

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

***Mechanismen von glomerulärem Zelltod, Entzündung und
Fibrose bei der Adriamycin-induzierten Glomerulosklerose
in der Maus***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Julia Krappe
aus Marburg

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Uwe Heemann
Priv.Doz. Dr. Gerald Schulz
Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann
Prof. Dr. Enrico De Toni

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2022

Für meine Eltern

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Wilkening A, Krappe J, Mühe AM, Lindenmeyer MT, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V.
C-C chemokine receptor type 2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal
segmental glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant. 2020 Feb 1;35(2):227-239

Zusammenfassung

Die Anzahl an Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen nimmt stetig zu und damit die gesundheitliche und ökonomische Relevanz. Die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) stellt eine häufige glomeruläre Ursache einer chronischen Nierenerkrankung dar. Sie ist durch histologische Veränderungen des Glomerulus gekennzeichnet, zu denen eine progrediente Vernarbung, entzündliche Veränderungen und der Verlust von podozytären Fußfortsätzen zählen. Dadurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere und zu fortschreitender Proteinurie im nephrotischen Bereich, was in späten Stadien zu einer terminalen Niereninsuffizienz führt. Hinsichtlich der Entstehung der FSGS gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze, die zum einen einen podozytären Schaden durch genetische Veränderungen in kritischen podozytären Genen und durch bislang nicht definierte zirkulierende Mediatoren am Beginn der Erkrankungskaskade sehen, zum anderen die Aktivität weiterer glomerulärer Zellen wie Mesangialzellen, glomerulärer Endothelzellen und Parietalzellen beinhalten. Ein möglicher zirkulierender Mediator ist das Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF), welches renal proinflammatorisch und proapoptisch wirkt.

Zur besseren Charakterisierung der molekularen und zellbiologischen Mechanismen der FSGS wurden in der vorliegenden Arbeit die vier glomerulären Zelltypen in Einzelzellkulturen mit Adriamycin (ADR) stimuliert, das im Mausmodell ein histopathologisches Bild induziert, welches mit der humanen FSGS vergleichbar ist. Mittels Proliferations-Assay wurde der Anteil vitaler Zellen nach Stimulation mit ADR gemessen. Zusätzlich wurde durch Hinzugabe von Zelltod-Inhibitoren der Anteil ablaufender Apoptose und Nekroptose am ADR-induzierten Zelltod charakterisiert. Es zeigte sich, dass vor allem in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen, in geringem Maße auch in Parietalzellen durch ADR Zelltod induziert wird. Ein Teil des ADR-induzierten Zelltodes in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen lässt sich der Apoptose zuschreiben, ein weiterer Teil der Nekroptose. Korrelierend hierzu wurde auf mRNA-Ebene die Expression von den an der Nekroptose-Kaskade beteiligten Mediatoren RIPK1, RIPK3 und MLKL in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen nach ADR-Exposition induziert. Zusätzlich konnte ein Teil des in glomerulären Endothelzellen ablaufenden ADR-induzierten Zelltodes durch TNF-Blockade inhibiert werden, was auf einen

TNF-vermittelten Anteil des ADR-induzierten Zelltods in diesen Zellen hinweist. Podozyten dagegen blieben durch ADR-Stimulation in ihrer Vitalität unbeeinflusst.

Weiter wurde in dieser Arbeit untersucht, in welchen glomerulären Zellen ADR die Expression und Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF und der proinflammatorischen Chemokine CCL2 und CCL5 induziert, die zurückliegend als Mediatoren der ADR-induzierten Glomerulosklerose beschrieben wurden. Die Expression wurde auf mRNA-Ebene mithilfe quantitativer *Real-Time* PCR untersucht. Zur Bestimmung der Sekretion der einzelnen Mediatoren wurden Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) -Untersuchungen verwendet. Nach ADR-Exposition wurde in Mesangialzellen die Expression und Sekretion von TNF und CCL2 induziert. Auch glomeruläre Endothelzellen zeigten eine vermehrte Expression und Sekretion von CCL2. Sowohl Podozyten als auch Parietalzellen exprimierten diese proinflammatorischen Marker nach ADR-Exposition nicht. Eine CCL5-Sekretion konnte nicht durch ADR, jedoch durch TNF in allen vier glomerulären Zelltypen induziert werden.

Schließlich wurden Mechanismen der glomerulären Vernarbung durch die Expressionsanalyse von profibrotischen Markern (Pro-Kollagen 1 und 4, Fibronectin, Laminin) in den vier glomerulären Zelltypen nach ADR-Exposition untersucht. Auch hier fand sich besonders in Mesangialzellen eine deutlich gesteigerte Expression dieser Marker. In glomerulären Endothelzellen wurde besonders Fibronectin und Laminin auf mRNA-Ebene induziert, während Parietalzellen und Podozyten vermehrt Laminin exprimierten. In Mesangialzellen wurden nach ADR-Stimulation bei vergleichbarer Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP2 und MMP9 deren Inhibitoren TIMP-1 und -2 vermehrt exprimiert. In Podozyten und Parietalzellen wurde durch TNF dagegen die Expression von MMP9 induziert.

Zusammenfassend zeigen die erarbeiteten Daten, dass ADR besonders auf Mesangialzellen und glomeruläre Endothelzellen eine direkt zytotoxische Wirkung hat und unter anderem Formen des regulierten Zelltods wie Apoptose und Nekroptose induziert. Zudem löst ADR-Exposition die Expression und Sekretion proinflammatorischer Zyto- und Chemokine wie TNF und CCL2 aus. Diese wiederum können parakrin möglicherweise eine sekundäre Schädigung der Podozyten durch vermehrte glomeruläre Inflammation hervorrufen. Schließlich scheint ADR vor allem in exponierten Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen direkt eine

vermehrte Expression extrazellulärer Matrixmoleküle zu induzieren. Somit könnten die Inhibition ADR-induzierter Zelltodformen, die Produktionshemmung proinflammatorischer Zyto- und Chemokine oder die Blockierung extrazellulärer Matrixbildung besonders in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen mögliche therapeutische Strategien in der Behandlung der FSGS darstellen.

Abstract

The number of patients suffering from chronic kidney disease (CKD) continues to rise. Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is a common glomerular cause for CKD. Its histopathological features include a focal and segmental sclerosis of the glomerulus, a progressive glomerular inflammation and the loss of podocyte foot processes. This podocyte injury leads to leakage of the glomerular filtration barrier, resulting in nephrotic range proteinuria and subsequently end-stage kidney disease. Podocyte damage might be caused by genetic alterations in critical podocyte genes, yet unknown circulating permeability factors and inflammatory mediators like the cytokine tumor necrosis factor (TNF) cytokine. The involvement of other glomerular cells in the pathophysiology of FSGS, such as mesangial cells, glomerular endothelial cells and parietal cells, is increasingly recognized.

To further characterize molecular and cellular mechanisms that lead to FSGS, the current experiments focused on adriamycin (ADR)-induced responses in cultured glomerular cells. ADR-nephropathy is a well-established experimental model of FSGS in rodents with similar histopathological changes as seen in human FSGS. To determine the number of vital cells after exposure to ADR, a proliferation assay was used. ADR induced cell death particularly in mesangial cells and glomerular endothelial cells, and to a lesser extent in parietal endothelial cells. To further characterize the type of cell death, inhibitors of apoptosis and necroptosis were added. It was shown that ADR induced both apoptosis and necroptosis in mesangial cells and glomerular endothelial cells. This was paralleled by increased mRNA expression of the necroptosis-associated mediators RIPK1, RIPK3 and MLKL in these cells. ADR-induced cell death in glomerular endothelial cells was partly TNF-dependent, as it could be reduced by TNF-blockade. ADR exposure did not induce significant cell death in cultured podocytes.

ADR-induced expression of proinflammatory mediators like TNF and the inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 was analyzed by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assays were used. ADR led to increased expression and secretion of TNF and CCL2 in mesangial cells, and increased expression and secretion of CCL2 in glomerular endothelial cells. Furthermore, TNF induced CCL5-secretion in all four glomerular cell types *in vitro*.

Following exposure to ADR, mesangial cells expressed profibrotic markers such as pro-collagen 1 and 4, fibronectin and laminin. Glomerular endothelial cells induced expression of fibronectin and laminin, and podocytes and parietal endothelial cells showed an increased expression of laminin upon stimulation with ADR.

In summary, these results demonstrate a direct cytotoxic effect of ADR on mesangial and glomerular endothelial cells as well as the induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines following ADR exposure in these cells. This might lead to secondary podocyte damage via paracrine cross-talk between glomerular cells. Moreover, ADR exposure directly induced the expression of extracellular matrix molecules, particularly in mesangial and glomerular endothelial cells. Thus, targeting cell death as well as the production of proinflammatory mediators and extracellular matrix molecules, specifically in mesangial and glomerular endothelial cells, emerge as potential therapeutic strategies of FSGS in the future.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	v
Abstract.....	viii
Inhaltsverzeichnis	x
Abbildungsverzeichnis.....	xii
Tabellenverzeichnis.....	xiv
Einleitung	1
1.1 Die Niere – Aufbau und Funktion	1
1.1.1 Der Glomerulus – die Filtereinheit der Niere.....	2
1.2 Chronische Nierenerkrankungen.....	8
1.3 Fokal segmentale Glomerulosklerose.....	9
1.4 Unterschiedliche Formen des Zelltodes	12
1.5 Tumornekrosefaktor und seine Rezeptoren.....	15
1.5.1 TNF als wichtiger Mediator in renalen Erkrankungen.....	17
1.6 Adriamycin-Nephropathie	19
1.7 Fragestellung.....	21
Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Primer für <i>Real-Time</i> PCR	24
2.1.3 Plastikwaren	25
2.1.4 Geräte	26
2.2 Zellkultur	27
2.2.1 Zelllinien	27
2.2.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen	28
2.2.3 Auftauen und Einfrieren der Zellen	28
2.2.4 Kultivierung der Zellen	29
2.2.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	29
2.2.6 Zellernte.....	30
2.2.7 Stimulation mit ADR und TNF.....	30
2.3 Proliferations-Assay.....	31
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.4.1 RNA-Isolation.....	33
2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	33
2.4.3 cDNA-Synthese	34
2.4.4 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	34
2.5 Immunologische Methoden	37
2.5.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	37
2.6 Statistik	38
Ergebnisse	39
3.1 Adriamycin-induzierter Zelltod im Glomerulus.....	40
3.1.1 Die Wirkung von Adriamycin auf das Überleben renaler Zellen <i>in vitro</i>	40
3.1.2 Die Wirkung von Adriamycin auf die Expression von Zelltod-Mediatoren in glomerulären Zellen <i>in vitro</i>	45

3.1.3 TNF-abhängige und –unabhängige Zelltodinduktion durch Adriamycin	48
3.2 Inflammation	51
3.2.1 Die Wirkung von Adriamycin auf die Expression und Sekretion von TNF in glomerulären Zellen	51
3.2.2 Die Wirkung von Adriamycin auf die Expression und Produktion von CCL2 und CCR2 in glomerulären Zellen	54
3.2.4 Die Wirkung von Adriamycin auf die Sekretion von CCL5 in glomerulären Zellen	59
3.2.5 Die Wirkung von TNF auf die Expression von inflammatorischen Markern in glomerulären Zellen	61
3.3 Fibrose	66
3.3.1 Fibroseinduktion in glomerulären Zellen durch Adriamycin und TNF	66
Diskussion	77
4.1 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	77
4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	79
4.2.1 Mechanismen der Podozytenschädigung bei der FSGS	79
4.2.2 Mechanismen der glomerulären Entzündungsreaktion bei der FSGS	82
4.2.3 Mechanismen der glomerulären Fibrosierung bei der FSGS	85
4.2.4 Limitationen der Arbeit	87
4.3 Schlussfolgerung und Ausblick	88
Literaturverzeichnis	91
Danksagung	102
Eidesstattliche Versicherung	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Nephron – die funktionelle Einheit der Niere.....	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Glomerulus.....	4
Abbildung 3: Aufbau der Filtrationsbarriere	4
Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	5
Abbildung 5: Zell-Zell-Signalübertragung zwischen intrinsischen glomerulären Zellen	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines gesunden und eines sklerosierten Glomerulus	12
Abbildung 7: Zelltod-Induktion durch TNF.....	14
Abbildung 8: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR	41
Abbildung 9: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR und Zelltod- Inhibitoren.....	44
Abbildung 10: Expression von Nekroptose-Markern nach Stimulation mit ADR	47
Abbildung 11: TNF-unabhängige Zelltodinduktion in Mesangialzellen durch Adriamycin.....	49
Abbildung 12: TNF-abhängige Zelltodinduktion in glomerulären Endothelzellen durch Adriamycin.....	50
Abbildung 14: TNF-Expression und Sekretion in Podozyten und Parietalzellen.....	52
Abbildung 15: TNF-Expression und Sekretion in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen.....	53
Abbildung 16: CCL2-Expression und Sekretion in Podozyten und Parietalzellen	55
Abbildung 17: CCL2-Expression und Sekretion in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen.....	56
Abbildung 18: CCR2-Expression in renalen Zellen nach Stimulation mit ADR.....	58
Abbildung 19: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit ADR.....	60
Abbildung 20: CCL2-Expression und Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF.....	63
Abbildung 21: CCR2-Expression in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF	64
Abbildung 22: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF	65
Abbildung 23: Expression von Fibrosemarkern in Podozyten nach Stimulation mit Adriamycin und TNF	67
Abbildung 24: Expression von Fibrosemarkern in Parietalzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF	68
Abbildung 25: Expression von Matrixmetalloproteinase 2 und 9 in Podozyten und Parietalzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF.....	70
Abbildung 26: Expression von Fibrosemarkern in Mesangialzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF	71
Abbildung 27: Expression von Matrixmetalloproteinasen in Mesangialzellen nach Stimulation mit Adriamycin	73
Abbildung 28: Expression von Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen in Mesangialzellen nach Stimulation mit Adriamycin	73
Abbildung 29: Expression von Fibrosemarkern in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF	75
Abbildung 30: Expression von Matrixmetalloproteasen in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit Adriamycin.....	76
Abbildung 31: Wirkung von Adriamycin auf glomeruläre Zellen.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überleben glomerulärer Zellen nach Stimulation mit ADR.....	41
Tabelle 2: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR in der Konzentration 0,3 µl/ml und Zelltod-Inhibitoren.....	45
Tabelle 3: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR in der Konzentration 3 µl/ml und Zelltod-Inhibitoren.....	45
Tabelle 4: Expression von Nekroptose-Markern nach Stimulation mit ADR	48
Tabelle 5: TNF-unabhängige Zelltod-Induktion in Mesangialzellen durch Adriamycin	49
Tabelle 6: TNF-abhängige Zelltod-Induktion in glomerulären Endothelzellen durch Adriamycin.....	50
Tabelle 7: TNF-Expression und Sekretion in glomerulären Zellen	54
Tabelle 8: CCL2-Expression und -Sekretion in glomerulären Zellen	57
Tabelle 9: CCR2-Expression in glomerulären Zellen.....	58
Tabelle 10: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen	60
Tabelle 11: CCL2-Expression und -Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF	63
Tabelle 12: CCR2-Expression in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF	64
Tabelle 13: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF	65
Tabelle 14: Expression von Fibrosemarkern in Podozyten und Parietalzellen nach Stimulation mit ADR und TNF	69
Tabelle 15: Expression von Matrixmetalloproteinasen in Podozyten und Parietalzellen nach Stimulation mit ADR und TNF.....	70
Tabelle 16: Expression von Fibrosemarkern in Mesangialzellen nach Stimulation mit ADR und TNF.....	72
Tabelle 17: Expression von Matrixmetalloproteasen und deren Inhibitoren in Mesangialzellen nach Stimulation mit ADR	73
Tabelle 18: Expression von Fibrosemarkern in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit ADR und TNF	75
Tabelle 19: Expression von Matrixmetalloproteasen in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit ADR	76

Einleitung

1.1 Die Niere – Aufbau und Funktion

Die in der Regel paarig angelegten Nieren erhalten in Ruhe etwa 1/5 des Herzminutenvolumens. Zu ihren Aufgaben zählen die Reinigung des Blutes von toxischen Stoffen, die Regulation des Volumenhaushalts, die Konstanzhaltung der Elektrolytkonzentration und des Säure-Base-Haushalts, sowie endokrine Funktionen im Rahmen der Blutbildung und der Vitamin-D-Aktivierung.

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron (Abb. 1). Jede Niere enthält etwa 1,2 Millionen mikroskopisch kleiner Nephronen, die wiederum aus einem Nierenkörperchen, dem Glomerulus mit der umgebenden Bowman-Kapsel, und den Nierenkanälchen, dem Tubulussystem, bestehen.

Glomeruli bestehen aus Kapillarknäueln, die in ihrer Gesamtheit etwa 180 ml Primärharn filtrieren [1]. Der Primärharn stellt ein Ultrafiltrat des Blutplasmas dar. Der weitaus größte Teil des Primärharns (99%) wird anschließend im Tubulussystem rückresorbiert und dem Blut wieder zugeführt. So scheidet der Körper am Tag etwa 1,8L Urin aus [2].

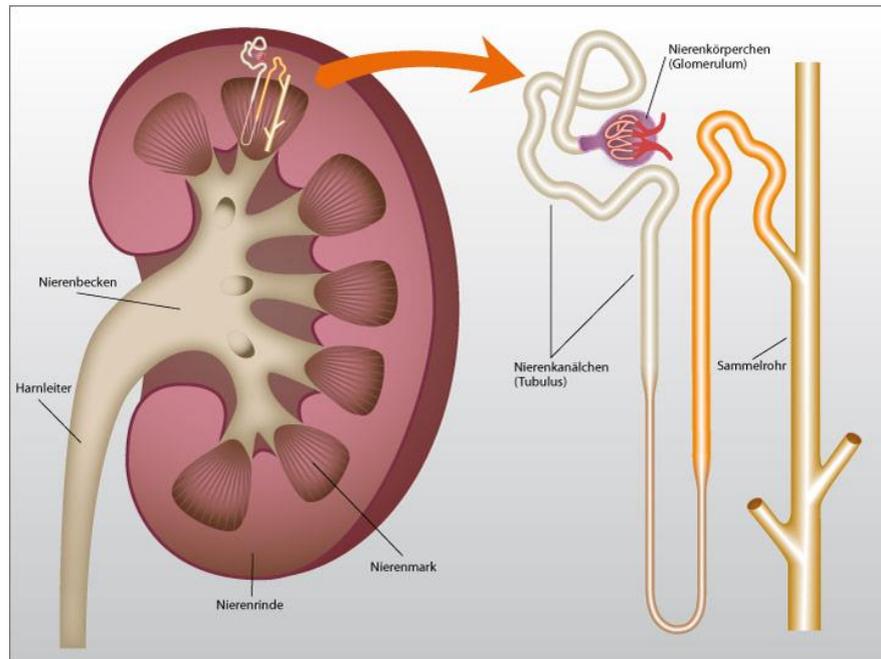


Abbildung 1: Das Nephron – die funktionelle Einheit der Niere [3]

1.1.1 Der Glomerulus – die Filtereinheit der Niere

Jede Niere enthält etwa 1-1,5 Millionen Glomeruli. Glomeruli sind hochspezialisierte Einheiten in der Nierenrinde, die die Filtrationsbarriere für das Blut bilden [4].

Ein Glomerulus besteht aus etwa 30-40 parallel geschalteten Kapillarschlingen. Diese erhalten ihr Blut über eine zuführende Arteriole (Vas afferens) und geben es an eine abführende Arteriole (Vas efferens) ab. Diese Ein- und Austrittspforte bezeichnet man als Gefäßpol. Zu unterscheiden ist der Gefäßpol vom gegenüberliegenden Harnpol, welcher die Öffnung des Glomerulus zum Tubulussystem darstellt [2]. Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung eines Glomerulus.

Die Kapillarschlingen des Glomerulus werden vom sogenannten Mesangium gestützt. Dieses setzt sich aus extrazellulärer Matrix und den Mesangialzellen zusammen. Die Mesangialzellen sind spezialisierte kontraktile Fibroblasten [5] mit einer Vielzahl von Funktionen innerhalb der

Niere. Man unterscheidet extraglomeruläre (außerhalb des Glomerulus am Gefäßpol gelegene) und intraglomeruläre (im Glomerulus gelegene) Mesangialzellen [6].

Die extraglomerulären Mesangialzellen (Abb. 2 E) bilden zusammen mit der Macula densa (Abb. 2 D, Zellverband im distalen Tubulus) und den juxtaglomerulären Zellen (spezielle epitheloide Zellen im Vas afferens) den juxtaglomerulären Apparat. Dieser spielt eine wichtige Rolle im Rahmen des tubulo-glomerulären Feedbacks und der Blutdruckkontrolle [7].

Die intraglomerulären Mesangialzellen (Abb. 2 F, G) dienen hauptsächlich zur Stütze der Kapillarschlingen. Sie bilden ein Achsenskelett, über welches die Schlingen am Gefäßpol befestigt werden. Des Weiteren sezernieren sie Prostaglandine, Endotheline, Zytokine [5] und Wachstumsfaktoren [1] und sind zur Phagozytose befähigt. Bei der Phagozytose können reaktive Sauerstoffspezies („ROS“) entstehen, welche Schäden am Glomerulus verursachen können [8]. Mesangialzellen reagieren zudem auf Einflüsse von Hormonen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Molekülen, was im Rahmen von primären glomerulären Erkrankungen eine große Rolle spielt [9].

Die extrazelluläre Matrix besteht aus Kollagen 1, 3, 4 und 5 sowie Fibronectin, Laminin und Proteoglykanen [1]. Mesangialzellen erhalten die Homöostase dieser Matrix aufrecht [10] und können über diese Ultrastruktur Zugkraft auf die glomeruläre Basalmembran ausüben, wodurch die Filtereigenschaft beeinflusst wird. Jedoch führt diese direkte Nachbarschaft bei entzündlichen Schädigungen der Mesangialzellen auch zur Beeinträchtigung der Filterfunktion.

Umgeben ist jeder einzelne Glomerulus von einer zarten Kapsel, die als Bowman-Kapsel bezeichnet wird (Abb. 2 C). Sie wird von einem einschichtigen Plattenepithel, den parietalen Epithelzellen, gebildet und stellt die Abgrenzung zum umliegenden Gewebe dar. Das Kapillarknäuel wird von einer weiteren Zellschicht, den Podozyten (Abb. 2 B), umgriffen. Zwischen Bowman-Kapsel und Podozyten befindet sich ein Raum, der sogenannte Bowman-Kapselraum (Abb. 2 H), in den das Ultrafiltrat des Blutplasmas, der Primärharn, gelangt [11].

