ankyrin-Domänen am N-Terminus, die vermutlich an der Kanal-Durchlässigkeit beteiligt sind (Howard & Bechstetd 2004).

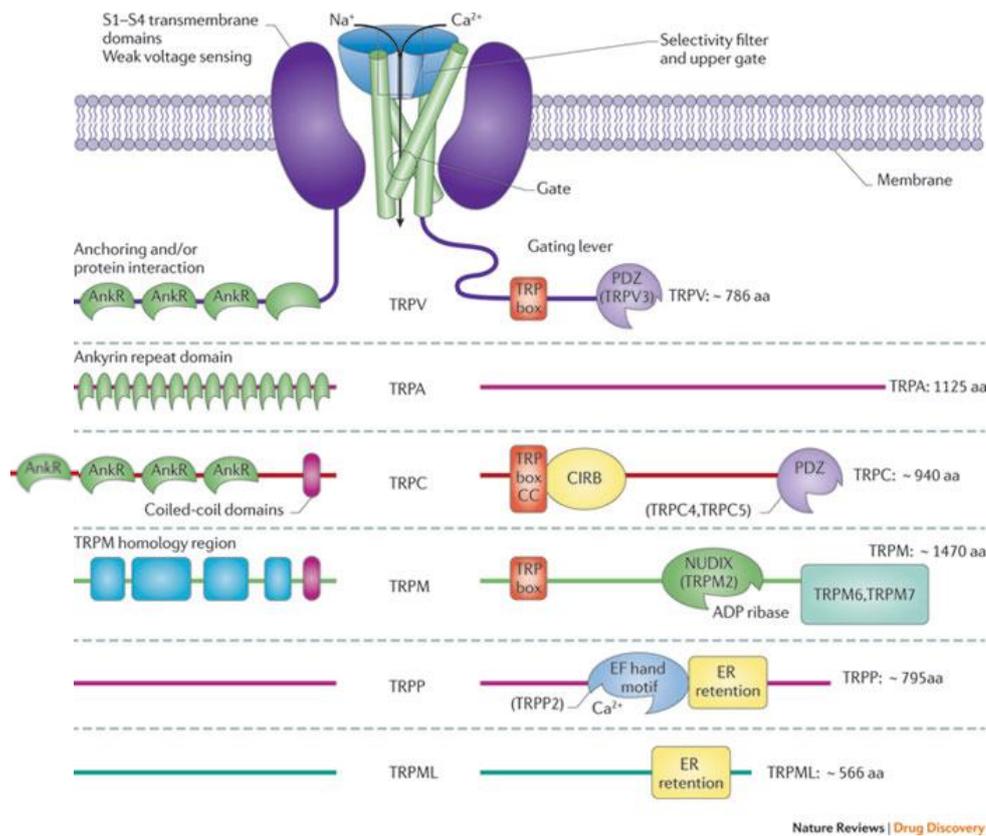


Abbildung 3: Proteinstruktur der N- und C-Termini unterschiedlicher TRP-Familien.

Die TRP-Subfamilien TRPV, TRPA und TRPC besitzen aminoterminalen Ankyrin Domänen (AnkR), welche in den anderen TRP-Subfamilien fehlen. Die TRP-box (TRPV, TRPM, TRPC) ist vermutlich am „gating“ beteiligt. TRPP und TRPML besitzen die „ER retention“-Region (ER = Endoplasmatisches Reticulum), vermutlich wegen ihrer Lokalisation auf intrazellulären Organellen. Weitere Domänen sind aa (Aminosäuren), CIRB (Calmodulin / Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P3) Rezeptor bindende Domäne), NUDIX („nucleoside diphosphate-linked moiety X“), PDZ (Akronym für „postsynaptic density protein 95“ (PSD95)), DLGA („*Drosophila* disc large tumour suppressor“), ZO1 („zonula occludens protein 1“) (Abbildung verändert nach Moran et al. 2011 und Clapham 2003).

TRP Kanäle werden vermehrt im Gehirn, aber auch im Herz, der Lunge, den Nieren und anderen Organen exprimiert (zusammengefasst in Minke & Cook 2002). Unter anderem werden sie in Epithelzellen und glatten Muskelzellen produziert und sind meist in der Plasmamembran lokalisiert, wo sie eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -, Na^+ - und Mg^{2+} -Konzentrationen spielen und an einer Vielzahl physiologischer Vorgänge beteiligt sind (Liman et al. 1999, Pérez et al. 2002, Beech 2005, zusammengefasst in Nilius & Owsianik 2011).

1.2 TRPC-Kanäle

Obwohl TRPC-Kanäle als erste TRP-Kanäle in Säugern kloniert und charakterisiert wurden, ist ihre physiologische Aufgabe noch immer nicht vollständig geklärt. Von allen TRP-Kanälen weisen

TRPC-Kanäle die größte Ähnlichkeit zu den TRP-Kanälen der Fruchtfliege *Drosophila* auf und werden deshalb als „classical“ oder „canonical“ bezeichnet, worauf der Buchstabe „C“ in ihrem Namen hinweist. In Abbildung 3 wird gezeigt, dass alle Mitglieder der TRPC Familie einen ähnlichen Aufbau haben. Am N-Terminus befinden sich 4 Ankyrin-Domänen, die von einer sog. „Coiled-coiled“ Region (stabile „Wendeldomäne“ aus mindestens zwei Einzelhelices) gefolgt werden. An die darauf folgende Transmembranregion schließt sich carboxyterminal eine hoch konservierte TRP-Domäne an. Gefolgt wird diese Region von einer Calmodulin und IP₃-Rezeptor Binderegion (CIRB), die Phosphoinositol binden kann (Kwon et al. 2007). In Abbildung 5 wird dieser Aufbau erneut für den TRPC6-Kanal erläutert.

Die Familie der TRPC-Kanäle hat sieben Vertreter, die von TRPC1-TRPC7 durchnummeriert werden und in vier Subfamilien unterteilt werden können. TRPC1 ist verhältnismäßig einzigartig und bildet die erste der vier Subfamilien. Dieser Kanal wurde als erster menschlicher TRP-Kanal kloniert und wird fast in allen menschlichen, aber auch murinen Geweben exprimiert (zusammengefasst in Nilius & Owsianik 2011).

Dem TRPC1-Kanal sehr ähnlich sind die Kanäle TRPC4 und TRPC5. Sie werden in einer weiteren Subfamilie zusammengefasst und teilen eine Aminosäureidentität von etwa 64%. Am Carboxyterminus besitzen diese Kanäle ein PDZ (postsynaptic density protein 95)-Bindemotiv, das kein anderer TRP-Kanal besitzt (Abbildung 3). TRPC4 wird in vielerlei Geweben, inklusive dem Gehirn und den Nieren, exprimiert (Zechel et al. 2007, Freichel et al. 2005). TRPC5 wird hingegen hauptsächlich in zentralen Nervensystem (ZNS) produziert, wo der Kanal eine wichtige Rolle für die Funktion der Amygdala, unter anderem beim Angstverhalten, spielt (Ricchio et al. 2009).

Die dritte Subfamilie bilden TRPC3, TRPC6 und TRPC7, welche zu 65-78% in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch sind. Außerdem teilen sie eine Sensitivität für die Aktivierung durch Diacylglycerol (DAG)(Hofmann et al. 1999, zusammengefasst in Dietrich et al. 2010, zusammengefasst in Venkatachalam & Montell 2007). TRPC3 wird in geringem Maße in den Zellen der Niere, zusätzlich jedoch genau wie TRPC7, stark in Gefäß- und Herzmuskelzellen exprimiert (zusammengefasst in Clapham 2003). Auf die Expression von TRPC6 wird im nächsten Kapitel speziell eingegangen. TRPC2 fungiert als alleiniger Vertreter einer vierten Subfamilie und ist beim Menschen lediglich als Pseudogen vorhanden (wie ein Gen aufgebaut, jedoch nicht für ein funktionelles Protein kodierend). Wie bereits in Abbildung 1 gezeigt wird TRPC2 jedoch in der Maus exprimiert. Dort befindet er sich in den dendritischen Ausläufern der Nerven des Vomeronasalorgans und wird mit der Pheromon-Wahrnehmung assoziiert, die zur Regulation der sozialen und sexuellen Verhaltensweisen beiträgt (zusammengefasst in Yildirim & Birnbaumer 2007). Während für TRPC2 keine Interaktionen mit anderen TRPC-Kanälen bekannt sind, kann TRPC1 zusammen mit TRPC4 und TRPC5 funktionelle Tetramere bilden. Außerdem wurde vor einigen Jahren gezeigt, dass TRPC1 auch

mit TRPC3, TRPC6 und TRPC7 Komplexe bilden kann (Storch et al. 2012), sich dadurch aber deren Ca^{2+} -Permeabilität verringert. Alle anderen TRPC-Kanäle können sowohl Homo- als auch Heterotetramere (Abbildung 4) bilden, jedoch nur mit Mitgliedern ihrer eigenen Subfamilie (Hofmann et al. 2002, Vergleiche auch Kapitel 1.1).

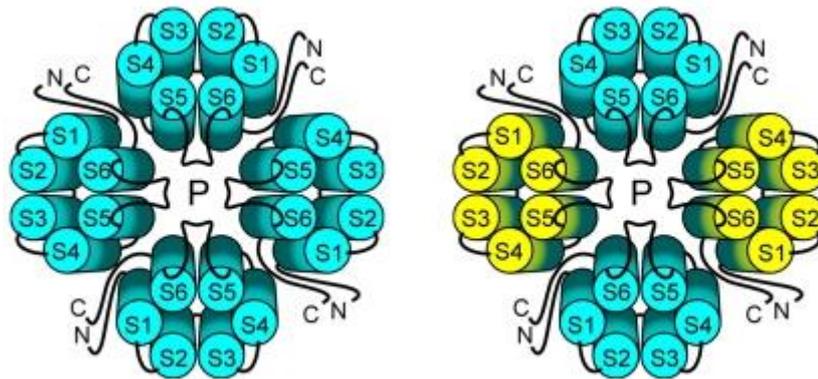


Abbildung 4: Bildung funktioneller TRPC-Kanäle aus gleichen oder unterschiedlichen Untereinheiten.

Bis auf TRPC2 können alle TRPC-Kanäle sowohl Homotetramere (links), als auch Heterotetramere (rechts) bilden (Abbildung www.uni-leipzig.de Schaefer M.).

Lange Zeit wurde angenommen, dass alle TRP-Kanäle Speicher-operierte Kanäle (SOC) sind und nach Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher aktiviert werden. Nach weiteren Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine Rezeptor-operierte (ROC) Kanalaktivierung möglich ist (Hofmann et al. 1999, Okada et al. 1999). Beide Aktivierungswege werden in Kapitel 1.3.2 noch einmal näher erläutert.

1.3 TRPC6-Kanäle

1.3.1 Struktur und Lokalisation

TRPC6 wurde ursprünglich aus der mRNA des Mausgehirns amplifiziert (Boulay et al. 1997) und ist nahezu (74%) identisch mit TRPC3. Das Gen besitzt 13 Exons und ist auf dem murinen Chromosom 9 lokalisiert (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Die cDNA des humanen TRPC6 konnte aus der Plazenta isoliert werden (Hofmann et al. 1999) und das zugehörige Gen ist auf Chromosom 11 q21-q22 lokalisiert (D'Esposito et al. 1998). Der murine TRPC6 besteht aus 930 Aminosäuren, der humane aus 931.

Die Proteinstruktur wird in Abbildung 5 dargestellt. Nach vier Ankyrindomänen schließt sich eine „Coiled-Coiled“-Domäne (stabile „Wendeldomäne“ aus mindestens zwei Einzelhelices) an, der die 6 Transmembrandomänen folgen. Zwischen Domäne 1 und 2 befindet sich, genau wie zwischen Domäne 3 und 4, je eine extrazelluläre Proteindomäne, in welcher je eine Glycolysierungsstelle lokalisiert werden konnte, was unter anderem für die Basalaktivität des Kanales von großer Bedeutung ist. Die doppelte Glykosylierung ist dafür verantwortlich, dass die Basalaktivität des TRPC6 geringer als die des einzeln glykosilierten TRPC3-Kanals ist. Carboxyterminal von der sechsten Transmembrandomäne schließt sich die hochkonservierte TRP-Domäne mit unbekannter Funktion an. Dieser folgt dann die CIRB-Region (Calmodulin / Inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins (1, 4,5) P3) Rezeptor bindende Domäne), an welche sich erneut eine „Coiled-Coiled“ Domäne anschließt.

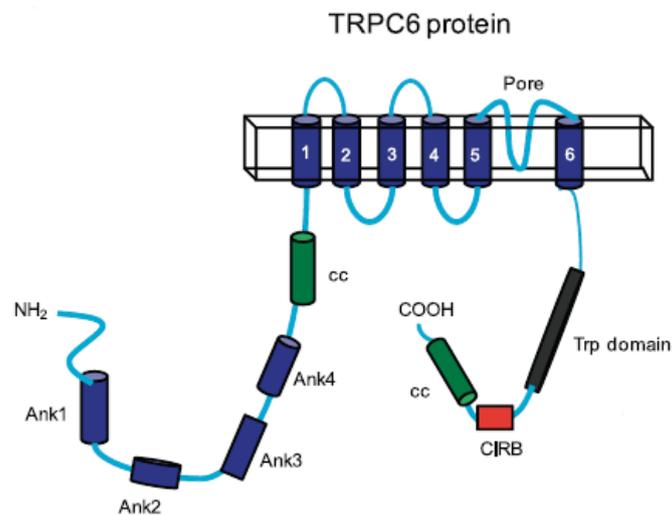


Abbildung 5: TRPC6 Proteinstruktur.

Der TRPC6-Kanal besitzt vier Ankyrindomänen (Ank1-4), zwei „Coiled-coiled“-Domänen (cc), sechs Transmembrandomänen (1-6), eine TRP-Domäne und eine CIRB-Region (Calmodulin / Inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P3) Rezeptor bindende Domäne) (Dryer & Reiser 2010).

Unter anderem mit „Northern Blot“-Analysen konnte gezeigt werden, dass TRPC6 hauptsächlich im murinen Gehirn und der Lunge (Boulay et al. 1997) exprimiert wird. Der humane TRPC6 wird hingegen in vielen Geweben exprimiert, ist jedoch sehr stark in der Lunge, der Plazenta und der Milz, aber auch in Geweben mit glatter Muskulatur (Hofmann et al. 2000), sowie im Verdauungstrakt (Beech et al. 2004) vertreten. Außerdem ist TRPC6 in präkapillären arteriellen glatten Muskelzellen der Lunge unter anderem für die akute hypoxische Vasokonstriktion (aHPV) nach partieller Lungenblockade verantwortlich. Aus diesem Grund zeigen TRPC6-defizient Mäuse keine aHPV und leiden an einer starken arteriellen Hypoxie, nachdem Teile der Lunge blockiert werden (Weissmann

et al. 2006, Dietrich et al. 2007). Darüber hinaus finden sich TRPC6- und TRPC3-Kanäle auch in der Niere (Vgl. Kapitel 1.9) (zusammengefasst in Hsu et al. 2007, zusammengefasst in Woudenberg-Vrenken et al. 2009)

1.3.2 Signalkaskaden mit Rezeptor (ROC)- oder Speicher (SOC)-operiertem Ca^{2+} -Einstrom

Der Inositol-Lipid-Signalweg ist eine weit verbreitete Signaltransduktionskaskade in sehr vielen eukaryotischen Zellen, die essentiell für die Regulation der TRPC-Kanäle ist. Die Rezeptor (ROC)- und Speicher (SOC)-operierten Regulationswege für den TRPC6-Kanal sind in Abbildung 6 dargestellt. Rezeptor-operierte Signalwege starten mit der Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. In Abbildung 6 wird Angiotensin II als Ligand dargestellt, der an den AT_1 -Rezeptor binden kann. Nach Rezeptorbindung werden spezifische Phospholipase C (PLC)-Isoformen über unterschiedliche Signalwege aktiviert (z. B. $\text{PLC}\beta$ oder $\text{PLC}\epsilon$, siehe Abbildung 6), die membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) spalten. Der „second-messenger“ DAG aktiviert anschließend z.B. Proteinkinase C (PKC) (zusammengefasst in Shu et al. 2008) oder kann direkt TRPC6-Kanäle öffnen, wodurch es zu Ca^{2+} -Einstrom kommt (Hofmann et al. 1999, Okada et al. 1999). TRPC6 wird, neben TRPC3 und TRPC7, als DAG-sensitiver TRPC-Kanal bezeichnet, was eine Rezeptor-operierte Kanalöffnung (ROC) ermöglicht. Außerdem kann der zweite gebildete „second-messenger“ IP_3 im Zytosol bis zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gelangen, wo spezielle IP_3 -Rezeptoren von diesem Liganden aktiviert werden können. Durch die Aktivierung der IP_3 -Rezeptoren kommt es zu einer Ca^{2+} -Entleerung des ERs, welches als interner Ca^{2+} -Speicher fungiert. Dabei fließen die Ca^{2+} -Ionen durch die IP_3 -Rezeptoren, die gleichzeitig Kanalfunktionen haben, in das Zytosol und erhöhen dort die Ca^{2+} -Konzentration. Um den Ca^{2+} -Verlust der internen Speicher zu kompensieren, werden im Anschluss an den Ca^{2+} -Einstrom Speicher-operierte Ca^{2+} -Kanäle aktiviert (SOC). Ein großer Durchbruch bezüglich des Verständnisses von Speicher operiertem Ca^{2+} -Influx war die Entdeckung des Ca^{2+} -Sensors STIM und der Orai-Kanäle (zusammengefasst in Cahalan 2009). STIM1 wird vorrangig in der Membran des ERs exprimiert und besitzt zwei Ca^{2+} -bindenden EF-Hände am N-Terminus der Transmembrandomäne im Inneren des ERs, die ideal platziert sind um die Ca^{2+} -Konzentrationen im ER zu messen (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Eine verminderte Konzentration führt dazu, dass STIM Proteine in sog. „Punctae“ aggregieren und SOC gesteuerten Kanälen in der Plasmamembran, wie zum Beispiel Orai-Kanäle, aktivieren können (Vergleiche Abbildung 6). Zwischenzeitlich deuten mehrere

Veröffentlichungen darauf hin, dass STIM1 sowohl mit Orai1 als auch mit TRPC-Kanälen in Kontakt stehen. Es könnten also komplexe Systeme aus allen drei Proteinen bestehen (Liao et al. 2009, zusammengefasst in Yuan et al. 2009, zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014).

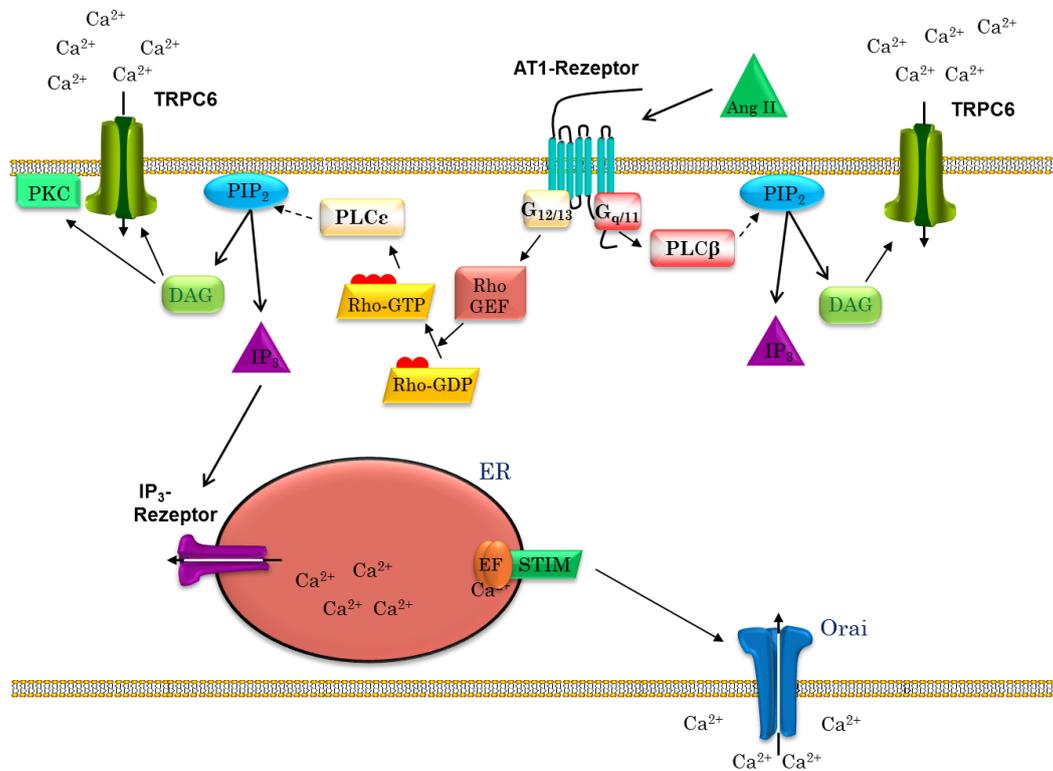


Abbildung 6: Signaltransduktionskaskaden für die Regulation von TRPC6-Kanälen.

AT₁-Rezeptor (Angiotensin 1-Rezeptor), Ang II (Angiotensin II), PKC (Proteinkinase C), DAG (Diacylglycerol), PLCβ und PLCε (Phospholipase Cβ und Cε), PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat), IP₃ (Inositoltrisphosphat), ER (Endoplasmatisches Retikulum) (erweitert nach Fahlbusch 2012).

Durch die erhöhte zytosolische Ca²⁺-Konzentration können dann diverse Signaltransduktionskaskaden ablaufen, die letztendlich zu Muskelkontraktion, Proliferation, Lernvorgängen oder Apoptose führen können (Berridge et al. 2000). Außerdem kann der Ca²⁺-Einstrom auch zu pathophysiologischen Prozessen beitragen. PLCε kann dabei nicht nur durch GPCRs (G-Protein gekoppelte Rezeptoren), sondern auch durch PKCs aktiviert werden (zusammengefasst in Smrcka et al. 2012).

Reguliert wird PLCε durch vielerlei Signalproteine, dies kann sowohl über Mitglieder der Ras-Familie sowie über RhoA sein. Anschließend wird, wie von allen PLC-Enzymen, Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) durch die Spaltung des Phospholipides Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) gebildet (zusammengefasst in Smrcka et al. 2012,

zusammengefasst in Kalwa et al. 2015). Diese charakteristische Eigenschaft von PLC ϵ führt zur Vermutung, dass vermehrte DAG-Produktion, nach Aktivierung des AT $_1$ -Rezeptors durch PLC ϵ , TRPC6 in Podozyten aktivieren könnte (Dietrich et al. 2010). Während jedoch die TRPC6-Aktivierung durch PLC β und PLC γ eingehend bekannt ist (zusammengefasst in Kalwa et al. 2015), wurde die Rolle von PLC ϵ bei der TRPC-Aktivierung bisher nicht untersucht (Smrcka et al. 2012).

1.3.3 Pharmakologie

In den letzten Jahren wurde weltweit viel Arbeit in die Erforschung spezifischer Blocker und Aktivatoren für TRPC6 gesetzt. Wie viele TRPs wird auch TRPC6 durch Ionen seltener Erdmetalle, wie Lantan- (La $^{3+}$) oder Gadoliniumionen (Gd $^{3+}$), unspezifisch inhibiert (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Ein weiterer unspezifischer Blocker für TRPC6 ist Clotrimazol, ein Pyrrol, das in der Medizin als Antimykotikum verwendet wird, und unter anderem unter dem Handelsnamen Canesten[®] vertrieben wird. Ursprünglich beschrieben als spezifischer Blocker für TRPM2 wurde später klar, dass auch TRPM3, TRPV4 und TRPC6 geblockt werden. Aktiviert werden hingegen TRPV1 und TRPA1 (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). SKF-96365 (1-[β -(3-(4-Methoxyphenyl)propoxy)-4-methoxyphenethyl]-1H-Imidazol Hydrochlorid) wurde ursprünglich als Inhibitor der Rezeptor- und Speicher-operierten Erhöhung des intrazellulären Ca $^{2+}$ durch spannungs-unabhängige Ca $^{2+}$ -Kanäle beschrieben. Später konnte festgestellt werden, dass TRPC6 (IC $_{50}$ = 2 μ M) in einem heterologen Überexpressionsmodell in der Tat um ein mehrfaches effizienter geblockt wird, als zum Beispiel TRPM3 (IC $_{50}$ = 12 μ M), TRPV4 (IC $_{50}$ = 25 μ M) oder TRPM2 (IC $_{50}$ = 75 μ M) (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Vor kurzem wurde ein weiterer, etwas spezifischerer, TRPC6 Blocker gefunden, das synthetische Gestagen Norgestimate (IC $_{50}$ = 5,2 μ M). Zusätzlich blockt es aber TRPC3 bei noch geringeren Konzentrationen (IC $_{50}$ = 3,0 μ M). Andere TRPC-Kanäle benötigen hingegen signifikant höhere Konzentrationen um geblockt zu werden (>10 μ M) (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014).

Der bisher vielversprechendste Blocker mit einer IC $_{50}$ von 3,2 μ M und einer mindestens 2,5-fach höheren Selektivität für TRPC6 im Vergleich zu nah verwandten TRPC3 wurde von Urban et al. 2012 veröffentlicht. Dieser TRPC6-Blocker, mit dem Namen "8009-5364", hat in Versuchen die induzierte, akute, hypoxische Vasokonstriktion in den Lungenarterien in vivo effektiv inhibiert. Aus diesen Gründen ist er ein potentiell vielversprechender Anwärter zur Entwicklung eines Medikaments, um künftig pulmonale Hypertonie effektiver behandeln zu können (Urban et al. 2012, zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Eine Nachsynthese dieses Blockers liegt unserem Labor vor und kann demnächst für Versuche herangezogen werden.

Für die Erforschung von Kanälen sind außerdem spezifische Aktivatoren von großer Bedeutung. Hierbei hat sich das membranpermeable DAG-Analogon OAG als sehr nützlich erwiesen (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014).

Überraschender Weise wurde auch Flufenamat (FAA 100 μM) als Aktivator für heterolog exprimierte TRPC6-Kanäle in Hek293-Zellen identifiziert, der interessanterweise die nahe verwandten Kanäle TRPC3 und TRPC7 blockiert (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014).

Hyperforin, eine antidepressiv wirkende Substanz aus dem Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), wurde ebenfalls als Aktivator von TRPC6 beschrieben. Interessanterweise gibt es Daten dafür, dass eine Konzentration von 10 μM Hyperforin TRPC6-Kanäle in einem heterologen Überexpressionssystem aktiviert, die nahe verwandten TRPC3-Kanäle jedoch nicht angeregt werden (Leuner et al. 2007). Hyperforin löst jedoch bei ähnlichen Konzentrationen auch unspezifische zelluläre Effekte aus, die unter anderem mit einer Zn^{2+} - und Ca^{2+} -Ausschüttung aus den Mitochondrien zusammenhängen könnten (Tu et al. 2010). Aus diesem Grund ist es nötig, eine genauere Analyse der Wirkung von Hyperforin und seinen Derivaten in WT- und TRPC6^{-/-}-Zellen durchzuführen.

Diverse weitere Blocker und Aktivatoren wurden identifiziert, kommen jedoch aus unterschiedlichsten Gründen, wie zum Beispiel geringer Selektivität oder hoher Toxizität, derzeit nicht zum Einsatz (Urban et al. 2012). Künftig werden besonders Blocker eine große Rolle in der weiteren Erforschung der TRPC6-Kanäle spielen und könnten als neue therapeutische Ansätze für Patienten mit überaktivierten TRPC6-Kanälen (z.B. Fokaler Segmentaler Glomerulus Sklerose oder pulmonaler Hypertonie) dienen.

1.4 Phosphoinositid-Phospholipase-C-Isoformen

Phosphoinositid spezifische Phospholipasen C (auch Phospholipase C, kurz PLC) können durch diverse extrazelluläre Rezeptorstimuli aktiviert werden. Sie hydrolysieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu den beiden „second messengern“ Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), die wiederum andere Proteine der Signaltransduktionskaskade aktivieren (siehe Abbildung 6 und Rohacs 2013, Zusammenfassung in Suh et al. 2008).

Die erste PLC, mit einem Molekulargewicht von 68 kDA, wurde 1981 von Takenawa und Nagai aufgereinigt. Nach und nach wurde eine Vielzahl unterschiedlicher PLCs mit abweichenden molekularen Massen gefunden. So war in den späten 80ern bereits die cDNA-Abfolge von PLC- β , - γ und - δ bekannt. Bei Wirbeltieren sind momentan 6 Subtypen von Phospholipasen C (β , γ , δ , ϵ , ζ , η) bekannt, die sich wiederum in 13 Isoformen unterteilen lassen (zusammengefasst in Suh et al. 2008).

Bisher ist jedoch wenig über die genaue Funktion und Hierarchie der verschiedenen Isoformen bekannt. Alle Subtypen, sowie ihre Aktivierung und Funktion, werden in Abbildung 7 näher erläutert.

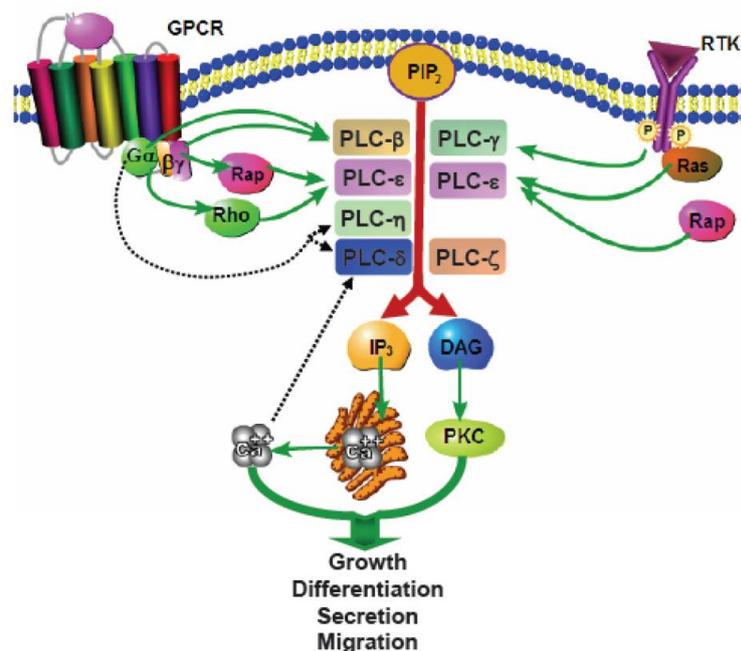


Abbildung 7: Aktivierung und Funktion der verschiedenen PLC-Isoformen.

Verschiedene extrazelluläre Rezeptorstimuli sorgen für eine Aktivierung der PLC Isoformen. Zu einer Aktivierung kommt es zum Beispiel wenn Agonisten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, links) oder Rezeptortyrosin-Kinasen (RTK, rechts) aktivieren, was über nachgeschaltete Stimulation verschiedenster Proteine (z.B. Rho, Rap oder Ras) geschehen kann. Anschließend wird das membranständige PIP₂ von einer PLC-Isoform zu IP₃ und DAG gespalten, was zur Aktivierung von Proteinkinasen C (PKC) und der Entleerung der internen Ca²⁺-Speicher sowie nachgeschaltet zu Wachstum („Growth“), Differenzierung („Differentiation“), Sekretion („Secretion“) oder Migration („Migration“) der Zelle führen kann (Abbildung aus Suh et al. 2008).

Jedes einzelne Isoenzym wird in mehreren Spleißvarianten exprimiert, die jedoch durch ähnliche funktionelle Protein-Domänen gekennzeichnet sind: die X-, Y-Domänen (verantwortlich für die katalytische Aktivität), die C2-Domänen (für die Plasmamembranbindung) und eine EF-Hand-Domäne zur Ca²⁺-Bindung. Andere Domänen wie RA1 / RA2 (ermöglichen Interaktion mit dem Ras Protein), die Ras-GEF-Bindungsstellen oder das PH (für Pleckstrin homologe Domäne)- Proteinmotiv (zur Bindung von PIP₂ und G-Protein-Untereinheiten), kommen hingegen nicht in allen Isoformen vor. Die Verteilung dieser Unterformen ist gewebs- und organspezifisch (zusammengefasst in Suh et al. 2008). Die einzelnen Isoformen und ihre Spleißvarianten werden in Abbildung 8 dargestellt.

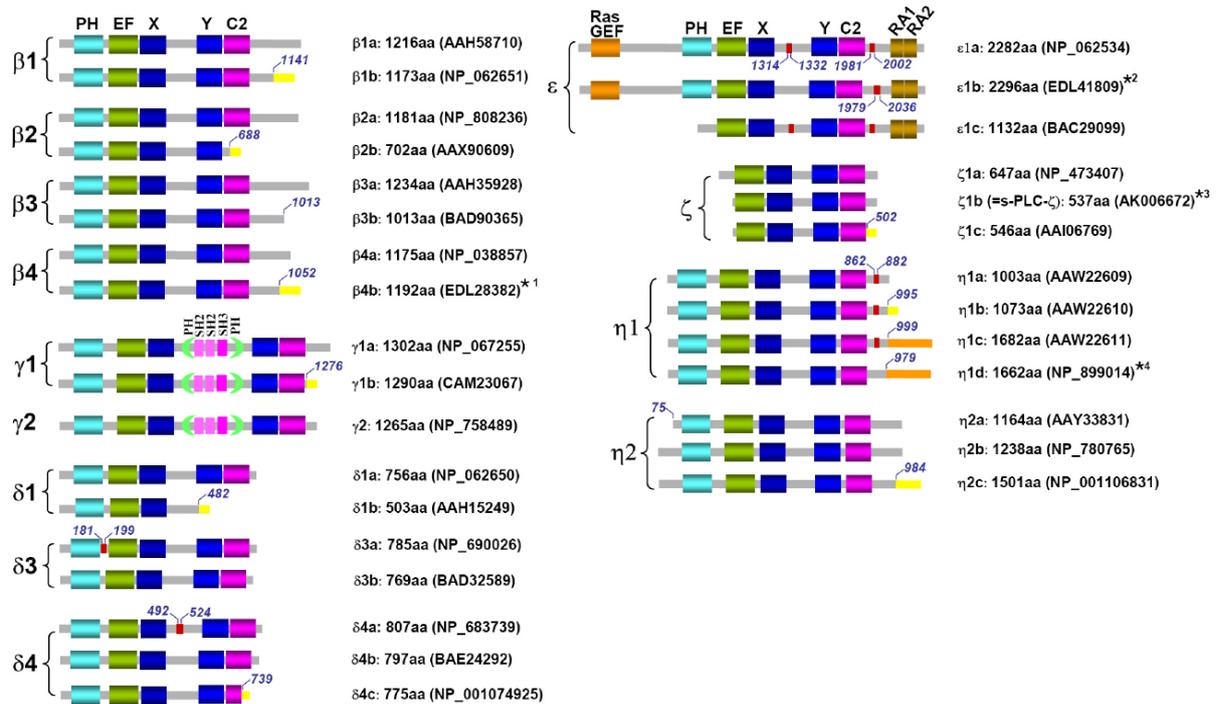


Abbildung 8: PLC-Isoformen und Spleißvarianten.

PH (Plekstrin homologe Domäne), EF (EF-Hand), katalytische X- und Y-Domänen, C2 (funktionelle Domäne), Ras-GEF (Bindestelle für Ras-GEF), RA1 / RA2 (ermöglicht Interaktion mit Ras-Proteinen) (Abbildung Suh et al. 2008).

Die verschiedenen Isoformen werden in vielen Körpergeweben exprimiert, fast alle können jedoch verstärkt im Gehirn gefunden werden. Eine systematische Analyse der Genexpression durch Shu et al. 2008 ergab das in Tabelle 1 dargestellte relative Expressionsmuster in der Niere, was den Anteil einer bestimmten Isoform im Verhältnis zum Anteil der Isoform im Rest des Körpers angibt.

Tabelle 1: Anteile der einzelnen PLC-Isoformen in der Niere (Suh et al. 2008)

PLC-Isoform	Anteil der Isoform in der Niere [% der Isoform im ganzen Körper]
PLC β_1	4,1
PLC β_2	2,0
PLC β_3	2,9
PLC β_4	2,6
PLC γ_1	2,5
PLC γ_2	8,2
PLC δ_1	3,0
PLC δ_3	2,4
PLC δ_4	6,0
PLC ϵ	1,4
PLC ζ	keine Angabe
PLC η_1	keine Angabe
PLC η_2	3,3

Über die Aktivierung von TRPC6 durch die Subgruppen der PLC β - und PLC γ -Isozyme wurde bereits mehrfach berichtet (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Zur Aktivierung durch PLC ϵ gab es bisher jedoch keine Veröffentlichungen. Auf die für diese Arbeit besonders wichtigen Subtypen, PLC β , PLC γ und PLC ϵ , wird in den nächsten drei Kapiteln näher eingegangen.

1.5 PLC β -Isoformen

Es existieren vier Isoformen von PLC β , die von 1 bis 4 durchnummeriert werden und deren verschiedene Spleißvarianten in Abbildung 8 erläutert werden. Neben den hoch konservierten X- und Y-Domänen haben PLC β s noch andere Domänen, zum Beispiel die PH- und die C2-Domäne, mit anderen PLCs gemeinsam. Sie unterscheiden sich hingegen durch ihren stark verlängerten C-Terminus, der unter anderem bei der Interaktion mit G-Proteinen der Gq-Familie und bei der Membranbindung eine wichtige Rolle spielt (Rebecchi et al. 2000, Rhee 2001, Faenza et al. 2008, Drin & Scarlata 2007).

Die Expression der PLC β -Subtypen in den verschiedenen Geweben des Körpers konnte zuerst im „Northern Blot“ auf mRNA-Ebene und schließlich durch Entwicklung neuer spezifischer Antikörpern auch im „Western-Blot“ auf Proteinebene analysiert werden (Kim et al. 1997). Dabei wurde festgestellt, dass PLC β_1 die am meisten exprimierte Isoform ist. Man findet sie nahezu im gesamten Körper, vor allem jedoch im Gehirn. PLC β_1 -defiziente Mäuse erleiden phänotypisch schwere

epileptische Krampfanfälle, was zum plötzlichen Tod der Mäuse führt. Dies legt nahe, dass PLC β_1 für die normale Funktion inhibitorischer Neuronen von großer Bedeutung ist (Kim et al. 1997).

Außerdem ist die PLC β_1 -Isoform am stärksten im Nucleus vieler Zellen lokalisiert. Dort ist sie unter anderem in den sog. „speckels“ (Faktoren, die zum Spleißen benötigt werden) identifiziert worden (zusammengefasst in Suh et al. 2008).

PLC β_1 spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Differenzierung hämatopoetischer Zellen (zusammengefasst in Suh et al. 2008) und ihre Funktion ist bei verschiedenen hämatologischen Defekten, wie dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder der akuten myeloischen Leukämie (AML), verändert. Mittels „Fluorescence in situ Hybridisierung“ (FISH) gelang es Suh et al. 2008 in einer kleinen Anzahl von Hochrisiko-MDS-Patienten nachzuweisen, dass eine Deletion im PLC β_1 Gen eine schlechtere klinische Prognose bedeutet.

1.6 PLC γ -Isoformen

PLC γ_1 und PLC γ_2 werden im Körper ubiquitär exprimiert. PLC γ_1 ist vor allem in Gehirn, Magen-Darm-Trakt, den Geschlechtsorganen und der Lunge lokalisiert (Shu et al. 2008). Außerdem findet man es vermehrt in hämatopoetischen Zellen und kolorektalen Karzinomzellen (Arteaga et al. 1991, Homma et al. 1989). PLC γ_2 wird ebenfalls verstärkt im Gehirn und den Geschlechtsorganen exprimiert, die größten Anteile finden sich jedoch in den Lymphknoten und den Nieren (Shu et al. 2008).

PLC γ_2 -defiziente Mäuse weisen diverse Beeinträchtigungen der Signalweiterleitung nach Rezeptoren der Immunglobulin-Familie auf. Beispielsweise ist die Anzahl der reifen B-Zellen aufgrund einer gestörten B-Zelldifferenzierung stark vermindert (Hashimoto et al. 2000).

Kanda et al. 2011 zeigten, dass eine Tyrosin Phosphorylierung von TRPC6 eine Komplexbildung mit PLC γ_1 nach sich zieht, was für die Oberflächenexpression von TRPC6 erforderlich ist. Im Weiteren zeigten sie, dass Nephrin mit seiner zytoplasmatischen Domäne in der Lage ist an phosphorylierte TRPC6-Kanäle zu binden, was wiederum die TRPC6-PLC γ_1 -Komplexbildung inhibiert, was im Anschluß die TRPC6-Oberflächenexpression sowie die TRPC6-Aktivierung verhindert. Manche FSGS-assoziierten Mutationen verändern TRPC6 dahingehend, dass der Kanal nicht mehr von Nephrin gebunden werden kann, was wiederum die Oberflächenexpression und Aktivierung des TRPC6-Kanals fördert (zusammengefasst in Kanda et al. 2011).

1.7 PLC ϵ -Isoform

Während PLC ϵ schon 1998, zuerst im *Caenorhabditis elegans*, als Ras Effektormolekül identifiziert wurde (Shibatohge et al. 1998, zusammengefasst in Smrcka et al. 2012), dauerte es noch drei weitere Jahre, bis das Gen der Säugetiere, unabhängig von einander, von drei verschiedenen Forschungsgruppen kloniert werden konnte (Kelley et al. 2001, Song et al. 2001, Lopez et al. 2001, zusammengefasst in Smrcka et al. 2012).

Bei PLC ϵ existiert nur eine Isoform, die allerdings in 2 (zusammengefasst in und Smrcka et al. 2012) oder 3 (zusammengefasst in Shu et al. 2008) Spleißvarianten (PLC ϵ_{1a} , PLC ϵ_{1b} und PLC ϵ_{1c}) vorliegt (siehe Abbildung 8).

Smrcka et al. 2012 vermuten, dass PLC ϵ in vielen Geweben lokalisiert ist, meist jedoch nur in äußerst geringen Mengen, die signifikant kleiner sind als die Mengen an anderen PLC-Isoformen. Es gibt bisher allerdings keine quantitative Analyse, welche diese Hypothese bestätigt. PLC ϵ ist das größte der PLC-Isoenzyme und besitzt, neben den PLC-typischen Bereichen, drei Domänen, die in keiner anderen PLC gefunden werden können (Vergleiche Abbildung 8). Zwei RA Domänen, welche C-terminal lokalisiert sind, ermöglichen die GTP-abhängige Interaktion mit Ras-Proteinen (kleine G-Proteine) (Song et al. 2001, Bunney et al. 2006) und die N-terminale Ras-GEF Domäne, welche die Ras-GEF-Bindung ermöglicht (Vergleiche Abbildung 8) (Jin et al. 2001).

Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass sich etwa 1,4% der im Körper vorhandenen PLC ϵ in der Niere lokalisieren lässt. Die Expression ist also im Vergleich zu anderen Geweben, wie dem Gehirn, verhältnismäßig gering.

Die PLC ϵ -Signalkaskade wird durch diverse Signale, wie zum Beispiel Mitglieder der Ras-Familie und RhoA, reguliert. Im Anschluß an die Aktivierung wird Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) durch die enzymatische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) gebildet (zusammengefasst in Smrcka et al. 2012, zusammengefasst in Kalwa et al. 2015). Die direkte Aktivierung von PLC ϵ kann dabei in 2 Klassen unterteilt werden: Diejenigen Proteine, die direkt mit der RA2-Domäne der PLC ϵ interagieren (z.B. Ras und Rap) und diejenigen, welche an anderen Stellen der PLC ϵ angreifen (z.B. Rho) (zusammengefasst in Smrcka et al. 2012).

Dabei kann die Signalkaskade über diverse G α -gekoppelte GPCRs (G-Protein gekoppelte Rezeptoren), wie zum Beispiel Rezeptoren für Adrenalin oder PGE $_1$, aber auch EGF und PDGF, ausgelöst werden (Schmidt et al. 2001, Evellin et al. 2002, zusammengefasst in Suh et al. 2008). Zudem weiß man, dass zahlreiche RhoGEFs durch G α_{12} und G α_{13} aktiviert werden und dass dies zur Bildung von aktivem, GTP-gebundenem RhoA führt. Aktives RhoA stimuliert anschließend die Aktivität von PLC ϵ , indem es direkt an die spezifische Y-Domäne der PLC ϵ bindet (zusammengefasst in Suh et al. 2008).

Diverse andere GPCR-Liganden, wie Lysophosphatid Säure (LPA), Thrombin oder Endothelin, können PLC ϵ , ebenso wie PLC β aktivieren, was auf Gemeinsamkeiten beider PLC-Subtypen hindeutet. Außerdem lassen sich beide Subtypen sowohl durch α -Untereinheiten als auch durch $\beta\gamma$ -Dimere heterotrimerer G-Proteine stimulieren (Lopez et al. 2001, Wing et al. 2001). Die PLC ϵ -Aktivierung kann dabei nicht direkt durch G $\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten, sondern über p115-RhoGEF oder andere RhoGEFs, welche die RhoA Aktivierung katalysieren, stattfinden (Hains et al. 2006).

In gendefizienten Mäusen, die keine funktionelle PLC ϵ mehr exprimieren, zeigte sich dass PLC ϵ eine Rolle in der Entwicklung und Funktion des Herzens spielt (Tadano et al. 2005, Wang et al. 2005). Diverse andere Veröffentlichungen zeigen, dass PLC ϵ eine Rolle bei der Zellproliferation spielt, was bei gendefizienten Tieren zum Beispiel zu geringeren Tumorraten, nach Induktion durch ein Karzinogen führt (zusammengefasst in Suh et al. 2008).

Außerdem wird vermutet, dass die renale Abwesenheit von PLC ϵ die Entwicklung der Niere im Kapillar-Loop-Stadium stoppen könnte, was später zu Nierenversagen führen würde (zusammengefasst in Suh et al. 2008). Darüber hinaus führen Mutationen in PLC ϵ beim Menschen zu pathologischen Nierenerkrankungen, wie zum Beispiel die Mesangialzellsklerose oder die Fokale Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) (Hinkes et al. 2006).

1.8 Lokalisation, charakteristischer Aufbau und Funktion der Niere

Die etwa 10 cm langen, bohnenförmigen menschlichen Nieren wiegen zwischen 120 und 300 g und liegen in der Lendengegend beidseits der Wirbelsäule. Die Nieren sind von einer Fettkapsel umgeben (capsula adiposa) und vom bindegewebigen Faszien sack umhüllt (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008).

Die drei Hauptaufgaben der Nieren bestehen einerseits in der Ausscheidung schädlicher Stoffwechselprodukte (z.B. Harnstoff, Harnsäure, Abbauprodukte des Eiweißstoffwechsels) und anderer giftiger Substanzen (z.B. Arzneistoffe). Andererseits sorgen die Nieren für die Aufrechterhaltung der physiologischen Elektrolytkonzentrationen im Körper sowie für die Regulation des Säure-Base-Gleichgewichtes und des Flüssigkeitshaushaltes. Die dritte wichtige Aufgabe der Niere ist die Produktion hormonähnlicher Substanzen, wie zum Beispiel Renin oder Erythropoetin, die eine wichtige Rolle bei der Kreislaufregulation und der Blutbildung spielen (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008). Darüber hinaus sind die Nieren auch an der Regulation des Knochenstoffwechsels, durch Bildung von aktivem Vitamin D, beteiligt.

Insgesamt sorgt die Niere durch die Ausscheidung sowie die Rückresorption verschiedenster Stoffe für die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes aller Körperflüssigkeiten und stellt eine ausgewogene Versorgung aller Organe mit Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen sicher.

Ein Schnitt durch die Niere zeigt eine Gliederung des Gewebes in die Bereiche der Nierenrinde (cortex renalis) und des Nierenmarks (medulla renalis) (Abbildung 9). Die Nierenrinde ist beim Menschen etwa 8 mm breit und befindet sich unmittelbar unter der bindegewebsartigen Nierenkapsel (capsula fibrosa). Die Nierenrinde erscheint dunkelrot, was pro Niere durch etwa 1,2 Millionen Nierenkörperchen bedingt ist, die jeweils blutgefüllte Kapillarknäuel (Glomeruli) enthalten, die die eigentliche Filtration übernehmen (Abbildung 10). An die Nierenrinde anliegend befindet sich das Nierenmark, welches aus 10-12 Markpyramiden gebildet wird. Zwischen den Pyramiden reicht die Rinde in Form von Säulen bis tief in das Mark. In den Nierenpyramiden befinden sich Bündel von Sammelrohren (Markstrahlen), die in den Nierenpapillen (papilla renalis) in die Nierenkelche (calix renalis) münden (Abbildung 9).

Am Eingang zur Niere (Nierenpforte) teilt sich die Arterie in 5-6 interlobare Gefäße, die sich weiter verzweigen und am Ende die Arteriolen bilden, die das Blut den Kapillarschlingen des Glomerulus zuführen. Nach der Filtration leiten efferente Arteriolen das Blut, welches die Filtrationseinheit passiert hat, wieder vom Glomerulus weg, zurück in den Körper (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008).

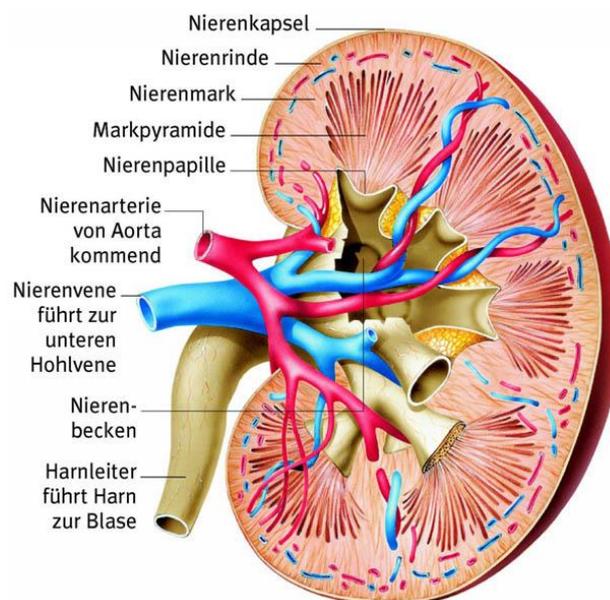


Abbildung 9: Aufbau der Niere.

An die Nierenkelche (calix renalis) schließt sich das Nierenbecken (pelvis renalis), welches in den Harnleiter (Ureter) mündet, an. Von dort gelangen die auszuscheidenden Produkte in die Harnblase (vesica urinaria), wo sie vorübergehend gespeichert werden (Abbildung aus www.jameda.de).

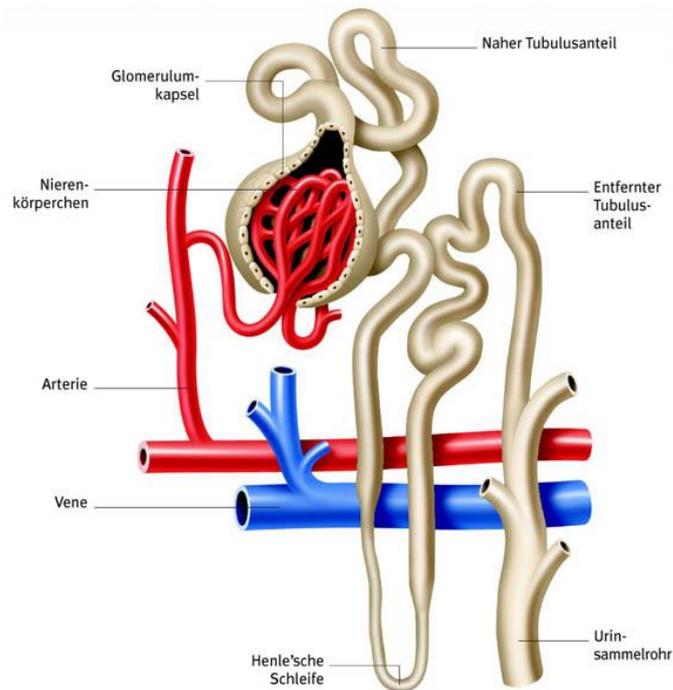


Abbildung 10: Nephron mit Darstellung der filtrierenden Einheit (Glomerulus).

Das Blut fließt durch die Arterie in das Nierenkörperchen, wo es filtriert wird. Dadurch wird der Urin gebildet, der über den nahen Tubulus, die Henle'sche Schleife, den entfernten Tubulus und das Urinsammelrohr abfließt. Das filtrierte Blut fließt anschließend durch die Vene zurück in den Körper (Abbildung aus www.jameda.de).

Schließlich sammelt sich das Blut in kleineren Venen, die sich zu den interlobaren Venen vereinigen und über die Nierenvene (Vv. renales) in die untere Hohlvene führen (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008). Die Niere besitzt neben den Blutgefäßen ein weiteres Kanalsystem, welches aus Nephronen besteht und die Arbeitseinheiten der Niere bildet (Abbildung 10). Das ankommende Blut muss im Nephron den Glomerulus passieren. Die einzelnen Bestandteile eines Glomerulus werden in Abbildung 11 dargestellt. Der Glomerulus ist von einer bindegewebsartigen Kapsel umgeben, die nach ihrem Entdecker William Bowman (Augenarzt und Anatom, 1816-1892) benannt wurde und als Bowmankapsel bezeichnet wird. Diese wird von parietalen, epithelialen Zellen (PEC) ausgekleidet, die unter anderem für Schutz und Stabilität sorgen. Außerdem fungieren PEC nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen als Podozyten-Vorläufer und können wahrscheinlich in geringem Maße krankhafte Podozyten ersetzen (Ronconi et al. 2009, Zhang et al. 2013).

Sowohl im inneren (intraglomerulär), als auch außerhalb (extraglomerulär) des Glomerulus befinden sich zudem Zellen, die Abkömmlinge von Muskelzellen sind und als Mesangialzellen bezeichnet werden. Diese haben viele Aufgaben, so sorgen sie neben Stabilität in geringem Maße auch für die Änderung der Druckverhältnisse im Filtrationsbereich, da sie kontrahieren können. Außerdem produzieren sie extrazelluläre Matrix und sorgen für die Aufrechterhaltung der Kapillarschlingen im

Glomerulus. Zudem können sie Entzündungsmediatoren (inkl. ROS) produzieren und Makrophagen aktivieren (zusammengefasst in Schlöndorff 1996).

Der eigentliche glomeruläre Filter besteht aus drei Einheiten. Die Blutgefäße im Glomerulus werden von einem fenestrierten Endothel ausgekleidet, welches direkt mit dem vorbeifließenden Blut in Kontakt steht und den ersten Teil der glomerulären Filtrationsbarriere bildet. Der zweite Teil des Filters wird durch die Basalmembran geformt, an der sowohl die Endothelzellen als auch, auf der Harnseite, die Podozyten aufliegen. Die Basalmembran besteht aus Kollagen und Glykoproteinen und wird wahrscheinlich sowohl von den Endothelzellen als auch von den Podozyten gebildet (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008).

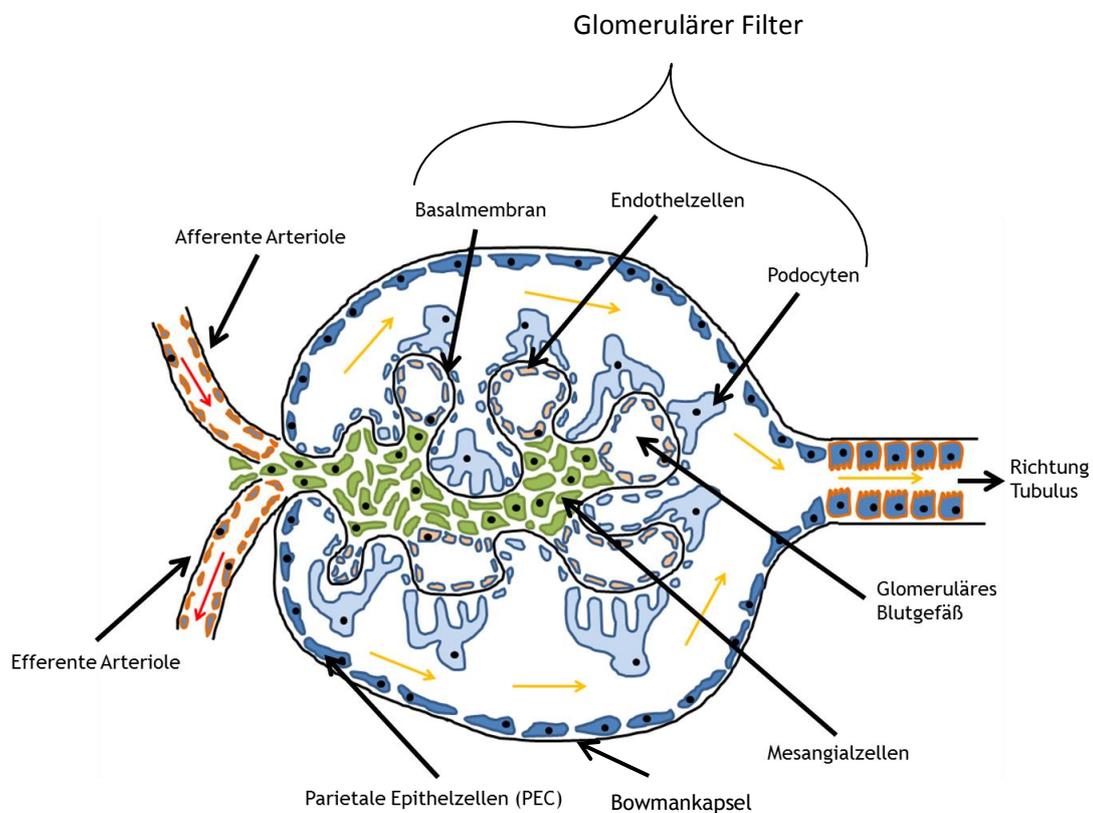


Abbildung 11: Darstellung eines Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole.

Rote Pfeile zeigen die Richtung des Blutflusses, gelbe Pfeile die Urinflussrichtung an. Die Klammer fasst die Bestandteile des glomerulären Filters zusammen.

Podozyten werden auch viszerale Epithelzellen genannt und sind hoch differenzierte Zellen, welche lange Zellfortsätze (sog. „major processes“) ausbilden. Von diesen Zellausläufern laufen wiederum kleinere Ausstülpungen (sog. „foot processes“) fort, die eng ineinander verzahnt sind, den dritten Teil des Filtersystems bilden (Mundel & Kriz 1995) und gleichzeitig das Filtersystem stabilisieren.

Diese kleinsten Ausläufer werden von drei Membrandomänen definiert (siehe Abbildung 12). Neben der Apikalmembrandomäne (AMD) gibt es die Basalmembrandomäne (BMD), die im engen Kontakt zur Basalmembran (GBM) liegt. Außerdem werden die Filtrationsschlitze vom glomerulären Schlitzdiaphragma (SD) als letzte Barriere vor dem Primärharn bedeckt. Alle drei Domänen sind sowohl physikalisch als auch funktionell untereinander und mit dem Aktinzytoskelett (PAB) der Podozyten verlinkt (Greka & Mundel 2012).

Die so gebildeten Filtrationsschlitze haben einen Durchmesser von etwa 30-50 nm (Reiser et al. 2000). Zusammen mit den Mesangialzellen sind Podozyten durch Phagozytose von Partikeln auch für die Reinigung des Filters verantwortlich (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008).

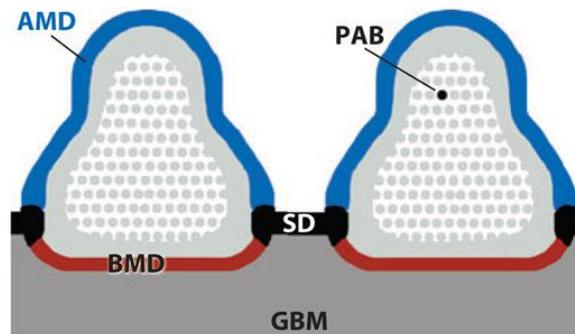


Abbildung 12: Schematischer Aufbau der Podozytenfortsätze.

Basalmembran (GBM), Schlitzdiaphragma (SD), Apikalmembrandomäne (AMD), Basalmembrandomäne (BMD), Aktinfaserbündel des Zytoskeletts (PAB) (Greka & Mundel 2012).

Die Flüssigkeit, die durch drei Schichten des Filters gepresst wird, bezeichnet man als Primärharn. Die Filtration ist ein passiver Vorgang, der im Wesentlichen vom Blutdruck und den Siebeigenschaften des Filters abhängt. Durch die Porengröße kann also das Molekulargewicht der filtrierten Substanzen bestimmt werden. So können Wasser und niedermolekulare Stoffe (z.B. Harnstoff, Glukose, Salze, Aminosäuren) ungehindert den Filter passieren, während größere Eiweißmoleküle (Albumine, Globuline) und Blutzellen (z.B. Erythrozyten) in der Regel durch einen intakten Filter nicht in den Urin gelangen. Durch den hohen Anteil an Glykoproteinen weist die Basalmembran einen großen Gehalt an negativen Ladungen auf weshalb, zusätzlich zum mechanischen Filter, noch ein elektrischer Filter existiert. Dadurch werden negative Blutbestandteile vermehrt abgestoßen und im Blut zurückgehalten. Normalerweise entstehen durch glomeruläre Filtration aller Glomeruli zusammen etwa 120 ml Primärharn pro Minute (glomeruläre Filtrationsrate (GFR) als Maß für die Ausscheidungsfähigkeit (Clearance) der Nieren). Der bei der glomerulären Filtration entstehende

Primärharn beträgt ungefähr 20% des Plasmavolumens, was etwa 170-180 Liter Primärharn pro Tag entspricht (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008, zusammengefasst in Aktories et al. 2009).

Nach Verlassen des Glomerulus gelangt der Harn zuerst in den nahen (proximalen) Tubulus, dann in die Henle'sche Schleife und von dort weiter in den fernen (distalen) Tubulus, an den das Sammelrohr anschließt (Abbildung 10). Die Wände der Nierentubuli sowie der Sammelrohre bestehen aus Epithelzellen, die transzelluläre und parazelluläre Transportvorgänge begünstigen. Die Zellen der einzelnen Tubulusabschnitte haben dabei unterschiedliche Funktionen und verändern die Zusammensetzung des Harns während der Passage durch die Tubuli grundlegend. Der größte Teil der gelösten Bestandteile (Ionen, Glukose, Aminosäuren) sowie 99% des Wassers werden dort teilweise passiv, teilweise aktiv resorbiert, also erneut dem Blutkreislauf zugeführt. Außerdem werden vor allem im proximalen Tubulus zahlreiche Stoffe (z.B. Harnsäure, Harnstoff, Ionen, Kreatinin, Pharmaka wie Penicillin etc.) aktiv aus dem Extrazellulärraum in das Tubulusinnere sezerniert. Zur Regulation des Wasserhaushaltes kann die Niere je nach Bedarf einen stärker, oder weniger stark, konzentrierten Harn bilden (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008). Dabei ermöglicht das Gegenstromprinzip, dass der Harn um das bis zu vierfache stärker konzentriert wird als das Blutplasma (zusammengefasst in Faller & Schünke 2008, zusammengefasst in Purves et al. 2006).

Zur Aufkonzentrierung des Harns pumpt das verdickte Segment des aufsteigenden Astes der Henle'schen Schleife aktiv NaCl aus dem Harn in die Gewebsflüssigkeit, Wasser kann jedoch nicht folgen, da dieser Bereich wasserundurchlässig ist (Nr. 1 in Abbildung 13). Die erhöhte NaCl-Konzentration (Osmolarität) in der Gewebsflüssigkeit führt so zu einer Wasser-Reabsorption aus dem absteigenden Ast der Henle'schen Schleife, wodurch die Tubulusflüssigkeit konzentriert wird (Nr. 2 in Abbildung 13). Passiert der Harn das Sammelrohr verliert er erneut Wasser, das in die Gewebsflüssigkeit übertritt (Nr. 3 in Abbildung 13), wodurch der Harn noch stärker aufkonzentriert wird. Das reabsorbierte Wasser aus dem absteigenden Ast und dem Sammelrohr werden durch die Vasa recta abtransportiert (Nr. 4 in Abbildung 13). Der untere Teil des Sammelrohres ist sowohl für Wasser als auch für Harnstoff permeabel. Da der Harnstoff im Harn an dieser Stelle sehr stark konzentriert ist, diffundiert er in die Gewebsflüssigkeit zurück und verstärkt dort den Solutgradienten (Nr. 5 in Abbildung 13). Ein Teil des Harnstoffes gelangt dabei in den aufsteigenden Ast und wird in das Sammelrohr zurückgeführt (zusammengefasst in Purves et al. 2006). Auf diese Weise wird stark konzentrierter Harn gebildet und zur vorübergehenden Speicherung in die Harnblase geleitet.

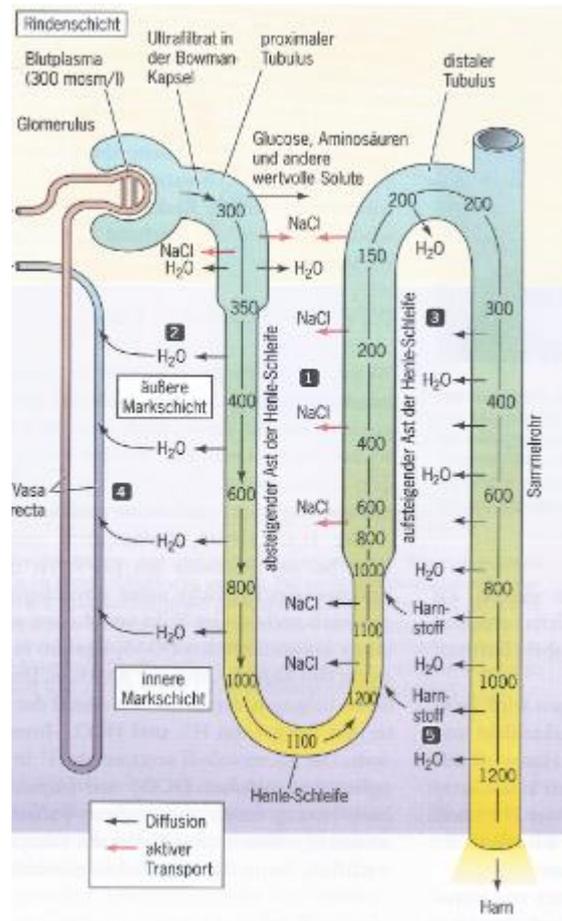


Abbildung 13: Aufkonzentrierung des Harns.

1) NaCl wird im aufsteigenden Ast aktiv in das Gewebe gepumpt, Wasser kann nicht folgen. 2) Die erhöhte Osmolarität im Gewebe führt zur Reabsorption von Wasser aus dem absteigenden Ast. 3) Wasser tritt aus dem Harn in Gewebe mit höherer Osmolarität über. 4) Reabsorbiertes Wasser verlässt das Gewebe durch die Vasa recta. 5) Der im Harn stark konzentrierte Harnstoff diffundiert zurück ins Gewebe und gelangt von dort teilweise in den aufsteigenden Ast zurück (verändert nach Purves et al. 2006).

1.9 TRP-Kanäle in der Niere

Sowohl im Manuskript von Hsu et al. 2007 als auch im Übersichtsartikel von Woudenberg-Vrenken et al. 2009 wird die Expression verschiedener TRP-Kanäle im Nephron der Nieren übersichtlich zusammengefasst (siehe Abbildung 14). Neben TRPC1 (im Glomerulus, proximalen Tubulus, distalen Tubulus, dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife) befinden sich TRPM3, TRPM6, TRPP2, TRPV4, TRPV5, TRPV6 in den verschiedenen Zellen des Nephrons. Der in dieser Dissertation analysierte TRPC6-Kanal ist genau wie TRPC3, im Glomerulus und entlang des Sammelrohres lokalisiert.

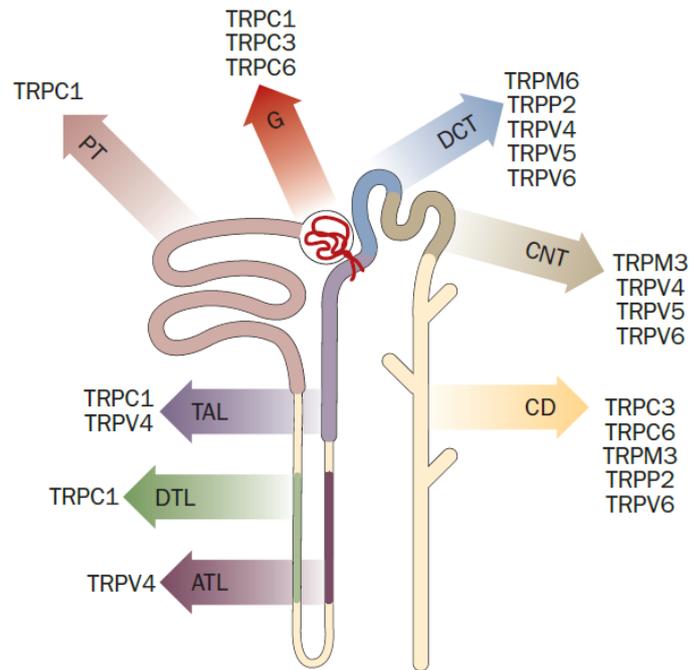


Abbildung 14: Expression von TRP-Kanäle im humanen Nephron.

Abkürzungen: (ATL) dünner aufsteigender Ast der Henle'schen Schleife, (CD) Sammelrohr, (CNT) Sammelrohrtubulus, (DCT) distaler gewundener Tubulus, (DTL) dünner absteigender Ast der Henle'schen Schleife, (G) Glomerulus, (PT) proximaler Tubulus, (TAL) dicker aufsteigender Ast der Henle'schen Schleife (Woudenberg-Vrenken et al. 2009).

In Zellkulturen von M1 und IMCD-3-Sammelrohrzellen wird TRPC3 ausschließlich an der Apikaldomäne gefunden, während sich TRPC6 jedoch an der basolateralen und apikalen Membran nachweisen lässt (Goel et al. 2007).

Eine sehr wichtige Funktion von TRPC6 in der Niere wurde durch die sog. Methode des „reverse genetics“ gefunden. Dort wird versucht durch gezielter Mutagenese ein Gen zu verändern um dann zu sehen, wie es sich auf die Funktion der Zellen und des Organismus auswirkt. Von den Auswirkungen wird dann auf die Funktion des Gens zurückgeschlossen. Mit dieser Methode identifizierten diverse Arbeitsgruppen überaktivierte sog. „gain of function“-TRPC6-Mutationen in Patienten, die an einer Fokalen Segmentalen Glomerulusklerose (FSGS) leiden (Vergleiche Kapitel 1.10) (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Alle bisher in Patienten identifizierten Mutationen im TRPC6-Kanal werden in Abbildung 16 (Abschnitt 1.10) aufgelistet. Die Patienten leiden an einer starken Proteinurie, die durch einen defekten Filter ausgelöst wird. Dies geschieht vermutlich durch eine verminderte Podozytenfunktion basierend auf Überaktivität des TRPC6-Kanals. Im Einklang mit dieser Hypothese sind einerseits TRPC6-defiziente Mäuse vor einer Angiotensin II induzierten Albuminurie geschützt (Eckel et al. 2011), während die Applikation von TRPC6-cDNA in vivo andererseits eine Proteinurie in Mäusen induzieren kann (Moller et al. 2007).

Durch TRPC6-Mutationen wird unter anderem die TRPC6-medierte Erk1 / 2 Phosphorylierung und die Assoziation zu Nephrin und PLC γ verändert, was wiederum Auswirkungen auf die Aktivität des Kanals haben könnte (zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Diese Veränderungen resultieren letztendlich in einer Zerstörung des Aktin-Zytoskelettes, zumindest in kultivierten Podozyten

(Moller et al. 2007), was wiederum für den gestörten Filtrationsprozess verantwortlich sein könnte.

Interessanterweise induziert der TRPC6-medierte Ca²⁺-Einstrom eine Calcineurin-Aktivierung sowie eine Synaptopodin Dephosphorylierung, was wiederum zu einem verminderten Schutz von RhoA vor Abbau durch Proteasen führt (Faul et al. 2008). Im Gegensatz dazu wird von einer anderen Arbeitsgruppe eine antagonistische Funktion von TRPC6 als RhoA Aktivator und TRPC5 als Rac1 Aktivator für die Zellmigration in kultivierten Podozyten postuliert (Tian et al. 2010). Zusätzlich könnte TRPC6 eng mit Podocin, das vor allem in Podozyten exprimiert wird und mechanische Kräfte während des Filtrationsprozesses detektiert, interagieren und eine Kanalaktivierung induzieren (Huber et al. 2007). Außerdem interagiert TRPC6 mit Nephrin, einem Schlitzdiaphragma assoziiertem Protein. Der Verlust von Nephrin führt zu einer Überexpression, sowie einer Fehllokalisation von TRPC6 in Podozyten. Diese Daten unterstützen das Konzept eines gemeinsamen Komplexes von Nephrin, Podocin und TRPC6, eventuell sogar zusammen mit dem AT₁-Rezeptor (zusammengefasst in Gudermann 2005).

Jedoch kann die Analyse der TRPC6-Funktion in der Niere sicher nicht nur auf die Podozyten beschränkt bleiben. Dabei könnten „parietal epithelial cells“ (PECs) zum Beispiel mit Hilfe von all-trans-retinoid-Säure (ATRA) in vitro zu Podozyten differenziert werden (Zhang et al. 2012). Aus diesen Gründen muss die genaue Funktion von TRPC6 in Podozyten und PECs, aber auch in anderen glomerulären Zellen wie Mesangialzellen und Endothelzellen, künftig weiter erforscht werden.

1.10 Fokale Segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

Der Ausdruck Fokale Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) fasst mehrere chronische Nierenerkrankungen zusammen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass bereits lichtmikroskopisch deutliche Vernarbungen (Sklerosen) des Glomerulus erkennbar sind (Abbildung 15). Dieses Phänomen tritt nur fokal auf, so dass nicht alle Glomeruli und nur Teile der Kapillarschlingen (segmental) betroffen sind. Die Krankheit schreitet fort indem Kapillarschlingen kollabieren, sich Podozytenfortsätze zurückbilden, Podozyten verloren gehen und Mesangialzellen verstärkt proliferieren (zusammengefasst in Korbet 1998).

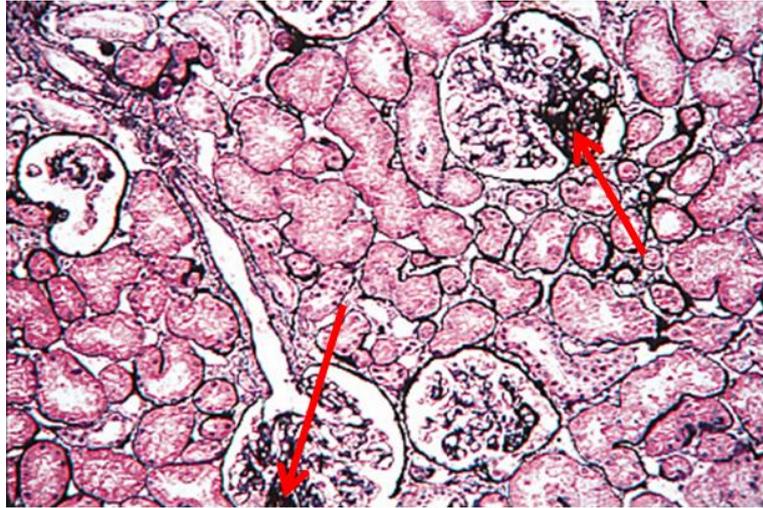


Abbildung 15: Histologische Aufnahme von Glomeruli mit dem Krankheitsbilde einer FSGS.

Die roten Pfeile zeigen auf sklerotische Stellen im Glomerulus. Daneben sind Glomeruli sichtbar, die nicht betroffen sind (Abbildung verändert nach Dr. Wolf, SUNY-Downstate MC, Brooklyn, USA).

Es gibt primäre und sekundäre Formen der FSGS. Während die sekundäre FSGS auf vorausgegangenen Nierenschäden basiert, werden für die primäre FSGS verschiedenste Ursachen, wie zum Beispiel eine erhöhte Konzentration des löslichen Urokinase-Rezeptors (McCarthy et al. 2010, Wie et al. 2011), Virus-Infektionen (HIV (Kimmel et al. 2003), Hepatitis C (zusammengefasst in Korbet 2012)), Drogenmissbrauch (zusammengefasst in Korbet 2012), Anabolikamissbrauch (Herlitz et al. 2010) oder Übergewicht (Schwimmer et al. 2003) verantwortlich gemacht. Die genaue Klassifizierung wird in Tabelle 2 dargestellt (nach Korbet 2012). Die erblichen Formen (= familiäre FSGS) wird dabei zur primären FSGS gezählt, da keine Nierenschäden vorausgegangen sind.

Tabelle 2: Klassifikation der FSGS

Primäre Veränderungen der glomerulären Epithelzellen
Primäre (idiopathische) FSGS
Virale FSGS (z.B. HIV-assoziierte Nephropathie, Parvovirus B19, Hepatitis C)
Drogen assoziierte FSGS (z.B. Heroin, Anabole Steroide)
Genetische FSGS
-genetisch familiär
-genetisch sporadisch
Sekundäre FSGS
Reflux Nephropathy
Renale Dysplasie
Oligomeganephronie
Übergewicht-assoziierte Nephropathie
Sichelzellanämie
Primäre glomeruläre Krankheiten
Sekundär nach fokaler proliferativer Nephritis
Sekundär zu erblicher Nephritis (Alport Syndrom)

(Verändert nach Korbet 2012)

Sowohl Gene, wie MYH9 (schwere Kette des Myosins), die als Risikofaktoren für FSGS in Frage kommen (Kopp et al. 2010), als auch Gene, deren Mutation zu FSGS führt, wurden bislang identifiziert. Neben Mutationen in ACTN4 (α -Actinin-4) (zusammengefasst in Pollak 2002) und NEPHS2 (Podocin) (Frishberg et al. 2002, zusammengefasst in Korbet 2012), wurden verschiedene autosomal dominante „gain-of-function“-Mutationen im TRPC6-Gen gefunden (Hofstra et al. 2013, zusammengefasst in Dietrich & Gudermann 2014). Außerdem gibt es Patienten die funktionslose, sog. „missense“-Mutationen von PLC ϵ tragen (Hinkes et al. 2006). Da TRPC6-Kanäle durch PLC-Isoformen aktiviert werden können, liegt die Vermutung nahe, dass TRPC6 und PLC ϵ im Glomerulus an der selben Signaltransduktionskaskade beteiligt sind und eine Fehlsteuerung FSGS auslösen könnte. In Abbildung 16 werden alle bisher bekannten Mutationen im TRPC6, die zur erblichen Form der FSGS führen, zusammengefasst.

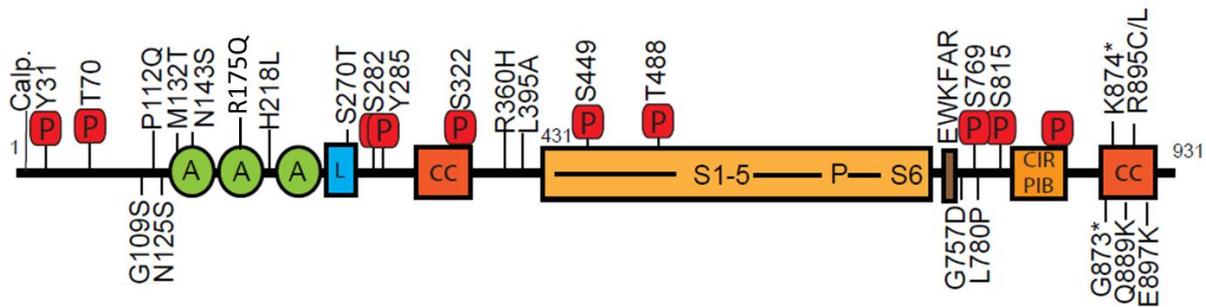


Abbildung 16: TRPC6-Mutationen im TRPC6-Gen von FSGS-Patienten.

Neben der verschiedenen Domänen des TRPC6-Gens werden alle bisher bekannten Mutationen und ihre Lokalisation auf dem Gen gezeigt. Ankyrin (A), „Coiled-coiled“-Domäne (cc), Calmodulin / Inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) Rezeptor bindende Domäne (CIR PIB), Konserviertes TRP-Box-Motif (EWKFAR), DAG sensitive „Lipid traffic“ Domäne (L), Phosphorylierungsstellen (P) (zusammengefasst in Mottl et al. 2013, Hofstra et al. 2013, Abbildung verändert nach Dietrich & Gudermann 2014).

Bis vor kurzem gab es keinerlei Hinweise darauf, dass Podozyten proliferieren können oder beschädigte Podozyten auf andere Weise ersetzt werden können. Aus diesem Grund glaubte man eine Beschädigung der Podozyten wäre die Ursache von FSGS. Zwischenzeitlich gibt es jedoch Hinweise, dass Podozyten durch PEC-Zellen zumindest zum Teil ersetzt werden können (Ronconi et al. 2009, Zhang et al. 2013). Die der FSGS zu Grunde liegenden, humanen TRPC6-Mutationen induzieren im Kanal zum Beispiel einen verstärkten Ca²⁺-Einstrom (z.B. P112Q (Winn et al. 2005)) oder erhöhte Strom-Amplituden (z.B. R895C und E897K (Reiser et al. 2005)). In einem heterologen Expressionssystem zeigten diese Mutanten in einer Podozytenzelllinie erhöhte basale, NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)-medierte Transkription (Schlöndorff et al. 2009).

Die Auswirkungen der FSGS auf den Glomerulus führen letztendlich zu einem gestörten Filtrationsprozess, wodurch große Proteine, die eigentlich im Harn zurückgehalten werden sollten, durch die Blut-Harn-Schranke in den Urin gelangen (Proteinurie).

Klinisch manifestiert sich FSGS neben der Proteinurie meist in Bluthochdruck, Hämaturie (Erythrozyten im Harn) und Niereninsuffizienz, bis hin zu akutem Nierenversagen (=ESRD = „End stage renal disease“), was bei etwa 2,3% der Patienten eintritt (zusammengefasst in Korbet 2012). Diese Patienten können nur durch Transplantation einer Spenderniere überleben.

Weitere Symptome, die vor allem durch die Proteinurie entstehen, äußern sich durch starke Ödembildung und schlechte Wundheilung am ganzen Körper. Durch den übermäßigen Proteinverlust ist das Blut im Vergleich zum Gewebe stark hypoton. Dadurch gelangt osmotisch Wasser aus den Gefäßen in das Gewebe, wodurch Ödeme entstehen. In Abbildung 17 werden Bilder einer jungen FSGS-Patientin gezeigt, die an manchen Tagen unter sehr starker Ödembildung leidet.



Abbildung 17: Starke Ödembildung bei einer jungen FSGS-Patientin.

(<http://fsgssucks.blogspot.de/>)

Die Prognosen für FSGS Patienten differieren stark und hängen, neben der Ursache, unter anderem vom Stärkegrad der Proteinurie ab. So haben Patienten mit massivster Proteinurie ($> 14 \text{ g} / 24 \text{ h}$) einen oft rapiden Krankheitsverlauf mit der Entwicklung eines terminalen Nierenversagens innerhalb von durchschnittlich 6 Jahren (zusammengefasst in Shiiki & Dohi 2000). Mehrere Studien zeigen jedoch auch, dass der Schweregrad der Proteinurie beim Auftreten der Krankheit in keinem Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine adäquate Therapie steht, da die renale Funktionsstörung vielerlei Ursachen haben kann (zusammengefasst in Shiiki & Dohi 2000). Keine Rolle spielen auch Alter, Geschlecht und Schwere des Bluthochdrucks oder der Hämaturie. Die ethnische Zugehörigkeit wird allerdings kontrovers diskutiert (zusammengefasst in Shiiki & Dohi 2000).

Es hat sich gezeigt, dass Patienten die auf die Behandlungen ansprechen und eine Verbesserung des Zustandes aufweisen, signifikant geringere Risiken haben eine ESRD zu erleiden. Die Prognosen sind dann exzellent, was eine 90% Überlebensrate der Nieren über 10 Jahre bedeutet. Im Vergleich dazu haben nach 10 Jahren nur noch 35% der Patienten, ohne Ansprechen auf die Behandlung, eine funktionsfähige Niere (zusammengefasst in Korbet 2012).

Es gibt momentan verschiedene medikamentöse Therapiemöglichkeiten für FSGS-Patienten. Die Verwendung von ACE-Hemmern (z.B. Benzapril), sowie AT_1 -Antagonisten, hat sich besonders bei FSGS-Patienten mit Bluthochdruck etabliert, um den Druck im Glomerulus zu senken. Dadurch werden bis zu 30% weniger Proteine durch den Filter gepresst (Bedogna et al. 1990, Huissoon et al. 1991, Praga et al. 1992).

In schwereren Fällen werden, neben ACE-Hemmern und AT_1 -Antagonisten, meist auch Glucocortikoide (wie z.B. Prednisolon) angewandt (zusammengefasst in Korbet 1998, zusammengefasst in Korbet 2012). Diese Medikamente besitzen eine immunsuppressive, antiphlogistische und antiallergische Wirkung. Bei Erwachsenen führt außerdem eine Steroidbehandlung oft zu einer starken Verbesserung (zusammengefasst in Shiiki & Dohi 2000).

Patienten, bei denen eine Steroidbehandlung ein zu hohes Risiko darstellt (z.B. schlecht eingestellte Diabetiker oder Übergewichtige), können ersatzweise mit Calcineurin-Inhibitoren behandelt werden. Außerdem klingen in bis zu 5% der Patienten die Symptome spontan ab (zusammengefasst in Korbet 2012).

1.11 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war zum einen die, bis dato nur von uns veröffentlichte (Kalwa et al. 2015), umfangreiche Charakterisierung primärer muriner Podozyten (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) im Hinblick auf diverse Zellmarker und somit der Nachweis, dass die auf diese Weise isolierten primären Zellen (nach Rastaldi et al. 2006), wirklich Podozyten sind. Zur Negativkontrolle konnten zwei Methoden der Mesangialzell-Isolierung etabliert, sowie erste Zellen charakterisiert werden.

Zudem wurden murine Podozyten verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-}, PLCε^{-/-}) isoliert, kultiviert und bezüglich ihrer physiologischen Eigenschaften analysiert. Dazu gehören sowohl Aktinpolymerisation, relative Menge an RhoA-GTP, DNA-Synthese (Proliferation) und Apoptose als auch die Expression verschiedener TRPC-Kanäle und Phospholipase C-Isoformen.

Die TRPC6-Aktivierung durch PLCβ und PLCγ ist bereits weitgehend bekannt, Aktivierungsmöglichkeiten über PLCε hingegen wurden bisher kaum erforscht. Da der Erkrankung Fokale Segmentale Glomerulusklerose sowohl Mutationen im TRPC6 als auch Mutationen in PLCε zu Grunde liegen können, wurden zudem mögliche Kollokalisierungen und Interaktion beider Proteine in einem künstlichen System (TRPC6-HA-Hek293-Zellen) untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es außerdem, den humanen TRPC6-WT und mehrere TRPC6-FSGS-Mutationen (insbesondere M132T) zuerst in ihr murines Pendant zu übersetzen, um sie dann in primäre, murine TRPC6^{-/-}-Podozyten zu transfizieren. In diesen beiden Systemen (TRPC6^{-/-}-Podozyten + mTRPC6-WT und TRPC6^{-/-}-Podozyten + mTRPC6-M131T) sollten dann ebenfalls Aktinpolymerisation, RhoA-GTP, DNA-Synthese und Apoptose analysiert werden, so dass insgesamt neben primärer WT-, TRPC6^{-/-}- und PLCε^{-/-}-Podozyten auch TRPC6^{-/-}-Podozyten, in welche entweder der murine TRPC6-WT oder eine seiner FSGS-Mutationen transfiziert wurden, analysiert werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper für Immunzytochemie

Protein	Firma / Nummer	„HOST“	Verdünnung	2. AK / Verdünnung
Podocin	Sigma-A. P0372	rabbit	1:100	Invitr.A11008 Alexa 488 / 1:1000
CD144	Cell Sign. (D87F2) # 2500	rabbit	1:400	Invitr.A11008 Alexa 488 / 1:1000
Nephrin	Acris Bp 5030	gui. pig	1:50	Sigma-A. F6261-FITC / 1:80
WT1	SC (C-19) -192	rabbit	1:50	Invitr.A11008 Alexa 488 / 1:500
Alpha-sma	Sigma-A. A2547	mouse	1:400	Sigma-A. F9006-FITC / 1: 1.000
Synaptopodin	Acris BM5086	mouse	unverdünnt	Sigma-A. F9006-FITC / 1: 1.000

Tabelle 4: Antikörper für „Western Blot“ und Immunpräzipitation

Protein	Firma / Nummer	„HOST“	Verdünnung	2. AK / Verdünnung
TRPC6	Alomone ACC 120	rabbit	1: 200	Sigma-A. A6154 / 1: 10.000
PLCε	Santa Cruz SC-(H 168)-368392	rabbit	1: 300	Santa Cruz SC-2004 / 1: 5.000
PLCβ1	Sigma-A. SAB2104946	rabbit	1: 1.000	Sigma-A. A6154 / 1: 10.000
Vinculin	Sigma-A. V9131	mouse	1: 10.000	Cell Sign. # 7076 / 1: 2.000
Podocin	Sigma-A. P0372	rabbit	1: 1.000	Sigma-A. A6154 / 1: 10.000
β-actin	Sigma-A. A3854 -HRP		1: 10.000	Nicht benötigt
CD144	Cell Sign. (D87F2) # 2500	rabbit	1: 1.000	Sigma-A. A6154 / 1: 10.000
Nephrin	Acris Bp 5030	gui. pig	1: 500	Acris R1322HRP / 1: 2.000
WT1	Santa Cruz SC (C-19) -192	rabbit	1: 200	Santa Cruz SC-2004 / 1: 5.000
HA	Roche (3F10) 1867423001	rat	1: 1.000	Sigma-A. A-5795 / 1: 1.000
Synaptopodin	Acris BM5086	mouse	1: 10	Cell Sign. # 7076 / 1: 2.000

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Produkt	Firma	Artikelnummer
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	7328.2
Agar	Applichem GmbH, Darmstadt	A0949
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe	2267.4
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe	K029.1
Angiotensin II	Calbiochem, Darmstadt	05-23-0101
Apotransferrin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	T1147-100
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	215589
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	B0126
BSA (Kälber Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	9418

CaCl ₂ (x 2H ₂ O) mol. wt 147	Sigma-Aldrich BioXtra, Deisenhofen	C5080
CuSO ₄	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	7758-98-7
Collagenase Typ F	Calbiochem, Merck, Darmstadt	234153
DAPI	Fluka, Sigma-Aldrich, Deisenhofen	32670
DTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	D0632-5G
DMSO	Riedel-D-Haënn, Seelze b. Hannover	60153
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe	CN06.2
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe	3054.2
Entwickler DOKUMOL	TETENAL AG, Norderstedt	Entwickler DOKUMOL
Essigsäure	VWR, Darmstadt	UN2789
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe	5054.3
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	E4391
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	252549
Glukose	Merck, Darmstadt	8337
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt	1.04091
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	0079.4
Goatserum	Bio-West	S2000-100
HCl	Merck, Darmstadt	1.003U7
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe	2363.3
Hepes	Carl Roth, Karlsruhe	9105.3
Igepal CA 630	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	I8896
Isofluran	Delta Select, Pfullingen	0670308
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	6752.3
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe	T832.2
Kaliumchlorid / KCl	Carl Roth, Karlsruhe	6781.1
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	6875.2
K ₂ S ₂ O ₅	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	6050.8
KOH	Carl Roth, Karlsruhe	2526.1
Kohrsolin	Bode, Hamburg	973620
Kupfer-II-Sulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	C8027
Magermilchpulver	Spinnrad, Bad Segeberg	Magermilchpulver
Magnesiumchlorid / MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe	KK36.2
Magnesiumsulfat / MgSO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	0261.2
Manganchlorid / MnCl ₂	Merck, Darmstadt	5927
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt	805740
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe	P717.1
Mountingmedium	Dako, Hamburg	53023
Nagellack, klar	Wild Shine, Basingstoke, GB	E4063
Natriumascorbat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A4033
Natrium Azid	Merck, Darmstadt / Sigma-A., Deisenho.	822335 / 78374
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe	HN01.1
Natriumchlorid / NaCl	Carl Roth, Karlsruhe	9265.1
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	16026
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	T876.1
Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	S6672-500G
Polybrene	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	107689
Ponceau S	Applichem / Panreac, Darmstadt	A2935,0500
Protein A / G Sepharose	Santa Cruz, Dallas, USA	SC-2003
Rotiphorese Gel	Carl Roth, Karlsruhe	3029.1
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	L4390

Stickstoff (N ₂) flüssig	Linde, München	N2 flüssig
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe	2367.1
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe	AE15.2
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe	3051.2
Tween-20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	2287
Trypton / Pepton	Carl Roth, Karlsruhe	8952.3

2.1.3 Enzyme, Kits und Marker

Tabelle 6: Enzyme, Kits und Marker

Produkt	Firma	Artikelnummer
BCA Assay	Pierce, Thermo Fi. Sci., Schwerte	23225
Click-it TUNEL Assay	Life Technologies, Darmstadt	C10245
DNA GeneRuler 100bp / 1kb	Fermentas, Waltham, USA	SM0241 / SM0312
Dynabeads® M-450 Tosylact.	Life Technologies, Darmstadt	14013
Erststrangsynthese-Kit	Fermentas, Waltham, USA	K1831
FastAP® Alkaline Phosphatase	Fermentas, Waltham, USA	EF0654
Fugene Transfection	Promega, Madison , USA	E2311
Fura-2-AM	Fluka, Sigma-Aldrich	Fluka: 47989
Gel-Extraktionskit	Quiagen, Hilden	28704
GeneJET™ Plasmid Miniprep	Thermo Fi.Sci, Schwerte	K0503
GenomONE-Neo EX	Cosmo Bio, Tokyo, Japan	ISK-GN-004-EX
Glasmilch-Selfmade-Kit	Quiagen, Hilden	selbst zusammengestellt
InCella Screenfect	InCella	S3001
Isifect	HISS, Freiburg	12-01S
Lenti-X-GoStix	Clontec, Mountain View, USA	PT5185-2
Lipofectamine 2000	Life Technologies, Darmstadt	11668019
Luminata Forte W. HRP Substrat	Merck Millipore, Schwalbach	WBLUF0100
MACs fectin	MACs	130-098-600
NanoJuice	Novagene, Izmir, Türkei	TB496,C0909JW
Neofectin Transfection	NEO Group, Cambridge, MA	85840654
NucleoBond Plasmid MAXI	Macherey-Nagel, Düren	740.414
NucleoBond Plasmid MIDI	Macherey-Nagel, Düren	740.410
Peg-it	SBI, Mountain View, USA	LV825A-1
RhoA-Assay	Cytoskeleton, Denver, USA	BK124
Restriktionsenzyme FD	Fermentas, Waltham, USA	divers
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	P1951
Polymerasen	Fermentas, Waltham, USA	divers
Fast Digest Puffer u. Puf. green	Fermentas, Waltham, USA	Bei Enzymen enthalten
q-pcr-kit	Thermo Fi.Sci, Schwerte	AB / 115813
RNA-Isolations-Kit, Invitrap	Stratec Molecular, Berlin	1060100300
SDS-Gel-Marker	Fermentas, Waltham, USA	26616, 26625, 26634
SuperSignal West Dura	Pierce, Thermo Fi.Sci, Schwerte	34075
SuperSignal West Pico	Pierce, Thermo Fi.Sci, Schwerte	34077
Transit-2020	Mirus, Madison, USA	2020
T4 DNA-Ligase und Puffer	Fermentas, Waltham, USA	EL0014
6 X DNA Loading Dye	Fermentas, Waltham, USA	R0611

2.1.4 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Produkt	Hersteller
Abzugssysteme	Waldner, Wangen
Autoklaviersystem	Hp Medizintechnik, Oberschleißheim
Binokular SD30	Olympus, Hamburg
Ca ²⁺ -Imaging System	TILL-Photonics, Gräfelfing
Ca ²⁺ -Imaging Filtersets	AHF Analysetechnik, Tübingen
Chemismart-Dokumentationssystem für „Western Blots“	Peqlab, Erlangen
Konfokales Mikroskop TCS SP5	Leica, Wetzlar
CO ₂ -Inkubator Heracel 150i	Thermo Fisher Sc., Schwerte
CO ₂ -Inkubator S2 Heracel 150i	Thermo Fisher Sc., Schwerte
Destillierapparat Destillier Destamat	Heraeus,Thermo Fisher Sc., Schwerte
Dokumentationssystem für DNA-Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen
Eismaschine	Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammer DNA	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer Proteine	Amersham, Biosciences, GE, Freiburg
Elektroporationsgerät (Nucleofector II)	Amaxa, Lonza, Basel, Schweiz
Elektroporationsgerät (NEON)	Invitrogen, CA, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Gewebezerkleinerer Handgerät	Xenox, Föhren
Gewebezerkleinerer Ultraturrax	Labor Praxis, Würzburg
Heizplatte	VWR, Darmstadt
Hitzesterilisateur Function Line Instruments	Heraeus, Thermo Fisher Sc., Schwerte
Kippschüttler	Peqlab, Erlangen
Kryokonservierungsbox	Nalgene, Sigma-Aldirch, Deisenhofen
Magnetischer Separator	Invitrogen
Mikrozentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Nanophotometer (Nanodrop)	Implen, München
OP-Besteck	FST, Berlin
PCR Thermocycler	Peqlab, Erlangen
PH-Meter	Mettler-Toledo
Photometer	Tecan, Crailsheim
Photometer Victor	Perkinelmer, Waltham, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus® Junior	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pumpe Zellkultur BUC21	Vacubrand, Wertheim
Quantitatives PCR-Gerät Lightcycler 480	Roche, Basel, Schweiz
Schüttelinkubator	Thermo Fis. Sci. / Fermentas, Waltham, USA
Schweißgerät F380	Krups, Offenbach am Main
Spannungsquelle Peqpower	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank / Laminarflow	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank / Laminarflow S2 / Hood	Safe 2020 1.2. Thermo Fisher Sci., Schwerte
Thermomix Probenemperierer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20 Labfuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Mikro 22R Labfuge	Hettich, Tuttlingen

Transferkammer Westernblot	Biorad, München
Trockenkammer Westernblot	unbekannt
Vortexgeräte Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Vortexgeräte S2 Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad-Tauchsieder	MGW, Lauda, Lauda-Königshofen
Zellkulturmikroskop Wilover AFL 40 Phako	Hund, Wetzlar
Zellkulturmikroskop S2	Hund, Wetzlar
Zellsiebe	Retsch GmbH, Haan
Zentrifuge Rotana / R E1210	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Sorval RC5C Plus	Sorval, Thermo Fisher Sc., Schwerte
Zentrifuge Labfuge 400	Thermo Fisher Sc., Schwerte
Zentrifuge S2 Universal 320 R	Hettich, Tuttlingen
-80°C Gefrierschrank U410	Eppendorf, Hamburg
-80°C Gefrierschrank S2	Elcold, Dänemark

2.1.5 Mauslinien

Tabelle 8: Mauslinien

Mauslinie	Genetischer Hintergrund
PLCε ^{-/-} (A. Smrcka)	C57BL / 6
TRPC6 ^{-/-} (A. Dietrich)	C57BL / 6
Wildtyp (aus der gleichen Kolonie)	C57BL / 6

2.1.6 Bakterien, Medien und Antibiotika für Bakterienkulturen

Ampicillin (analog für Kanamycin)

1 g Ampicillin (Natriumampicillin) [100 mg / ml], Carl Roth

- Einwiegen der Chemikalien in ein 50 ml Röhrchen.
- Mit bidest. Wasser auf 10 ml auffüllen.
- Vortexen, bis sich alles gelöst hat.
- Aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.
- Zur Verwendung 1:1000 in das Kulturmedium geben.

Kompetente Bakterien

Neben selbst hergestellten, chemisch kompetenten Bakterien (Abschnitt 2.2.2) wurden in dieser Arbeit diverse, kommerziell erhältliche, chemisch kompetente E.coli Stämme verwendet. Alle verwendeten Stämme werden in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete, kommerziell erhältliche, chemisch kompetente Bakterien

Name	Firma
One Shot Stbl3	Life Technologies, Thermo Fi.Sc., Schwerte
NEB10β	NEW England Biolabs, Frankfurt am Main
TOP10	Life technologies, Thermo Fi.Sc., Schwerte

LB-Medium

10 g Trypton / Pepton [1,0%], Carl Roth

5 g Hefeextrakt [0,5%], Carl Roth

10 g NaCl [171 mM], Carl Roth

- Einwiegen der Chemikalien in ein 1 Liter Becherglas.
- Mit VE-Wasser auf 800 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Je 250 ml in einen 1 Liter Erlenmeyerkolben aliquotieren und mit Alufolie verschließen.
- Umgehend autoklavieren.

SOB (und SOC-Medium)

20,0 g Trypton / Pepton [2,0%], Carl Roth

5,0 g Hefe [0,5%], Carl Roth

10,0 ml 1 M NaCl [10,0 mM], Carl Roth

2,5 ml 1 M KCl [2,5 mM], Carl Roth

10,0 ml 1 M MgCl₂ [10,0 mM], Carl Roth

10,0 ml 1 M MgSO₄ [10,0 mM], Carl Roth

(Für SOC Medium: Zugabe von [20 mM] Glukose)

- Einwiegen der Chemikalien (bis auf MgCl₂ und MgSO₄) in ein 1 Liter Becherglas.
- Mit VE-Wasser auf 800 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Umgehend autoklavieren.
- MgCl₂ und MgSO₄ Lösungen steril filtrieren und zugeben.
- Nochmals für 5 min auf einem Magnetrührer rühren.
- Je 50 ml aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.

Agar-Platten

Nach der Herstellung von LB kann dieses zu Agar-Platten weiterverarbeitet werden.

7,5 g Agar, Applichem GmbH, Darmstadt

500 ml LB-Medium (Abschnitt 2.1.6 weiter oben)

50 mg Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin)

- 7,5 g Agar in eine 500 ml Flasche einwiegen.
- Mit LB-Medium auf 500 ml auffüllen.
- Umgehend autoklavieren.
- Abkühlen auf unter 60 °C.
- Optional: Zugabe von 50 mg Selektionsantibiotika [100 µg / ml].
- Den Agar auf 100 mm Petrischalen aufteilen (ca. 10 ml pro Schale).
- Nach dem Aushärten bei 4 °C lagern.

2.1.7 Plasmide

Tabelle 10: Plasmide

Plasmid	Firma
pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pmax eGFP	Lonza, Köln
pMD2G	Addgene, Boston 1225
psPAX2	Addgene, Boston 12260
pSUPER	Oligoengine, Seattle, USA
pWPXL	Addgene, Boston 12257

2.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden, in bereits gelöster Form, bei „Metabion“ in Martinsried bestellt und zur Verwendung 1:10 verdünnt [10 pmol].

Oligonukleotide für die Mutagenese

Oligonukleotide für die Mutagenese sollten zwischen 25 und 45 Basen lang sein, wobei die Schmelztemperatur (T_m) größer oder gleich 78 °C sein sollte. Die Mutationen liegen am besten mittig im Oligonukleotid und werden auf beiden Seiten von 10-15 homologen Basen flankiert. Das Minimum an GC-Gehalt beträgt 40%, wobei die Primer aus Stabilitätsgründen auf ein oder mehreren

GC enden sollten. Außerdem ist es von Vorteil, wenn die Oligonukleotide HPLC-gereinigt sind und bei der Mutagenese im Überschuss verwendet werden. Alle Mutagenese Oligonukleotide, welche für diese Arbeiten hergestellt wurden, werden in Tabelle 11 dargestellt. Die Mutationen sind jeweils rot markiert.

Tabelle 11: Murine (m) Mutagenese Oligonukleotide

Mutation	Sequenz
mG108S „forward“	CGC TTT CTA GAT GCA GCT GAA TAT TCC AAC ATC CCA GTG GTG CGG
mG108S „reverse“	CCG CAC CAC TGG GAT GTT GGA ATA TTC AGC TGC ATC TAG AAA GCG
mM131T „forward“	GTT AAC TGT GTG GAT TAC ACG GGC CAG AAT GCC CTA CAG C
mM131T „reverse“	GCT GTA GGG CAT TCT GGC CCG TGT AAT CCA CAC AGT TAA C
mS296T „forward“	CAT GAT TCC TTC AGC CAC ACT AGA TCC AGG ATC AAT GC
mS296T „reverse“	GCA TTG ATC CTG GAT CTA GTG TGG CTG AAG GAA TCA TG

Humane (h) q-PCR-Oligonukleotide

Tabelle 12: Humane (h) q-PCR-Oligonukleotide

Name	„forward“	„reverse“	Bp	Tm °C
β-Aktin	CCA ACC GCG AGA AGA TGA	CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG	97	60 / 59
PLC β ₁	GTG GGA GAC ACG CCA AAG	GGC CCA TAC ACC ACT GTG A	106	60 / 60
PLC β ₂	ACA GAG CCC CTG GAA AAG TT	GAG GAT CTT GCC CCT GAG AT	78	60 / 60
PLC β ₃	CCC CAA AAA GCC AAC TAC AG	CTC CTC AGT GGC ATT CAC CT	61	59 / 60
PLC β ₄	CAG TCC AAT GAC ATG CCT CA	GGA ATT TTA CCA TTT GTG TTG GT	72	60 / 59
PLC γ ₁	CGG AAT CGT GAG GAT CGT A	GGG ACC CGG TAG TTG ACC	71	59 / 60
PLC γ ₂	GAC CAC GCC TTT GTT ACC TC	GCT GCA GTG CTC CTC GAT	60	59 / 60
PLC δ ₁	GGA GGA CTG CAA GAC CAT CT	TTC GCA CCT CCT GAA TGT C	95	59 / 59
PLC δ ₃	GCA AGA TGA GCT TCA AGG AGA T	GAC GGT CGT TGT TGG AGT G	114	59 / 60
PLC δ ₄	GCG TCG AGG GAT ATA TAC GG	GTT CCC CGC TAG GTC CAT	81	59 / 59
PLC ζ	CAA GTG ACC TTT GGG GAT ATG T	ACA ACA GGT TCA TTT TGT GCT C	94	60 / 59
PLC η ₁	AAC TGT GGA AGA ACT GGC TCA	CAA GAC AAT AGT CCG TTG TCA CAT	74	59 / 60
PLC η ₂	TGG TGC TGT CTT CAG AGT GG	CTG CAT CCC CTC TTG CAT	74	60 / 59
PLC ε	GTG ACT AAG GGC AGC ATG TTT	TCA ATT TCC AGT TTA AGT CTG ATG A	112	59 / 59
TRPC1	GAG AGC ATT TGA ACT TAG TGC TGA	TTA CAT TGC CGG GCT AGT TC	93	60 / 60
TRPC2	TAT CCC CCG ATC CCT ACT TT	GGT AGG ATC CAC GCT CTC C	73	59 / 59
TRPC3	AAT TAT GGT CTG GGT TCT TGG A	CCA CAA CTG CAA AAT GTA TTC C	88	59 / 59
TRPC4	GGT CAG ACT TGA ACA GGC AAG	GTT TAA TTT CTC CCC ATA TGA AGC	93	59 / 59
TRPC5	GGG ACT TAC AGA AGA AAA TTT TAA GG	CCA AGA GGT CAA GCA CTT CAT	77	59 / 59
TRPC6	TTC CTT GTG GTC CTT GCT GT	TGA ATG GTC CAC GCA TTA TC	103	60 / 59
TRPC7	GCC ATG ATA AAC AACV TCC TAT CAG	GCG AAC TTC CAT TCC ACA TC	62	59 / 60

Die mTRPC-Oligonukleotidsequenzen wurden, bis auf „TRPC6 nach Exon 7“, aus Hartmann et al. 2008 entnommen.

Tabelle 13: Murine (m) q-PCR-Oligonukleotide

Name	„forward“	„reverse“	Bp	Tm °C
β-Aktin	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG	ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA	104	59 / 60
Nephrin	CCA TCC TCC CAG AGA TGT TC	TTC TCC ATG TCG TCC AGG TT	76	80 / 80
PLC β ₁	CGC ATT TCT GGA GAA AGC ATA	CCG GTC TGC TGA GAA CAA TC	100	60 / 60
PLC β ₂	CAG TGG ACC GCA TTG ATG T	ACA GGA ACT GCC CAG AGA TG	69	60 / 60
PLC β ₃	AAA AAG CCC ACC ACT GAT GA	ACA TCT CCT CCT TTG CAT T	61	60 / 60
PLC β ₄	GGA GGA AGG TCT TCA GTG GAA A	TCC CAA CAG TCA AGT TCA ACA	77	59 / 59
PLC γ ₁	CAT GCT TTC GTA GCC TCA GA	TGA AGT GCT GAG CCA TGT TT	91	59 / 59
PLC γ ₂	CGG CAT CAA GTT TCT CAA GG	GCT GAG CTC ATC TTT CTG TGC	61	60 / 60
PLC δ ₁	CCA ACT ACA GTC CCG TGG AG	TTG GAA GTT CAG AGC CAC AA	62	60 / 59
PLC δ ₃	GAG CTT CAA GAA GAT CAA GAG C	CGT TGT TGG AAT GGT CAC AC	101	59 / 59
PLC δ ₄	AAT GTA GGC TGC CAG ATG GT	GGC CAT CAC AGA TAT CCA TTG	70	59 / 60
PLC ζ	CAG TTC TTT GCA TGA ACA AAG G	AAG GTT CGC ACC GGA TTT	65	59 / 60
PLC η ₁	CGC AGA AAA GTC AGG CAA AT	AAA TGT CAA GGT TCC CTG ATT C	66	60 / 59
PLC η ₂	TGA CTG CAA GCT CCT CAA TG	TTT GCA ATG TTT TCC ACA CG	63	60 / 60
PLC ε	GGG ATG TCA TCT CCC ACT AG	TTG CAT TCC TCC TCG GAT T	69	60 / 60
TRPC1	GCC CCC ACC TTT CAA CAT TA	GTC GCATGG ACG TCA GG TAG	209	58 / 61
TRPC3	AGG CGC AGC AGT ATG TGG A	GGC CAA AGC TCT CGT TTG C	207	58 / 58
TRPC4	CTC CGC CTG ATC TCT CTG T	AAA CGCGTT GTT CTG TTT CT	216	57 / 55
TRPC5	ATG AGG GGC TAA CAG AAG A	TGC AGCCTA CAT TGA AAG A	210	55 / 53
TRPC6 nach Exon 7	GCAGCTGTTCAGGATGAAAAC	TTCAGCCCATATCATGCCTA	85	58 / 56
TRPC7	CCT ACG CCA GGG ATA AGT G	AAG GCC ACA AAT ACC ATG A	205	57 / 54

Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

Tabelle 14: Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

Name	Sequenz
mTRPC6.downstream	CAA GAC ATC TCA AGT CTC CG
mTRPC6.M131T	GTC TAT TGA GGA AGA ACG C
mTRPC6.S269T	GAG CGG CCT CAT GAT TAC TTC
mTRPC6.upstream	CAC CAC TGG GAT GTT GC
pwpxl.EF1a.downstream	GTA GAC ATA ATA GCA ACA GAC
pwpxl.WPRE.upstream	CGT AGC AGA AGG ACG TC
Seq pwpxl Insert BamHI / EcoRI	GTC TGT TGC TAT TATGTC TAC
T7-Primer	GATC intern / MWG intern

2.1.9 Puffer und Lösungen

Cave: Bei allen Puffern und Lösungen muss der pH-Wert bei der jeweiligen Verwendungstemperatur eingestellt oder vor Verwendung nachgemessen werden. Gegebenenfalls muss nachjustiert werden.

CaCl₂ zur Calciumphosphatpräzipitation

9,18 g CaCl₂ x 2H₂O (mol. wt. 147), Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalie in einen 50 ml Erlenmeyerkolben.
- Mit bidest. Wasser auf 25 ml auffüllen.
- Mit dem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Steril filtrieren durch einen 0,22 µm Filter.
- Aliquotieren und bei 4 °C lagern.

Cave: Unbedingt bidest. Wasser verwenden, da ansonsten die Calciumphosphatpräzipitation nicht in ausreichender Qualität ablaufen kann.

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)

1 mg DAPI C₁₆H₁₅N₅ [1 mg / ml], Fluka, Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß.
- Mit bidest. Wasser (unlöslich in PBS) auf 1 ml auffüllen.
→ 1 mg / ml [1-5 mg / ml für Stammlösung empfohlen]
- Vortexen, bis sich alles gelöst hat.
- Verdünnung der Stocklösung mit Methanol 1:1000 auf 1 µg / ml.
- Lagerung dunkel, bei RT 1-2 Wochen; 6 Monate bei +4 °C; bis zu 12 Monate bei -20 °C.
- Proben im Dunkeln lagern, da DAPI sehr schnell ausbleicht.

Cave: DAPI interkaliert in die DNA, deshalb immer mit Handschuhen arbeiten!

Fixierer (Röntgenfilmentwicklung)

625 g Natriumthiosulfat Pentahydrat (Na₂S₂O₃ x 5H₂O) [1,26 M], Sigma-Aldrich

49 g Kaliummetabisulfit (K₂S₂O₅) [0,11 M], Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalien in eine 2 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 2 Liter auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.

- Lagerung bei RT.

Gepuffertes Wasser zur Calciumphosphatpräzipitation

125 µl HEPES 1 M pH 7,3 [2,5 mM], Carl Roth

- Einfüllen von 50 ml bidest H₂O in ein 50 ml Röhrchen.
- Zugabe der HEPES-Lösung.
- Vortexen.
- Lagerung im Kühlschrank für mehrere Wochen möglich.

Cave: Für Calciumphosphatpräzipitation / LV-Produktion immer bidest. Wasser verwenden, da sonst keine einwandfreie Präzipitationsbildung möglich ist.

HeBS (2 X) zur Calciumphosphatpräzipitation

16,36 g NaCl [0,28 M], Carl Roth

11,9 g Hepes [0,05 M], Carl Roth

0,213 g Na₂HPO₄ Anhydrat [1,5 mM], Carl Roth

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit bidest. Wasser auf 800 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- pH 7,00 mit 10 M NaOH einstellen (so exakt wie möglich).
- Mit bidest. Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- pH 7,00 überprüfen und gegebenenfalls nachjustieren.
- Filtrieren durch einen 0,22 µm Sterilfilter.
- In 50 ml Röhrchen aliquotieren.
- Lagerung für mehrere Wochen im Kühlschrank oder bei -70 °C bis zu 2 Jahre.

Cave: Der pH-Wert muss exakt stimmen. Unter 6,95 oder über 7,05 werden die Kristallnadeln nicht in ausreichender Qualität gebildet, wodurch die Transfektionseffizienz stark reduziert wird. Außerdem ist die Verwendung von bidest. Wasser für die einwandfreie Präzipitatbildung unumgänglich.

HEPES-Ringer

7,97 g NaCl [140 mM], Carl Roth

0,418 g KCl [5 mM], Carl Roth

0,2033 g MgCl₂ x 6H₂O [1 mM], Carl Roth

2,38 g Hepes [10 mM], Carl Roth

2,18 g Glukose [5 mM], Merck

0,3234 g CaCl₂ x 2H₂O [2 mM], Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 800 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- pH 7,45 mit NaOH / HCl einstellen.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Puffer mit einem 0,45 µM Sterilfilter filtrieren.
- Lagerung bei 8°C bis zu 6 Monaten möglich.

Cave: Benötigt man eine Ca²⁺-freie Lösung, wird CaCl₂ weggelassen und eventuell 2 mM EGTA (Ca²⁺-Chelatbildner) zugesetzt.

Laemmli-Puffer (2 X)

25,0 ml 4 X Tris / SDS Puffer pH 6,8

20,0 ml Glycerin [20%], Merck

4,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [140 mM, 4%], Sigma-Aldrich

1,0 mg Bromphenolblau, Sigma-Aldrich

2,0 ml b-Mercaptoethanol [2%], Merck

- Einwiegen / Einmessen der Chemikalien (bis auf Mercaptoethanol) und Puffer in eine 100 ml Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Mercaptoethanol zugeben und kurz weiter rühren (alternativ Zugabe vor Gebrauch).
- Aliquotieren und zur Lagerung bei -20 °C einfrieren.

Cave: Unter dem Abzug arbeiten, da Mercaptoethanol beim Einatmen giftig ist.

Laemmli-Puffer (6 X)

6,0 ml 4 X Tris / SDS Puffer pH 6,8 [375 mM]

48,0 g Glycerin [48%], Merck

6,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat)[6%], Sigma-Aldrich

0,03 g Bromphenolblau [0,03%], Sigma-Aldrich

9,0 ml b-Mercaptoethanol [9%], Merck

- Einwiegen / Einmessen der Chemikalien (bis auf Mercaptoethanol) und Puffer in eine 100 ml Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Mercaptoethanol zugeben und kurz weiter rühren (alternativ Zugabe vor Gebrauch).
- Aliquotieren und zur Lagerung bei -20 °C einfrieren.

Cave: Unter dem Abzug arbeiten, da Mercaptoethanol beim Einatmen giftig ist.

Laufpuffer für SDS Gelelektrophorese (10 X)

30,2 g Tris Base [250 mM], Carl Roth

144,0 g Glycin [1,920 M], Carl Roth

10,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [35 mM, 1%], Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Zur Verwendung 1:10 mit VE-Wasser verdünnen.

PBS (10 X)

80,0 g NaCl [1,37 M], Carl Roth

2,0 g KCl [27 mM], Carl Roth

14,4 g Na₂HPO₄ [101 mM], Carl Roth

2,4 g KH₂PO₄ [18 mM], Carl Roth

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis die Lösung klar ist.
- Zur Verwendung 1:10 verdünnen.

PBST [0,5%](1 X)

- 10 X PBS wird zu 1 X PBS + 0,5% Tween 20 verdünnt.

RIPA-Lysepuffer

1% Igepal CA 630, Sigma-Aldrich
0,5% Na-deoxycholat, Sigma-Aldrich
0,1% SDS, Sigma-Aldrich
1 X PBS ad 500 ml

- Einwiegen der Chemikalien in eine 500 ml Glasflasche.
- Mit 1 X PBS auf 500 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Vor Gebrauch Protease-Inhibitor Zugabe (1 Complete Mini Tablette pro 10 ml).
- Gut lösen, aliquotieren und bis zu 1 Monat bei -20 °C einfrieren.

Stripping-Puffer

100 mM NaOH, Carl Roth
2% SDS, Sigma-Aldrich
0,5% DTT, Sigma-Aldrich

- Einwiegen / Einfüllen der Chemikalien in eine 50 ml Glasflasche.
- Mit bidest. Wasser auf 50ml auffüllen.
- Bei RT lagern.

TAE-Puffer (50 X) (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

242 g Tris Base [2,000 M], Carl Roth
57,1 ml konz. Essigsäure [1,000 M], VWR
37,2 g EDTA [127 mM], Carl Roth

- Einwiegen / Einfüllen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Mit einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.

TE-Puffer (1 X) (Tris-EDTA-Puffer)

10 ml Tris 1M pH 8,0 [10,0 mM], Carl Roth
2 ml EDTA 0.5 M pH 8,0 [1,0 mM], Carl Roth

- Einfüllen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit bidest. Wasser auf 800 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer mehrerer Minuten rühren, bis alles gut vermischt ist.
- pH 8,0 mit NaOH / HCl einstellen.
- Mit bidest. Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Erneut mehrere Minuten mit dem Magnetrührer durchmischen.
- pH-Wert kontrollieren und gegebenenfalls nachjustieren.
- Autoklavieren oder durch einen 0,45 µm Nitrozellulosefilter steril filtrieren (Für Calciumphosphatpräzipitation / LV-Produktion nicht autoklavieren).

Cave: Für Calciumphosphatpräzipitation / LV-Produktion immer bidest. Wasser verwenden, da sonst keine einwandfreie Präzipitationsbildung möglich ist!

Transferpuffer (Transfer von SDS Gelen auf Membranen) (10 X)

30,2 g Tris Base [250 mM], Carl Roth

144,0 g Glycin [1,920 M], Carl Roth

2,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [7 mM, 0,2%], Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- Zur Verwendung wie folgt 1:10 verdünnen:
100 ml 10 X Transferpuffer + 200 ml Methanol + 700 ml VE-Wasser

Transformationspuffer (Herstellung kompetenter Bakterien)

238,31 mg Hepes [10 mM], Carl Roth

220,5 mg CaCl₂ x 2H₂O [15 mM], Sigma-Aldrich

1,86 g KCl [250 mM], Carl Roth

1,08 g MnCl₂ x 4H₂O [55 mM], Merck

- Einwiegen der Chemikalien (bis auf MnCl₂) in einen 100 ml Erlenmeyerkolben.
- Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.
- pH 6,7 mit KOH einstellen.
- MnCl₂ zuwiegen und weiterrühren, bis sich alles gelöst hat.

- Durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtrieren.

Tris / SDS Puffer pH 6,8 (4 X)

6,05 g Tris Base [500 mM], Carl Roth

0,40 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [1 mM, 0,4%], Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalien in eine 100 ml Glasflasche.
- Mit VE-Wasser zuerst auf 50 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis die Lösung klar ist.
- Einstellen des pH-Wertes mit NaOH / HCl auf pH 6,8.
- Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Lagerung im Kühlschrank oder bei 4 °C für einige Monate möglich.

Tris / SDS Puffer pH 8,8 (4 X)

91 g Tris Base [1,500 mM], Carl Roth

2 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [14 mM, 0,4%], Sigma-Aldrich

- Einwiegen der Chemikalien in eine 500 ml Glasflasche.
- Mit VE-Wasser zuerst auf 300 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis die Lösung klar ist.
- Einstellen des pH-Wertes mit NaOH / HCl auf pH 8,8.

Cave: pH 8,8 soll bei Verwendungstemperatur eingestellt sein.

- Mit VE-Wasser auf 500 ml auffüllen.
- Lagerung im Kühlschrank oder bei 4 °C für einige Monate möglich.

2.1.10 „Small hairpin“ (sh)-RNAs und „Small interfering“ (si)-RNAs

sh-RNAs

Die sh-RNAs befinden sich im Vektor PSuper und wurden von H. Kalwa inkloniert. Der Loop sowie die Gen-Binderegionen werden jeweils in rot dargestellt.

Tabelle 15: sh-RNA-„forward“ gegen PLCε

sh-RNA gegen	„forward“
PLCε	GATCCCCAGCCGATGGCAGTTTATAA TTCAAGAGATTATAAACTGCCATCGGCTTTTTGGAAA

Tabelle 16: sh-RNA-„reverse“ gegen PLCε

sh-RNA gegen	„reverse“
PLCε	AGCTTTTCCAAAAAGCCGATGGCAGTTTATAATCTCTTGAAATTATAAACTGCCATCGGCTGGG

Tabelle 17: sh-RNA-control-„forward“

sh-RNA control	„forward“
-----	GATCCCCACCGACGAGCAGCTAGAACTTCAAGAGAGTTCTAGCTGCTCGTCGGTTTTTTGGAAA

Tabelle 18: sh-RNA-control-„reverse“

sh-RNA control	„reverse“
-----	AGCTTTTCCAAAAAACCGACGAGCAGCTAGAACTCTCTTGAAGTTCTAGCTGCTCGTCGGTGGG

si-RNAs

Die si-RNAs wurden bei Dharmacon (GE Healthcare, München) bestellt und bestanden jeweils aus einer Vierermischung von hochwirksamen si-RNAs. Die Resuspendierung zu einer Stocklösung von 100 µM wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

Tabelle 19: si-RNA „smart-pool“ gegen PLCβ₁

si-RNA gegen / Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
PLCβ ₁ / “smart-pool / ON TARGET plus”	Dharmacon, GE Healthcare, München	L-010280-00-0005

Tabelle 20: si-RNA „nontargeting –pool“

si-RNA gegen / Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
„nontargeting-pool / ON TARGET plus”	Dharmacon, GE Healthcare, München	D-001810-10-05

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 21: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Biomax Röntgenfilm	Kodak, NY, USA
Deckgläser / Glasplättchen	Menzel, Marienfeld
Einmal-Skalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Spritzen 1 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Sterilfilter 0,22 µm / 45 µm	Merk Millipore, Billerica, USA
Röhrchen („Falcons“): 50 ml / 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glasboden Petrischalen 3,5 cm	MatTek, MA, USA
Kryogefäße 1 ml / 1,5 ml / 2,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturflaschen (T25 / T75 / T175)	Sarstedt, Nümbrecht
Multipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran PROTRAN	Whattmann, Dassel
Objektträger	Menzel, Marienfeld
Folie („Parafilm“)	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Tubes	Greiner BioOne, Frickenhausen
Petrischalen (3,5 cm / 10 cm / 15 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen 6-Well	Corning, Omnilab Bremen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran Roti fluora	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzennadeln	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Merk Millipore, Billerica, USA
Zellkulturpipetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.12 Zellen und Zellkulturmedien

Zur Behandlung von Mykoplasmen wurde zeitweise allen Zellkultur-Medien Plasmocin (nach Anleitung) zugesetzt. Außerdem wurden Zellen, die längere Zeit im Stickstofftank waren, nach dem Auftauen für 2 Wochen mit Plasmocin behandelt, um eine eventuelle Infektion mit Mykoplasmen im Stickstofftank zu bekämpfen.

Tabelle 22: Zellen

Primäre Zellen	Zelllinien
murine Mesangialzellen	Hek293 (human embryonic kidney cells)
murine Podozyten	ISO-HAS (Unger et al. 2001)
murine PSMC (Katharina Hofmann)	Lenti-X-TM-239 Zellen (Clontech, Nr. 32180, Mountain View, USA)
	TRPC6-Hämagglutinin (HA)-Hek293 (6HA)

Tabelle 23: Zellkulturlösungen und Zusätze

Produkt	Firma	Artikelnummer
Accutase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A6964-100
DMEM + Phenolrot	Lonza, Basel, Schweiz	BE-1260 4F
FCS	Life Technologies, Ther. Fi.S., Schwerte	10270-106
G418	InvivoGen, San Diego, USA	Ant-gn-5
Hams F12 + Phenolrot	Lonza, Basel, Schweiz	BE-12-615F
HBSS	Lonza, Basel, Schweiz	BE-10-527F
Hepes 1M	Biochrome, Merk Millip., Billerica, USA	L1613
Hydrocortison 50µg / ml Sto.	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	H4001-1G
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	19278-5
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	S5761
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	S5261
Normocin	InvivoGen, San Diego, USA	Ant-nr-2
Optimem	Life Technologies, Ther. Fi.S., Schwerte	11058-021
PBS	Lonza, Basel, Schweiz	BE-17-512F
Penicillin / Streptomycin	Lonza, Basel, Schweiz	DE-17-602E
Plasmocin	InvivoGen, San Diego, USA	Ant-mpp / ant-pc
RPMI 1640 + Phenolrot	Lonza, Basel, Schweiz	BE-12-702F
Trypsin	Lonza, Basel, Schweiz	BE-17-161E

Tabelle 24: Podozytenmedium (verändert nach Rastaldi et al. 2006)

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
Hams F12	500 ml
FCS [10%]	50 ml
Penicillin / Streptomycin [1%]	5 ml
Apotransferrin [5 µg / ml]	1 ml
Normocin [100 µg / ml]	1 ml
Insulin [5 µg / ml]	250 µl
Hydrocortison [100 nM]	100 µl
Natriumselenit [5 ng / ml]	50 µl

Tabelle 25: Mesangialzellmedium für die Passage # 0-# 5

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
RPMI 1640	500 ml
FCS [20%]	100 ml
Penicillin / Streptomycin [1%]	5 ml
Normocin [100 µg / ml]	1 ml
Natriumselenit [5 ng / ml]	50 µl

Tabelle 26: Mesangialzellmedium ab Passage # 6

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
RPMI 1640	500 ml
FCS [10%]	50 ml
Penicillin / Streptomycin [1%]	5 ml
Normocin [100 µg / ml]	1 ml

Tabelle 27: Medium für Hek293 und ISO-HAS

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
DMEM	500 ml
FCS [10%]	50 ml
Penicillin / Streptomycin [1%]	5 ml

Tabelle 28: Medium für TRPC6-HA-Hek293 (6HA)

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
DMEM	500 ml
FCS [10%]	50 ml
Penicillin / Streptomycin [1%]	5 ml
G418 [800 µg / ml]	4,44 ml

Tabelle 29: Medium für Lenti-X™-293 Zellen

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
DMEM	500 ml
FCS [10%]	50 ml
Penicillin / Streptomycin [1%]	5 ml
Natriumbicarbonat [0,075%]	100 µl

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkulturen, „Glycerinstocks“ und Plasmid-Isolation

Tabelle 30: Material zu Bakterienkultivierung, „Glycerinstocks“ und Plasmid-Isolation

LB Nährlösung mit passendem Selektionsantibiotikum (z.B. 0,1 mg / ml Ampicillin)
Pipettenspitzen (steril)
Bakterienschüttelinkubator
Glycerin [87%]
Plasmid DNA-Isolationskit (Mini, Midi oder Maxi)
Isopropanol
Ethanol [70%]
Flüssiger Stickstoff
Bidest. Wasser
TE-Puffer pH 8,0
1,5 ml Reaktionsgefäße
Geeignete Kulturgefäße (Erlenmeyerkolben oder Bakterienröhrchen)

Je nachdem, wieviel DNA gewonnen werden soll wird mit Bakterienkulturen von wenigen Millilitern bis zu 500 ml gearbeitet. Die genauen Mengen können den Miniprep (GeneJet)- und Midi (NucleoBond MIDI)- bzw. Maxi (NucleoBond MAXI)-Prep-„Kits“ der Firma „Macherey-Nagel“ entnommen werden. In dieser Arbeit wurden für Miniprep 5 ml, für Midiprep und Maxiprep je 250 ml Bakterienkultur angesetzt.

Inkubation

- Zugabe der Antibiotika und vorwärmen des LB-Mediums für 15-30 Minuten bei 280 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator.
- Picken einer einzelnen Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze.
- Einbringen der Pipettenspitze samt Bakterienklon in die LB-Nährlösung.

Cave: Klone sollten nur gepickt werden solange sie vereinzelt auf den Platten liegen. Entstehen kleine Nebeklonen (Schwärmer) rings um die größeren Kolonien, so können diese nur wachsen, weil das Selektionsantibiotikum bereits vom antibiotikaresistenten Klon abgebaut wurde.

- Inkubation, je nach Herstelleranleitung des „Kits“, für 1 h bis über Nacht, bei 37 °C und 255-280 rpm.
- Herstellung eines oder mehrerer „Glycerinstocks“ zur Aufbewahrung und Isolation der Plasmid-DNA.

Anlegen von „Glycerinstocks“

„Glycerinstocks“ dienen der Lagerung von Bakterien, die Plasmide enthalten, über längere Zeit bei -80 °C. Wird erneut Plasmid-DNA gebraucht, muss nicht zuerst eine Transformation gemacht werden, sondern die eingefrorenen „Glycerinstocks“ können Verwendung finden. „Glycerinstocks“ müssen stets, umgehend nach Herstellung, in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und sollten zum Auftauprozess auf Eis gelegt werden.

- Aus der Bakterienkultur je „Glycerinstock“ 750 µl Bakteriensuspension entnehmen und mit 250 µl 87%igem Glycerin mischen bis keine Schlieren mehr sichtbar sind.
- Umgehend verschließen und in flüssigem Stickstoff einfrieren.
- Umgehend aus dem Stickstoff entnehmen und bei -80 °C tiefrieren.

Plasmid-DNA-Isolation

Die Plasmid-Isolation wurde nach Herstellerangaben der verschiedenen „Kits“ (GeneJet, NucleoBond MIDI, NucleoBond MAXI) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA analog der Anleitungen gefällt und je nach weiterer Verwendung in bidest. Wasser oder TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die Quantifizierung der erhaltenen DNA wurde mittels Absorptionsmessung bei 260 nm durchgeführt. In manchen Fällen wurde zur Überprüfung der Absorptionsmessung zusätzlich eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt um die erhaltenen DNA-Banden zur Quantifizierung mit der Intensität eines Markers in bekannter Konzentration zu vergleichen.

2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Bei E.coli Bakterien wird unter niedrigen Wachstumstemperaturen und Behandlung mit $MnCl_2$ und $CaCl_2$ eine chemische Kompetenz ausgelöst. Zusammen mit einem Hitzeschock führt dies dazu, dass die Bakterien in der Lage sind freie Plasmid-DNA aufzunehmen.

Tabelle 31: Material zur Herstellung kompetenter Bakterien

SOB-Medium (250 ml)
Transformationspuffer (100 ml)
E.coli Bakterien (DH5α oder Stbl3) auf Agar-Platten ausplattiert
Eis
Bakterienschüttelinkubator
Flüssiger Stickstoff
DMSO
PCR-Gefäße (stickstoffresistent)

- Eine Kolonie der E.coli Bakterien von einer Agar-Platte picken und in einen Erlenmeyerkolben, mit 250 ml vorgewärmten SOB, aufnehmen.
- Kultivierung bei 18 °C (wenn nicht möglich, bei RT) und 280 rpm über Nacht, bis zu einer OD660 nm von 0,6 (logarithmische Wachstumsphase).
- Mindestens eine Stunde vor Erreichen der OD den Transformationspuffer auf Eis stellen.
- Die Bakteriensuspension nach Erreichen der OD für 10 Minuten auf Eis stellen.
- Bei 4 °C und 2100 g für 10 Minuten zentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen und das Pellet mit 80 ml eiskaltem Transformationspuffer vollständig resuspendieren. Dabei stets auf Eis belassen.
- Die Lösung für 10 Minuten auf Eis inkubieren.
- Erneut bei 4 °C und 2100 g für 10 Minuten zentrifugieren.
- Den Überstand verwerfen und das Pellet in 20 ml + 7% DMSO (final) zügig resuspendieren.
- In 100 µl oder 50 µl Aliquots aufteilen und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefrieren.
- Lagerung bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff für längere Zeit möglich.

2.2.3 Transformation

Plasmid-DNA kann durch Transformation in kompetente Bakterien, zur Vermehrung während des Wachstums, eingebracht werden. Nach der Amplifikation kann die DNA dann aus den Bakterien zurückgewonnen werden. Zur Transformation wird die Eigenschaft chemisch kompetenter Bakterien genutzt, unter erhöhter Temperatur poröse Zellwände auszubilden, durch welche sie DNA aufnehmen können. Die DNA wird dann während der Zellteilung zusammen mit dem Bakteriengenom repliziert. Neben der Transformation werden zwei Negativkontrollen sowie eine Positivkontrolle durchgeführt (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Nötige Kontrollen bei der Transformation

Kontrolle	Antibiotika	Plasmid / Bakterien	Zweck	Wachstum
+	keines	nein / ja	Funktion Bakterien	+
-	Antibiotika	nein / ja	Funktion Antibiotika / Verunreinigung Bakterien	-
-	keines	nein / nein	Verunreinigungstest der Platten	-

Tabelle 33: Material zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zu amplifizierende DNA (Plasmid)
Chemisch kompetente Bakterien (z.B. Stbl3) (3 Klone mehr als Proben)
Agar-Platten mit passenden Selektionsantibiotika (z.B. 0,1 mg / ml Ampicillin) (1 mehr als Proben)
2 Agar-Platten ohne Selektionsantibiotika zur Kontrolle
Eis
Thermomix (Heizblock)
Bakterieninkubator

- Auftauen der kompetenten Bakterien (Aliquots zu 50 oder 100 µl) auf Eis (Ein Aliquot je Probe + 3 Aliquots für die Kontrollen).
- 1-5 µl Plasmid-DNA [1 µg / µl] oder 1-5 µl vom Ligationsansatz zupipettieren und vorsichtig vermischen (leicht schwenken und dagegen klopfen, nicht vortexen).
- 30 Minuten auf Eis inkubieren. In der Zwischenzeit den Thermomix auf 42 °C vorwärmen sowie die Agar-Platten bei 37 °C in den Bakterieninkubator stellen.
- Die Bakterien für 45-90 Sekunden einem 42 °C Hitzeschock aussetzen, anschließend umgehend zurück auf das Eis stellen.
- 2 Minuten auf Eis inkubieren.
- 10-20 µl der Bakteriensuspension je Agar-Platte ausstreichen.
- Über Nacht bei 37 °C im Bakterieninkubator inkubieren.
- Fortfahren mit der Kultivierung der Bakterien.

2.2.4 Klonierungsstrategie des mTRPC6

Die cDNA-Fragmente mit dem murinen Wildtyp-TRPC6-Gen, oder den TRPC6-Mutanten (G108S, S269T und M131T) wurden zusammen mit der codierenden Region des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) aus dem Vektor pcDNA3.1 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* ausgeschnitten und in den lentiviralen Vektor pWPXL kloniert. Die gewonnen DNA-Fragmente wurden nach dem Verdau über ein Agarosegel aufgetrennt und aus den Gelstücken über eine Gelextraktion mittels Glasmilch isoliert. Anschließend wurde das pWPXL-Plasmid mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert und die extrahierten cDNA-Fragmente einligiert.

2.2.5 *In-vitro*-Mutagenese

Die *In-vitro*-Mutagenese wird verwendet, um Punktmutationen in die DNA einzufügen. In dieser Arbeit wurden Punktmutationen im TRPC6-Gen, die in Patienten die an FSGS leiden entdeckt wurden, in den murinen TRPC6 eingefügt. Die Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen TRPC6 zeigen eine 94%ige Übereinstimmung. Dem murinen Protein (930 AS) fehlt jedoch an Position 35 eine Aminosäure des humanen Proteins (931 AS) (Abbildung 18).