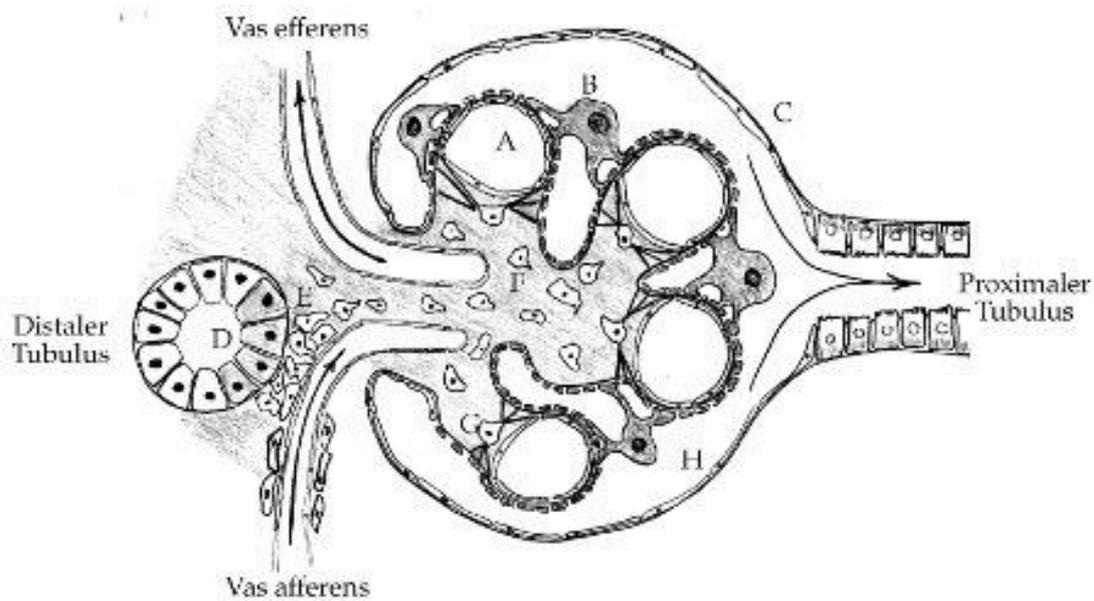


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Glomerulus:

A) Glomeruluskapillar B) Podozyt C) Bowman'sche Kapsel D) Macula densa im distalen Tubulus E) extraglomeruläre Mesangiumzellen mit juxtaglomerulären Apparat F) intraglomeruläre Mesangiumzellen G) kontraktile Mesangiumzellen zum Steuern des Filtrationsdruck H) Lumen der Bowman-Kapsel, gefüllt mit Primärharn [12].

Die Filtrationsbarriere des Glomerulus (Abb. 3), auch als Blut-Harn-Schranke bezeichnet, setzt sich aus drei Anteilen zusammen: dem Endothel der Glomeruluskapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten [4]. In Abbildung 4 werden die einzelnen Bestandteile rasterelektronenmikroskopisch dargestellt.

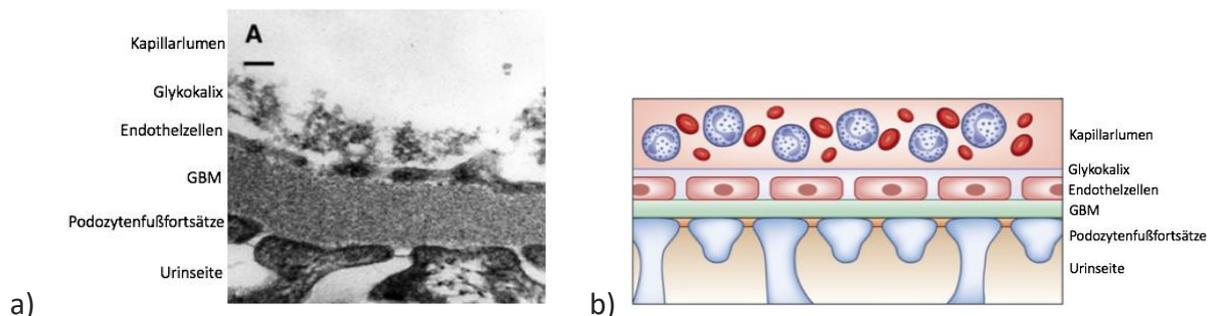


Abbildung 3: Aufbau der Filtrationsbarriere

Der Nierenfilter besteht aus drei Schichten: den Endothelzellen, die das Blutgefäß auskleiden, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Fußfortsätzen der Podozyten, zwischen denen sich die Schlitzmembran ausspannt. a) zeigt den elektronenmikroskopischen Aufbau (modifiziert nach [1]), b) den schematischen Aufbau (modifiziert nach [13]).

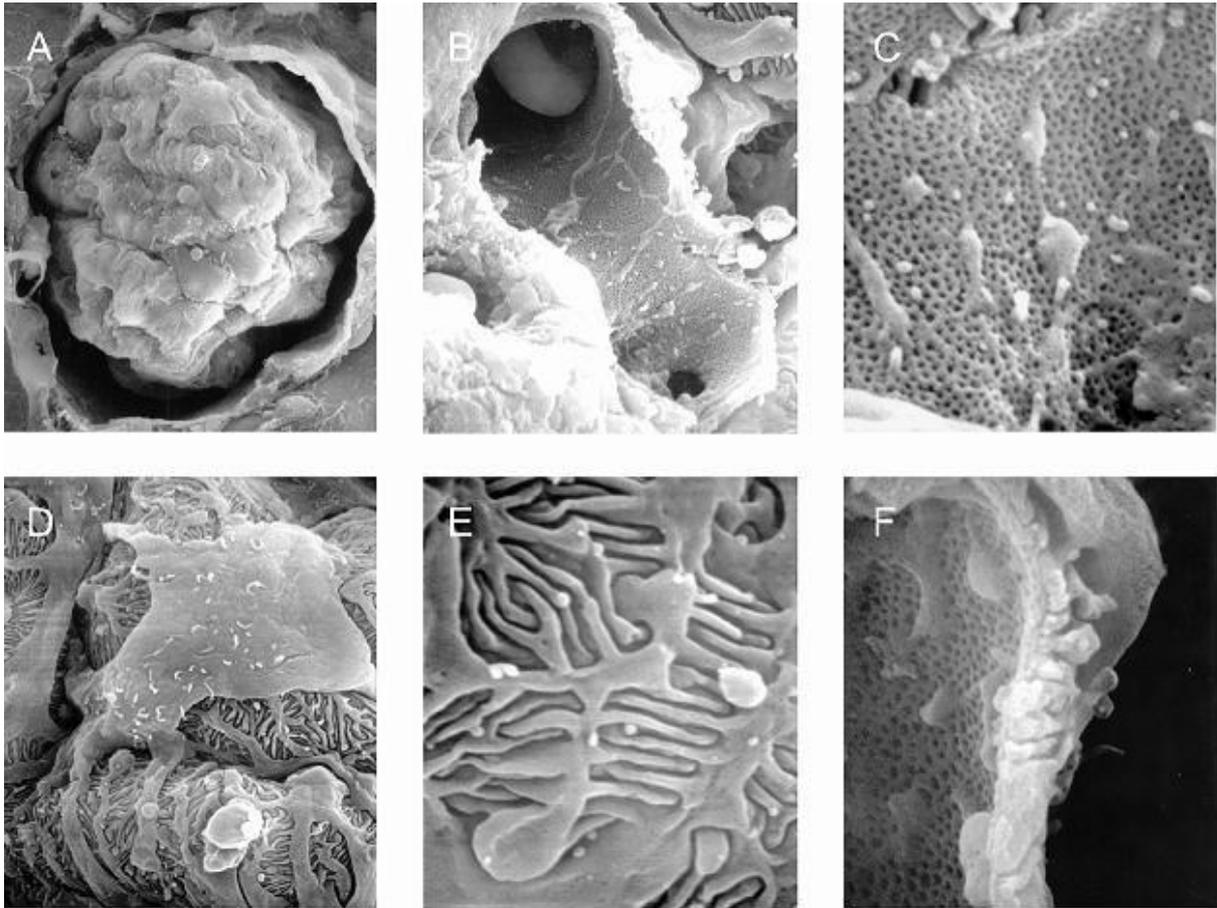


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

(A) eines Nierenkörperchens (Glomerulus), (B) eines Blutgefäßes im Nierenkörperchen, (C) des Endothels, (D) eines Podozyten, (E) von Podozytenfußfortsätzen, (F) eines Querschnitts durch die Filterschichten [14].

Die Endothelzellen der Glomeruluskapillaren sind relativ dünn, flach und fenestriert (Fenestrae mit ca. 70-100 nm im Durchmesser) [15]. Mit ihren ladungsselektiven Eigenschaften tragen sie zur Selektivität der Filtrationsbarriere bei [1]. Zudem besitzen sie Rezeptoren für die von Podozyten sezernierten *Vascular Endothelial Growth Factor-A* und *-C*, sodass diese zelluläre Interaktion zur Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beiträgt [16].

Die glomeruläre Basalmembran besteht aus drei Schichten: eine zum Endothel gewandte Lamina rara interna, eine mittlere Lamina densa und eine zu den Podozyten gewandte Lamina rara externa. Diese Schichten enthalten neben Kollagen 4 hauptsächlich Fibronectin, Laminin und Heparansulfat und sind ungefähr 240-370 nm dick [1]. Durch den speziellen Aufbau dieses

Komplexes werde Moleküle ab einem Molekulargewicht von 70,000 Da sowie negativ geladene Teilchen nicht filtriert [17].

Podozyten sind terminal differenzierte, glomeruläre viszerale Epithelzellen. Sie sind über breite Primär- und fingerförmige Sekundärfortsätze miteinander verzahnt. Zwischen den Sekundärfortsätzen befindet sich die Schlitzmembran, die eine wichtige Komponente der glomerulären Filtrationsbarriere und ihrer Selektivität darstellt [16]. Bestimmte Proteine wie etwa Nephrin tragen zur Integrität der Schlitzmembran bei [18]. Podozyten sezernieren ebenfalls extrazelluläre Matrixkomponenten und stützen gemeinsam mit den Mesangialzellen die Kapillarwand gegen den intrakapillären Druck.

Da Podozyten terminal differenzierte Zellen sind, sind sie nicht zur Zellteilung und Selbstregeneration befähigt. Eine Podozytenschädigung oder der Verlust funktionsfähiger Podozyten im Rahmen verschiedener Zelltodmechanismen stellen die Hauptgründe für die Ausbildung einer irreversiblen glomerulären Vernarbung, der Glomerulosklerose, dar. Sie gehen fast immer mit einer Proteinurie einher [19]. Die Proteinurie selbst wiederum führt ebenfalls zu einer Podozytenschädigung. Andererseits schädigen proinflammatorische Zytokine Podozyten, woraufhin diese selbst Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) ausschütten [20, 21].

Einzelne glomeruläre Zelltypen beeinflussen sich gegenseitig, so z.B. Podozyten und Mesangialzellen. Durch parakrine Eigenschaften der Mesangialzellen kommt es bei verschiedenen Glomerulopathien zur inflammatorischen Aktivierung der Podozyten [20], aber auch die Schädigung von Podozyten führt zu einer vermehrten mesangialen Aktivierung und Proliferation [22]. Abbildung 5 zeigt die anatomische Verbundenheit der einzelnen Zellen und die daraus resultierende interzelluläre Signalübertragung. Das genaue Zusammenspiel zwischen den intrinsischen glomerulären Zellen und die Rolle proinflammatorischer Zytokine bei der Entstehung der Glomerulosklerose ist jedoch bis heute nicht komplett verstanden.

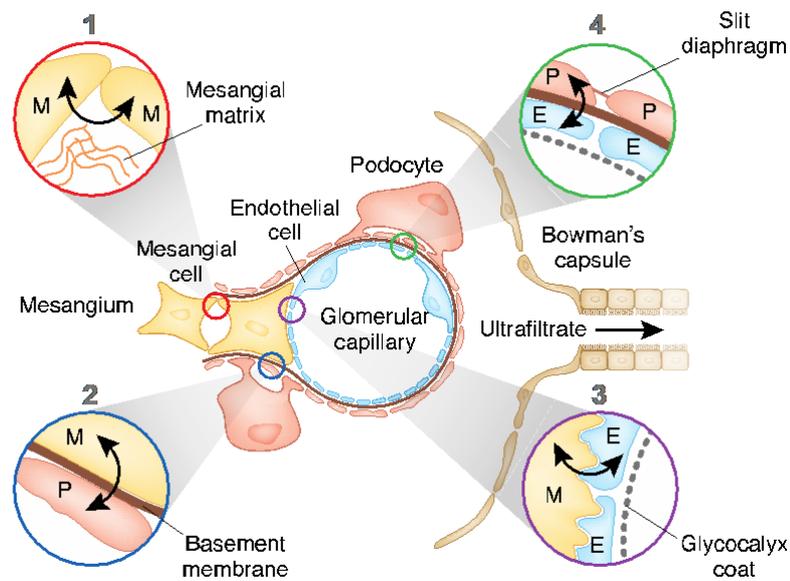


Abbildung 5: Zell-Zell-Signalübertragung zwischen intrinsischen glomerulären Zellen

Cross-talk findet sich zwischen einzelnen Mesangialzellen (1), Mesangialzellen und Podozyten (2), Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen (3) und Podozyten und glomerulären Endothelzellen (4) [22].

1.2 Chronische Nierenerkrankungen

Die Anzahl der Patienten mit chronischem Nierenversagen nimmt stetig zu [23]. Der Bundesverband Niere e.V. schätzte 2014 die Anzahl der chronisch Nierenkranken in Deutschland auf über 2 Millionen, davon waren etwa 65000 dialysepflichtig. Somit stellen chronische Nierenerkrankungen nicht nur ein gesundheitliches, sondern auch ein ökonomisches Problem dar [24].

Chronische Nierenerkrankung ist der Oberbegriff für eine Gruppe heterogener Erkrankungen, die die Struktur und Funktion der Niere beeinträchtigen [25]. Definitionsgemäß besteht eine chronische Nierenerkrankung unabhängig von der Grunderkrankung beim Vorliegen eines Nierenschadens mit begleitender renaler Funktionseinschränkung über mehr als drei Monate. Dieser wird durch spezielle Marker im Blut oder Urin nachgewiesen oder zeigt sich in einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate (GFR) $<60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ [25][26]. Chronische Nierenerkrankungen können sich über Jahre hinweg progredient verschlechtern und führen über die Verschlechterung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion meist zu einer terminalen Niereninsuffizienz [27], welche mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität der Patienten einhergeht und zusätzlich einen großen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt [28].

Im Rahmen der jeweiligen Grunderkrankung kommt es durch den Untergang von Glomeruli in den verbliebenen, gesunden Restglomeruli zu einer intraglomerulären Drucksteigerung mit Hyperfiltration, die zu einer weiteren glomerulären Schädigung führt. Des Weiteren kommt es durch eine vermehrte Zytokin- und Wachstumsfaktorproduktion zu einer glomerulären Hypertrophie und Hyperplasie. Der Untergang von Glomeruli führt zu einem GFR-Verlust, während eine Schädigung im Glomerulus und somit an der Filtrationsbarriere eine Proteinurie zur Folge hat. Diese wirkt wiederum nephrotoxisch. So kommt es auch an den übrigen Anteilen des Nephrons, dem Tubulussystem, zu einer Schädigung mit Funktionsverlust [27, 29, 30].

Als Folge einer chronischen Niereninsuffizienz kommt es zu Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt, zum Versagen der exkretorischen Nierenfunktion, zur Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion (Sekretion von Renin, Erythropoetin, Vitamin D und Prostaglandinen wird vermindert) und in letzter Konsequenz zu toxischen Organschäden durch retinierte harnpflichtige Substanzen [2].

Als Therapie der terminalen Niereninsuffizienz bleibt die Einleitung einer Nierenersatztherapie, welche verschiedene Formen der Dialyse sowie die Nierentransplantation beinhaltet. Häufig sind diese Therapien jedoch mit großen Nebenwirkungen und Einschränkungen der Lebensqualität verbunden [31]. Zudem gibt es nicht für alle Patienten ein Spenderorgan. Der Bedarf an weiteren Therapiemöglichkeiten zur Progressionsverlangsamung der chronischen Nierenschädigung und insbesondere zu kausalen Behandlungen ist daher groß.

Ein gemeinsamer Endpunkt von unterschiedlichen renalen und extrarenalen Erkrankungen, die zu einem chronischen Nierenversagen führen, ist die renale Fibrose. Fibrose bezeichnet einen Vernarbungsprozess mit Anhäufung von extrazellulärer Matrix, dem eine Interaktion zwischen verschiedenen epithelialen, endothelialen und inflammatorischen Zellen zugrunde liegt. Fibrose ist somit auch eng mit Inflammation verbunden [7]. In der Niere betrifft der narbige Gewebeumbau sowohl das glomeruläre als auch das tubuläre Organkompartiment und führt zur Glomerulosklerose bzw. tubulointerstitiellen Fibrose. Therapien, die sich die Bekämpfung der Fibrose zum Ziel setzen, sind daher auch ein interessanter Ansatz in der Behandlung der chronischen Nierenerkrankung [32].

1.3 Fokal segmentale Glomerulosklerose

Die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) ist ein klinisch-pathologisches Syndrom, welches gekennzeichnet ist durch histologisch sichtbare Veränderungen im Glomerulus [33]. Zu diesen zählen eine zunehmende Vernarbung und Fibrosierung der Glomeruli, ein Verlust der podozytären Fußfortsätze und entzündliche Veränderungen. Zu Beginn der Erkrankung ist das Erscheinungsbild fokal, d.h. nur einige Glomeruli zeigen Veränderungen, und segmental, also nur einzelne Bereiche des Kapillarknäuels sind betroffen [34]. Je weiter die Krankheit fortschreitet, desto diffuser und globaler wird das Befallsmuster [35].

Die FSGS gehört zu den häufigsten glomerulären Ursachen für ein terminales Nierenversagen [36, 37]. Klinisch geht sie aufgrund des Podozytenschadens mit einem nephrotischen Syndrom [36, 38, 39] oder einer isolierten Proteinurie einher [40]. Zudem kommt es durch die glomeruläre Vernarbung zu einer progredienten Einschränkung der Nierenfunktion [36].

Das nephrotische Syndrom ist Zeichen für die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere. Es ist selbst keine Krankheitsentität, sondern bezeichnet einen Symptomkomplex, der bei verschiedenen nephrologischen und systemischen Erkrankungen auftreten kann. Per definitionem umfasst der Symptomkomplex des nephrotischen Syndroms eine starke Proteinurie über 3,5 g pro Tag, eine Hypalbuminämie < 2,5 g/dl, das Auftreten peripherer Ödeme und eine sekundäre Hyperlipoproteinämie mit Erhöhung von LDL-Cholesterin und Triglyzeriden [41]. Die Beeinträchtigung der Podozytenintegrität wird als hauptverantwortlich für die Proteinurie angesehen [42].

Die Ätiologie der FSGS ist vielseitig. Man unterscheidet zwischen primären und sekundären Formen. Bei der primären FSGS lässt sich häufig keine eindeutige Ursache eruieren, genetische Mutation [43] oder Polymorphismen in Podozytenproteinen [44] und zirkulierende, schädigende Faktoren [45, 46] sind eine mögliche Ätiologie. Sekundäre Formen sind durch Viren (besonders HIV [47]), arterielle Hypertension, Adipositas [48], oder Medikamenttoxizität (unter anderem durch Anthrazykline) bedingt [49]. Ebenso führen chronische glomeruläre Erkrankungen wie z.B. die IgA-Nephritis, die Lupus-Nephritis, die membranöse Glomerulonephritis oder die thrombotische Mikroangiopathie durch anhaltende entzündliche Schädigungen zu einer sekundären FSGS [50].

Die Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer FSGS ist entscheidend für Prognose und Therapie der Erkrankung [51]. Die Diagnose wird mittels feingeweblicher Nierenbiopsie gestellt. Patienten mit nephrotischem Syndrom und einer hochgradigen Proteinurie von > 3,5 g/d, Hypalbuminämie, > 80% Verlust der podozytären Fußfortsätze und fehlenden Risikofaktoren für sekundäre Formen haben mit größter Wahrscheinlichkeit eine primäre FSGS [51]. Die Erstlinientherapie der primären FSGS besteht aus einer Kombination von Immunsuppressiva plus einer supportiven, progressionshemmenden Therapie mit RAAS-Blockade zur Senkung des glomerulären Filtrationsdruckes [40], während bei der sekundären FSGS medikamentöse Maßnahmen zur Senkung des intraglomerulären Druckes mit RAAS-Blockade im Vordergrund stehen.

Gemäß der Columbia- Klassifikation lassen sich histopathologisch fünf verschiedene Subtypen der FSGS unterscheiden: klassisch, perihilär, TIP-Läsion, zellreich und kollabierend [52]. Prognostische Bedeutungen der unterschiedlichen Varianten hinsichtlich der Progression

werden kontrovers diskutiert [37, 53]. Der entscheidende Parameter für die Prognose, d.h. die Progression der Nierenfunktionseinschränkung, bleibt weiterhin das Ausmaß der Proteinuriederuktion [40].

Die Pathogenese der primären FSGS ist noch nicht bis ins Detail verstanden. Man geht davon aus, dass ein podozytärer Schaden am Beginn der Erkrankungskaskade steht und eine zunehmende glomeruläre Sklerosierung zur Folge hat [54]. Eine Beteiligung von parietalen Epithelzellen, Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen an diesem Prozess wurde ebenfalls beschrieben, der endgültige pathologische Zusammenhang ist aber noch nicht hinreichend geklärt [7, 55]. Abbildung 6 zeigt die schematische Darstellung eines gesunden im Vergleich zu einem fokal sklerosierten Glomerulus.

Der Schaden an glomerulären Zellen wird durch unterschiedliche, bisher nicht genau identifizierte zirkulierende Mediatoren hervorgerufen, wahrscheinlich im Zusammenspiel mit einer genetischen Prädisposition durch Polymorphismen in Podozytengeneten [44, 56]. Diese Theorie wird unterschützt durch die mögliche wiederkehrende Erkrankung im Nierentransplantat [57].

Der Krankheitsverlauf der FSGS ist unvorhersehbar. Verschiedene immunologische Mediatoren wie Interleukin-1 β (IL1- β), Tumornekrosefaktor (TNF) oder der Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor- β 1* (TGF- β 1) führen zu einem proinflammatorischen und profibrotischen Milieu, welches die Progression der Erkrankung vorantreibt bis letztendlich ein terminales Nierenversagen eintritt [46]. Chemokine spielen ebenfalls eine Rolle in der Progression der renalen Schädigung. Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die Zellkommunikation vermitteln. Man unterteilt abhängig von ihrer Aktivität in proinflammatorische (z.B. *Monocyte Chemoattractant Protein 1*, CCL2 und *RANTES*, CCL5) und homöostatische (z.B. CCL18, CXCL12) Chemokine. Sie entfalten ihre Wirkung durch Bindung an Rezeptoren der Zielzelle und Interaktion mit löslichen und adhärennten Molekülen [58]. Renale Zellen produzieren physiologisch nur wenig proinflammatorische Chemokine. Jedoch können Mediatoren wie TNF oder IL1- β die Produktion besonders von CCL2 und CCL5 induzieren. Dies wurde bereits in verschiedenen Zellkultur- bzw. Tiermodellen gezeigt [59-62]. Diese renale Inflammation hat weitere Schädigungen zu Folge, wie in den folgenden Kapiteln erläutert wird. Eine therapeutische Bedeutung im Rahmen renaler Erkrankung entsteht durch die mögliche Blockade von Chemokinen und deren Rezeptoren.

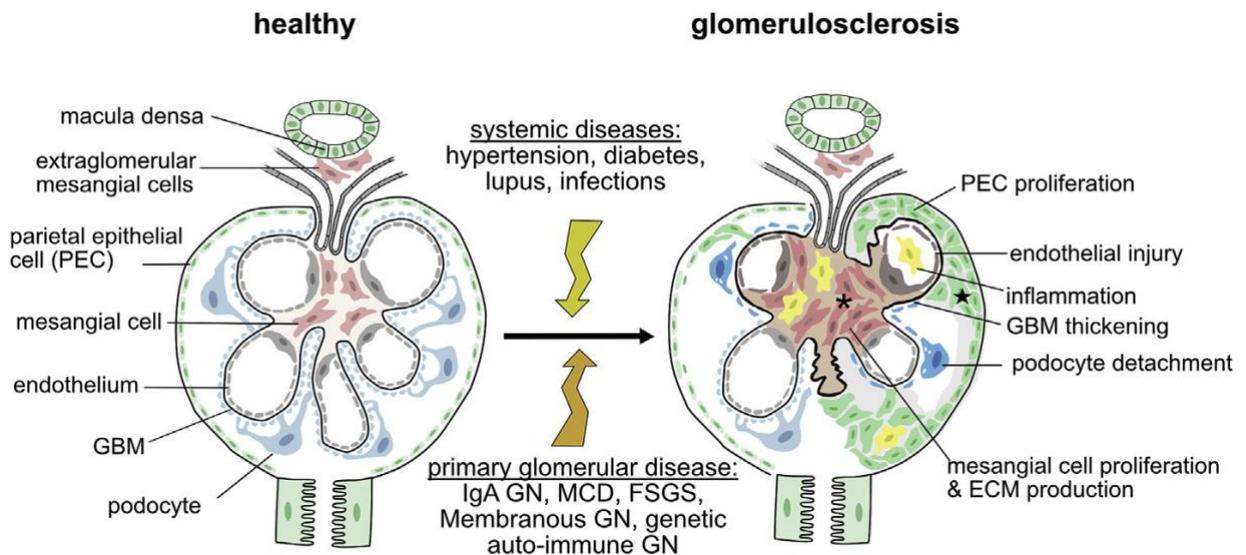


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines gesunden und eines sklerosierten Glomerulus
 Verschiedene systemische und glomeruläre Erkrankungen führen zu einem podozytären und endothelialen Schaden und zu Matrixproduktion durch Parietalzellen (PEC) und Mesangialzellen, was zu einer glomerulären Fibrose führt [7].

1.4 Unterschiedliche Formen des Zelltodes

Eine Dysbalance zwischen Zelltod und Zellproliferation steht am Beginn vieler Erkrankungen [63]. Auch bei der FSGS ist der Zelltod und die daraus resultierende Gewebeumwandlung mit Fibrose und Sklerose ein wichtiger prognostischer Faktor.

Man unterscheidet zwei Hauptformen von zellulärem Absterben: die Apoptose und die Nekrose [64]. Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der unerwünschte, überschüssige Zellen gezielt aus dem Organismus entfernt [63]. Sie wird durch zwei Hauptmechanismen ausgelöst: der erste Mechanismus wird über die Bindung eines Liganden (z.B. TNF) an einen auf der Zellmembran exprimierten Todesrezeptor ausgelöst, was zur Aktivierung von intrazellulärer Caspase-8 führt; der zweite Mechanismus führt über verschiedene Stimuli zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welches wiederum die Caspase-Kaskade aktiviert. Ein potenter Hemmer der Apoptose ist ZVAD, ein Pan-Caspase-Inhibitor. Über die Hemmung der Caspaseaktivität führt er zur Blockade von Caspase-vermittelter Apoptose [65].

Initial ging man davon aus, dass Nekrose eine passive Form des Zelltodes ist, die durch physikalischen Stress induziert wird und unabhängig von jeglichen zellulär regulierten Signalwegen abläuft. Inzwischen hat man erkannt, dass verschiedene Formen von regulierter Nekrose (RN) existieren [66], die einige morphologische Gemeinsamkeiten wie Anschwellen von Zellen oder Zellorganellen, zytoplasmatische Granulation und Ruptur der Zellmembran mit Freisetzung zellulärer Bestandteile haben [67].

Eine Form der RN ist die Nekroptose. Nekroptose kann durch verschiedene inflammatorische Stimuli getriggert werden, unter anderem durch TNF. TNF aktiviert die Bildung eines intrazellulären Komplexes, der Necrosom genannt wird [68]. Dieser besteht aus einem Fas-assoziierten Protein mit *Death Domain* (FADD), inaktivierter Caspase-8, *FLICE-like Inhibitory Protein* (FLIP), *Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase* 1 und 3 (RIPK1, RIPK3). Er führt zu einer RIP-Kinase abhängigen Nekroptose [66]. Dabei wird das Molekül *Mixed Lineage Kinase Domain-like* (MLKL) phosphoryliert, was die Bildung von Plasmamembranporen vermittelt. Der Nekrose-Antagonist Nekrostatin 1s (Nec1s) ist experimentell in der Lage, diesen Vorgang durch die Blockade der RIPK1-Aktivität zu inhibieren [69].

Kommt es zur RN, werden immunstimulierende Mediatoren aus den Zellen freigesetzt. Hierzu zählen *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs). DAMPs aktivieren *Pattern Recognition Receptors* (PRR), die wiederum inflammatorische Zellen wie z.B. Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen an den Ort der Zellschädigung rekrutieren und aktivieren. Diese Zellen produzieren dann proinflammatorische Mediatoren, welche selbst regulierten Zelltod triggern können. Somit entsteht eine Autoamplifikationschleife, die man als Nekroinflammation bezeichnet. PRR werden auch von renalen Zellen exprimiert. RN spielt bei der akuten Nierenschädigung wie z.B. der akuten Tubulusnekrose oder der thrombotischen Mikroangiopathie eine wichtige pathophysiologische Rolle und trägt zur fortschreitenden Nierenschädigung bei [70]. Ob dies jedoch auch bei der FSGS der Fall ist, ist bislang unklar.

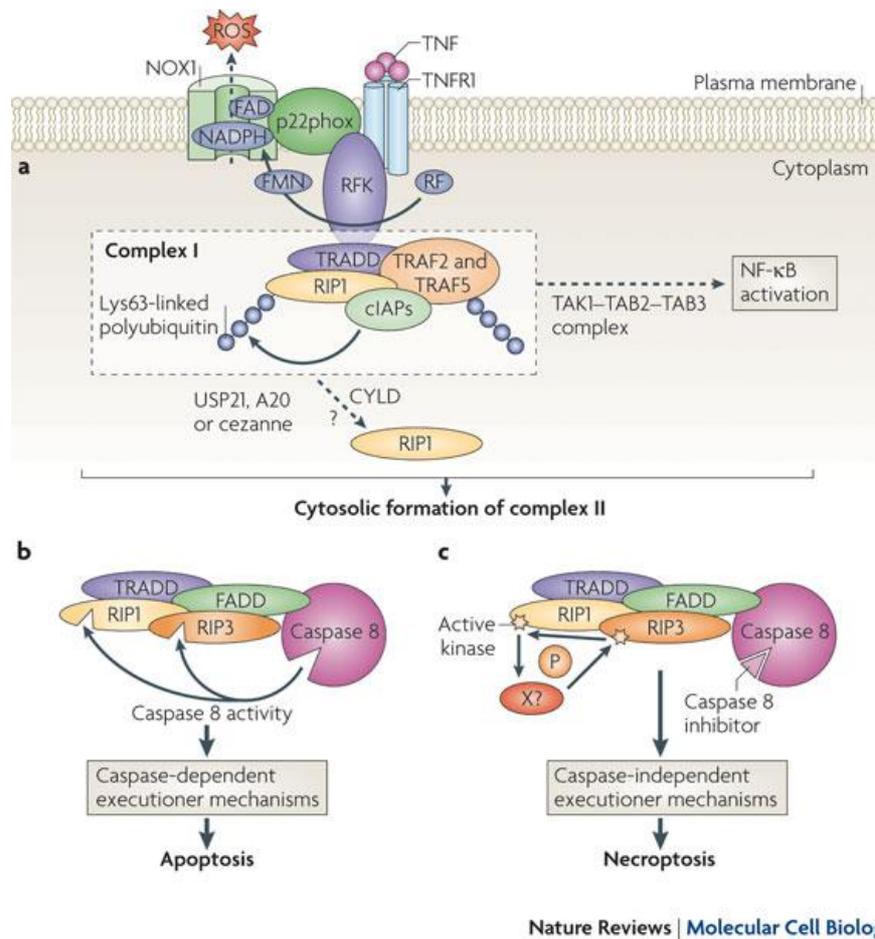


Abbildung 7: Zelltod-Induktion durch TNF

a) Formierung des Signalosom durch Bindung von TNF an TNFR1; b) Komplex IIa bestehend aus TRADD, FADD und Caspase-8. Die Aktivität von Caspase-8 führt zur Inaktivierung von RIP1 und RIP3 und damit zur Apoptose. c) Komplex IIc bestehend aus FADD, inaktivierter Caspase-8, Rip, RIPK1 und RIPK3 führt zur RIP-Kinase abhängigen Nekroptose [71].

1.5 Tumornekrosefaktor und seine Rezeptoren

TNF ist ein homotrimeres, 26 Kilodalton (kDa) schweres Transmembran-protein [72]. Als zentraler Mediator spielt dieses Zytokin eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen von Zellproliferation und Differenzierung über Zelltod bis hin zu Entzündungsreaktionen [73, 74]. Darüber hinaus hat es wichtige Funktionen im Rahmen der angeborenen und adaptiven Immunantwort [75] sowie im Erhalt des Immungleichgewichts [76].

TNF kommt in zwei Formen vor – membrangebunden und als zirkulierendes, lösliches 17 kDa Polypeptid. Beide Formen sind bioaktive Homotrimere [77]. Die lösliche Form entsteht durch Abspaltung von membrangebundenem TNF durch die Metalloprotease *TNF α Converting Enzyme* (TACE/ADAM17) [74].

TNF wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert, aber auch von Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Antigen-stimulierten T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Neutrophilen und Mastzellen. Ebenso können Fibroblasten und intrinsische renale Zellen, wie z.B. Mesangialzellen und glomeruläre und tubuläre Epithelzellen TNF produzieren [73, 78]. All diese Zellen werden durch viele unterschiedliche – toxische, physikalische, chemische und immunologische – Stimuli dazu angeregt, TNF zu produzieren und freizusetzen [78].

Bei physiologischen Konzentration sorgt TNF für die Aufrechterhaltung der körpereigenen Immunantwort gegen Infektionen. Mit steigender Konzentration führt TNF jedoch zu einer starken Inflammationsreaktion mit Gewebeuntergang [79]. Es induziert die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, die wiederum die Chemotaxis von Leukozyten vermitteln. Diese Leukozyten werden ihrerseits von TNF stimuliert, so dass sie weitere Chemokine und inflammatorische Zytokine wie z.B. CCL2, CCL5 und IL-1 produzieren [73, 80]. Darüber hinaus besitzt TNF wichtige immunregulatorische Funktionen und ist für die Entwicklung sekundärer lymphoider Organstrukturen verantwortlich [81]. Zusätzlich spielt TNF eine wichtige Rolle für die Induktion von programmiertem Zelltod wie Apoptose und Nekroptose [82].

TNF bindet an zwei verschiedene Rezeptoren: TNF-Rezeptor 1 und 2 (TNFR1, TNFR2). Beide Rezeptoren sind transmembranäre Proteine und können beide TNF-Formen binden, wobei TNFR2 bevorzugt durch membranständiges TNF aktiviert wird. Eine gegenseitige

Beeinflussung und Aktivierung der beiden Rezeptoren durch Erhöhung der lokalen TNF-Konzentration und „ligand passing“ wird diskutiert [73].

Beide Rezeptoren werden auf der Oberfläche der meisten Zellen exprimiert. Physiologisch findet man in der Niere TNFR1 auf glomerulären Endothelzellen. Die Expression von TNFR2 wird hingegen erst durch verschiedene renale Erkrankungen induziert [73, 83].

Bindet TNF an einen der beiden Rezeptoren, werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die letztendlich proinflammatorische oder Zelltod-induzierende Effekte von TNF vermittelt. TNFR1 enthält eine homologe intrazelluläre Region, die *Death Domain* (DD) genannt wird. Bindet TNF an TNFR1, interagiert diese Domäne mit einer weiteren DD eines Adapterproteins, des sogenannten *TNF Receptor-Associated Death Domain* (TRADD). Dabei wird die Konformation von TRADD verändert, sodass TRADD in der Lage ist, zwei weitere intrazelluläre Moleküle zu binden: RIPK1 und *TNF Receptor-Associated Factor 2* (TRAF2) [84]. Zusammen bilden sie einen Komplex, der auch als Signalosom bezeichnet wird. Das Signalosom wiederum aktiviert weitere Signalkaskaden, die verschiedene Formen des programmierten Zelltodes, z.B. Apoptose (über Komplex IIa = TRADDosom) und Nekroptose (über Komplex IIc = Nekrosom) [64] auslösen oder über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B - (Nuclear Factor κ B) [85] und Proliferation und Inflammation induzieren [86, 87].

Aufgrund der fehlenden DD ist TNFR2 nicht in der Lage, TRADD zu rekrutieren. Aber TNFR2 kann direkt mit TRAFs interagieren [74]. TNFR2 ist somit auch in der Lage, den NF- κ B-Signalweg zu aktivieren [88].

Das zunehmende Wissen über TNF führte zu neuen therapeutischen Möglichkeiten in der Behandlung von Krankheiten. Der ursprünglichen Idee, TNF in der Tumorthherapie einzusetzen, folgte der Ansatz einer TNF-Blockade bei entzündlichen Erkrankungen [82]. Mittlerweile haben zahlreiche Studien gezeigt, dass TNF als therapeutische Ziel bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie etwa der rheumatoiden Arthritis große Erfolge bringt [89]. Verschiedene TNF-blockierende Substanzen, wie z.B. Etanercept und blockierende Antikörper sind heute in der Behandlung unterschiedlicher entzündlicher Erkrankungen zugelassen und werden höchst erfolgreich eingesetzt [79]. Dennoch birgt die anti-TNF Therapie durch die immunsuppressive Wirkung auch Nebenwirkungen, wie etwa die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose und gehäufte opportunistische Infektionen [82].

1.5.1 TNF als wichtiger Mediator in renalen Erkrankungen

TNF messenger RNA (mRNA) kann in der gesunden Niere kaum detektiert werden. Mit der Einwanderung aktivierter Monozyten und Leukozyten im Rahmen eines Erkrankungsprozesses steigt die renale TNF-Expression [73]. Zudem haben Studien gezeigt, dass die TNF-Produktion durch intrinsische renale Zellen wie Mesangialzellen, Podozyten und tubulären Epithelzellen eine große Bedeutung hat. Normalerweise produzieren Mesangialzellen kein TNF, werden aber durch die Stimulation mit z.B. Lipopolysacchariden [90], Immunglobulinen [91] und IL-1 zur Produktion angeregt [92]. Ebenso erhöht sich die TNF-Produktion in Podozyten nach Stimulation mit Adriamycin [93] und in tubulären Epithelzellen nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden [94].

Das in der Niere generierte TNF scheint mehrere Funktionen zu erfüllen: Mesangialzellen regt es zum einen zur Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie etwa CCL2 oder reaktiven Sauerstoffmetaboliten an [73], zum anderen fördert es deren Proliferation und Apoptose [95]. Auf tubuläre Epithelzellen hat TNF ebenfalls einen proapoptotischen Effekt und regt diese zur IL-8 Produktion an [96]. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass TNF sowohl als Regulator von Proliferation und Zelltod in Nierenzellen fungiert, als auch in der Lage ist, eine lokale proentzündliche Kaskade in Gang zu setzen, die renale Erkrankungen fördert. Denn durch die Akkumulation von Zytokinen und Chemokinen werden Leukozyten rekrutiert, aktiviert und setzen wiederum entzündungsfördernde Mediatoren frei, wodurch letztendlich eine chronische Inflammationsreaktion entsteht. Dieser chronische Entzündungsprozess führt zur Gewebeerstörung bzw. zum Umbau in fibrotisches und damit funktionsloses Gewebe [73].

Ebenso wie TNF wird die Expression der TNF-Rezeptoren im Verlauf akuter und chronischer Nierenerkrankungen induziert. Lösliche Formen der Rezeptoren sind im Urin nachweisbar. Die Arbeitsgruppe von *Tippling et al.* hat mit murinen Knochenmarkchimären anhand der Immunkomplexglomerulonephritis gezeigt, dass besonders die TNF-Produktion intrinsischer Nierenzellen zu einem glomerulären Schaden und einer renalen Entzündungsreaktion führt [97]. Analog hierzu konnte *Vielhauer et al.* zeigen, dass die Expression von TNFR2 durch intrinsische Nierenzellen entscheidend für die Entwicklung einer Glomerulonephritis ist [73].

Zahlreiche Studien weisen auf eine pathophysiologische Rolle von TNF und TNF-abhängiger zellulärer Signalwege bei der FSGS hin. Erhöhte Serum-TNF-Spiegel sind bei Patienten mit nephrotischem Syndrom und FSGS nachweisbar [98]. Bei einigen pädiatrischen FSGS-Patienten kann durch eine TNF-blockierende Therapie eine Verbesserung des Krankheitsbildes erreicht werden [99, 100]. Tatsächlich beschrieben *Chung et al.*, dass in Podozyten von FSGS-Patienten TNF-abhängige Signalwege aktiviert sind [101]. Entsprechend konnte experimentell im FSGS-Mausmodell nachgewiesen werden, dass renales TNF einen Lipid-vermittelten Podozytenschaden verursacht [102]. Interessanterweise korrelierte in dieser Studie der eGFR-Verlust mit glomerulären, nicht jedoch Serum-TNF-Spiegeln. Dies weist darauf hin, dass eine intrinsische renale Aktivierung TNF-abhängiger Signalwege eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der FSGS spielt [102]. Vor kurzem konnte auch nachgewiesen werden, dass Serum von FSGS-Patienten TNF-vermittelte Signalwege in Podozyten induziert [103], was ebenfalls auf eine pathophysiologische Rolle von glomerulärem TNF auf den Podozytenschaden bei der FSGS hinweist.

1.6 Adriamycin-Nephropathie

Adriamycin (ADR), auch bekannt als Doxorubicin, ist ein Anthracyclin, welches eine wichtige Rolle als Zytostatikum in der Antitumorthherapie spielt. 1970 zeigten *Sternberg et al.* zum ersten Mal, dass die Applikation von Anthracyclinen in Ratten zu einer glomerulären Schädigung führt [104]. Nachdem 1977 *Burke et al.* die Entwicklung eines Nierenversagens nach Applikation von ADR beim Menschen beschrieben [105], wurde die Adriamycin-Nephropathie ausführlich untersucht. ADR wird in Nagetieren nach Verabreichung nicht metabolisiert, sondern rasch aus dem Plasma entfernt und lagert sich hauptsächlich in der Niere ab, was vermutlich zur Nephrotoxizität führt [106, 107]. ADR führt in der Maus und Ratte zu Veränderungen, welche histologisch den Veränderungen der FSGS des Menschen mit Podozytenschaden, Sklerose, Inflammation und Fibrose entsprechen [108]. Die Adriamycin-Nephropathie hat sich daher als Tiermodell der FSGS in der nephrologischen Forschung etabliert. ADR wirkt durch die Interkalierung in die DNA direkt toxisch auf glomeruläre Zellen und verursacht Schäden an der glomerulären Filtrationsbarriere, inklusive glomerulärer Endothelzellen, glomerulärer Basalmembran und Podozyten. Nach ADR-Exposition kommt es zur Einwanderung von Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten, die proinflammatorische Mediatoren wie z.B. Interleukine, TNF, Chemokine oder TGF β ausschütten und so die glomeruläre Entzündungsreaktion und den podozytären Schaden vorantreiben [108].

Es kommt zu einer Verdünnung der Glykokalix, einer Vergrößerung der glomerulären Endothelzellporen mit reduzierter Filterselektivität, einer Verschmelzung und letztendlich zum Ablösen der podozytären Fußfortsätze. TNF führt in Podozyten zu einer verminderten Expression von Synaptopodin, was als funktioneller Marker somit eine verschlechterte Podozytenfunktion anzeigt. Ebenfalls einhergehend mit den beschriebenen Veränderungen kommt es nach ADR-Exposition im Glomerulus zu einer verminderten Produktion von Proteoglycanen und Glycosaminoglykanen durch glomeruläre Endothelzellen [109]. In Podozyten führt ADR zu einer verminderten Expression von Schlitzmembranmolekülen, insbesondere Nephrin und Podocin. Diese zeigen nach ADR-Applikation anstatt eines kontinuierlichen nur noch ein diskontinuierliches, punktförmiges Muster, welches vereinbar mit der Podozytenschädigung ist [110]. Schließlich wird durch die chronische Schädigung eine

glomeruläre Matrixproduktion induziert, die zum charakteristischen Bild der segmentalen glomerulären Sklerose führt.

Der ADR-induzierte glomeruläre Schaden führt zudem dazu, dass tubuläre Zellen vermehrt proinflammatorische Zytokine wie CCL2 und CCL5 produzieren [106], was wie bei der FSGS des Menschen zu einer sekundär interstitiellen Nephritis und Fibrosierung führt. Tierversuche haben gezeigt, dass man den durch ADR vermittelten renalen Schaden verhindern kann, indem man die Nierenarterie während der Applikation clippt. Somit ist eine direkte Exposition der Niere gegenüber ADR notwendig, um die ADR-Nephropathie zu induzieren [111].

Die Applikation von ADR bei Nagetieren führt außerdem zu einer messbaren Verschlechterung der renalen Funktion. Es kommt zu einer Erhöhung des Serumkreatinins, einer Verminderung der Kreatinin-Clearance und des Serumalbumins, Dyslipidämie und erhöhter Proteinausscheidung im Urin [109, 112]. Diese Veränderungen sind vereinbar mit den Symptomen eines nephrotischen Syndroms und einer chronischen Niereninsuffizienz.

Wie genau ADR diese unterschiedlichen Veränderungen auf molekularer Ebene induziert, ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Es werden neben den direkt toxischen Effekten auf Podozyten und glomeruläre Endothelzellen verschiedene weitere Mechanismen diskutiert. Eine mögliche Pathogenese ist die erhöhte Produktion freier Radikale in Podozyten durch ADR sowie verminderte Konzentrationen von Glutathion bei gleichzeitig erhöhter Konzentration von Lipidperoxiden [113, 114]. Freie Radikale können wiederum Zelltod induzieren und so den Untergang intrinsischer Nierenzellen vorantreiben. Ein weiterer Ansatz wird in der ADR-induzierten mitochondrialen Dysfunktion und mitochondrialen Konformationsänderung gesehen [115]. Auch führt ADR zu einer erhöhten Sekretion und Expression von *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) und deren Rezeptoren (RAGEs). Mäuse mit verminderter RAGE-Expression zeigen nach ADR-Exposition eine geringere ausgeprägte Albuminurie und Glomerulosklerose, sodass eine RAGE-Abhängigkeit ebenfalls diskutiert wird [114].

Trotz des mittlerweile gut etablierten Modells ist der Mechanismus, wie der Podozytenschaden bei der FSGS und der Adriamycin-Nephropathie zum Zelltod der Podozyten und zur Glomerulosklerose führt, sowohl im Modell als auch bei der humanen Erkrankung weitgehend ungeklärt. Im Fokus dieser Arbeit steht daher die bessere Charakterisierung molekularer und zellbiologischer Mechanismen der FSGS-Entstehung durch geeignete *in vitro* Untersuchungen.