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
	1784 bits(4620)	0.0	Compositional matrix adjust.	871/931(94%)	893/931(95%)	1/931(0%)	
hTRPC6	1		MSQSPAFGPRRGSSPRGAAGAAARRNESQDYLLMDSSELGEDGCPQAPLPCYGYPCFRGS	60			
mTRPC6	1	R.VT...G.LKA.P..GT.....-...D.Y..L...P....S...N	59			
hTRPC6	61		DNRLAHRRTVLRKGRRLANRGPAYMFSDRSTSLSEIEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEE	120			
mTRPC6	60		E...T....I.....N.H.....	119			
hTRPC6	121		CHSLNVNVCVDYMQNALQLAVANEHLEITELLKKNLSRVGDALLLAIKGYVRIVEAI	180			
mTRPC6	120		179			
hTRPC6	181		LSHPAFAEGKRLATSPSQSELQQDDFYAYDEDEGTRFSDVTPILAAHCQEYEVHTLLR	240			
mTRPC6	180		.N.....	239			
hTRPC6	241		KGARIERPHDYFCKCNDNCNQKQKHSFHSRSRINAYKGLASPAYLSLSEDPVMTALEL	300			
mTRPC6	240	TE.S.....	299			
hTRPC6	301		SNELAVLANIEKEFKNDYKQLSMQCKDFVVGLLDLCRNTEEVEAILNGDVETLQSGDHGR	360			
mTRPC6	300	R.....A..R.P..F..	359			
hTRPC6	361		PNSRLKLAIKYEVKVFVAHPNCQQQLLSIWYENLSGLRQQTMAVKFLVVLAVAIPLPFL	420			
mTRPC6	360		419			
hTRPC6	421		ALIYWFAPCSKMGKIMRGPFMKVFVAHAASFTIFLGLVMNAADRFEQTKLLPNETSTDNA	480			
mTRPC6	420	C.....L.....	479			
hTRPC6	481		KQLFRMKTSCFSWMEMLIISWVIGMIWAECKEINTQGPKEYLFELWNMLDFGMLAIFAAS	540			
mTRPC6	480		R.....	539			
hTRPC6	541		FIARFMAFWHASKAQSIIDANDTLKDLTKVTILGDNVYKYNLARIKWDPSPQIISEGLYA	600			
mTRPC6	540	T.....	599			
hTRPC6	601		IAVVLFSFRIAYILPANESFGPLQISLGRTVKDIKFMVIFIMVFVAFMIGMFNLYSYYI	660			
mTRPC6	600		659			
hTRPC6	661		GAKQNEAFTTVEESFKTLFWAIFGLSEVKSVINYNHKKFIENIGVLYGVYVIMVIVLL	720			
mTRPC6	660		719			
hTRPC6	721		NMLIAMINSSFQEIEDDADVEWKFARAKLWFSYFEEGRITLVPFNLVPSPKSLFYLLKL	780			
mTRPC6	720	L....F	779			
hTRPC6	781		KKWISELFQGHKKGFQEDAEMNKINEEKKLGILGSHEDLSKLSLDKQVGHNKQPSIRSS	840			
mTRPC6	780		..MC..I..Q.Q.....R.....F..S.....F...N.LA...S.T...	839			
hTRPC6	841		EDFHLNSFNNPPRQYQKIMKRLIKRYVLQAQIDKESDEVNEGELKEIKQDISSLRYELLE	900			
mTRPC6	840		..Y.....S.....	899			
hTRPC6	901		EKSQNTEDLAEILRELGEKLSMEPNQEETNR	931			
mTRPC6	900	K...R...L...KL...SR.	930			

Abbildung 18: Aminosäuresequenz-Vergleich des humanen und murinen TRPC6.

Die Aminosäuresequenzen beider Proteine zeigen eine 94%ige Übereinstimmung. Unterschiedliche Aminosäuren werden in rot dargestellt. An Position 35 fehlt dem murinen TRPC6 eine Aminosäure des humanen Proteins (verändert nach www.ensembl.org).

Für diese Arbeit wurden zuerst drei bekannte humane FSGS-Mutationen ausgewählt (Vergleiche Abbildung 16) und in ihr murines Gegenstück übersetzt. Die korrespondierenden murinen Mutationen werden in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Humane und murine Pendants der Mutationen

hTRPC6	mTRPC6
G109S	G108S
S270T	S269T
M132T	M131T

Für die eigentliche Mutagenese wurden zuerst Oligonukleotide hergestellt, die größtenteils homolog zur murinen TRPC6-cDNA sind, aber mittig die FSGS-Mutation enthalten (Vergleiche Tabelle 11). Das Prinzip der Mutagenese wird in Abbildung 19 verdeutlicht. Beide Oligonukleotid-Primer binden an die homologe, einzelsträngige TRPC6-DNA, die in einen passenden Vektor (z.B. pcDNA3.1) für die Amplifikation in Bakterienkulturen einkloniert wurde. Während einer PCR-Reaktion werden beide Oligonukleotide durch eine Polymerase mit einer „proof-reading“-Funktion (z.B. Pfu Ultra HF) verlängert, bis das Plasmid vollständig dupliziert ist. Dadurch werden Plasmide generiert, die die FSGS-Mutationen in der TRPC6-cDNA beinhalten.

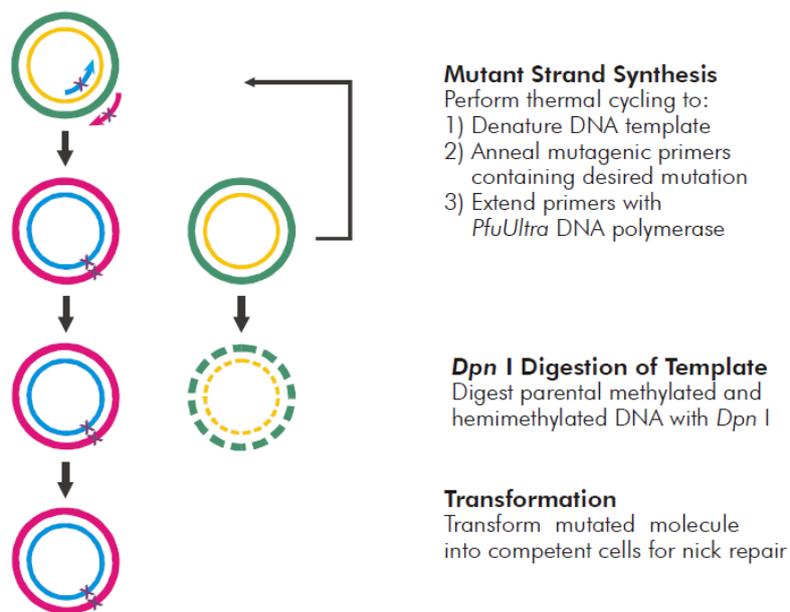


Abbildung 19: Prinzip der Mutagenese.

Um anschließend die ursprünglichen Plasmide ohne Mutation zu entfernen, kann eine *DpnI*-Verdau durchgeführt werden. *DpnI* ist ein Enzym, das spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA-Stücke verdaut. Methylierung kann jedoch nicht während einer PCR, sondern nur während der Plasmidvermehrung mit Hilfe von Bakterien geschehen, mit deren Hilfe die Ursprungsplasmide vermehrt wurden.

Tabelle 35: Material zur Mutagenese

Eis
Template DNA (in Bakterien produziert)
Oligonukleotid-Primer mit Mutationen („forward“ und „reverse“)
dNTP Mix
“Phusion High Fidelity” DNA-Polymerase und 5 X “HF-Phusion” Puffer
Autoklaviertes Millipore-Wasser
PCR-Gefäße
PCR-Cycler

- Die Mutageneseprimer laut Richtlinien (Abschnitt 2.1.8) designen (Vergleiche Tabelle 11).
- Wie in Tabelle 36 dargestellt, 3 Ansätze pipettieren, die 5 ng, 25 ng und 50 ng der zu amplifizierenden DNA beinhalten.

Tabelle 36: Pipettierschema der *In-vitro*-Mutagenese

Lösung	Menge
5 X HF Phusion Puffer	10 µl
dsDNA Template (5, 25, 50 ng / µl)	1 µl
Oligonukleotid-Primermix (forward and reverse) 10 pmol / µl	2 µl
dNTP Mix	1 µl
Bidest. H ₂ O	36 µl
Pfu Ultra DNA-Polymerase (2,5 U / µl)	1 µl

- Folgende PCR (Tabelle 37) durchführen (*= 1 Minute / kb der Plasmidlänge):

Tabelle 37: Mutagenese-PCR

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 sec
12	95°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	9 min*(für 9 kb Plasmid)

- Nach der PCR kann das Produkt vorübergehend auf Eis gelagert oder für längere Zeit bei -20 °C eingefroren werden. Am besten ist es jedoch, wenn umgehend mit dem *DpnI*-Verdau begonnen wird.
- 1 µl *DpnI* (10 U / µl) pro Probe zupipettieren und 1 h bei 37 °C inkubieren.
- Anschließend ist eine vorübergehende Lagerung der Probe im Kühlschrank oder bei -20 °C für längere Zeit möglich.

2.2.6 DNA-Fällung

DNA lässt sich mit Hilfe von Salzen und Alkohol aus wässrigen Lösungen ausfällen. Dazu wird sie wie folgt behandelt.

Tabelle 38: Material zur DNA-Fällung

Natriumacetat [3 M]
Ethanol (oder Isopropanol) 95% und Ethanol 70%
Bidest. VE-Wasser oder TE-Puffer pH 8,0
Passende Reaktionsgefäße

- Zu 1 Volumen DNA-Lösung werden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen 95% Ethanol pipettiert.
- Gut vortexen.
- Mindestens 30 Minuten bei -20 °C einfrieren.
- 15 Minuten auf höchster Stufe einer Tischzentrifuge bei 0 °C (oder 4 °C für 30 Minuten) zentrifugieren.
- Die ausgefällte DNA 2 x mit 70% Ethanol waschen. Dazwischen jeweils mindestens 5 Minuten bei 0 °C (oder 10 Minuten bei 4 °C) zentrifugieren.
- Ethanol vorsichtig abnehmen und die DNA vollständig an der Luft trocknen lassen.
- Die DNA in TE-Puffer pH 8,0 oder bidest. VE-Wasser aufnehmen.

2.2.7 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen und Phosphatase

Die Methode des DNA-Verdau kann genutzt werden um DNA-Stücke, wie zum Beispiel Plasmide, an einer bestimmten Stelle zu schneiden. Anschließend können andere DNA-Stücke einligiert werden oder die geschnittenen DNA-Fragmente auf einem Agarosegel bezüglich ihrer Länge überprüft

werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind sog. „Fast Digest“ (FD). Sie haben gegenüber normalen Enzymen die Vorteile, dass sie zum einen sehr schnell und mit wenig Fehlern arbeiten und dass alle im selben Puffer aktiv sind, so dass Verdaus mit mehreren Enzymen unkompliziert möglich sind. Für eine Negativkontrolle kann in einem Ansatz das Restriktionsenzym weggelassen werden. Ein zusätzlicher Phosphatase-Verdau (parallel möglich) entfernt das Phosphat an den 5'-Enden der verdauten DNA, wodurch bei einer späteren Ligation sichergestellt wird, dass nur das DNA-Fragment mit seinen Phosphatresten einligiert wird und nicht die Plasmidenden wieder religiert werden.

Tabelle 39: Material zum DNA-Restriktionsverdau

Zu verdauende-DNA (z.B. Plasmid)
10 X „FastDigest“ grüner Puffer oder 10 X FastDigest® Puffer
Restriktionsenzym(e) „FastDigest“
1,5 ml Reaktionsgefäße
Bidest. VE-Wasser
Eis

- Pipettieren des Reaktionsmixes auf Eis analog zu Tabelle 40 (für simultanen Phosphataseinkubation siehe Tabelle 41).

Tabelle 40: Pipettierreihenfolge des Restriktionsverdaus

Lösung	Menge
Template-DNA (z.B. Plasmid)	500 ng
10 X FastDigest® green Puffer	2 µl
Restriktionsenzym(e) FastDigest® [1 FDU / µl]	je 1 µl
Bidest. VE-Wasser	Auf 20 µl auffüllen

- Inkubation für mindestens 5 Minuten (bis zu 30 Minuten) bei 37 °C im Thermomix bei 300 rpm.
- Die Proben mindestens 2 Minuten auf Eis stellen, dann weiterverwenden oder bei -20 °C lagern.

Tabelle 41: Simultaner Phosphataseverdau

Lösung	Menge
FastAP® Thermosensitive Alkaline Phosphatase [1 U / µl]	1 µl

Für den simultanen Phosphataseverdau wird 1 µl des Enzyms Phosphatase (Tabelle 41), zusätzlich zu den Lösungen der Tabelle 40, auf Eis pipettiert. Der Phosphataseverdau kann gleichzeitig oder später erfolgen.

- Pipettieren des Reaktionsmixes auf Eis analog Tabelle 40 und Tabelle 41.
- Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C im Thermomix bei 300 rpm.
- Stoppen der Reaktion durch Erhitzen der Probe auf 80 °C für 20 Minuten.

2.2.8 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Agarosegelelektrophorese wird verwendet um DNA-Stücke in einem Agarosegel der Größe nach aufzutrennen. Die Konzentration des zu verwendenden Agarosegels wird je nach Größe der DNA-Stücke ausgewählt. Bei großen Stücken im kb-Bereich wird ein wenig konzentriertes Gel (z.B. 0,7%) empfohlen. Kleine Stücke lassen sich besser auf höherkonzentrierten Gelen (bis zu 2,5%) auftrennen. Im Nachfolgenden wird die Herstellung eines 1%-Agarosegels erklärt.

Tabelle 42: Material zur DNA-Agarosegelelektrophorese

Gene Ruler DNA Leiter 1 kb (0,5 µg / µl)
Ethidiumbromid (1% in Wasser, 10 mg / ml)
TAE 1 X (Siehe Abschnitt 2.1.9)
Agarose
UV-Detektionsgerät
Gelelektrophorese-Ausstattung
VE-Wasser

Agarosegel

- 1 g Agarose in einen 300 ml Erlenmeyerkolben einwiegen.
- Mit 1 X TAE-Puffer auf 100 ml auffüllen.
- Auf kleiner Stufe in der Mikrowelle aufkochen, bis sich alles gelöst hat.
- Kurz abkühlen lassen, dann einen Tropfen Ethidiumbromid (10 mg / ml) zu tropfen und umgehend schwenken bis es sich gut verteilt hat.
- Gel in die Gießvorrichtung kippen und Kamm einsetzen.
- Eventuell entstandene Luftblasen mit einem Spatel zerstören oder beiseite schieben.

Cave: Stets mit Handschuhen und unter dem Abzug arbeiten, da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und stark gesundheitsschädlich ist.

- Mindestens 20 Minuten aushärten lassen.

Elektrophorese und Detektion

- Befüllen der Elektrophoresekammer mit 1 X TAE-Puffer.
- Zufügen von einem Tropfen Ethidiumbromid in den Puffer.
- Einlegen des Gels in den Puffer laut Herstelleranleitung.
- Entnehmen des Kammes und befüllen der Taschen mit Marker (3 µg) oder Probe (0,25 µg).
- Elektrophorese bei 120 V konstant (ca. 300 mA) für ca. 1,5 h (je Auftrennung variabel).
- Betrachten des Gels mittels UV-Dokumentationssystem.
- Auswertung und speichern der Bilder am PC.

2.2.9 DNA-Gelextraktion

DNA kann nach einer Agarosegelelektrophorese aus dem Gel zurückgewonnen werden, um sie zum Beispiel in einen Vektor zu ligieren. Dazu gibt es verschiedene kommerziell erhältliche „Kits“. In dieser Arbeit wurde jedoch mit einem selbst zusammen gestellten Glasmilch-Kit und Puffern von „Quiagen“ gearbeitet. Glasmilch ist sehr fein geriebenes Glas, das mit Wasser gemischt wird, wodurch eine milchige Suspension entsteht. DNA kann an diesen feinen Glaskügelchen binden und unter bestimmten chemischen Voraussetzungen wieder eluiert werden, was bei der Gelextraktion genutzt wird. Ist die Glasmilch eingetrocknet, kann sie jederzeit wieder mit Wasser resuspendiert werden.

Tabelle 43: Material zur DNA-Gelextraktion

QX1 Puffer (Quiagen)
PE Puffer (Quiagen)
Glasmilch
Bidest. VE-Wasser
1,5 ml Reaktionsgefäße
Skalpell
Bidest. VE-Wasser

- Ausschneiden des DNA-Fragmentes aus dem Gel mit Hilfe eines Skalpells.

Cave: Zur besseren Lokalisation kann unter UV-Licht gearbeitet werden. Dieses sollte eine geringe Wellenlänge haben, damit die DNA nicht geschädigt wird. Außerdem sollte geeignete Schutzausrüstung (Brille) getragen werden.

- Auswiegen von 250 mg DNA-Gel in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß.
- 300 µl QX1 Puffer pro 100 mg Gel zupipettieren.
- 20 µl Glasmilch zugeben, vortexen und 10 Minuten bei 50 °C inkubieren. Dabei alle 2 Minuten erneut vortexen. Das Gel sollte im Anschluss daran komplett gelöst sein.

Cave: Auf das Vortexen sollte verzichtet werden, wenn das Fragment größer als 10 kb ist, da es ansonsten leicht zerstört wird.

- 1 Minute bei 7000 rpm zentrifugieren, anschließend den Überstand verwerfen.
- Die Glasmilch in 500 µl QX1 Puffer resuspendieren.
- 1 Minute bei 7000 rpm zentrifugieren, anschließend den Überstand verwerfen.
- Die Glasmilch in 500 µl PE Puffer resuspendieren und den Waschschrift wiederholen.
- Den Überstand vorsichtig abnehmen und 20-23 Minuten von Luft trocknen lassen.
- Zur Elution das Pellet in 20 µl bidest. VE-Wasser resuspendieren und für 5 Minuten bei RT inkubieren.
- 1 Minuten bei 7000 rpm zentrifugieren und den Überstand (enthält DNA) in ein sauberes Reaktionsgefäß überführen.
- Die Rest-DNA kann erneut von der Glasmilch eluiert und die Überstände gemischt werden.

2.2.10 DNA-Ligation

Es gibt zwei Arten von Ligation, zum einen die „Sticky-End“-Ligation, bei der die DNA-Stücke so geschnitten werden, dass sie Überhänge aufweisen, die zueinander komplementär sind. Zum anderen die „Blunt-End“-Ligation, bei der keine Überhänge generiert werden. Die Durchführung beider Arten wird hier erklärt. Neben den Proben sollte stets eine Kontrolle ohne Ligase (Kontrolle des Verdau) und eine Kontrolle ohne DNA-Fragment (Kontrolle der Religation) durchgeführt werden.

Tabelle 44: Material zur DNA-Ligation

DNA 1 (z.B. Linearisierter, Phosphatase behandelter Vektor)
DNA 2 (z.B. Insert)
10 X T4 DNA Ligase Puffer (bei Ligase mitgeliefert)
T4 DNA Ligase
50% PEG 4000 Lösung (bei Ligase mitgeliefert)
Bidest. VE-Wasser
1,5 ml Reaktionsgefäße

„Sticky-End“-Ligation

- Den Reaktionsmix analog zu Tabelle 45 pipettieren.

Tabelle 45: Sticky-End-Ligation

Lösung	Menge
DNA 1 (Linearer Vektor)	20-100 ng
DNA 2 (Fragment)	1:1, 1:3 oder 1:5 bezüglich Vektor
10 X T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase	1 U
Bidest. VE-Wasser	Auf 20 µl auffüllen

- Mindestens 10 Minuten bei RT inkubieren.
- Die Ligase kann anschließend bei 65 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert werden.

„Blunt-End“-Ligation

- Den Reaktionsmix analog zu Tabelle 46 pipettieren.

Tabelle 46: Blunt-End-Ligation

Lösung	Menge
DNA 1 (Linearer Vektor)	20-100 ng
DNA 2 (Fragment)	1:1, 1:3 oder 1:5 bezüglich Vektor
10 X T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase	5 U
50% PEG 4000 Lösung	2 µl
Bidest. VE-Wasser	Auf 20 µl auffüllen

- Mindestens 1 h bei RT inkubieren.
- Die Ligase kann anschließend bei 65 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert werden.

2.2.11 RNA-Gewinnung

RNA kann aus verschiedenen Geweben oder Zellen gewonnen werden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des RNA-Isolations „Kits“ „Invitrap“ der Firma „Strattec“ sowohl RNA aus Nieren, als auch aus verschiedensten, kultivierten Zellen gewonnen und anschließend zur Erststrangsynthese eingesetzt. Zur weiteren Aufbewahrung wurde die RNA dann umgehend bei -80 °C tiefgefroren.

Bei der RNA-Gewinnung wurde analog dem Herstellerprotokoll gearbeitet. Die Zellen oder das Gewebe werden zuerst lysiert, anschließend wird über Affinitätssäulen zuerst die genomische DNA entfernt und dann die gereinigte Gesamt-RNA eluiert.

2.2.12 Erststrangsynthese (cDNA-Synthese)

Mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ kann aus RNA einzelsträngige komplementär-DNA (cDNA) synthetisiert werden. CDNA kann vorübergehend bei 8 °C im Kühlschrank gelagert werden, sollte zur längeren Aufbewahrung jedoch bei -20 °C eingefroren werden.

In dieser Arbeit wurde ein „Kit“ der Firma „Thermo Fisher / Fermentas“ verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die dazu nötigen Inkubationsschritte wurden mit einem „Thermocycler“ der Firma „Peqlab“ durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde anschließend zur quantitativen RT (Reverse Transkriptase)-PCR verwendet.

2.2.13 Quantitative RT(Reverse Transkriptase)-PCR

Bei der quantitativen RT (Reverse Transkriptase)-PCR (auch q-PCR oder q-RT-PCR) kann, zusätzlich zur normalen Amplifikation bei einer herkömmlichen PCR, eine indirekte Quantifizierung der cDNA und somit der RNA-Level in einem Proteinlysat durchgeführt werden. Dabei wird die relative Expression des „gene of interest“ mit der Expression eines „housekeeping“-Gens verglichen, weshalb die Expression des „gene of interest“ stets als Anteil vom „housekeeping“-Gen angegeben wird. Letzteres besitzt ein relativ stabiles Expressionsniveau und kann deshalb als Standard verwendet werden. In dieser Arbeit wurde sowohl bei den murinen, als auch bei den humanen Proben, β -Aktin als „housekeeping“-Gen verwendet.

Die Quantifizierung während der q-PCR erfolgte mittels Fluoreszenzfarbstoffen, wie dem „SYBR®-Green“ von „Thermo Fisher Scientific“. Dieser Stoff lagert sich während der Amplifikation in doppelsträngige DNA ein und gibt dann, nach Anregung bei 494 nm, ein definiertes Signal bei 521 nm ab, dessen Intensität proportional zum DNA-Gehalt ist, sich nach jedem PCR-Zyklus also verdoppelt.

Tabelle 47: Material zur q-PCR

96-Lochplatte (Roche) mit Klebeverschlussfolien
Thermo SYBR®-Green „Kit“ (Thermo Fisher Scientific)
Pipetten
Bidest. Wasser
1,5 ml Reaktionsgefäße
Eis
Light Cycler 480 (Roche)
cDNA (Erststrangsynthese 1:10 mit bidest. Wasser verdünnt)
Oligonukleotidmix („forward“ und „reverse“) von „gene of interest“ und „housekeeping“-Gen

Vorbereitung zur q-PCR

- Auf Eis pipettieren. (Am besten so dunkel wie möglich arbeiten, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern.)
- Je Probe einen sog. „Mastermix“ für Triplikate ansetzen (Tabelle 48). Dabei bedenken, dass im besten Fall Triplikate je Primermix pipettiert werden. Außerdem eine Negativkontrolle mit bidest. Wasser statt cDNA anfertigen um die Verunreinigung des Wassers durch DNA zu überprüfen.

Tabelle 48: Mastermix zur q-PCR

Lösung	Menge je Monokat
Thermo SYBR®-Green	5 µl
cDNA (1:10 aus Erststrangsynthese)	2 µl
Bidest. Wasser	1 µl

- 2 µl des Oligonukleotidgemisches in ein Loch einer 96-Lochplatte pipettieren.
- Je Probe 8 µl des Mastermixes aus Tabelle 48 zupipettieren und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gut vermischen.
- Lückenloses Zukleben der 96-Lochplatte mit einer speziellen Klebefolie.
- Schnellst möglich im „Light Cycler“ vermessen.

Messung

- Mit einer Geschwindigkeit von 800 rpm für 2 Minuten zentrifugieren, um Flüssigkeit auf den Böden der Löcher zu lokalisieren.
- Im „Light Cycler“ das Programm aus Tabelle 49 verwenden.

Cave: Ausnahme: Bei der Nephtrin-PCR werden bei allen 45 Zyklen je 10 Sekunden (statt 15 Sekunden) bei den Einzelschritten verwendet.

Tabelle 49: „Light Cycler“ Programm bei der q-PCR

Zyklen	Titel	Temperatur	Zeit
1	Aktivierung	94 °C	15 Minuten
45	Denaturierung	94 °C	15 Sekunden
	Annealing	55 °C	15 Sekunden
	Elongation	72 °C	15 Sekunden
1	Schmelzkurve	kontinuierlich steigend 55 °C - 95 °C	15 Sekunden

2.2.14 Kultivieren von Zellen

Die aufgeführten Zelllinien wurden in 10 cm Petrischalen oder 175 cm² Flaschen mit 10 ml Medium ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Anschließend wurde bei primären Zellen zweimal die Woche das Medium ersetzt (Montag und Donnerstag, oder Dienstag und Freitag). Bei Hek293 und von diesen Zellen abstammenden Zellen (TRPC6-HA-Hek293 (6HA) und Lenti-X-293) wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. Sie wurden so geteilt, dass sie zweimal pro Woche gesplittet werden mussten und kein Mediumwechsel von Nöten war.

Cave: Hek293-Zellen und ihre Derivate müssen immer in der Wachstumsphase gehalten werden, damit sie ihre charakteristischen Eigenschaften behalten. Dies bedeutet, dass sie auf keinem Fall konfluent werden dürfen, da sie sonst einem Proliferationsstopp unterliegen können. Am besten ist es, wenn sie bei spätestens 90%iger Konfluenz 1:10 bis 1:30 (je nach Alter) auf weitere Zellkulturschalen verteilt werden.

Auch Podozyten sollten ab # 1 nicht zu dicht werden, da sie dann ebenfalls langsamer proliferieren, es ist jedoch lediglich eine Splittung von 1:2 nötig.

Zellen Teilen („Splitten“)

Tabelle 50: Material zum Teilen von Zellen

PBS
Zellen
Zell-Medium + FCS
Trypsin oder Accutase
50 ml Röhrchen

- Zellen 2 x mit PBS waschen um jegliche Proteinanhaftungen zu entfernen, welche das Trypsin abstoppen würden.
- Zellen für 1-5 Minuten (je nach Anhaftungsintensität) mit einer Trypsin / EDTA-Lösung (2-3 ml bei einer 10 cm Petrischale) bei 37 °C inkubieren (Die Ablösung kann dann unter dem Mikroskop kontrolliert werden und gegebenenfalls mit leichtem Klopfen gegen die Schale nachgeholfen werden).
- Durch Zupipettieren von FCS-haltigem Medium (bei 10% FCS mindestens doppelte Menge im Vergleich zur zugegebenen Trypsinmenge) wird die Trypsinreaktion gestoppt.
- Die Lösung nach mehrmaligem auf- und abpipettieren in ein 50 ml Röhrchen füllen und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugieren.
- Zur Aussaat der Zellen die abgestoppte Trypsinlösung vorsichtig vom entstandenen Pellet absaugen und dieses in einer entsprechenden Menge warmen Medium aufnehmen.
- Mehrmalig auf- und abpipettieren, zur Vereinzelnung verklumpeter Zellen.
- Nun können die Zellen in frische Petrischalen ausgesät und im Inkubator kultiviert werden.

Cave: Manche Zellen vertragen es besser, wenn sie nach Ablösung direkt ausgesät werden und das Trypsin nicht zuvor entfernt wird, da der langwierige Stress durch die Zentrifugation entfällt. Was für die jeweiligen Zellen am besten ist muss ausprobiert werden. In dieser Arbeit wurde das Trypsin stets durch Abzentrifugieren entfernt.

2.2.15 Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen

Um Säugerzellen über einen längeren Zeitraum zu lagern werden diese, wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben, vom Boden der Petrischalen abgelöst und abzentrifugiert. Anschließend wird wie folgt verfahren:

Kryokonservierung

Tabelle 51: Material zur Kryokonservierung

Kryokonservierungsbox
Kryokonservierungs-Röhrchen
1,5 ml Reaktionsgefäße
DMSO
Zellspezifisches Medium + FCS

- In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 500 µl 37 °C warmes, zellspezifisches Medium mit 125 µl DMSO [20% final] gut vermischen.
- Die Zellen z.B. in 500 µl 37 °C warmen, zellspezifischem Medium resuspendieren und mit der Mikroliterpipette abmessen, wie viel Lösung exakt entstanden ist. (Die genaue Menge ist abhängig von der Anzahl der Zellen. Es sollten ca. 1 Million Zellen pro ml aufgenommen werden.)
- In einem 1 ml Kryogefäß beide Lösungen (Zell-Lösung und DMSO-Lösung) 1:1 mischen, umgehend verschließen und sofort in einer Box zur Kryokonservierung bei -80 °C tiefrieren.
- Zur längeren Aufbewahrung nach etwa 48 h aus der Kryokonservierungsbox entfernen und in flüssigem Stickstoff lagern.

Auftauen

- Die Kryogefäße samt Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entfernen und umgehend in ein 37 °C Wasserbad geben.
- Sobald die Zellen aufgetaut sind aus dem Wasserbad entnehmen und gut mit 70% Ethanol absprühen.
- Das Kryogefäß unter der Sterilwerkbank öffnen und die Lösung in ein 50 ml Röhrchen pipettieren. Dann das Kryogefäß gut mit 2 ml frischem, warmem Medium nachspülen, um möglichst alle Zellen zu erwischen.
- Die Zellen im 50 ml Röhrchen mit 10 ml warmem Medium versetzen und gut resuspendieren.
- Bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugieren um das schädliche DMSO zu entfernen.
- Die Lösung über dem Pellet absaugen und die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben, aussäen.

Cave: Die Abzentrifugation des DMSOs kann unter Umständen weggelassen werden. Dies ist je nach Zelllinie auszutesten.

2.2.16 Podozyten-Isolation

Die Isolation primärer, muriner Podozyten wird in Anlehnung an Rastaldi et al. 2006 durchgeführt. Die benötigten Tiere müssen noch sehr jung sein (ca. 9-14 Tage), da Podozyten nur während des Wachstums der Nieren proliferieren können.

Tabelle 52: Material zur Podozyten-Isolation

Mindestens 4 Mäuse im Alter von 9-14 Tagen.
Isofluran und ein Becherglas (ca. 300 ml) mit Alufolienabdeckung
Autoklaviertes OP-Besteck (Mindestens 2 Scheren-je eine für innen, bzw. außen; 1 Pinzette)
Präparierunterlage (evtl. mit Papiertüchern abgedeckt) und Befestigungsmaterial
70% Ethanol
Podozyten Medium, 10-50 ml, je nach Anzahl der Tiere
Sterilisierte Zellsiebe aus Edelstahl (Firma Retsch): 100 µm, 75 µm, 50 µm, 36 µm
Isolationsmedium (Hams F12, 1% Penicillin / Streptomycin), etwa 400 ml
Beschichtungsmedium (1:1 Isolationsmedium / FCS), 10-15 ml
1 ml Spritze
Mehrere 50 ml Röhrchen (mindestens 2)
Petrischalen 10 cm, 15 cm (je mindestens 2, Anzahl variabel je nach Menge der Mäuse)
Mehrere serologische Pipetten
Zellkulturpumpe mit sterilen Pasteurpipetten
Sterile Zellschaber (evtl.)
Zellkulturgerätschaften (Sterilbank, Brutschrank, Mikroskop, 2 Wasserbäder, Zentrifuge)

Vorbereitungen

- Etwa eine halbe Stunde vor Beginn der Präparation alle Medien im Wasserbad der Zellkultur auf 37 °C erwärmen. 45 ml des Isolationsmediums unter der Sterilbank in ein 50 ml Röhrchen abfüllen und im zweiten Wasserbad, neben dem Präparierplatz, auf 37 °C erwärmen.
- Präparierplatz vorbereiten und mit Papiertüchern abdecken. Befestigungsmaterial bereitlegen, autoklaviertes OP-Besteck bereitlegen.
- Desinfektion von Präparierplatz und OP-Besteck mit 70% Ethanol.

Präparation der Nieren

- Jungtiere in einer Box holen und in ein Becherglas mit Isofluran getränkten Papiertüchern (ca. 500 µl Isofluran aufträufeln) umsetzen. Becherglas mit Alufolie abdecken und ca. 3 Minuten auf den Tod der Tiere warten.
- Die Jungtiere aus der Box nehmen und gut mit 70% Ethanol einsprühen. Die Köpfe abschneiden.
- Schwanzspitzen entfernen und für spätere Nachgenotypisierung einfrieren.
- Nun die Mäuse mit beiden Händen dorsal greifen und das noch sehr weiche Fell so aufreißen, dass eine Hälfte Richtung caudal, die andere cranial abgezogen werden kann (Abbildung 20).

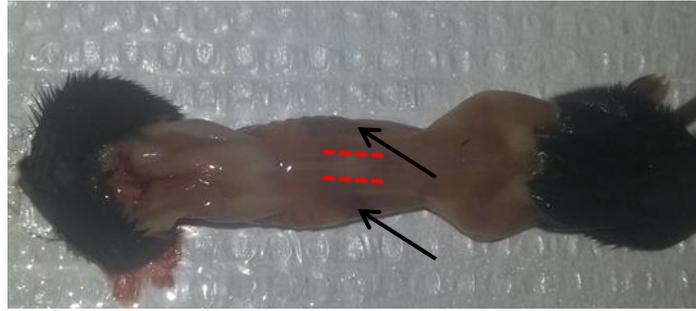


Abbildung 20: Jungtier nach Eröffnung der Haut.

Die zwei schwarzen Pfeile zeigen die beiden rötlich durchscheinenden Nieren links und rechts der Wirbelsäule. Die zwei roten Striche zeigen die Schnittrichtung.

- Nun kann die Maus am Präparierplatz befestigt werden. Man sieht bereits dorsal die beiden Nieren rötlich durchschimmern (schwarze Pfeile, Abbildung 20).
- Mit der Schere die Schnitte (ca. 1 cm lang) nun jeweils neben den Nieren, entlang der Wirbelsäule, ansetzen (rote Linien, Abbildung 20).
- Mit der Pinzette gegen das umliegende Gewebe drücken, so dass die Nieren durch die Öffnung nach außen treten. Die Nierengefäße sind noch sehr filigran und reißen beim Herausnehmen ab.
- Sofern die Organhaut sowie Reste von umliegendem Gewebe und Fett noch am Organ anhaften, diese mit der Schere (für innen) entfernen. Anschließend mit der Pinzette die Niere der Länge nach, seitlich etwas zusammendrücken, wodurch der Ureter nach außen gewölbt wird und mit der Schere (für innen) entfernt werden kann.
- Niere umgehend in das Röhrchen mit warmem Isoliermedium geben. Die Aufbewahrung im Wasserbad (nicht länger als 30 Minuten), bis alle Tiere präpariert sind ist empfehlenswert.

Präparation der Glomeruli

- Das Röhrchen mit den Nieren vom Wasserbad am Präparierplatz in das Wasserbad der Zellkultur bringen.
- Die sterilen Siebe unter der Sterilbank auspacken und mit warmem Beschichtungsmedium so lange auf jeweils beiden Seiten beschichten, bis alle Poren benetzt sind. Den Siebturm von unten nach oben wie folgt aufbauen: Auffangschale, 36 μm , 50 μm , 75 μm , 100 μm .
- Die Nieren auf das oberste Sieb kippen und mittels Stempel der Spritze durch das oberste Sieb reiben. Dabei das Sieb mehrmals mit mindestens 10 ml Isoliermedium nachspülen, bis nur noch wenig weiße Gewebsreste zu sehen sind.

- Durch mehrmaliges auf- und abbewegen (ca. 100 x) des obersten Siebes Unterdruck erzeugen und das Gewebe zusätzlich durch das Sieb saugen, anschließend erneut mit ca. 10 ml Medium nachspülen.
- Vorherigen Schritt mindestens 1 x wiederholen.
- Für die beiden folgenden Siebe (75 µm, 50 µm) ebenso verfahren, allerdings nicht mehr mit dem Spritzenstempel drücken. Zwischendurch durchgespültes Medium abpumpen.
- Nun befinden sich alle Glomeruli auf dem untersten Sieb.
- Das Sieb umdrehen und mit einer Pipette ca. 100 ml Isolationsmedium kraftvoll in eine 15 cm Petrischale spülen.
- Gesamtes Medium von der Petrischale erneut aufnehmen und auf zwei 50 ml Röhrchen verteilen, dabei die Schale mehrmals nachspülen um alle Glomeruli zu erhalten. Bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugieren.

Cave: In der leeren Schale haften trotz Nachspülung diverse Glomeruli am Boden und können mit Podozytenmedium kultiviert werden. Es müssen jedoch am nächsten Tag unter dem Mikroskop die Tubuli mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt werden. Außerdem können dabei die wenigen Glomeruli mit Umhüllung entfernt werden, da ansonsten auch PEC-Zellen auswachsen könnten.

- Das Isoliermedium nach der Zentrifugation bis auf ein paar Milliliter vorsichtig absaugen, den Rest in Podozytenmedium aufnehmen, gut resuspendieren und in einer Petrischale aussäen.
- Mindestens zwei Tage unberührt im Inkubator kultivieren, dann etwa 3 ml Frischmedium zugeben. Erste Podozyten wachsen aus dem Glomerulus aus (Abbildung 21 a).
- Alle 2-3 Tage Medium wechseln, bis die Petrischale zu 70% konfluent ist, dann können die Zellen gesplittet und für Versuche ausgesät werden. Die typischen Fußfortsätze zeigen sich erst ab Passage # 1 (Abbildung 21 b). Um die empfindlichen Podozytenfortsätze zu schonen kann statt Trypsin auch Accutase zur Ablösung verwendet werden.

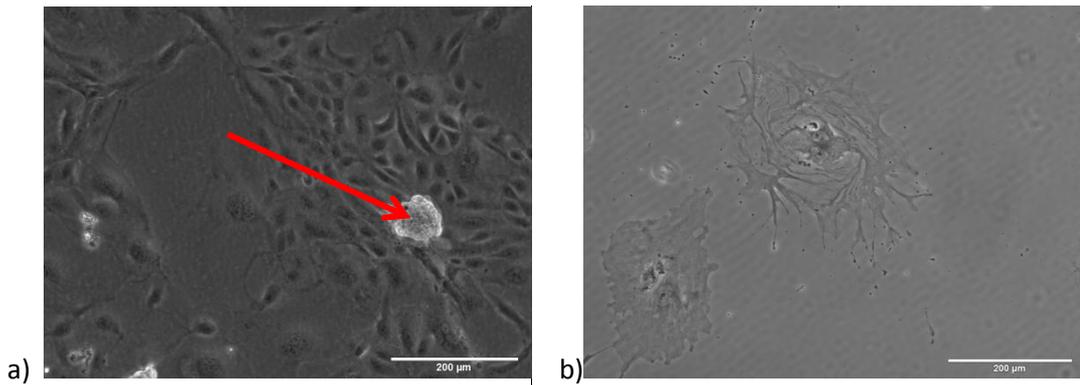


Abbildung 21: Podozyten im Phasenkontrastmikroskop.

a) Glomerulus (roter Pfeil), aus dem pflastersteinförmige Podozyten der Passage # 0 auswachsen.
 b) Podozyten der Passage # 1 mit sichtbaren Fußfortsätzen.

- Die Siebe anschließend mit Handseife und klarem VE-Wasser spülen. Eventuell in regelmäßigen Abständen zusätzlich in der Spülmaschine und im Ultraschallbad reinigen.

2.2.17 Mesangialzell-Isolation

Zur Mesangialzell-Isolation stehen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Wie bei der Podozyten-Isolation müssen zuerst Glomeruli isoliert werden, aus denen Mesangialzellen auswachsen können. Allerdings werden zur Mesangialzell-Isolation keine Jungtiere benötigt, da Mesangialzellen auch in älteren Mäusen noch proliferieren können.

Methode eins: Glomeruli mit Sieben, analog zur Podozyten-Isolation isolieren. Diese Methode ist sehr einfach, liefert jedoch nur wenig Glomeruli. Zudem ist die erhaltene Glomeruli-Suspension stark mit anderen Nierenbestandteilen, wie Tubuli, verunreinigt.

Die schwierigere und teurere zweite Methode der ex-vivo-Perfusion liefert hingegen eine äußerst große Anzahl von Glomeruli, die kaum bis gar nicht verunreinigt sind.

Tabelle 53: Material zur Mesangialzellisolierung durch ex-vivo-Perfusion

Mindestens 1 Maus, am besten männlich (größere Gefäße) im Alter von 5-8 Wochen (wenig Bauchfett)
„Dynabeads M450 tosylactivated“, 0,45 µm, 10 ml (Invitrogen)
Magnetischer Separator (Abbildung 23 a)
Mehrere Zellsiebe 100 µm (Kunststoff, einmal verwendbar)
PBS + PS (am besten mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺) (eiskalt) [Statt PBS kann auch HBSS verwendet werden]
Collagenase 1A oder D [1 mg / ml] in PBS
Mehrere 1 ml Spritzen
30G Nadeln
OP-Besteck inkl. Pinzette mit Vertiefung für Gefäßaufnahme
Federschere
Petrischalen
Mehrere Röhrchen 50 ml und 15 ml
Mehrere 1,5 ml Reaktionsgefäße
Zelkultur inkl. Pipetten etc.
Mesangialzellmedium 20% FCS, Mesangialzellmedium 10% FCS
Binokular
6-Lochplatten
Eis
70% Ethanol
Skalpell

„Bead“-Vorbereitung

- Die magnetischen „Beads“ unter der Sterilwerkbank gut resuspendieren (schütteln und vortexen).
- 150-200 µl „Dynabead“-Suspension in ein 1,5 ml Gefäß geben, an den Magneten hängen und mindestens 1 Minute warten.
- Zum Waschen die Lösung vorsichtig abnehmen, während das Gefäß am Magnet hängt und durch 1 ml PBS ersetzen. Das Gefäß vom Magneten nehmen und schütteln. Anschließend wieder an den Magneten hängen und 1 Minute warten.
- 2 weitere Male waschen.
- Die „Dynabeads“ in 10 ml eiskaltem PBS+PS aufnehmen, gut resuspendieren und vorübergehend auf Eis lagern (Kann dann mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden).

Weitere Vorbereitungen

- Mesangialzellmedium mit 20% FCS bei 37 °C warm stellen (Ca. 1 ml davor abnehmen und auf Eis stecken).

Cave: Ab hier stets auf Eis arbeiten (außer während der Präparation und der Binokular-Phase).

- Pro Maus ein 50 ml Röhrchen mit eiskaltem PBS + PS in das Eis stecken.
- Bead-Lösung erneut resuspendieren und genau wie mehrere 1 ml Spritzen sowie mehrere 30 G Nadeln auf Eis legen.
- Präparierplatz vorbereiten, autoklaviertes Besteck auspacken, bereitlegen und mit 70% Ethanol absprühen.
- Petrischale mit eiskaltem PBS + PS füllen und auf Eis legen.

Präparation und Perfusion

Cave: Stets sehr sauber arbeiten und alle Gegenstände, sowie die Mäuse (nach Tötung) mit 70% Ethanol absprühen.

- Maus durch Genickbruch töten und mit der ventralen Seite nach oben auf dem Präparierplatz befestigen.
- Maus gut mit 70% Ethanol absprühen.
- Mit einer großen Schere den Bauchraum öffnen, dabei zuerst das Fell, dann die Unterhaut von den Geschlechtsorganen, mittig Richtung cranial, schneiden bis die Mitte des Brustkorbes erreicht ist.
- Die Hautschichten seitlich abspreizen und auf dem Präparierplatz befestigen.
- Falls nicht bereits geschehen, den Eingeweidesack mit einer zweiten Schere eröffnen.
- Nun werden alle Därme, sowie Magen und Leber nach cranial weggehoben. Der Enddarm wird dazu mit der Schere (für außen), nahe des Anus, durchgeschnitten.
- Dadurch werden die Nieren, ähnlich Abbildung 22, sichtbar. Gegebenenfalls muss zuvor vorsichtig etwas Fett beseitigt werden.
- Nun mit einer Pinzette (mit Vertiefung für Gefäßaufnahme) die Nierenarterie, sowie die Nierenvene gleichzeitig umfassen (grüne Klammer in Abbildung 22) und leicht anheben.
- Mit einer sterilen Nagelschere nun die beiden Gefäße, caudal der grünen Klammer entlang der hellblauen Linie 1, durchtrennen und die Pinzette danach etwas weiter anheben.
- Mit der Nagelschere kann dann zwischen den Gefäßen und der Wirbelsäule sowie unter den Nieren entlanggeschnitten werden, so dass der Verbund lediglich am cranialen Ende mit dem Körper verbunden bleibt.
- Den gesamten Verbund, entlang der hellblauen Linie 2 durchschneiden und heraustrennen. Dabei stets mit der Pinzette (mit Gewebsaufnahme) festhalten.
- Den Verbund umgehend in die Petrischale mit dem eiskalten PBS + PS legen und vorerst auf Eis behalten. Der Verbund muss komplett von Flüssigkeit bedeckt sein.

- Nun den Verbund umdrehen, so dass die vorherige sichtbare Seite dann auf dem Boden der Petrischale aufliegt und die Seite, die zuvor der Wirbelsäule auflag, nun sichtbar ist. (Dadurch wird die Aorta das erste Gefäß, auf das man bei der Präparation stößt.)
- Nun unter dem Binokular arbeiten, wenn möglich weiterhin auf Eis. Wenn nicht möglich, möglichst zügig (< 30 Minuten) arbeiten.
- Fett- und Muskelreste vorsichtig mit einer Pinzette und einer feinen Scheren abzupfen, bis die Arterie sichtbar ist. (Oft sind Arterie und Vene schlecht voneinander zu unterscheiden. Die Arterie hat einen kleineren Durchmesser, ist jedoch muskulöser. Die Vene ist meist ein nicht muskulöser Schlauch. Oft befinden sich auch Blutreste in der Vene, wodurch diese leicht von der Arterie zu unterscheiden ist.)
- Mit der Pinzette gestockte Blutreste bestmöglich aus den Gefäßen entfernen.
- Eventuell das kalte PBS + PS in der Petrischale durch frisches ersetzen, wenn viel Blut und Fett die Sicht versperren.
- Nun die Arterie entlang der gelben Linie (Abbildung 22) eröffnen. Dazu schrittweise mit einer sehr feinen Federschere kleine, vorsichtige Schnitte ansetzen.
- Nach Öffnung die Arterie aufklappen. Nun sieht man mehrere, abgehende, kleinere Arterien von denen die größten (links und rechts) zu den Nieren führen (in Abbildung 22 werden nur diese gezeigt).

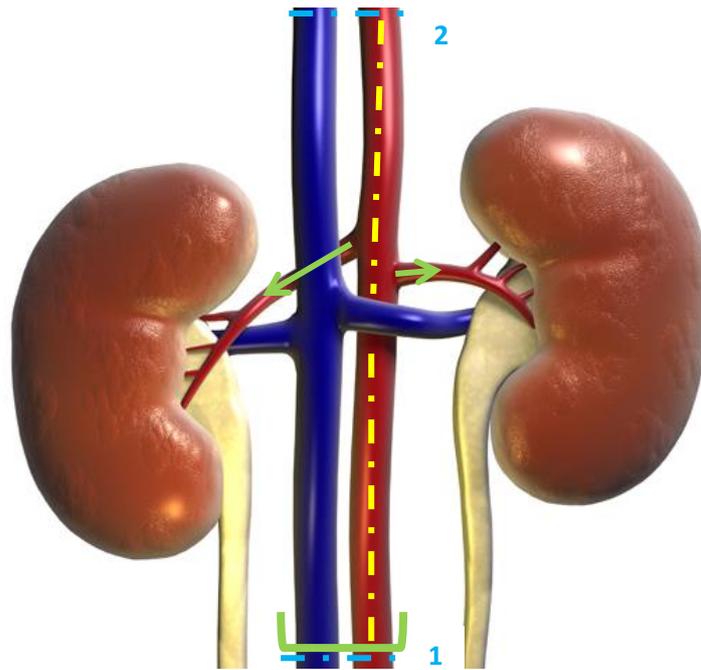


Abbildung 22: Herausgetrennter Nierenverbund vor der Wendung.

Nierenverbund von ventral nach Herausnahme aus der Maus, bevor er gewendet wird. Die grüne Klammer zeigt den Bereich an dem die Pinzette mit Gefäßaufnahme angesetzt wird. Die hellblauen, nummerierten Linien zeigen die beiden Schnitte zum Heraustrennen des Verbundes. In gelben Strichen werden die Schnitte der Arterieneröffnung angezeigt. Die grünen Pfeile zeigen die späteren Perfusionsrichtungen an (verändert nach www.medicalgraphics.de).

- Nun die Beads erneut resuspendieren und eine 1 ml Spritze damit füllen. Die 30G Nadel etwas abknicken und die Spitze an einer sterilen Stelle eventuell etwas stumpf wetzen, damit die Gefäße nicht durchstoßen werden.
- Luft aus der Spritze und der Nadel entfernen.
- Nun entlang der grünen Pfeile (Abbildung 22) je Niere 1 ml „Dynabead“-Lösung perfundieren. Dabei den Verbund mit einer Pinzette festhalten. Die Perfusion mit hohem Druck und relativ rasch ausführen. Die Perfusion hat geklappt, wenn einerseits Blut aus den Venen tritt, andererseits die Niere hell bis weiß wird. Nun stecken die Beads vor und in den Glomeruli fest. (Sammeln sich die Beads außerhalb der Niere, hat geronnenes Blut die Arterien verstopft. Eine Perfusion ist dann in der Regel nicht mehr möglich.)
- Nach Perfusion beider Nieren jegliche Gewebsreste (samt Organhaut) entfernen. Dabei die Nieren mit den Fingern (Handschuhe zuvor mit 70% Ethanol absprühen) leicht drücken und abwischen. Zum Schluss Reste am Ureteransatz mit einer feinen Schere entfernen.
- Die Nieren können dann in einer weiteren Petrischale mit PBS + PS auf Eis gelagert und bis zu 3 weitere Mäuse präpariert und perfundiert werden.
- Anschließend die Nieren mit einem Skalpell in einer Petrischale etwas zerkleinern (Würfel von 1-2 mm³) und für 30 Minuten bei 37 °C mit der Collagenase verdauen.

Glomerulipräparation

- Von nun an wird unter der Sterilbank gearbeitet. Dabei wird weiterhin auf Eis präpariert.
- Ein 50 ml Röhrchen ins Eis stecken und ein 100 µm Zellsieb (Kunststoff, einmalig verwendbar) aufsetzen.
- Die Überreste des Collagenaseverdaus auf dem Sieb platzieren und mit Hilfe eines Spritzenstempels durch das Sieb passieren. Dabei mehrmals mit eiskaltem PBS + PS nachspülen, bis alles durchpassiert ist (eventuell bleiben wenige weiße Zellreste zurück).
- Die Suspension mit einer 10 ml Pipette aufsaugen und mit Druck (aufgesetzt), durch ein neues 100 µm Zellsieb, in ein weiteres 50 ml Röhrchen pressen. Dabei mehrmals die Position auf dem Sieb verändern.
- Bei 1200 rpm und 4 °C für 5 Minuten in einer Zellkulturzentrifuge abzentrifugieren.
- Überstand vorsichtig verwerfen.
- Das Pellet mit einer Pipette in 1 ml Medium pro Niere resuspendieren und umgehend zurück ins Eis stecken (nicht vortexen).

Magnetische Separation

Bei der magnetischen Separation werden die Beads in den Glomeruli am Separator (Abbildung 23 a) angereichert. Alle anderen Bestandteile der Suspension werden gewaschen, wodurch eine sehr reine Glomerulisuspension gewonnen werden kann.

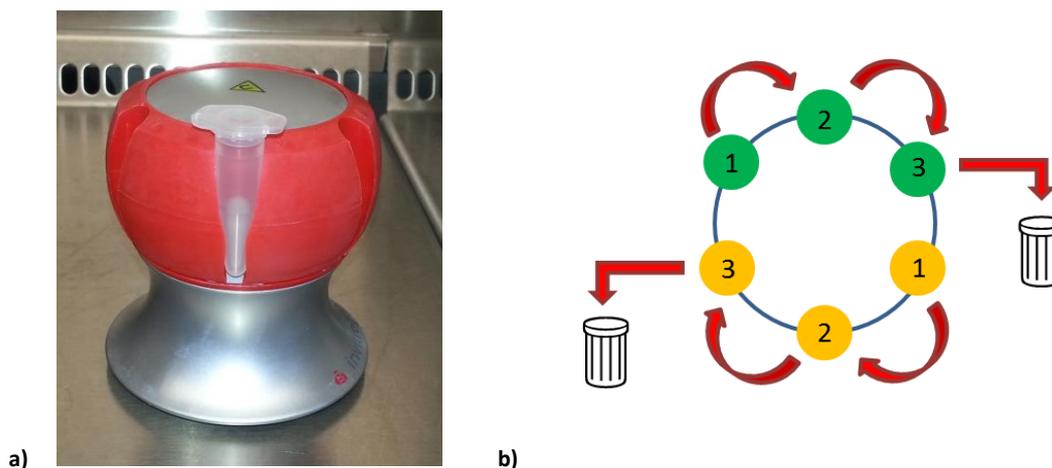


Abbildung 23: a) Separator, b) Pipettierschema zur magnetischen Separation.

a) Separator bei dem einer der 6 Steckplätze mit einem 1,5 ml Gefäß besetzt ist. b) Pipettierschema zur magnetischen Separation. Die Suspension wird von den Steckplätzen 1 in die Steckplätze 2, von dort in die Steckplätze 3 pipettiert.

- Stets auf Eis arbeiten.
- Alle 6 Steckplätze des Separators mit frischen 1,5 ml Gefäßen bestücken.
- Die Glomerulisuspension erneut mit einer Pipette resuspendieren und ca. 500-700 µl in Steckplatz 1 pipettieren. Den Rest der Suspension erneut auf Eis lagern.
- Den Separator leicht in alle Richtungen schütteln und anschließend 1 Minute ruhig stehen lassen. Die „Dynabeads“ und Glomeruli sammeln sich nun am Magneten an.
- Nach 1 Minute den Überstand am äußeren Gefäßrand vorsichtig absaugen und in Steckplatz 2 pipettieren (Bereits jetzt sollten „Dynabeads“ an der Magnetseite des Steckplatzes 1 erkennbar sein.).
- Umgehend 1 ml kaltes PBS + PS in Steckplatz 1 pipettieren (verhindert Austrocknung der Glomeruli und ist zugleich der erste Waschschrift).
- Zum Waschen die rote Steckplatzhalterung samt Gefäßen vom Separator trennen und in alle Richtungen schütteln. Dann wieder aufsetzen, ein weiteres Mal schütteln und 1 Minute warten.
- Den Überstand von Steckplatz 2 am äußeren Gefäßrand vorsichtig absaugen und in Steckplatz 3 pipettieren. Den Waschüberstand aus Platz 1 in Steckplatz 2 geben. Platz 1 mit 1 ml frischem, kalten PBS + PS versorgen.
- Erneut waschen.
- Den Überstand von Steckplatz 3 am äußeren Gefäßrand vorsichtig absaugen und werfen (er sollte nun keine „Dynabeads“ mehr enthalten). Den Waschüberstand aus Platz 2 in Steckplatz 3 geben. Den Überstand aus Platz 1 in Steckplatz 2 pipettieren und Platz 1 mit 1 ml frischem, kalten PBS + PS versorgen.
- Ein drittes Mal waschen.
- Bei hohen Reinheitsanforderungen analog zu den vorherigen Schritten einen weiteren Waschschrift anfügen.
- 1 Minute warten.
- Nun die Waschüberstände aus allen Gefäßen werfen und die „Dynabeads“ / Glomeruli Mischung in 30 µl kaltem Mesangialzellmedium + 20% FCS aufnehmen und resuspendieren.
- Je nach Menge der Lösung können 5-10 µl entnommen und auf einen Objektträger pipettiert werden. So kann unter dem Mikroskop die Reinheit und Anzahl der gewonnenen Glomeruli überprüft werden (Abbildung 24 a). Den Rest der Suspension zurück auf Eis stecken.

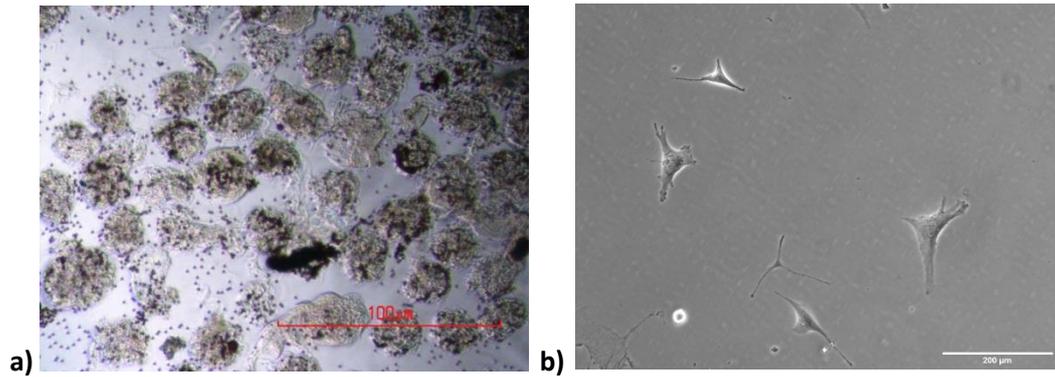


Abbildung 24: a) Glomeruli nach der Isolation mit „Dynabeads“, b) Mesangialzellen wt # 6.

a) Es handelt sich um eine sehr reine „Dynabeads“ (kleine Punkte) / Glomeruli-Mischung, ohne erkennbare Verunreinigung durch Tubuli. b) WT Mesangialzellen in Medium nach Passage # 6. Der Maßstab in Abbildung 24 b entspricht 200 µm.

Kultivierung

- Die Glomeruli anschließend in 6-Lochplatten aussäen. Dazu gut in warmem Mesangialzellmedium + 20% FCS resuspendieren. Je Niere 1-1,5 Löcher mit je 2 ml Medium versehen und in den Brutschrank stellen.
- 2-3 Tage unberührt stehen lassen, dann ca. 1 ml Frischmedium zupipettieren.
- Weitere 2 Tage unberührt stehen lassen. Unter dem Mikroskop sollten bereits angewachsene Glomeruli und daraus auswachsende Zellen erkennbar sein.
- Medium 2 x die Woche erneuern, bis die Zellen ca. 70-80% konfluent sind. Dann 1:2 in neue Petrischalen aufteilen.
- Nach Passage # 5 auf das Mesangialzellmedium mit 10% FCS umstellen.

Cave: Die Mesangialzellen nach Passage # 12 nicht mehr für Versuche verwenden.

2.2.18 Immunzytochemie

Während einer Immunzytochemie werden Zellen fixiert und Proteine durch Fluoreszenzfärbung nachgewiesen. Dies geschieht mit Hilfe eines Erstantikörpers der gegen das Zielprotein gerichtet ist und einem Zweitantikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrom) konjugiert wurde und gegen den Fc-Teil des Erstantikörper gerichtet ist. Je nach Antikörper und nachzuweisenden Proteinen sind unterschiedliche Fixierungsmethoden nötig. Die Methoden mit Methanol bzw. Formaldehyd werden in Abschnitt 2.2.19 und 2.2.21 näher erläutert.

Tabelle 54: Material zur Durchführung der Immunfluoreszenz

Zellen auf Deckgläsern (in 6-Lochplatten)
Ziegenserum oder BSA
1. und 2. Antikörper (2. Antikörper mit Farbstoff gekoppelt)
„Mountingmedium“
Nagellack
Methanol oder Formaldehyd 3,7%
PBS
Folie („Parafilm“)
Pinzette
Triton X-100
Hoechst 33342 oder DAPI

- Fixierung der Zellen wie in Abschnitt 2.2.19 oder 2.2.21 beschrieben.
- 60 Minuten bei RT blocken. Dazu entweder 3% BSA in PBS + 0,3% Triton X-100 oder 5% Ziegenserum in PBS + 0,3% Triton X-100 verwenden (Ziegenserum wird verwendet, weil der 2. Antikörper oft aus der Ziege stammt).
- Währenddessen den 1. Antikörper laut Herstellerangaben in 1% BSA in PBS + 0,3% Triton X-100 verdünnen (50 µl pro Deckgläschen).
- 50 µl Antikörperlösung (je Deckglas) auf eine Folie („Parafilm“) tropfen, der in einer Petrischale ausgestrichen wurde.
- Deckglas mit der Zellseite auf den Tropfen legen.
- Bei 4 °C über Nacht inkubieren.
- 3 x 5 Minuten in PBS waschen.
- Währenddessen den 2. Antikörper (Fluorochrom konjugiert) laut Herstellerangaben in 1% BSA in PBS + 0,3% Triton X-100 verdünnen (50 µl pro Deckgläschen).
- 50 µl Antikörperlösung (je Deckglas) auf eine Folie („Parafilm“) tropfen, der in einer Petrischale ausgestrichen wurde.
- Deckglas mit der Zellseite auf den Tropfen legen.
- 2 h bei RT im Dunkeln inkubieren.
- 3 x 5 Minuten in PBS waschen.

Anfärbung der Zellkerne

- Verdünnen von Hoechst 33342 1:5000 in PBS (Lagerung der Hoechst-Lösung im Dunkeln bei 4 °C für mehrere Tage möglich).
- Pipettieren von 50 µl Hoechst-Lösung (je Deckglas) auf eine Folie („Parafilm“), die in einer Petrischale ausgestrichen wurde.

- Platzieren der Deckgläser mit der Zellseite auf dem Tropfen.
- 15-30 Minuten bei RT in einer dunklen, feuchten Kammer inkubieren.
- 2 x mit PBS waschen.

Konservierung

- Die Deckgläser 1 x mit Millipore Wasser waschen.
- In der Zwischenzeit einen Tropfen „Mountingmedium“ auf einem Objektträger platzieren und jegliche Luftblasen mit einer Nadel zerstören.
- Die Deckgläser aus dem Wasser entfernen und die Ränder mit einem fusselfreien Tuch abtupfen um Restwasser zu entfernen.
- Die Deckgläser mit der Zellseite auf dem „Mountingmedium“ platzieren.
- Überschüssiges Medium mit einem fusselfreien Tuch abtupfen.
- Die Deckgläser mit klarem Nagellack umranden, um sie vor Austrocknung zu schützen.
- Dunkel und kühl lagern, anschließend baldmöglichst am Fluoreszenzmikroskop auswerten.

2.2.19 TUNEL Apoptose Assay

Der Begriff TUNEL steht für „TdT-(terminal deoxynucleotidyl transferase)-dUTP nick end labeling“. Die Methode basiert auf der Inkorporation modifizierter dUTPs durch das Enzym Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) an den 3'OH-Enden von DNA-Bruchstücken. Diese Bruchstücke entstehen während der Apoptose der Zellen. Der verwendete „Click-iT® TUNEL Alexa Fluor®“-„Assay“ der Firma „Life Technologies“ verwendet dabei dUTPs, welche mit Alkinen markiert wurden. Diese werden anschließend durch eine Kupfer-katalysierte Click-Reaktion zwischen Alkin und Azid nachgewiesen. Das Azid ist dabei an einen Alexa Fluor®488-Farbstoff gekoppelt. Auf diesem Weg können dsDNA-Brüche mittels Exzitationsmessung der Alexa 488 Fluorophore, bei einer Wellenlänge von 495 nm nachgewiesen werden. Die Durchführung der Methode wird in Abbildung 25 erläutert (www.invitrogen.com).

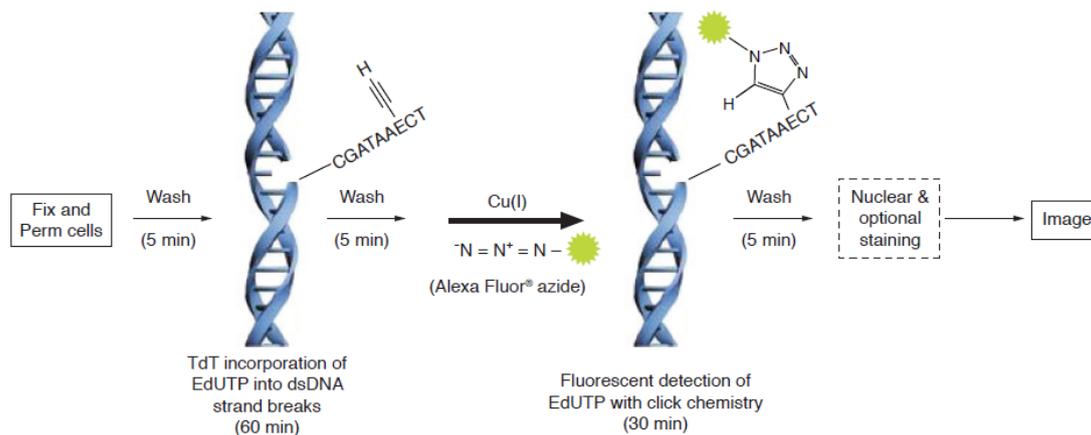


Abbildung 25: Detektion der Apoptose mittels "Click-it TUNEL Alexa Fluor 488-Assay".

(Abbildung www.invitrogen.com).

Tabelle 55: Material zur Durchführung des „TUNEL-Assays“

Zellen auf Deckgläsern in 6-Lochplatten (50-70% konfluent)
Methanol
PBST und PBS
Millipore Wasser
„TUNEL Assay-Kit“ (Invitrogen) (DNase I (Reagenz G), DNase I Puffer (Reagenz H), TdT Reaktions Puffer (Reagenz A), EdUTP (Reagenz B), TdT (Reagenz C), Click-it Puffer (Reagenz D), Click-it Puffer Additive (Reagenz E), Hoechst 33342 Lösung (1:1000) (Reagenz F)
3% BSA / PBS
Objekträger
„Mountigmedium“ und Nagellack
Folie („Parafilm“)
Nadel
Pinzette
Fusselreie Tücher

Methanolfixierung und Permeabilisierung

- Medium absaugen und Zellen 2 x mit warmen PBS waschen.
- In 100% eiskaltem Methanol fixieren und permeabilisieren. Dazu etwa 1 ml pro Loch zugeben und mindestens 5 Minuten bei -20 °C inkubieren.
- Die Hälfte des Methanols absaugen und vorsichtig durch kaltes PBS ersetzen.
- 2 x mit 2 ml PBS waschen um das restliche Methanol zu entfernen.
- So können die Zellen bis zu 1 Woche im Kühlraum bei 4 °C gelagert werden.

Positivkontrolle

- Nach der Fixierung die Glasplättchen 1 x mit Millipore-Wasser waschen.
- Vorbereiten der DNase I-Lösung analog Tabelle 56.

Tabelle 56: DNase I-Lösung (Positivkontrolle) für 2 Deckgläschen

Komponente	Menge
Millipore Wasser	89 µl
DNase I Puffer	10 µl
DNase I (1U / µl)	1 µl
Gesamtvolumen	100 µl

- Pipettieren von 50 µl der DNase I-Lösung auf eine Folie („Parafilm“), die zuvor in einer Petrischale glattgestrichen wurde.
- Platzieren der Deckgläschen mit der Zellseite auf der DNase I-Lösung.
- Inkubation für 30 Minuten bei RT.
- 1 x mit Millipore-Wasser waschen.

TdT Reaktion

- Pipettieren von 50 µl TdT Reaktions Puffer (je Deckgläschen) auf eine Folie („Parafilm“), die zuvor in einer Petrischale ausgestrichen wurde.
- Deckgläschen mit der Zellseite auf dem Tropfen platzieren.
- 10 Minuten bei RT inkubieren.
- Die Deckgläschen mit einer Pinzette aufnehmen und seitlich an ein fusselfreies Tuch tupfen um den überschüssigen Puffer abzusaugen.
- Herstellen des TdT-Reaktionsgemisches analog Tabelle 57.

Tabelle 57: TdT-Reaktionsgemisch für 2 Deckgläschen

Komponente	Menge
TdT Reaktions Puffer	94 µl
EdUTP	2 µl
TdT	4 µl
Gesamtvolumen	100 µl

- Pipettieren von 50 µl TdT Reaktionsgemisch (je Deckgläschen) auf eine Folie („Parafilm“), die in einer Petrischale ausgestrichen wurde.

- Platzieren des Deckgläschens mit der Zellseite auf dem Tropfen.
- 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten, dunklen Kammer inkubieren.
- Waschen der Deckgläser für 2 x 2 Minuten mit 3% BSA / PBS.

„Click-it“ Reaktion

- Herstellen des „Click-it“ Reaktionsgemisches analog Tabelle 58.

Cave: Verwendung innerhalb von 15 Minuten zwingend erforderlich.

Tabelle 58: „Click-it“ Reaktionsgemisch für 2 Deckgläschen

Komponente	Menge
„Click-it“ Reaktions-Puffer	97,5 µl
„Click-it“ Reaktions-Puffer Additiv	2,5 µl
Gesamtvolumen	100 µl

- Pipettieren von 50 µl „Click-it“ Reaktionsgemisch auf eine Folie („Parafilm“), die zuvor in einer Petrischale ausgestrichen wurde.
- Platzieren der Deckgläser mit der Zellseite auf dem Tropfen.
- 30 Minuten bei RT in einer dunklen, feuchten Kammer inkubieren.
- 5 Minuten mit 3% BSA / PBS waschen.
- DNA-Färbung wie unter 2.2.18 beschrieben durchführen.
- Glasplättchen wie unter 2.2.18 beschrieben aufkleben.

2.2.20 EdU-Inkorporation zur Quantifizierung der DNA-Synthese

Der „EdU-DNA-Synthese-Assay“ wird oft fälschlicherweise als „Proliferations-Assay“ betitelt, es wird jedoch lediglich die DNA-Synthese quantifiziert, die nicht unbedingt mit der Proliferationsrate der Zellen identisch sein muss.