1.7 Fragestellung

Wie beschrieben ist die fokal segmentale Glomerulosklerose eine der häufigsten glomerulären Ursachen für eine chronische Nierenerkrankung bzw. eine terminale Niereninsuffizienz [37] und somit Gegenstand der aktuellen Forschung. Pathophysiologisch geht man davon aus, dass ein podozytärer Schaden am Beginn der Erkrankungskaskade steht und dass unterschiedliche Zytokine wie TNF zur glomerulären Schädigung und Inflammation führen, die wiederum weiteren Zelluntergang und eine Fibrosierung zur Folge haben [7, 56]. Die genaue Pathogenese und die Abläufe auf molekularer und zellulärer Ebene bei der FSGS sind jedoch nicht komplett verstanden. Auch im häufig verwendeten tierexperimentellen Modell der FSGS, der Adriamycin-induzierten Glomerulosklerose, sind die pathophysiologischen Vorgänge, die zu Podozytenverlust und glomerulärer Vernarbung führen, unzureichend charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Mechanismen untersucht werden, die nach ADR-Exposition die typischen histopathologischen Veränderungen der FSGS (Absterben glomerulärer Zellen, glomerulärer Entzündung und Fibrose) vermitteln. Zusätzlich soll geklärt werden, welche glomerulären Zellen hieran beteiligt sind. Dazu werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Führt Adriamycin zu einem vermehrten Absterben unterschiedlicher renaler Zellen und welche Formen des Zelltodes werden durch Adriamycin induziert?
2. Wird der durch Adriamycin induzierte Zelltod über TNF vermittelt?
3. Führt Adriamycin zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF in renalen Zellen?
4. Führt Adriamycin zu einer vermehrten Expression und Produktion weiterer inflammatorischer Zytokine und Chemokine in glomerulären Zellen?
5. Welche glomerulären Zellen bewirken nach Exposition gegenüber Adriamycin die fibrotischen Veränderungen im Glomerulus?

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

<i>Chemikalien für Zellkultur</i>	
Adriamycin	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, D
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, D
DMEM Medium (1X) + GlutaMAX™	gibco® by life technologies, Paisley, UK
DPBS	Pan™ BioTech, Aidenbach, D
Etanercept	Wyeth Pharmaceuticals AG, Zug, CH
FBS, Fetales Bovines Serum	Biochrom KG, Berlin, D
HEPES 1M	gibco® by life technologies, Paisley, UK
Interferon-gamma 50 μ g/ml	Pepro Tech, Rocky Hill, USA
Nec1s (Necrostatin)	BioVision Inc., Milpitas, CA, USA
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe, D
Rekombinates murines TNF	Pepro Tech, Rocky Hill, USA
RLT-Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™	gibco® by life technologies, Paisley, UK
Sodium Bicarbonate Solution 7,5 %	gibco® by life technologies, Paisley, UK
Sodiumpyruvat 100 mM	gibco® by life technologies, Paisley, UK
Triton® X-100	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Trypsin/EDTA Solution 0,05/0,02 % in PBS	Pan™ BioTech, Aidenbach, D
Z-VAD-FMK	Invivogen, San Diego, USA

<i>Chemikalien für molekularbiologische Methoden</i>	
ELISA-Kit MCP-1/CCL2	BD BioSciences, San Diego, USA
ELISA-Kit RANTES /CCL5	R&D Systems, Abigdon, UK
ELISA-Kit Mouse TNF- α	BioLegend®, San Diego, USA
PureLink® RNA Mini Kit	Ambion™ by life technologies, Carlsbad, USA
Materialien für Reverse Transkription 5x First strand Buffer dNTP (25nM) DTT (0,1 M) Hexanukleotide Linear Acrylamid RNase free Spray RNAsin Superscript II	Invitrogen, Carlsbad, USA GE Healthcare, München, D Invitrogen, Carlsbad, USA Roche, Basal, CH Ambion, Darmstadt, D Gene Choice, Frederick, USA Promega, Madison, USA Invitrogen, Carlsbad, USA
Materialien für SYBR Green I Mix, RT-PCR 10 x Taq Buffer without Detergent BSA PCR grade dNTP (25 nM) MgCl ₂ 25mM PCR-Optimizer Rox SYBR Green I Dye Detection Taq DNA Polymerase	Fermentas, Waltham, USA Fermentas, Waltham, USA GE Healthcare, München, D Fermentas, Waltham, USA Bitop, Witten, D Invitrogen, Carlsbad, USA Applied Biosystems, Norwalk, USA New England BioLabs, Ipswich, USA

<i>Sonstige Chemikalien</i>	
Aqua ad iniectabilia	Berlin-Chemie AG, Berlin, D
Tween	Sigma, Deisenhofen, D

2.1.2 Primer für *Real-Time* PCR

Die Primer wurden bei Metabion international AG, Planegg, erworben.

Name	Sequenz
18S rRNA	<i>Forward Primer:</i> 5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3' <i>Reverse Primer:</i> 5'-AGGGCCCTCACTAAACCATCC-3'
CCL2	<i>Forward Primer:</i> 5'-CCT GCT GTT CAC AGT TGC C-3' <i>Reverse Primer:</i> 5'-ATT GGG ATC ATC TTG CTG GT-3'
CCR2	<i>Forward Primer:</i> 5'-GGGCATTGGATTCAACCAC-3' <i>Reverse Primer:</i> 5'-CCGTGGATGAACTGAGGTAAC-3'
Fibronectin	<i>Forward Primer:</i> 5'-GGA GTG GCA CTG TCA ACC TC-3' <i>Reverse Primer:</i> 5'-ACT GGA TGG GGT GGG AAT-3'

Laminin	<i>Forward Primer: 5'-CAT GTG CTG CCT AAG GAT GA-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-TCA GCT TGT AGG AGA TGC CA-3'</i>
MLKL	<i>Forward Primer: 5'-CTG AGG GAA CTG CTG GAT AGA G-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-CGA GGA AAC TGG AGC TGC TGA T-3'</i>
MMP2	<i>Forward Primer: 5'-TGCTATATTAATTACATATCGGGGG-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-CATCGATCAAAGGTTCTGGC-3'</i>
MMP9	<i>Forward Primer: 5'-AGA CGA CAT AGA CGG CAT CC-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-CTG TCG GCT GTG GTT CAG T-3'</i>
Pro-Kollagen 1	<i>Forward Primer: 5'ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3'</i>
Pro-Kollagen 4	<i>Forward primer: 5'-GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT-3'</i> <i>Reverse primer: 5'-CACATTTTCCACAGCCAGAG-3'</i>
RIPK1	<i>Forward Primer: 5'-GACTGTGTACCCTTACCTCCGA-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-CACTGCGATCATTCTCGTCCTG-3'</i>
RIPK3	<i>Forward Primer: 5'-GAAGACACGGCACTCCTTGGTA-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-CTTGAGGCAGTAGTTCTTGGTGG-3'</i>
TIMP1	<i>Forward Primer: 5'-TCC CCA GAA ATC AAC GAG AC-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-CAT TTC CCA CAG CCT TGA AT-3'</i>
TIMP2	<i>Forward Primer: 5'-GAA TCC TCT TGA TGG GGT TG-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-CGT TTT GCA ATG CAG ACG TA-3'</i>
TNF	<i>Forward Primer: 5'-CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC-3'</i> <i>Reverse Primer: 5'-AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT-3'</i>

2.1.3 Plastikwaren

Falcons 15 und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Petrischalen 10 cm, 6 well und 96 well	TPP®, Trasadingen, CH
Pipettenspitzen 1-1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettierhilfespitzen 2-25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße 500, 1500 und 2000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Tube 2ml zur Zellkryokonservierung	alpha laboratories, Eastleigh, UK
Zellschaber S (240mm)	TPP®, Trasadingen, CH
96-well Platten, durchsichtig, Elisa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.4 Geräte

Zentrifugen Heraeus, Megafuge 1.0R Eppendorf, Centrifuge 5415 C Hettich, Rotanta 460 R	Heraeus, Hanau, D Eppendorf, Hamburg, D Hettich, Tuttlingen, D
Zellinkubator Typ B5060 EC- CO2	Heraeus Instruments, OsterodeTu, D
ELISA-Reader GENios Plus	Tecan, Männedorf, Schweiz
PCR-Maschine TagMan Sequence Detection System LightCycler® 480	Roche, Basel, CH
Mikroskop Leica DMIL LED	Leica, Wetzlar, D
Sonstige Geräte Spektrophotometer ND-1000 Thermomixer comfort Vortex-Gerät Pipettierhilfe Pipetus® Pipetten 20 µl, 200 µl, 1000 µl	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D Eppendorf, Hamburg, D Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, D Hirschmann Laborgeräte Abimed

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Zellart</i>	<i>Referenz</i>
mGENC	murine glomeruläre Endothelzellen	Akis et al. 2004 [116]
mMC	murine Mesangialzellen	Satriano et al. 1997 [117]
mPC	murine Podozyten	Schiwek et al. 2004 [118]
mPEC	murine Parietalzellen	Ohse et al. 2008 [119]

Die murine glomeruläre Endothelzelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Nese Akis, Uludag University, Bursa, Türkei zur Verfügung gestellt. Sie stammt aus einer tsA58 Immorto-Maus und wurde mittels positiver CD31-Immunfluoreszenzfärbung und durch Aufnahme von acetyliertem LDL charakterisiert [116]. Die murine Mesangialzelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Detlef Schlöndorff, New York überlassen. Sie wurde mit dem nicht replizierenden Virus SV-40 transformiert, sodass sie mit primär kultivierten murinen Mesangialzellen vergleichbar ist [117]. Beide Zellreihen wachsen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Zellteilung gut unter normalen, nicht-permissiven Zellkulturbedingungen [116, 117].

Die murine Podozytenzelllinie und die murine Parietalzelllinie wurden uns freundlicherweise von Dr. Jun Oh, Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung von immortalisierten Podozyten erfolgte aus Glomeruli der Immorto-Mouse (Charles River, USA). Sie tragen eine Temperatur-sensitive Mutation des SV40-Large-T-Antigen (SV40-TAg) Vektors in sich. Dieser wird durch einen Promotor kontrolliert, der durch Interferon- γ (IFN- γ) induziert wird. Podozyten sind terminal ausdifferenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen können. Die Podozyten, die man zur Zellexpansion verwendet, müssen daher mit einem proonkogenen Vektor bestückt sein. Fügt man bei einer Temperatur von 33°C (permissive Bedingungen) IFN- γ zu dem Medium hinzu, induziert dies die Aktivierung des SV40-TAg Vektors und führt zur Zellteilung in undifferenzierten Podozyten. Bei einer Temperatur von 37°C (nicht-permissive Bedingungen) wird dieser Vektor inaktiviert, sodass ein Temperaturshift von 33°C zu 37°C zur Ausdifferenzierung von Podozyten führt [118, 120]. Analog dazu verläuft die Kultivierung und die Ausdifferenzierung der murinen Parietalzellen, die ebenfalls ausdifferenzierte Zellen sind. Deren Etablierung erfolgte ebenfalls aus Glomeruli der Immorto-Mouse [119].

2.2.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Das Einfrieren und Auftauen von Zellen sowie die Passage und Stimulationsexperimente wurden ausschließlich unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Dazu verwendete Gegenstände wie Pipetten, Pipettenspitzen, Materialflaschen, etc. wurden vor Ingebrauchnahme sorgfältig desinfiziert.

Die Kultivierung der immortalisierten glomerulären Endothelzellen erfolgte nach den Angaben von *Akis et al.* [116], die der immortalisierten Mesangialzelllinie nach *Satriano et al.* [117] in einem Brutschrank bei 37°C und einem 5 % CO₂/Luft-Gemisch.

Die Kultivierung der Podozyten und Parietalzellen erfolgte in einem Brutschrank bei 33°C und einem 5 % CO₂/Luft-Gemisch. Für Stimationsversuche wurden die Zellen 14 Tage vor Beginn zur Differenzierung in einen Brutschrank mit 37°C und 5 % CO₂/Luft-Gemisch überführt. Das entsprechende Medium enthielt dabei kein IFN- γ .

2.2.3 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen wurde eine 10 cm Petrischale mit 9 ml des Wachstumsmediums vorbereitet. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit einer 1000 μ l Pipette in die Schale überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

Zum Ablösen der Zellen wurden diese zunächst mit 2-5 ml DPBS gewaschen und mit 2-4 ml Trypsin-EDTA bei 37°C (Mesangialzellen und glomeruläre Endothelzellen) bzw. 33°C (Podozyten und Parietalzellen) für etwa 5 Minuten inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde entsprechendes Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellsuspension in einem 15 ml Falcon-Röhrchen für 3 Minuten bei 37°C und 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Zum Einfrieren der Zellen wurde das Pellet mit einem Einfriermedium aus FBS und 10-20 % DMSO resuspendiert. Je 1 ml wurden in entsprechendes Kryoröhrchen pipettiert und zunächst bei -80°C in einer Isopropanol-Kühlbox eingefroren.

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Einfrieren und Auftauen der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.2.4 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der murinen Mesangial- und Endothelzellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit GlutaMax, 1% Penicillin-Streptomycin und 2,5 % (Mesangialzellen) bzw. 10 % (glomeruläre Endothelzellen) fetalem bovines Serum (FBS).

Für die Kultivierung von Podozyten und Parietalzellen wurde Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit GlutaMax, 5 % FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % HEPES, 1 % Natriumpyruvat und 1 % Natriumbicarbonat verwendet. Zusätzlich wurde IFN- γ mit 50 U/ml während der Proliferationsphase hinzugefügt.

Zum Passagieren der Zellen wurde diese nach Erreichen einer etwa 80 % Konfluenz wie bereits oben beschrieben abgelöst, das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und auf neue Platten mit entsprechendem Wachstumsmedium verteilt. Die Kultivierung erfolgte stets unter sterilen Bedingungen.

Die Podozyten- und Parietalzelllinien wurden zur Differenzierung für Stimulationsversuche nach Erreichen einer 80% Konfluenz wie oben beschrieben abgelöst und für 14 Tage in IFN- γ freiem Medium bei 37°C inkubiert. Nach sieben Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Dies geschah unter sterilen Bedingungen.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Um die Vitalität und Zellzahl zu bestimmen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurden die Zellen wie auch beim Passagieren von der Platte gelöst und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde resuspendiert. Anschließend wurden ca. 2 μ l der Lösung mit Trypanblau vermischt und in die Zählkammer pipettiert. Der Farbstoff Trypanblau färbt selektiv das Zytoplasma von toten Zellen an, in deren Zellinneres er aufgrund der erhöhten Membrandurchlässigkeit ungehindert diffundieren kann. Mikroskopisch erscheinen diese Zellen daher dunkelblau, während die vitalen Zellen heller aussehen.

Mittels der Formel

$$\text{Zellzahl (Mittelwert aus 4 Großquadranten)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

errechnet sich die Zellzahl der vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer.

2.2.6 Zellernte

Zur 24-stündigen Stimulation mit verschiedenen Adriamycin- und TNF-Konzentrationen wurden die Zellen ausgezählt und jeweils ca. 300.000 Zellen pro Well auf einer 6-Well-Platte mit je 2 ml entsprechendem Medium bis zum Erreichen einer 80% Konfluenz angezüchtet. Nach abgeschlossener Stimulation wurde der Proteinüberstand abgesaugt und in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden für weitere ELISA-Auswertungen bei - 80°C aufbewahrt.

Die adhärennten Zellen wurden mit 350 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol und einem flexiblen Zellschaber abgelöst und für die RNA-Isolation in 1,5ml Eppendorfgefäßen bei - 20°C aufbewahrt.

2.2.7 Stimulation mit ADR und TNF

Alle 4 Zelllinien wurden auf einer 6-Well-Platte angezüchtet und wie folgt stimuliert:

Kontrolle	2 ml Wachstumsmedium
Adriamycin 0,3 µg/ml	2 ml Wachstumsmedium + Adriamycin 0,3 µg/ml
Adriamycin 3 µg/ml	2 ml Wachstumsmedium + Adriamycin 3 µg/ml
TNF 1 ng/ml	2 ml Wachstumsmedium + TNF 1 ng/ml
TNF 10 ng/ml	2 ml Wachstumsmedium + TNF 10 ng/ml
TNF 50 ng/ml	2 ml Wachstumsmedium + TNF 50 ng/ml

Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin erfolgte die wie oben beschriebene Zellernte.

2.3 Proliferations-Assay

Proliferations-Assays sind ein weit verbreitetes Testprinzip in der Zellbiologie, um Wachstumsaktivität und Zellüberleben unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wie Ernährung, Zytokinexposition oder Exposition gegenüber zytotoxischen Stoffen zu untersuchen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Bestimmung der Zellzahl in einem Proliferations-Assay. Zum einen kann man die Zellen direkt zählen mit Hilfe eines Mikroskops oder einem elektrischen Zellzähler; zum andern indirekt durch die Messung der metabolischen Aktivität bestimmter zellulärer Enzyme oder der Aufnahme radioaktiver Metabolite.

Für diese Arbeit wurde der Proliferations-Assay *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* von Promega verwendet. Er basiert auf der Umsetzung von Tetrazoliumsalz in ein Formazanprodukt, dessen Konzentration man gut durch Absorptionsmessung mit einem 96-Well-Plattenlesegerät (in dieser Arbeit: GENios Plus – Elisa Reader) bestimmen kann. Damit ist es möglich, die Zahl lebender Zellen nach verschiedenen Zelltod-induzierenden Behandlungen zu bestimmen.

Für die Durchführung des Assays wurden die Zellen wie unter 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben angezüchtet und passagiert. Nach Erreichen der 3. bis 4. Passage wurden sie abgelöst und mittels der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurden 10.000 Zellen/Well auf einer 96-Well-Platte über Nacht angezüchtet. Als Stimulationsmedium für Mesangial- und glomeruläre Endothelzellen wurde DMEM verwendet, für Podozyten und Parietalzellen RPMI. Da die Reagenzien Nec1s und ZVAD in DMSO gelöst sind, wurde sowohl zur Negativ-Kontrolle, als auch zur Stimulation mit Etanercept DMSO in gleicher Konzentration hinzugefügt. Als Positiv-Kontrolle für die Zelltodinduktion diente Triton® X-100. Die Konzentrationen der einzelnen Stimulationen sind unten aufgeführt.

Nach Vorinkubation mit Nec1s, ZVAD und Etanercept wurde nach 30 Minuten jeweils 15 µl/Well Adriamycin in der entsprechenden Dosierung hinzugefügt. Die Platte wurde anschließend für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde jeweils 15 µl/Well Dye Solution hinzugefügt und erneut für vier Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert. In dieser Zeit wandeln vitale Zellen das Tetrazolium der Dye Solution in ein Formazanprodukt um. Im Anschluss erfolgte die Hinzugabe von 100 µl/Well Stop Solution. Die Platten wurde danach über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in dem

Elisa Reader GENios Plus bei 570 nm ausgelesen. Der gemessene Wert entspricht der Absorption des Formazanproduktes und ist somit proportional zum Anteil vitaler Zellen. Die korrekten Absorptionswerte wurden durch Abzug eines sogenannten Blank-Wertes errechnet. Das Well des Blank-Wertes enthielt keine Zellen, sondern lediglich Medium mit DMSO.

Folgende Konzentrationen wurden zur Stimulation verwendet:

Negativ-Kontrolle: Medium mit DMSO	Konzentration: DMSO 0,1 %
Positiv-Kontrolle: Medium mit Triton®X-100	Konzentration: Triton®X-100 2%
Nec1s in DMSO gelöst und in PBS verdünnt	Stock Solution: 100 mM in DMSO 100 %
	Endkonzentration: Nec1s 100 µM / DMSO 0,1 %
ZVAD in DMSO gelöst und in PBS verdünnt	Stock Solution: 20 mM in DMSO 100 %
	Endkonzentration: ZVAD 10 µM / DMSO 0,1 %
Etanercept in PBS (ggf. zur Denaturierung 30 Minuten bei 95°C im Thermomixer inkubiert)	Stock Solution: 50 mg/ml
	Endkonzentration: Etanercept 10 µg/ml / DMSO 0,1 %
Adriamycin in PBS verdünnt (Zugabe nach 30 Minuten)	Stock Solution: 2 mg/ml
	Endkonzentration: 0,3 und 3 µg/ml

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation

RNA ist im Gegensatz zu DNA sehr fragil. Es war wichtig, bei der Isolation möglichst schnell die stabilen RNAsen von der RNA zu trennen. Für möglichst ideale Bedingung wurden daher alle benötigten Materialien sowie die Arbeitsfläche mit RNase-freiem Wasser gereinigt. Die RNA-Isolierung der Mesangial-, Endothel, Parietalzellen und Podozyten erfolgte mit Hilfe des PureLink® RNA Mini Kit von Ambion™. Die wie unter 2.2.6 beschriebenen geernteten Zellen wurden auf die entsprechenden Filtriersäulen überführt und anschließend 15 Sekunden bei 12.000 g zentrifugiert. Dadurch löste sich die RNA aus dem Gemisch und verblieb in der Filtriersäule. Das Filtrat wurde abgegossen. In einem ersten Waschschrift wurde mittels je 700 µl Wash-Buffer 1 das β-Mercaptoethanol aus den Filtriersäulen gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 12.000 g und der Abguss des Filtrats. Die Filtriersäulen wurden in einem zweiten Waschschrift mit je 500 µl Wash-Buffer 2 gewaschen, erneut zentrifugiert und das Filtrat abgegossen. Zum Trocknen der Filtermembran wurden die Filtriersäulen auf RNase-freie Auffangbehälter gesetzt und für zwei Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde jeweils 30 µl RNA-freies Wasser zu jeder Filtriersäule hinzugefügt und für eine Minute inkubiert. Dadurch löst sich die RNA von den Filtriersäulen. Durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 12.000 g wurde die RNA am Boden des Auffanggefäßes gesammelt. Die so gewonnene RNA wurde entweder direkt für weitere Experimente verwendet oder bei - 20° eingefroren.

Produkt	Firma	Artikelnummer
PureLink® RNA Mini Kit	Ambion™ by life technologies	12183018A

2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mittels eines Spektrometers bestimmt. Dazu wurde die Extinktion der jeweiligen Probe bei $\lambda=260$ nm (RNA) und $\lambda=280$ nm (Proteine)

gemessen. Bei ausreichender Reinheit der RNA-Präparation sollte der sich daraus ergebende Koeffizient zwischen 1,7 und 2,3 liegen. Ein Koeffizient außerhalb dieser Grenzen deutet auf eine kontaminierte Präparation hin und es empfiehlt sich, die RNA erneut aufzureinigen.

Die Konzentration einer Probe in $\mu\text{g/ml}$ lässt sich photometrisch wie folgt berechnen:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.4.3 cDNA-Synthese

Für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion wird DNA benötigt, daher muss die aufgereinigte RNA in DNA revers transkribiert werden.

Je Probe wurde 1 μg RNA / 20 μl in komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurde ein 13,2 μl Ansatz aus 1 μg RNA und Wasser (Aqua ad iniectabilia) vorbereitet, sowie ein 6,8 μl Mastermix bestehend aus:

Mastermix für cDNA-Synthese	4 μl 5x Puffer
	0,4 μl 25 mM dNTP
	1 μl 0,1 M DTT
	0,5 μl 40 U/ μl RNasin
	0,25 μl Linear Acrylamid 15 $\mu\text{g/ml}$
	0,215 μl Hexanukleotide
	0,43 μl Superscript

Der Mastermix wurde mit den RNA-Proben vermischt und für 90 Minuten bei 42°C und 350 Umdrehungen im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde zur Denaturierung der DNAsen der Mix für weitere 5 Minuten bei 85°C inkubiert.