Zellen werden in der S-Phase identifiziert, indem 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) während der Replikation in das Chromatin inkorporiert wird. EdU ist ein Thymidin Analogon, das während der DNA-Synthese anstelle des Originals eingebaut wird. Durch eine Kupfer-abhängige Click-Reaktion wird die Ethynyl-Gruppe von EdU kovalent an ein kleines fluoreszierendes Azid gekoppelt. Der Vorteil gegenüber der BrdU-Methode liegt darin, dass die Reaktionskomponenten allesamt sehr klein sind, weshalb keine chemische oder enzymatische Zerstörung der DNA-Helix nötig ist. Bei der älteren BrdU-Methode muss die Helixstruktur aufgebrochen werden um den Zugang der Antikörper zum

BrdU zu ermöglichen, wodurch die DNA-Helix und viele zelluläre Antikörperepitope zerstört werden (Buck et al. 2008). Der Vorgang der EdU-Click-Reaktion wird in Abbildung 26 erneut erläutert.

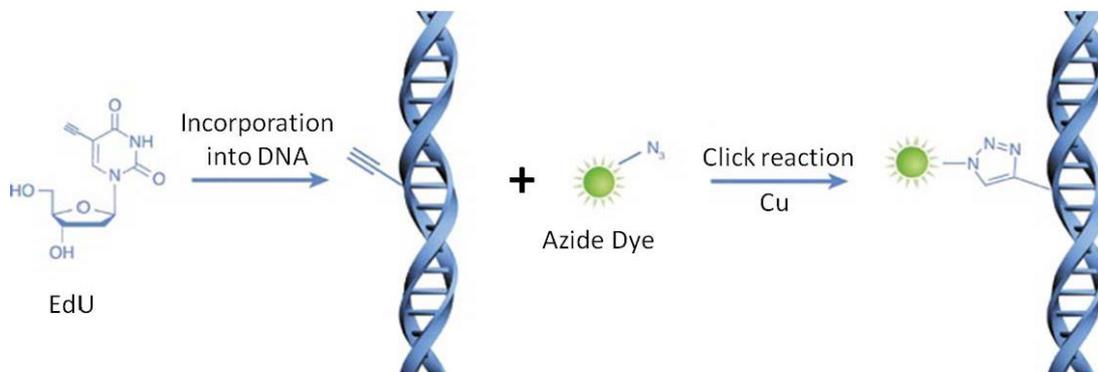


Abbildung 26: Nachweis der DNA-Synthese mittels EdU-Click-Reaktion.

Eine Kupfer-abhängige Click-Reaktion ermöglicht die Bindung der Alkyngruppe des EdUs an das fluoreszierende Azid (verändert nach Buck et al. 2008).

Tabelle 59: Material zur EdU-DNA-Synthese-Messung

Zellen auf Deckgläsern in 6-Lochplatten (50-70% konfluent)
Passendes Kulturmedium
Methanol
PBST und PBS
Millipore Wasser
EdU-Stock-Lösung (10 mM)
Reaktionscocktail
1,5 ml Reaktionsgefäße
Objektträger
3% BSA / PBS
Hoechst 33342 1:1000
„Mountingmedium“ und Nagellack
Folie („Parafilm“)
Nadel
Pinzette
fusselfreie Tücher

EdU Inkorporation

- Die passende Menge an EdU-Stocklösung zum Medium der Zellen geben um eine finale Konzentration von 10 μ M zu erreichen.
- Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ in einem handelsüblichen Zellkultur-Inkubator.

Methanolfixierung und Permeabilisierung

Die Fixierung und Permeabilisierung analog zum Abschnitt 2.2.19 durchführen.

EdU Detektion

- Inkubation der Deckgläschen für 1 h in einer 3% BSA / PBS-Blockier-Lösung.
- Vorbereitung des „Click-it“-Reaktionscocktails analog Tabelle 60.

Tabelle 60: EdU „Click-it“- Reaktionscocktail

Komponente	Menge	Konzentration
Tris / HCl-Puffer (1 M, pH 7)	10 µl	0,1 M
CuSO ₄ (100 mM)	4 µl	4 mM
Natriumascorbat (1 M)	5 µl	50 mM
Azid Farbstoff (10 mM)	0,2 µl	0,02 mM
bidest. Wasser	80 µl	

- Pipettieren von 50 µl „Click-it“ Reaktionscocktail (je Deckglas) auf eine Folie („Parafilm“), die zuvor in einer Petrischale ausgestrichen wurde.
- Platzieren der Deckgläser mit der Zellseite auf dem Tropfen.
- Inkubation für 30 Minuten bei RT in einer dunklen, feuchten Kammer.

Anfärbung der Gesamt-DNA

Die Anfärbung der Gesamt-DNA sowie das Aufsetzen auf das Deckgläschen wird analog zum Abschnitt 2.2.18 durchgeführt.

2.2.21 Aktinfaser-Anfärbung

Polymerisiertes F-Aktin des Zellskelettes kann mit Hilfe des Pilzgiftes Phalloidin (Abbildung 27 b), welches an ein Fluorophor gekoppelt wurde, angefärbt werden. Das Toxin wurde ursprünglich vom Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*, Abbildung 27 a) isoliert. Phalloidin stabilisiert die Aktinfilamente, wodurch die Bewegung des Zellskelettes unterbunden wird. Verwendet man Fluoreszenz-konjugiertes Phalloidin, können die Aktinfilamente anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und analysiert werden (Sigma-Aldrich). Die Färbung wird analog dem Protokoll von Sigma-Aldrich P1951 durchgeführt.

Mit einer finalen Konzentration des Agonisten Angiotensin II von 100 μM wurde in einem weiteren Experiment versucht die Aktinpolymerisation anzuregen.

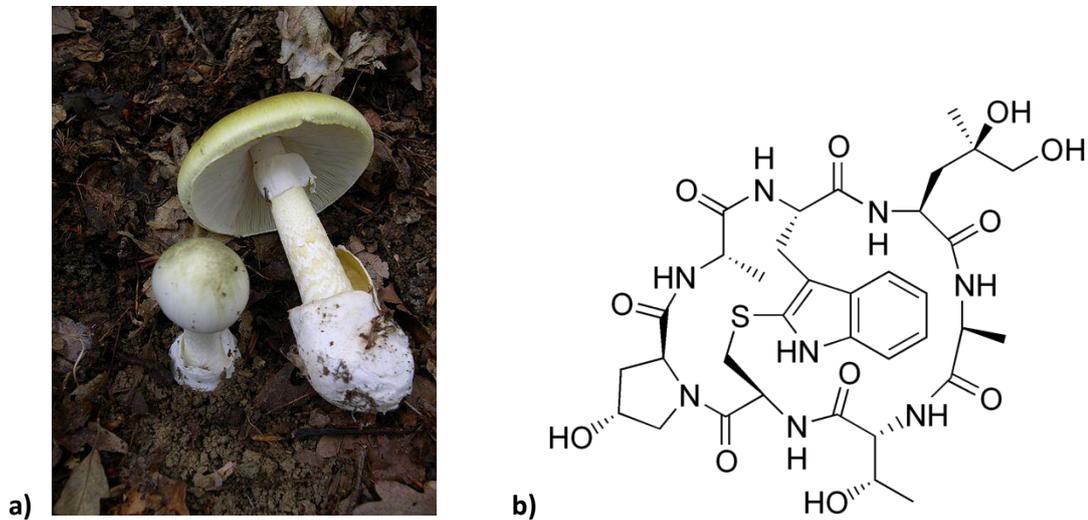


Abbildung 27: a) Knollenblätterpilz *Amanita Phalloides*, b) Phalloidin Strukturformel.

(Bilder aus www.wikipedia.com)

Tabelle 61: Material zur Aktinfaser-Anfärbung

Zellen auf Deckgläsern in 6-Lochplatten (50-70% konfluent)
Formaldehyd 3,7% in PBS frisch angesetzt
Triton X-100 (0,1%)
PBST und PBS
Millipore Wasser
Phalloidin-TRITC Stock-Lösung (1mg / ml) in Methanol
1,5 ml Reaktionsgefäße
Objektträger
Hoechst 33342 1:1000
„Mountingmedium“ und Nagellack
Folie („Parafilm“)
Nadel
Pinzette
Fusselfreie Tücher
Angiotensin II-Lösung [10 mM] \rightarrow finale Konzentration 100 μM

Vorbehandlung mit dem Agonisten Angiotensin II (optional)

Um die Hypothese zu überprüfen, ob Angiotensin II die Polymerisation des F-Aktins erhöht, wurden unter anderem Versuche gemacht, bei denen die Zellen zuvor in einem Angiotensin II-haltigen Medium inkubiert wurden.

- Die Zellen befinden sich auf Glasplättchen in 6-Lochplatten mit je 2 ml Medium (am besten vom Vortag).
- Zugabe von 20 µl Angiotensin II (10 mM) je Loch [final 100 µM].
- 15 Minuten Inkubation im Brutschrank.
- Fortfahren mit der Fixierung.

Formaldehydfixierung und Permeabilisierung

Die Fixierung und Permeabilisierung kann nicht mit Methanol durchgeführt werden, da ansonsten die Aktinstruktur zerstört wird. Aus diesem Grund wird mit frisch angesetztem 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert.

- Medium absaugen und Zellen 1 x mit warmem PBS waschen.
- Fixierung der Zellen für 5 Minuten in 1 ml 3,7% Formaldehyd.
- Absaugen der Hälfte des Formaldehyds und ersetzen mit PBST.
- 2 x mit PBST waschen.
- Permeabilisieren der Zellen für 1 Minute in 0,1% Triton X-100 in PBS.
- 2 x mit PBS waschen.

Phalloidinreaktion

- Verdünnung der Phalloidin-TRITC-Stocklösung in PBS zu einer 50 µg / ml Phalloidin-TRITC-Lösung.
- Pipettieren von 50 µl Phalloidin-TRITC-Lösung (je Deckglas) auf eine Folie („Parafilm“), die in einer Petrischale ausgestrichen wurde.
- Platzieren des Deckgläschens mit der Zellseite auf dem Tropfen.
- Inkubation für 40 Minuten bei RT in einer dunklen, feuchten Kammer.
- Mindestens 3 x mit PBST waschen.

Anfärbung der Gesamt-DNA

Die Anfärbung der Gesamt-DNA sowie das Aufsetzen auf das Deckgläschen wird analog zum Abschnitt 2.2.18 durchgeführt.

2.2.22 „Immunoblotting“ („Western Blot“)

Tabelle 62: Material zur Durchführung des „Western Blots“

PBS / PBST
Eis
Ripa-Puffer + Proteaseinhibitor
Laemmli-Puffer
1,5 ml Reaktionsgefäße
Zellen
Ultraschallbad
30% Acrylamid / Bisacrylamid
4 X TRIS / SDS pH 8,8 und 4 X TRIS / SDS pH 6,8
H ₂ O (Millipore und VE)
10% APS in H ₂ O
TEMED
Laufpuffer
Transferpuffer
Gelmarker
Transfermembran (PVDF oder Nitrozellulose)
Methanol
Ponceau S
Milchpulver
Natriumazid
Antikörper
2% und 5% Essigsäure
Entwickler
Fixierer
Röntgenfilme
Chemilumineszenzsubstrate („Luminata forte“, Merck; SuperSignal West Dura / Pico, Pierce)
Gerätschaften (Power Supply, Lauf – und Transferkammer, Spatel etc.)
„Stripping“-Puffer

Protein-Lyse

- Die Zellen zuerst mit warmen PBS waschen.
- Dann die Kulturschale auf Eis stellen und die Zellen mit eiskaltem Ripa-Puffer (+ Proteaseinhibitor) sowie einem Zellschaber vom Untergrund entfernen.
- In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß füllen (pro Loch einer 6-Lochplatte etwa 150 µl Ripa).

- Die Lysate anschließend mindestens 45 Minuten auf Eis stellen und dabei mehrmals vortexen.
- Die Proben für 30-60 Minuten bei 4 °C auf höchster Stufe in einer Tischzentrifuge zentrifugieren um die Zellreste zu entfernen (An dieser Stelle kann die Probe vorübergehend bei -20 °C gelagert werden).
- Das Pellet wird verworfen und der Überstand (5 + 1) mit 6 X Laemmlipuffer (6,0 ml 4 X Tris / SDS Puffer pH 6,8 [375 mM] + 48,0 g Glycerin [48%] + 6,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [6%] + 0,03 g Bromphenolblau [0,03%] + 9,0 ml β-Mercaptoethanol [9%]) oder (1 + 1) mit 2 X Laemmlipuffer (25,0 ml 4 X Tris / SDS Puffer pH 6,8 + 20,0 ml Glycerin [20%] + 4,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [140 mM, 4 %] + 1,0 mg Bromphenolblau + 2,0 ml β-Mercaptoethanol [2%]) versetzt und gut vermischt.
- 10 Minuten kochen bei 95 °C im Thermomix garantiert das Aufbrechen der proteinieren Schwefelbrücken und die Linearisierung der Proteine.
- Um zähflüssige Lysate einfacher aufs Gel auftragen zu können, kann die genomische DNA zerstört werden indem die Probe 15 Sekunden im Ultraschallbad behandelt wird. Bei empfindlichen Proben reicht es aus, diese mit einer 1000 Mikroliterpipette mehrmals auf und ab zu pipettieren, um die genomische DNA zu zerstören.
- Anschließend kann die Probe auf das SDS-Gel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert werden.

SDS-PAGE

Proteine mit hohem Molekulargewicht (kDa) werden in weniger konzentrierten Polyacrylamidgelen (bis 7%) als niedermolekulare Proteine aufgetrennt (bis 15%). Hochkonzentrierte Gele sind dem entsprechend bei Proteinen mit geringen kDa zu bevorzugen.

Zum Gießen der Gele wird zuerst die Gießvorrichtung laut Herstellerprotokoll zusammgebaut und anschließend zuerst das Trenngel, dann das Sammelgel gegossen. Das Trenngel dient später zur Auftrennung der Proteine, das Sammelgel zur Konzentrierung der Proteine, damit die Auftrennung aller Proteine zum selben Zeitpunkt startet.

Cave: Stets Handschuhe tragen und unter dem Abzug arbeiten, da Acrylamid stark gesundheitsgefährdend ist. Nicht vortexen, nur leicht schwenken, da zu viel Sauerstoff die Polymerisation behindern kann.

- Acrylamid, Tris / SDS pH 8,8 und H₂O, in der angegebenen Reihenfolge, in einem 50 ml Röhrchen vermischen (nicht vortexen).

Tabelle 63: SDS Trenngel (für je 1 Gel)

Lösung	7% Gel	10% Gel	15% Gel
Acrylamid / Bisacrylamid (30%)	3,5 ml	5 ml	7,5 ml
4 X TRIS / SDS pH 8,8 (Siehe Kapitel 2.1.9)	2,63 ml	3,75 ml	5,62 ml
H ₂ O (Millipore)	8,87 ml	6,125 ml	1,83 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS) in H ₂ O	100 µl	100 µl	100 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	20 µl	20 µl	20 µl

- APS und TEMED zugeben und erneut leicht schwenken. Nun beginnt die Polymerisation.
- Das Gel mit Hilfe einer Pipette in die Gießvorrichtung füllen und umgehend mit ein paar Milliliter Isopropanol überschichten um eine gerade Gelobergrenze zu erhalten. Das übrige Gel im Röhrchen verschließen und ebenfalls polymerisieren lassen.
- Ca. 45 Minuten warten (Mit Hilfe des Restgels den Polymerisationsgrad überprüfen).
- Isopropanol abschütten und 10 Minuten austrocknen lassen (eventuell mit fusselfreiem Tuch nachtrocknen).
- Das Sammelgel gießen. Dazu Acrylamid, Tris / SDS pH 6,8 und H₂O, in der angegebenen Reihenfolge, in einem 50 ml Röhrchen vermischen (nicht vortexen).

Tabelle 64: SDS Sammelgel (für je 1 Gel)

Lösung	Sammelgel
Acrylamid / Bisacrylamid 30%	0,65 ml
4 X Tris / SDS pH 6,8 (Siehe Kapitel 2.1.9)	1,25 ml
H ₂ O (Millipore)	3,05 ml
10% APS in H ₂ O	50 µl
TEMED	10 µl

- APS und TEMED zugeben und erneut leicht schwenken. Nun beginnt die Polymerisation.
- Das Gel mit Hilfe einer Pipette in die Gießvorrichtung füllen und umgehend den Kamm für die Proteintaschen einsetzen. Das übrige Gel im 50 ml Röhrchen verschließen und ca. 45 Minuten polymerisieren lassen (Mit Hilfe des Restgels den Polymerisationsgrad überprüfen).

Protein Auftrennung

- Den 10 X Laufpuffer (30,2 g Tris Base [250 mM] + 144,0 g Glycin [1,920 M] + 10,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [35 mM, 1%]) 1:10 mit VE-Wasser verdünnen.
- Das gegossene Gel mit den Glasplatten in die Laufkammer stellen, dazu den unteren Klippverschluss öffnen.

- Die Laufkammer, sowie die Gelkammer, laut Herstellerangaben mit 1 X Laufpuffer füllen.
- Den Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernen, dabei darauf achten, dass das Gel stets mit Laufpuffer überschichtet ist.
- Den Proteinmarker (ca. 20 µl) sowie die Proben (10-30 µl) mit einer Mikroliterpipette vorsichtig in die Geltaschen füllen, so dass nichts in die Nachbartaschen schwappen kann.
- Leere Geltaschen mit Laemmlipuffer ohne Proteine befüllen.
- Das Gel bei 20 mA (pro Gel) so lange (ca. 2-3 h) laufen lassen, bis die gewünschte Auftrennung erreicht ist (Kontrolle über Position der Markerproteine).

Transfer

Nun können die aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran transferiert werden. Das PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Material hat dabei gegenüber Nitrozellulosemembranen den Vorteil, dass es widerstandsfähiger ist und schon sehr geringe Proteinmengen gut daran haften. Allerdings beobachtet man mit dieser Membran auch mehr unspezifische Signale, so dass für jeden Proteinnachweis beide Membranen getestet werden sollten.

- 30 Minuten vor Transferbeginn den 10 X Transferpuffer 1:10 verdünnen, dabei 20% Methanol zugeben (siehe Abschnitt 2.1.9). Den Puffer dann bei 4 °C kühlstellen.
- Nach dem Kühlstellen die Membran waschen. Immer zuerst auf die Flüssigkeitsoberfläche legen, damit Luftblasen aus der Membran entweichen können (Nitrozellulose 1 Minute in Wasser, dann in Transferpuffer legen, PVDF 15 Sekunden in Methanol, 2 Minuten in Wasser und mindestens 5 Minuten in Transferpuffer legen.).
- Für den Transfer je Gel zwei Schwämme und zwei Filterpapiere im Transferpuffer aufweichen sowie das Transfergitter bereitlegen.
- Auf die schwarze Seite des Transfergitters zuerst einen der eingeweichten Schwämme, dann ein Filterpapier legen.
- Das Gel vorsichtig mit einem Spatel ablösen und auf das Filterpapier legen.
- Die nasse Membran aus dem Puffer entnehmen und auf das Gel legen. Eventuell entstehende Luftblasen mit einem Spatel verstreichen und entfernen.

Cave: Zur besseren Erkennung der Liegerichtung können Gel und Membran durch das Abschneiden einer der Ecken gekennzeichnet werden.

- Das zweite Filterpapier und den zweiten Schwamm auf die Membran legen und die rote Seite des Transfergitters nach oben klappen.
- Das Gitter, laut Herstellerangaben (rote Seite zur Anode, schwarze Seite zur Kathode), in die mit Puffer gefüllte Transferkammer hängen.

- Der Transfer läuft bei 20 mA (egal wie viele Gele) für 17-20 h im Kühlraum.

Cave: Ein schnellerer Transfer (auch in 30 Minuten mit höherer Ampere-Zahl) ist prinzipiell möglich, wegen der entstehenden Wärme jedoch nicht zu empfehlen. In dieser Arbeit lief der Transfer stets für exakt 20 h bei 20 mA.

- Nach Abschluss des Transfers kann der mittransferierte Marker mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet werden, da dieser ansonsten bei den nachfolgenden Schritten herausgewaschen werden könnte.
- Die vorübergehende Lagerung der Membran in PBST bei 4 °C ist mehrere Tage möglich.

Ponceau S Färbung

Zur Überprüfung des Transfers kann eine Ponceau-Färbung durchgeführt werden. Ponceau hat eine tief rote Farbe und bindet unspezifisch an jegliche Proteine. Hat der Transfer geklappt zeigt sich meist eine rosa-Färbung der Protein-Banden (Abbildung 28).

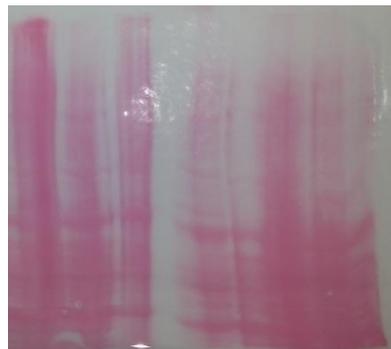


Abbildung 28: Ponceau-Färbung.

- Die Membran 5 Minuten in VE-Wasser waschen um Pufferreste zu entfernen.
- Einige Minuten in der Ponceau-Essiglösung auf dem Kippschüttler inkubieren.
- Ponceau abkippen (Ponceau kann mehrfach verwendet werden).

Antikörperinkubation

Die Antikörper wurden in dieser Arbeit, wie in Abschnitt 2.1.1 angegeben, verdünnt. Meist entspricht dies den Herstellerangaben. Alle Antikörper wurden in 10 ml einer PBST-Lösung angesetzt (Zugabe von bis zu 5% Milchpulver möglich). Bei Erstantikörpern (aber nicht bei Peroxidase-konjugierten Erstantikörpern) wurde gegen das Bakterienwachstum 0,01-0,02% Natriumazid zugesetzt.

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung an die proteinfreie Membran muss die Membran vor der Zugabe der Antikörper mit Milchpulver inkubiert werden. In dieser Arbeit wurde stets eine 5% Milchpulverlösung in PBST frisch angesetzt.

- Die Membran in einer geeigneten Box für 1 h bei RT in einer 5% Milchpulverlösung in PBST inkubieren (Kippschüttler).
- Die Membran aus der Blocklösung entnehmen und ohne zwischengeschaltete Waschschrte in die Erstantikörperlösung legen. Darin je nach Herstellerangaben 2-24 h inkubieren (Für diese Arbeit wurden die besten Ergebnisse mit einer Inkubation über Nacht bei 4 °C erzielt).
- Die Antikörperlösung abschütten aber aufbewahren und die Membran 3 x kurz in ca. 10 ml PBST waschen. Im Anschluss 2 x für 10 Minuten mit ca. 10 ml PBST auf dem Kippschüttler waschen, um überflüssige Antikörper zu entfernen.
- Die Membran in die Zweitantikörperlösung legen und nach Herstellerangaben inkubieren.
- Die Antikörperlösung verwerfen und die Membran erneut 3 x kurz in ca. 10 ml PBST waschen. Im Anschluss 2 x für 10 Minuten mit ca. 10 ml PBST auf dem Kippschüttler waschen, um überflüssige Antikörper zu entfernen.
- Die Membran kann dann für kurze Zeit in PBST (im Dunkeln) gelagert werden, sollte aber bald möglichst entwickelt werden.

Cave: Um Antikörper zu sparen kann die Membran mit einem Schweißgerät eng in eine Folie eingeschweißt werden. Auf diese Weise reichen etwa 2 ml Antikörperlösung für die Inkubation aus.

Signaldetektion

Zur Signaldetektion wurden je nach Signalintensität verschiedene Substrate (nach Herstellerangaben) verwendet. Die Filmentwicklung fand stets im Fotolabor unter einer Rotlichtlampe statt. Die Lösungen zur Entwicklung können bereits vor Beginn der Entwicklung in die Entwicklungsschalen gegossen werden, dies sollte jedoch bereits unter Rotlichtlampen geschehen, da der Entwickler lichtinstabil ist. Der Entwickler „DOKUMOL“ von „Tetenal“ wird dazu 1:7 mit Millipore-Wasser verdünnt und kann mehrmals verwendet werden (Lagerung in lichtdichter Flasche). Zum Abstoppen wird eine 2%-Essiglösung verwendet, auch diese kann mehrmals Verwendung finden. Der Fixierer (625 g Natriumthiosulfat Pentahydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) [1,26 M]; 49 g Kaliummetabisulfid ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) [0,11 M]) wird laut Protokoll (Abschnitt 2.1.9) hergestellt und kann ebenfalls mehrfach verwendet werden.

- Die Membran mit Hilfe eines fusselfreien Tuches abtupfen um überflüssiges PBST zu entfernen.

- Die Membran auf die Entwicklungsfolie in der Filmbox legen und gleichmäßig, mit ausreichend Chemilumineszenzsubstrat beträufeln.
- Die Folie zuklappen und gut verstreichen, so dass alle Luftblasen entfernt werden und überall Substrat verteilt wird.
- Je nach Substrat bis zu 5 Minuten warten.
- In der Zwischenzeit den Röntgenfilm zurecht schneiden und auf die Folie legen. Zur besseren Orientierung kann auf dem Film mit Bleistift die Umrandung der Membran nachgezeichnet werden, sowie Angaben zu Substrat, Antikörpern und Inkubationszeit festgehalten werden.
- Die Filmbox fest verschließen und je nach Protein, Antikörper und Substrat zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden inkubieren. Die optimale Zeit muss für jeden „Western Blot“ eigenständig herausgefunden werden.
- Nach Inkubation den Film in den Entwickler tauchen und so lange schwenken bis das Signal gut sichtbar ist.
- Umgehend für ein paar Sekunden in die Essigsäurelösung legen, dadurch wird die Entwicklung gestoppt.
- Den Film für 15-60 Minuten in den Fixierer legen, bis er klar wird.
- Den Film gut mit VE-Wasser waschen bis jeglicher Fixierer entfernt ist.
- Der Film kann anschließend entweder von Luft oder in einem speziellen Film-Trockenschrank, bei leicht erwärmter Luft, getrocknet werden.

Einige „Western Blots“ dieser Arbeit wurden nach Zugabe des Chemilumineszenzsubstrats mit Hilfe des „Chemismart“-Dokumentationssystems laut Herstellerangaben analysiert.

„Stripping“

Um eine Membran erneut mit anderen Antikörpern zu entwickeln, kann der „Blot“ „gestrippt“ werden. Dabei werden alle Antikörper entfernt, die Proteine bleiben jedoch, bei mäßiger Inkubationszeit, auf der Membran haften. Nach dem „Stripping“ sollte der Blot erneut belichtet werden um zu überprüfen ob noch Antikörperreste vorhanden sind. In diesem Fall müsste erneut „gestrippt“ werden.

- Die Membran in ca. 10 ml (je nach Boxgröße) des „Stripping“-Puffers für mindestens 5 Minuten bei RT inkubieren. (Die Inkubation kann bis zu 30 Minuten bei bis zu 55 °C variiert werden, was allerdings zu Proteinverlust führen kann.)
- Die Membran mehrmals in frischem PBST waschen.
- Zur Überprüfung entwickeln und gegebenenfalls erneut „strippen“.
- Mit der Milchpulver-Blockierung beginnen und den gewünschten „Blot“ durchführen.

2.2.23 Immunpräzipitation (IP)

Bei der Immunpräzipitation werden Proteinverbände mit Hilfe von Antikörpern isoliert, die mit ihrem Fc-Abschnitt an Protein A / G Agarose (Handelsname A / G Sepharose) gebunden werden. Die isolierten Proteine können dann auf ein SDS Gel aufgetragen und mittels „Western Blot“ nachgewiesen werden. Die Immunpräzipitation wird in Abbildung 29 schematisch dargestellt und wurde in dieser Arbeit nach dem Protokoll von „Cell Signaling“ durchgeführt.

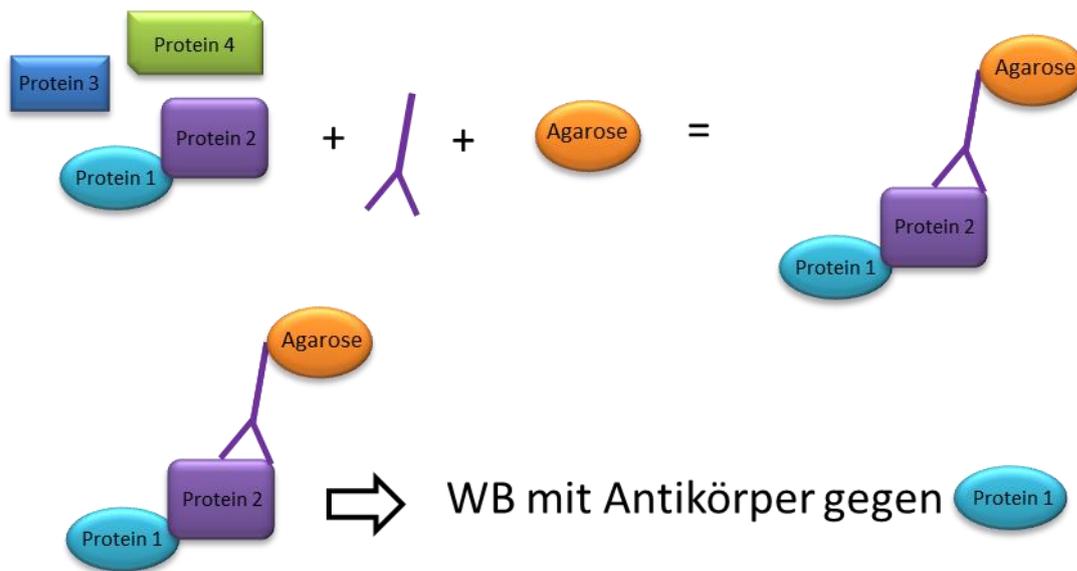


Abbildung 29: Immunpräzipitation.

Grafische Darstellung einer Immunpräzipitation. Aus einer Proteinlösung wird mittels Agarose-gekoppeltem Antikörper ein Protein, mit all seinen anhängenden Proteinen, isoliert. Der Proteinkomplex kann dann in einem „Western Blot“ analysiert werden.

Tabelle 65: Material zur Immunpräzipitation

Ripa-Puffer + Proteaseinhibitor
Laemmli-Puffer
Protein A / G Sepharose (Agarose)
Antikörper
1,5 ml Reaktionsgefäße
Folie („Parafilm“)

- Die Zellen wie in Abschnitt 2.2.22 mit Ripa-Puffer (+ Proteaseinhibitor) lysieren (500 µl pro 10 cm Petrischale), aber noch keinen Laemmli-Puffer zupipettieren.
- Die Proteinkonzentration auf 1 mg / ml einstellen (z.B. mit BCA-„Assay“, Abschnitt 2.2.24).

- In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu 200 µl Lysat [1 mg / ml] den 1. Antikörper (Menge laut Herstellerangaben) zupipettieren und unter langsamer Rotationsschüttelung über Nacht bei 4 °C inkubieren (Das Gefäß fest mit „Parafilm“ verschließen).
- 10-30 µl Protein A / G Sepharose unter ständigem schütteln (damit die Sepharose in Suspension bleibt) zupipettieren und 1-3 h bei 4 °C bei langsamem Rotationsschütteln inkubieren (Das Gefäß fest mit „Parafilm“ verschließen).
- Mikrozentrifugieren bei 4 °C für 30 sec. auf 14000 rpm.
- Überstand verwerfen und Pellet 3-5 x mit 500 µl Ripa (+ Proteaseinhibitor) waschen (30 sec., 4 °C, Mikrozentrifuge, 14000 rpm). Die Proben zwischen den Schritten jeweils auf Eis lagern.
- Aufnahme in Laemmli-Puffer analog zur Erklärung in 2.2.22.
- „Western Blot“ wie unter 2.2.22 beschrieben durchführen.

2.2.24 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-„Assay“)

Der BCA-„Assay“ der Firma „Thermo Fisher Scientific“ ist eine Methode zur kolorimetrischen Quantifikation von Proteinen. Diese Methode kombiniert die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einem alkalischen Medium mit der hoch selektiven und sensitiven kolorimetrischen Detektion von Cu^{1+} durch BCA („bichinoninic acid“), wodurch ein violetter Chelatkomplex gebildet wird. Dieser Komplex hat bei 562 nm sein Absorptionsmaximum, wobei die Absorption annähernd linear zur Proteinkonzentration ansteigt.

Der Assay wird zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten verwendet und wurde in dieser Arbeit analog zur Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.25 Bestimmung des aktiven RhoA (RhoA-GTP)

Zur Bestimmung der Menge an aktivem RhoA (RhoA-GTP) wurde der „Assay“ RhoA-G-LISA BK124 der Firma „Cytoskeleton“ (Denver, USA) verwendet, der analog der Herstellerangaben durchgeführt wurde und nach folgendem Prinzip abläuft (Abbildung 30).

Am Boden der Löcher einer 96-Lochplatte (Abbildung 30, schwarz) befindet sich ein RhoA-GTP-Bindeprotein (Abbildung 30, Ebene 1, hellblau). Die zu testenden Zellen werden mit dem im „Kit“ mitgelieferten Mittel zur Zelllyse lysiert und das Lysat anschließend in ein Loch der 96-Lochplatte gegeben (Abbildung 30, Ebene 2). Anschließend wird mit einem 1. Antikörper gegen RhoA-GTP (Abbildung 30, Ebene3, grün) und einem HRP (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten 2. Antikörper (Abbildung 30, Ebene 4, dunkelblau und rot) gegen den 1. Antikörper inkubiert. Nach

anschließender Zugabe des mitgelieferten Substrates (Abbildung 30, Ebene 5) wird dieses durch das Enzym HRP umgesetzt, was zu einem kolorimetrisch messbaren Farbumschlag führt. Die Absorption kann bei 490 nm gemessen und nach Vergleich mit einem Blank-Wert (Wasser statt Zelllysate) die relative Menge an aktivem RhoA (RhoA-GTP) bestimmt werden.

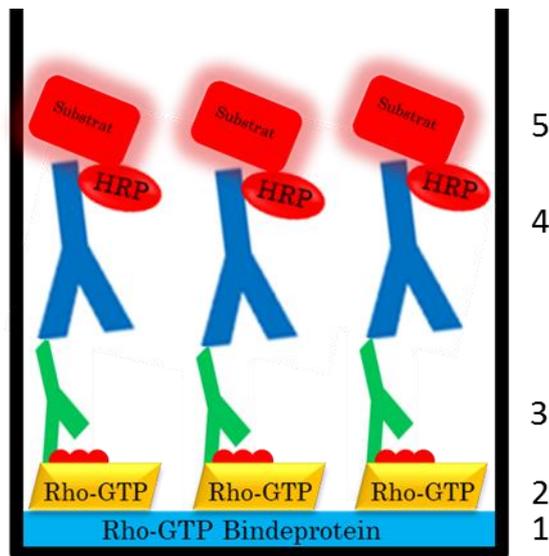


Abbildung 30: Prinzip des RhoA „Assays“.

Schwarz: Loch einer 96-Lochplatte. Die verschiedenen Vorgänge während der „Assay“-Durchführung werden von 1-5 durchnummeriert. 1) RhoA-GTP Bindeprotein (hellblau) am Boden des Loches der 96-Lochplatte. 2) RhoA-GTP (gelb / rot) aus dem Zelllysate. 3) 1. Antikörper gegen das RhoA-GTP (grün) 4) HRP(rot)-gekoppelter 2. Antikörper (dunkelblau) gegen den 1. Antikörper (grün). 5) Substrat (leuchtend rot).

2.2.26 Transfektion mittels Elektroporation

In dieser Arbeit wurden zwei Systeme der Elektroporation ausprobiert, um DNA-Plasmide in primäre Zellen zu transfizieren. Die verwendeten Geräte waren zum einen das „Neon“-Transfektionsgerät von „Invitrogen“, zum anderen das „Amaxa-Nucleofector II“-Gerät von „Lonza“. Die Funktionsweise ist bei beiden Geräten ähnlich. Allerdings benützt das „Neon“-Transfektionsgerät dünne Pipetten anstelle von Küvetten, was für die Zellen laut Herstellerangaben weniger toxisch ist. Die Zellen werden in Lösung gebracht und anschließend mittels Strom eine poröse Zellmembran generiert, wodurch die Zellen die DNA einschleusen können (zusammengefasst in Andre & Mir 2004). Beide Transfektionsmethoden wurden analog der Herstelleranleitung durchgeführt. Die verwendeten Programme werden in Tabelle 66 und 67 erläutert.

Tabelle 66: Verwendete Programme bei der „NEON“-Transfektion von Podozyten

Programm	[V]	ms	Pulse
15	1300	20	2
16	1400	20	2
19	1050	30	2
20	1150	30	2
23	1500	10	3

Tabelle 67: Verwendete Programme bei der Amaxa-Transfektion von Podozyten

Programm
P-013
A-033
D-033
P-024
U-25

2.2.27 Weitere Transfektionsmethoden

Neben Calciumphosphatpräzipitation, lentiviraler Transfektion und Elektroporation gibt es viele weitere Transfektionsmethoden, von denen einige in dieser Arbeit ausprobiert wurden. Alle Transfektionsmethoden wurden laut Protokoll der Hersteller durchgeführt, was hier nicht näher erläutert wird.

Lipofektionen

Bei der Lipofektion handelt es sich um eine Transfektion mittels kationischer Lipidlösungen, welche negativ geladene DNA spontan umhüllen können, wodurch sich Vesikel mit einer Phospholipid-Doppelschicht bilden. Diese können dann mit der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran fusionieren und endozytotisch aufgenommen werden. In dieser Arbeit wurden neben „ScreenFect®A“ der Firma „InCella“ auch „Lipofektamin 2000“ von „Life Technologies“, „MACSfectin“ von „MACS“, und „Nanojuice“ der Firma „Novagen“ verwendet. Letzteres ist eine Mischung aus Lipiden und positiven Dendrimeren.

Positive Dendrimere

Positiv geladene Dendrimere lagern sich in mehreren Generationen um die DNA und können dann als Komplex an negativen Stellen der Zellmembran anhaften, anschließend werden sie endozytotisch in die Zellen eingeschleust (siehe „Nanojuice“ bei Lipofektion).

Kationische Polymere

Auch kationische Polymere lagern sich, ähnlich der Lipofektion und der Dendrimere, um die negativ geladene DNA und können dann endozytotisch in die Zellen aufgenommen werden. Sie enthalten jedoch keinen hydrophoben Teil und sind komplett wasserlöslich. In dieser Arbeit wurde das auf Polyethylenimine (PEI) basierende „IsiFect“ von „HISS“ verwendet.

HVJ-Envelope Vektor

Das verwendete „GenomONE“ von „Cosmo Bio“ ist eine nicht-virale Transfektionsmethode, die allerdings auf dem HVJ-Virus (Sendai Virus) basiert. Bei „GenomONE“ handelt es sich um nicht-proliferative, nicht-infektiöse Vesikel, die etwa 300 nm Durchmesser haben. Die ursprüngliche Virus-RNA wurde dabei komplett inaktiviert. Die Vesikel besitzen F-Proteine zur Membranfusion auf der Oberfläche. Zur Transfektion ist es möglich DNA in diese Vesikel zu inkorporieren, welche nach der Membranfusion in die Zellen gelangt (Cosmo Bio).

Sonstige Transfektionsmethoden

Außerdem wurde mit „Fugene“ der Firma „Promega“ und „Transit2020“ der Firma „Mirus“ gearbeitet. Bei diesen beiden Transfektionslösungen wurde jedoch herstellerseits bisher nichts über die Wirkmechanismen veröffentlicht.

2.2.28 Lentivirusproduktion (verändert nach tronolab.epfl.ch)

Die Lentivirenproduktion (S2) wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an tronolab.epfl.ch durchgeführt und ist in Abbildung 31 dargestellt. Dabei werden drei Plasmide in Lenti-X-TM293 Zellen (am besten zur Virusproduktion geeignet) transfiziert. Diese drei Plasmide enthalten alle Informationen, welche die Zellen benötigen um Viren zu produzieren. Die entstehenden Viren können dann Zielzellen infizieren, aber nicht selbst replizieren, um eine unkontrollierte Vermehrung zu unterbinden. Bei der Transfektion mit Lentiviren integriert das Zielgen stabil in das Genom der Wirtszelle und unterliegt dadurch der zellulären Replikation.

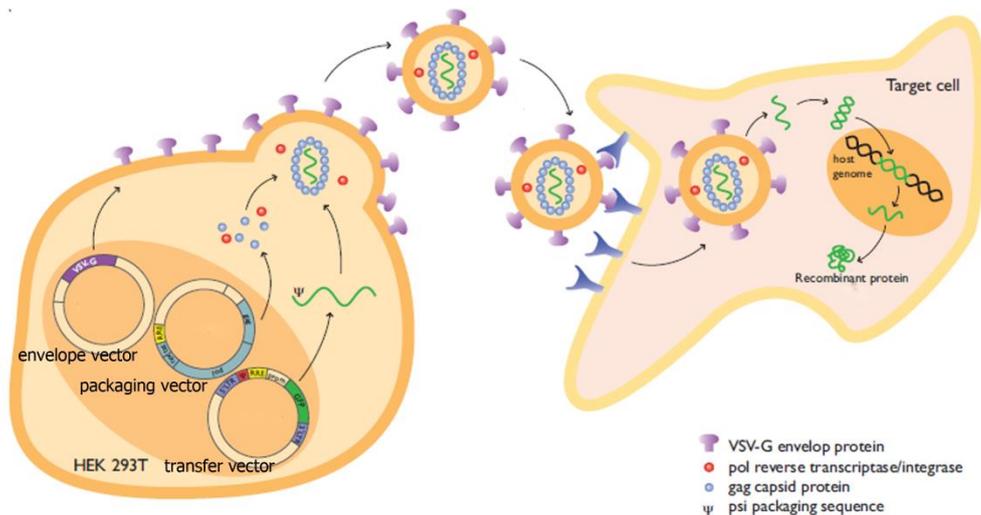


Abbildung 31: Herstellung rekombinanter Lentiviren.

Zur Herstellung rekombinanter Lentiviren werden z. B. Hek293-Zellen (hier Lenti-X-293-Zellen) mit drei Plasmiden transfiziert, auf denen alle Informationen zur Virusproduktion gespeichert sind. Die produzierten Viren gelangen in den Zellüberstand und können gesammelt werden. Anschließend können frische Zellen damit infiziert werden. Dabei integriert das Zielgen stabil in das Genom der Wirtszellen (verändert nach www.invivogen.com).

Folgende drei Plasmide kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

Tabelle 68: Plasmide zur Lentivirusproduktion

Plasmid	Firma
pMD2G	Addgene, Boston 1225
psPAX2	Addgene, Boston 12260
pWPXL	Addgene, Boston 12257

Dabei kodiert der Vektor pMD2G für das VSV-G Envelope-Protein der Viren, psPAX2 ist für die viralen Proteine HIV-1, Gag, Pol, Tat und Rev kodierend, während in den pWPXL-Vektor das jeweilige Zielgen samt eGFP inkloniert ist.

Zur Virenproduktion können diverse Transfektionsmethoden eingesetzt werden. Die kostengünstigste Methode ist die Calciumphosphatpräzipitation, bei der die Plasmide mit einer Ausfällreaktion, bei welcher Calciumphosphatnadeln gebildet werden, in die Zellen eingeschleust werden. Die Größe und Anzahl der entstehenden Nadeln ist dabei für die Effektivität der Transfektion ausschlaggebend, worauf später erneut eingegangen wird. Bei der Transfektion ist es von äußerster Wichtigkeit, dass bei allen Puffern frische Chemikalien und doppelt destilliertes (bidest.) Wasser verwendet wird. Die Herstellung der einzelnen Puffer wird in Abschnitt 2.1.9 ausführlich erklärt.

Tabelle 69: Material zur Lentivirusproduktion mittels Calciumphosphatpräzipitation

Lenti-X TM-239 Zellen
Lentix-Medium und Lentix-Medium ohne Natriumbicarbonat
Trypsin
Plasmide: pMD2G, psPAX2, pWPXL
TE Puffer (1 X) pH 8; TE Puffer (0,1 X) pH 8
2,5 M CaCl ₂
HeBS 2 X
PBS
70% Ethanol
Vortexgerät
Petrischalen 15 cm (5 Stück)
Mehrere 50 ml und 15 ml Röhrchen
Zellkulturgerätschaften (Sterilwerkbank, 2 Wasserbäder, Brutschrank, Zentrifuge, Mikroskop)
LV-Go-Stix
PEG-it
Polybrene in 0,9% NaCl
pH-Meter und Eichlösungen
Hepes gepuffertes Wasser
Flächen-und Handdesinfektionsmittel

Cave: S2-Arbeiten müssen in einem dafür deklarierten Labor unter strengen Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt werden. Alle Arbeiten mit offenen Flüssigkeiten müssen dabei unter der Sterilwerkbank durchgeführt werden. Geschlossene Behälter dürfen erst nach Desinfektion mit 70% Ethanol aus der Sterilwerkbank entfernt werden. Jeglicher Müll (flüssig oder fest) muss autoklaviert werden. Flüssigmüll muss zuvor zusätzlich mit geeigneten Stoffen (Bleiche / Chlortabletten etc.) unschädlich gemacht werden. Alle Oberflächen müssen nach der Arbeit mit einem geeigneten Desinfektionsmittel (z.B. Kohrsolin, Bode, Hamburg) und anschließend mit 70% Ethanol behandelt werden. Außerdem müssen stets Handschuhe und Kittel getragen werden. Gegebenenfalls muss der Kittel nach Benutzung autoklaviert werden, bevor er in die Reinigung gebracht wird. Vor Verlassen des Raumes müssen die Hände gut mit geeigneter Seife gewaschen und anschließend desinfiziert werden (siehe ausgehängter Hygieneplan im S2-Labor).

Tag 1, Vorbereitungen:

Der folgende Ansatz ist für 5 Petrischalen der Größe 15 cm geeignet:

- Lenti-X-Zellen in Lentix-Medium in 15 cm Petrischalen kultivieren und regelmäßig (2 x wöchentlich, z.B. Montag und Donnerstag) splitten (1:10 bis 1: 30 mit Trypsin). Zellen mit Passagenzahlen über # 30 sollten nicht mehr zu Virusproduktion verwendet werden.

- Zur Virusproduktion die Zellen so aufteilen, dass am Tag des Produktionsstartes eine ca. 80%ige Konfluenz herrscht (bei einer Aussaat am Freitag für einen Produktionsbeginn am Montag, $2,5 \times 10^6$ -Zellen pro 15 cm Schale). Alternativ kann man am Vortag des Produktionsbeginns $11,0 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale aussäen. Die Aussaat 3 Tage vor Beginn ist empfehlenswert, da die Zellen dann fester am Boden der Petrischale anhaften. Alternativ kann ein sog. „Coating“ mit z.B. Collagen oder PEI (sorgt für Anhaftung und erhöhte Transfektionseffizienz) verwendet werden.

Tag 2, Calciumphosphatpräzipitation zur Cotransfektion der drei Plasmide:

Mit der Transfektion wird entweder morgens oder abends begonnen. Da in dieser Arbeit größere Erfolge mit einer morgendlichen Transfektion und einem abendlichen Mediumwechsel erreicht wurden (bessere Überlebensrate der Zellen, da geringere Expositionszeit), wird dieses Verfahren hier näher beschrieben.

- Zwei Stunden vor Transfektionsbeginn das alte Medium absaugen und durch 22,5 ml frisches Lenti-X-Medium (hier ohne Natriumbicarbonat!) ersetzen. Zur Effizienzerhöhung kann das Medium zuvor durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Sterilfilter filtriert werden.
- Einstellen der DNA-Konzentration aller Plasmide (in TE-Puffer pH 8,0) auf $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$.
- Für 5 Petrischalen der Größe 15 cm folgende Lösungen in ein 50ml Röhrchen pipettieren:

112,5 μg pWPXL (mit EGFP und „gene of interest“)

39,5 μg pMD2G

73 μg psPAX2

- In dieser Reihenfolge anschließend 3,3 ml TE-Puffer (0,1 X) und 1,75 ml Hepes gepuffertes Wasser zugeben.
- Kurz vortexen.
- Unter ständigem Vortexen und der dabei entstehenden Strudelbildung zuerst 565 μl CaCl_2 [2,5 M] tropfenweise in die Mitte des Strudels pipettieren.
- Unter weiterem vortexen mit Strudelbildung, tropfenweise 5,7 ml HeBs (2 X) zupipettieren und weiter vortexen bis die gesamte Lösung zugetropft ist.

Cave: Gleichmäßiges aber nicht übermäßiges Vortexen mit Strudelbildung und mittiges zutropfen der Lösungen ist überaus wichtig, damit die Calciumphosphatpräzipitate in ausreichender Qualität gebildet werden.

- Die nun leicht trübe Lösung mindestens 5 Minuten (höchstens 30 Minuten) unberührt bei RT stehen lassen um die Ausbildung von Calciumphosphatnadeln zu gewährleisten.
- Tropfenweise je 2,25 ml der Präzipitationslösung (pro Schale) unter ständigem Kippen und Rotieren zu den kultivierten Zellen pipettieren. Dabei so lange schwenken, bis das Medium komplett zur Ursprungsfarbe zurückkehrt. Unter dem Mikroskop müssen nun zahlreiche, kleine Calciumphosphatnadeln erkennbar sein (Abbildung 32 a).

Cave: Die Bildung der Kristallnadeln in ausreichender Qualität und Quantität hängt von vielen Faktoren ab. Zum einen muss der pH-Wert aller Lösungen so exakt wie möglich eingestellt sein. Außerdem müssen alle Chemikalien möglichst frisch und frei von Verunreinigungen sein. Wichtig ist außerdem die Qualität des Wassers. Am besten ist doppelt destilliertes (bidest.) Wasser geeignet.

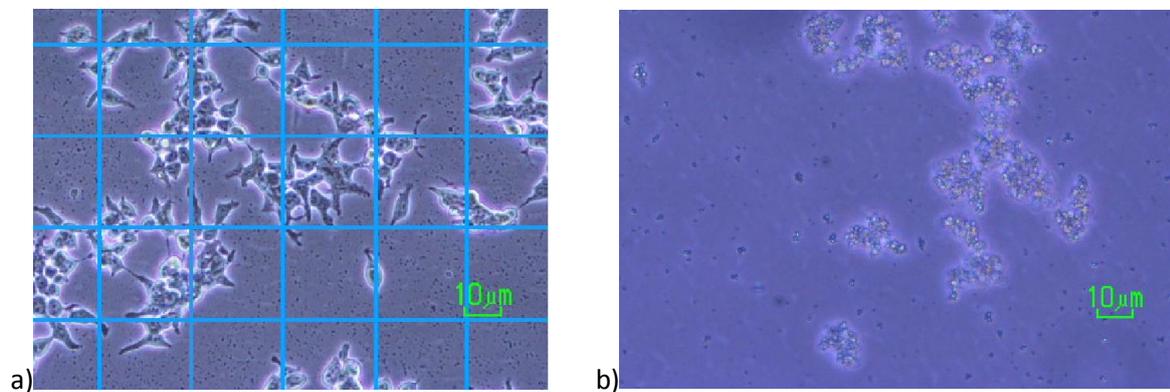


Abbildung 32: Calciumphosphatpartikel.

a) Lenti-X-Zellen mit kleinen Calciumphosphatpartikeln, optimal zur Transfektion. b) Grobe und verklumpte Calciumphosphatpartikel, zu groß zur Transfektion (keine Zellen in Bild b).

- Mindestens 6-8 Stunden im Brutschrank inkubieren (bei abendlichem Transfektionsbeginn über Nacht).
- Das alte Medium vorsichtig absaugen um eine Zellablösung zu vermeiden, als S2-Müll entsorgen und langsam mit 14 ml frischem Medium (ohne Natriumbicarbonat) ersetzen. Die Transfektion kann bereits jetzt am Fluoreszenzmikroskop (EGFP in pWPXL) überprüft werden. Leuchten die Zellen, so ist die Chance groß, dass auch Viren produziert werden.

Tag 3, Sammlung der Virenpartikel:

- Alle 8 bis 16 h das Medium wechseln und beim abgenommenen Medium umgehend mit der Aufkonzentrierung der Viren beginnen (Siehe Abschnitt 2.2.30).

Eine Aufkonzentrierung ist nicht zwingend nötig, der abgenommene Überstand kann direkt oder in Verdünnung auf zu infizierende Zellen gegeben werden (Siehe Abschnitt 2.2.31). Meist ist die Virus-Konzentration allerdings sehr gering, was für die Infektion von Hek293-Zellen, nicht jedoch für primäre Zellen ausreicht.

2.2.29 Virusnachweis mit Lenti-X-GoStix

Lenti-X-GoStix bieten die Möglichkeit schnell und einfach nachzuweisen ob der Überstand der Zellen Lentiviren enthält. Zeigt sich ein deutlicher Streifen im Testbereich, so befinden sich mindestens 5×10^5 IFU / ml („Infectious Units“ pro ml) in der Flüssigkeit. Man entnimmt mit einer Pipette 20 μ l des Überstandes und tropft die Lösung auf den vorgegebenen Bereich. Anschließend tropft man 3 Tropfen des mitgelieferten Puffers auf die gleiche Stelle. Nach 5 bis 10 Minuten erscheint gegebenenfalls neben einer Kontrolllinie, welche die Funktionalität des Tests überprüft, eine weitere Linie die das Vorhandensein der Viren bestätigt (Siehe Abbildung 33).



Abbildung 33: Lenti-X-GoStix.

Der linke Streifen über dem T zeigt das Vorhandensein der Viren an. Der rechte Streifen dient lediglich zur Kontrolle der Funktionalität des Testes.

2.2.30 Aufkonzentrierung von Lentiviren mit PEG-it™

Tabelle 70: Material zur Aufkonzentrierung von Lentiviren

PEG-it, SBI
50 ml Röhrchen
Pipetten
Eis
PBS

Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Aufkonzentrierung der Viruspartikel. Eine günstige Möglichkeit ist die Ultrazentrifugation, welche unter tronolab.epfl.ch näher beschrieben wird. In unserem Labor wird jedoch die Aufkonzentrierung mit Polyethylenglycol (PEG-it) durchgeführt.

- Den abgenommenen Überstand 5 Minute bei 1200 rpm zentrifugieren um tote Zellen und Partikel zu entfernen (Die Viren befinden sich im Überstand).
- Überstand abnehmen und umgehend mit der zähflüssigen PEG-it-Lösung versetzen (am besten in 50 ml Röhrchen 1 Teil PEG-it auf je 4 Teile Medium). Dabei keine Luftblasen erzeugen und mehrmaliges auf- und abpipettieren vermeiden.
- Zur besseren Vermischung das Röhrchen so lange hin und her wenden, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind.
- Die Lösung muss mindestens 12 h, jedoch höchstens 4-5 Tage, bei 4 °C gelagert werden.
- Wie folgt aufkonzentrieren, dabei stets auf Eis arbeiten.
- Die Suspensionen bei 1500 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugieren (Die Viren werden in einem grau / weißen Niederschlag pelletiert.).
- Den Überstand abnehmen und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführen. Darin erneut bei 1500 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugieren (Die Viren werden erneut in einem grau / weißen Niederschlag pelletiert.). Das Pellet der ersten Zentrifugation in der Zwischenzeit auf Eis lagern.
- Den Überstand verwerfen und alle entstandenen Pellets 1:10 bis 1:100 im Vergleich zum Ausgangsvolumen in eiskaltem PBS aufnehmen.
- In Einfrierröhrchen aliquotieren und bei -70 °C lagern.

Zur Titerbestimmung können verschiedene Konzentrationen (10 µl bis 500 µl pro Loch einer 6-Lochplatte) des Konzentrates auf Zellen (z.B. Hek293) gegeben und die Anzahl der transfizierten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

In dieser Arbeit wurden die Überstände 1:30 in eiskaltem PBS aufgenommen und je 200 µl zur Infektion der Zellen eines Lochs einer 6-Lochplatte verwendet.

2.2.31 Lentivirale Infektion von Zielzellen

Die Infektion, besonders von primären Zellen, wird unter Zugabe von Polybrene durchgeführt, was den Viren eine bessere Anhaftung an der Zelloberfläche ermöglicht.

Tabelle 71: Material zur lentiviralen Infektion von Zielzellen

Virusüberstand oder aufkonzentrierte Lentiviren
Polybrene [2 mg / ml] in 0,9% NaCl (→ Polybrene final [8 µg / ml]), Sigma-Aldrich
Zellkulturmedium der Zielzellen
Zielzellen in 6-Lochplatte ausgesät, 70-80% konfluent
Eis

- Zum Auftauen der benötigten Viren werden die Plastikröhrchen mit den Viren in ein Eisbad gesteckt. Zu schnelles Auftauen führt zu einer verminderten Infektionsrate, da die Viren Schaden nehmen.

Cave: Häufige Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden, da dies die Intaktheit der Viren ebenfalls herabsetzt.

- Medium der Zielzellen (70-80% konfluent) absaugen und mit je 2 ml frischem Medium + 8 µl Polybrene (Polybrene vor dem Mediumwechsel zum frischen Medium geben und gut vermischen) ersetzen um eine finale Polybrenekonzentration von 8 µg / ml zu erreichen.
- Die Zellen zurück in den Brutschrank stellen und mindestens 5 Minuten (oder bis die Viren aufgetaut sind) warten.
- Die gewünschte Menge an Viren oder Virenkonzentrat zutropfen und die Platte dabei vorsichtig in alle vier Richtungen schwenken (nicht kreiseln).
- Zurück in den Inkubator stellen.
- Nach mindestens 4, höchstens 16 h das Medium absaugen und durch frisches Vollmedium ersetzen. (In dieser Arbeit wurde der Mediumwechsel nach etwa 7 h gemacht, da zu lange Inkubation von Virus und Polybrene die Zellen stark schädigt.)
- Je nach Zielgen sollten die ersten Zellen nach 24-72 h das transfizierte Gen exprimieren.
→ Kontrolle des eGFP-Fusionsproteins mittels Fluoreszenzmikroskop.

2.2.32 Mikroskopie

Neben herkömmlicher Durchlichtmikroskopie wurden in dieser Doktorarbeit verschiedene, andere bildgebende Mikroskopieverfahren angewandt.

Die Phasenkontrast-Mikroskopie ist ein Abbildungsverfahren, bei dem die Tatsache genutzt wird, dass sich die Phase von Lichtwellen beim Durchgang durch ein Medium verändert. Dadurch wird eine Abbildung von Strukturen ermöglicht, die nur einen äußerst geringen Eigenkontrast aufweisen und bei Hellfeldmikroskopie nicht als eigenständige Struktur in Erscheinung treten. Das

Phasenkontrastverfahren wurde bereits vor dem 2. Weltkrieg (1932) vom niederländischen Physiker Frits Zernike (1888-1966) in Amsterdam entwickelt, welcher 1953 für seine Entdeckung den Nobelpreis für Physik erhielt (www.nobelprize.org, www.mikrofoto.de). Das Verfahren wurde in dieser Arbeit hauptsächlich während der Zellkultur, der Transfektionskontrolle und der Immunzytochemie angewandt.

Weit verbreitet ist außerdem die Fluoreszenzmikroskopie. Sie beruht auf dem Effekt der Fluoreszenz, bei dem Fluorochrome mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und anschließend das Licht einer anderen, ebenfalls spezifischen Wellenlänge abstrahlen. Verschiedenste Proteine einer Zelle können mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden, so dass sie mit Hilfe eines Mikroskops dargestellt werden können. In dieser Arbeit wurde das Verfahren bei einer Vielzahl von Versuchen, wie dem TUNEL-„Assay“, dem EdU-„Assay“, der Immunzytochemie, der Phalloidin färbung und der Überprüfung einiger Transfektionen verwendet.

Eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie ist die konfokale Lasermikroskopie. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie wird dabei jedoch nicht das gesamte Objekt von einem Laserlicht beleuchtet, sondern Stück für Stück, jeweils nur ein kleiner Teil davon. Dabei entsteht im Mikroskop zu keiner Zeit ein vollständiges Bild, so dass eine anschließende Zusammensetzung der Einzelbilder nötig ist, was von der zugehörigen Software übernommen wird. Eine weitere Besonderheit der Konfokalmikroskopie ist, dass Strukturen nicht nur aus der Aufsicht gezeigt werden können, sondern dass jede denkbare Z-Ebene abgebildet werden kann, was bedeutet, dass optische Schnittebenen der Strukturen dargestellt werden können. Dies wird durch eine Lochblende im Strahlengang ermöglicht, welche lediglich für Licht aus dem abzubildenden Bereich durchlässig ist. Licht aus anderen Ebenen wird dabei zuverlässig blockiert. Gewinnt man zahlreiche Einzelbilder können über diese, mit Hilfe einer Software, dreidimensionale Rekonstruktionen der Präparate im Strahlengang errechnet werden. In dieser Arbeit wurde die Konfokalmikroskopie angewandt, um zu überprüfen, ob sich Kanäle nach der Transfektion an die Zelloberfläche begeben oder in anderen Bereichen lokalisiert werden.

Alle mikroskopischen Verfahren wurden analog den Herstellerangaben der Geräte und der Software durchgeführt.

2.2.33 Auswertung und Statistik

Zellfotos wurden, neben den geräteeigenen Programmen des Fluoreszenzmikroskopes von „Olympus“ und des Konfokalmikroskopes von „Leica“, auch mit „ImageJ“, „Fiji“ (<http://fiji.sc/Fiji>), sowie „Photoshop“ und „Lightroom“ der Firma „Adobe“ bearbeitet.

Zur Analyse von DNA und Planung DNA-bezogener Versuche wurde das Computerprogramm „Ape“ (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) verwendet.

Grafiken wurden mit Hilfe von „Microsoft Power Point“ erstellt und verändert.

Rechnerische und statistische Auswertungen von Daten wurden mit „Excel“ der Firma „Microsoft“ und „Graph Pad Prism“ der Firma „Graph Pad Software“ durchgeführt. Zur Erstellung einer Statistik wurden allgemein gültige Verfahren angewandt. Nach Testung auf Gaußsche-Normalverteilung mittels dreier Tests (D’Agostino, Shapiro-Wilk, Kolmogorow-Smirnow) wurden parametrische (für normalverteilte Daten: „Two-tailed T-Test“) oder nicht-parametrische Tests (für nicht normalverteilte Daten: „Mann-Whitney-Test“) durchgeführt. Die T-Tests wurden nach Testung auf Varianz (F-Test) ohne (keine störende Varianz) oder mit (zu große Varianz) „Welch’s correction“ durchgeführt. Ausreißer wurden mit Hilfe des ROUT-Tests aus den Messwerten entfernt. Der Fehler wurde stets als Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean“ oder SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von primären Podozyten

Nach der Isolation primärer Podozyten aus jungen Mäusen unterschiedlicher Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) muss deren Identität überprüft werden. Die immunzytochemische Charakterisierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen Podozyten-assoziierte Proteine wie Nephrin, Synaptopodin und WT1 (Wilms Tumor Protein 1) wird zwar in der Veröffentlichung von Rastaldi et al. 2006 beschrieben, jedoch nicht gezeigt.

Wir charakterisierten die isolierten Podozyten durch den Nachweis ähnlicher Markerproteine (durch immunhistochemische Analysen oder im sog. „Western Blot“) oder ihrer mRNAs mit Hilfe der quantitativen RT-PCR. Allerdings wurden anstatt epithelialer Zytokeratine das, ebenfalls Podozyten assoziierte, Podocin verwendet und anstelle von CD31 wurden CD144-Antikörper zum Nachweis der Abwesenheit von Endothelzellen genutzt.

Das wohl bekannteste Podozyten-assoziierte Protein ist Nephrin. Es ist unter anderem am Aufbau des Schlitzdiaphragmas (Vergleiche Abbildung 12) beteiligt (Tryggvason 1999, Wartiovaara et al. 2004). Zudem spielt Nephrin auch bei der Signalübertragung eine wichtige Rolle (zusammengefasst in Benzing 2004). Das Nephrin Gen (NEPHS1) liegt beim Menschen auf Chromosom 19, bei der Maus auf Chromosom 7. Im „Western Blot“ zeigt das Protein eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 185 kDa.

Neben NEPHS1 existiert das Gen NEPHS2, welches auf dem menschlichen Chromosom 1 lokalisiert ist und das Protein Podocin kodiert. Podocin ist ebenfalls am Schlitzdiaphragma der Podozyten (Vergleiche Abbildung 12) zu finden und ist etwa 42 kDa groß. Am Schlitzdiaphragma interagiert es mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin (zusammengefasst in Benzing 2004). Wie bereits erwähnt, können manche Mutationen in Podocin unter anderem ebenfalls zu einer FSGS-Erkrankung führen.

WT1 wird unter anderem auch NEPHS4 genannt. Das zugehörige Gen liegt auf dem menschlichen Chromosom 11 und kodiert für einen Transkriptionsfaktor der, je nach Isoform, zwischen 53 und 75 kDa groß ist. WT1 spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Urogenitalsystems und kann durch eine Mutation die Entwicklung eines Wilms Tumors in den Nieren induzieren (Spraggon et al. 2007). Exprimiert wird WT1 in Podozyten, die genaue Funktion dort ist jedoch bisher unklar (Guo J.-K. et al. 2002).

Synaptopodin ist ein zytoplasmatisches Protein mit einer Molekülmasse von etwa 74 kDa, das beim Mensch auf Chromosom 5, bei der Maus auf Chromosom 18 liegt. Es kommt neben dem Großhirn ausschließlich in Podozyten vor (Mundel et al. 1997). Auf dem „Western Blot“ zeigt es manchmal

eine zusätzlich Bande bei ca. 44 kDa, die wahrscheinlich ein Abbauprodukt des Proteins ist. Eine weitere Bande kann in Podozyten bei einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa mit spezifischen Antikörpern detektiert werden und stellt wahrscheinlich ein modifiziertes Protein dar, dessen genauer Hintergrund noch unklar ist (www.acris.com). In Podozyten spielt Synaptopodin bei der Ausbildung der Aktinstressfasern eine Rolle (Asanuma et al. 2006, Faul et al. 2008).

CD144 wird auch VE-Cadherin genannt und ist auf dem humanen Chromosom 16 (Gen CDH5), sowie auf dem murinen Chromosom 8 lokalisiert. Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsproteine, die Zellkontakte zwischen Zellen bilden. CD144 kommt nur in Endothelzellen vor und wird deshalb als Marker für diese Zellen verwendet. Das Protein hat je nach Zelltyp und Modifikation ein Molekulargewicht von etwa 140 kDa.

Das Gen von α -sma („alpha-smooth-muscle-actin“) wird auch ACTA₂ genannt und liegt auf dem humanen Chromosom 10, sowie dem murinen Chromosom 19. Aktine sind hoch konservierte Proteine die bei der Zellintegrität, der Zellstruktur, aber auch der Zellbewegung eine Rolle spielen. Da α -sma ein wichtiges Muskelzellmarkerprotein ist, kann man Mesangialzellen (die von Muskelzellen abstammen) von Podozyten (die das Protein nicht exprimieren) unterscheiden.

3.1.1 Nachweis von Podozytenmarkern auf mRNA-Ebene durch quantitative RT-PCR

Durch quantitative RT-PCR konnte sowohl im Nierencortex von WT-Mäusen, als auch in primären Podozyten aller drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-}) Nephritin mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 34). WT-Podozyten und Podozyten des Genotypes PLC ϵ ^{-/-} wiesen außerdem keine signifikanten Unterschiede in der Menge der exprimierten Nephritin mRNA auf. In TRPC6^{-/-}-Podozyten wurde hingegen, im Mittel 47,61%, mehr Nephritin mRNA als in WT-Podozyten gefunden. Die primären Mesangialzellen sowie primäre Lungen-Endothelzellen aus unserem Labor fungierten als Negativkontrollen und wiesen keine Nephritin mRNA auf.

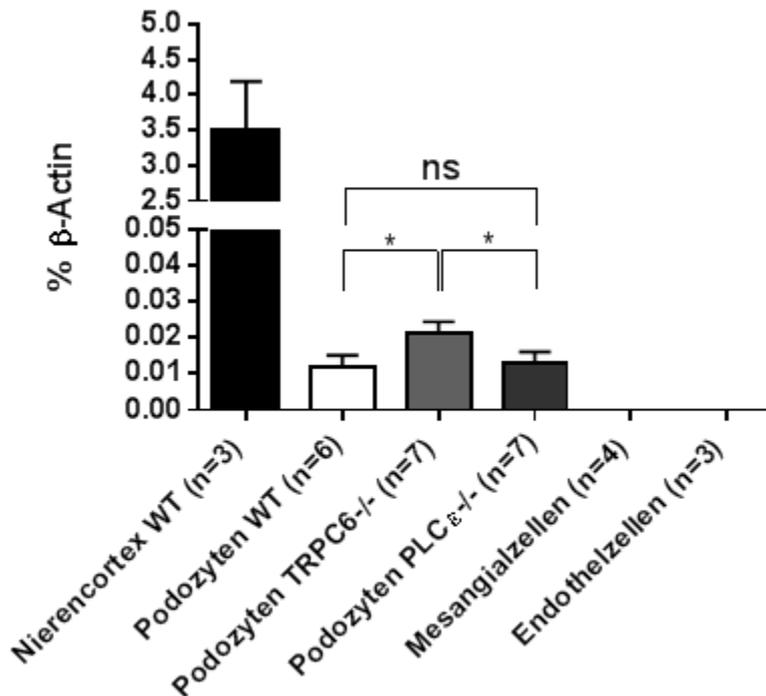


Abbildung 34: Nachweis von Nephtrin-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten und Nierencortex.

Sowohl im Nierencortex von WT-Mäusen als auch in primär isolierten Podozyten der Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-} konnte Nephtrin mRNA nachgewiesen werden. Primäre Mesangialzellen und primäre Lungen-Endothelzellen zeigten hingegen keine Expression von Nephtrin mRNA. ns = nicht signifikant; * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; Die angegebenen Fehler entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.1.2 Nachweis von Podozytenmarkern auf Proteinebene durch Immunzytochemie

Nephtrin

Mit Hilfe der Immunzytochemie mit einem α -Nephtrin-Antikörper von Acris (Bp5030) und dem passenden Fluoreszenz-markierten FITC-konjugierten 2. Antikörper von Sigma (F6261) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) konnte der Nachweis von Nephtrin in primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-}) erbracht werden (Abbildung 35). Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Als Negativkontrolle fungierten Endothelzellen der Zelllinie ISO-HAS (Hemangiosarcomazellen, Masuzawa et al. 1999), bei denen keine Proteine durch spezifische Antikörper detektiert wurden, sondern lediglich die Zellkerne sichtbar waren. Beim Vergleich aller drei Podozyten-Genotypen ist außerdem die geringere Zellgröße der PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten, im Vergleich zu den anderen Genotypen, auffällig. Durch die Färbung mit Nephtrin-spezifischen Antikörpern, sowie durch die Zellform, konnten die isolierten Podozyten eindeutig identifiziert werden.

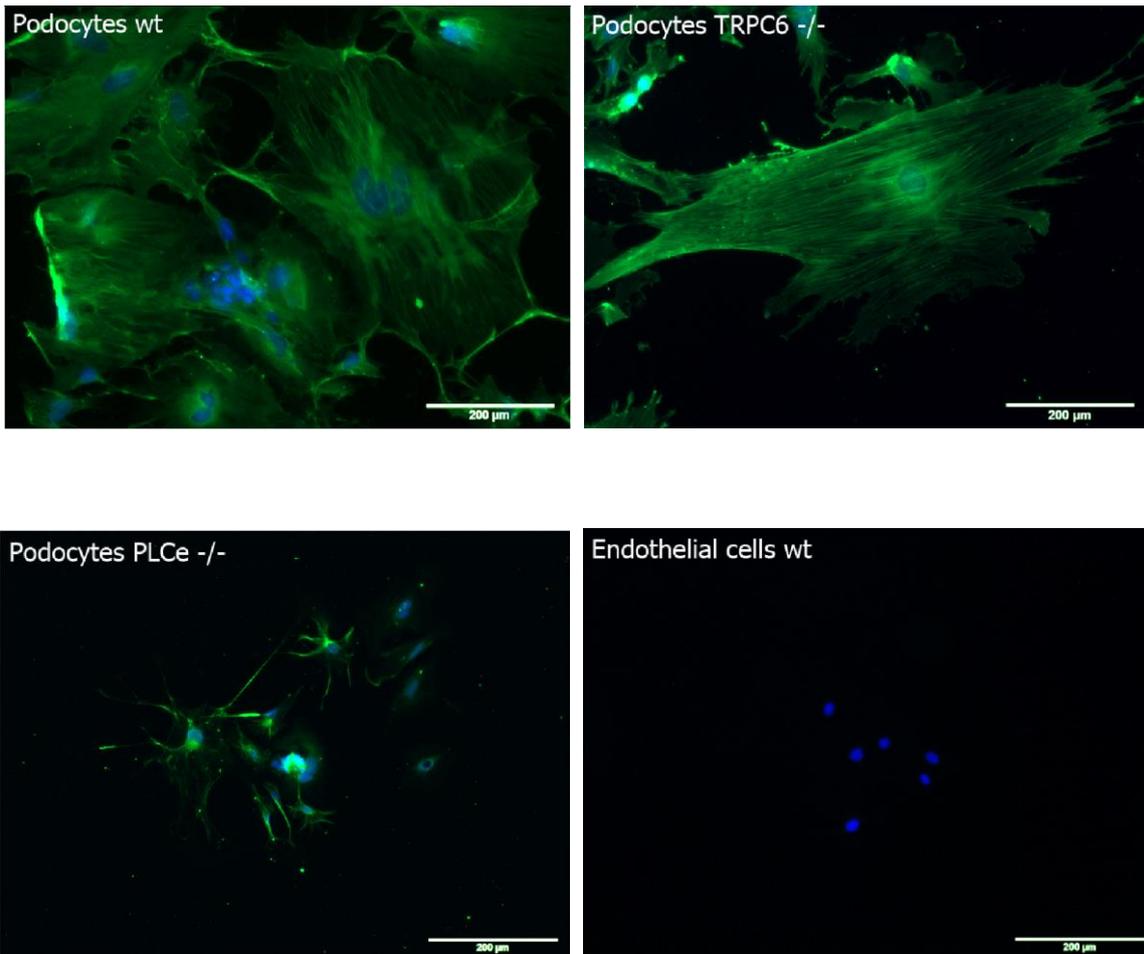


Abbildung 35: Nachweis von Nephrin durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

Podozyten (podocytes) aus Mäusen verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) zeigen eine deutliche Anfärbung mit dem Nephrin-Antikörper (grün). PLCε^{-/-}-Podozyten sind aus unbekanntem Grund aber deutlich kleiner. Endothelzellen zeigen hingegen lediglich die Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342. Der Maßstab entspricht 200 μm.

Eine zusätzliche Färbung der WT-Podozyten aus Abbildung 35 mit dem TRITC-gekoppelten Pilzgift Phalloidin zeigt außerdem deutliche Unterschiede der Lokalisation von Aktin (rot) und Nephrin (grün) (Abbildung 36). Hier wird deutlich, dass Nephrin im lockeren Zellverband, im Gegensatz zu Aktin, vermehrt an den Zellrändern anzutreffen ist (Abbildung 36 a, oben). Im dichteren Zellverband scheint Aktin, zusätzlich zu Nephrin, die Zellränder zu stabilisieren (Abbildung 36 b, unten).

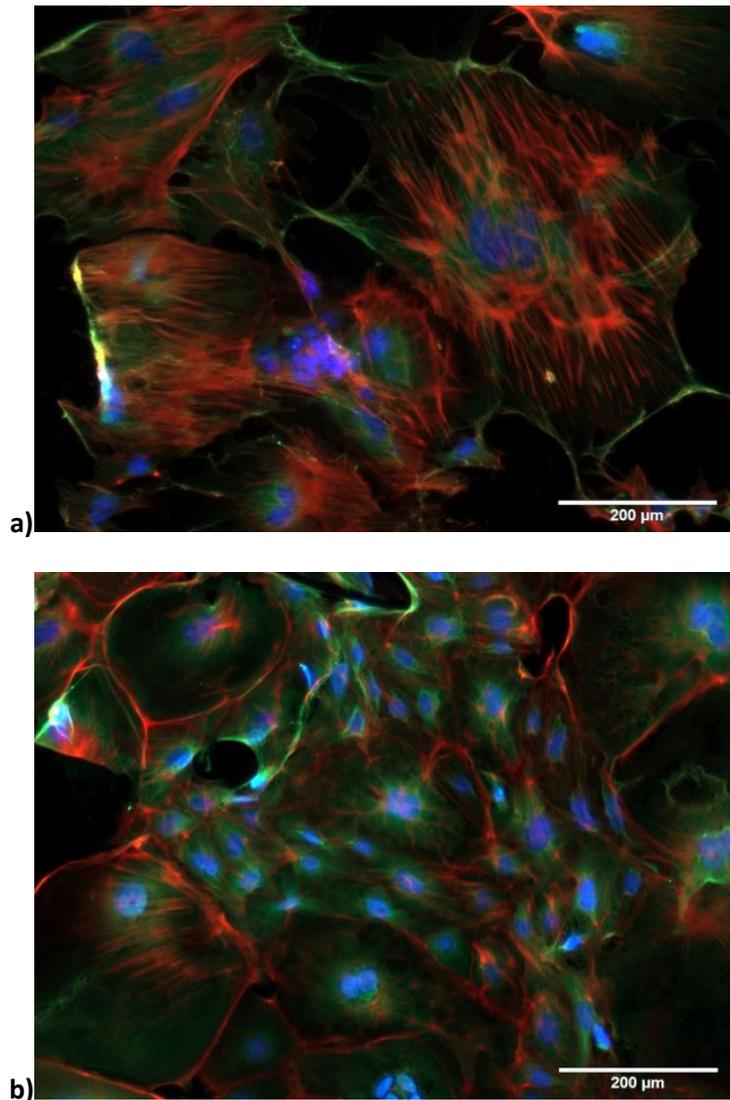


Abbildung 36: Nachweis von Nephrin (grün) und Aktin (rot) durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären WT-Podozyten im lockeren (a) und dichten (b) Zellverband.

Färbung von Aktin (rot) und Nephrin (grün) mit einem Fluoreszenz-gekoppelten 2. Antikörper und Hoechst 33342 (blau) von WT-Podozyten im a) lockeren Zellverband. b) dichten Zellverband. Der Maßstab entspricht 200 μm.

Podocin

Mit dem α -Podocin-Antikörper von Sigma (P0372) und dem passenden Alexa 488-konjugierten 2. Antikörper von Invitrogen (A11008) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) konnte der Nachweis von Podocin in den primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-}) erbracht werden (Abbildung 37). Der Zellkern wurde dabei mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Als Negativkontrolle fungierten, wie bei der Färbung mit dem Nephrin-Antikörper, Endothelzellen der Zelllinie ISO-HAS, bei denen lediglich die Zellkerne sichtbar waren. Was beim Vergleich aller drei Podozyten-Genotypen erneut auffiel, ist der ausgeprägte Größenunterschied der PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten im Vergleich zu den

anderen Genotypen. Auch durch die Färbung mit dem Podocin-spezifischen Antikörper, sowie durch die Zellform, konnten die isolierten Podozyten eindeutig identifiziert werden.

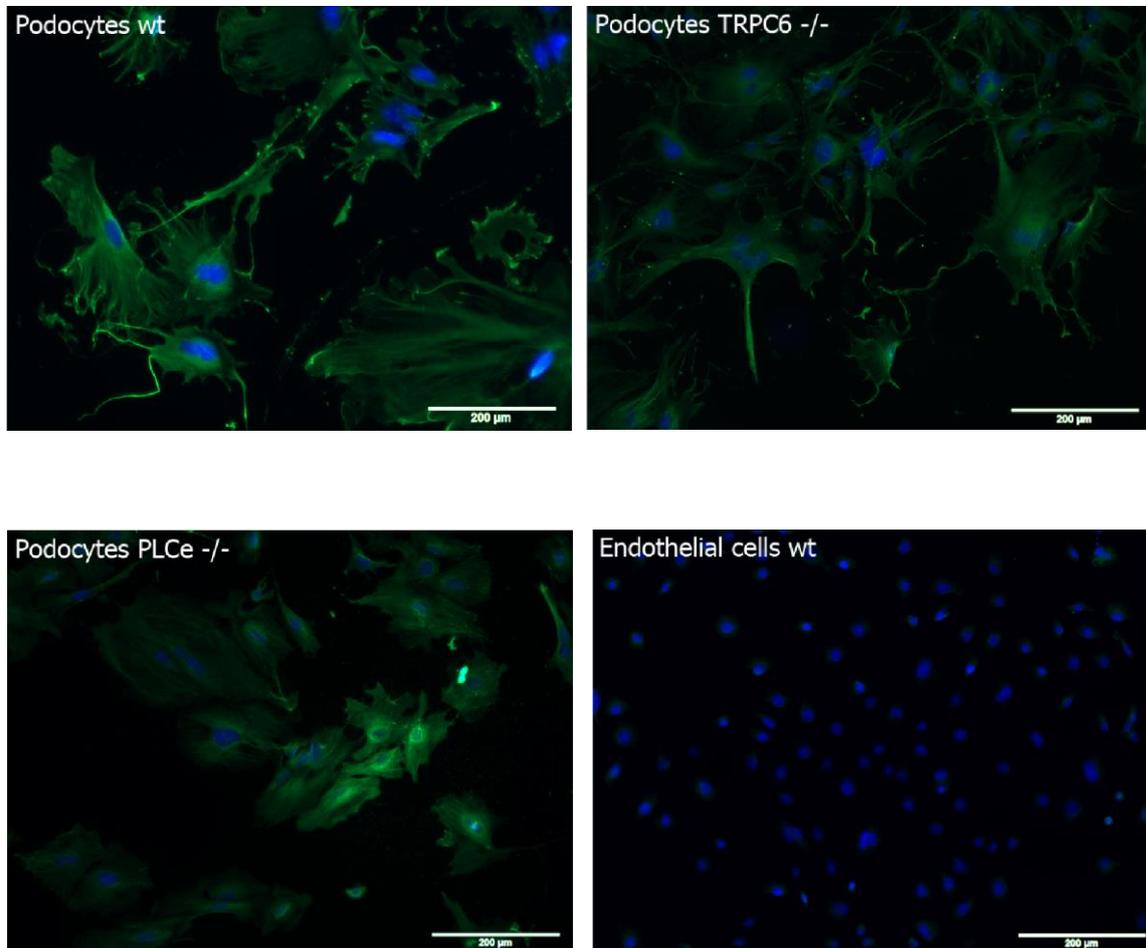


Abbildung 37: Nachweis von Podocin durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

Podozyten (podocytes) aus Mäusen verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCe^{-/-}) zeigen eine deutliche Anfärbung mit dem Podocin-Antikörper (grün). PLCe^{-/-}-Podozyten sind aus unbekanntem Grund aber deutlich kleiner. Endothelzellen zeigen hingegen lediglich die Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342. Der Maßstab entspricht 200 µm.

WT1

Mit dem WT1-Antikörper von Santa Cruz (SC (C-19) -192) und dem passenden Alexa 488-konjugierten 2. Antikörper von Invitrogen (A11008) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) konnte auch WT1 in den primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCe^{-/-}) nachgewiesen werden (Abbildung 38). Die Färbung war allerdings weniger intensiv, als die mit Nephrin- und Podocin-Antikörpern. Auch bei der WT1-Färbung wurde der Zellkern mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Als Negativkontrolle fungierten, wie bei den vorherigen Färbungen, Endothelzellen der Zelllinie ISO-HAS, bei denen lediglich die Zellkerne sichtbar waren. Auch durch die Färbung mit

dem WT1-spezifischen Antikörper, sowie durch die Zellform, konnten die isolierten Podozyten eindeutig identifiziert werden.

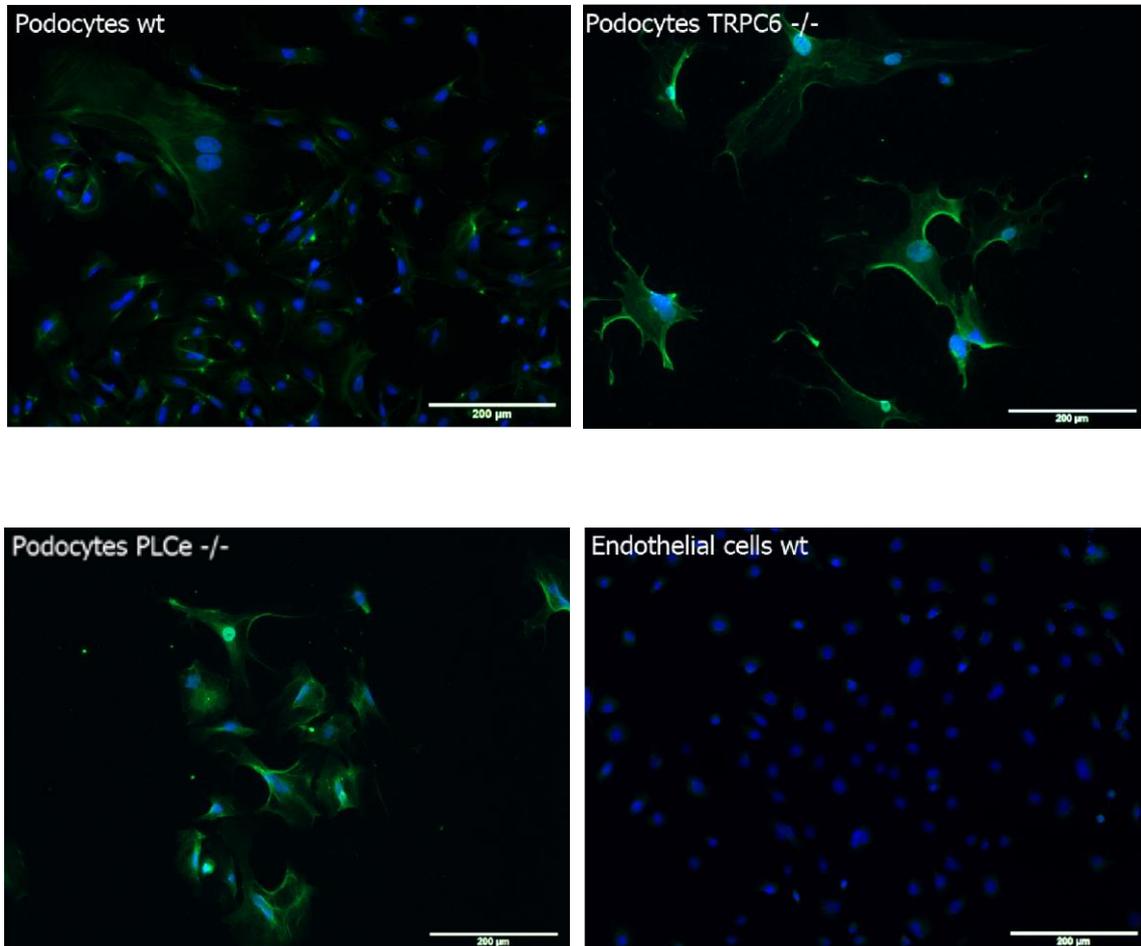


Abbildung 38: Nachweis von WT1 durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

Podozyten (podocytes) aus Mäusen verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCe^{-/-}) zeigen eine deutliche Anfärbung mit dem WT1-Antikörper (grün). Endothelzellen zeigen hingegen lediglich die Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342. Der Maßstab entspricht 200 μm.

Synaptopodin

Mit dem Synaptopodin-Antikörper von Santa Cruz (C19-192) und dem passenden FITC-konjugierten 2. Antikörper von Sigma (F9006) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) konnte zudem Synaptopodin in den primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCe^{-/-}) nachgewiesen werden (Abbildung 39). Die Synaptopodin-Färbung war allerdings weniger intensiv, als die mit Nephrin- und Podocin-Antikörpern. Auch bei der Synaptopodin-Färbung wurde der Zellkern mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Als Negativkontrolle fungierten, wie bei den vorherigen Färbungen, Endothelzellen der Zelllinie ISO-HAS, bei denen lediglich die Zellkerne sichtbar waren. Auch durch die Färbung mit

Synaptopodin-spezifischen Antikörpern, sowie durch die Zellform, konnten die isolierten Podozyten eindeutig identifiziert werden.

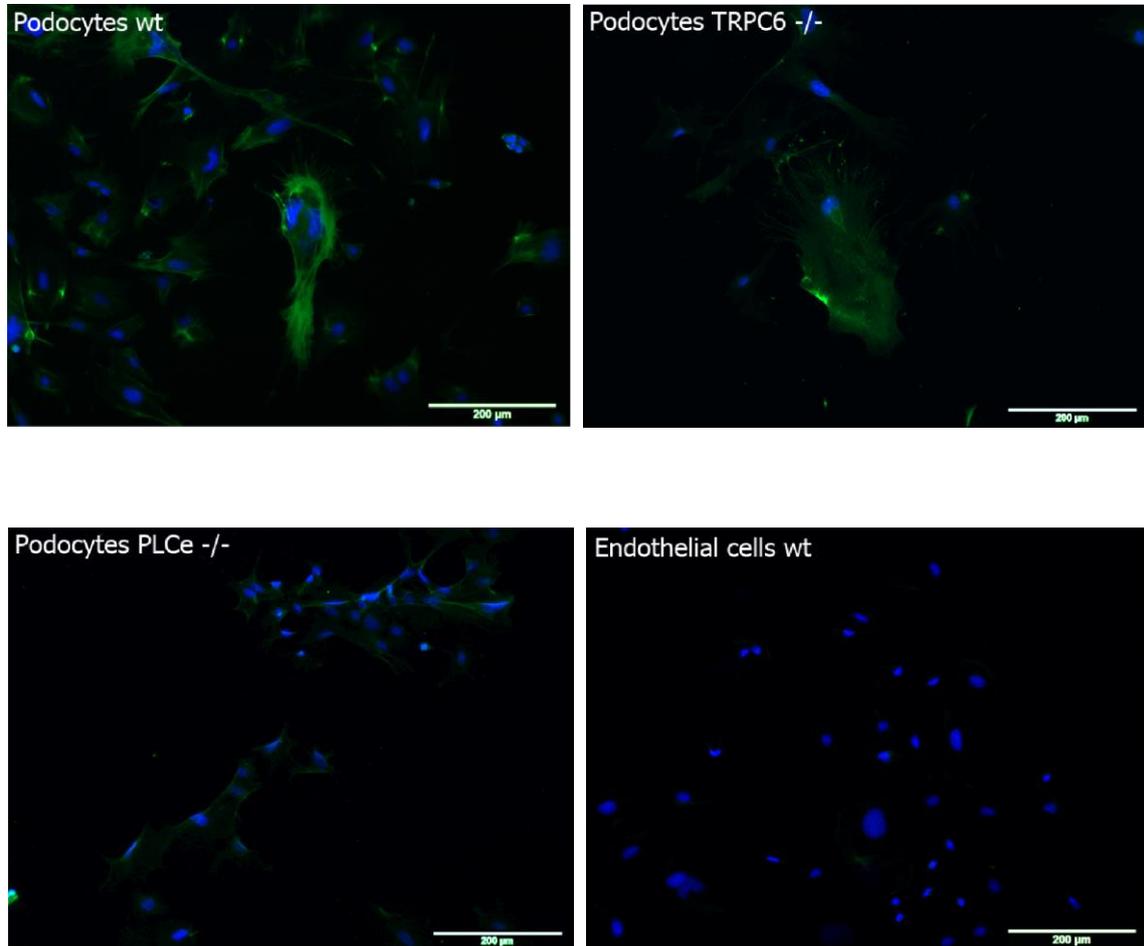


Abbildung 39: Nachweis von Synaptopodin durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

Podozyten (podocytes) aus Mäusen verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) zeigen eine deutliche Anfarbung mit dem Synaptopodin-Antikörper (grün). Endothelzellen zeigen hingegen lediglich die Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342. Der Maßstab entspricht 200 µm.

CD144

Wie erwartet konnte mittels α -CD144-Antikörper von Cell Signaling (D87F2) und dem passenden Alexa 488-konjugierten 2. Antikörper von Invitrogen (A11008) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) gezeigt werden, dass VE-Cadherine in Endothelzellen der Zelllinie ISO-HAS exprimiert werden. Bei den primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) wurde kein CD144 nachgewiesen, es handelte sich demnach nicht um Endothelzellen oder deren Abkömmlinge (Abbildung 40). Der Zellkern wurde, wie bei den anderen Versuchen, mit Hoechst 33342 gegengefärbt.

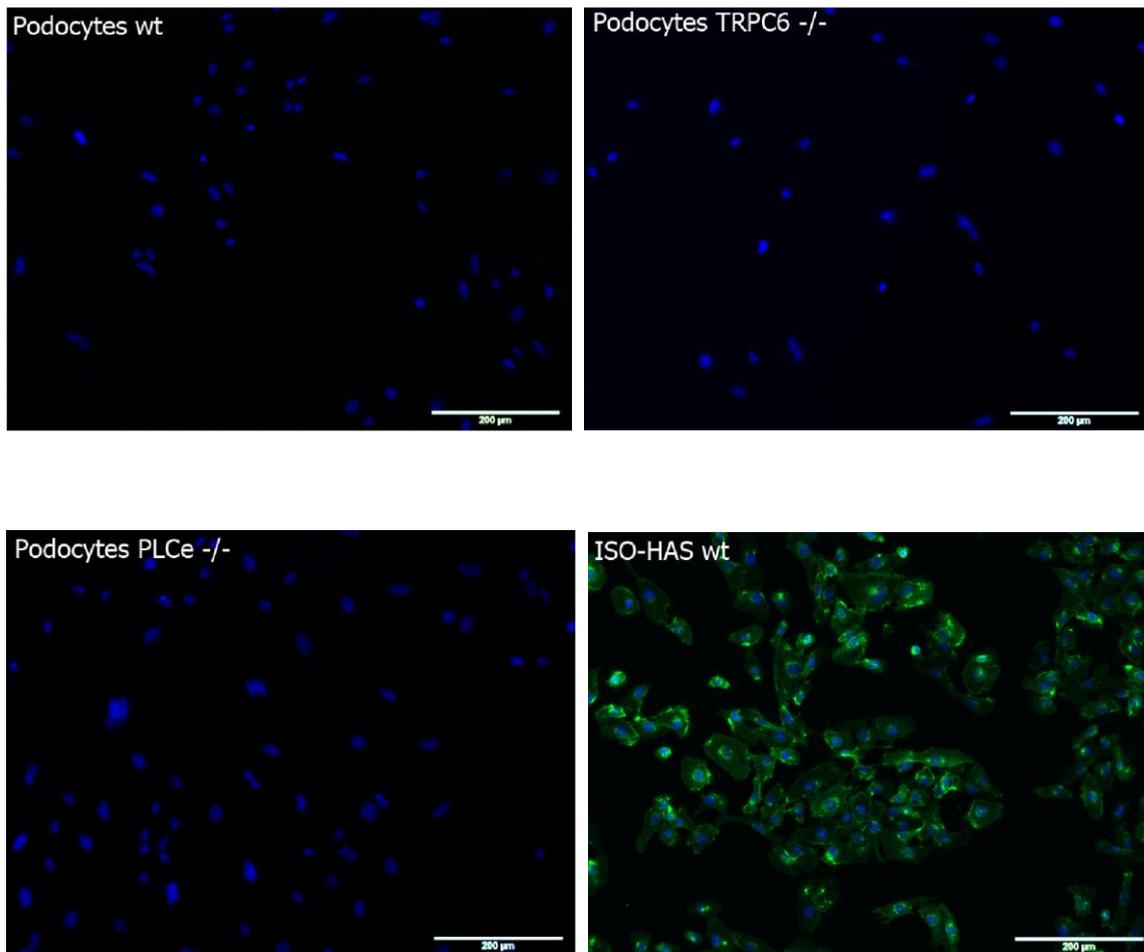


Abbildung 40: Nachweis von CD144 durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

Podozyten (podocytes) aus Mäusen verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) zeigen keine Anfarbung mit dem CD144-Antikörper sondern lediglich die blaue Zellkernfärbung durch Hoechst 33342. Endothelzellen zeigen hingegen zusätzlich eine deutliche Anfarbung mit dem CD144-Antikörper. Der Maßstab entspricht 200 µm.

α-sma („alpha-smooth-muscle-actin“)

Da α-sma in Muskelzellen, nicht aber in Podozyten vorkommt, wurde nun die Positivkontrolle durch primär isolierte Mesangialzellen von Sebastian Kubanek ersetzt. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen α-sma von Sigma (A2547) und dem passenden FITC-konjugierten 2. Antikörper der gleichen Firma (F9006) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) konnte α-sma in primär isolierten WT-Mesangialzellen, nicht jedoch in primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}), nachgewiesen werden (Abbildung 41). Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 gegengefärbt.

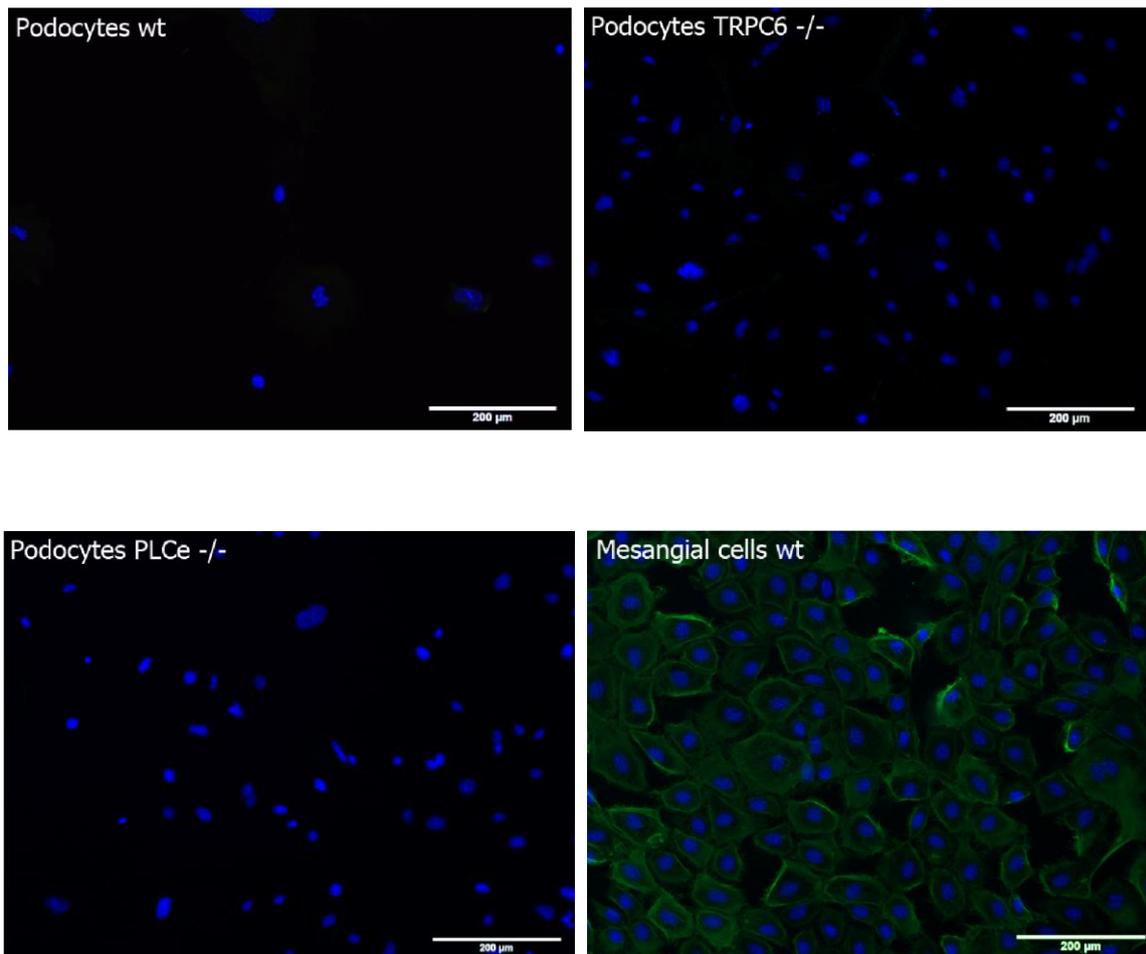


Abbildung 41: Nachweis von α -sma durch Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

Podozyten (podocytes) aus Mäusen verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) zeigen keine Anfärbung mit dem α -sma-Antikörper sondern lediglich die blaue Zellkernfärbung von Hoechst 33342. Mesangialzellen (mesangial cells) zeigen hingegen zusätzlich eine deutliche Anfärbung mit dem α -sma-Antikörper. Der Maßstab entspricht 200 μ m.

3.1.3 Nachweis von Podozytenmarkern auf Proteinebene durch „Western Blot“

Nephrin

Mit Hilfe des „Immunoblots“ („Western Blot“) mit einem α -Nephrin-Antikörper von Acris (Bp5030) und dem passenden HRP (Meerrettich-Peroxidase)-konjugierten 2. Antikörper der gleichen Firma (R1322HRP) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) zeigte sich, dass Nephrin mit einem Molekulargewicht von 185 kDa in den primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT (5), TRPC6^{-/-} (1) und PLCε^{-/-} (2)) exprimiert wird (Abbildung 42). Eine Ladekontrolle wurde mit Hilfe des HRP-gekoppelten β -Aktin-Antikörpers von Sigma (A3854-HRP) durchgeführt. Als Negativkontrolle fungierten sowohl primär isolierte WT-SMC (3) (von Katharina Hofmann), als auch primär isolierte WT-Mesangialzellen

(6). Die Bande der Mesangialzellen (6) zeigt in Abbildung 42 einen Abstand zu den anderen Banden, da mehrere unbedeutende Banden herausgeschnitten wurden. Es handelt sich jedoch um den selben „Western Blot“. Die Ergebnisse zeigten weitere deutliche Hinweise darauf, dass die primär isolierten Zellen (Spuren 1, 2 und 5) tatsächlich Podozyten waren.

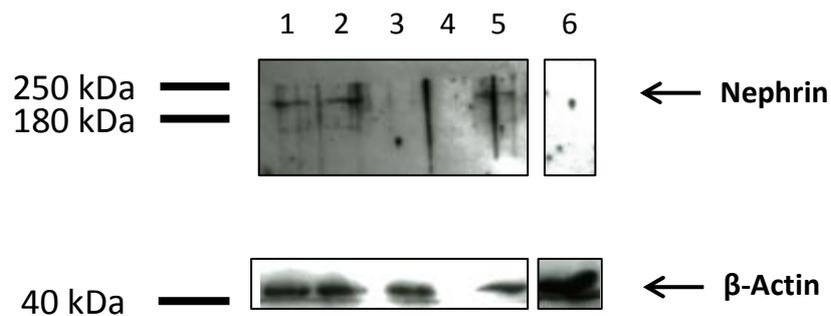


Abbildung 42: Nachweis von Nephrin durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

In Podozytenlysaten aus Mäusen verschiedener Genotypen (Wildtyp (WT), TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) wird durch einen spezifischen Nephrin-Antikörper eine Proteinbande bei 185 kDa sichtbar. Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells = SMC) und Mesangialzellen zeigen hingegen keine markierten Proteinbanden in diesem Größenbereich. Die Ladekontrolle zeigt β-Aktin (β-Actin). Spuren: 1) TRPC6^{-/-}-Podozyten; 2) PLCε^{-/-}-Podozyten; 3) WT-SMC; 4) leer; 5) WT-Podozyten; 6) WT-Mesangialzellen;

Podocin

Mit Hilfe der „Immunoblots“ mit einem α-Podocin-Antikörper von Sigma (P0372) und dem passenden HRP-konjugierten 2. Antikörper der gleichen Firma (A6154) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) wurde der Nachweis von Podocin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa in primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT (3), TRPC6^{-/-} (4) und PLCε^{-/-} (5)) erbracht (Abbildung 43). Die Ladekontrolle wurde mit Hilfe des HRP-gekoppelten α-β-Aktin-Antikörpers von Sigma (A3854-HRP) durchgeführt. Als Negativkontrolle fungierten sowohl primär isolierte WT-SMC (1) (Katharina Hofmann), als auch primär isolierte WT-Mesangialzellen (6). Auch durch diesen „Western Blot“ wurde die Identität der Podozyten bestätigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PLCε^{-/-}-Podozyten, aus unbekanntem Gründen, weniger Podocin exprimieren als die Podozyten der anderen zwei Genotypen.

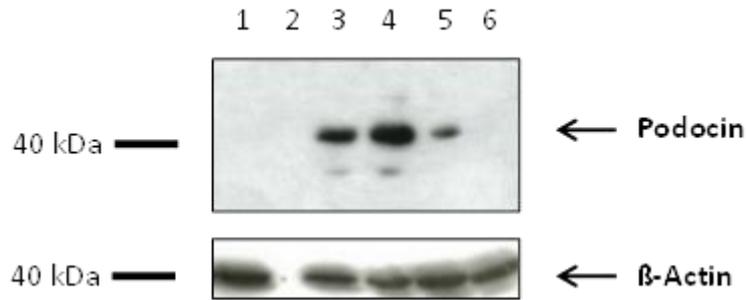


Abbildung 43: Nachweis von Podocin durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

In Podozytenlysaten aus Mäusen verschiedener Genotypen (Wildtyp (WT), $TRPC6^{-/-}$ und $PLC\epsilon^{-/-}$) wird durch einen spezifischen Podocin-Antikörper eine Proteinbande bei 42 kDa sichtbar. Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells = SMC) und Mesangialzellen zeigen hingegen keine markierten Proteinbanden in diesem Größenbereich. Die Ladekontrolle zeigt β -Aktin (β -Actin). Spuren: 1) WT-SMC; 2) leer; 3) WT-Podozyten; 4) $TRPC6^{-/-}$ -Podozyten; 5) $PLC\epsilon^{-/-}$ -Podozyten; 6) WT-Mesangialzellen;

WT1

Der „Western Blot“ mit dem α -WT1-Antikörper von Santa Cruz (SC (C-19) -192) und dem passenden HRP-konjugierten 2. Antikörper der gleichen Firma (SC2004) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) zeigte, dass WT1 mit einem Molekulargewicht zwischen 53 und 75 kDa (je nach Isoform) in den primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT (1), $TRPC6^{-/-}$ (2) und $PLC\epsilon^{-/-}$ (3)) vorhanden ist (Abbildung 44). Die Ladekontrolle wurde mit einem α -Vinculin-Antikörper von Sigma (V9131) und einem passenden HRP-gekoppelten 2. Antikörper von Cell Signaling (# 7076) durchgeführt. Als Negativkontrolle fungierten sowohl primär isolierte WT-SMC (5) (Katharina Hofmann), als auch primär isolierte WT-Mesangialzellen (4). Die Banden der Negativkontrollen (5 und 6) zeigen in Abbildung 44 einen Abstand zu den anderen Banden, da mehrere unbedeutende Banden herausgeschnitten wurden. Es handelt sich jedoch um den selben „Western Blot“. Die Ergebnisse zeigten weitere deutliche Hinweise darauf, dass die primär isolierten Zellen (Spuren 1, 2 und 3) tatsächlich Podozyten sind.

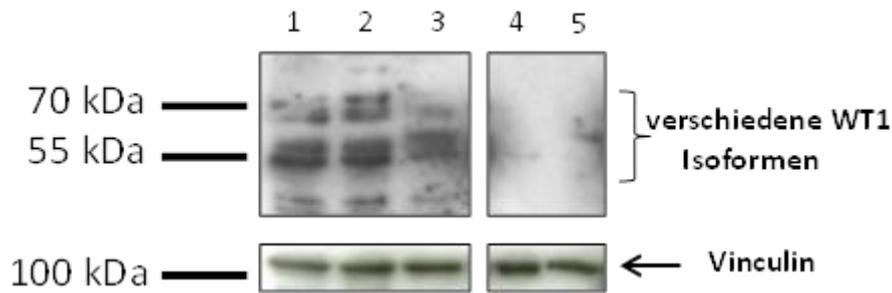


Abbildung 44: Nachweis von WT1 durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

In Podozytenlysaten aus Mäusen verschiedener Genotypen (Wildtyp (WT), TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) werden durch einen spezifischen WT1-Antikörper mehrere Proteinbanden zwischen 53 und 75 kDa sichtbar (verschiedene Isoformen). Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells = SMC) und Mesangialzellen zeigen hingegen keine markierten Proteinbanden in diesem Größenbereich. Die Ladekontrolle zeigt Vinculin. Spuren: 1) WT-Podozyten; 2) TRPC6^{-/-}-Podozyten; 3) PLCε^{-/-}-Podozyten; 4) WT-Mesangialzellen; 5) WT-SMC;

Synaptopodin

Der α-Synaptopodin-Antikörper von Acris (BM5086) und der passende HRP-konjugierten 2. Antikörper von Cell Signaling (# 7076) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) zeigten im „Western Blot“, dass Synaptopodin mit einem Molekulargewicht von 74 und 110 kDa in den primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT (1), TRPC6^{-/-} (2) und PLCε^{-/-} (3)) vorhanden ist (Abbildung 45). Die Ladekontrolle wurde mit einem HRP gekoppelten α-β-Aktin Antikörper von Sigma (A3854) durchgeführt. Als Negativkontrolle fungierten sowohl primär isolierte WT-SMC (4) (Katharina Hofmann), als auch primär isolierte WT-Mesangialzellen (6). Linie 5 blieb frei.

Die Bande der Mesangialzellen (6) zeigt in Abbildung 45 einen Abstand zu den anderen Banden, da mehrere unbedeutende Banden herausgeschnitten wurden. Es handelt sich jedoch um den selben „Western Blot“. Die Ergebnisse zeigten weitere deutliche Hinweise darauf, dass die primär isolierten Zellen (Spuren 1, 2 und 3) tatsächlich Podozyten sind.

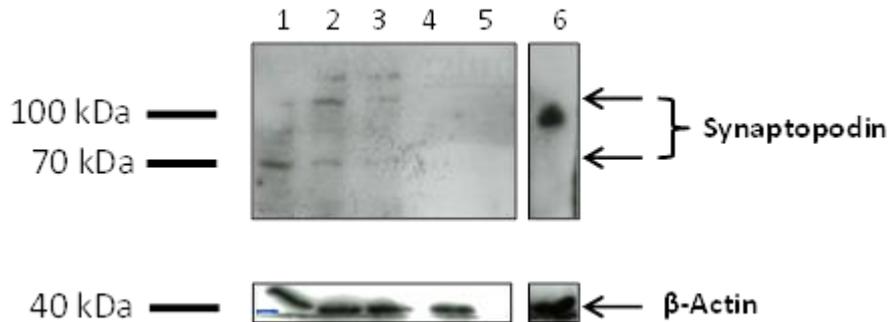


Abbildung 45: Nachweis von Synaptopodin durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

In Podozytenlysaten aus Mäusen verschiedener Genotypen (Wildtyp (WT), TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) werden durch einen spezifischen Synaptopodin-Antikörper Proteinbanden bei 74 und 110 kDa sichtbar. Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells = SMC) und Mesangialzellen zeigen hingegen keine markierten Proteinbanden in diesem Größenbereich. Die Ladekontrolle zeigt β-Aktin (β-Actin). Spuren: 1) WT-Podozyten; 2) TRPC6^{-/-}-Podozyten; 3) PLCε^{-/-}-Podozyten; 4) WT-SMC; 5) leer; 6) WT-Mesangialzellen;

CD144

Mit Hilfe des α-CD144-Antikörpers von Cell Signalling (D87F2) und dem passenden HRP-konjugierten 2. Antikörper von Sigma (A6154) (Vergleiche Abschnitt 2.1.1) gelang es, CD144 mit einem Molekulargewicht von 140 kDa in der Endothelzelllinie ISO-HAS (4) nachzuweisen (Abbildung 46). In primär isolierten Podozyten aller drei Genotypen (WT (1), TRPC6^{-/-} (2) und PLCε^{-/-} (3)) konnte das Protein nicht nachgewiesen werden (Abbildung 46). Es handelte sich also nicht um Endothelzellen oder deren Abkömmlinge. Die Ladekontrolle wurde mit Hilfe des α-Vinculin-Antikörpers von Sigma (AV9131) und dem passenden HRP-gekoppelten 2. Antikörper von Cell Signaling (# 7076) durchgeführt. Als Positivkontrolle fungierten die bereits erwähnten Endothelzellen der Linie ISO-HAS (4).

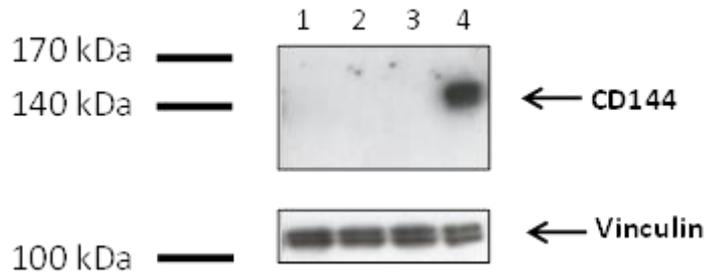


Abbildung 46: Nachweis von CD144 durch „Western Blot“ mit spezifischen Antikörpern in primären Podozyten.

In Podozytenlysaten aus Mäusen verschiedener Genotypen (Wildtyp (WT), TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) wird durch einen spezifischen CD144-Antikörper keine Proteinbande sichtbar. Endothelzellen der Zelllinie ISO-HAS zeigen hingegen eine spezifische Proteinbande bei 140 kDa. Die Ladekontrolle zeigt Vinculin. Spuren: 1) WT-Podozyten; 2) TRPC6^{-/-}-Podozyten; 3) PLCε^{-/-}-Podozyten; 4) ISO-HAS Endothelzellen;

3.2 Funktionelle Charakterisierung der primären Podozyten

3.2.1 Quantitative RT-PCR zur Analyse der TRPC-Expression

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR konnten in den primär isolierter Podozyten der drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) verschiedene Expressionsmuster für die TRPC-Kanäle TRPC1, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 identifiziert werden (siehe Abbildungen 47-50). Für TRPC2, TRPC5 und TRPC7 konnte in Vorversuchen keine Expression in den primär isolierten Podozyten nachgewiesen werden. TRPC2 wurde darüber hinaus beim Menschen nur als Pseudogen beschrieben und ist bei der Maus, sofern bisher bekannt, lediglich für die Pheromonwahrnehmung wichtig (zusammengefasst in Yildirim & Birnbaumer 2007).

Abbildung 47 zeigt, dass die TRPC1 mRNA, im Vergleich zu den anderen TRPC-mRNAs (siehe Abbildung 48-50), am stärksten in primären Podozyten exprimiert wird. Während sich WT-Podozyten hinsichtlich ihrer TRPC1-mRNA Expression nicht von TRPC6^{-/-}-Pododozyten unterschieden, war die TRPC1-Expression in PLCε^{-/-}-Podozyten um mehr als das dreifache erhöht.

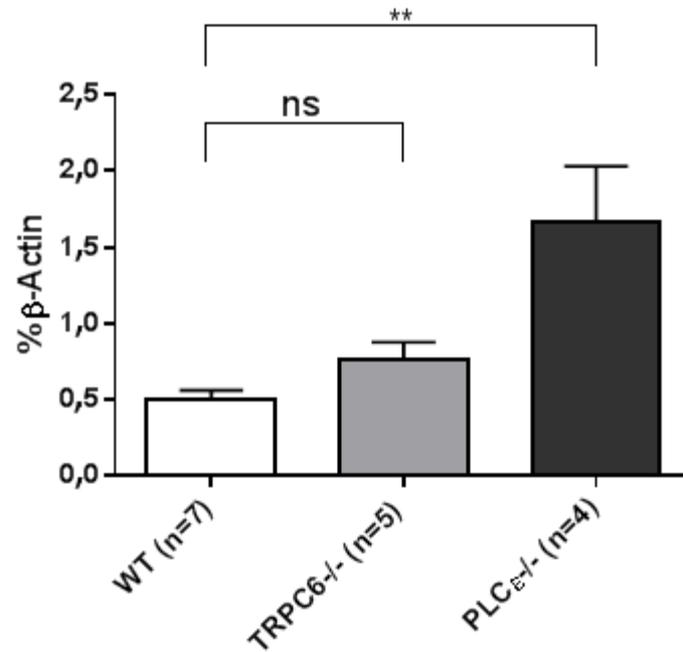


Abbildung 47: Nachweis von TRPC1-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.

Dargestellt ist die relative TRPC1-mRNA Expression im Vergleich mit dem Haushaltsgen β -Aktin (β -Actin) in primär isolierten WT-Podozyten und gendefizienten Podozyten (TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-}). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Betrachtet man hingegen die Expression der mRNA des TRPC3-Kanals, so zeigte sich eine 5-fache Erhöhung in TRPC6^{-/-}-Podozyten im Vergleich zu WT-Podozyten, deren Expression sich nicht signifikant von der in PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten unterschied (Abbildung 48).

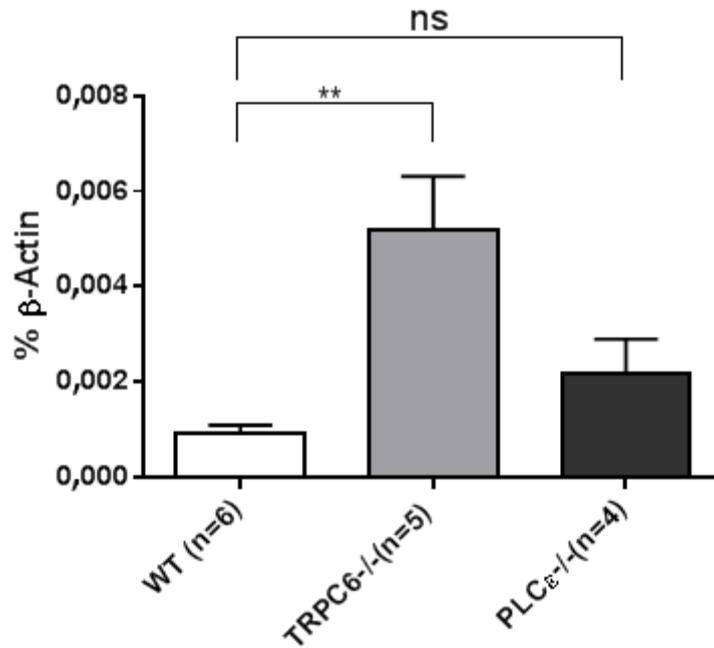


Abbildung 48: Nachweis von TRPC3-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.

Dargestellt ist die relative TRPC3-mRNA Expression im Vergleich mit dem Haushaltsgen β -Aktin (β -Actin) in primär isolierten WT-Podozyten und gendefizienten Podozyten (TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-}). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

In Abbildung 49 werden die Ergebnisse der TRPC4-qRT-PCR dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression in primären Podozyten der Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-}.

Die Ergebnisse der TRPC6-qRT-PCR werden in Abbildung 50 dargestellt. Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen primären WT-Podozyten und primären PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten. TRPC6^{-/-}-Podozyten zeigten hingegen wie erwartet (siehe Dietrich 2005) keine vollständige TRPC6-mRNA, die das deletierte Exon 7 enthält. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen primären WT-Podozyten und primären PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten existieren.

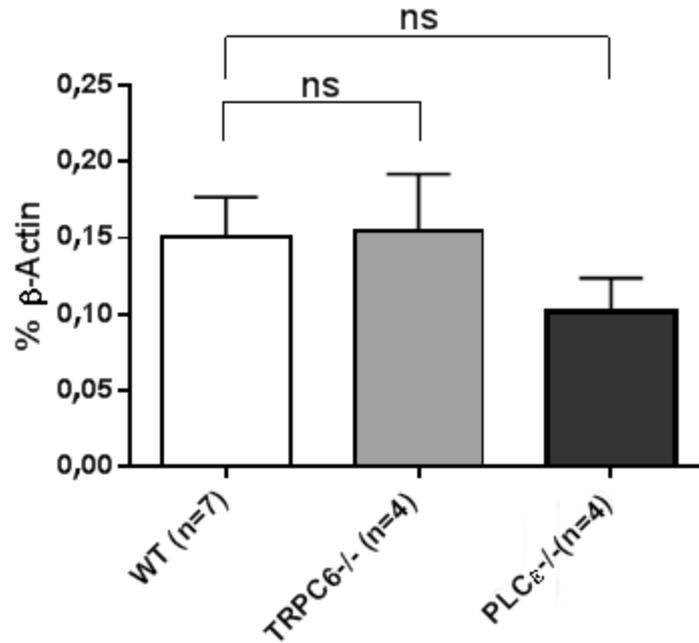


Abbildung 49: Nachweis von TRPC4-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.

Dargestellt ist die relative TRPC4-mRNA Expression im Vergleich mit dem Haushaltsgen β -Aktin (β -Actin) in primär isolierten WT-Podozyten und gendefizienten Podozyten (TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

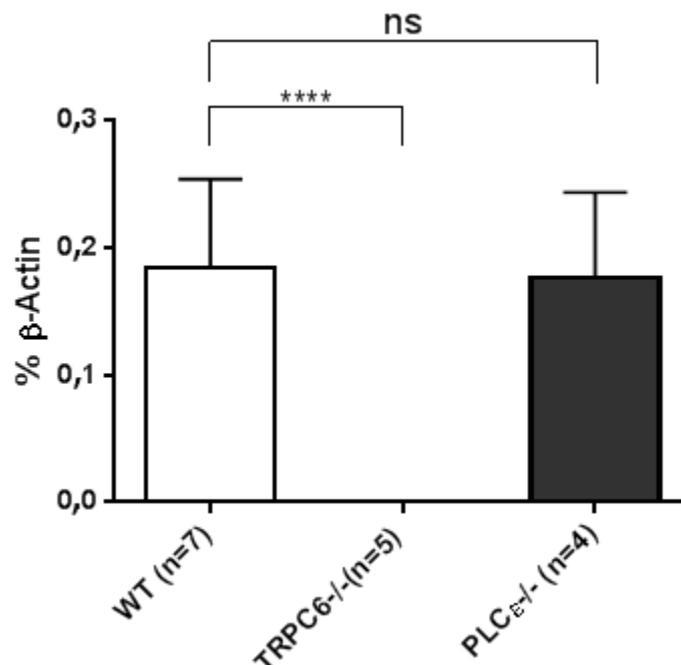


Abbildung 50: Nachweis von TRPC6-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.

Dargestellt ist die relative TRPC6-mRNA Expression im Vergleich mit dem Haushaltsgen β -Aktin (β -Actin) in primär isolierten WT-Podozyten und gendefizienten Podozyten (TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.2 Quantitative RT-PCR zur Analyse der PLC-Expression

Neben der mRNA-Expression der TRPC-Kanäle in den drei Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) der primären Podozyten, wurde auch die Expression der PLCs (PLCβ₁, PLCβ₂, PLCβ₃, PLCβ₄, PLCγ₁, PLCγ₂ und PLCε) untersucht. In Abbildung 51 werden zuerst die schwächer exprimierten PLC-mRNAs dargestellt (<0,3% der β-Aktin-mRNA-Expression). Für die PLCβ₁-mRNA Expression zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den TRPC6^{-/-}- und PLCε^{-/-}-Podozyten im Vergleich zu den WT-Zellen.

Ebenso wenig gab es Unterschiede in der mRNA-Expression von PLCβ₂ in WT- und PLCε^{-/-}-Podozyten. TRPC6^{-/-}-Podozyten wiesen hingegen um etwa das 7-fache mehr PLCβ₂-mRNA auf als WT-Podozyten. Für die PLCε-mRNA Expression gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen primären WT-Podozyten und Zellen des TRPC6^{-/-}-Genotyps. PLCε^{-/-}-Podozyten zeigten hingegen keine Expression einer vollständigen PLCε-mRNA.

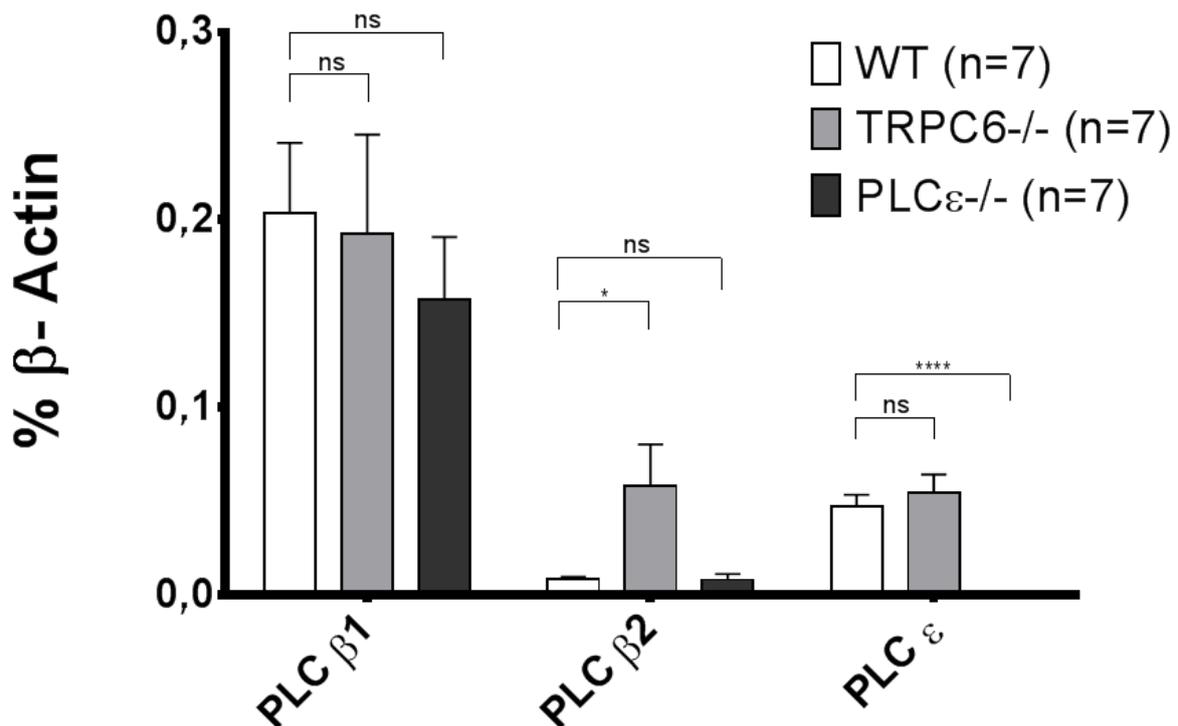


Abbildung 51: Nachweis von PLCβ₁-, PLCβ₂- und PLCε-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.

Dargestellt ist die relative PLCβ₁-, PLCβ₂- und PLCε-mRNA Expression im Vergleich mit dem Haushaltsgen β-Aktin (β-Actin) in primär isolierten WT-Podozyten und gendefizienten Podozyten (TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; * = Signifikanzniveau p < 0,05; **** = Signifikanzniveau p < 0,0001; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Abbildung 52 zeigt die stärker exprimierten PLC-mRNAs in primären Podozyten.

PLC β_3 -mRNA zeigte sich in WT-Podozyten am stärksten exprimiert und wies in TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten eine ca. 26,35% und in PLC $\epsilon^{-/-}$ -Podozyten eine ca. 34,78% geringere Expressionsrate auf.

PLC β_4 -mRNA wurde ebenfalls in primären TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten, um im Mittel 29,32%, geringer exprimiert als in primären WT-Podozyten. Für die PLC γ_1 -mRNA kam es zu keinen Veränderungen der Expression in den drei Genotypen (WT, TRPC6 $^{-/-}$ und PLC $\epsilon^{-/-}$), während die PLC γ_2 -mRNA, sowohl in TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten um ca. 58,63%, als auch in PLC $\epsilon^{-/-}$ -Podozyten um ca. 39,05% geringer exprimiert wurde. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PLC β_2 in TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten signifikant mehr exprimiert wurde als in WT- und PLC $\epsilon^{-/-}$ -Podozyten. PLC β_3 wurde hingegen in WT-Podozyten signifikant stärker exprimiert als in TRPC6 $^{-/-}$ - und PLC $\epsilon^{-/-}$ -Podozyten. Dies war bei PLC γ_2 ebenso der Fall. Bei PLC β_4 zeigte sich lediglich eine verminderte Expression in TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten.

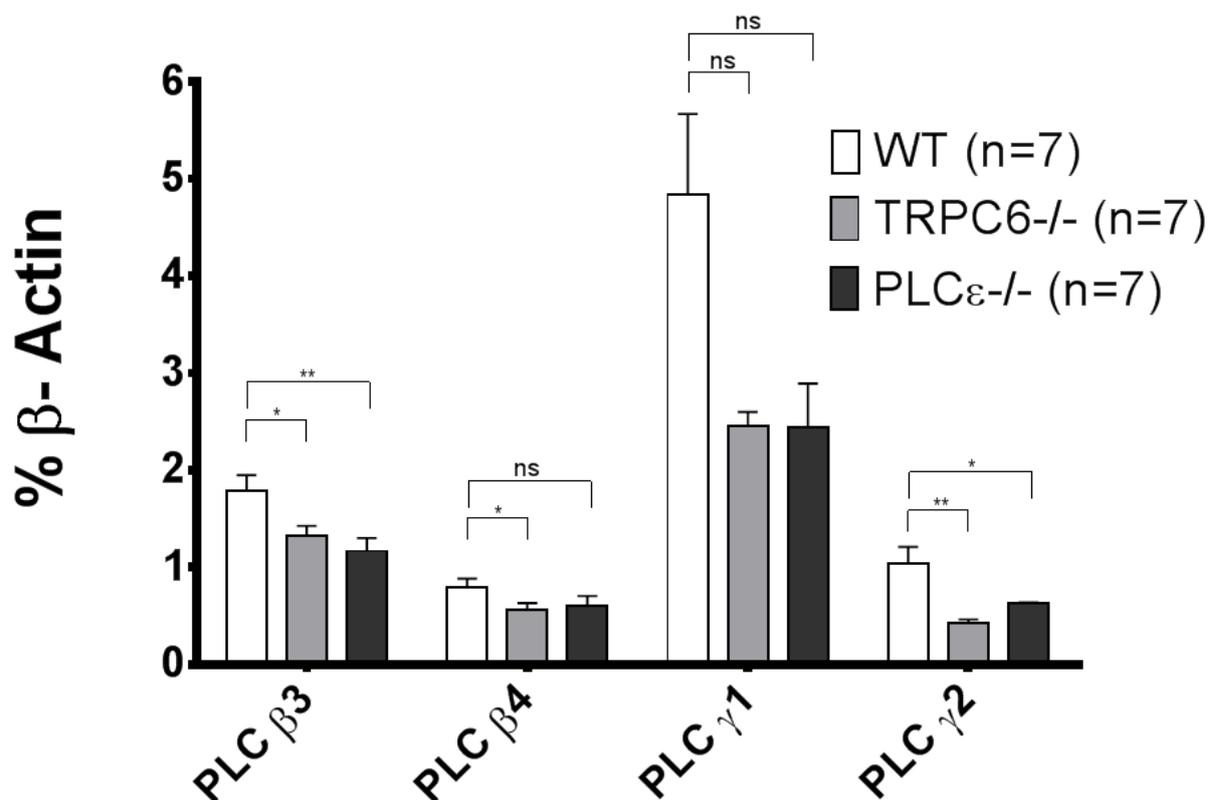


Abbildung 52: Nachweis von PLC β_3 -, PLC β_4 -, PLC γ_1 - und PLC γ_2 -mRNA durch quantitative RT-PCR in primären Podozyten.

Dargestellt ist die relative PLC β_3 -, PLC β_4 -, PLC γ_1 - und PLC γ_2 -mRNA Expression im Vergleich mit dem Haushaltsgen β -Aktin (β -Actin) in primär isolierten WT-Podozyten und gendefizienten Podozyten (TRPC6 $^{-/-}$ und PLC $\epsilon^{-/-}$). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; * = Signifikanzniveau p < 0,05; ** = Signifikanzniveau p < 0,01; **** = Signifikanzniveau p < 0,0001; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.3 DNA-Synthese (Proliferation)

In Abbildung 53 werden Beispielfotos einer Analyse der DNA-Synthese mit Hilfe des Einbaus von Fluoreszenz-markiertem EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine) gezeigt. Die DNA und somit die Zellkerne aller Zellen wurden durch Hoechst 33342 blau angefärbt (a), nur die Zellkerne, die gerade DNA-Synthese vollzogen haben, konnten EdU einbauen und fluoreszierten deshalb zusätzlich grün (b). Die Zahl der DNA-synthetisierenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl ist in (c) durch Überlagerung der beiden Bilder zu erkennen.

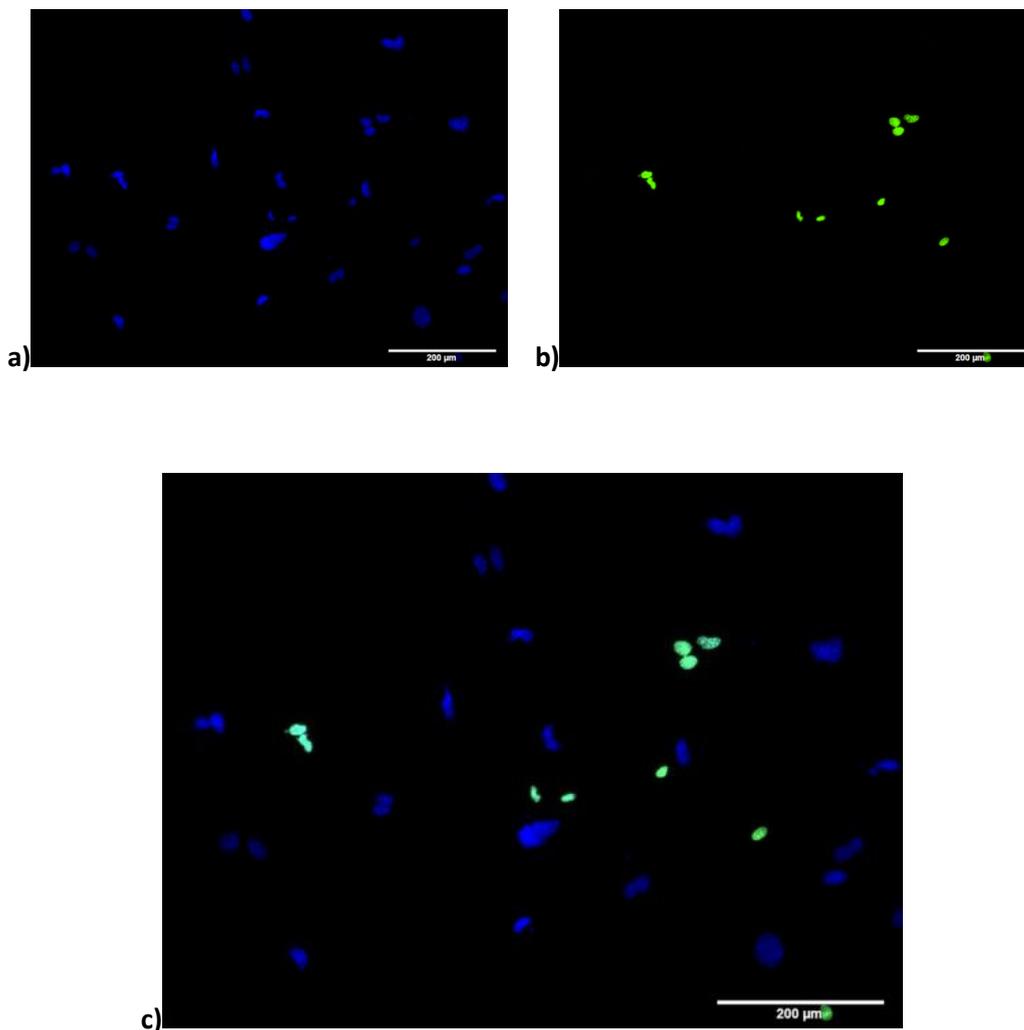


Abbildung 53: Analyse der DNA-Synthese in WT-Podozyten.

a) WT-Podozyten deren Zellkern mit Hoechst 33342 angefärbt wurde (blau). b) Zellkerne der DNA-Synthese aktiven WT-Podozyten (grün). c) Überlagerung beider Bilder aus a und b. Der Maßstab entspricht 200 µm.

Bei der DNA-Syntheserate verschiedener Podozyten-Klone der Zellpassage # 1, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Podozyten (36,78% DNA-Syntheserate) und $PLC\epsilon^{-/-}$ -Podozyten

(35,85% DNA-Syntheserate) (Abbildung 54). TRPC6^{-/-}-Podozyten zeigten jedoch eine deutlich erhöhte DNA-Syntheserate (um ca. 20,48% auf 57,26%) (Abbildung 54). Die DNA-Syntheserate ist unter anderem ein Marker für die Zell-Proliferation, da die DNA-Synthese eine notwendige Voraussetzung für die Zellteilung ist.

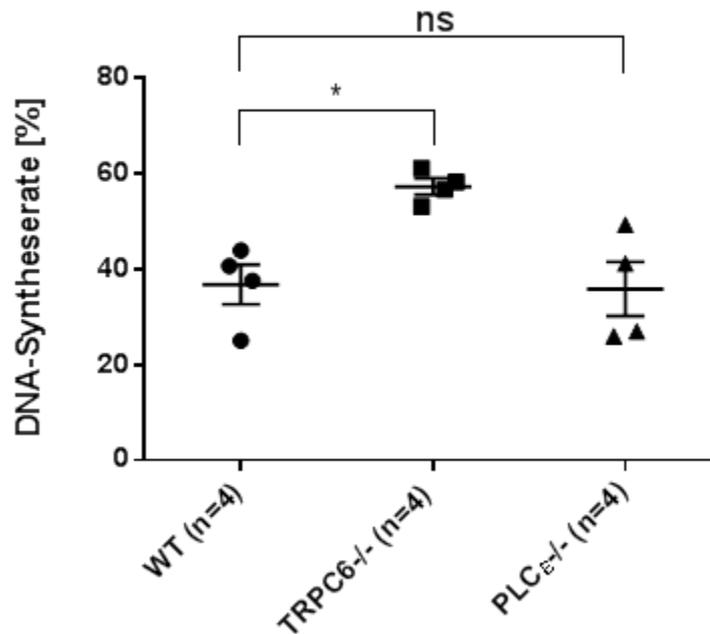


Abbildung 54: Nachweis der DNA-Syntheserate in Podozyten verschiedener Genotypen.

Dargestellt ist die DNA-Syntheserate primär isolierter Podozyten (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; * = Signifikanzniveau p < 0,05; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.4 Quantifizierung der Apoptoserate

In Abbildung 55 sind Beispielfotos zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung als Marker der Apoptoserate mit Hilfe des sog. „TUNEL“ („TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“)-Tests zu sehen. Die Abbildungen a 1, b 1 und c 1 zeigen TRPC6^{-/-}-Podozyten, die Abbildungen a 2, b 2 und c 2 eine Positivkontrolle zur DNA-Fragmentierung durch DNase-Behandlung. Die Abbildungen a zeigen jeweils die Hoechst-Färbung (blau), in b wurden die Zellkerne der Zellen mit DNA-Fragmenten angefärbt (grün). Abbildung c zeigt jeweils die Überlagerung beider Bilder aus den beiden Abbildungen a und b, wodurch die Schnittmenge besser erkennbar ist.