Die erhaltene cDNA diente als Vorlage, um spezifische Sequenzen in einer quantitativen *Real-Time* PCR zu amplifizieren.

2.4.4 Quantitative *Real-Time* PCR

Prinzip: Die quantitative *Real-Time* PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Zusätzlich bietet sie die Möglichkeit der Quantifizierung. Am einfachsten geschieht dies durch Nutzung von DNA-

Fluoreszenzfarbstoffen. Diese binden an die amplifizierte doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Daher korreliert die Zunahme der Fluoreszenz von Amplifikationszyklus zu Zyklus mit der Zunahme der amplifizierten Ziel-DNA. In dieser Doktorarbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Durch seine interkalierenden Eigenschaften kann sich dieses asymmetrische Cyanin in die doppelsträngige DNA einlagern und somit die Fluoreszenz bei Amplifikation der DNA ansteigen lassen.

Entscheidend für die Quantifizierung der amplifizierten doppelsträngigen DNA ist der sogenannte CT-Wert (cycle threshold), d.h. die Zykluszahl, bei dem sich die gemessene Fluoreszenz deutlich vom Hintergrundsignal unterscheidet und einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Der CT-Wert wird für jede amplifizierte Ziel-cDNA berechnet. Je kleiner der CT-Wert einer cDNA ist, umso mehr cDNA bzw. ursprünglich mRNA des exprimierten Gens ist in der untersuchten Probe vorhanden. Um das Expressionsniveau der Ziel-cDNA in verschiedenen Proben vergleichen zu können, wird ihre Expression im Verhältnis zu einem Referenzgen, einem Housekeeper-Gen, angegeben. Dieses ist in allen Geweben oder Zellen auf vergleichbarem Expressionsniveau vorhanden. In dieser Arbeit wurde als Housekeeping-Gen ribosomale 18S rRNA verwendet. Die Berechnung der relativen Expression des Zielantigens erfolgte mit der $2^{\Delta CT}$ -Methodik.

Zu Beginn des PCR-Zyklus wird die cDNA auf 95°C erhitzt, was zur Auftrennung des Doppelstranges in zwei komplementäre Einzelstränge führt. Dieser Schritt wird als Denaturierung bezeichnet. Anschließend wird auf 65°C abgekühlt, sodass sich die fluoreszenzmarkierten Primer im Rahmen der Hybridisierung an die DNA-Einzelstränge anlegen können. Bei 72°C werden die DNA-Stränge ausgehend vom Primer durch die hitzestabile DNA-Polymerase amplifiziert und damit der cDNA-Gehalt in der Probe verdoppelt. Im Anschluss wird dieser Amplifikationszyklus 40-mal wiederholt, so dass die amplifizierte DNA-Menge und entsprechend das detektierte Fluoreszenzsignal bis zum Aufbrauchen der im Reaktionsansatz vorhandenen Ausgangsreagenzien exponentiell ansteigt. Im Anschluss an den letzten PCR-Zyklus wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese dient dazu, die Spezifität der Amplifikationen zu bestimmen. Die PCR-Ansätze werden dafür von 65°C auf 95°C erhitzt. Spezifische Amplifikationsprodukte (Primer mit spezifisch amplifizierter cDNA) weisen eine höhere Schmelztemperatur auf als unspezifische PCR-Produkte (z.B. Primer-Dimere). Am Schmelzpunkt lösen sich die DNA-Doppelstränge und setzen den Fluoreszenzfarbstoff frei, wodurch es zu einem Abfall der detektierten Fluoreszenz kommt.

Protokoll: Die cDNA-Proben wurden mit Wasser (Aqua ad iniectabilia) im Verhältnis von 1:10 verdünnt.

Für den SYBR Green I – Mix wurden folgende Reagenzien verwendet:

SYBR Green I	100 µl 10x Taq Buffer without Detergent
	7,5 µl dNTPs 25 mM
	20 µl Rox
	PCR-Optimizer (200 µl)
	BSA PCR grade (10 µl)
	SYBR Green I (2 µl)
	MgCl ₂ 25mM (120 µl)
	H ₂ O (40,5 µl)

In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden zunächst je 2 µl der verdünnten cDNA-Probe pipettiert und anschließend je 18 µl eines Mixes bestehend aus:

Mix für RT-PCR	10 µl SYBR Green I
	0,6 µl Forward Primer (1:10 verdünnt)
	0,6 µl Reverse Primer (1:10 verdünnt)
	0,16 µl Taq-Polymerase
	6,64 µl H ₂ O

Die Platte wurde mit einer durchsichtigen Folie verklebt und zentrifugiert.

Die *Real-Time* PCR mittels SYBR Green Methode erfolgte unter folgenden Einstellungen:

	Temperatur	Dauer	
Vorabdenaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	25 s	40x Wiederholung
Hybridisierung	60°C	45 s	
Amplifikation	72°C	30 s	
Schmelzkurve	95°C	5 s	
	Steigerung von 65°C auf 95°C	10 min	

Die CT-Werte wurden mit Hilfe der *LightCycler® 480 Software Release 1.5.0 SP4* ermittelt und das Expressionsniveau der Zielgene im Verhältnis zum Housekeeping-Gen 18s rRNA berechnet.

Die verwendeten Primer-Sequenzen sind in der Tabelle unter Punkt 2.1.2. aufgeführt.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Prinzip: Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit dessen Hilfe können verschiedene Substanzen quantitativ nachgewiesen werden. Hierzu wird zunächst ein Antikörper, der das zu bestimmende Antigen spezifisch bindet, auf eine Platte (sogenannte ELISA-Platte) aufgetragen, und daraufhin mit einem entsprechenden Detektionsantikörper inkubiert. Mehrere Waschvorgänge dienen dazu, freie, nicht gebundene Antigene zu entfernen. Der Detektionsantikörper wurde zuvor mit einem Enzym markiert, welches eine Reaktion mit Farbumschlag oder Chemolumineszenz katalysiert, die als Nachweißreaktion für das gesuchte Antigen dient. Die Signalstärke kann mithilfe eines Photometers nachgewiesen werden und ist eine Funktion der Antigenkonzentration.

Durch Bestimmung der Absorption sogenannter Standardproben mit vorher genau definierten Konzentrationen kann eine Standardkurve ermittelt werden, mit der sich dann anschließend die Antigenkonzentration der Proben berechnen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Überstände der stimulierten Mesangial-, Endothel-, Podozyten- und Parietalzelllinien zur Proteinbestimmung verwendet. Die Messungen der Farbreaktion erfolgte mittels des ELISA-Readers GENios Plus, der die Absorption proportional zur gebundenen Antigenmenge misst.

Protokoll: Die Konzentrationen von CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES und TNF wurden in den Überständen von allen vier Zelllinien nach 24-stündiger Stimulation (Kontrolle, 0,3 µg/ml, 3 µg/ml ADR, 1, 10 und 50 ng/ml TNF) bestimmt.

Die Durchführung erfolgte stets nach Herstellerangaben. Verwendet wurden folgende ELISA-Kits:

<i>ELISA-Kits</i>	
Maus CCL2/MCP-1	R&D Systems
Maus CCL5/RANTES	R&D Systems
Maus TNF-α	BioLegend

2.6 Statistik

Die dargestellten Ergebnisse der *in vitro* Versuche repräsentieren Daten von jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde für den Vergleich von 2 Gruppen der zweiseitige Zweistichproben-t-Test (Student's t-Test) verwendet, für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen ANOVA sowie Bonferroni's Multiple Comparison post-hoc Test. P-Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant angenommen und mit „*“ markiert ($p < 0,01$ wurde mit „**“ gekennzeichnet, $p < 0,001$ mit „***“).

Die statistische Berechnung und graphische Darstellung erfolgte mit *GraphPad® Prism 5.0*.

Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind die pathophysiologischen Mechanismen, die der FSGS zugrunde liegen, noch nicht abschließend geklärt. Eine entscheidende Rolle wird der Schädigung des Podozyten zugeschrieben [54], die Bedeutung weiterer glomerulärer Zellen bei der Entstehung der FSGS ist jedoch noch unzureichend charakterisiert. Zum besseren Verständnis von zellulären Mechanismen des Krankheitsablaufes wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit *in vitro* Experimente durchgeführt, die die im FSGS-Modell der Adriamycin-Nephropathie [106] ablaufenden Hauptkomponenten der Erkrankung – Zelltod, Entzündung und Fibrosierung – näher untersuchen.

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass nach ADR-Exposition eine Fibrosierung im Glomerulus induziert wird, die Expression podozytärer Marker wie Podocin und Nephrin als Zeichen der Podozytenschädigung abnimmt, und gleichzeitig die Konzentration proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie TNF und CCL2 im Glomerulus ansteigt [121].

3.1 Adriamycin-induzierter Zelltod im Glomerulus

Das Krankheitsbild der FSGS und analog dazu das experimentelle Modell der Adriamycin-Nephropathie sind durch einen Podozytenschaden und –verlust charakterisiert [37, 106]. Die Mechanismen, die zum podozytären Zelltod führen, sind bislang nicht exakt charakterisiert. Es ist unklar, ob ADR direkt zu einem Absterben von Podozyten führt oder indirekt über die Schädigung anderer glomerulärer Zellen dies bewirkt. Daher wurde zunächst das Überleben von verschiedenen glomerulären Zellarten nach ADR-Exposition untersucht.

3.1.1 Die Wirkung von Adriamycin auf das Überleben renaler Zellen *in vitro*

Zur genaueren Untersuchung der Wirkung von Adriamycin (ADR) auf das Überleben glomerulärer Zellen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Proliferations-Assay *CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* von Promega durchgeführt. Damit konnte der Prozentteil überlebender Zellen nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe bestimmt werden. Die Zellen wurden hierfür *in vitro* zunächst mit ADR in verschiedenen Konzentrationen (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde normales Medium verwendet. Für die Positiv-Kontrolle diente Medium plus Triton X-100. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Polyoxyethylen, dass zur Zelllyse führt, indem es unselektiv die Zellmembran permeabilisiert [122].

Es zeigte sich, dass Adriamycin in Podozyten, der pathogenetischen Hauptkomponente der FSGS, keinen signifikanten Zelltod induziert (Abb. 8A, Tabelle 1). In Parietalzellen wurde nur nach Exposition gegenüber der hohen ADR-Konzentration (3 µg/ml) ein geringes, aber signifikant vermindertes Zellüberleben um 17 % nachgewiesen (Abb. 8B, Tabelle 1). Dagegen zeigten weitere Untersuchungen an Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen ein signifikant schlechteres Überleben nach Exposition gegenüber ADR unter beiden Konzentrationen. Das Überleben der Mesangialzellen war nach Exposition gegenüber ADR in der Konzentration 0,3 µg/ml um fast 60 % vermindert, das der glomerulären Endothelzellen um fast 80 %; gegenüber ADR in der hohen Konzentration (3 µg/ml) überlebten nur 13 % der Mesangialzellen und 15 % der glomerulären Endothelzellen (Abb. 8C, 8D, Tabelle 1).

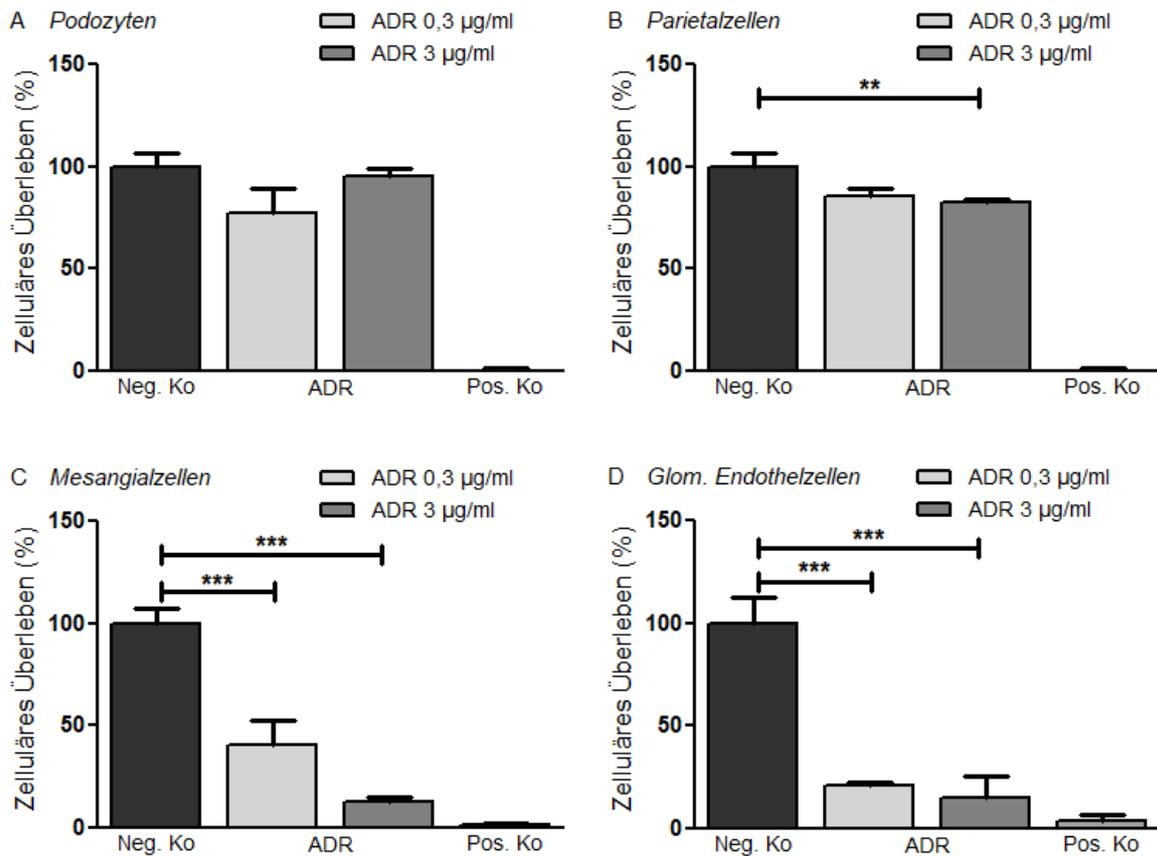


Abbildung 8: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* mit jeweils zwei verschiedenen ADR-Konzentration (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) für 24 Stunden stimuliert. Als negative Kontrolle diente reines Medium, als positive Kontrolle wurde Medium plus Triton X100 verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen (n≥3) dar.

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, neg. Kontrolle versus ADR-Stimulation

Tabelle 1: Überleben glomerulärer Zellen nach Stimulation mit ADR

(%)	Podozyten (n=3)	Parietalzellen (n=3)	Mesangialzellen (n=9)	Glom. Endothelzellen (n=6)
Negativ-Kontrolle	100,0 ± 7,7	100,0 ± 6,8	100,0 ± 7,7	100,0 ± 13,8
ADR 0,3 µg/ml	77,2 ± 14,9	85,3 ± 4,1	40,3 ± 12,5	20,8 ± 1,6
ADR 3 µg/ml	95,7 ± 4,2	82,9 ± 1,5	13,0 ± 1,9	15,3 ± 10,2
Positiv-Kontrolle	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,1	1,9 ± 0,4	3,8 ± 2,7

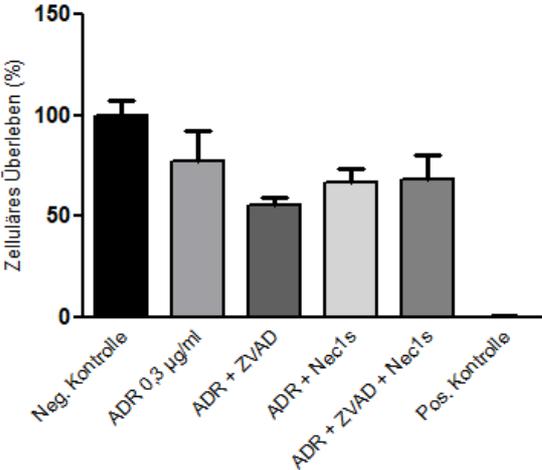
Um genauer zu klären, welche Art von Zelltod in den jeweiligen glomerulären Zellen durch ADR initiiert wird, wurden die Versuche unter Zugabe spezifischer Zelltod-Inhibitoren durchgeführt. Zur Hemmung von Apoptose wurde der Caspase-Inhibitor ZVAD verabreicht. Er bindet irreversibel an die katalytische Seite von Caspase-Proteasen und verhindert so die Induktion der Apoptose [123]. Als Nekroptose-Inhibitor wurde Necrostatin-1s (Nec1s) eingesetzt. Als allosterischer Hemmer inhibiert er die RIP-Kinase-1-Aktivität und somit die Nekroptose-Kaskade [124].

In Podozyten zeigt sich bei fehlender Zelltod-Induktion durch ADR lediglich unter gemeinsamer Inhibition mit ZVAD und Nec1s teilweise ein verbessertes Zellüberleben (Abb. 9A1, 9A2, Tabelle 2,3). Dies weist darauf hin, dass unabhängig von einer ADR-Exposition im Rahmen des *in vitro* Experiments auftretender Zelltod in Podozyten durch simultane Apoptose- und Nekroptose Blockade reduziert werden kann. Bei Parietalzellen lässt sich der durch ADR 3 µg/ml induzierte Zelltod durch simultane Zugabe von ZVAD und Nec1s signifikant hemmen (Abb. 9B2, Tabelle 3). Der in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen durch ADR-Exposition induzierte Zelltod wird durch die beiden Inhibitoren ZVAD und Nec1s unterschiedlich beeinflusst. Durch die Zugabe des Apoptose-Inhibitors ZVAD zeigt sich bei Mesangialzellen, die mit ADR 0,3 µg/ml stimuliert wurden, ein signifikant besseres Überleben (Abb. 9C1, Tabelle 2). In glomerulären Endothelzellen ergibt sich hier keine signifikante Verbesserung (Abb. 9D1, Tabelle 2). Nec1s steigert dagegen sowohl bei Mesangialzellen als auch bei glomerulären Endothelzellen nach Inkubation mit ADR 0,3 µg/ml signifikant das Zellüberleben (Abb. 9C1, 9D1, Tabelle 2). Unter ADR-Exposition mit der hohen Konzentration von 3 µg/ml wird der verstärkt induzierte Zelltod in Mesangialzellen nur geringfügig durch Nec1s (Abb. 9C2, Tabelle 3), in Endothelzellen durch einzelne Zugabe der Inhibitoren nicht signifikant vermindert (Abb. 9D2, Tabelle 3). Eine kombinierte Behandlung mit ZVAD und Nec1s führt in beiden Zelltypen zu signifikanter Zelltodhemmung, sowohl nach ADR-Inkubation mit 0,3 µg/ml als auch 3 µg/ml. Allerdings ergibt sich kein signifikanter Unterschied zur alleinigen Behandlung mit den einzelnen Inhibitoren (Abb. 9C1-9D2, Tabelle 2,3).

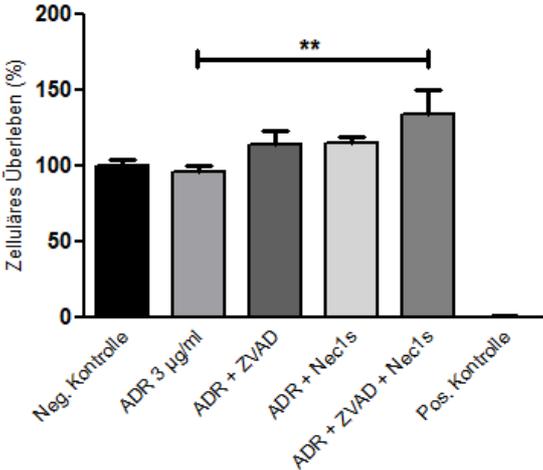
Diese Ergebnisse zeigen, dass Exposition gegenüber der niedrigen ADR-Konzentration in Mesangialzellen sowohl Apoptose als auch Nekroptose, in glomerulären Endothelzellen Nekroptose induziert. Der massive Zelltod nach Inkubation mit hoher ADR-Konzentration kann dagegen nur geringfügig durch Hemmung der Nekroptose (Mesangialzellen) oder simultane Blockade von Apoptose und Nekroptose (glomeruläre Endothelzellen) vermindert werden. Da

durch die Inhibitoren der ADR-induzierte Zelltod auch in Kombination nur partiell blockiert wird, ist davon auszugehen, dass weitere Formen des passiven (Nekrose) oder des regulierten Zelltodes (z.B. Ferroptose) nach ADR-Exposition ablaufen. Dagegen führt ADR in Podozyten und parietalen Endothelzellen direkt zu keiner relevanten Zelltodinduktion nach 24-stündiger Inkubation.

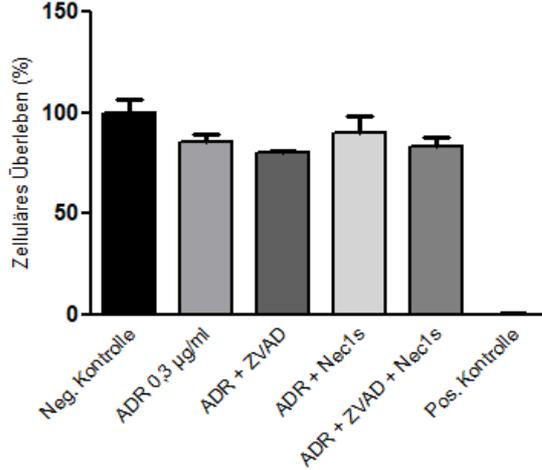
A1 Podozyten ADR 0,3 µg/ml



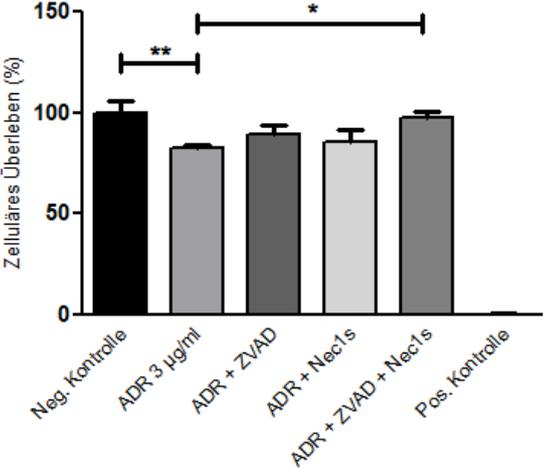
A2 Podozyten ADR 3 µg/ml



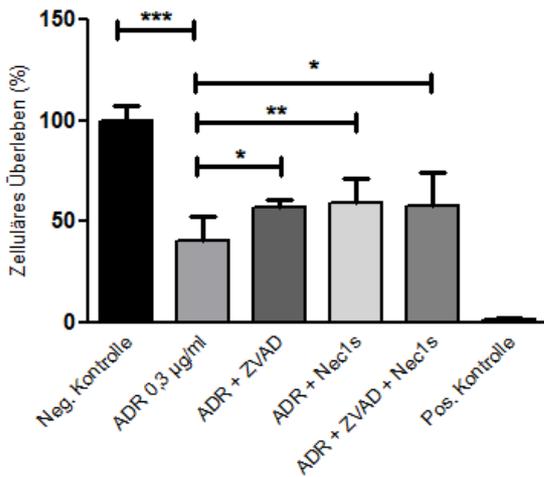
B1 Parietalzellen ADR 0,3 µg/ml



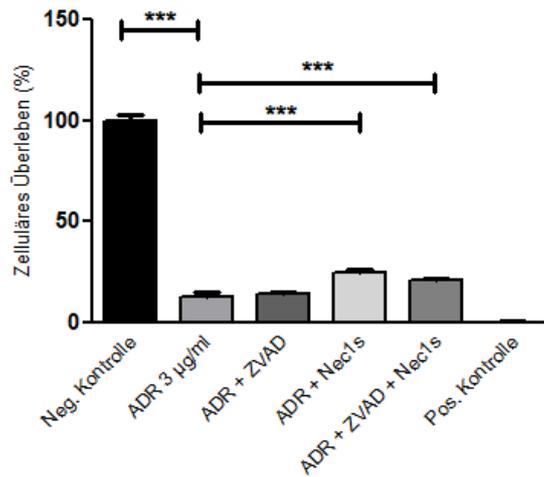
B2 Parietalzellen ADR 3 µg/ml



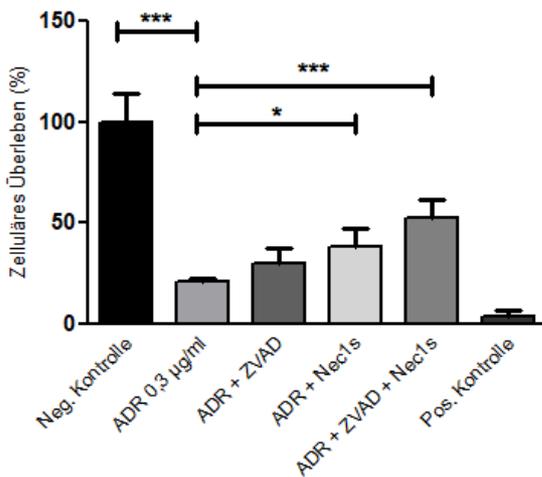
C1 Mesangialzellen ADR 0,3 µg/ml



C2 Mesangialzellen ADR 3 µg/ml



D1 Glomeruläre Endothelzellen ADR 0,3 µg/ml



D2 Glomeruläre Endothelzellen ADR 3 µg/ml

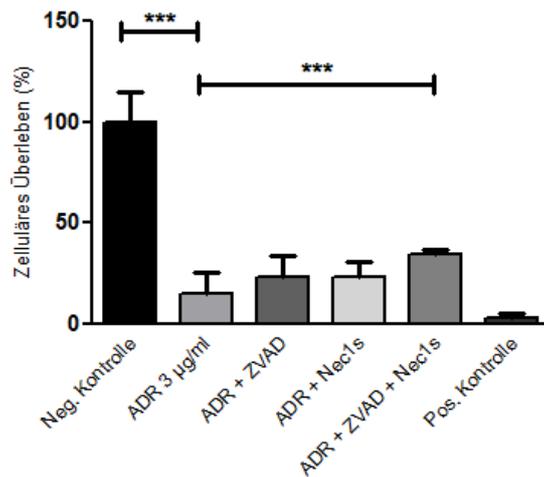


Abbildung 9: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR und Zelltod-Inhibitoren

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* mit jeweils zwei verschiedenen ADR-Konzentration (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) für 24 Stunden stimuliert. Zur Inhibition von Apoptose und Nekroptose wurden die Inhibitoren ZVAD und Nec1s sowie eine Kombination aus beiden eine halbe Stunde vor ADR-Zugabe hinzugefügt. Als negative Kontrolle diente Medium, als positive Kontrolle wurde Medium plus Triton X100 verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen (n≥3) dar. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, Kontrolle versus ADR, ADR versus ADR + zusätzliche Stimulation

Tabelle 2: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR in der Konzentration 0,3 µl/ml und Zelltod-Inhibitoren

(%)	<i>Podozyten (n=3)</i>	<i>Parietalzellen (n=3)</i>	<i>Mesangialzellen (n=9)</i>	<i>Glom. Endothelzellen (n=3)</i>
<i>Negativ-Kontrolle</i>	100,0 ± 7,7	100,0 ± 6,8	100,0 ± 7,7	100,0 ± 13,8
<i>ADR 0,3 µg/ml</i>	77,2 ± 14,9	85,3 ± 4,1	40,3 ± 12,5	20,8 ± 1,6
<i>ADR + ZVAD</i>	55,7 ± 3,9	80,0 ± 0,4	57,3 ± 3,8	30,2 ± 7,2
<i>ADR + Nec1s</i>	67,1 ± 6,8	90,0 ± 8,5	59,3 ± 12,3	38,3 ± 8,8
<i>ADR + ZVAD + Nec1s</i>	68,1 ± 12,0	83,5 ± 4,2	57,6 ± 17,0	52,8 ± 9,0
<i>Positiv-Kontrolle</i>	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,1	1,9 ± 0,4	3,8 ± 2,7

Tabelle 3: Überleben glomerulärer Zellen nach Inkubation mit ADR in der Konzentration 3 µl/ml und Zelltod-Inhibitoren

(%)	<i>Podozyten (n=3)</i>	<i>Parietalzellen (n=3)</i>	<i>Mesangialzellen (n=3)</i>	<i>Glom. Endothelzellen (n=6)</i>
<i>Negativ-Kontrolle</i>	100,0 ± 3,8	100,0 ± 5,7	100,0 ± 2,5	100,0 ± 15,1
<i>ADR 3 µg/ml</i>	95,7 ± 4,2	82,9 ± 1,5	13,0 ± 1,9	15,3 ± 10,2
<i>ADR + ZVAD</i>	114,6 ± 8,7	89,4 ± 4,8	14,4 ± 0,9	23,4 ± 10,8
<i>ADR + Nec1s</i>	115,4 ± 3,8	85,9 ± 6,0	24,5 ± 2,0	23,6 ± 7,3
<i>ADR + ZVAD + Nec1s</i>	134,1 ± 16,2	97,5 ± 3,4	21,01 ± 0,7	34,8 ± 1,9
<i>Positiv-Kontrolle</i>	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,9	0,0 ± 0,0	3,4 ± 2,4

3.1.2 Die Wirkung von Adriamycin auf die Expression von Zelltod-Mediatoren in glomerulären Zellen *in vitro*

Zur weiteren Charakterisierung der regulierten Nekrose nach Stimulation mit ADR in glomerulären Zellen wurde die Expression bestimmter intrazellulärer Nekroptose-Mediatoren auf mRNA-Ebene untersucht.

Die renalen Zellen wurden zunächst *in vitro* für 24 Stunden mit ADR in der Konzentration 0,3 µg/ml und 3 µg/ml inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen zur RNA-Gewinnung vom Well gelöst. Die gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und der quantitativen *Real-Time* PCR zugeführt.

Als Marker für Nekroptose wurden RIPK 1, RIPK 3 [66, 68] und MLKL [69] verwendet. Wie zuvor beschrieben, führt die Aktivierung von RIPK1 zur Inaktivierung von Caspase 8 und Bindung und Aktivierung von RIPK3 und MLKL. Zusammen bilden sie den Nekrosom-Komplex, der die Einleitung der Nekroptose vermittelt [69]. Eine vermehrte Expression der drei Marker auf mRNA-Ebene korreliert mit gesteigert ablaufender Nekroptose.

Für Podozyten zeigt sich nach Stimulation mit ADR 0,3 µg/ml ein signifikanter Anstieg der MLKL-Expression. Die Expressionsniveaus von RIPK 1 und RIPK 3 bleiben unbeeinflusst. Nach Inkubation mit 3 µg/ml ADR sinkt die RIPK 1-Expression signifikant ab, die Expression der beiden anderen Mediatoren bleibt unbeeinflusst (Abb. 10A, Tabelle 4).

In Parietalzellen zeigt sich für MLKL ein signifikanter Expressionsanstieg nach Inkubation mit ADR 0,3 µg/ml. Bei Exposition gegenüber der höheren Konzentration von 3 µg/ml ADR, wird dagegen ein signifikanter Abfall der RIPK 1 Expression beobachtet (Abb. 10B, Tabelle 4).

Die Untersuchung der Marker in Mesangialzellen ergibt eine signifikant höhere Expression von RIPK 3 und MLKL unter Inkubation mit ADR 0,3 µg/ml. Nach Exposition gegenüber ADR 3 µg/ml ergeben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede (Abb. 10C, Tabelle 4).

In den glomerulären Endothelzellen zeigt sich die höchste Übereinstimmung zwischen gesteigerter Expression von Nekroptosemarkern und dem Ergebnis des funktionellen Proliferationsassays. Die Inkubation mit ADR 0,3 µg/ml induziert signifikant die Expression aller drei Nekroptosemarker RIPK1, RIPK3 und MLKL. Nach Inkubation mit der hohen ADR-Konzentration zeigt sich ein Rückgang der Expression (Abb. 10D, Tabelle 4).

Zusammenfassend zeigt sich, dass Parietalzellen, Mesangialzellen und insbesondere glomeruläre Endothelzellen nach ADR-Exposition mit 0,3 µg/ml eine erhöhte Expression von Nekroptose-assoziierten Markern aufweisen. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit dem Nachweis einer ablaufenden Nekroptose in ADR-exponierten Mesangial- und Endothelzellen im Proliferations-Assay. Dagegen konnte in Parietalzellen keine ADR-induzierte Nekroptose nachgewiesen werden. Die verminderten Expressionsniveaus nach Exposition gegenüber ADR 3 µg/ml erklären sich dagegen mit dem durch die hohe ADR-Konzentration induzierten ausgeprägten Zellschaden.

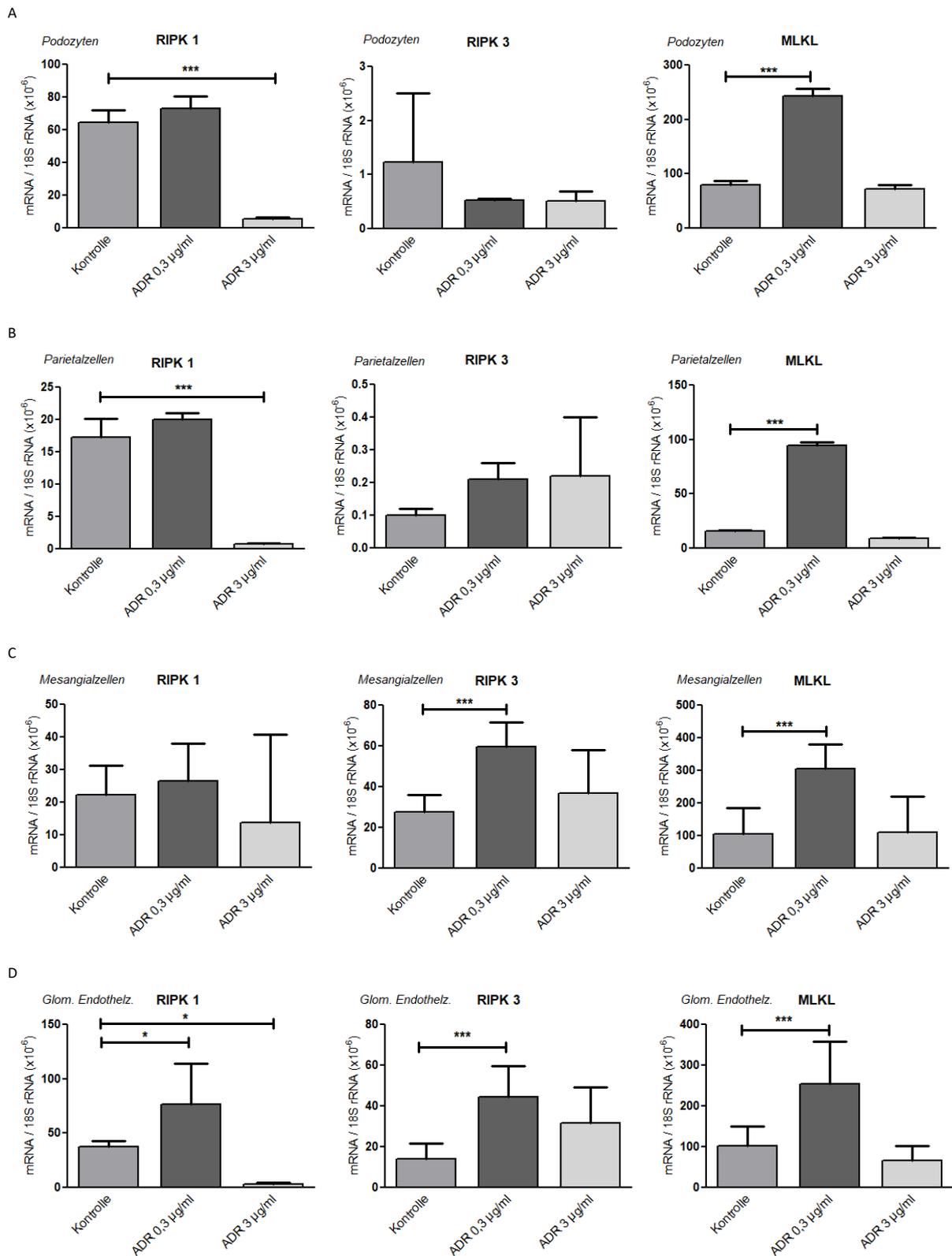


Abbildung 10: Expression von Nekroptose-Markern nach Stimulation mit ADR

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit jeweils zwei verschiedenen ADR-Konzentration (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) stimuliert. Für die quantitative Real-Time PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen (n≥3) dar. * p<0,05, *** p<0,001, ADR-Stimulation versus Kontrolle

Tabelle 4: Expression von Nekroptose-Markern nach Stimulation mit ADR

mRNA / 18S rRNA (x10 ⁻⁶)	RIPK 1	RIPK 3	MLKL
Podozyten (n=3)			
<i>Kontrolle</i>	64,6 ± 7,4	1,2 ± 1,3	79,3 ± 8,4
<i>ADR 0,3 µg/ml</i>	72,9 ± 7,4	0,5 ± 0,0	243,0 ± 14,3
<i>ADR 3 µg/ml</i>	5,4 ± 1,3	0,5 ± 0,2	71,5 ± 8,6
Parietalzellen (n=3)			
<i>Kontrolle</i>	17,2 ± 2,9	0,1 ± 0,0	15,7 ± 1,2
<i>ADR 0,3 µg/ml</i>	20,0 ± 1,0	0,2 ± 0,1	94,5 ± 3,4
<i>ADR 3 µg/ml</i>	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,2	8,8 ± 1,0
Mesangialzellen (n=8-9)			
<i>Kontrolle</i>	22,2 ± 9,1	27,6 ± 8,4	104,6 ± 79,8
<i>ADR 0,3 µg/ml</i>	26,6 ± 11,5	59,5 ± 12,2	305,1 ± 76,2
<i>ADR 3 µg/ml</i>	13,8 ± 27,1	36,9 ± 21,1	109,8 ± 110,2
Glomeruläre Endothelzellen (n=7-8)			
<i>Kontrolle</i>	37,5 ± 5,3	14,0 ± 7,5	103,2 ± 48,1
<i>ADR 0,3 µg/ml</i>	76,3 ± 38,1	44,5 ± 15,0	254,2 ± 104,7
<i>ADR 3 µg/ml</i>	3,0 ± 1,3	31,5 ± 17,5	66,9 ± 35,1

3.1.3 TNF-abhängige und –unabhängige Zelltodinduktion durch Adriamycin

TNF ist ein potenter Zelltod-Induktor. Um zu überprüfen, ob der durch Adriamycin induzierte Zelltod in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen über auto- oder parakrine Sekretion von TNF induziert wird, wurde eine TNF-Blockade mit Etanercept durchgeführt. Etanercept ist ein dimeres, lösliches Fusionsprotein des TNF-Rezeptors 2. Es bindet TNF und verhindert somit seine Interaktion mit TNF-Rezeptoren der Zellen. Dadurch wird TNF biologisch inaktiv [125].

Die Zellen wurden mit Adriamycin (0,3 und 3 µg/ml) und Etanercept (2 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle der Wirksamkeit von Etanercept wurde zusätzlich eine Stimulation mit denaturiertem Etanercept (Denaturierung für 30 min bei 90°C) vorgenommen.

Bei den Mesangialzellen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Stimulationen mit ADR bzw. ADR + denaturiertes Etanercept und ADR + Etanercept (Abb. 11, Tabelle 5), allerdings ergibt sich unter niedrigdosierter ADR-Exposition ein tendenziell reduzierter Zelltod bei TNF-Blockade. Bei den glomerulären Endothelzellen hingegen zeigt sich nach Inkubation mit ADR 0,3 µg/ml ein signifikant besseres Überleben unter TNF-Blockade mit Etanercept,

während denaturiertes TNF das Ausmaß des Zelltods nicht beeinflusste. Bei der höheren ADR-Konzentration ergeben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12, Tabelle 6), vereinbar mit dem Ablauf passiver oder nicht TNF-abhängiger, regulierter Zelltodmechanismen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der durch niedrige ADR-Konzentrationen induzierter Zelltod insbesondere in Endothelzellen, möglicherweise auch in Mesangialzellen zum Teil TNF-vermittelt abläuft.

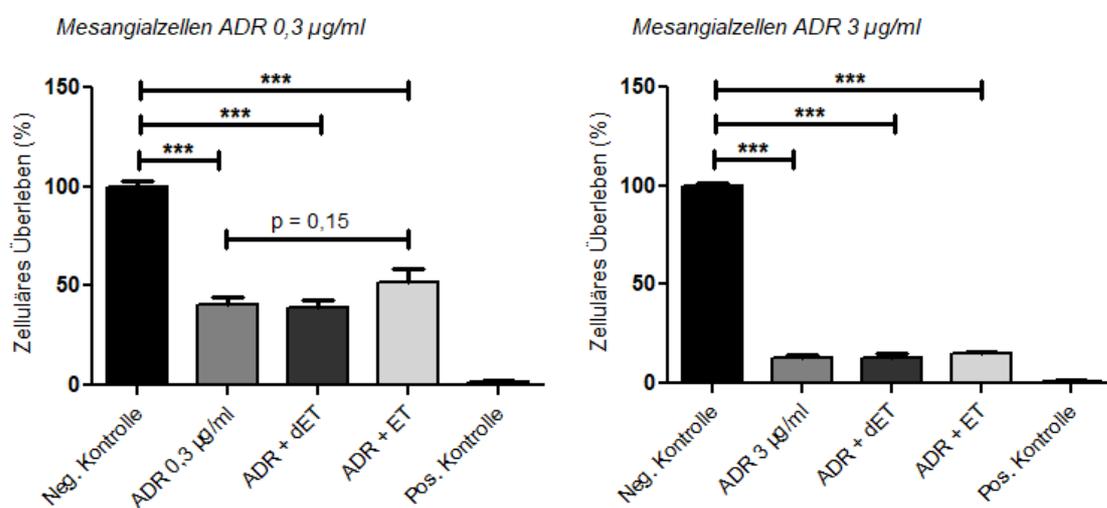


Abbildung 11: TNF-unabhängige Zelltodinduktion in Mesangialzellen durch Adriamycin

Mesangialzellen wurden *in vitro* mit jeweils zwei verschiedenen ADR-Konzentration (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) für 24 Stunden stimuliert. Zur Blockade von TNF wurde Etanercept in der Konzentration 2 µg/ml hinzugegeben. Die Zugabe von denaturiertem Etanercept diente als Kontrolle. Als negative Kontrolle diente Medium, als positive Kontrolle wurde Medium plus Triton X100 verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen (n≥3) dar. *** p<0,001, Kontrolle versus Stimulation, ADR versus ADR mit TNF-Blockade mit Etanercept

Tabelle 5: TNF-unabhängige Zelltod-Induktion in Mesangialzellen durch Adriamycin

(%)	Mesangialzellen + ADR 0,3 µg/ml (n=9)	Mesangialzellen + ADR 3 µg/ml (n=3)
Negativ-Kontrolle	100,0 ± 7,7	100,0 ± 2,5
ADR	40,3 ± 12,5	13,0 ± 1,9
ADR + dET	38,9 ± 11,2	12,9 ± 4,0
ADR + ET	51,9 ± 19,5	14,8 ± 1,8
Positiv-Kontrolle	1,9 ± 0,4	0,0 ± 0,0

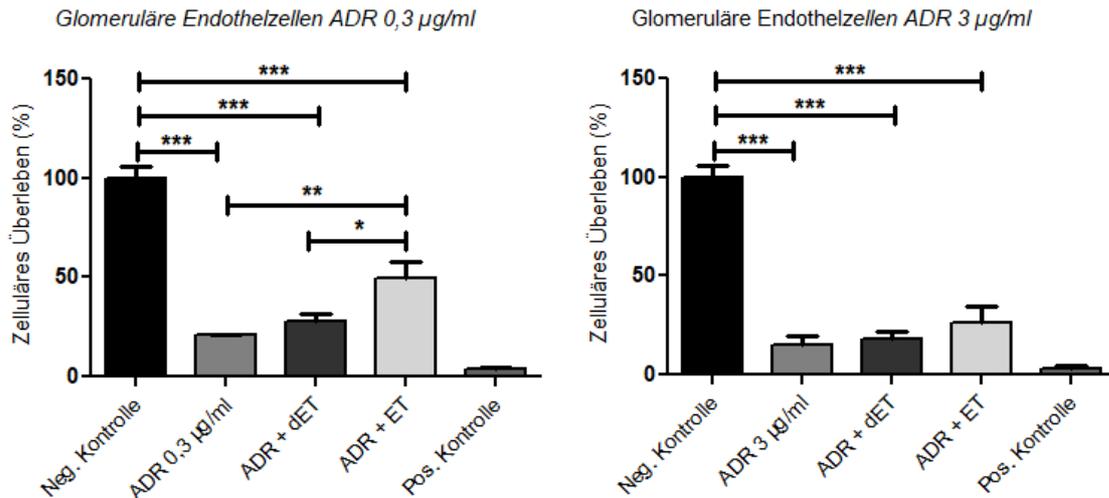


Abbildung 12: TNF-abhängige Zelltodinduktion in glomerulären Endothelzellen durch Adriamycin

Glomeruläre Endothelzellen wurden *in vitro* mit jeweils zwei verschiedenen ADR-Konzentration (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) für 24 Stunden stimuliert. Zur Blockade von TNF wurde Etanercept der Konzentration 2 µg/ml hinzugegeben. Die Zugabe von denaturiertem Etanercept diente als Kontrolle. Als negative Kontrolle diente Medium, als positive Kontrolle wurde Medium plus Triton X100 verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils sechs unterschiedlichen Ansätzen (n=6) dar. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, Kontrolle versus Stimulation, ADR versus ADR mit TNF-Blockade mit Etanercept, denaturiertes Etanercept versus Etanercept

Tabelle 6: TNF-abhängige Zelltod-Induktion in glomerulären Endothelzellen durch Adriamycin

(%)	Glomeruläre Endothelzellen + ADR 0,3 µg/ml (n=6)	Glomeruläre Endothelzellen + ADR 3 µg/ml (n=6)
Negativ-Kontrolle	100,0 ± 13,8	100,0 ± 15,1
ADR	20,8 ± 1,5	15,3 ± 10,2
ADR + dET	28,0 ± 8,5	17,8 ± 10,6
ADR + ET	49,9 ± 20,4	26,5 ± 19,7
Positiv-Kontrolle	3,8 ± 2,7	3,4 ± 2,4

3.2 Inflammation

Entzündliche Mechanismen spielen in der Pathogenese der FSGS eine Rolle. Es wird ein proinflammatorisches Milieu beschrieben, welches die Progression der Erkrankungen unterhält [46]. Inflammatorische Mediatoren, die zu diesem Entzündungsgeschehen beitragen sind bisher jedoch auch in Tiermodellen der FSGS wie der ADR-Nephropathie nur unzureichend charakterisiert. Sie könnten jedoch Ziele möglicher therapeutischer Strategien darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wie weit eine Adriamycin-Exposition eine Veränderung in der glomerulären Expression und Produktion der inflammatorischen Moleküle TNF, CCL2 und CCL5 bewirkt.