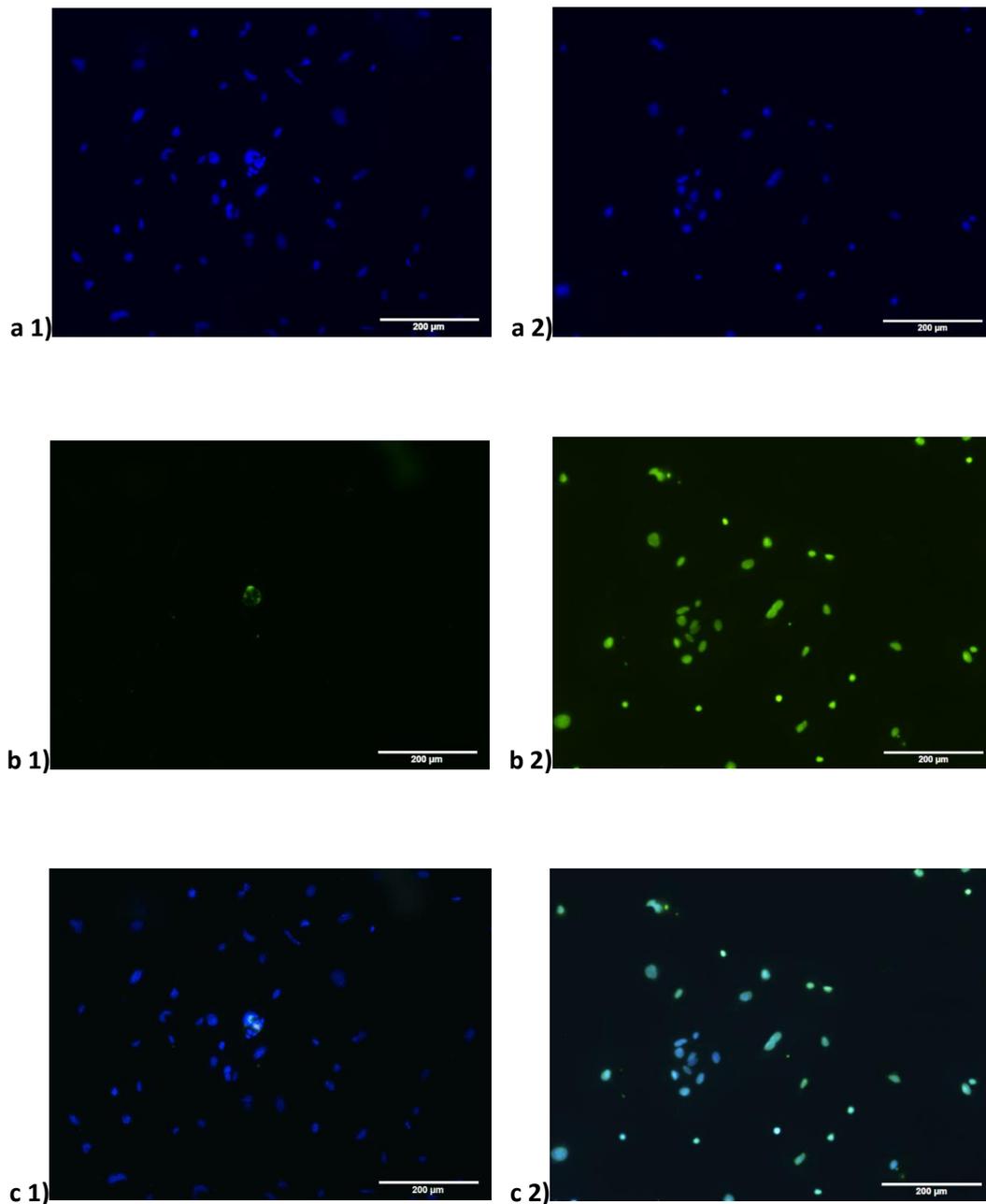


Abbildung 55: Analyse der Apoptoserate in primären TRPC6^{-/-}-Podozyten.

a 1) TRPC6^{-/-}-Podozyten deren Zellkern mit Hoechst 33342 angefärbt wurde. A 2) TRPC6^{-/-}-Podozyten nach DNase-Behandlung und Zellkernfärbung mit Hoechst 33342. b 1) TRPC6^{-/-}-Podozyten mit Anfärbung der apoptotischen Zellkerne (grün). b 2) TRPC6^{-/-}-Podozyten nach DNase-Behandlung mit Anfärbung der apoptotischen Zellkerne (grün). c 1) Überlagerung der Bilder aus a 1 und b 1. c 2) Überlagerung der Bilder aus a 2 und b 2. Der Maßstab entspricht 200 µm.

Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurden mehrere Klone (WT n=5, TRPC6^{-/-} n=4, PLCε^{-/-} n=4) der Zellpassage # 1 ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 56 graphisch dargestellt. Man sieht deutlich, dass WT-Podozyten kaum DNA-Fragmentierung aufwiesen (0,52% Apoptoserate), während die TRPC6^{-/-}-Podozyten mit einem Wert von 1,44% eine signifikant höhere Apoptoserate zeigten. PLCε^{-/-}-Podozyten wiesen mit 3,35% die stärkste Apoptoserate auf. Zusammenfassend lässt sich

feststellen, dass TRPC6^{-/-}-Podozyten signifikant mehr Apoptose aufwiesen als WT-Podozyten, die stärkste Apoptose jedoch in Podozyten des Genotypes PLCε^{-/-} auftrat.

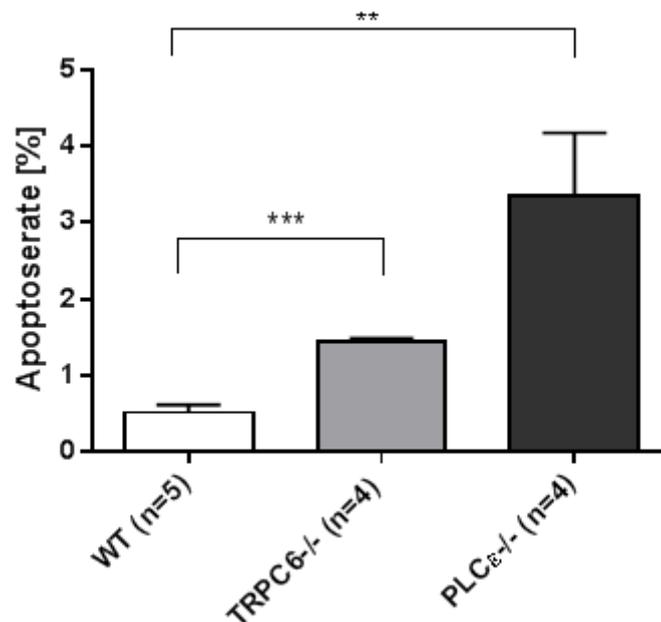


Abbildung 56: Nachweis der Apoptoserate in Podozyten verschiedener Genotypen.

Dargestellt ist die Apoptoserate primär isolierter Podozyten (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}). n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ** = Signifikanzniveau p < 0,01; *** = Signifikanzniveau p < 0,001; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.5 Quantifizierung von Aktinstressfasern

Die Funktion von Podozyten hängt unter anderem vom Aktin-Zytoskelett ab. Veränderungen im Zytoskelett führen langfristig zum Verlust der Fußfortsätze und zu Proteinurie (Kerjaschki 2001).

Deshalb wurde das Aktin-Zytoskelett der verschiedenen Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) durch Quantifizierung der Aktinpolymerisation (Aktinstressfaserbildung) mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Phalloidin vor und nach Gabe eines Rezeptoragonisten (Angiotensin II) untersucht.

Wie in Abbildung 57 erkennbar, zeigten kultivierte WT-Podozyten zwar Aktinstressfaserbildung, jedoch kaum Zellausläufer. Die TRPC6^{-/-}-Podozyten zeigten hingegen eine stärkere Ausbildung von Aktinstressfasern und mehr Zellfortsätze (Abbildung 58). Die in Abbildung 59 gezeigten PLCε^{-/-}-Podozyten ähnelten in Aktinpolymerisation und Ausbildung von Zellausläufern den WT-Podozyten, wenn gleich auch hier der starke Größenunterschied zu den WT-Podozyten auffiel.

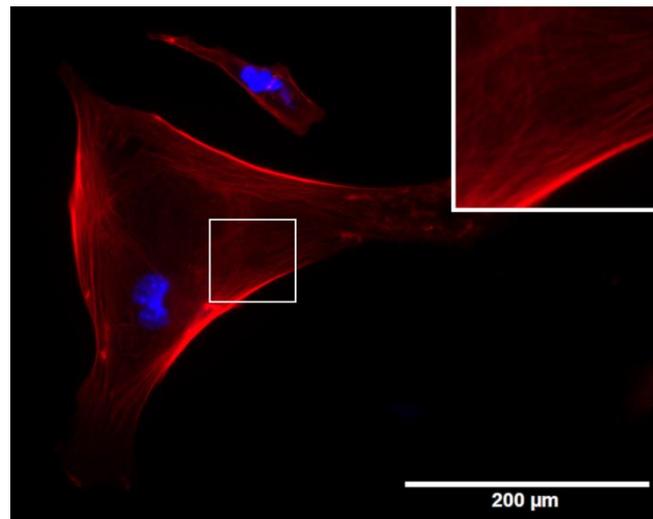


Abbildung 57: Nachweis der Aktinpolymerisation durch Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin bei WT-Podozyten.

Aktinstressfaser-Färbung von WT-Podozyten. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Der Bereich des kleinen weißen Quadrats wurde im oberen rechten Eck vergrößert dargestellt.

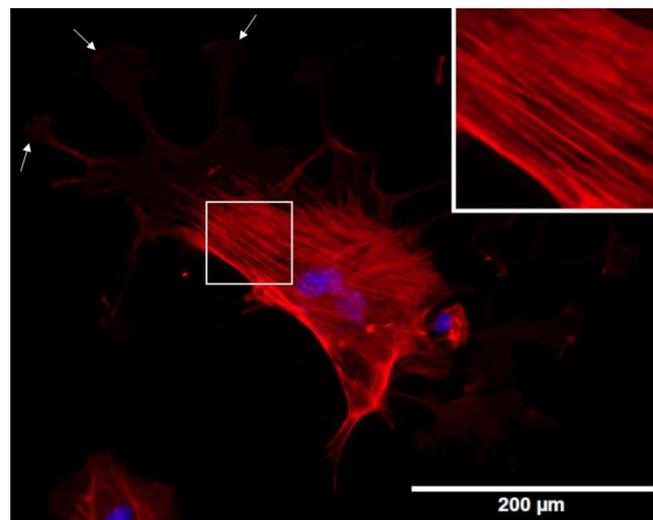


Abbildung 58: Nachweis der Aktinpolymerisation durch Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin bei TRPC6^{-/-}-Podozyten.

Aktinstressfaser-Färbung von TRPC6^{-/-}-Podozyten. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Der Bereich des kleinen weißen Quadrats wurde im oberen rechten Eck vergrößert dargestellt. Die weißen Pfeile deuten auf Zellfortsätze.

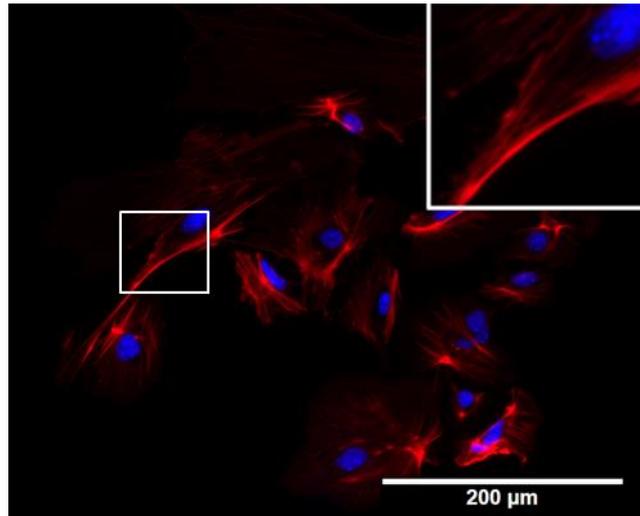


Abbildung 59: Nachweis der Aktinpolymerisation durch Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin bei PLC $\epsilon^{-/-}$ -Podozyten.

Aktinstressfaser-Färbung von PLC $\epsilon^{-/-}$ -Podozyten. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 gegengefärbt. Der Bereich des kleinen weißen Quadrats wurde im oberen rechten Eck vergrößert dargestellt. Auffällig ist die viel geringere Zellgröße im Vergleich zu den anderen Genotypen.

Die Aktinstressfaserbildung wurde anschließend mit einem Computerprogramm der Firma „Olympus“ quantifiziert, indem Bilder in Graustufenwerte konvertiert wurden. Dabei wurde der Messbereich durch Markierung der Plasmamembran definiert. Ein Beispiel für die Auswertung wird in Abbildung 60 gezeigt.

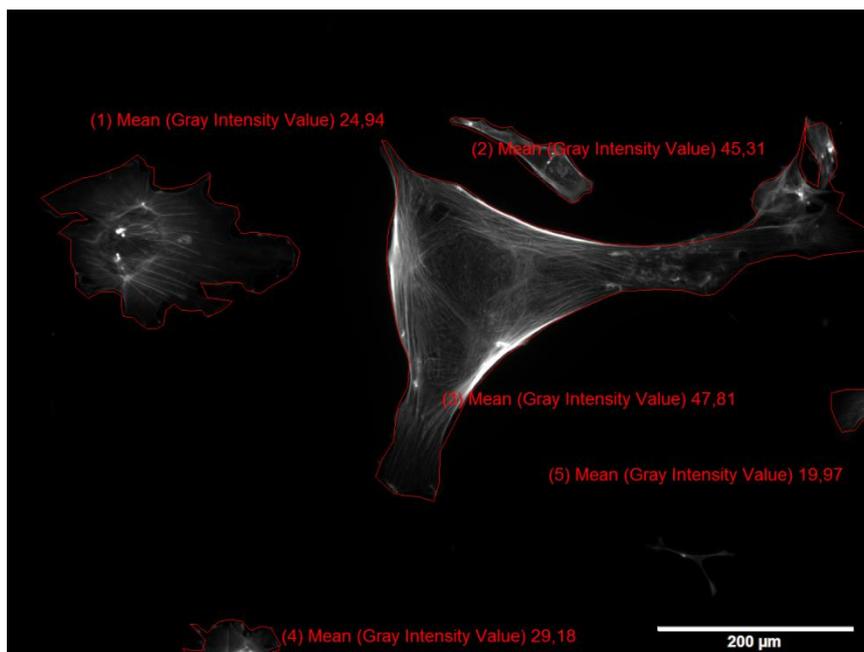


Abbildung 60: Beispielbild für die quantitative Auswertung der Aktinstressfaserpolymerisation.

Die ermittelten Werte für die Aktinpolymerisation werden in Abbildung 61 graphisch dargestellt. Dabei zeigte sich, dass sowohl TRPC6^{-/-}-Podozyten, um ca. 41,68%, als auch PLCε^{-/-}-Podozyten, um ca. 31,44% mehr Stressfasern aufweisen als WT-Podozyten.

Durch die Inkubation mit dem Rezeptoragonist Angiotensin II wurde die Stressfaserbildung in den WT-Podozyten um ca. 39,90% (Graustufenwert erhöhte sich von ca. 28,71 auf ca. 45,99) erhöht (Abbildung 62). Die Behandlung von TRPC6^{-/-}-Podozyten mit Angiotensin II hingegen zeigte keine Erhöhung der Aktinstressfaserbildung, während sich die PLCε^{-/-}-Podozyten wie die WT-Zellen verhielten (Graustufenwert erhöhte sich von ca. 33,75 auf ca. 43,34).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TRPC6^{-/-}-Podozyten von Haus aus signifikant mehr Aktinstressfasern als WT-Podozyten und PLCε^{-/-}-Podozyten aufwiesen. Nach Inkubation mit dem Rezeptoragonisten Angiotensin II ließen sich die Werte in WT- und PLCε^{-/-}-Podozyten jedoch signifikant erhöhen, so dass sie denen der TRPC6^{-/-}-Podozyten ähnelten.

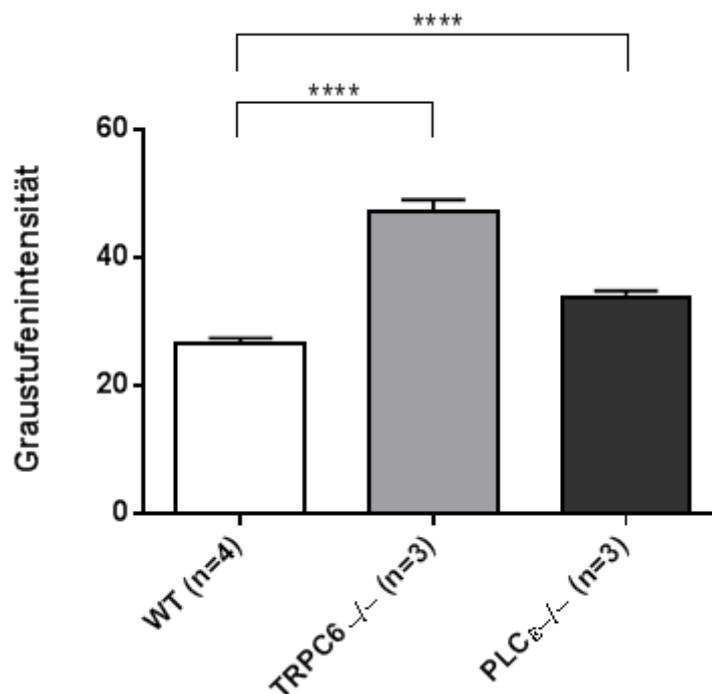


Abbildung 61: Quantifizierung der Aktinstressfaserpolymerisation in primären Podozyten.

Dargestellt ist die Quantifizierung der Aktinstressfaserpolymerisation primär isolierter Podozyten (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) mit Hilfe der Graustufenintensitätsmessung. n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; **** = Signifikanzniveau p < 0,0001; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

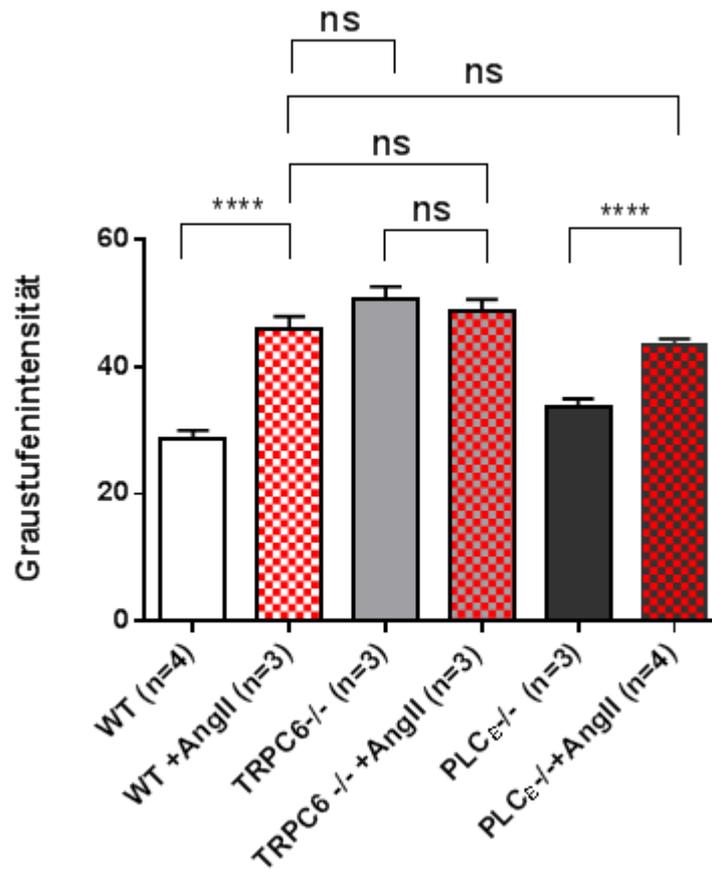


Abbildung 62: Quantifizierung der Aktinstressfaserpolymerisation in primären Podozyten vor und nach Rezeptoraktivierung durch Zugabe von Angiotensin II (AngII).

Die Werte der Zellen ohne Angiotensin II-Behandlung werden in einfarbigen Säulen, die Werte nach Angiotensin II-Behandlung in rot-gemusterten Säulen dargestellt. ns = nicht signifikant; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.6 Bestimmung des aktiven RhoAs (RhoA-GTP)

Das RhoA-Protein wird für die Bildung von Aktinstressfasern verantwortlich gemacht, weshalb in dieser Arbeit die relative Menge an aktivem RhoA (RhoA-GTP) in primären Podozyten der Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-} bestimmt wurde. Die Ergebnisse der RhoA-GTP-Bestimmung, die mit Hilfe des „Assays“ RhoA-G-LISA BK124 der Firma „Cytoskeleton“ (Denver, USA) durchgeführt wurde, werden in Abbildung 63 dargestellt. Die primären WT Podozyten zeigten eine Absorption bei 490 nm von im Mittel 0,119, die primären TRPC6^{-/-}-Podozyten eine geringere Absorption von im Mittel 0,078. Die primären PLCε^{-/-}-Podozyten wiesen mit 0,109 eine ähnliche Absorption wie die WT-Zellen auf. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Menge des aktiven RhoA-GTP zwischen den drei Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}.

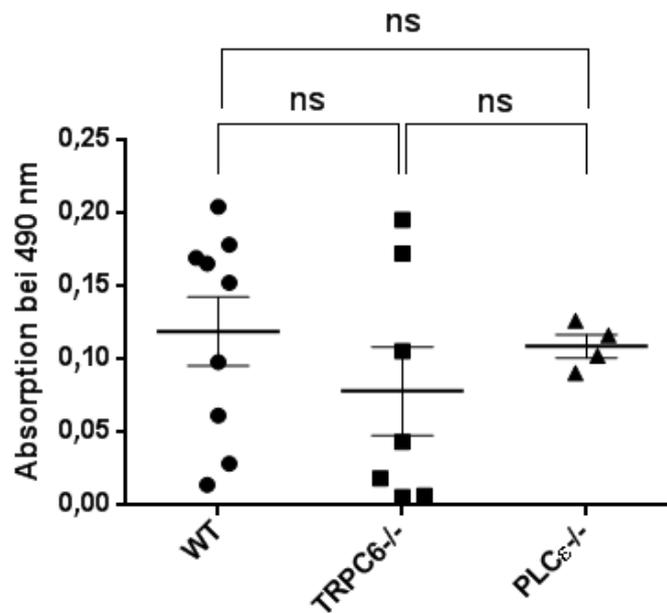


Abbildung 63: Quantifizierung des aktiven RhoA (RhoA-GTP) in primären Podozyten.

Dargestellt ist die Quantifizierung des aktiven RhoA-Proteins (RhoA-GTP) in primären Podozyten (WT (n=9), TRPC6^{-/-} (n=7) und PLCε^{-/-} (n=4)). Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen. n = Anzahl der untersuchten Podozytenklone; ns = nicht signifikant; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.3 Koimmunpräzipitation von TRPC6 mit PLCε

Um die Hypothese zu überprüfen, ob TRPC6 in nativen Zellen mit PLCε kolokalisiert ist, wurden mehrere Koimmunpräzipitationen in stabil transfizierten TRPC6-HA-Hek293-Zellen (Hek293-Zellen in die cDNAs von TRPC6 und Hämagglutinin stabil transfiziert wurden), sowie im Nierencortex durchgeführt. Alle verwendeten Antikörper werden in Abschnitt 2.1.1 näher erläutert.

Die stabil mit TRPC6-HA transfizierten Hek293-Zellen benötigen stets die Menge von 800 µg / ml G418 als Selektionsantibiotikum. Findet sich kein oder zu wenig G418 im Medium, können sich auch Zellen vermehren, die aus diversen Gründen kein TRPC6-HA mehr besitzen, wodurch man in Kürze eine Mischkultur hätte. Die Expression des TRPC6-HA-Komplexes in den stabil transfizierten Hek293-Zellen (6HA) wurde deshalb mit regelmäßigen „Western Blot“-Kontrollen überprüft. Nur Zellen, die dieses Ergebnis zeigten, wurden für weitere Versuche verwendet.

In Abbildung 64 wird gezeigt, dass es möglich war in TRPC6-HA-Hek293-Zellen, die zusätzlich mit PLCε transfiziert wurden, sowohl mit einem Antikörper gegen PLCε (α-PLCε) als auch mit einem Antikörper gegen HA (α-HA) PLCε zu präzipitieren und anschließend im „Western Blot“ nachzuweisen. Die Fällung mit dem Antikörper gegen PLCε fungierte dabei als Positiv- sowie Transfektionskontrolle.

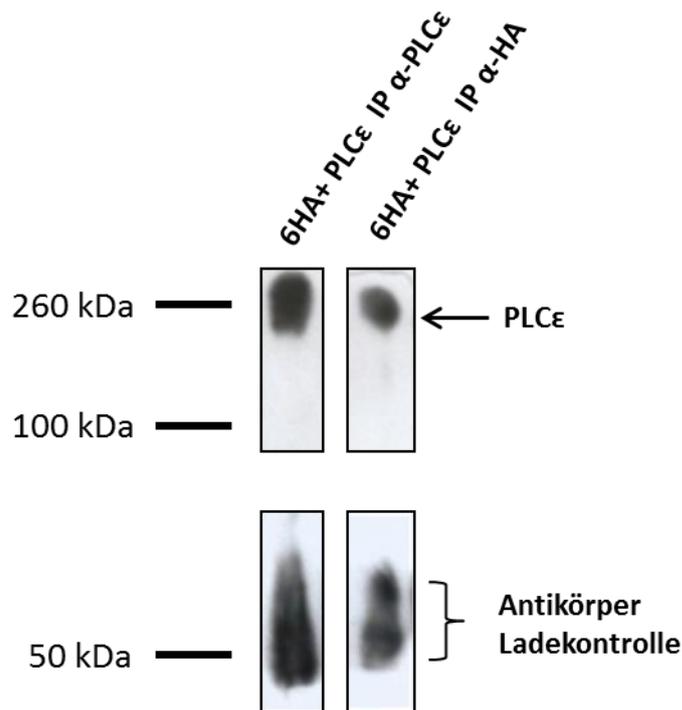


Abbildung 64: PLCε-Nachweis in einer Koimmunpräzipitation mit α-PLCε und α-HA aus 6HA+PLCε exprimierenden Hek293-Zellen.

Dargestellt werden Hek293-Zellen, die stabil TRPC6-HA exprimieren und zusätzlich mit der PLCε-cDNA transfiziert wurden. Es konnte sowohl mit einem Antikörper gegen PLCε (α-PLCε) als auch mit einem Antikörper gegen HA (α-HA) PLCε präzipitiert und im „Western Blot“ nachgewiesen werden. In der Ladekontrolle werden die zur Fällung verwendeten Antikörper gezeigt.

Abbildung 65 zeigt das Experiment aus Abbildung 64 in umgekehrter Weise. In TRPC6-HA-Hek293-Zellen, die zusätzlich mit PLCε transfiziert wurden, wurde sowohl mit einem Antikörper gegen PLCε (α-PLCε) als auch mit einem Antikörper gegen HA (α-HA) der TRPC6-HA-Komplex gefällt und anschließend im „Western Blot“ nachgewiesen. Die Fällung mit dem α-HA Antikörper fungierte dabei als Positivkontrolle.

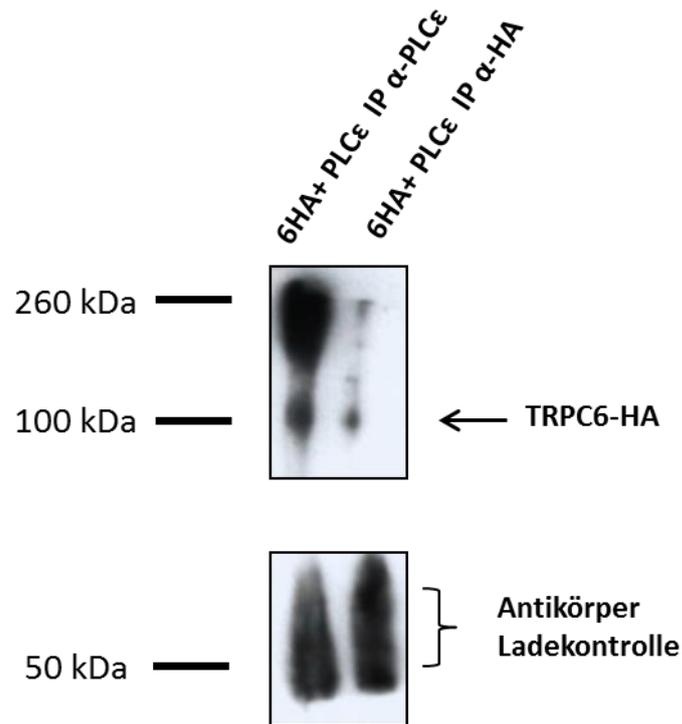


Abbildung 65: HA-Nachweis in einer Koimmunpräzipitation mit α -PLC ϵ und α -HA aus 6HA+PLC ϵ exprimierenden Hek293-Zellen.

Dargestellt werden Hek293-Zellen, die stabil TRPC6-HA exprimieren und zusätzlich mit der PLC ϵ -cDNA transfiziert wurden. Es konnte sowohl mit einem Antikörper gegen PLC ϵ (α -PLC ϵ) als auch mit einem Antikörper gegen HA (α -HA) der TRPC6-HA-Komplex präzipitiert und im „Western Blot“ nachgewiesen werden. In der Ladekontrolle werden die zur Fällung verwendeten Antikörper detektiert.

In Abbildung 66 wird nun gezeigt dass die Kopplung von TRPC6 und PLC ϵ nicht nur in Zellen, die die Proteine heterolog exprimieren, sondern auch im Nierengewebe von Mäusen nachgewiesen werden konnte. TRPC6 konnte dabei mit einem Antikörper gegen PLC ϵ gefällt und im „Western Blot“ nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen waren zum einen eine IgG Kontrolle (Präzipitation mit einem α -GFP Antikörper), sowie Nierencortexgewebe einer TRPC6^{-/-}-Maus (Präzipitation mit einem α -PLC ϵ Antikörper).

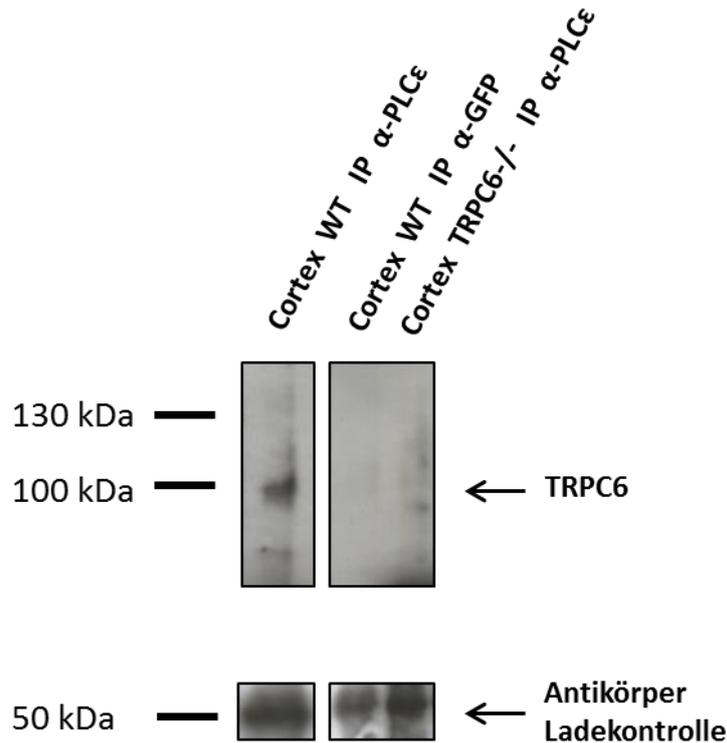


Abbildung 66: TRPC6-Nachweis in einer Koimmunpräzipitation mit α -PLC ϵ und α -GFP-Antikörpern im Nierencortex.

TRPC6 konnte mit einem Antikörper gegen PLC ϵ gefällt und im „Western Blot“ nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen mit einem α -GFP Antikörper, sowie im Nierencortexgewebe einer TRPC6^{-/-}-Maus (Präzipitation mit einem α -PLC ϵ Antikörper) zeigen im „Western Blot“ keine durch den TRPC6-Antikörper zu detektierenden Proteinbanden. In der Ladekontrolle werden die zur Fällung verwendeten Antikörper detektiert.

3.4 In-vitro Mutagenese der TRPC6-cDNA und Klonierung in Expressionsvektoren

Die in-vitro-Mutagenese der TRPC6-cDNA zur Insertion der drei Mutationen (G108S, S269T und M131T; Abschnitt 2.2.5), die in FSGS-Patienten identifiziert worden sind, wurde im Vektor pcDNA3 durchgeführt, der das WT-TRPC6-eGFP in die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI einkloniert hatte. Die DNA der neu generierten Plasmide wurde sowohl durch Restriktionsverdau (*Pst*I, *Bam*HI und *Eco*RI), als auch mittels Sanger-DNA-Sequenzierung (Firma „MWG Eurofins“ und Firma „GATC“) überprüft.

Ein Ethidiumbromid gefärbtes Gel, das DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau von sechs mTRPC6-M131T Klonen zeigt, ist in Abbildung 67 dargestellt. Der *Bam*HI / *Eco*RI (blau) Doppelverdau von TRPC6-eGFP in pcDNA3 resultierte in 2 Fragmenten mit einer Größe von etwa 5,5 und 3,5 kb (siehe Pfeile Abbildung 67). Der Verdau mit dem Enzym *Pst*I (rot) produzierte 4 Fragmente mit einer Größe von etwa 5, 1,7, 1,4 kb und 860 bp (siehe Pfeile Abbildung 67). Alle sechs Klone aus Abbildung 67 zeigen passende Banden auf den richtigen Höhen.

Ob die Mutagenese geklappt hat und die Mutation enthalten ist wurde dann per Sanger-DNA-Sequenzierung (Firma MWG Eurofins und Firma GATC) überprüft (Vergleiche auch Abbildung 69, Sequenzierung in pWPXL).

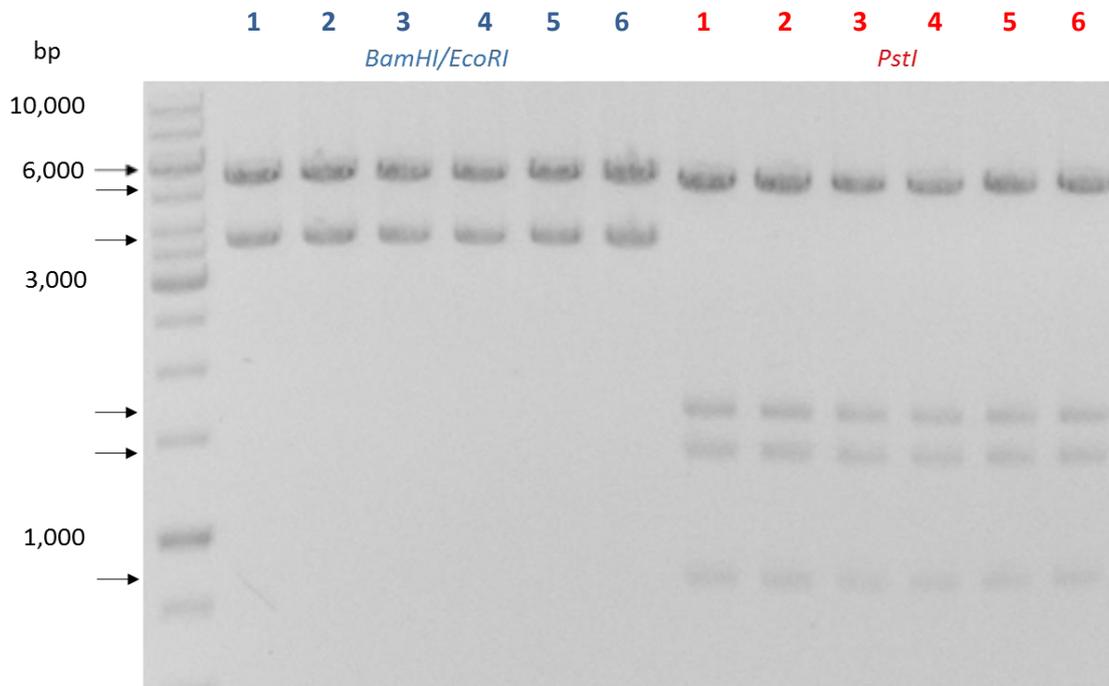


Abbildung 67: Darstellung von DNA-Fragmenten eines Verdau des pcDNA3-TRPC6-M131T-eGFP-Plasmids mit spezifischen Restriktionsenzymen im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

Jeweils sechs verschiedene Plasmide, die die M131T-Mutation im TRPC6-eGFP enthalten sollten, wurden mit den Restriktionsenzymen *BamHI/EcoRI* (blau) bzw. *PstI* (rot) verdaut und 0,25 µg jeder Probe, sowie 3 µg der 1 kb DNA Leiter auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung wurde bei 120 V (konstant) und etwa 300 mAmp für 1,5 h durchgeführt. Der Doppelverdau mit *BamHI/EcoRI* zeigt 2 Fragmente (5,5 kb und 3,5 kb; siehe Pfeile), der Verdau mit *PstI* 4 Fragmente (5 kb; 1,7 kb; 1,4 kb und 860 bp; siehe Pfeile).

Anschließend wurde die korrekte TRPC6-eGFP cDNA und die TRPC6- M131T-eGFP cDNA aus dem pcDNA3 Vektor ausgeschnitten und in den lentiviralen Vektor pWPXL kloniert, wo die cDNAs unter der Kontrolle des humanen „elongation factor alpha“ (EF1-alpha) Promotors und der posttranskriptionalen regulatorischen Elemente des „wood-chuck hepatitis virus“ (WPRE) stehen. Das Ligationsprodukt konnte im Anschluss daran durch Restriktionsverdau mit *BamHI / EcoRI* und *PstI* überprüft werden. In Abbildung 68 werden die DNA-Fragmente des TRPC6-M131T-eGFPs in pWPXL nach dem Restriktionsverdau gezeigt. Das Herausschneiden der TRPC6-M131T-eGFP cDNA durch Verdau mit *BamHI / EcoRI* resultierte in 2 Fragmenten mit etwa 9,7 kb und 3,5 kb (Vergleiche Klon 1 (blau) und 2 (blau) in Abbildung 68). Der Restriktionsverdau mit *PstI* produzierte 4 Fragmente mit Größen von etwa 10,3 kb, 1,6 kb, 860 bp und 500 bp (Vergleiche Klon 1 (rot) und 2 (rot) in

Abbildung 68). Klon 3 zeigte aus unbekanntem Gründen abweichende Fragmentgrößen und konnte nicht für weiterführende Experimente herangezogen werden.

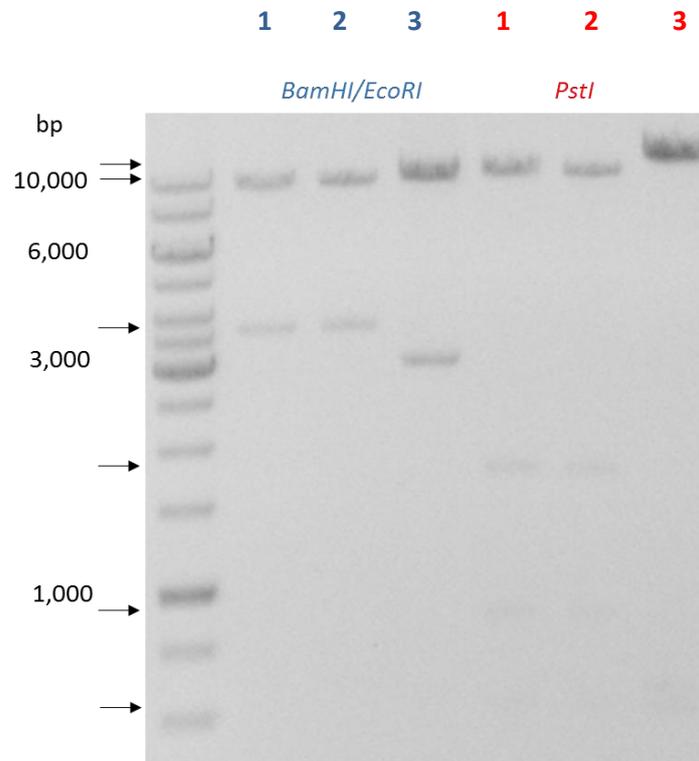


Abbildung 68: Darstellung von DNA-Fragmenten eines Verdau des pWPXL-TRPC6-M131T-eGFP-Plasmids mit spezifischen Restriktionsenzymen im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

Jeweils drei verschiedene Klone, die die M131T-Mutation im TRPC6-eGFP enthalten sollten, wurden mit den Restriktionsenzymen *BamHI/EcoRI* (blau) bzw. *PstI* (rot) verdaut und 0,25 µg jeder Probe, sowie 3 µg der 1 kb DNA Leiter auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung wurde bei 120 V (konstant) und etwa 300 mA für 1,5 h durchgeführt. Der Doppelverdau mit *BamHI/EcoRI* zeigt 2 Fragmente (9,7 kb und 3,5 kb; siehe Pfeile), der Verdau mit *PstI* 4 Fragmente (10,3 kb; 1,6 kb, 860 bp und 500 bp; siehe Pfeile).

Klon 1 und 2 der Mutation M131T, sowie passende Klone der Mutationen G108S und S269T, wurden zur exakten Überprüfung mittels Sanger-DNA-Sequenzierung (Firma „MWG Eurofins“ und Firma „GATC“) eingeschickt. In Abbildung 69 wird ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs der Mutationen G108S, S269T und M131T mit der nicht-mutierten mTRPC6-cDNA (Sequenz aus der Datenbank www.ensembl.com) gezeigt. Die G108S-Mutation in Abbildung 69 zeigte die erwartete Mutation von GGC zu TCC an Position 322 und 323 der Basenpaarsequenz, was im späteren Protein zu einem Austausch der Aminosäure Glycin (G) zu Serin (S) führt. In der M131T-Mutante wurde ATG durch ACG ersetzt, was durch eine Punktmutation an Stelle 392 der Basenpaarsequenz hervorgerufen wird. Dies führt zu einer Substitution von Methionin (M) durch Threonin (T). Die S269T-Mutante zeigte nach

Sequenzierung ebenfalls die erwarteten Veränderungen (TCT zu ACT → Serin (S) zu Threonin (T)). Die mutierten Basen sind jeweils rot unterlegt.

mTRPC6 G108S	<u>GAATAT</u> TCCAACAT
mTRPC6	316<GAATAT <u>GG</u> CAACAT>329
mTRPC6 M131T	<u>TACACGGGCCAGA</u>
mTRPC6	388<TACAT <u>T</u> GGGCCAGA>400
mTRPC6 S296T	<u>Gccaca</u> CTAGATCC
mTRPC6	800<.GCCAC <u>T</u> CTAGATCC>813

Abbildung 69: Sequenzierung der Mutationen in pWPXL und Sequenzvergleich mit mTRPC6.

Die mutierten Basen sind jeweils rot hinterlegt.

In Abbildung 70 wird das lentivirale pWPXL-Vektorplasmid dargestellt. Die Positionen der Mutationen in der mTRPC6-eGFP-cDNA sind markiert.

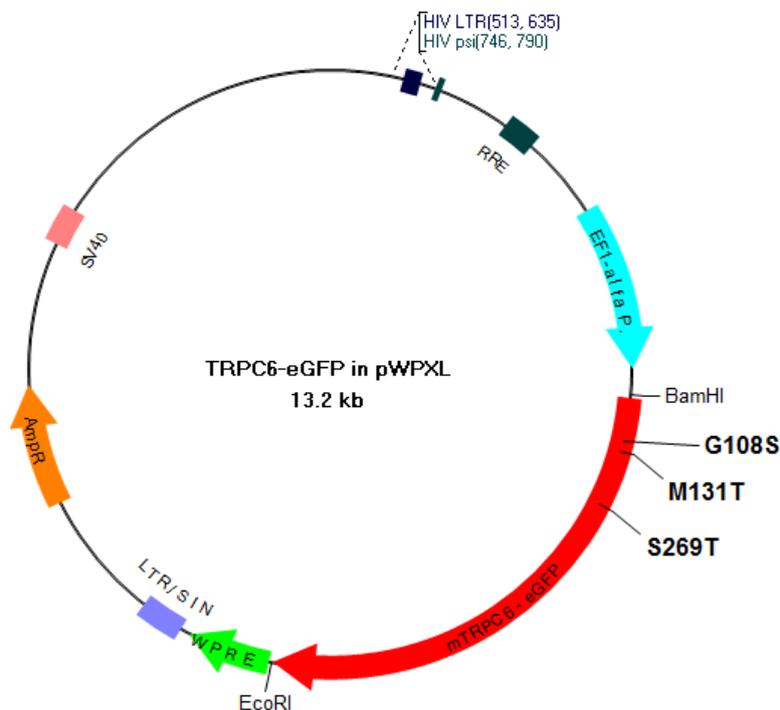


Abbildung 70: Lentiviraler Vektor pWPXL mit mTRPC6-eGFP-cDNA und den jeweiligen Mutationen.

Das mTRPC6-eGFP-Fusionsprotein (mit und ohne Mutationen, rot) steht unter der Regulation des EF1-alpha Promotors (türkis) und dem regulatorischen WPRE-Element (grün). Außerdem besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz (orange), den SV40 Promotor (rosa), die LTR/SIN-Region („self-inactivating long terminal repeat“), den HIV LTR (HIV-„Long terminal repeat“), die HIV psi-Region (psi „packaging signal“) und die RPE-Domäne („Ref-responsive Element“)(Abbildung Susanne Fiedler).

3.5 Expression des mTRPC6 und der M131T-Mutation in Hek293

Zur Überprüfung der heterologen Expression der TRPC6-M131T-Mutation im Vergleich zum WT-mTRPC6 wurden beide DNAs (in pcDNA3) mittels Transfektionsreagenz (Lipofektamin) in Hek293-Zellen transfiziert, die nach 48 h lysiert wurden. Eine Expressionsanalyse durch „Western Blott“ ist in Abbildung 71 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass die Expressionslevel des mTRPC6 und der mTRPC6-M131T-Mutante in Hek293-Zellen in etwa gleich waren. In nicht-transfizierten Hek293-Zellen ließ sich kein TRPC6 nachweisen.

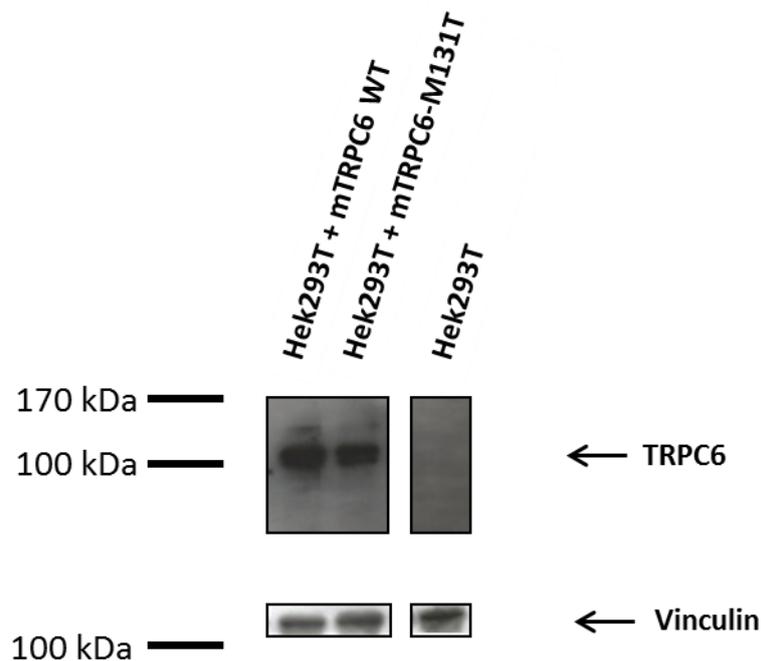


Abbildung 71: TRPC6-Nachweis in Hek293-Zellen, die mit mTRPC6 oder mTRPC6-M131T transfiziert wurden.

In Proteinlysaten aus Hek293-Zellen, die mit WT-TRPC6 oder der M131T-Mutante des TRPC6 transfiziert wurden, wird durch einen spezifischen TRPC6-Antikörper eine Proteinbande bei 100 kDa sichtbar. Untransfizierte Hek293-Zellen zeigen hingegen keine Proteinbanden in diesem Größenbereich. Die Ladekontrolle zeigt Vinculin.

3.6 Analyse der intrazellulären Lokalisation der TRPC6-Mutanten in Hek293

Um zu überprüfen ob das TRPC6-M131T-eGFP-Protein nach der lentiviralen Transfektion, genau wie der WT-TRPC6-eGFP-Kanal, in der Plasmamembran der Zelle exprimiert wird oder in intrazellulären Organellen verbleibt, wurden Hek293-Zellen mittels Lentiviren mit der TRPC6-M131T-eGFP-cDNA

transfiziert. Die Zellen wurden dazu auf Petrischalen mit Glasboden (Dicke 0, Firma „ibidi“) ausgesät und 48 h nach der Transfektion im Konfokallasermikroskop untersucht.

In Abbildung 72 a werden die Zellen in Aufsicht betrachtet. Man sieht deutlich die Expression des grünen TRPC6-M131T-eGFP auf der Oberfläche. Betrachtet man mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie einen Querschnitt durch die Zellen (Abbildung 72 b), wird deutlich, dass auch das mutierte TRPC6-Protein in der Plasmamembran exprimiert wurde. Hier ließ sich im Zytosol der Zelle nur wenig TRPC6-M131T-eGFP detektieren.

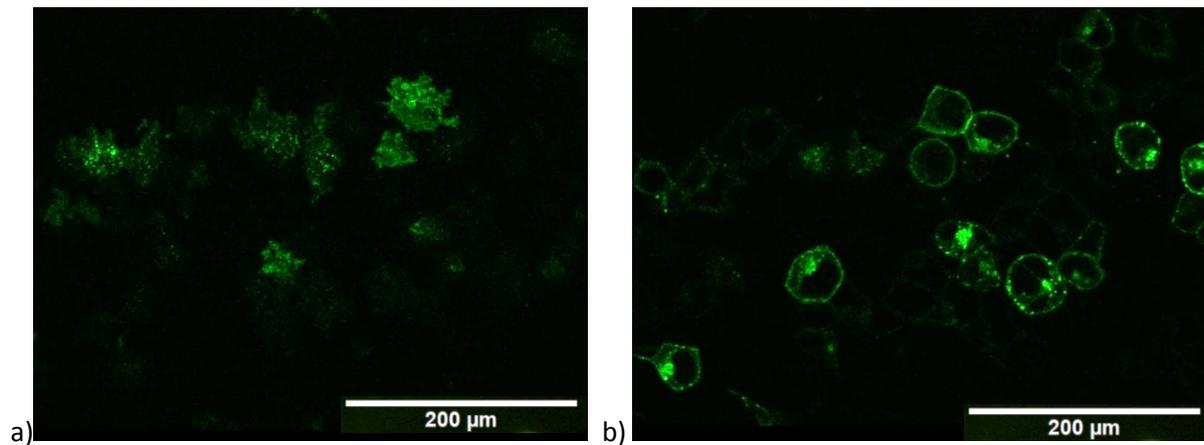


Abbildung 72: Nachweis der Oberflächenexpression von TRPC6-M131T-eGFP in Hek293-Zellen.

a) Expression des TRPC6-M131T-eGFP auf der Oberfläche von Hek293-Zellen (grün); b) Expression des TRPC6-M131T-eGFP am Rand von Hek293-Zellen (grün);

3.7 Transfektion primärer Podozyten mit Plasmiden zur Expression des murinen TRPC6-Kanals und seiner Mutanten

3.7.1 Nicht-virale Methoden

In Tabelle 72 werden die angewandten Methoden und die erreichte Transfektionseffizienz verschiedener Plasmide (pmaxGFP und mTRPC6-eGFP-pcDNA3 (WT-TRPC6)), in primär isolierten Podozyten, aufgelistet.

Tabelle 72: Transfektionseffizienz nicht-viraler Transfektionsmethoden in primäre Podozyten

Methode (Firma)	pmaxGFP	mTRPC6-eGFP-pcDNA3
ScreenFect A (Incella)	45%	0%
Lipofektamin 2000 (Life Technologies)	0%	0%
MACSfectin (MACS)	30%	0%
Nanojuice (Novagen)	6%	0%
Isifect (HISS)	0%	0%
GenomeONE (Cosmo Bio)	25%	0%
Fugene (Promega)	0%	0%
Transit (Mirus)	0%	0%
Neon (Invitrogen)	0%	0%
Nucleofector (Amaxa)	30%	0%

Eine relativ hohe Effizienz erreichte dabei „ScreenFectA“ von „Incella“ (45%) bei der Transfektion primärer Podozyten, allerdings nur mit dem Kontrollplasmid „pmaxGFP“ von „Lonza“. Auch „MACSfectin“ von „MACS“ erreichte mit „pmaxGFP“ eine 30%ige Transfektionseffizienz in den primären Podozyten, genau wie der „Nucleofector“ von „Lonza“, der ebenfalls 30% Effizienz bei der Transfektion des „pmaxGFP“-Plasmides lieferte. Immerhin 25% Effizienz konnte mit „GenomeOne“ von „CosmoBio“ und 6% Effizienz mit „Nanojuice“ von „Novagen“ erreicht werden. Keine der Methoden aus Tabelle 72 lieferte jedoch positive Ergebnisse bei der Transfektion von mTRPC6-eGFP-pcDNA3 in primär isolierte Podozyten.

3.7.2 Lentivirale Transfektion

Wie in Abschnitt 2.2.28 bis 2.2.31 erklärt, wurden für diese Arbeit drei verschiedene Lentiviren hergestellt und aufkonzentriert. Dazu zählten Kontroll-Viren mit G5A (eGFP-5-Aequorin). Außerdem wurden Viren mit dem murinen mTRPC6-eGFP sowie mit der M131T-Mutation (mTRPC6-M131T-eGFP) generiert und jeweils sowohl Hek293-Zellen (Kontrolle) als auch

TRPC6^{-/-}-Podozyten infiziert, mit denen anschließend weitere Experimente durchgeführt werden sollten. Alle generierten Viren lieferten bei Hek293-Zellen eine etwa 98% Transfektionseffizienz. TRPC6^{-/-}-Podozyten konnten ebenfalls mit einer >90%igen Effizienz mit G5A-Lentiviren transfiziert werden. In Abbildung 73 werden diese Transfektionskontrollen gezeigt.

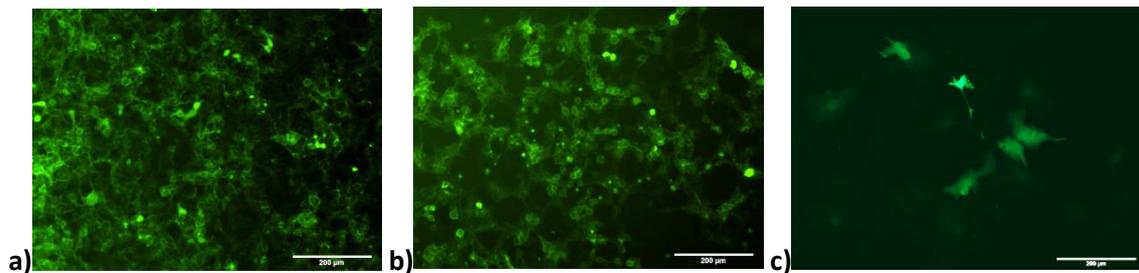


Abbildung 73: Expression fluoreszierender Protein nach lentivirale Transfektions in verschiedenen Zelltypen.

a) Hek293-Zellen nach einer Infektion mit mTRPC6-eGFP-Lentiviren. b) Hek293-Zellen nach einer Infektion mit mTRPC6-M131T-eGFP-Lentiviren. c) TRPC6^{-/-}-Podozyten nach einer Infektion mit G5A-Lentiviren.

Im Gegensatz dazu scheiterten alle Versuche vitale WT- oder TRPC6^{-/-}-Podozyten nach Transfektion mit mTRPC6-eGFP oder mTRPC6-M131T-eGFP-Lentiviren zu erzeugen. Die Transfektionseffizienz mittels Lentiviren war zwar mit der Effizienz der G5A-Lentiviren vergleichbar, jedoch starben die Podozyten umgehend, so dass nur tote Zellen die grünen Fluoreszenzproteine exprimierten (Abbildung 74).

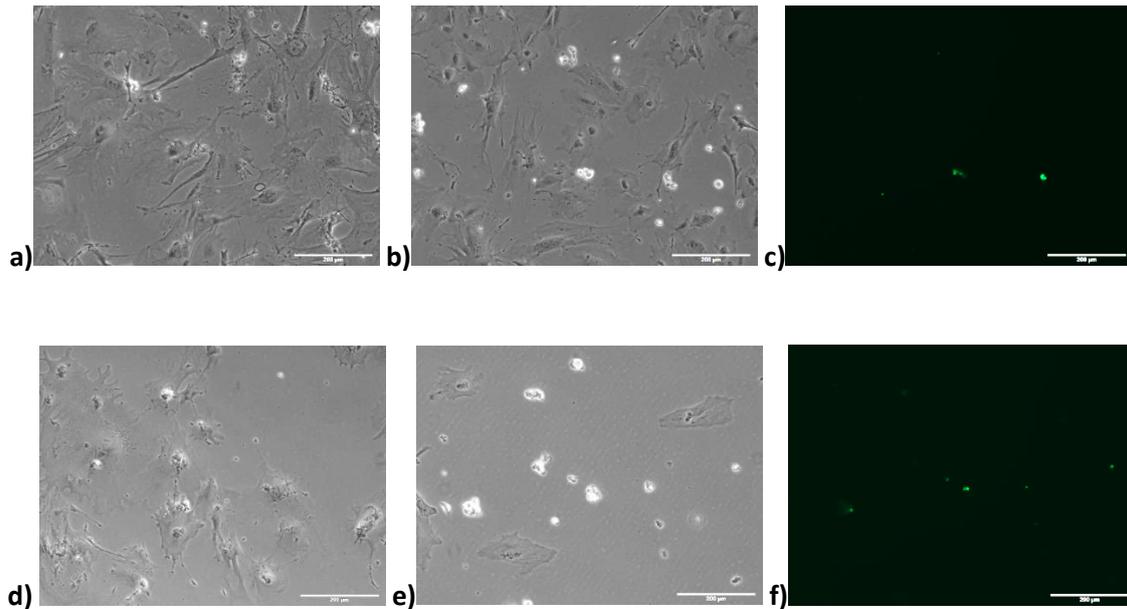


Abbildung 74: Transfektion primärer Podozyten mit mTRPC6 (WT)- und mTRPC6-M131T-Lentiviren.

a) Phasenkontrastaufnahme von TRPC6^{-/-}-Podozyten nach Zugabe von Polybrene. b) Phasenkontrastaufnahme von TRPC6^{-/-}-Podozyten nach Zugabe von Polybrene und mTRPC6-eGFP-Lentiviren. c) TRPC6^{-/-}-Podozyten nach Zugabe von Polybrene und mTRPC6-eGFP-Lentiviren in grüner Fluoreszenz. d) Phasenkontrastaufnahme von TRPC6^{-/-}-Podozyten nach Zugabe von Polybrene e) Phasenkontrastaufnahme von TRPC6^{-/-}-Podozyten nach Zugabe von Polybrene und mTRPC6-M131T-eGFP-Lentiviren. f) TRPC6^{-/-}-Podozyten nach Zugabe von Polybrene und mTRPC6-M131T-eGFP-Lentiviren in grüner Fluoreszenz.

Aus diesem Grund konnten die TRPC6-FSGS-Mutanten nur in HEK293-Zellen analysiert werden, was von Fr. Dr. Ursula Storch durchgeführt wurde (Abschnitt 3.8).

3.8 Elektrophysiologische Untersuchung von primären Podozyten

Fr. Dr. Ursula Storch untersuchte zusätzlich die während dieser Arbeit primär isolierten Podozyten der drei Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-} mittels „Patch-Clamp“-Methode. Bei dieser Methode können elektrophysiologische Ein- und Ausströme in einzelne Zellen und durch einzelne Ionenkanäle vor, während und nach einer Stimulation gemessen werden. Die verschiedenen Kanäle kann man dabei unter anderem durch die Form der Strom-Spannungskurve unterscheiden. Um alle vorhandenen G-Protein gekoppelten Signalwege zu aktivieren, wurden mit GTP γ S alle G-Proteine der Zelle stimuliert und spezifische TRPC6-Ströme gemessen, da andere Kanäle wie K⁺- und Cl⁻-Kanäle durch spezifische Inhibitoren geblockt wurden (Details in Kalwa et al. 2015). Die GTP γ S-induzierten TRPC6-Ströme der primär isolierten PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten unterschieden sich nicht von den in WT-Zellen gemessenen Ströme und waren deutlich höher als der Basalstrom (Abbildung 75 a und c). Wie erwartet konnten in TRPC6^{-/-}-Podozyten keine GTP γ S-induzierten TRPC6-Ströme, sondern nur der

Basalstrom gemessen werden (Abbildung 75 b). In weiteren Versuchen wurde mit Flufenamat einem spezifischen TRPC6-Aktivator stimuliert (Fostera et al. 2009). Die Ergebnisse unterschieden sich nicht von denen der GTP γ S-Stimulation (Abbildung 75 a-d), so dass kein PLC ϵ -induzierter TRPC6-Strom in primären Podozyten nachweisbar war.

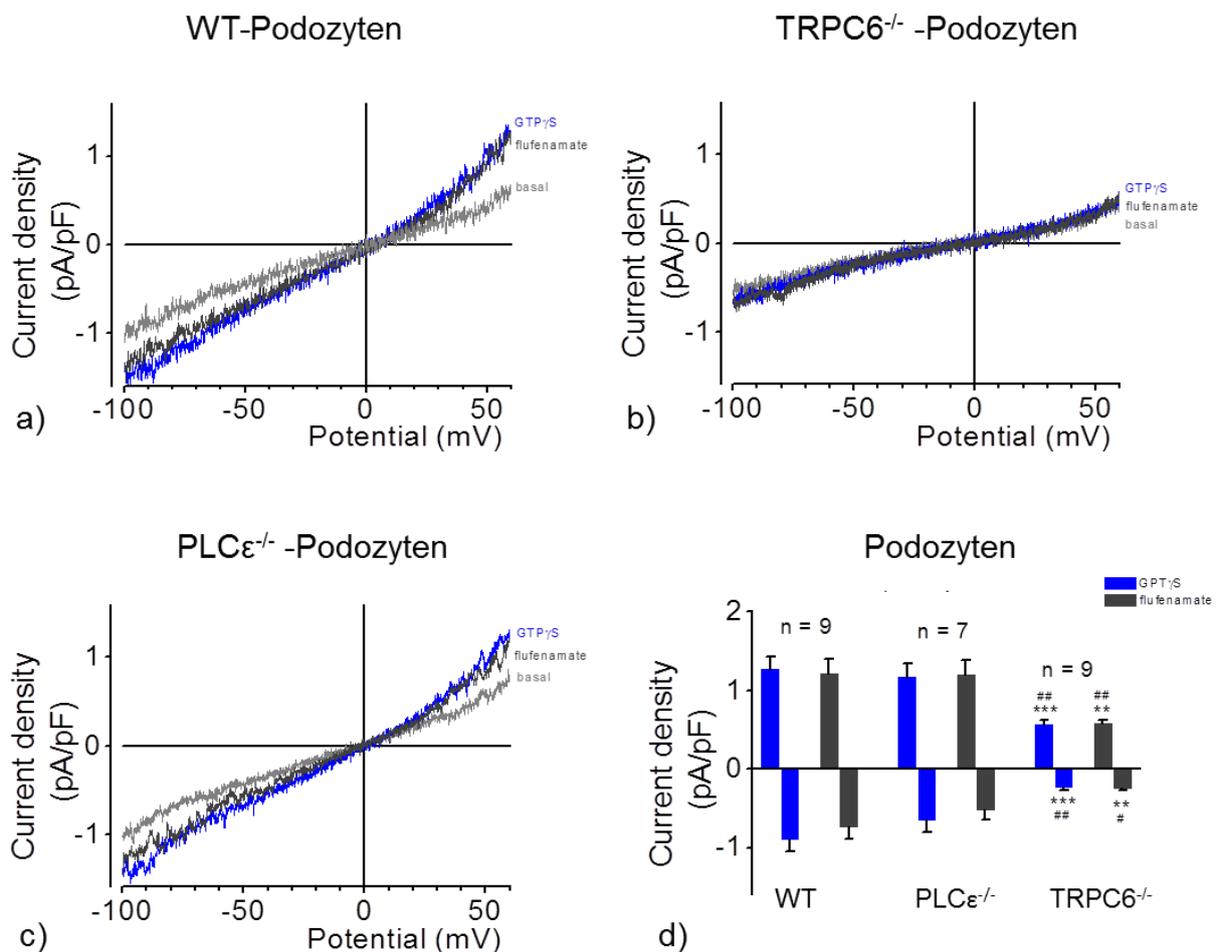


Abbildung 75: Elektrophysiologische Analysen von GTP γ S- und Flufenamat-induzierten Strömen in primären Podozyten.

a,b,c) Repräsentative Strom-Spannungskurven von GTP γ S (blau)- und Flufenamat (schwarz)-induzierte Ströme in primär isolierten Podozyten der Genotypen WT (a), TRPC6^{-/-} (b) und PLC ϵ ^{-/-} (c) mittels „Patch-Clamp“-Methode detektiert. d) Zusammenfassung der Stromdichte nach GTP γ S (blau)- und Flufenamat (schwarz)-Stimulation in primären Podozyten der drei Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLC ϵ ^{-/-} bei ± 60 mV. * und ** zeigen signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ und $0,01$ zwischen TRPC6^{-/-}-Podozyten und WT-Podozyten auf; # und ## ** zeigen signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ und $0,01$ zwischen TRPC6^{-/-}- und PLC ϵ ^{-/-}-Podozyten auf (verändert nach Kalwa et al. 2015).

3.9 Funktionstest der „small hairpin“ (=sh)-RNAs und „small interference“ (=si)-RNAs

Für weiterführende Versuche wurde die Effektivität der sh-RNA gegen PLC ϵ (und die entsprechende Kontroll-sh-RNA), sowie die si-RNA gegen PLC β_1 (und die entsprechende Kontroll-si-RNA) durch quantitative RT-PCR und „Western Blot“ überprüft.

Die jeweiligen sh- oder si-RNAs sollten die mRNA des Zielgens signifikant herunterregulieren ohne unspezifische Nebeneffekte auf andere Gene aufzuweisen.

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR aus RNAs von HEK293-Zellen, die das jeweilige Zielgen heterolog exprimierten, werden in Abbildung 76 dargestellt. Im linken Teil der Abbildung wird gezeigt, dass die spezifische si-RNA gegen PLC β_1 die PLC β_1 -mRNA Konzentration signifikant erniedrigte (im Mittel um 60,38%). Die si-RNA-Kontrolle, sowie die sh-RNA gegen PLC ϵ und die sh-RNA-Kontrolle zeigten nach Transfektion in die Zellen keine signifikanten Änderungen der PLC β_1 - mRNA-Konzentration.

Im rechten Teil der Abbildung konnte gezeigt werden, dass die sh-RNA gegen PLC ϵ die mRNA-Konzentration des Zielproteins ebenfalls signifikant verminderte (im Mittel um 34,64%) während die si-RNA gegen PLC β_1 keinen signifikanten Einfluss auf PLC ϵ exprimierende HEK293-Zellen hatte. Allerdings führten sowohl die Kontroll-sh-RNA als auch die Kontroll-si-RNA aus unbekanntem Gründen zu einer signifikanten Erhöhung des PLC ϵ -mRNA-Gehalts (um im Mittel 14,11% und 21,7%). Entscheidend ist jedoch die Beeinflussung des Proteingehalts nach Transfektion der sh- und si-RNAs, die in den Abbildungen 77 und 78 mit Hilfe des „Western Blots“ überprüft wurde.

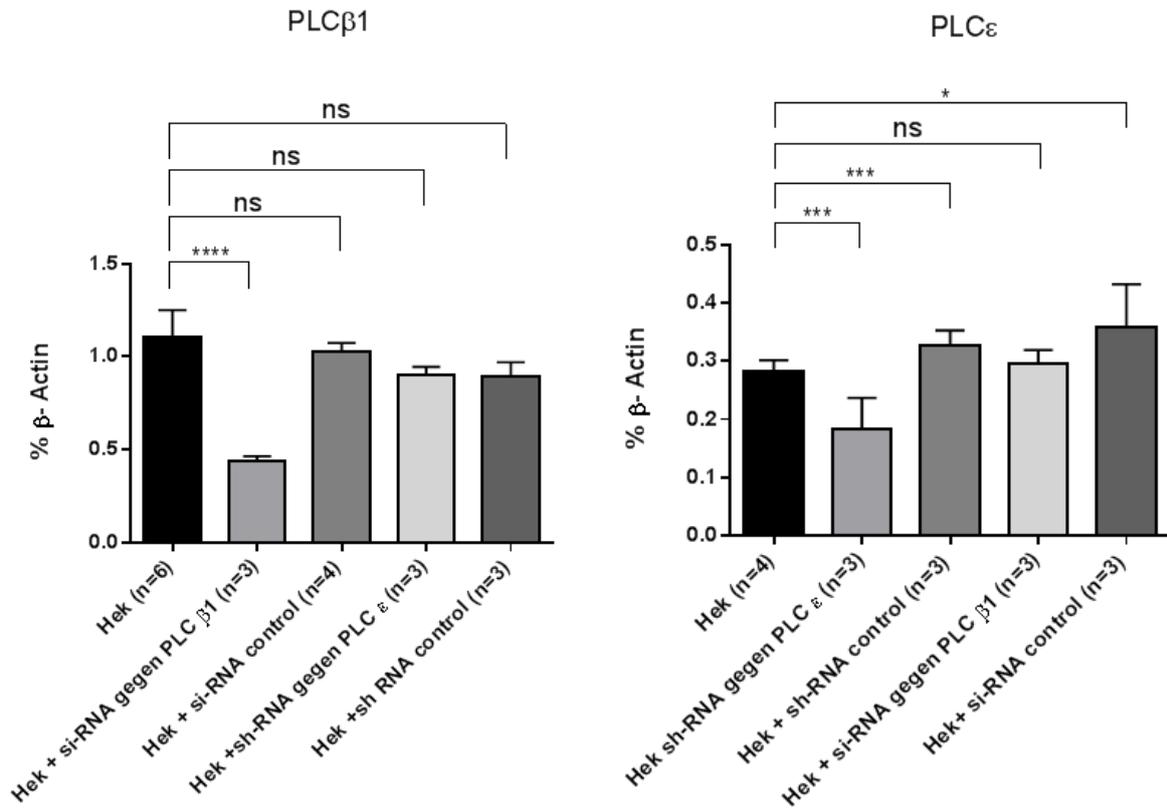


Abbildung 76: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR mit PLC β ₁ (links)-und PLC ϵ (rechts)-spezifischen Oligonukleotiden.

links: Die si-RNA gegen PLC β ₁ bewirkte eine signifikante Verminderung bezüglich PLC β ₁. Die Kontroll-si-RNA, sowie die sh-RNA gegen PLC ϵ und die Kontroll-sh-RNA hatten keine signifikanten Auswirkungen auf PLC β ₁. rechts: Die sh-RNA gegen PLC ϵ regulierte das Zielprotein signifikant herunter. Die si-RNA gegen PLC β ₁ hatte keine signifikanten Einflüsse auf PLC ϵ . Allerdings führten sowohl die Kontroll-sh-RNA als auch die Kontroll-si-RNA zu einer signifikanten Hochregulation von PLC ϵ .

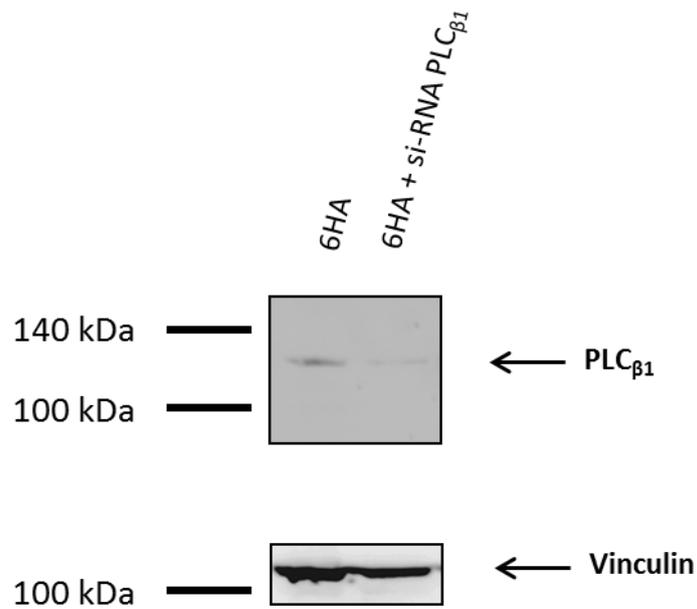


Abbildung 77: Nachweis von PLC β_1 -Protein in HEK293-Zellen, die TRPC6-HA (=Hämagglutinin) stabil exprimieren (6HA) und mit einer si-RNA gegen PLC β_1 transfiziert wurden.

PLC β_1 konnte in HEK293-Zellen, die stabil TRPC6-HA exprimieren, nachgewiesen werden (Spur 1, 6HA). 6HA-Zellen die mit einer PLC β_1 -si-RNA transfiziert worden waren, zeigen eine deutlich geringere Expression (Spur 2, 6HA + PLC β_1 -si-RNA). Die Ladekontrolle zeigt die Expression des Vinculin-Proteins.

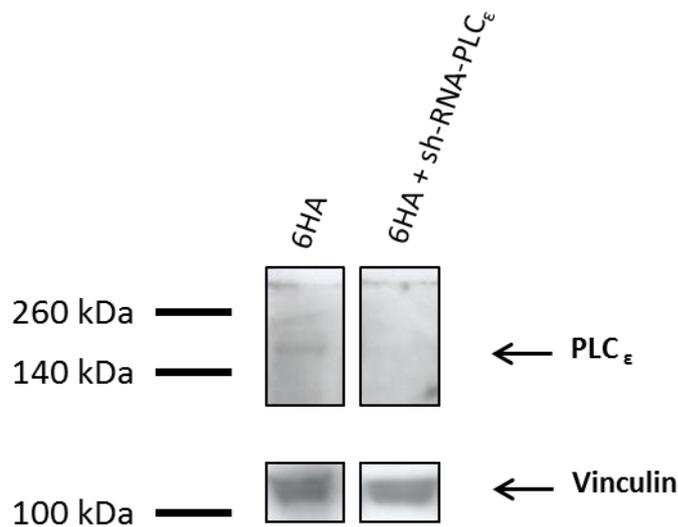


Abbildung 78: Nachweis von PLC ϵ -Protein in HEK293-Zellen, die TRPC6-HA (=Hämagglutinin) stabil exprimieren (6HA) und mit einer sh-RNA gegen PLC ϵ transfiziert wurden.

PLC ϵ konnte in HEK293-Zellen, die stabil TRPC6-HA exprimieren, nachgewiesen werden (Spur 1, 6HA). 6HA-Zellen die mit einer PLC ϵ -sh-RNA transfiziert worden waren, zeigen eine deutlich geringere Expression (Spur 2, 6HA + sh-RNA PLC ϵ). Die Ladekontrolle zeigt die Expression des Vinculin-Proteins.

3.10 Elektrophysiologische Untersuchung der TRPC6-PLC ϵ - und der TRPC6-M131T-PLC ϵ -Interaktion in Hek293-Zellen

Außerdem wurden von Fr. Dr. Ursula Storch elektrophysiologische Messungen zur Interaktion von TRPC6 und PLC ϵ in Hek293-Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 79). Alle Teilabbildungen in Abbildung 79 zeigen die Stimulation mit Carbachol (blau) und Flufenamat (grau) sowie den Basalstrom (schwarz). Untransfizierte Hek293-Zellen zeigten keine Änderungen der Stromdichten nach Carbachol- oder Flufenamat-Stimulation auf (Abbildung 79 a). Die Zellen wurden deshalb sowohl mit TRPC6 als auch mit dem M5-Rezeptor (muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor 5) transfiziert (Abbildung 79 b-f) . In Abbildung 79 c wurden die Zellen zusätzlich mit einer Kontroll-sh-RNA transfiziert und in Abbildung 79 e mit einer Kontroll-si-RNA. Die elektrophysiologischen Messungen der Kontrollen 79 c und e unterschieden sich dabei nicht von den Messungen ohne Kontroll-sh-RNA bzw. Kontroll-si-RNA, die in Abbildung 79 b dargestellt wird. Die gemessenen Stromdichten werden in Abbildung 80 a (Kontroll-sh-RNA) und Abbildung 80 b (Kontroll-si-RNA) für alle Messungen der Carbachol-Stimulation zusammengefasst. Die gemessenen Stromdichten nach Carbachol-Stimulation in Zellen, die zusätzlich eine PLC ϵ -sh-RNA exprimierten, werden in Abbildung 79 d exemplarisch dargestellt und in Abbildung 80 a zusammengefasst. Dabei zeigte sich ein signifikant geringerer TRPC6-Strom als in Zellen, die nur die Kontroll-sh-RNA exprimierten. Die erzielte Inhibition der TRPC6-spezifischen Stromdichten in Zellen, die eine PLC β_1 -si-RNA oder eine PLC ϵ -sh-RNA exprimierten wird in Abbildung 79 f, sowie 80 b dargestellt.

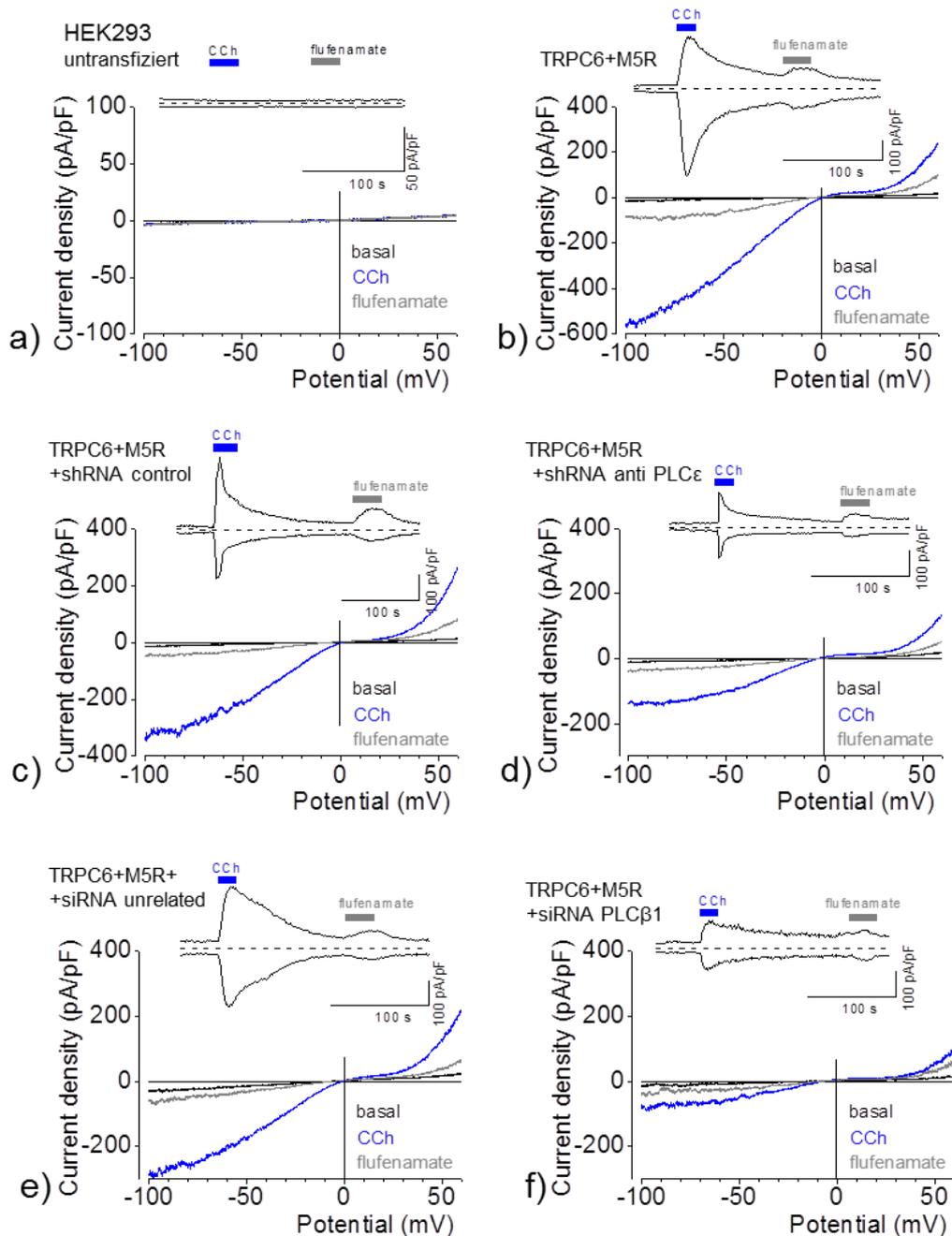


Abbildung 79: Elektrophysiologische Analyse der TRPC6-PLCε-Interaktion in Hek293-Zellen die TRPC6 stabil exprimieren.

a,b) Repräsentative Strom-Spannungskurven die mittels Ganz-Zell „Patch-Clamp“-Methode in untransfizierten Hek293-Zellen (a) und in Hek293-Zellen die den muskarinen Acetylcholinrezeptor 5 (M5) und TRPC6 exprimieren (b) gewonnen wurden, vor (basal, schwarz) und während der Rezeptoraktivierung durch Carbachol (CCh, blau) und Flufenamat (flufenamate, grau).

c,d) Repräsentative Strom-Spannungskurven von TRPC6-Strömen in M5 und TRPC6 exprimierenden Hek293-Zellen, die mit einer Kontroll-sh-RNA (shRNA control, c) oder mit einer spezifischen sh-RNA gegen PLCε (shRNA PLCε, d) transfiziert wurden, vor (basal, schwarz) und während der Rezeptoraktivierung durch Carbachol (CCh, blau) und Flufenamat (flufenamate, grau).

e,f) Repräsentative Strom-Spannungskurven von TRPC6-Strömen in M5 und TRPC6 exprimierenden Hek293-Zellen, die mit einer Kontroll-si-RNA (siRNA control, e) oder mit einer spezifischen si-RNA gegen PLCβ₁ (siRNA PLCβ₁, f) transfiziert wurden, vor (basal, schwarz) und während der Rezeptoraktivierung durch Carbachol (CCh, blau) und Flufenamat (flufenamate, grau).

a-f) Die Strom-Zeitverläufe werden bei ± 60 mV gezeigt. Die Applikation von Carbachol und Flufenamat wird durch Balken angezeigt (verändert nach Kalwa et al. 2015).

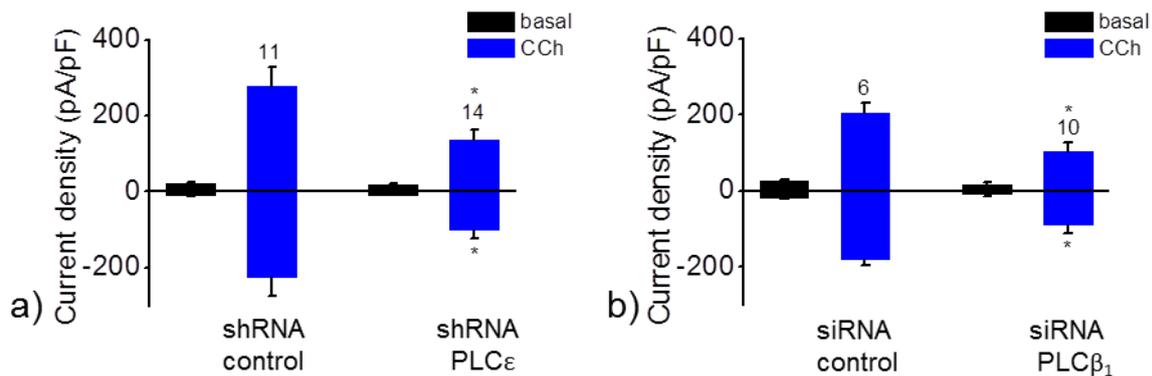


Abbildung 80: Ca²⁺-Stromverläufe in Hek293-Zellen mit TRPC6.

Dargestellt werden die Zusammenfassungen gemessener Stromdichten in Hek293-Zellen, die mit dem TRPC6 und dem M5-Rezeptor transfiziert wurden. Die Ergebnisse wurden mit der „Patch-Clamp“-Ganz-Zell-Methode generiert und werden für eine Carbachol-Stimulation (blau) im Vergleich zum Basalstrom (schwarz) für Messungen bei ± 60 mV dargestellt. a) Zusammenfassung der Ca²⁺-Stromverläufe nach einer zusätzlichen Applikation einer Kontroll-sh-RNA oder der PLC ϵ -sh-RNA. b) Zusammenfassung der Ca²⁺-Stromverläufe nach einer zusätzlichen Applikation einer Kontroll-si-RNA oder der PLC β_1 -si-RNA. * markieren signifikante Unterschiede für p < 0,05 (verändert nach Kalwa et al. 2015).

Neben den Messungen zur Interaktion von TRPC6 und PLC ϵ wurden von Fr. Dr. Ursula Storch auch elektrophysiologische Messungen zur Interaktion der, in dieser Arbeit generierten, TRPC6-M131T-Mutante mit PLC ϵ in Hek293-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dafür ebenfalls sowohl mit TRPC6-M131T als auch mit dem M5-Rezeptor (Muskariner Acetylcholin-Rezeptor 5) transfiziert (Abbildung 81 a-d). Alle Teilabbildungen in Abbildung 81 zeigen die Stimulation mit Carbachol (blau) und Flufenamat (grau), sowie den Basalstrom (schwarz). Die Teilabbildungen 81 a und 81 c zeigen die Ergebnisse der Ca²⁺-Stromverläufe nach zusätzlicher Transfektion mit einer Kontroll-sh-RNA (Abbildung 81 a) und einer Kontroll-si-RNA (Abbildung 81 c). Diese unterschieden sich nicht voneinander. Die Ca²⁺-Stromverläufe wurden jedoch durch die PLC ϵ -sh-RNA (Abbildung 81 b), sowie durch die PLC β_1 -si-RNA (Abbildung 81 d) stark verringert, was in Abbildung 82 für die Carbachol-Stimulation im Vergleich dargestellt wird.

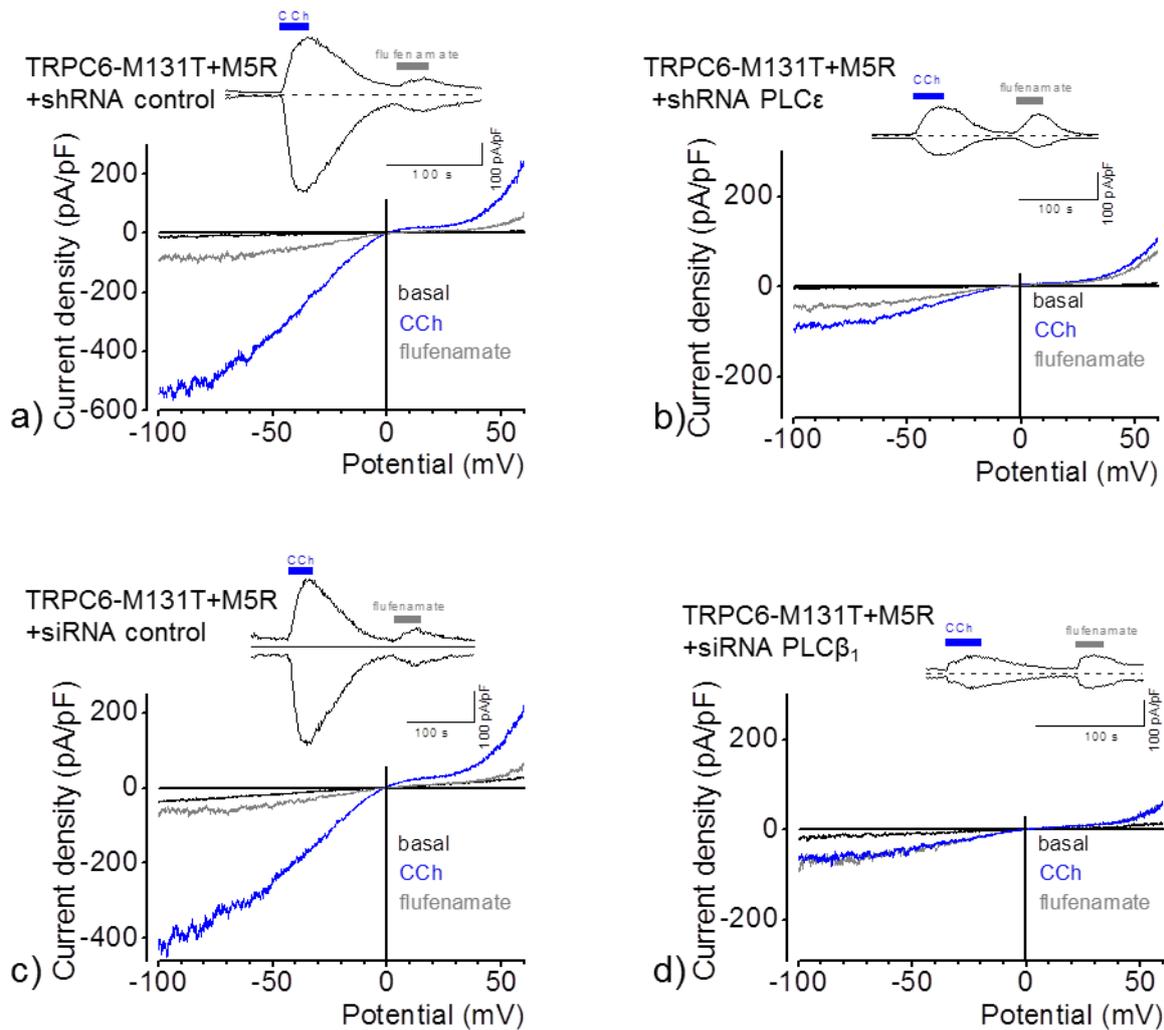


Abbildung 81: Elektrophysiologische Analyse der TRPC6-M131T-PLC ϵ -Interaktion in Hek293-Zellen die TRPC6-M131T stabil exprimieren.

a,b) Repräsentative Strom-Spannungskurven die mittels Ganz-Zell „Patch-Clamp“-Methode in Hek293-Zellen, die den muskarinen Acetylcholinrezeptor 5 (M5) und TRPC6-M131T exprimieren, sowie eine Kontroll-sh-RNA (a) oder eine spezifische sh-RNA gegen PLC ϵ (b), vor (basal, schwarz) und während der Rezeptoraktivierung durch Carbachol (CCh, blau) und Flufenamat (flufenamate, grau).

c,d) Repräsentative Strom-Spannungskurven die mittels Ganz-Zell „Patch-Clamp“-Methode in Hek293-Zellen, die den muskarinen Acetylcholinrezeptor 5 (M5) und TRPC6-M131T exprimieren, sowie eine Kontroll-si-RNA (c) oder eine spezifische si-RNA gegen PLC β_1 (d), vor (basal, schwarz) und während der Rezeptoraktivierung durch Carbachol (CCh, blau) und Flufenamat (flufenamate, grau) (verändert nach Kalwa et al. 2015).

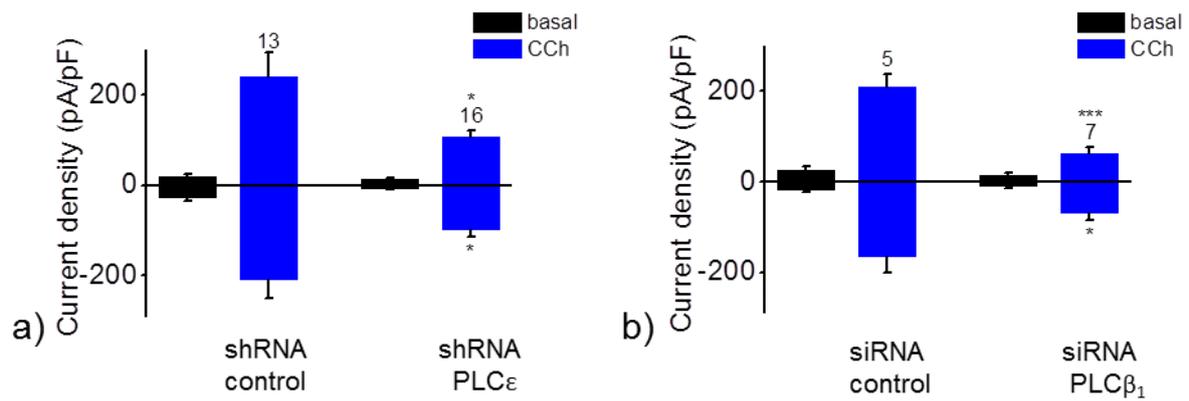


Abbildung 82: Ca²⁺-Stromverläufe in Hek293-Zellen mit TRPC6-M131T.

Dargestellt werden die Zusammenfassungen gemessener Stromdichten in Hek293-Zellen, die mit dem TRPC6-M131T und dem M5-Rezeptor transfiziert wurden. Die Ergebnisse wurden mit der „Patch-Clamp“-Ganz-Zell-Methode generiert und werden für eine Carbachol-Stimulation (blau) im Vergleich zum Basalstrom (schwarz) für Messungen bei ± 60 mV dargestellt. a) Zusammenfassung der gemessenen Stromdichten in Zellen, die zusätzlich eine Kontroll-sh-RNA, oder eine spezifische PLC ϵ -sh-RNA exprimieren. b) Zusammenfassung der gemessenen Stromdichten in Zellen, die zusätzlich eine Kontroll-si-RNA, oder eine spezifische PLC β_1 -si-RNA exprimieren. * markieren signifikante Unterschiede für $p < 0,05$; *** markieren signifikante Unterschiede für $p < 0,001$ (verändert nach Kalwa et al. 2015);

4 Diskussion

In vielen Studien werden als Podozyten „immortalisierte“ Zelllinien verwendet, die sich während der Teilungsphase in einer Art Vorstufe befinden und vor den Versuchen erst ausdifferenziert werden müssen. Ob diese Zellen wirklich native Podozyten repräsentieren, wird immer wieder diskutiert. Da sich in unserer Arbeitsgruppe in früheren Experimenten jedoch zeigte, dass die mRNA-Expression verschiedener Gene sich in der Zelllinie stark von nativen Podozyten unterscheidet, wurden für diese Arbeit primäre Podozyten aus jungen Mäusen isoliert. Dabei spielte es unter anderem eine wichtige Rolle, dass die mRNA des TRPC6-Kanals, der Gegenstand dieser Arbeit ist, in nativen Podozyten, nicht jedoch in der redifferenzierten Zelllinie, exprimiert wird. Außerdem besitzt die Zelllinie kein Podocin, welches als Podozytenmarker gilt (Doktorarbeit von Charlotte Piper, Philipps-Universität Marburg, 2009).

Das Ziel dieser Arbeit war deswegen eine umfangreiche Charakterisierung der primären murinen Podozyten verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}), die mit der Methode von der Arbeitsgruppe Rastaldi (Rastaldi et al. 2006) isoliert wurden.

Außerdem sollten diese primären, murinen Podozyten verschiedener Genotypen (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) funktionell (DNA-Syntheserate, RhoA-GTP-Gehalt, Apoptoserate, Aktinstressfaserbildung) analysiert werden, um Funktionen des TRPC6-Kanals als Effektor der PLCε zu identifizieren.

Mutationen im Gen des TRPC6-Kanals (zusammengefasst in Mottl et al. 2013), aber auch in der codierenden Region für PLCε (Hinkes et al. 2006), konnten in Patienten mit einer Fokalen Segmentalen Glomerulusklerose (FSGS) gefunden werden, was eine gemeinsame Signaltransduktionskaskade beider Proteine nahelegt. Es wäre möglich, dass die typischen Symptome der FSGS (z.B. Proteinurie durch eine gestörte Filterfunktion im Nierenglomerulus) durch eine veränderte Proteinfunktion von TRPC6 und / oder PLCε hervorgerufen werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der physiologische und funktionelle Zusammenhang beider Proteine in verschiedenen Zellsystemen untersucht. Ferner sollten die menschlichen FSGS-Mutationen durch in-vitro-Mutagenese in die murine TRPC6 cDNA überführt und anschließend die mutierten TRPC6-cDNAs zur heterologen Expression in primäre, murine TRPC6^{-/-}-Podozyten transfiziert werden.

4.1 Charakterisierung der primären Podozyten

Spezifische Markerproteine für Podozyten sind neben Nephrin und Podocin auch WT1 und Synaptopodin.

Nephrin ist am Aufbau des Schlitzdiaphragmas (Vergleiche Abbildung 12) beteiligt (Tryggvason 1999, Wartiovaara et al. 2004). Außerdem spielt Nephrin bei der Signalübertragung eine wichtige Rolle (zusammengefasst in Benzing 2004) und es gibt Hinweise darauf, dass es zusammen mit Podocin und dem Aktin-Zytoskelett an der Ausbildung der Podozytenfortsätze beteiligt ist (Saleem et al. 2002). Podocin liegt ebenfalls dem Schlitzdiaphragma assoziiert (Vergleiche Abbildung 12), wo es mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin interagiert (zusammengefasst in Benzing 2004) und an der Ausbildung der Podozytenfortsätze beteiligt sein könnte (Saleem et al. 2002). Außerdem kann Podocin durch die Interaktion mit Nephrin sowohl dessen Signalaktivität stimulieren (zusammengefasst in Ostendorf 2010, Huber et al. 2001) als auch mit dem N-Terminus von TRPC6 interagieren (zusammengefasst in Anderson et al. 2013). Interessanterweise erhöht ein Podocin-„Knockdown“ die TRPC6-Aktivierung durch Membrandehnung, hebt die Aktivierbarkeit von TRPC6 durch DAG jedoch nahezu auf (Anderson et al. 2013). Dies zeigt, dass Podocin für die DAG-Sensitivität von TRPC6 nötig sein könnte.

WT1 ist ein Transkriptionsfaktor der bei der Entwicklung des Urogenitalsystems eine Rolle spielt und durch Mutation die Entwicklung eines Wilms Tumors in den Nieren induzieren kann (Spraggon et al. 2007). Neben der Niere wird WT1 auch in sich entwickelnden Epithelial- und Mesenchymalgeweben (Parenti et al. 2013) sowie im Knochenmark exprimiert (Fraizer et al. 1995). Die Funktion von WT1 in Podozyten ist bisher unklar (Guo J.-K. et al. 2002), es spielt aber bei der Podozytendifferenzierung eine Rolle als Regulator (zusammengefasst in Gebeshuber et al. 2013). Außerdem führt die Herunterregulation von WT1 zu einer nachgeschalteten Herunterregulation von Podocalyxin und Nephrin, sowie diverser anderer Gene, die für die Struktur von Podozyten wichtig sind. Dies kann zum regelrechten Kollaps der Podozytenstruktur und zu einer FSGS führen (Gebeshuber et al. 2013). Synaptopodin ist ein zytoplasmatisches Protein das ausschließlich in Podozyten und dem Großhirn lokalisiert ist (Mundel et al. 1997). In Podozyten spielt es bei der Ausbildung der Aktinstressfasern eine wichtige Rolle (Asanuma et al. 2006, Faul et al. 2008).

Für das Protein Nephrin zeigte sich durch Immunzytochemie, dass alle drei Genotypen primärer Podozyten (WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-}) das Protein exprimieren (Abschnitt 3.1.2). Im „Western Blot“ konnte eine ähnliche Expressionstärke in allen drei Genotypen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.3). Im Gegensatz dazu zeigte die qRT-PCR signifikant mehr Nephrin in TRPC6^{-/-}-Podozyten als in WT- und PLCε^{-/-}-Podozyten (Abschnitt 3.1.1). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass zwar mehr Nephrin mRNA in TRPC6^{-/-}-Podozyten gebildet wird, diese aber nicht in das Protein translatiert, sondern abgebaut wird. Die als Negativkontrollen herangezogenen Endothelzellen, primären Mesangialzellen und primären glatten Muskelzellen (SMC = smooth muscle cells) zeigten keine Nephrin-Expression.

Für das Protein Podocin konnte ebenfalls, sowohl durch Immunzytochemie (Abschnitt 3.1.2) als auch durch den „Western Blot“ (Abschnitt 3.1.3), eine Expression nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen (primäre Mesangialzellen, Endothelzellen und primäre SMC) zeigten auch in diesen Experimenten keinerlei Podocin-Expression. Im „Immunoblot“ zeigte sich jedoch, dass $PLC\epsilon^{-/-}$ -Podozyten weniger Podocin produzieren. Da Podocin am Schlitzdiaphragma lokalisiert ist, wo es mit Nephrin interagiert (zusammengefasst in Benzing 2004), könnte der geringere Podocingehalt in $PLC\epsilon^{-/-}$ -Podozyten bei der Ausbildung einer FSGS durchaus von Bedeutung sein. Dies könnte auf einer verringerten Nephrin-Signalaktivität (vergleiche Ostendorf 2010, Huber et al. 2001) oder einer Verringerung der DAG-Sensitivität des TRPC6 (vergleiche Anderson et al. 2013) basieren, auch wenn in den meisten Fällen die Überaktivität von TRPC6 zu FSGS führt.

Auch der Nachweis von WT1 (Wilms Tumor Protein 1) als wichtiger Marker unterstützt die Identität der Zellen als Podozyten, denn sowohl die Immunzytochemie (Abschnitt 3.1.2) als auch der „Western Blot“ (Abschnitt 3.1.3) zeigten eindeutig, positive Resultate für die primären Podozyten aller drei Genotypen (WT, $TRPC6^{-/-}$, $PLC\epsilon^{-/-}$). Die Negativkontrollen (primäre Mesangialzellen, Endothelzellen und primäre SMC) zeigten auch bei diesen Versuchen keine Expression von WT1.

Auch für den Marker Synaptopodin zeigten sich ähnliche Ergebnisse im „Western Blot“ und der Immunzytochemie (Abschnitt 3.1.3 und Abschnitt 3.1.2). Zwar wird dieser Marker auch im Großhirn gefunden (Mundel et al. 1997), doch kann das Vorhandensein von Zellen aus dem Gehirn durch die Isolationsmethode ausgeschlossen werden. Außerdem zeigten die drei Negativkontrollen (primäre Mesangialzellen, Endothelzellen und primäre SMC) auch hier keinerlei Signale für diesen Marker. Auffällig war jedoch, dass WT-Podozyten mehr Synaptopodin als $TRPC6^{-/-}$ -Podozyten exprimierten und dass $PLC\epsilon^{-/-}$ -Podozyten am wenigsten Synaptopodin aufwiesen. Die Ursachen für diese Unterschiede sind noch unklar, sollten aber weiter untersucht werden.

Als Negativkontrollen dienten CD144 (als Endothelzellmarker) und α -sma (als Mesangialzellmarker). Beide Zelltypen, die ebenfalls im Glomerulus lokalisiert sind, konnten nicht in den primär isolierten und kultivierten Zellen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3).

Zusammenfassend gelang in dieser Arbeit, sowohl auf Proteinebene (Immunzytochemie und „Western Blot“), als auch auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) eine umfassende Charakterisierung der primären Zellen als Podozyten, die nach der Methode der AG Rastaldi isoliert wurden. Die reduzierte Expression von einigen Markerproteinen in $PLC\epsilon^{-/-}$ -Podozyten kann der veränderten Signaltransduktionskaskade durch das Fehlen von $PLC\epsilon^{-/-}$ geschuldet sein, müsste jedoch in weiteren Versuchen überprüft und quantifiziert werden. Eine veränderte Signaltransduktionskaskade könnte ebenfalls die Ursache für den kleineren Zelldurchmesser der $PLC\epsilon^{-/-}$ -Podozyten sein, der in den immunzytochemischen Versuchen deutlich wurde. Durch die eventuell geringere Zellgröße und eine mögliche Fehlfunktion durch geringer exprimierte Podozytengene, könnte der glomeruläre Filter

instabiler und die Proteinurie in FSGS-Patienten verursacht werden. Aus diesem Grund wurden die primären Podozyten anschließend auch funktionell charakterisiert.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der primären Podozyten

Eine dauerhafte Fehlregulation der Podozyten führt zu vielerlei Veränderungen, wie dem Verlust der Anhaftung an die Basalmembran, was letztendlich zum Zelltod und zum Ablösen der Zellen führt (zusammengefasst in Greka und Mundel 2011). Um die Effekte einer möglichen Fehlregulation durch den Verlust von TRPC6 oder PLC ϵ zu analysieren, wurden primäre Podozyten der Genotypen WT, TRPC6 $^{-/-}$ und PLC ϵ $^{-/-}$ funktionell charakterisiert.

Zunächst wurde die TRPC- und PLC-mRNA-Expression in den primär isolierten Podozyten untersucht. Die Charakterisierung durch quantitative RT-PCR (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) zeigte, dass TRPC1, gefolgt von TRPC6, TRPC4 und TRPC3, der am stärksten exprimierte TRPC-Kanal in allen primär isolierten Podozyten ist. Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe um Tian (Tian et al. 2010) werden TRPC5 und TRPC7 in diesen Zellen nicht exprimiert. Allerdings analysierte diese Arbeitsgruppe immortalisierte Mauspodozyten, die wie bereits erwähnt, oft andere Expressionsmuster als primäre Zellen aufweisen.

Außerdem stellte sich heraus, dass PLC ϵ $^{-/-}$ -Podozyten signifikant mehr TRPC1 als die beiden anderen Genotypen (WT und TRPC6 $^{-/-}$) produzieren. Die in Abschnitt 3.2.2 analysierten PLC's neben PLC ϵ (PLC β_1 , PLC β_2 , PLC β_3 , PLC β_4 , PLC γ_1 und PLC γ_2) zeigten keine erhöhte Expression in PLC ϵ $^{-/-}$ -Podozyten. Die Expression von PLC β_3 und PLC γ_2 war sogar signifikant herunterreguliert. In TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten zeigte sich im Gegensatz zu PLC ϵ $^{-/-}$ -Podozyten eine signifikante Erhöhung der TRPC3-mRNA-Expression (Abschnitt 3.2.1), was ein kompensatorischer Vorgang sein könnte. Als weitere, möglicherweise kompensatorische, Veränderung zeigte sich eine Hochregulation der PLC β_2 -mRNA in den TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten (Abschnitt 3.2.2), was zusammen mit der erhöhten Expression des TRPC3-Kanals die Vermutung nahe legt, dass bei einer TRPC6-Defizienz in Podozyten die Signalkaskade kompensatorisch über PLC β_2 und den eng verwandten, ebenfalls durch DAG / OAG aktivierbaren TRPC3-Kanal abläuft, wodurch der fehlende Ca $^{2+}$ -Einstrom über TRPC6 ausgeglichen werden könnte. Ähnlich wie in primären Podozyten konnte unsere Arbeitsgruppe eine erhöhte TRPC3-mRNA-Expression in glatten Muskelzellen von TRPC6 $^{-/-}$ -Mäusen identifizieren (Dietrich et al. 2005). Trotz der starken Ähnlichkeit der beiden TRPC-Kanäle, die zur selben Unterfamilie gehören, unterscheiden sich TRPC3 und TRPC6 in ihrer Basalaktivität. Um zu überprüfen ob der Kationen-Einstrom nach einer Kompensation durch TRPC3 verändert wird, wurde in unserer Arbeitsgruppe unter anderem der basale Ba $^{2+}$ -Einstrom gemessen. Der basale Strom war in

TRPC6^{-/-}-Zellen, die TRPC3 verstärkt exprimierten, erhöht und konnte durch eine spezifische TRPC3-si-RNA wieder reduziert werden. In weiteren Versuchen wurde unter anderem gezeigt, dass durch das Ersetzen der TRPC6-TRPC3-Heterotetramere durch TRPC3-Homotetramere und den dadurch erhöhten Basalstrom auch die Kontraktilität isolierter Aortenringe erhöht wird (Dietrich et al. 2005). Diese Versuche unterstützen die Hypothese dass in TRPC6^{-/-}-Mäusen der konstitutiv aktive TRPC3-Kanal zwar zu einem erhöhten Basalstrom führt, aber den TRPC6 funktionell nicht ersetzen kann. Dies könnte auch in unseren primär isolierten Podozyten der Fall sein, da es ebenfalls zu einer, vermutlich kompensatorischen, Erhöhung der TRPC3-mRNA-Expression in TRPC6^{-/-}-Podozyten kam. Die anderen, in dieser Arbeit durchgeführten, quantitativen RT-PCR-Ergebnissen (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) zeigten keinerlei auffällige Veränderungen in den verschiedenen Genotypen.

Da bei der Zellkultivierung auffiel, dass primär isolierte TRPC6^{-/-}-Podozyten der Passage # 1 schneller konfluent wuchsen, als am selben Tag isolierte primäre WT-Podozyten und dass PLCε^{-/-}-Podozyten nur selten überhaupt Konfluenz erreichten, stellte sich die Frage, ob dies an einer stärkeren Proliferationsrate der TRPC6^{-/-}-Zellen oder einer erhöhten Apoptoserate der WT-Zellen, sowie einer noch höheren Apoptoserate der PLCε^{-/-}-Zellen liegen könnte.

Zur Überprüfung der Proliferationsrate wurde der EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)-Inkorporations-„Assay“ zur Quantifizierung der DNA-Synthese herangezogen. Da DNA-Synthese hauptsächlich während der Proliferation und nur im geringen Maße zur DNA-Reparatur abläuft, kann auf diese Weise Zellproliferation quantifiziert werden. In andere Analysen, wie dem sog. „Scratchassay“ (Liang et al. 2007), bei dem in einem Zellrasen eine „Wunde“ erzeugt wird und die Zeit bis zur „Heilung“ gemessen wird oder der sog. „Woundhealing-Assay“ des ECIS-Gerätes („Electric Cell-system Impedance Sensing“, „Applied Biophysics“, NY, USA), bei dem nach einer Verwundung der Zellwiderstand während der Wundreparatur eines Zellrasens gemessen wird, kann Proliferation nur schwer von Zellmigration unterschieden werden. Beim XTT-„Assay“, der ebenfalls oft als Proliferations-„Assay“ dargestellt wird, wird hingegen die Zellviabilität gemessen. Dabei wird XTT durch mitochondriale Enzyme umgewandelt, was zu einem Farbumschlag führt und kolorimetrisch bestimmt werden kann. Die in Abschnitt 3.2.3 aufgezeigten Ergebnisse des EdU-„Assays“ zeigten, dass die DNA-Syntheserate bei primären TRPC6^{-/-}-Podozyten im Vergleich zu primären WT-Podozyten um im Mittel 20,48% (von 36,78% auf 57,26%) erhöht war. Die PLCε^{-/-}-Podozyten zeigten hingegen mit einer DNA-Syntheserate von 35,85% keine signifikanten Unterschiede zu den WT-Podozyten. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe, die eine ebenfalls erhöhte Viabilität der TRPC6^{-/-}-Podozyten nachwiesen (Dissertation Meike Fahlbusch). Die erhöhte DNA-Syntheserate und Zellviabilität der TRPC6^{-/-}-Podozyten könnte mit dem eventuell höheren Basalstrom, der durch die Hochregulation der TRPC3-mRNA entstanden sein könnte (Vergleiche Dietrich et al. 2005), in Zusammenhang stehen.

Die mittels „TUNEL („TdT-(terminal deoxynucleotidyl transferase)-dUTP nick end labeling“-Assay“ (Abschnitt 3.2.4) quantifizierte Apoptoserate zeigte in den TRPC6^{-/-}-Podozyten, im Vergleich zu den WT-Zellen, eine signifikant erhöhte Sterblichkeit. Ähnliches konnte in einer weiteren Veröffentlichung (Chen et al. 2011) gezeigt werden. Hier wurde eine erhöhte Apoptoserate in immortalisierten Podozyten nach Ca²⁺-Einstrom über TRPC6-Kanäle nachgewiesen. Die von uns festgestellte erhöhte Apoptoseneigung könnte jedoch durch die erhöhte Proliferationsrate (DNA-Synthese, Abschnitt 3.2.3) ausgeglichen und sogar übertroffen werden, so dass es trotzdem zu einem schneller konfluenten Zellrasen kommen könnte. Die Apoptoserate von PLCε^{-/-}-Podozyten war, im Vergleich zu WT-Podozyten, noch stärker erhöht, was bei gleicher Proliferationsrate die längere Zeit zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens erklären und einen weiteren Hinweis darauf geben könnte, warum es Fälle von FSGS gibt (Hinkes et al. 2006). Die geringere Zellgröße (Vergleiche Abschnitt 4.1) und die erhöhte Apoptoserate der Podozyten könnte in Patienten mit einer funktionslosen PLCε-Mutante die Proteinurie durch den dann instabilen glomeruläre Filter erklären. Diese Zusammenhänge müssten jedoch noch für die einzelnen PLCε-Mutationen überprüft werden. Betrachtet man die Aktinstressfaserpolymerisation (Abschnitt 3.2.5) als ein Maß für die Stabilität einer Zelle, so zeigte sich eine signifikante Vermehrung der Aktinfasern in TRPC6^{-/-}-Podozyten im Vergleich zu WT-Podozyten. Die vermutlich höhere Zellstabilität könnte die Ursache dafür sein, dass TRPC6^{-/-}-Mäuse in gewissem Maße vor einer Albuminurie geschützt sind (Eckel et al. 2011), während die Verabreichung von TRPC6-cDNA in vivo Proteinurie in Mäusen induzierte (Moller et al. 2007). Die induzierte Proteinurie könnte mit einer verringerten Aktinstressfaserbildung in Verbindung stehen. Interessanterweise zeigte sich bei den PLCε^{-/-}-Podozyten ebenfalls eine leicht aber signifikant erhöhte Stressfaserbildung im Vergleich zu WT-Zellen. Der dadurch erhöhten Zellstabilität könnte die erhöhten Apoptoserate, die geringere Zellgröße und die geringere Expression von Podozytenmarkern entgegenstehen, so dass die Zellen trotzdem eine Fehlfunktion aufweisen (Vergleiche Abschnitt 4.1 und 4.2 weiter oben). Die Arbeitsgruppe um Chen et al. stellte 2011 außerdem fest, dass in immortalisierten Podozyten, in denen durch die Verwendung von TRPC6-spezifischen si-RNAs die TRPC6-mRNA-Expression inhibiert wurde, die Polymerisation des F-Aktins deutlich stärker als in den WT-Zellen ist. Umgekehrt zeigten Zellen, in denen der TRPC6-Kanal vermehrt exprimiert wurde, lediglich eine geringe Stressfaserbildung (Jiang et al. 2011). Beide Arbeitsgruppen bestätigen also unsere Resultate, die von uns allerdings in primären Podozyten gewonnen wurden. Sowohl in WT- als auch in PLCε^{-/-}-Podozyten konnte in dieser Arbeit außerdem eine signifikante Zunahme der Aktinpolymerisation nach Angiotensin II-Behandlung festgestellt werden. Die erhöhte Stressfaserbildung unterschied sich nicht signifikant von der natürlichen Aktinpolymerisation der TRPC6^{-/-}-Podozyten, die von Haus aus eine vermehrte Polymerisation des F-Aktins zeigten. Eine Inkubation der TRPC6^{-/-}-Podozyten mit Angiotensin-II zeigte keine weitere Erhöhung der bereits

signifikant stark erhöhten Aktinstressfaserbildung. Physiologisch macht es Sinn, dass eine Erhöhung der Angiotensin II-Konzentration, die durch Bindung an den AT₁-Rezeptor den Blutdruck erhöht, zu einer vermehrten Stabilität am Glomerusfilter durch Erhöhung der Aktinstressfasern in den Podozyten führt, um eine Proteinurie zu verhindern. Therapeutisch werden aber ACE-Hemmer (z.B. Lisinopril) sowie AT₁-Antagonisten (z.B. Losartan) verwendet, weil das nachhaltige Senken des Blutdrucks eine Proteinurie effektiver verhindern kann als eine Erhöhung der Stabilität der Podozyten.

Veränderungen des Zytoskelettes in Podozyten werden häufig durch Mitglieder der Rho-Familie, wie Rho oder Rac1 mediiert, die wiederum Komplexe mit Rezeptor-aktivierten TRPC-Kanälen bilden können (Tian et al. 2010). Angiotensin II aktiviert den Angiotensin 1 (AT₁)-Rezeptor, wodurch das RhoA-Protein, welches für die Bildung von Aktinstressfasern verantwortlich gemacht wird, stimuliert wird. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zur Aktinstressfaserpolymerisation untermauern die Hypothese, dass der Ca²⁺-Einstrom durch den TRPC6-Kanal den Abbau des RhoA-Proteins, das wesentlich für die Bildung der Aktinstressfasern verantwortlich ist, fördern könnte (Faul et al. 2008). Die Arbeitsgruppe um Faul et al. zeigte 2008 in diesem Zusammenhang, dass die Bindung von Ca²⁺ das Protein Calcineurin aktiviert, was zur Dephosphorylierung von Synaptopodin führt. Dieser Vorgang fördert den Abbau des Synaptopodins und blockiert die Inhibition des RhoA-Abbaus durch den Synaptopodin-14-3-3-Komplex. Das Fehlen des TRPC6-Kanals in den TRPC6^{-/-}-Podozyten führt also zu einer vermehrten Bildung von Stressfasern, so dass nach Aktivierung des RhoA über den AT₁-Rezeptor keine signifikanten Einflüsse auf die Aktinpolymerisation mehr möglich sind. Aus diesem Grund quantifizierten wir die RhoA-Aktivität in nicht-stimulierten Podozyten der verschiedenen Genotypen. Nach unserer Theorie und den Daten der AG Faul (Faul et al. 2008) müssten TRPC6^{-/-}-Zellen mehr aktives RhoA aufweisen als WT- oder PLCε^{-/-}-Zellen. Die Ergebnisse (Abbildung 63) zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede im relativen Gehalt an RhoA-GTP in primären Podozyten der drei Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLCε. Allerdings streuten die Werte sehr stark. Die Daten einer anderen Arbeitsgruppe deuten auf einen Molekülkomplex von TRPC6 mit RhoA und TRPC5 mit Rac1 hin (Tian et al. 2010). Ca²⁺-Einstrom durch TRPC6 aktiviert RhoA, was wiederum Rac1 inhibiert und die Aktinpolymerisation vorantreibt, der TRPC5-Rac1-Komplex hat dabei antagonistische Funktion im Vergleich zum TRPC6-RhoA-Komplex (Tian et al. 2010). Demnach generiert RhoA im Gegensatz zu Rac1, welches von RhoA inhibiert wird, durch die Ausbildung von Filopodien einen beweglichen Phänotyp. TRPC6^{-/-} sollte demzufolge weniger aktives RhoA und dafür mehr aktives Rac1 besitzen. Im klaren Gegensatz zu dieser Hypothese zeigten unsere Daten jedoch, dass TRPC6^{-/-}-Podozyten vermehrte Aktinstressfaserpolymerisation aufweisen. Außerdem konnten wir keine TRPC5 Expression in unseren isolierten primären Podozyten nachweisen, während der Kanal offensichtlich in der immortalisierten Zelllinie exprimiert wird (Tian et al. 2010). Die von uns bei

TRPC6^{-/-}-Podozyten beobachteten, zusätzlich vermehrten Ausläufer könnten jedoch auch auf eine vermehrte Rac1-Expression hinweisen. Zur weiteren Analyse müssten die Menge an aktivem Rac1 überprüft werden.

Für die PLCε^{-/-}-Podozyten konnte in dieser Arbeit eine vermehrte Expression des TRPC1-Proteins identifiziert werden. Es bleibt jedoch unklar, ob TRPC1 überhaupt funktionelle homomere Kanaltetramere ausbilden kann (zusammengefasst in Dietrich 2014) oder nur als regulatorische Untereinheit andere TRPC-Kanäle fungiert (Storch et al. 2012).

Der erhöhten Apoptoserate von PLCε^{-/-}-Podozyten gegenüber WT-Podozyten könnte ein erhöhter Ca²⁺-Einstrom als Folge der vermehrten Expression eines funktionellen TRPC1-Proteins zu Grunde liegen. Es könnten jedoch neben dem Ausfall von PLCε auch noch weitaus komplexere Signalkaskaden involviert sein. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass es bei Patienten, die an PLCε-Mutationen leiden, bisher keine eindeutigen Genotyp-Phänotyp Zuordnungen gibt, was soviel heisst dass es mehrere Individuen gibt, die zwar eine homozygote „loss of function“-Mutation in der PLCε aufweisen, jedoch keinerlei Symptome zeigten (Boyer et al. 2010, Gbadegesin et al. 2009, Gilbert et al. 2009).

Patienten mit überaktiven TRPC6-Mutationen zeigen vermutlich einen verstärkten RhoA-Abbau und eine dadurch verminderte Stressfaserbildung, was wiederum die Stabilität und somit die Barrierefunktion der Podozyten herabsetzen und zu einer Störung des glomerulären Filters mit zunehmender Albuminurie führen würde.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass es mehrere Studien gibt, die TRPC6-Überexpression für Fehlfunktionen an Podozyten verantwortlich machen (unter anderem Möller et al. 2007, Krall et al. 2010). Die Arbeitsgruppe um Krall zeigte, dass die Überexpression von TRPC6-WT, aber auch von TRPC6-Mutationen, in transgenen Mäusen ähnliche Nierensymptome hervorruft wie FSGS. Demnach müssten Zellen mit TRPC6-Defizienz stabilere Podozyten sein. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein, denn TRPC6^{-/-}-Podozyten zeigten sowohl verstärkte Aktinstressfaserpolymerisation als auch verstärkte Proliferation (DNA-Syntheserate). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TRPC6^{-/-}-Mäuse vor einer Angiotensin II-induzierten Albuminurie geschützt sind (Eckel et al. 2011). Ein höherer Ca²⁺-Einstrom führt also zu einem intrazellulären Ca²⁺-Überschuss, was wiederum den Zelltod forciert (zusammengefasst in Greka & Mundel 2011).

Diese Hypothese sollte durch die Expression von TRPC6-FSGS-Mutationen in primären Podozyten direkt überprüft werden, worauf in Abschnitt 4.4 eingegangen wird.

4.3 Analyse der TRPC6-PLCε-Interaktion

In Abschnitt 3.3 wurde nachgewiesen, dass sich in 6HA (Hek-Zellen die stabil mit TRPC6-HA transfiziert sind)-Zellen, die zusätzlich mit PLCε transfiziert wurden, sowohl PLCε mit einem α-HA-Antikörper (siehe Abbildung 64), als auch umgekehrt TRPC6-HA mit einem α-PLCε-Antikörper (siehe Abbildung 65) ko-immunpräzipitieren ließen, was auf eine örtliche Kolokalisation hinweist. Die in Abbildung 66 dargestellte Immunpräzipitation zeigt, dass diese Kolokalisation auch im nativen Gewebe des Nierenkortex vorhanden ist. Es bleibt jedoch noch unklar, welche Zellen in der Niere beide Proteine exprimieren. In Podozyten wurde eine Expression von TRPC6 (Winn et al. 2005, Reiser et al. 2005) und von PLCε (Hinkes et al. 2006) bereits gezeigt. Unsere Daten (Kalwa et al. 2015, Abbildung 5 C) zeigten nun, dass in primären WT-Podozyten TRPC6 mit PLCε kolokalisiert ist, was auf eine gemeinsame Signaltransduktionskaskade beider Proteine hindeuten könnte. Aus diesem Grund wurde diese Hypothese durch Analyse zellulärer Signaltransduktionskaskaden weiter verfolgt. Interessanterweise kann eine durch PLCε ausgelöste DAG-Produktion in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) TRPC6 aktivieren, wenn der G_{q11} -Signalweg über $PLC\beta_1$ blockiert ist (siehe Kalwa et al. 2015). Diese Schlußfolgerung basiert darauf, dass es nach LPA-Stimulation zu einem mehr als 10-fachen Ca^{2+} -Anstieg in $G_{q11}^{-/-}$ -MEF-Zellen, die TRPC6 exprimierten, kam. Dieser Einstrom konnte sowohl durch eine spezifische PLCε-si-RNA als auch durch Inhibition des PLCε Aktivators Rho durch Rho-Toxin unterdrückt werden. Da der LPA-Rezeptor sowohl an G_{q11} als auch an $G_{\alpha12/13}$ koppelt (zusammengefasst in Wettschureck & Offermanns 2005), vermuten wir eine $G_{\alpha12/13}$ basierte Rho-GEF-Aktivierung von RhoA, welche die DAG-Produktion über PLCε in $G_{q11}^{-/-}$ -MEF-Zellen auslöst. Im Gegensatz dazu ist in Hek293-Zellen, die TRPC6 stabil exprimieren, nach Carbachol-Stimulation eine PLCε-induzierte TRPC6-Aktivierung messbar, was durch eine FSGS-spezifische PLCε-„loss of function“-Mutation und eine spezifische PLCε-sh-RNA (ausgetestet in dieser Arbeit Abschnitt 3.10) unterdrückt werden konnte (Kalwa et al. 2015).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit klonierte murine Homolog (TRPC6-M131T) der humanen „gain of function“-Mutation aus FSGS Patienten (TRPC6-M132T, Heeringa et al. 2009) in Hek293-Zellen ebenso durch PLCε aktiviert werden kann (Abbildung 81 und 82). Da die Carbachol-Stimulation der muskarinen Acetylcholin-Rezeptoren allein in einer G_{q11} -Aktivierung resultiert (zusammengefasst in Wettschureck & Offermanns 2005), scheint in diesen Zellen die PLCε-induzierte TRPC6-Aktivierung über G_{q11} und die p3RhoGEF-Aktivierung von RhoA (Lutz et al. 2005) zu laufen. Die TRPC6-Aktivierung über PLCε läßt sich also nur in HEK293-Zellen, die TRPC6 stabil überexprimieren, und in einer MEF-Zelllinie mit einem deletiertem G_{q11} -Signalweg identifizieren.

Zusätzlich konnten wir primär isolierte Podozyten der drei Genotypen WT, TRPC6^{-/-} und PLCε^{-/-} mit GTPγS stimulieren und mittels „Patch-Clamp“-Methode analysieren. Die gemessenen Ströme in PLCε^{-/-}-Podozyten unterschieden sich dabei nicht von denen der WT-Zellen (Abbildung 75). In TRPC6^{-/-}-Podozyten hingegen waren die gemessenen Ströme viel geringer und nicht signifikant vom Basalstrom zu unterscheiden (Abbildung 75). Der TRPC6-spezifische Aktivator Flufenamat (Fostera et al. 2009) erzeugte ähnliche Ströme in WT- und PLCε^{-/-}- nicht jedoch in TRPC6^{-/-}-Podozyten, so dass es sich tatsächlich um einen Ioneneinstrom durch den TRPC6-Kanal handelt. Diese Daten unterstützen die Bedeutsamkeit der TRPC6-Kanäle für die Funktion primärer Podozyten. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei kürzlich erschienenen Veröffentlichungen gezeigt, in denen TRPC6-ähnliche Ströme in frisch isolierten murinen Podozyten (Ilatovska et al. 2014) und in Ratten-Podozyten gemessen wurden, die sich noch im Glomerulus befanden (Roshanravan & Dryer 2014, Anderson et al. 2014). Da sich PLCε^{-/-}-Podozyten aber anders als TRPC6^{-/-}-Podozyten verhalten, ist es unwahrscheinlich dass PLCε für die TRPC6-Aktivierung in Podozyten unverzichtbar ist und dass der Verlust von PLCε allein zur Ausprägung einer FSGS führt. Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass ein größerer Anteil an Patienten mit Mutationen im PLCε-Gen an Diffuser Mesangialzellsklerose (DMS, 7 Patienten) leiden, als an FSGS (2 Patienten, Hinkes et al. 2006). Nur ein Patient zeigt beide histologischen Veränderungen. Darüber hinaus gibt es keinen FSGS Phänotyp in PLCε^{-/-}-Mäusen und nur eine verminderte Expression von PLCε im Zebrafisch, was zu ähnlichen Symptomen wie im Menschen führt (Hinkes et al. 2006). Es wurden homozygote und heterozygote Mutationen der PLCε in 33% der analysierten DMS Patienten, aber nur in 8% der FSGS Patienten gefunden (Boyer et al. 2010). In dieser Publikation werden auch 3 Individuen mit homozygoten „loss of function“-Mutationen der PLCε beschrieben, die phänotypisch jedoch gesund sind. Dies spricht ebenfalls dafür, dass eine Mutation in PLCε alleine wohl nicht ausreicht, um die Symptome der FSGS hervorzurufen und dass bei erkrankten Individuen eventuell weitere Gene betroffen sein könnten. Außerdem kam es bei allen bis auf einen Patienten, die eine TRPC6 „gain of function“-Mutation exprimierten, zu einer später einsetzenden sog. „late-onset“-FSGS (Heeringa et al. 2009, zusammengefasst in Mottl et al. 2013 und Kalwa et al. 2015), während die zwei Patienten mit Mutationen im PLCε-Gen schon in der Kindheit an FSGS litten (Hinkes et al. 2006).

Schon bald nachdem das erste TRPC-Gen kloniert wurde, wurden sowohl PLCβ- als auch PLCγ-Isoformen für die Aktivierung von TRPC-Kanälen durch G-Proteine (Boulay et al. 1997) oder Tyrosinkinase-Rezeptoren (Li et al. 1999) verantwortlich gemacht. Darüberhinaus ist klar, dass in Podozyten PLCβ-Isoformen essentiell für die Angiotensin II-medierte Aktivierung von TRPC6 sind (zusammengefasst in Gudermann 2005) und dass PLCγ₁ wichtig für die Translokation von TRPC6 zur Plasmamembran ist (Kanda et al. 2011). Nun konnten wir zeigen, dass eine PLCε-TRPC6-Interaktion in einem heterologen Überexpressionssystem beider Proteine und in nativen Podozyten möglich ist.

Außerdem ist die PLC ϵ -medierte DAG-Produktion in der Lage TRPC6 zu aktivieren, wenn der G $_{q11}$ -Signalweg inklusive der PLC β_1 -Isoform deletiert ist. Jedoch scheint dieser Signalweg in primären Podozyten durch PLC β_1 überlagert zu sein, da diese Phospholipase in den Zellen mehr als 20-fach höher exprimiert ist als PLC ϵ -Isoformen (Abschnitt 3.2.2 Abbildung 51 und Abbildung 52).

4.4 Expression des TRPC6-Kanals und seiner TRPC6-M131T-Mutation in primär isolierten murinen Podozyten

Wie in Abschnitt 3.7.1 gezeigt erwiesen sich nicht-virale Methoden als ungeeignet für die Transfektion primärer Podozyten mit Plasmiden zur Expression des TRPC6-Proteins oder dessen Mutanten. Einige der aufgeführten Methoden erzielten zwar eine annähernd brauchbare Effizienz (bis zu 45% mit "Screenfect A" von "Incella") für das Kontrollplasmid, allerdings nicht für das Plasmid mit dem TRPC6-Gen oder seinen Mutationen. Mit rekombinanten lentiviralen Viruspartikeln hingegen lassen sich viele primär isolierte Zellen sehr effizient transfizieren (tronolab.epfl.ch). Darüber hinaus ähnelt eine lentivirale Expression der natürlichen zellulären Expression, so dass wir die mutierten TRPC6-Proteine in ihrer natürlichen Umgebung in TRPC6 defizienten primär isolierten Podozyten exprimieren wollten, um ihre zelluläre Funktion zu analysieren. Wie in Abbildung 74 gezeigt lassen sich die Podozyten zwar mit den rekombinanten TRPC6-Lentiviren transfizieren, aber sterben durch die Expression von TRPC6-Protein oder dessen M131T-Mutante ab. Diese Phänomene lies sich sowohl nach Transfektion der WT-Podozyten als auch nach Transfektion von TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten beobachten, so dass die Expressionsrate des TRPC6-Proteins alleine nicht entscheidend für die Zellschädigung sein kann. Interessanterweise zeigte sich, dass diese Lethalität in Podozyten, nicht jedoch in Hek293-Zellen auftritt, die die Transfektion mit TRPC6- oder TRPC6-M131T-exprimierenden rekombinanten Lentiviren unbeschadet überstanden (Abbildung 73 a und b). Auch scheint es nicht daran zu liegen, dass Podozyten durch die Lentiviren selbst oder das Polybrene geschädigt werden, denn sowohl die Polybrenekontrollen (Abbildung 74 a und d) als auch die Transfektionen von Podozyten mit rekombinanten Lentiviren, die ein anderes Gen tragen (G5A, Abbildung 73 c), funktionierte einwandfrei. Die TRPC6-Expression scheint also, wie bereits vermutet, eine Fehlfunktion und Schädigung in primären Podozyten auszulösen, was dann zum frühen Tod der Podozyten führt. Auf die Transfektion primärer TRPC6 $^{-/-}$ -Podozyten mit Lentiviren, die weitere TRPC6-Mutationen (G108S und S269T) exprimieren, wurde daher verzichtet, da die Transfektion mit dem TRPC6-WT-Lentiviren die selben Ergebnisse lieferte, wie die Transfektion mit dem mutierten TRPC6-M131T-Lentiviren. Da die Transfektionen mit dem TRPC6-WT und der TRPC6-M131T-Mutation zur Ablösung und dem Tod der Podozyten führte, konnten keine weiteren

Versuche mit den Zellen durchgeführt werden. Man könnte allerdings weitere Versuche mit den TRPC6-Lentiviren und den TRPC6-M131T-Lentiviren in Hek293-Zellen durchführen, um zu überprüfen, ob die im Vergleich zu TRPC6-WT beschriebenen signifikant erhöhten Ca^{2+} -Einwärts- sowie Auswärtsstromamplituden (Heeringa et al. 2009) ebenfalls im murinen TRPC6-Kanal messbar sind. Hier handelt es sich aber natürlich um ein heterologes Überexpressionssystem in Zellen ohne Podozytenfunktion mit sehr beschränkter Aussagekraft.

Die von uns zusätzlich klonierte murine TRPC6-S269T-Mutation zeigte im humanen TRPC6-Kanal (S279T) keine Veränderung der Stromamplituden, aber eine verspätete Kanal-Inaktivierung (Reiser et al. 2005). Soweit bisher bekannt wurden noch keine in-vitro-Experimente mit einer dritten humanen TRPC6-Mutation (G109S) durchgeführt, aber Patientendaten untermauern ihre Rolle bei der Entwicklung einer FSGS (Reiser et al. 2005).

Interessant wäre nun, ob die Patienten-Mutationen auch zu einem verstärkten RhoA-Abbau und somit zu verringerten Aktinstressfasern führen würde. Auch die Analyse der Apoptose und Proliferation (DNA-Synthese) in Zellen, die TRPC6-Mutationen exprimieren, sollte in Zukunft in verschiedenen anderen Zellsystemen untersucht werden, da auch andere Organsysteme in den FSGS-Patienten betroffen sein könnten. TRPC6^{-/-}-Podozyten könnten auch erneut mittels Lentiviren, die TRPC6 oder TRPC6-Patientenmutationen exprimieren, unter gleichzeitiger Gabe eines TRPC6-spezifischen Blockers transfiziert werden, um zu testen, ob eine solche Verminderung der TRPC6-Aktivität sich positiv auf die Überlebensrate der Podozyten auswirkt.

4.5 Analyse von TRPC6-Kanälen und der TRPC6-M131T-Kanalmutante in Hek293-Zellen

Da aus den oben genannten Gründen keine Experimente mit dem TRPC6-Kanal und dessen Mutanten in primären Podozyten durchgeführt werden konnten, wurden erste Versuche zur Expression in Hek293-Zellen gemacht. Aus Abbildung 71 wird deutlich, dass beide Proteine in Hek293-Zellen etwa gleich stark exprimiert werden und die konfokalen Aufnahmen aus Abbildung 72 zeigen, dass auch die M131T-Mutante des TRPC6-Kanals in der Plasmamembran von Hek293-Zellen exprimiert wird. In den „Patch-Clamp“-Experimenten zeigte die TRPC6-M131T-Mutante (Abbildung 81 und 82) nach Carbachol-Stimulation eine signifikant höhere Stromdichte als der TRPC6-WT-Kanal (Abbildung 79 und 80), die aber ähnlich wie der TRPC6-WT-Kanal durch intrazelluläre Expression von PLC β_1 -siRNAs und PLC ϵ -shRNAs inhibiert werden konnte. Dies spricht dafür, dass zumindest in diesem artifiziellen System auch die TRPC6-FSGS-Mutante durch PLC β_1 und PLC ϵ aktivierbar ist.

5 Ausblick

Im Hinblick auf künftige medikamentöse Behandlung von Krankheiten, deren Ursache überaktive TRPC6-Kanäle sind, wäre es hilfreich Patienten wirkungsvolle, aber auch verträgliche und spezifische TRPC6-Blocker verabreichen zu können. Der Inhibitor 8009-5364 aus einer aktuellen Veröffentlichung (Urban et al. 2012) könnte ein vielversprechender Kandidat sein. Er wurde nach Lipinski's „Rule of five“ (Faustregel für die orale Bioverfügbarkeit einer Substanz) generiert und stellt deshalb eine mögliche Basis für ein künftiges, orales Medikament dar. Der Blocker liegt unserem Labor als Nachsynthese vor und zeigte in ersten Vorversuchen im Calciumimaging nach 5-minütiger Inkubation mit einer 10 μ M Lösung bereits starke inhibitorische Effekte. Verglichen wurden in diesen Versuchen HEK293-Zellen, die den TRPC6-Kanal stabil exprimierten, mit nativen HEK293-Zellen, die keinen TRPC6-Kanal exprimieren (unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe).

In Zukunft sollte vermehrt mit der „Patch-Clamp“-Methode gearbeitet werden, da damit einzelne TRPC-Kanäle aufgrund ihrer Strom-Spannungskurven überprüft werden könnten. Dabei wäre für das Abschätzen der Selektivität des Blockers besonders der TRPC3-Kanal interessant, der in HEK293-Zellen nativ exprimiert wird und von 8009-5364 ebenfalls, allerdings mit einer 2,5 fach verminderten Effektivität, blockiert wird (Urban et al. 2012). Der nahe verwandte TRPC7-Kanal hingegen wird durch 8009-5364 nicht blockiert. Detailliertere Experimente in primären Podozyten müssen folgen, um genauere Aussagen über die Effektivität des spezifischen TRPC6-Blockers in-vivo machen zu können.