3.2.1 Die Wirkung von Adriamycin auf die Expression und Sekretion von TNF in glomerulären Zellen

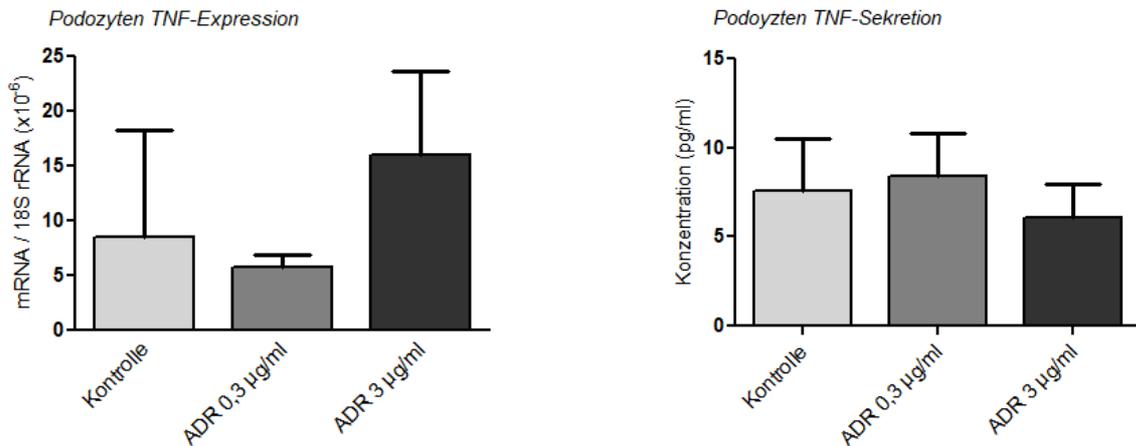
Zur Quantifizierung der TNF-Expression auf mRNA- und Proteinebene nach ADR-Stimulation wurden die vier unterschiedlichen Zelltypen für 24 Stunden mit ADR 0,3 µg/ml und ADR 3 µg/ml stimuliert. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben bearbeitet und der *Real-Time* PCR zugeführt. Der Überstand wurde mittels Elisa-Test untersucht.

Für Podozyten und Parietalzellen zeigte sich weder auf mRNA- noch auf Proteinebene ein signifikanter Anstieg der TNF-Expression und TNF-Sekretion (Abb. 14, Tabelle 7).

Mesangialzellen zeigen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene einen signifikanten Anstieg der TNF-Expression nach Stimulation mit ADR (Abb. 15A, Tabelle 7). Glomeruläre Endothelzellen zeigen ebenfalls einen signifikanten Anstieg auf mRNA-Ebene nach Exposition gegenüber der niedrigen ADR-Konzentration und auf mRNA- und Proteinebene nach Exposition gegenüber der höheren ADR-Konzentration (Abb. 15B, Tabelle 7).

Somit scheint ADR vor allem in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen direkt die Synthese und Sekretion von TNF zu induzieren.

A



B

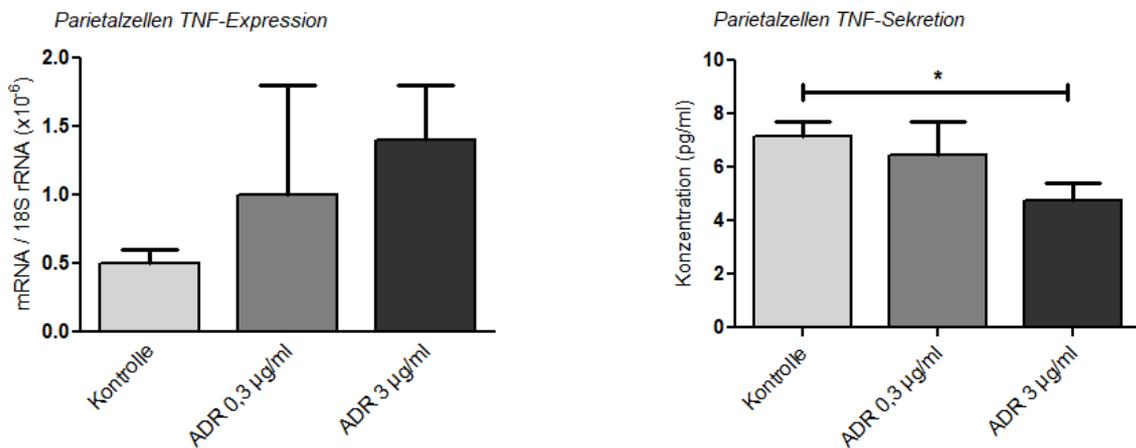
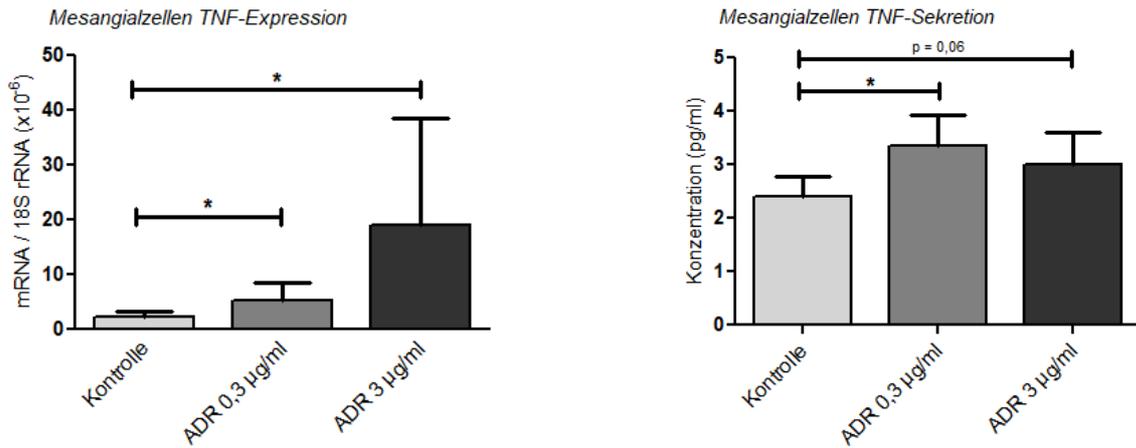


Abbildung 14: TNF-Expression und Sekretion in Podozyten und Parietalzellen

Podozyten (A) und Parietalzellen (B) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit zwei verschiedenen ADR-Konzentrationen (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Für den Elisa wurde der gewonnene Überstand untersucht. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen (n=3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p < 0,05, Kontrolle versus Stimulation

A



B

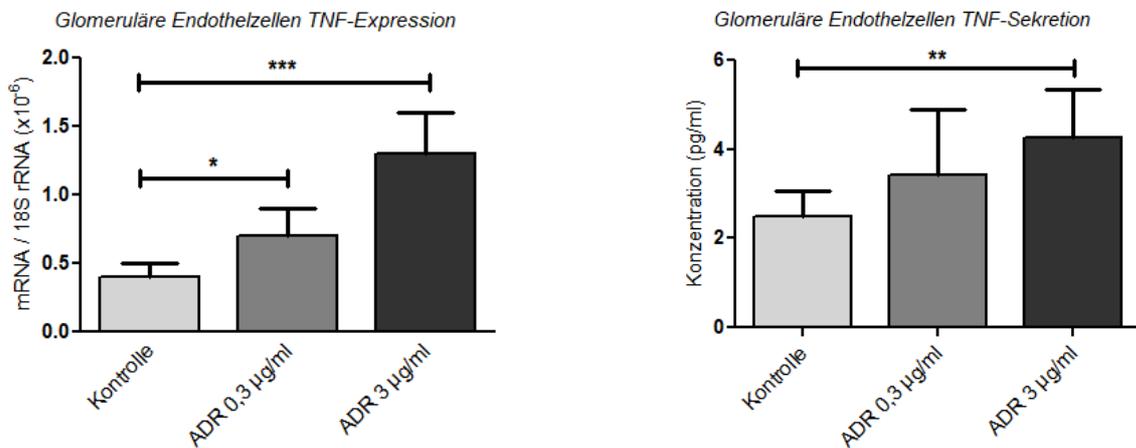


Abbildung 15: TNF-Expression und Sekretion in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen

Mesangialzellen (A) und glomeruläre Endothelzellen (B) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit zwei verschiedenen ADR-Konzentrationen (0,3 µg/ml und 3 µg/ml) stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Für den Elisa wurde der gewonnene Überstand untersucht. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens sechs unterschiedlichen Ansätzen (n≥6) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 7: TNF-Expression und Sekretion in glomerulären Zellen

	<i>TNF mRNA</i> mRNA / 18S rRNA ($\times 10^{-6}$)	<i>TNF-Konzentration</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Podozyten (n=3)		
<i>Kontrolle</i>	8,5 \pm 9,8	7,6 \pm 2,9
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$</i>	5,7 \pm 1,2	8,4 \pm 2,4
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$</i>	16,1 \pm 7,6	6,1 \pm 1,8
Parietalzellen (n=3)		
<i>Kontrolle</i>	0,5 \pm 0,1	7,1 \pm 0,6
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$</i>	1,0 \pm 0,8	6,5 \pm 1,2
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$</i>	1,4 \pm 0,4	4,8 \pm 0,6
Mesangialzellen		
<i>Kontrolle</i>	2,3 \pm 1,0 (n=8)	2,4 \pm 0,4 (n=6)
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (n=9)</i>	5,2 \pm 3,4	3,4 \pm 0,6
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$ (n=9)</i>	19,1 \pm 19,4	3,0 \pm 0,6
Glomeruläre Endothelzellen		
<i>Kontrolle (n=6)</i>	0,4 \pm 0,1	2,5 \pm 0,6
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (n=6)</i>	0,7 \pm 0,2	3,4 \pm 1,5
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$ (n=6)</i>	1,3 \pm 0,3	4,3 \pm 1,1

3.2.2 Die Wirkung von Adriamycin auf die Expression und Produktion von CCL2 und CCR2 in glomerulären Zellen

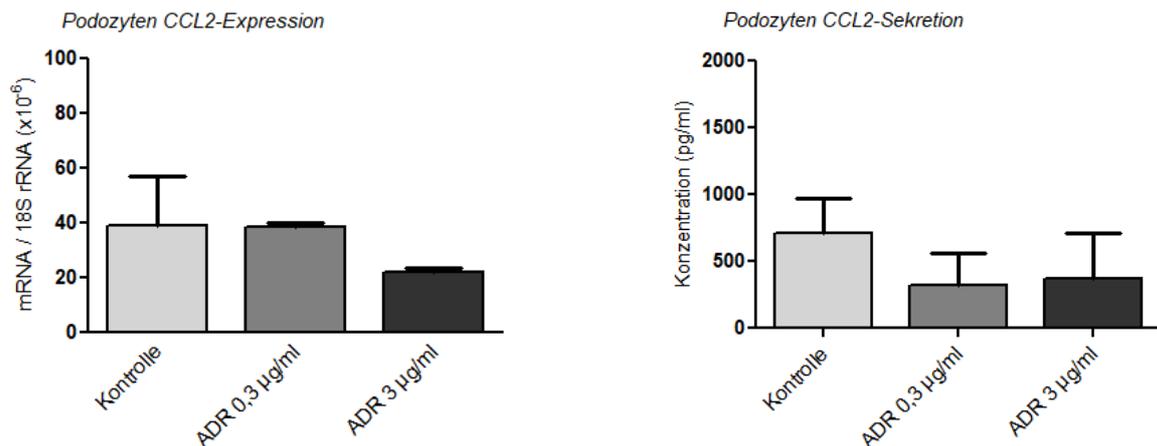
Um den Zusammenhang zwischen ADR-induziertem glomerulären Schaden und entzündlichen Prozessen bei der FSGS besser zu verstehen, wurde die Expression und Produktion des Chemokins CCL2 nach Stimulation der glomerulären Zellen mit ADR auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Eine mögliche Rolle von CCL2 und seines Rezeptors CCR2 bei der Vermittlung des glomerulären Schadens im Verlauf der FSGS wurde beschrieben [126]. Die vier Zelltypen wurden für 24 Stunden mit ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$ und ADR 3 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben verarbeitet und die gewonnene cDNA der quantitativen *Real-Time* PCR zugeführt. Der Überstand wurde mittels Elisa-Test untersucht.

Podozyten zeigen auf mRNA-Ebene keine vermehrte Expression von CCL2 nach Stimulation mit ADR. Gleiches stellte sich auf Proteinebene dar (Abb. 16A, Tabelle 8). Parietalzellen exprimieren durch Stimulation mit ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$ signifikant mehr CCL2-mRNA mit tendenziell verstärkter Sekretion auf Proteinebene (Abb. 16B, Tabelle 8).

In Mesangialzellen ist durch Stimulation mit ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$ signifikant mehr CCL2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Überstand nachweisbar (Abb. 17A, Tabelle 8).

Glomeruläre Endothelzellen exprimieren nach ADR-Inkubation mit 0,3 µg/ml mehr CCL2, allerdings konnte auf Proteinebene keine deutlich vermehrte CCL2-Sekretion im Überstand nachgewiesen werden (Abb. 17B, Tabelle 8).

A



B

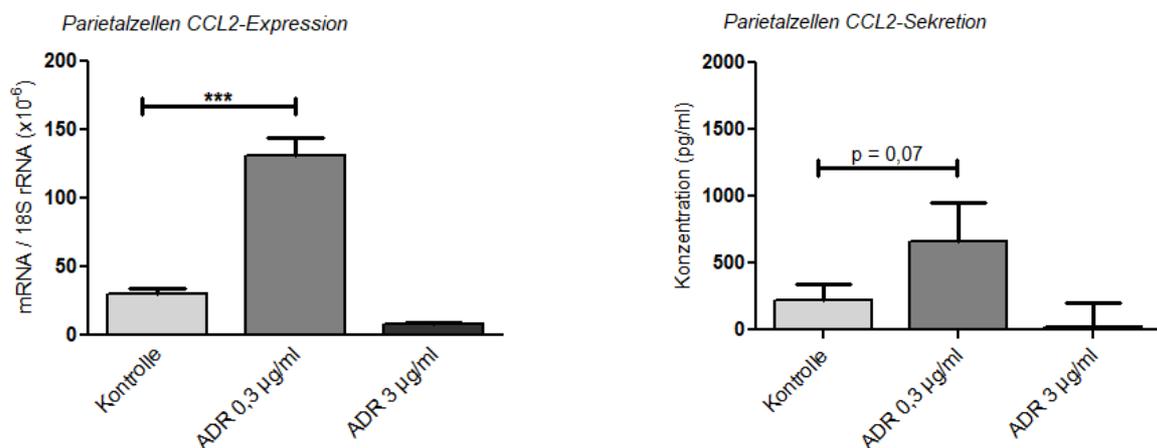
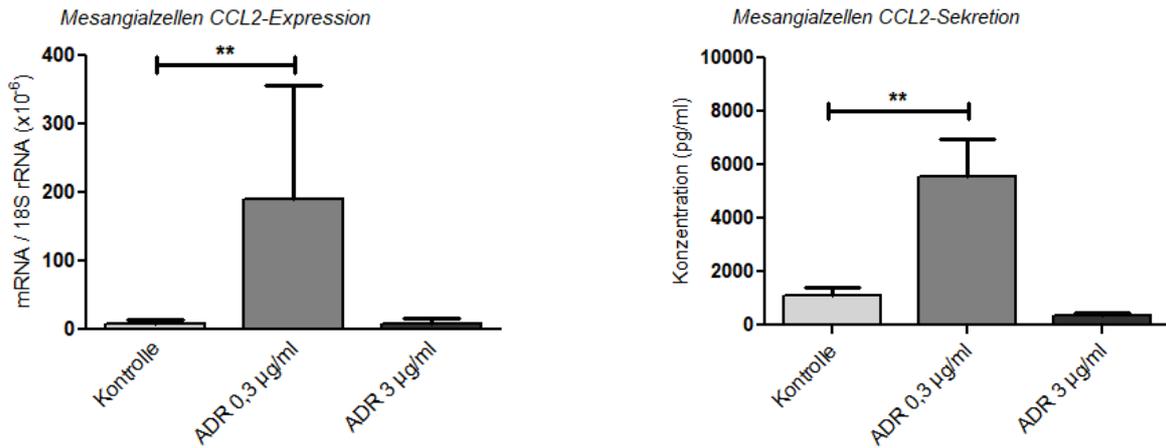


Abbildung 16: CCL2-Expression und Sekretion in Podozyten und Parietalzellen

Podozyten (A) und Parietalzellen (B) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Für den Elisa wurde der gewonnene Überstand untersucht. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen (n=3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. *** p<0,001, Kontrolle versus Stimulation

A



B

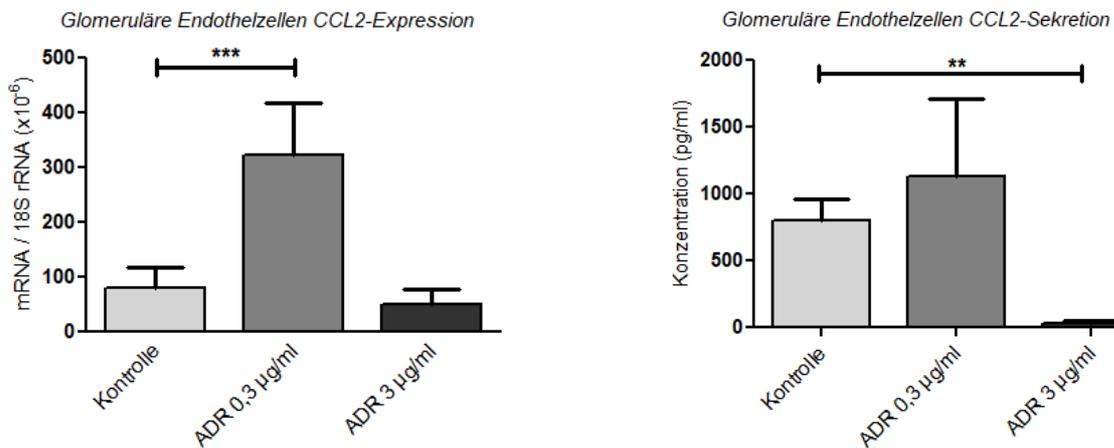


Abbildung 17: CCL2-Expression und Sekretion in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen

Mesangialzellen (A) und glomeruläre Endothelzellen (B) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Für den Elisa wurde der gewonnene Überstand untersucht. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens sechs unterschiedlichen Ansätzen ($n \geq 6$) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 8: CCL2-Expression und -Sekretion in glomerulären Zellen

	CCL2-mRNA mRNA / 18S rRNA ($\times 10^{-6}$)	CCL2-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)
Podozyten (n=3)		
<i>Kontrolle</i>	39,0 \pm 18,1	713,4 \pm 258,3
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$</i>	38,4 \pm 1,5	325,0 \pm 239,0
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$</i>	22,2 \pm 1,4	374,7 \pm 334,7
Parietalzellen (n=3)		
<i>Kontrolle</i>	30,3 \pm 3,7	219,0 \pm 120,7
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$</i>	130,7 \pm 13,6	663,0 \pm 283,8
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$</i>	8,1 \pm 0,8	0,0 \pm 185,0
Mesangialzellen (n=9)		
<i>Kontrolle</i>	9,2 \pm 1,4	1103,0 \pm 314,3
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$</i>	190,6 \pm 55,2	5564,0 \pm 1377,0
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$</i>	8,0 \pm 2,9	366,3 \pm 92,4
Glomeruläre Endothelzellen (n=6-8)		
<i>Kontrolle</i>	79,61 \pm 38,7	803,3 \pm 159,7
<i>ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$</i>	324,0 \pm 94,6	1133,0 \pm 579,4
<i>ADR 3 $\mu\text{g/ml}$</i>	49,4 \pm 28,1	35,7 \pm 13,6

Zur Charakterisierung möglicher glomerulärer Zielzellen, die durch lokal gebildetes CCL2 aktiviert werden, wurde die Expression des CCL2-Rezeptors CCR2 untersucht. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben stimuliert und der quantitativen *Real-Time* PCR zugeführt. Podozyten zeigen auf mRNA-Ebene keinen signifikanten Anstieg der CCR2-Expression (Abb. 18A, Tabelle 9). Bei den Parietalzellen steigt die Expression der CCR2-mRNA durch Stimulation mit ADR 3 $\mu\text{g/ml}$ signifikant an (Abb. 18B, Tabelle 9). Gleiches ist für Mesangialzellen nachweisbar (Abb. 18C, Tabelle 9). Auch in glomerulären Endothelzellen ergibt sich ein nicht signifikanter Trend zu einer verstärkten CCR2-Expression nach ADR-Exposition (Abb. 18D, Tabelle 9).

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass eine lokale glomeruläre Aktivierung des proinflammatorischen CCL2 / CCR2-Signalwegs durch ADR vor allem in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen, in geringem Maße auch in Parietalzellen zur Schädigung im Verlauf der ADR-induzierten FSGS beiträgt. In Podozyten scheint dieser Signalweg durch ADR direkt nicht induziert zu werden.