6 Anhang

➤ Abkürzungen

Tabelle 73: Abkürzungen

A	
ACE	Acetylcholinesterase
AMD	Apikalmembrandomände
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amp	Ampere
Ank	Ankyrin
AT ₁	Angiotensin 1
ATRA	„All trans retinoic acid“
AUC	„Area under the curve“ (Fläche unter der Kurve)
B	
BCA	„Bicinchoninic acid“
BMD	Basalmembrandomäne
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	„bovine serum albumin“ (Kälber Serum Albumin)
C	
cc	Wendel („coiled-coiled“)
CCH	Carbachol
CD	„cluster of differentiation“
CIRB	Calmodulin und IP ₃ -Rezeptor Binderegion
cm	Centimeter
D	
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („Desoxyribonucleinacid“)
E	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
EF1-alpha	„elongation factor 1 alpha“
EGFP / eGFP	„enhanced green fluorescent protein“
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESRD	„end stage renal disease“, Nierenversagen
F	
FAA	Flufenamat
FCS	Fetales Kälber („calf“) Serum
FD	„fast digest“
FISH	„Fluorescence in situ Hybridisierung“

FSGS	Fokale Segmentale Glomerulusklerose
G	
g	Gram
G5A	G 5 Aequorin
GBM	Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G-Protein gekoppelter („coupled“) Rezeptor
GTP	Guanosin Triphosphat
H	
h	human
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBSS	„Hank's balanced salt solution“
HeBS	Hepes gepufferte („buffered“) Salzlösung
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
I	
IC	Inhibitorische Konzentration („inhibitoric concentration“)
IF	Immunofluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K	
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilo Dalton
L	
l	Liter
LB	„Lysogeny broth“
LPA	Lysophosphatid Säure („acid“)
LV	Lentivirus
M	
m	murin
M5	Muskariner Acetylcholin-Rezeptor 5
mAmp	Milliampere
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Mol
mV	Millivolt
N	
n	Anzahl
NFAT	„Nuclear Factor of Activated T-cells“
nm	Nanometer
O	
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
P	
PAB	Aktinfaserbündel des Zytoskeletts
PBS	Phosphat gepufferte („buffered“) Salzlösung („saline“)
PCR	Polymerase Ketten(„chain“)-Reaktion

PDGF	„platelet derived growth factor“
PDZ	„postsynaptic density protein 95“
PEC	Parietale epitheliale Zellen („cells“)
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PH	Plekstrin homologe Domäne
pmol	Picomol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PS	Penicillin / Streptomycin
R	
RIPA	„radioimmunoprecipitation assay“
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleinacid“)
ROC	Rezeptor operierter Kanal („receptor operated channel“)
rpm	Umdrehungen („rounds“) pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
S	
SD	Schlitzdiaphragma
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	„standard error of the mean“
SMC	Glatte Muskelzellen („smooth muscle cells“)
SOC	Speicher operierter Kanal („store operated channel“)
STIM	„stromal interaction molecule“
T	
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tm	Schmelztemperatur („melting“)
TRP	„transient receptor potential channels“
TRPC	„classical (oder canonical) transient receptor potential channels“
TUNEL	„terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“
U	
UTP	Uracil Triphosphate
V	
V	Volt
W	
WB	„Western Blot“
WPRE	regulatorisches Element des „wood-chuck hepatitis virus“
WT	Wildtyp
WT1	Wilms-Tumor-Protein 1
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem
Sonstiges	
α	anti
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
6HA	TRPC6-HA

➤ Plasmidkarten

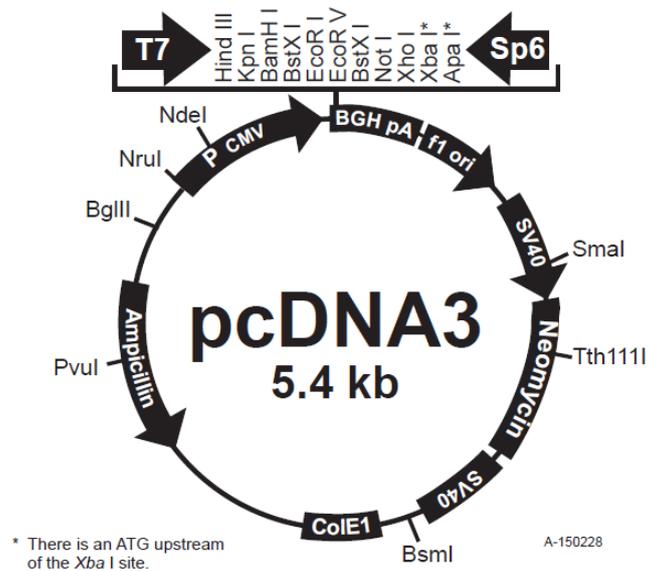


Abbildung 83: Plasmidkarte pcDNA3 (www.invitrogen.com).

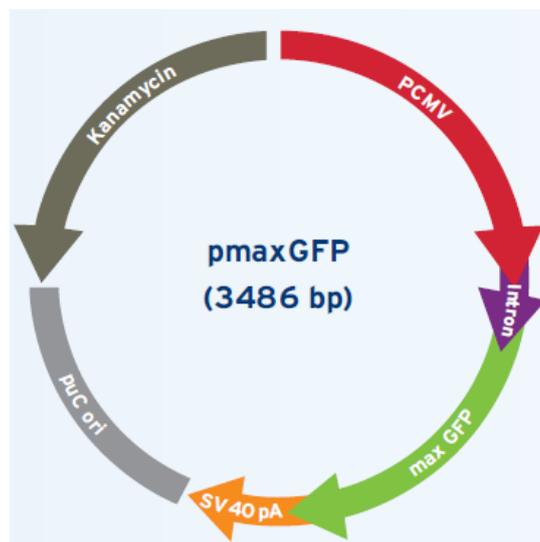


Abbildung 84: Plasmidkarte pmaxGFP (www.lonza.com).

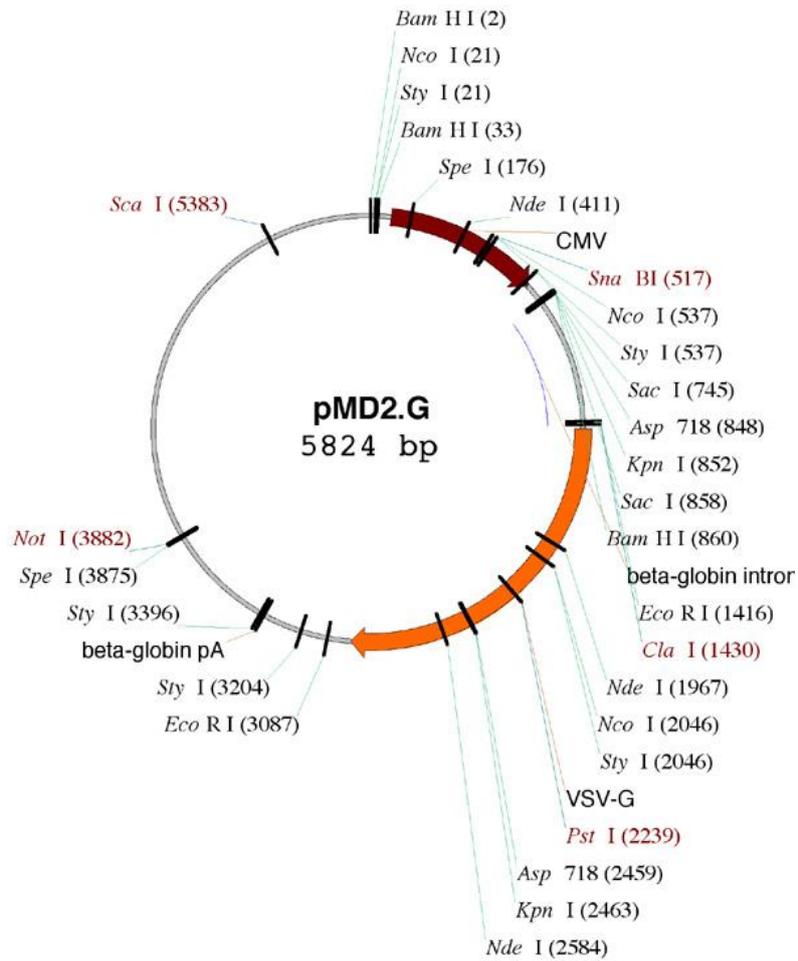


Abbildung 85: Plasmidkarte pMD2.G (www.addgene.com).

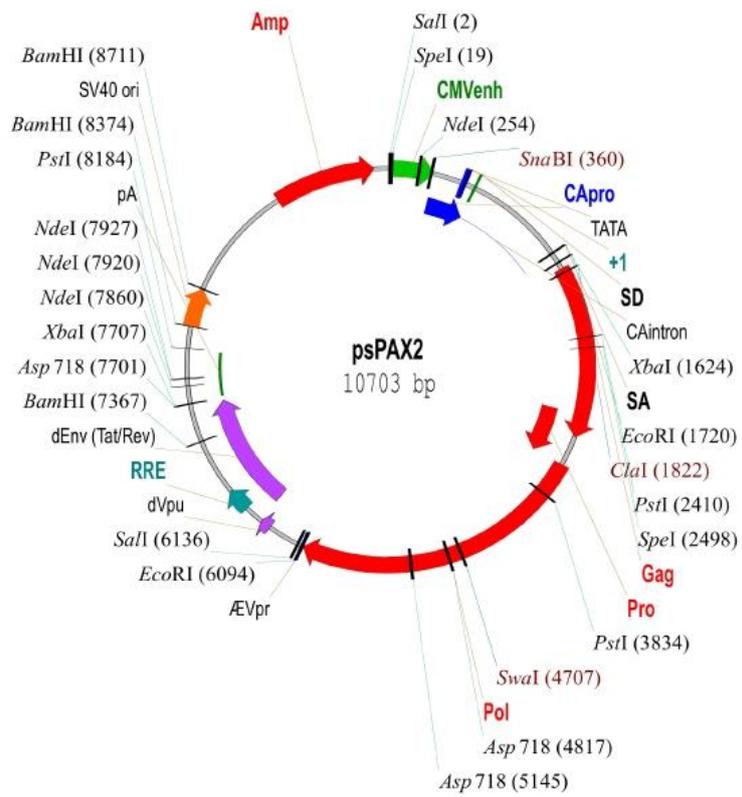


Abbildung 86: Plasmidkarte psPAX2 (www.addgene.com).

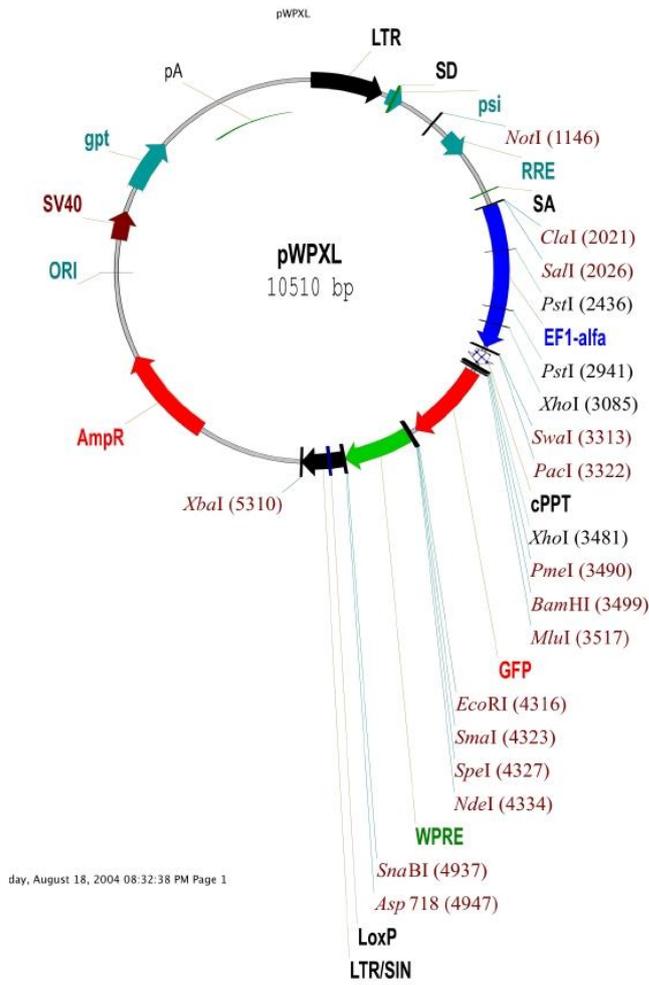


Abbildung 87: Plasmidkarte pWPXL (www.addgene.com).

➤ Publikationen während der Doktorarbeit

Poster

- GBM 2012, Reisenburg: Analysis of TRPC function in cells of kidney glomeruli.
- DGPT 2013, Halle: Analysis of TRPC function in mesangial cells and podocytes of kidney glomeruli.
- DGPT 2014, Hannover: Phospholipase C- ϵ (PLC ϵ) induced TRPC6 activation: A common but redundant mechanism in podocytes.
- Interact 2014, München: Phospholipase C- ϵ (PLC ϵ) induced TRPC6 activation: A common but redundant mechanism in podocytes.

Originalpublikation mit Koautorenschaft

- Migliorini A., Angelotti M.L., Mulay S.R., Kulkarni O.O., Demleitner J., Dietrich A., Sagrinati C., Ballerini L., Peired A., Shankland S.J., Liapis H., Romagnani P., Anders H.-J., 2013
The antiviral cytokines IFN- α and IFN- β modulate parietal epithelial cells and promote podocyte loss: implications for IFN toxicity, viral glomerulonephritis, and glomerular regeneration.
The American Journal of Pathology, Vol. 183, No. 2, 431-440 August 2013

Originalpublikation mit Erstautorenschaft

- Kalwa H.*, Storch U.*, Demleitner J.*, Fiedler S, Mayer T., Kannler M., Fahlbusch M., Barth H., Smrcka A., Hildebrandt F., Gudermann T. & Dietrich A. 2014 online / 2015.
* These authors contributed equally to the work.
Phospholipase C epsilon-induced TRPC6 activation: A common but redundant mechanism in primary Podocytes. Journal of Cell. Physiol. 230: 1389–1399

Originalpublikation mit Koauthorschaft in Revision

- Darisipudi N.M., Mi R., Kulkarni O.P., Mulay S.R., Demleitner J., Uhl B., Reichel C., Krombach F., Cohen C., Lindenmeyer M., Liapis H., Moll S., Reid E., Stitt A., Schott B., Gruner S., Haap W., Ebeling M., Hartmann G., Anders H.-J.
Cathepsin S promotes diabetic nephropathy and retinopathy by inducing PAR2-mediated endothelial dysfunction.

Vorträge

- „Journal Club“ des Walther-Straub-Instituts 2013, München: Wnt / β -catenin signalling pathway mediates high glucose induced cell injury through activation of TRPC-6 in podocytes. (Li Z. et al. 2013)
- Institutseminar des Walther-Straub-Instituts 2013, München: TRPC-Kanälen in Zellen der Niere.

➤ Literaturverzeichnis

Aktorics K., et al. 2009. Repetitorium- Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2009, Bd. 2. Auflage, S. 202.

Alzoubi A., Almalouf P., Toba M., O'Neill K., Qian X., Francis M., Taylor M.S., Alexeyev M., McMurtry I.F., Oka M., Stevens T. 2013. TRPC4 inactivation confers a survival benefit in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol.* Dezember 2013, S. 1779-88.

Amdani S.N., Jones C., Coward K. 2013. Phospholipase C zeta (PLC ζ): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Adv Biol Regul.* September 2013, S. 292-308.

Anderson M., Kim E.Y., Hagmann H., Benzing T., Dryer S.E. 2013. Opposing effects of podocin on the gating of podocyte TRPC6 channels evoked by membrane stretch or diacylglycerol. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305 (3). 2013, S. C276-C289.

Anderson M., Roshanravan H., Khine J., Dryer S.E. 2014. Angiotensin II activation of TRPC6 channels in rat podocytes requires generation of reactive oxygen species. *J. Cell Physiol.* 229. 2014, S. 434-442.

Andre F., Mir L. 2004. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene. Ther.* 11. 2004, S. 33- 42.

Andrukhova O., Smorodchenko A., Egerbacher M., Streicher C., Zeitz U., Goetz R., Shalhoub V., Mohammadi M., Pohl E.E., Lanske B., Erben R.G. 2014. FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. *EMBO J.* Januar 2014.

Arteaga C.L., Johnson M.D., Todderud G., Coffey R.J., Carpenter G., Page D.L. 1991. Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in primary human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dezember 1991, S. 10435-9.

Asanuma K., Yanagida-Asanuma E., Faul C., Tomino Y., Kim K., Mundel P. 2006. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nature cell biology.* 2006, S. 485-493.

Barde I., Salmon P., Trono D. 2010. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Neurosci.* 2010, S. Kapitel 4:Unit 4.21.

Barth H., Hofmann F., Oelenik C., Just I., Aktories K. 1998. The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary Clostridium botulinum C2 toxin interacts with the binding component

C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect Immun.* April 1998, S. 1364-9.

Barth H., Stiles B.G. 2008. Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr Med Chem.* 2008, S. 459-69.

Bedogna V., Valvo E., Casagrande P., et al. 1990. Effects of ACE inhibition in normotensive patients with chronic glomerular disease and normal renal function. *Kidney Int.* 1990, S. 101-107.

Beech D.J. 2005. Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32 (8), 2005, S. 597-603.

Beech D.J., Muraki K., Flemming R. 2004. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *J.Physiol.* 599 (Pt3). 2004, S. 685-706.

Bellone R.R. und Brooks S.A. et al. 2008. Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*). *Genetics.* 2008, 179(4), S. 1861-1870.

Benzing, T. 2004. Signaling at the Slit Diaphragm. *J.Am.Soc. Nephrol.* 15. 2004, S. 1382–1391.

Bergling S., Dolmetsch R., Lewis R.S., Keizer J. 1998. A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores. *Cell Calcium.* April 1998, S. 251-9.

Berna-Erro A., Galan C., Dionisio N., Gomez L.J., Salido G.M., Rosado J.A. 2012. Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* August 2012, S. 1242-51.

Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Oktober 2000, S. 11-21.

Berridge M.J., Lipp P., et al. 2000. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 287 (5458). 2000, S. 1604-1605.

Birnbaumer L., Zhu X., Jiang M., Boulay G., Peyton M. 1996. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (26). 1996, S. 15195-202.

Boron W., Boulpaep F., Emile L. 2009. Medical physiology : a cellular and molecular approach. *Saunders / Elsevier.* 2009, S. 480.

Boulay G., Zhu X. 1997. Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J. Biol. Chem.* 272 (47), 1997, S. 29672-29680.

Boyer O., Benoit G., Gribouval O., Nevo F., Pawtowski A., Bilge I., Bircan Z., al., et. 2010. Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *J. Med. Genet.* Juli 2010, 47, S. 445-52.

- Buck S.B., Bradford J., Gee K.R., Agnew B.J., Clarke S.T., Salic A. 2008.** Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* 44 (7). 2008, S. 927:929.
- Bunney T.D., Harris R., Gandarillas N.L., Josephs M.B., Roe S.M., Sorli S.C., Paterson H.F., Rodrigues-Lima F., Esposito D., Ponting C.P., Gierschik P., Pearl L.H., Driscoll P.C., Katan M. 2006.** Structural and mechanistic insights into ras association domains of phospholipase C epsilon. *Mol. Cell* 21. 2006, S. 495-507.
- Bunney T.D., Katan M. 2006.** Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends. Cell. Biol.* Dezember 2006, 16 (12), S. 640-8.
- Cahalan, M.D. 2009.** STIMulating store-operated Ca (2+) entry. *Nat. Cell Biol.* 2009, 11 (6), S. 669-677.
- Cai R., Ding X., Zhou K., Shi Y., Ge R., Ren G., Jin Y., Wang Y. 2009.** Blockade of TRPC6 channels induced G2 / M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells. *Int. J. Cancer.* November 2009, 12 (6), S. 2281-7.
- Campbell, Anthony K. 2015.** *Intracellular Calcium*. s.l. : John Wiley & Sons, 2015.
- Camps M., Carozzi A., Schnabel P., Scheer A., Parker P.J., Gierschik P. 1992.** Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature.* Dezember 1992, 360 (6405), S. 684-6.
- Camps M., Hou C., Sidiropoulos D., Stock J.B., Jakobs K.H., Gierschik P. 1992.** Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein beta gamma subunits. *Eur. J. Biochem.* Juni 1992, S. 821-31.
- Carozzi A., Camps M., Gierschik P., Parker P.J. 1993.** Activation of phosphatidylinositol lipid-specific phospholipase C-beta 3 by G-protein beta gamma subunits. *FEBS Lett.* Januar 1993, 315 (3), S. 340-2.
- Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. 1997.** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* Oktober 1997, 389 (6653), S. 816-824.
- Catterall W.A., Striessnig J., Snutch T.P., Perez-Reyes E. 2003.** International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev.* Dezember 2003, 55 (4), S. 579-81.
- Chen S., He F.F., Wang H., Shao N., Tian X.J., Liu J.S., Zhu Z.H., Wang Y.M., Wang S., Huang K., Zhang C. 2011.** Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell Calcium* 50 (6). 2011, S. 523-529.
- Chubanov V. und Schlingmann K.P. et al. 2007.** Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6. *J. Biol. Chem.* 2007, 282(10), S. 7656-7667.
- Clapham D.E. 2003.** TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003, 426 (6966), S. 517-523.

- Cosens D.J. und Manning A. 1969.** Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature*. 1969, 224, S. 285-287.
- D'Alonzo G.E., Barst R.J., Ayres S.M., Bergofsky E., Jundage B.H., Detre K.M., Fishman A.P., Goldring R.M., Groves B.M., Kernis J.T., al., et. 1991.** Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann. Intern. Med.* September 1991, 115 (5), S. 343-9.
- Davenport A.P. 2002.** International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* Juni 2002, 54 (2), S. 219-26.
- D'Esposito M., Strazzullo M., Cuccurese M., Spalluto C., Rocchi M., D'Urso M., Ciccociola A. 1998.** Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21-->q22. *Cytogenetics and cell genetics* 83(1-2). 1998, S. 46-47. doi:151165.
- Dietrich A., Chubanov V., Guderman T.,. 2010.** Renal TRP channels. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 2010, S. 736-744. Brief Review.
- Dietrich A., Gudermann T. 2014.** TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance. [Buchverf.] Flockerzi V. Nilius B. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, Berlin : Handbook of Experimental Pharmacology 222, Springer- Verlag, 2014, S. 157-188.
- Dietrich A., Kalwa H., Fuchs B., Grimminger F., Weissmann N., Gudermann T. 2007.** In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium*. 42 (2), 2007, S. 233-244.
- Dietrich A., Mederos y Schnitzler M., Emmel J., Kalwa H., Hofmann T., Gudermann T. 2003.** N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 und TRPC6 channel activity. *J. Biol. Chem.* 2003, 278 (48), S. 47842-47852.
- Dietrich A., Schnitzler M. M. Y., Gollasch M., Gross V., Storch U., Dubrovskaja G., Obst M., Yildirim E., Salanova B., Kalwa H., Essin K., Pinkenburg O., Luft F.C., Gudermann T., Birnbaumer L. 2005.** Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol. Cell. Biol.* 25. 2005, S. 6980-6989.
- Drin G., Scarlata S. 2007.** Stimulation of phospholipase C beta by membrane interactions, interdomain movement, and G protein binding -- how many ways can you activate an enzyme? *Cell. Signal.* 2007, 19, S. 1383-1392.
- Dryer S.E., Reiser J. 2010.** TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* . 2010, 299 (4), S. 689-701. Review.
- Duncan L, M., Deeds J., Hunter J., et al. 1998.** Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Research*. 1998, 58, S. 1515-1520.
- Eckel J., Lavin P.J., Finch E.A., Mukerji N., Burch J., Gbadegesin R., Wu G., Bowling B., Byrd A., Hall G., Sparks M., Zhang Z.S., Homstad A., Barisoni L., Birbaumer L., Rosenberg P., Winn M.P. 2011.** TRPC6 enhances angiotensin II-induced albuminuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (3), März 2011, S. 526-35.

- Edamatsu H., Satoh T., Kataoka T. 2006.** Ras and Rap1 activation of PLCepsilon lipase activity. *Methods Enzymol.* 2006, 407, S. 99-107.
- Eddahibi S., Adnot S. 2001.** Endothelins and pulmonary hypertension, what directions for the near future? *Eur. Respir. J.* Juli 2001, 18, S. 1-4.
- Eddahibi S., Morrell N., d'Ortho M.P., Naeije R., Adnot S. 2002.** Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* Dezember 2002, 20 (6), S. 1559-72.
- Erac Y., Selli C., Kosova B., Akcali K.C., Tosun M. 2010.** Expression levels of TRPC1 and TRPC6 ion channels are reciprocally altered in aging rat aorta: implications for age-related vasospastic disorders. *Age (Dordr).* Juni 2010, 32 (2), S. 223-30.
- Etienne-Manneville S., Hall A. 2002.** Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420. 2002, S. 629–635.
- Evellin S., Nolte J., Tysack K., von Dorp F., Thiel M., Weernik P.A., Jakobs K.H., Webb E.J., Lomasney J.W., Schmidt M. 2002.** Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, S. 16805-16813.
- Everett K.V., Chioza B.A., Georgoula C., Reece A., Gardiner R.M., Chung E.M. 2009.** Infantile hypertrophic pyloric stenosis: evaluation of three positional candidate genes, TRPC1, TRPC5 and TRPC6, by association analysis and re-sequencing. *Hum. Genet. (Springer).* Dezember 2009, S. 819-31.
- Faenza I., Bregoli L., Ramazzotti G., Gaboardi G., Follo M.Y., Mongiorgi S., Billi A.M., Manzoli L., Martelli A.M., Cocco L. 2007.** Nuclear phospholipase C beta1 and cellular differentiation. *Front. Biosci.* 2007, 13, S. 1452-2463.
- Faller A., Schünke G., unter Mitarbeit von Schünke M. 2008.** Der Körper des Menschen. Auflage 15, 2008, S. 500-523. Buch.
- Faul C., Donnelly M., Merscher-Gomez S., Chang Y.H., Franz S., Delfgaauwe J., Chang J.M., Choi H.Y., Campbell K.N., Kim K., Reiser J., Mundel P. 2008.** The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine. *A. Nat. Med.* 2008, 14 (9), S. 931-938.
- Ferreira P.A., Shortridge R.D., Pak W.L. 1993.** Distinctive subtypes of bovine phospholipase C that have preferential expression in the retina and high homology to the norpA gene product of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Juli 1993, 90 (13), S. 6042-6.
- Flockerzi V., Jung C., Aberle T., Meissner M., Freichel M., Philipp S.E., Nastainczyk W., Maurer P., Zimmermann R. 2005.** Specific detection and semi-quantitative analysis of TRPC4 protein expression by antibodies. *Pflugers Arch.* Oktober 2005, 415 (1), S. 81-6.
- Flockerzi V., Nilius B. 2014.** Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels, Volume 1. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2014, S. 1-12.
- Fostera R.R., Zadehb M.A.H., Welsha G.I., Satchella S.C., Yea Y., Mathiesona P.W., Batesb D.O., Saleema M.A. 2009.** Flufenamic acid is a tool for investigating TRPC6-mediated calcium signalling in human conditionally immortalised podocytes and HEK293 cells. *Cell Calcium* 45 (4). 2009, S. 384-390.

- Fraizer G.C., Patmasiriwat P., Zhang X., Saunders G.F. 1995.** Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow. *Blood* 86 (12). 1995, S. 4704-4706.
- Freichel M., Vennekens R., Olausson J., Stolz S., Philipp S.E., Weissgerber P., Flockerzi V. 2005.** Functional role of TRPC proteins in native systems: implications for knockout and knock-down studies. *J. Physiol.* 15 (567), 2005, S. 59-166. Review.
- Frishberg Y., Rinat C., Megged O., Shapira E., Feinstein S., Raas-Rothschild A. 2002.** Mutations in NPHS2 Encoding Podocin Are a Prevalent Cause of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome among Israeli-Arab Children. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, S. 400-405.
- Fuchs B., Rupp M., Ghofrani H.A., Schermuly R.T., Seeger W., Grimminger F., Gudermann T., Dietrich A., Weissmann N. 2011.** Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir. Res.* Februar 2011, 12:20.
- Fuso L., Baldi F., Di Perna A. 2011.** Therapeutic strategies in pulmonary hypertension. *Front. Pharmacol.* April 2011, S. 21.
- Garcia R.L., Schilling W.P. 1997.** Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Oktober 1997, S. 279-83.
- Gbadegesin R., Bartkowiak B., Lavin P.J., Mukerji N., Wu G., Bowling B., Ecke J., Damodaran T., Winn M.P. 2009.** Exclusion of homozygous PLCE1 (NPHS3) mutations in 69 families with idiopathic and hereditary FSGS. *Pediatr. Nephrol.* 24. 2009, S. 281-285.
- Gebeshuber A.C., Kornauth C., Dong L., Sierig R., Seibler J., Reiss M., Tauber S., Bilban M., Wang S., Kain R., Böhmig G.A., Moeller M.J., Gröne H.-J., Eglert C., Martinez J., Kerjaschki D. 2013.** Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nature Medicine* 19. 2013, S. 481-487.
- Giaid A., Yanagisawa M., Langleben D., Michel R.P., Levy R., Shennib H., Kimura S., Masaki T., Duguid W.P., Stewart D.J. 1993.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* Juni 1993, 328, S. 1723-9.
- Gibon J., Tu P., Bohic S., Richaud P., Arnaud J., Zhu M., Boulay G., Bouron A. 2011.** The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc. *Biochim. Biophys. Acta.* Dezember 2011, 1808 (12), S. 2807-18.
- Gilbert R.D., Turner C.L.S., Gibson J., Bass P.S., Haq M.R., Cross E., Bunyan D.J., Collins A.R., Tapper W.J., Needell J.C., Dell B., Morton N.E., Temple I.K., Robinson D.O. 2009.** Mutations in phospholipase C epsilon 1 are not sufficient to cause diffuse mesangial sclerosis. *Kidney Int.* 75. 2009, S. 415-419.
- Goel M., Sinkins W.G., Schilling W.P. 2002.** Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* Dezember 2002, 277 (50), S. 48303-10.
- Goel M., Zuo C.D., Sinkins W.G., Schilling W.P. 2007.** TRPC3 channels colocalize with Na⁺ / Ca²⁺ exchanger and Na⁺-pump in axial component of transverse-axial tubular system of rat ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007, 292 (2), S. H874-883.

Green M., Sambrook R.J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. [Hrsg.] Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012.

Greka A. und Mundel P. 2012. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu. Rev. Physiol. (Review)*. 2012, 74, S. 299-323.

Greka A., Mundel P. Balancing calcium signals through TRPC5 and TRPC6 in podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22. S. 1969-1980.

Gudermann, T. 2005. A new TRP to kidney disease. *Nat. Genet.* 2005, 37 (7), S. 663-664.

Guo J.-K., Menke A.L., Gubler M.-C., Clarke A.R., Harrison D., Hammes A., Hastie N.D., Schedl A. 2002. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 11 (6). 2002, S. 651-659.

Guo N. Huang, Weizhong Zeng, Joo Young Kim, Joseph P. Yuan, Linhuang Han, Shmuel Muallem, Paul F. Worley. 2006. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, Icrac and TRPC1 channels. *Nature Cell Biology* 8. 2006, S. 1003 - 1010.

Hains M.D., Wing M.R., Maddileti S., Siderovski D.P., Harden T.K. 2006. G α 12 / 13- and rho-dependent activation of phospholipase C-epsilon by lysophosphatidic acid and thrombin receptors. *Mol. Pharmacol.* 2006, 69, S. 2068- 2075.

Hartmann J., Dragicevic E., Adelsberger H., Henning H.A., Sumser M., Abramowitz J., Blum R., Dietrich A., Freichel M., Flockerzi V., Birnbaumer L., Konnerth A. 2008. TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination. *Neuron.* 2008, 59 (3), S. p392-398.

Hashimoto A., Takeda K., Inaba M., Sekimata M., Kaisho T., Ikehara S., Homma Y., Akira S., Kurosaki T. 2000. Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J. Immunol.* August 2000, 165 (4), S. 1738-42.

Heeringa S.F., Möller C.C., Du J., Yue L., Hinkes B., Chernin G., Vlangos C.N., Hoyer P.F., Reiser J., Hildebrandt F. 2009. A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLOS. one.* 2009, 4 (11).

Herlitz L.C. 2010. Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse. *J. of Am. Soc. of Nephrol.* 2010, 21 (1), S. 163-172.

Hinkes B., Wiggins R.C., Gbadegesin R., Vlangos C.N., Seelow D., Nürnberg G., Garg P., Verma R., Chaib H., Hoskins B.E., Ashraf S., Becker C., Hennies H.C., Goyal M., Wharram B.L., Schachter A.D., Mudumana S., Drum. I., Kerja D., Waldh. R., Dietrich A., et al. 2006. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nature Genetics* . 2006, 38 (12), S. 1397-1405.

Hofmann T., Obukhov A.G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T., Schultz G.,. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* 1999, 397, S. 259-263.

Hofmann T., Schaefer M. 2000. Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J. Mol. Med.* 2000, 78 (1), S. 14-25.

- Hofmann T., Schaefer M., Schultz G., Gudermann T. 2002.** Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Mai 2002, 99 (11), S. 7461-6.
- Hofstra J.M., Lainez S., van Kuijk W.H.M., Schoots J., Baltissen M.P.A., Hoefsloot L.H., Knoers N.V.A.M., Berden J.H.M., Bindels R.J.M., van der Vlag J., Hoenderop J.G.J., Wetzels J.F.M., Nijenhuis T. 2013.** New TRPC6 gain-of-function-mutation in a non-consanguineous Dutch family with late-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013, 28 (7).
- Holzhauser L., Zolty R. 2014.** Endothelin receptor polymorphisms in the cardiovascular system: potential implications for therapy and screening. *Heart Fail Rev.* Februar 2014, 19 (6).
- Homma Y., Takenawa T., Emori Y., Sorimachi H., Suzuki K. 1989.** Tissue- and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 164 (1), S. 406-412.
- Howard J., Bechstedt S. 2004.** Hypothesis: A helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Current Biology.* 2004, 14 (6), S. R224-R226.
- Hsu Y.J., Hoenderop J.G., Bindels R.J. 2007.** TRP channels in kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, 1772 (8), S. 928-936. Review.
- Hu G., Oboukhova E.A., Kumar S., Sturek M., Obukhov A.G. 2009.** Canonical transient receptor potential channels expression is elevated in a porcine model of metabolic. *Mol Endocrinol.* Mai 2009, 23 (5), S. 689-99.
- Huber T.B., Schermer B., Benzing T. 2007.** Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Experimental Nephrologie.* 2007, 106 (2), S. E27-31.
- Huissoon A., Meehan S., Keogh J.A. 1991.** Reduction of proteinuria with captopril therapy in patients with focal segmental glomerulus sclerosis and IgA nephropathy. *Ir. J. Med. Sci.* 1991, 160, S. 319-321.
- Ilatovska D.V., Palygin O., Chubinskiy-Nadezhdin V., Negulyaev Y.A., Ma R., Birnbaumer L., Staruschenko A. 2014.** Angiotensin II has acute effects on TRPC6 channels in podocytes of freshly isolated glomeruli. *Kidney Int.* 86. 2014, S. 506-514.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. 1990.** High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene.* November 1990, 96 (1), S. 23-8.
- Invitrogen.** Fluorescent Ca²⁺ Indicators Excited with UV Light - Section 19.2. [Online] [Zitat vom: 19. Januar 2014.] <http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html>.
- Jardin I., Gómez L.J., Salido G.M., Rosado J.A. 2009.** Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca²⁺ entry pathways. *Biochem. J.* Mai 2009, 420 (2), S. 267-76.
- Jiang H., Wu D., Simon M.I. 1994.** Activation of phospholipase C beta 4 by heterotrimeric GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* März 1994, 269 (10), S. 7593-6.

- Jiang L., Ding J., Tsai H., Li L., Feng Q., Miao J., Fan Q. 2011.** Overexpressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular Ca²⁺ and RhoA activation. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 236. 2011, S. 184-193.
- Jin T.G., Satoh T., Liao Y., Song C., Gao X., Kariya K., Hu C.D., Kataoka T. 2001.** Role of the CDC25 homology domain of phospholipase Cepsilon in amplification of Rap1- dependent signaling. *J. Biol. Chem.* . 2001, 276, S. 30301-30307.
- Jung S., Strotmann R., Schultz G., Plant T.D. 2002.** TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* Februar 2002, 282 (2), S. 347-59.
- Kalwa H., Storch U., Demleitner J., Fiedler S., Mayer T., Kannler M., FAhlbusch M., Barth H., Smrcka A., Hildebrandt F., Gudermann T., Dietrich A. 2015.** Phospholipase C epsilon-induced TRPC6 activation: A common but redundant mechanism in primary podocytes. *Journal of Cellular Physiology.* 2015, 230.
- Kanda S., Harita Y., Shibagaki Y., Sekine T., Igarashi T., Inoue T., Hattori S. 2011.** Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC-gamma1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol. Biol. Cell* 22 (11). 2011, S. 1824-1835.
- Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K., Harada K., Miyamoto S., Nakazawa H., Won K.J., Sato K. 1997.** Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* Juni 1997, 49 (2), S. 157-230.
- Kelley G.G., Reks S.E., Ondrako J.M., Smrcka A. 2001.** Phospholipase C (epsilon): a novel Ras effector. *EMBO J.* 2001, 20, S. 743-754.
- Kerjaschki, D. 2001.** Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J. Vlin. Invest.* 2001, 108 (11), S. 1583-1587.
- Kim D., Jun K.S., Lee S.B., Kang N.G., Min D.S. 1997.** Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature.* 1997, 389 (6648), S. 290-293.
- Kim J.Y., Saffen D. 2005.** Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J. Biol. Chem.* Juni 2005, 280, S. 32035-47.
- Kim N., Ahn S.J., Kim M.S., Seo J.S., Kim B.S., Bak H.J., Lee J.Y., Park M.A., Park J.H., Lee H.H., Chung J.K. 2013.** PLC-δ1-Lf, a novel N-terminal extended phospholipase C-δ1. *Gene.* Oktober 2013, 528 (2), S. 170-7.
- Kimmel P.L., Barisoni L., Kopp J.B. 2003.** Pathogenesis and treatment of HIV-associated renal disease: lessons from clinical and animal studies, molecular pathologic correlations and genetic investigations. *Annal. of intern. med.* 2003, 139 (2), S. 214-226.
- Kopp J.B., et al. 2010.** MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genetics.* 2010, 40 (10), S. 1175-1184.

- Korbet S. M. 1998.** Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998, 9, S. 1333-1340. Review.
- Korbet, S.M. 2012.** Treatment of primary FSGS in adults. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012, 23, S. 1769-1776. Review.
- Kraft, R. 2007.** The Na⁺ / Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 potently blocks TRPC channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* September 2007, 361 (1), S. 230-236.
- Krall P., Canales C.P., Kairath P., Carmona-Mora P., Molina J., Carpio J.D., Ruiz P., Mezzano S.A., Li J., Wei C., Reiser J., Young J.I., Walz K. 2010.** Podocyte-specific overexpression of wild type or mutant trpc6 in mice is sufficient to cause glomerular disease. *PLoS One* 5. 2010.
- Kriz, W. 2005.** TRPC6 - a new podocyte gene involved in focal segmental glomerulosclerosis. *Trends. Mol. Med.* Dezember 2005, 11 (12), S. 527-30.
- Kwon Y., Hofmann T., Montell C. 2007.** Integration of phosphoinositide- and calmodulin- mediated regulation of TRPC6. *Mol. Cell.* 2007, 25 (4), S. 491-503.
- Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* August 1970, 227, S. 680-5.
- Lainez S., Schlingmann K.P., van der Wijst J., Dworniczak B., van Zeeland F., Konrad M., Bindels R.J., Hoenderop J.G. 2014.** New TRPM6 missense mutations linked to hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Eur. J. Hum. Genet.* April 2014, 22 (4), S. 497-504.
- Leuner K., Kazanski V., Mueller M., Essin K., Henke B., Gollasch M., Harteneck C., Mueller W.E. 2007.** Hyperforin-a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J.* 2007, 21 (14), S. 41001- 4111.
- Leuner K., Li W., Amaral M.D., Rudolph S., Calfa G., Schuwald A.M., Harteneck C., Inoue T., Pozzo-Miller L. 2013.** Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca²⁺ -permeable TRPC6 channels. *Hippocampus.* Januar 2013, 23 (1), S. 40-52.
- Lewis, R.S. 2011.** Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* Dezember 2011, 3 (12), S. 1-24.
- Li H.S., Xu X.Z., Montell C. 1999.** Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* 24 (1). 1999, S. 261-273.
- Li T., Chen Y., Zang W., Geng N., Ma S., Li X. 2013.** Prostacyclin and its analogues in pulmonary artery hypertension: a meta-analysis. *Curr. Med. Res. Opin.* August 2013, 29 (8), S. 889-99.
- Li Z., Xu J., Xu P., Liu S., Yang Z. 2013.** Wnt / β -catenin signalling pathway mediates high glucose induced cell injury through activation of TRPC-6 in podocytes. *Cell. Prolif.* 2013, 46, S. 76-85.
- Liang C.C., Park A.Y., Gun J.L. 2007.** In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2 (2). 2007, S. 329-333.

Liao Y., Plummer N.W., George M.D., Abramowitz J., Zhu M.X., Birnbaumer L. 2009. A role of Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009, 106 (9), S. 3202-3206.

Liman E.R., Corey D.P., Dulac C., 1999. TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1999, 96 (10), S. 5791-5796.

Lin H., Lee J.L., Hou H.H., Chung C.P., Hsu S.P., Juan S.H. 2008. Molecular mechanisms of the antiproliferative effect of beraprost, a prostacyclin agonist, in murine vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* Februar 2008, 214 (2), S. 434-41.

Liu Q., Sham J.S., Shimoda L.A., Sylvester J.T. 2001. Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* Mai 2001, 280 (5), S. L856-65.

Lonza. . Nucleofector Protocols. [Online] . <http://bio.lonza.com/resources/product-instructions/protocols/>.

Lopez I., Mak E.C., Ding J., Hamm H.E., Lomasney J.W. 2001. A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by G-alpha 12 and stimulates the Ras / mitogen activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, S. 2758-2765.

Masuzawa M., Fujimura T., Hamada Y., Fujita Y., Hara H., Nishiyama S., Katsuoka K., Tamauchi H., Sakurai, Y. 1999. Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Int.J.Cancer* 81. 1999, S. 305-308.

McCarthy E.T., Sharma M., Savin V.J. 2010. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010, S. 2115-2121.

Minke B., Cook B. 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol. Rev.* 2002, 82 (2), S. 429- 472.

Minke B., Wu C., Pak W.L. 1975. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature.* 1975, 258, S. 84-87.

Minke, B. 1982. Light-induced reduction in excitation efficiency in the trp mutant of *Drosophila*. *J. Gen. Physiol.* März 1982, 79 (3), S. 361-85.

Minke, Baruch. 2010. The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J. Neurogenet.* Dezember 2010, 24 (4), S. 216-33.

Möller C.C., Wei C., Altintas M.M., Li J., Greka A., Ohse T., Pippin J.W., Rastaldi M.P., Wawersik S., Schiavi S., Henger A., Kretzler M., Shankland S.J., Reiser J. 2007. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* Januar 2007, 18 (1), S. 29-36.

Mollet G., Ratelade J., Boyer O., Muda A. O., Morisset L., Lavin T. A., Kitzis D., Dallman M. J., Bugeon L., Hubner N., Gubler M. C., Antignac C., Esquivel E. L. 2009. Podocin Inactivation in Mature Kidneys Causes Focal Segmental Glomerulosclerosis and Nephrotic Syndrome. 2009, 20 (10), S. 2181–2189.

- Montell C. und Rubin G.M. 1989.** Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989, 2(4), S. 1313-23.
- Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V., Bindels R.J., Bruford E.A., Caterina M.J., Clapham D.E., Harteneck C., Heller S., Julius D., Kojima I., Mori Y., Penner R., Prawitt D., Scharenberg A.M., Schultz G., Shimizu N., Zhu M.X. 2002.** A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell*. Februar 2002, 9 (2), S. 229-31.
- Montell, C. 2001.** Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE*. Juli 2001, 90 p.re 1.
- Moran M.M., McAlexander M.A., Bíró T., Szallasi A. 2011.** Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011, 10, S. 601-620.
- Mottl A.K., Lu M., Fine C.A., Weck K.E. 2013.** A novel TRPC6 mutation in a family with podocytopathy and clinical variability. *BMC Nephrology*. 2013, 10, 14:104, S. 14:104.
- Mundel P. und Kriz W. 1995.** Structure and function of podocytes: an update. *Anat. Embryol*. 1995, 192 (5), S. 192:385-397.
- Mundel P., Heid H.W., Mundel T.M., Krüger M., Reiser J., Kriz W. 1997.** Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *Journal of Cell Biology*. 1997, 139 (1), S. 193-204.
- Nilius B., Owsianik G. 2011.** The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*. 2011, 12 (3), S. 218. Review.
- Numata T., Shimizu T., Okada Y. 2007.** Direct mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel. *Cellular and Physiological Biochemistry*. 19 2007, 19 (1-4), S. 1-8.
- Okada T., Inoue R., Yamazaki K., Imoto K., Mori Y. 1999.** Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca (2+) permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *L.Biol. Chem*. 1999, 274 (39), S. 27359- 27370.
- Okada T., Shimizu S., Wakamori M., Maeda A., Kurosaki T., Takada N., Imoto K., Mori Y. 1998.** Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J. Biol. Chem*. April 1998, 273 (17), S. 10279-87.
- Olschewski H., Hoepfer M.M., Borst M.M., Ewert R., Grünig E. 2006.** Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie. *Pneumologie*. 2006, 60, S. 749-771.
- Ostendorf, B.N. 2010.** Ein neues Motiv reguliert die Internalisierung und Degradation des glomerulären Schlitzmembranproteins Podocin. *Dissertation*. 2010.
- Owsianik G., D'hoedt D., Voets T., Nilius B. 2006.** Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2006, 156, S. 61-90.
- Park D., Jhon D.Y., Lee C.W., Lee K.H., Rhee S.G. 1993.** Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J. Biol. Chem*. März 1993, 268 (7), S. 4573-6.

- Partent R., Perris R., Vecchio G.M., Salvatorelli L., Torrisi A., Gravina L., Magro G. 2013.** Immunohistochemical expression of Wilms' tumor protein (WT1) in developing human epithelial and mesenchymal tissues. *Acta. Histochemica* . 2013, 115 (1), S. 70-75.
- Patterson R.L., van Rossum D.B., Ford D.L., Hurt K.J., Bae S.S., Suh P.G., Kurosaki T., Snyder S.H., Gill D.L. 2002.** Phospholipase C-gamma is required for agonist-induced Ca²⁺ entry. *Cell*. November 2002, 111 (4), S. 529-41.
- Philipp S., Hambrecht J., Braslavski L., Schroth G., Freichel M., Murakami M., Cavalié A., Flockerzi V. 1998.** A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J*. August 1998, 17 (15), S. 4274-82.
- Philipp S., Trost C., Warnat J., Rautmann J., Himmerkus N., Schroth G., Kretz O., Nastainczyk W., Cavalié A., Hoth M., Flockerzi V. 2000.** TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca²⁺ -like channels in adrenal cells. *J. Biol. Chem*. August 2000, 275 (31), S. 23965-72.
- Pimentel, Enrique. 1994.** *Handbook of Growth Factors*. s.l. : CRC Press, 1994.
- Pollak M.R. 2002.** Inherited Podocytopathies: FSGS and Nephrotic Syndrome from a Genetic Viewpoint. *J. Am. Soc. Nephrol.* . 2002, 13, S. 3016-3023.
- Praga M., Hernandez E., Montoyo C., Andres A., Ruilope L.M., Rodicio J.L. 1992.** Long-term beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with nephrotic proteinuria. *A. Qm. J. Kidney Dis.* . 1992, 20, S. 240-248.
- Purves W.K., Sadava D., Orians G.H., Heller H.C. 2006.** *Biologie*. 7. Auflage. München : Spektrum (Elsevier), 2006. S. 1239.
- Rastaldi M.P., Armelloni S., Berra S., Calvaresi N., Corbelli A., Giardino L.A., Li M., Wang G.Q., Fornasieri A., Vila A., Heikkila E., Soliymani R., Boucherot A., Cohen C.D., Kretzler M., Nitsche A., Ripamonti M., Malgaroli A., Pesaresi M., et al. 2006.** Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *The FASEB Journal - FJ Express Summary*. 2006, 20, S. 976-978 und E88-E97.
- Razzini G., Brancaccio A., Lemmon M.A., Guarnieri S., Falasca M. 2000.** The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta (1). *J. Biol. Chem*. Mai 2000, 275 (20), S. 14873-81.
- Rebecchi M.J., Pentylala S.N. 2000.** Structure, function and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *C. C. Physiol. Rev.* 2000, 80, S. 1291-1335.
- Reiser J., Polu K.R., Moller C.C., Kenlan P., Altintas M.M., Wei C., Faul C., Herbert S., Villegas I., Avila-Casado C., McGee M., Sugimoto H., Brown D., Kalluri R., Mundel P., Smith P.L., Clapham D.E., Pollak M.R. 2005.** TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat. Genet.* 2005, 37 (7), S. 739-744.
- Rhee, S.G. 2001.** Regulation of phosphoinositide- specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* . 2001, 70, S. 281-312.

Riccio A., Li Y., Moon J., Kim K.S., Smith K.S., Rudolph U., Gapon S., Yao G.L., Tsvetkov E., Rodig S.J., Vant't Veer A., Meloni E.G., Carlezon W.A. jr., Bolshakov V.Y., Clapham D.E. 2009. Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell* 15. 2009, 137 (4), S. 761-772.

Roche Universal Probe Library. [Online] <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/ezhome.html>.

Ronconi E., Sagrinati C., Angelotti M.L., Lazzeri E., Mazzinghi B., Ballerini L., Parente E., Becherucci F., Gacci M., Carini M., Maggi E., Serio M., Vannelli G.B., Lasagni L., Romagnani S., Romagnani P. 2009. Regeneration of Glomerular Podocytes by Human Renal Progenitors. *Journal Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, S. 322-332.

Roshanravan H., Dryer S.E. 2014. ATP acting through P2Y receptors causes activation of podocyte TRPC6 channels: role of podocin and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 306. 2014, S. F1088-1097.

Salido G.M., Jardín I., Rosado J.A. 2011. The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011, 704, S. 413-33.

Saul S., Stanisz H., Backes C.S., Schwarz E.C., Hoth M. 2014. How ORAI and TRP channels interfere with each other: interaction models and examples from the immune system and the skin. *Eur. J. Pharmacol.* September 2014, 739, S. 49-59.

Saunders C.M., Larman M.G., Parrington J., Cox L.J., Royse J., Blayney L.M., Swann K., Lai F.A. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development.* August 2002, 129 (15), S. 3533-44.

Schaldecker T., Kim S., Tarabanis C., Tian D., Hakrrouch S., Castonguay P., Ahn W., Wallentin H., Heid H., Hopkins C.R., Lindsley C.W., Riccio A., Buvall L., Weins A., Greka A. 2013. Inhibition of the TRPC5 ion channel protects the kidney filter. *J. Clin. Invest.* Dezember 2013, 123 (12), S. 5298-309.

Schlöndorff D. 1996. Roles of the mesangium in glomerular function. *Kidney international.* 1996, 49, S. 1583-1585.

Schlöndorff J., Del C., Carrasquillo R., Lacey V., Pollak M.R. 2009. TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009, 296 (3), S. C 558-569.

Schmidt M., Evellin S., Weernik P.A., von Dorp F., Rehmann H., Lomasney J.W., Jakobs K.H. 2001. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat. Cell Biol.* . 2001, 3, S. 1020-1024.

Schwimmer J.A., Markowitz G.S., Valerie A.M., Imbriano L.J., Alvis R., D'Agati V.D. 2003. Secondary focal segmental glomerulosclerosis in non-obese patients with increased muscle mass. *Clin. Nephrol.* . 2003, 60 (4), S. 233-241. Case Report.

Seeger W., Adir Y., Barberà J.A., Champion H., Coghlan J.G., Cottin V., De Marco T., Galiè N., Ghio S., Gibbs S., Martinez F.J., Semigran M.J., Simonneau G., Wells A.U., Vachiéry J.L. 2013. Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J. Am. Coll. Cardiol.* Dezember 2013, 62 (25), S. 109-16.

- Seeger W., Pullamsetti S.S. 2013.** Mechanics and mechanisms of pulmonary hypertension- Conference summary and translational perspectives. *Pulm. Circ.* Januar 2013, 3 (1), S. 128-36.
- Seferian A., Chaumais M.C., Savale L., Günther S., Tubert-Bitter P., Humbert M., Montani D. 2013.** Drugs induced pulmonary arterial hypertension. *Presse Med.* September 2013, 42 (9 Pt 2), S. 303-10.
- Seifert J.P., Zhou Y., Hicks S.N., Sondek J., Harden T.K. 2008.** Dual activation of phospholipase C-epsilon by Rho and Ras GTPases. *J. Biol. Chem.* Oktober 2008, 290 (23), S. 29690-8.
- Seo K., Rainer P.P., Shalkey Hahn V., Lee D.I., Jo S.H., Andersen A., Liu T., Xu X., Willette R.N., Lepore J.J., Marino J.P.Jr., Birnbaumer L., Schnackenberg C.G., Kass D.A. 2014.** Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Januar 2014, 111 (4), S. 1551-6.
- Shen A.C., Jennings R.B. 1972.** Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am. J. Pathol.* Jun 1972, 67 (3), S. 441-52.
- Shi J., Mori E., Mori Y., Mori M., Li J., Ito Y., Inoue R. 2004.** Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J. Physiol.* Dezember 2004, 561 (Pt 2), S. 415-32.
- Shi Y., Ding X., He Z.H., Zhou K.C., Wang Q., Wang Y.Z. 2009.** Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer. *Gut.* November 2009, 58 (11), S. 1443-50.
- Shibatohge M., Kariya K., Liao Y., Hu C.D., Watari Y., Goshima M., Shima F., Kataoka T. 1998.** Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras. *J. Biol. Chem.* . 1998, 273, S. 6218-6222.
- Shiiki H., Dohi K. 2000.** Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: Clinical Course, Predictors of Renal Outcome and Treatment. *Int. Med.* 2000, 39 (8), S. 606-611.
- Smrcka A.V., Brown J.H., Holz G.G. 2012.** Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cellular Signalling.* 2012, 24, S. 1333–1343.
- Soboloff J., Spassova M., Xu W., He L.P., Cuesta N., Gill D.L. 2005.** Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* Dezember 2005, 280 (48), S. 39786-94.
- Song C., Hu C.D., Masago M., Kariyai K., Yamawaki-Kataoka Y., Shibatohe M., Wu D., Satoh T., Kataoka T. 2001.** Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by RAs. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, S. 2752-2757.
- Song J., Wang Y., Li X., Shen Y., Yin M., Guo Y., Diao L., Liu Y., Yue D. 2013.** Critical role of TRPC6 channels in the development of human renal cell carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* August 2013, 40, S. 5115-22.
- Spraggon L., Dudnakova T., Slight J., Lustig-Yariv O., Cotterell J., Hastie N., Miles C. 2007.** hnRNP-U directly interacts with WT1 and modulates WT1 transcriptional activation. *Oncogene.* 2007, 26, S. 1484-1491.

- Storch U., Forst A.L., Phillipp M., Gudermann T., Mederos y Schnitzler M. 2012.** Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *J. Biol. Chem.* 2012, 287 (5), S. 3530-3540.
- Stowers L., Holy T.E., Meister M., Dulac C., Koentges G. 2002.** Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* Februar 2002, 295, S. 1493-500.
- Strübing, C, et al. 2003.** Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J. Biol. Chem.* Juli 2003, 278, S. 39014-9.
- Suh P.-G., Park J.-I., Manzoli L., Cocco L., Peak J.C., Katan M., Fukami K., Kataoka T., Yun S., Ryu S.H. 2008.** Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMP reports.* 2008, 41 (6), S. 415-434. Review.
- Sukumaran P., Löf C., Kemppainen K., Kankaanpää P., Pulli I., Näsman J., Viitanen T., Törnquist K. 2012.** Canonical transient receptor potential channel 2 (TRPC2) as a major regulator of calcium homeostasis in rat thyroid FRTL-5 cells: importance of protein kinase C δ (PKC δ) and stromal interaction molecule 2 (STIM2). *J. Biol. Chem.* Dezember 2012, 287 (53), S. 44345-60.
- Sukumaran P., Löf C., Pulli I., Kemppainen K., Viitanen T., Törnquist K. 2013.** Significance of the transient receptor potential canonical 2 (TRPC2) channel in the regulation of rat thyroid FRTL-5 cell proliferation, migration, adhesion and invasion. *Mol. Cell Endocrinol.* Juli 2013, 374 (1-2), S. 10-21.
- Swann K., Larman M.G., Saunders C.M., Lai F.A. 2004.** The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction.* April 2004, 127 (4), S. 431-9.
- Tadano M., Edematsu H., Minawisawa S., Yokoyama U., Ishikawa Y., Suzuki N., Saito H., Wu D., Masago-Toda M., Yamawaki-Kataoka Y., Setsu T., Terashima T., Maeda S., Satoh T., Kataoka T. 2005.** Congenital semilunar valvulogenesis defect in mice deficient in phospholipase C epsilon. *Mo. Cell Biol.* 2005, 25, S. 2191-2199.
- Takahashi H., Soma S., Muramatsu M., Oka M., Ienaga H., Fukuchi Y. 2001.** Discrepant distribution of big endothelin (ET)-1 and ET receptors in the pulmonary artery. *Eur. Respir. J.* Juli 2001, 18 (1), S. 5-14.
- Takenawa T., Nagai Y. 1981.** Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, S. 6769-6775.
- Tian D., Jacobo S.M., Billing D., Rozkalne A., Gage S.D., Anagnostou T., Pavenstadt H., Hsu H.H., Schlöndorff J., Ramos A., Greka A. 2010.** Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Science signaling.* 2010, 3 (145), S. ra77.
- Tryggvason, K. 1999.** Unraveling the Mechanisms of Glomerular Ultrafiltration: Nephlin, a Key Component of the Slit Diaphragm. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10 (11), S. 2440–2445.
- Tsutsui H., Karasawa S., Okamura Y., Miyawaki A. 2008.** Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat. Methods.* August 2008, 5, S. 683-685.

- Tu P., Gibon J., Bouron A. 2010.** The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. *Journal of neurochemistry*. 2010, 112 (1), S. 204-213.
- Ueda N., Iniguez-Lluhi J.A., Lee E., Smrcka A.V., Robishaw J.D., Gilman A.G. 1994.** G protein beta gamma subunits. Simplified purification and properties of novel isoforms. *J. Biol. Chem.* Februar 1994, 269 (6), S. 4388-95.
- Unger R.E., Krump-Konvalinkova V., Peters K., Kirkpatrick J.C. 2002.** In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular Research* . 2002, 64, S. 384-397.
- Urban N., Hill K., Wang L., Kuebler W.M., Schaefer M. 2012.** Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia induced vasoconstriction. *Cell Calcium*. 2012, 51 (2), S. 194-206.
- Venkatachalam und Montell C. 2007.** TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* 2007, 76, S. 387–417.
- Wang H., Oestereich E.A., Maekawa N., Bullard T.A., Vikstorm K.L., Dirksen R.T., Kelley G.G., Balaxall B.C., Smrcka A.V. 2005.** Phospholipase C epsilon modulates beta-adrenergic receptor-dependent cardiac contraction and inhibits cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* . 2005, 97, S. 1305-1313.
- Wang R.C., Jiang F.M., Zheng Q.L., Li C.T., Peng X.Y., He C.Y., Luo J., Liang Z.A. 2014.** Efficacy and safety of sildenafil treatment in pulmonary arterial hypertension: A systematic review. *Respir Med.* März 2014, 108 (3), S. 531-7.
- Wang T., Pentylala S., Elliott J.T., Dowal L., Gupta E., Rebecchi M.J., Scarlata S. 1999.** Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C- β 1 and- β 2 with activated G α q subunits: an alternative function for C2-signaling modules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Juli 1999, 96 (14), S. 7843-6.
- Wang Y., Yue D., Li K., Liu Y.L., Ren C.S., Wang P. 2010.** The role of TRPC6 in HGF-induced cell proliferation of human prostate cancer DU145 and PC3 cells. *Asian J. Androl.* November 2010, 12 (6), S. 841-52.
- Wartiovaara, J. et al. 2004.** Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J. of Clin. Inv.* 2004, 114 (10), S. 1475-1483.
- Waypa G.B., Chandel N.S., Schumacker P.T. 2001.** Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ. Res.* Juni 2001, 88 (12), S. 1259-66.
- Wei C., El Hindi S., Li J., Fprnoni A., Goes N. 2011.** Circulatin urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Med.* 2011, 17.
- Weissmann N. 2012.** Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nature Communications*. 2012, 3, S. S. 3:649.
- Weissmann N., Dietrich A., Fuchs B., Kalwa H., Ay M., Dimitrascu R., et al. 2006.** Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (50), 2006, S. 19093-19108.

- Weitzenblum E., Hirth C., Ducolone A., et al. 1981.** Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1981, 36 (10), S. 752-758.
- Wes P.D., Chevesich J. und et al. 1995.** TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, 92(21): 9652-6.
- Wettschureck N., Offermanns S. 2005.** Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* 2005, 85, S. 1159–1204.
- Williams, R.L. 1999.** Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999, 1441 (2-3), S. 255-67.
- Wing M.R., Houston D., Kelley G.G., Der C.J., Siderovski D.P., Harden T.K. 2001.** Activation of phospholipase C- ϵ by Heterotrimeric G Protein $\beta\gamma$ -Subunits. *J. Biol. Chem.* 2001, S. 48257-48261.
- Winn M.P., Conlon P.J., Lynn K.L., Farrington M.K., Creazzo T., Hawkins A.F., DAskalakis N., Kwan S.Y., Ebersviller S., Burchette J.L., Pericak-Vance M.A., Howell D.N., Vance J.M., Rosenberg P.B. 2005.** A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*. 2005, 308 (5729), S. 1801-1804.
- **Vrenken T.E., Bindels R.J., Hoenderop J.G. 2009.** The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009, 5 (8), S. 441-449. Review.
- Xia Y., Yang X.R., Fu Z., Paudel O., Abramowitz J., Birnbaumer L., Sham J.S. 2014.** Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. *Pulm. Hypertension*. Januar 2014, 63, S. 173-80.
- Yildirim E., Birnbaum L. 2007.** TRPC2: molecular biology and functional importance. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2007, 179, S. 53-75. Review.
- Yuan J.P., Zeng W., Huang G.N., Worley P.F., Muallem S. 2007.** STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat. Cell Biol.* Mai 2007, 9, S. 636-47.
- Yuan J.P., Zeng W., Huang G.N., Worley P.F., Muallem, S. 2009.** TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels*. 2009, 3 (4), S. 221-225.
- Zechel S., Werner S., von Bohlen und Halbach O. 2007.** Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res.* 2007, 328 (3), S. 651-706.
- Zhang J., Pippin J.W., Krofft R.D., Naito S., Liu Z.H., Shankland S.J. 2013.** Podocyte repopulation by renal progenitor cells following glucocorticoids treatment in experimental FSGS. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2013, 304 (11), S. F1375-1389.
- Zhang J., Pippin J.W., Vaughan M.R., Kroft R.D., Taniguchi Y., Romagnani P., Nelson P.J., Liu Z.H., Shankland S.J. 2012.** Retinoids augment the expression of podocyte proteins by glomerular parietal epithelial cells in experimental glomerular disease. *Nephron Experimental Nephrology*. 2012, 121 (1-2), S. E23-37.

Zhang L., Saffen, D. 2001. Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J. Biol. Chem.* Januar 2001, 276, S. 13331-9.

Zhou F.W., Roper S.N. 2014. TRPC3 mediates hyperexcitability and epileptiform activity in immature cortex and experimental cortical dysplasia. *J. Neurophysiol.* März 2014, 111 (6), S. 1227-1237.

Zhu X., Chu P.B., Peyton M., Birnbaumer L. 1995. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene. *FEBS Lett.* Oktober 1995, 373 (3), S. 193-8.

Zhu X., Jiang M., Peyton M., Boulay G., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L. 1996. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell.* Mai 1996, 85 (5), S. 661-71.

Zitt C., Zobel A., Obukhov A.G., Harteneck C., Kalkbrenner F., Lückhoff A., Schultz G. 1996. Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron.* Juni 1996, 16 (6), S. 1189-96.

Zywietz A., Gohla A., Schmelz M., Schultz G., Offermanns S. 2001. Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and -independent mechanisms. involvement of Gq but not G11. *J. Biol. Chem.* Februar 2001, S. 3840-5.

➤ Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Molekulare Analyse der Funktion des TRPC6-Kanals in primären Podozyten der Maus

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin / Doktorand

➤ Danksagung

Allen voran bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann, der mir die Möglichkeit gab in seinem Institut meine Doktorarbeit durchzuführen.

Ferner möchte ich Prof. Dr. Alexander Dietrich für die großartige Betreuung meiner Doktorarbeit höchsten Dank aussprechen. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Auch bedanke ich mich bei den verschiedenen Gutachtern meiner Arbeit für ihre Mühen. Leider kann ich diese namentlich noch nicht aufführen, da sie mir noch nicht bekannt sind.

Besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. Hermann Kalwa. Hermann, ich kann kaum in Worte fassen wie sehr du mich unterstützt hast. Ich weiß nicht was mir mehr geholfen hat, dein fachlicher Beistand oder deine stets unermüdliche Motivation, wenn die „Benchitis“ wieder die Oberhand ergriffen hatte.

Weiterhin danken möchte ich meinen großartigen Kollegen der AG Dietrich für die Hilfe und Unterstützung in allen fachlichen, aber auch privaten, Belangen. Mein tiefster Dank gilt Susanne Fiedler für die unermüdliche, tatkräftige und äußerst motivierte Unterstützung während ihrer Masterarbeit. Du wurdest von einer Praktikantin, zur Masterstudentin, Doktorandin und schließlich Freundin. Nicht weniger wichtig für mich waren Katharina Hofmann, Martina Kannler und Bettina Braun. Danke euch viere, dass stets auf euch Verlass war, ihr immer ein offenes Ohr hattet und dass ihr mich stets mit konstruktiver Kritik bereichert habt. Ich will unsere gemeinsame Zeit nicht missen und hoffe unsere Freundschaft bleibt auch weiterhin so bestehen, wie sie momentan ist.

Über dies möchte ich meiner Tischnachbarin Diana Koch für die gute Zusammenarbeit großen Dank aussprechen.

Tim Mayer, Sebastian Kubanek und Jonas Weber möchte ich für die tolle Zusammenarbeit und dafür, dass ihr zu unterschiedlichen Zeiten etwas mehr Testosteron in unserer Arbeitsgruppe gebracht habt, danken. So viele Frauen auf einem Haufen sind nicht immer ganz problemlos zu händeln und ihr habt es geschafft etwas Gelassenheit und Ruhe in die Gruppe zu bringen. Mein Dank gilt außerdem Brigitte Mayerhofer und Christiana Oehlmann für ihre stets fachmännische und kompetente Unterstützung. Oehli möchte ich außerdem dafür danken, dass sie stets die verschiedensten Kontakte geknüpft und den neuesten Buschfunk weitergeleitet hat.

Großer Dank gilt außerdem dem Team unseres Tierstalles, allen voran Petra Eigner und Brigitte Mayerhofer, für eine stets vorbildliche Arbeit mit den Tieren und all ihren Belangen.

An dieser Stelle möchte ich auch den anderen Arbeitsgruppen des Walther-Straub-Institutes für die gute Zusammenarbeit danken, deren einzelne Vertreter ich hier nicht alle erwähnen kann. Besonders möchte ich mich aber bei den AG's Schredlsecker, Steinritz und Mückter für die Aushilfe mit Chemikalien und Geräten sowie für die stets ermunternden Mittagspausen bedanken. Einzeln danken möchte ich an dieser Stelle Christian Bald für die ermunternden Gespräche morgens vor der Arbeit, sowie Christian Juretschke für die Kaffeepausen an langen Arbeitstagen - Ihr habt mich

zwischendurch auf andere Gedanken gebracht, sodass ich Kraft für die weiteren Arbeitsstunden sammeln konnte.

Außerdem möchte ich mich zu tiefst bei allen bedanken, die diese Arbeit auf Rechtschreibfehler korrigiert haben. Im speziellen bei meinen Kollegen der AG Dietrich und den drei fachfremden Leserinnen Aloisia Neumeier (Krankenschwester), Frau Dr. Stefanie Anders (Anthropologin) und Lisa Plesch (Physikerin).

Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle zudem meine Eltern, Großeltern, Schwiegereltern und meine restliche Familie sowie Freunde die, egal in welcher Situation, immer hinter mir standen und stehen.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem lieben Ehemann Michael, der mir stets in allen Lebenslagen zur Seite stand und steht, sowie meine Übellaunigkeiten in stressigen Zeiten der Doktorarbeit auffing. Ich liebe dich mehr denn je!