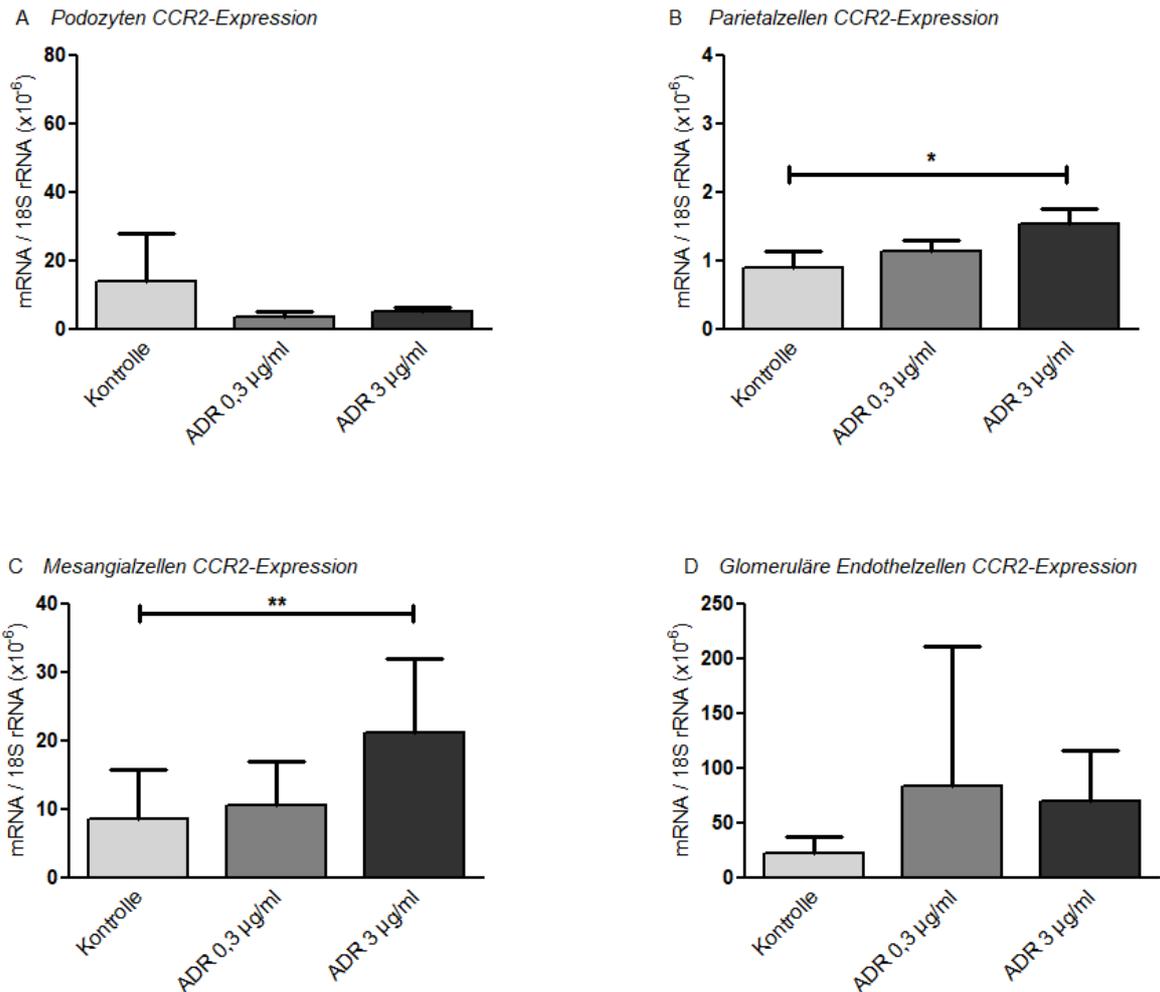


Abbildung 18: CCR2-Expression in renalen Zellen nach Stimulation mit ADR

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen (n≥3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p<0,05, ** p<0,01, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 9: CCR2-Expression in glomerulären Zellen

mRNA / 18S rRNA (x10 ⁻⁶)	Podozyten (n=3)	Parietalzellen (n=3)	Mesangialzellen (n=8-9)	Glom. Endothelzellen (n=8)
Kontrolle	14,1 ± 14,0	0,9 ± 0,2	8,6 ± 7,2	23,1 ± 14,5
ADR 0,3 µg/ml	3,5 ± 1,9	1,1 ± 0,1	10,6 ± 6,5	83,9 ± 127,7
ADR 3 µg/ml	5,2 ± 1,2	1,5 ± 0,2	21,3 ± 10,7	69,8 ± 46,2

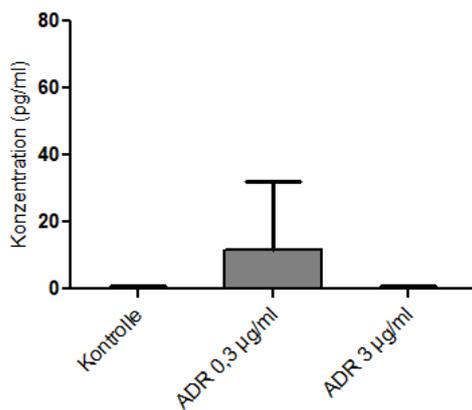
3.2.4 Die Wirkung von Adriamycin auf die Sekretion von CCL5 in glomerulären Zellen

CCL5 ist ein Chemokin der CC-Familie, welches unter anderem über den CC-Chemokinrezeptor 1 (CCR1) die Leukozyteninfiltration in entzündetes Gewebe stimuliert. In verschiedenen renalen Erkrankungen, unter anderem der FSGS, sind sowohl CCR1 als auch CCL5 vermehrt zu detektieren, wobei allerdings überwiegend die pathophysiologische Rolle ihrer tubulointerstitiellen Expression nachgewiesen wurde [127].

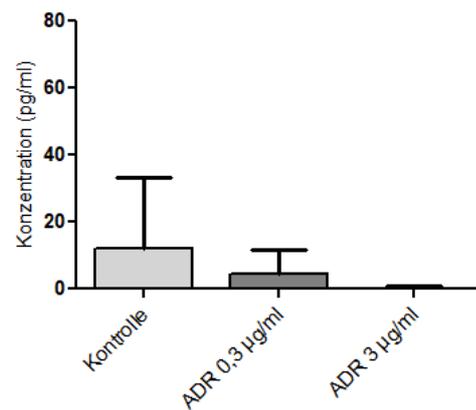
In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es durch Adriamycin zu einer direkten glomerulären Stimulation der CCL5-Produktion kommt. Podozyten, Parietalzellen, Mesangialzellen und glomeruläre Endothelzellen wurden dafür *in vitro* für 24 Stunden mit den beiden ADR-Konzentrationen 0,3 g/ml und 3 µg/ml stimuliert. Anschließend wurde der Überstand mittels Elisa-Test untersucht.

Alle vier glomerulären Zelltypen zeigen durch die Stimulation mit ADR keinen signifikanten Anstieg der CCL5-Sekretion, zum Teil sogar eine Verminderung (Abb. 19, Tabelle 10). Diese Daten sprechen gegen eine direkte ADR-vermittelte CCL5-Induktion in glomerulären Zellen.

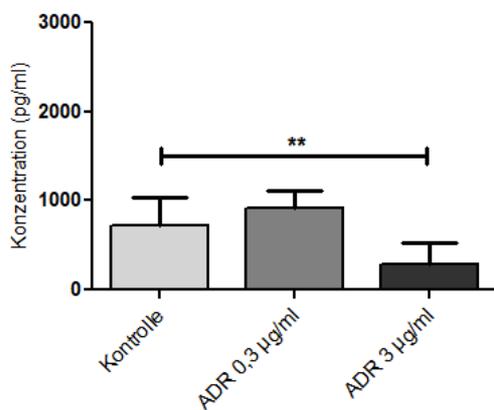
A Podozyten CCL5-Sekretion



B Parietalzellen CCL5-Sekretion



C Mesangialzellen CCL5-Sekretion



D Glomeruläre Endothelzellen CCL5-Sekretion

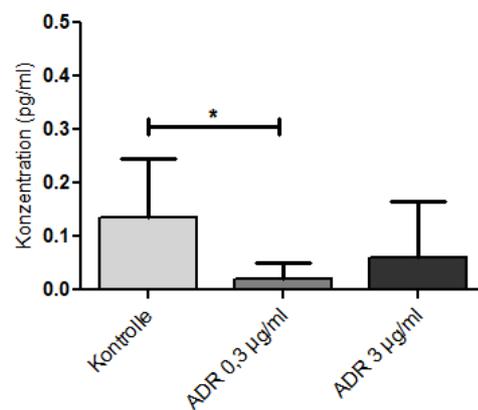


Abbildung 19: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit ADR

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR in den Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml stimuliert. Für den Elisa wurde der gewonnene Überstand untersucht. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen (n≥3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p<0,05, ** p<0,01, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 10: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen

(pg/ml)	Podozyten (n=3)	Parietalzellen (n=3)	Mesangialzellen (n=9)	Glom. Endothelzellen (n=8)
Kontrolle	0,0 ± 0,0	12,2 ± 21,1	720,1 ± 314,3	0,1 ± 0,1
ADR 0,3 µg/ml	11,8 ± 20,4	4,3 ± 7,4	912,9 ± 198,6	0,0 ± 0,0
ADR 3 µg/ml	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	281,4 ± 247,3	0,1 ± 0,1

3.2.5 Die Wirkung von TNF auf die Expression von inflammatorischen Markern in glomerulären Zellen

TNF wirkt wie bereits zuvor beschrieben als potenter Mediator von reguliertem Zelltod und Inflammation. Zur genaueren Beurteilung der Bedeutung von TNF als inflammatorischer Mediator in glomerulären Zellen wurden sowohl Podozyten, Parietalzellen, Mesangialzellen als auch glomeruläre Endothelzellen für 24 Stunden mit TNF der Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml stimuliert. Wie bereits bei der Adriamycin-Stimulation wurden die Zellen für die quantitative *Real-Time* PCR verarbeitet und der Überstand für Elisa-Auswertungen verwendet.

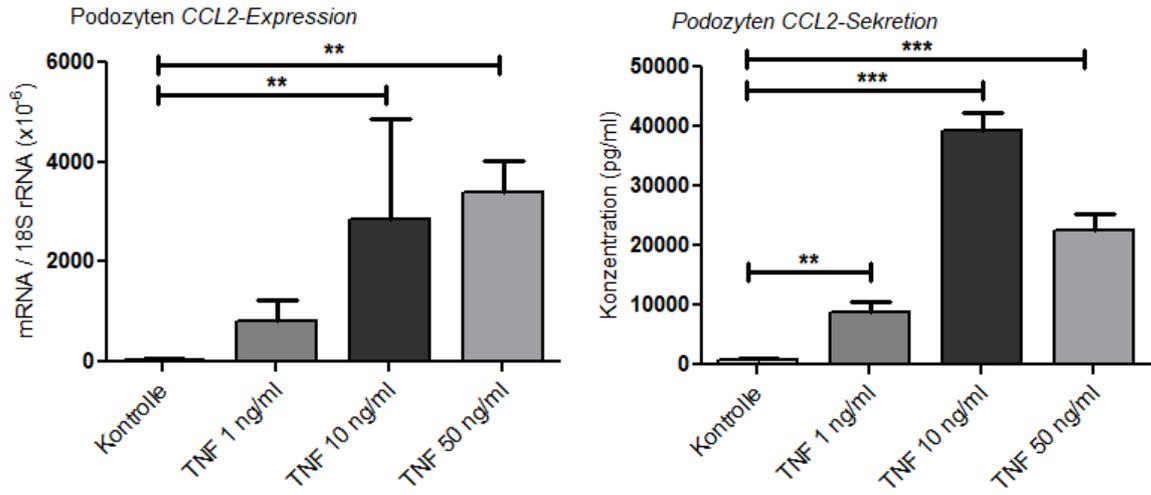
Als inflammatorische Marker wurden die Expression des Chemokins CCL2 und seines Rezeptor CCR2 sowie des Chemokins CCL5 nach TNF-Stimulation untersucht.

Alle vier Zelltypen zeigen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene dosisabhängig einen signifikanten CCL2-Anstieg durch Stimulation mit TNF (Abb. 20, Tabelle 11). Dagegen führte die TNF-Stimulation im Gegensatz zur ADR-Exposition zu keiner Induktion des CCL2-Rezeptors CCR2. Alle vier Zellreihen zeigen keinen Anstieg der CCR2-mRNA-Expression. TNF führt somit in allen vier unterschiedlichen glomerulären Zelltypen zur Induktion von CCL2, nicht jedoch seines Rezeptors CCR2 (Abb. 21, Tabelle 12).

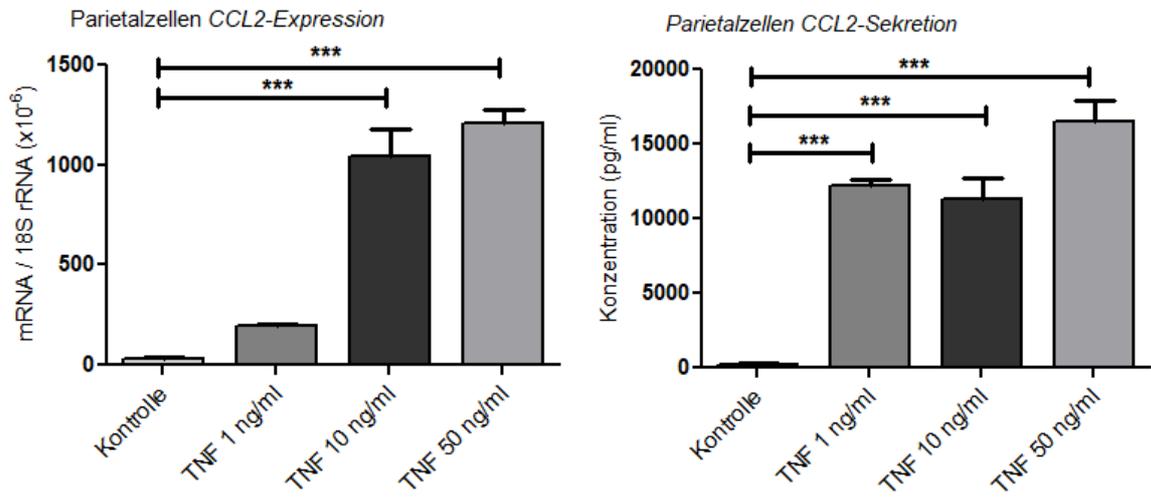
Die veränderte Ausschüttung des Chemokins CCL5 nach Stimulation mit TNF wurde auf Proteinebene untersucht. Alle vier Zelllinien zeigen nach TNF-Stimulation dosisabhängig einen signifikanten Anstieg der CCL5-Sekretion (Abb. 22, Tabelle 13).

Diese Daten zeigen, dass im Verlauf der ADR-Nephropathie glomerulär gebildetes TNF in allen glomerulären Zelltypen die Sekretion der proinflammatorischen Chemokine CCL2 und CCL5 induzieren kann. Im Gegensatz zu ADR führt TNF jedoch nicht zu einer verstärkten Expression des CCL2-Rezeptors CCR2.

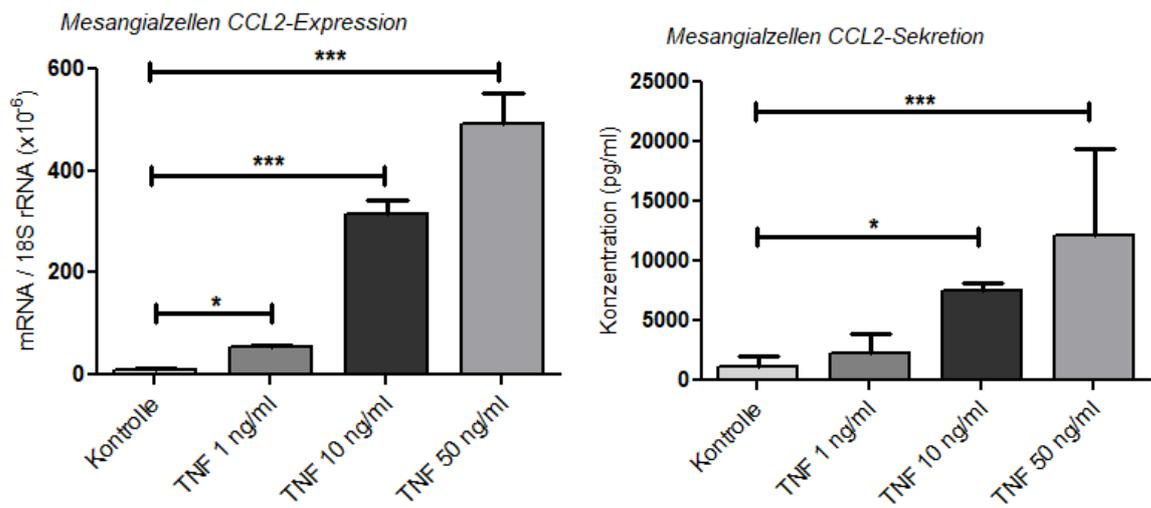
A



B



C



D

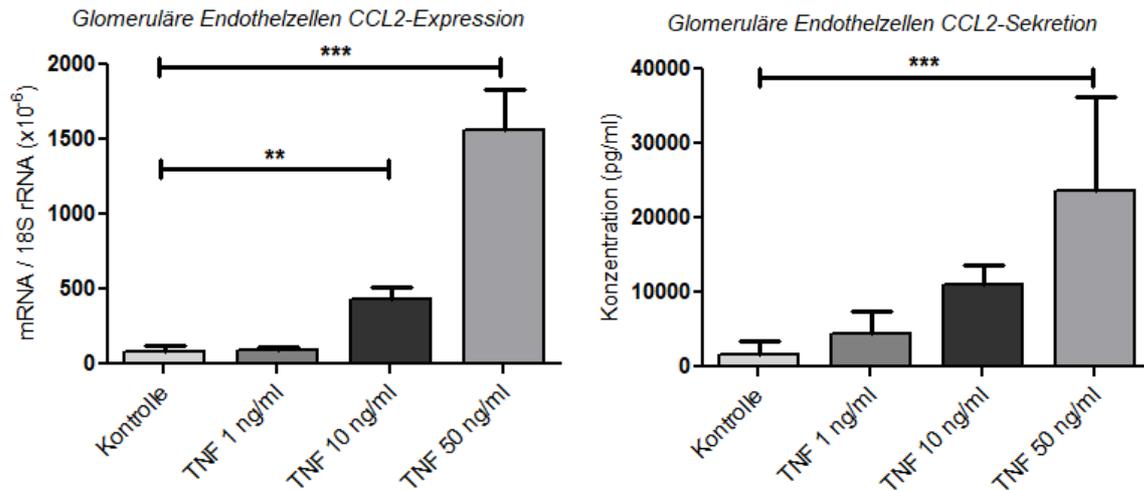


Abbildung 20: CCL2-Expression und Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit 3 verschiedenen TNF-Konzentrationen stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Für den Elisa wurde der gewonnene Überstand untersucht. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen ($n \geq 3$) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 11: CCL2-Expression und -Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF

	CCL2-mRNA (mRNA / 18S rRNA 10^{-6})	CCL2-Konzentration (pg/ml)
Podozyten (n=3)		
Kontrolle	39,0 ± 18,1	713,4 ± 258,3
TNF 1 ng/ml	822,8 ± 412,3	8796,7 ± 1843,0
TNF 10 ng/ml	2863,0 ± 1988,0	39400,2 ± 2945,0
TNF 50 ng/ml	3392,0 ± 638,7	22655,5 ± 2732,0
Parietalzellen (n=3)		
Kontrolle	30,3 ± 3,7	219,03 ± 120,7
TNF 1 ng/ml	193,3 ± 11,6	12234,9 ± 426,9
TNF 10 ng/ml	1044,0 ± 132,8	11346,9 ± 1343,0
TNF 50 ng/ml	1208,0 ± 66,2	16535,4 ± 1412,0
Mesangialzellen (n=3-9)		
Kontrolle	9,2 ± 4,3	1103,0 ± 942,8
TNF 1 ng/ml	54,2 ± 4,9	2285,0 ± 1661,0
TNF 10 ng/ml	316,9 ± 26,0	7554,0 ± 530,9
TNF 50 ng/ml	491,9 ± 59,4	12191,0 ± 7224,0
Glom. Endothelzellen (n=4-8)		
Kontrolle	79,6 ± 38,7	1701,0 ± 1712,0
TNF 1 ng/ml	87,4 ± 22,5	4426,0 ± 3018,0
TNF 10 ng/ml	430,1 ± 78,8	10961,0 ± 2657,0
TNF 50 ng/ml	1557,0 ± 279,1	23715,0 ± 12588,0

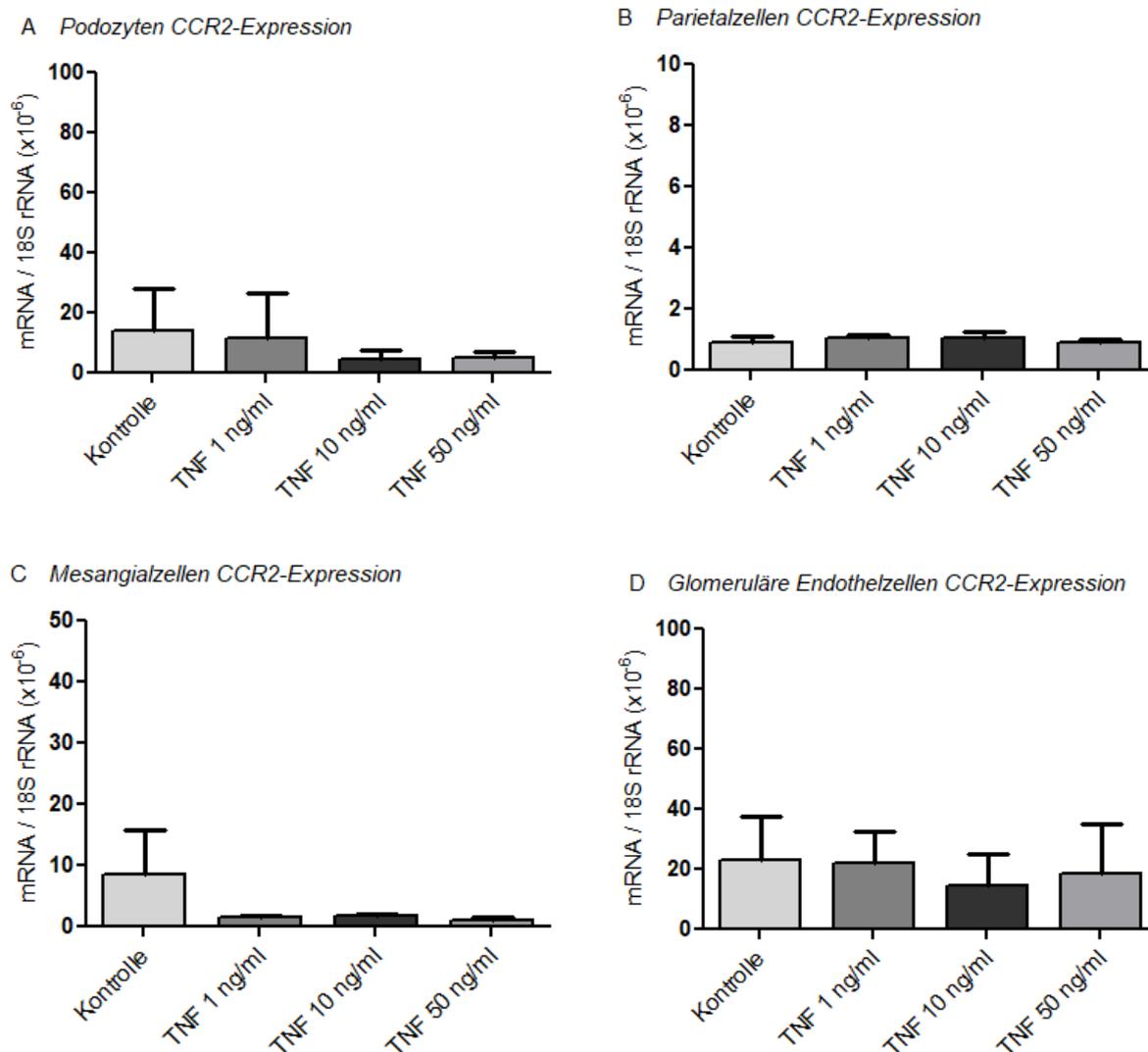


Abbildung 21: CCR2-Expression in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit 3 verschiedenen TNF-Konzentrationen stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen ($n \geq 3$) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation.

Tabelle 12: CCR2-Expression in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF

(mRNA / 18S rRNA 10 ⁻⁶)	Podozyten (n=3)	Parietalzellen (n=3)	Mesangialzellen (n=3-8)	Glom. Endothelzellen (n=4-8)
Kontrolle	14,1 ± 14,0	0,9 ± 0,2	8,6 ± 7,2	23,1 ± 14,5
TNF 1 ng/ml	11,5 ± 14,9	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,3	21,9 ± 10,9
TNF 10 ng/ml	4,5 ± 3,0	1,1 ± 0,2	1,8 ± 0,4	14,8 ± 10,4
TNF 50 ng/ml	5,3 ± 1,8	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,3	18,8 ± 16,2

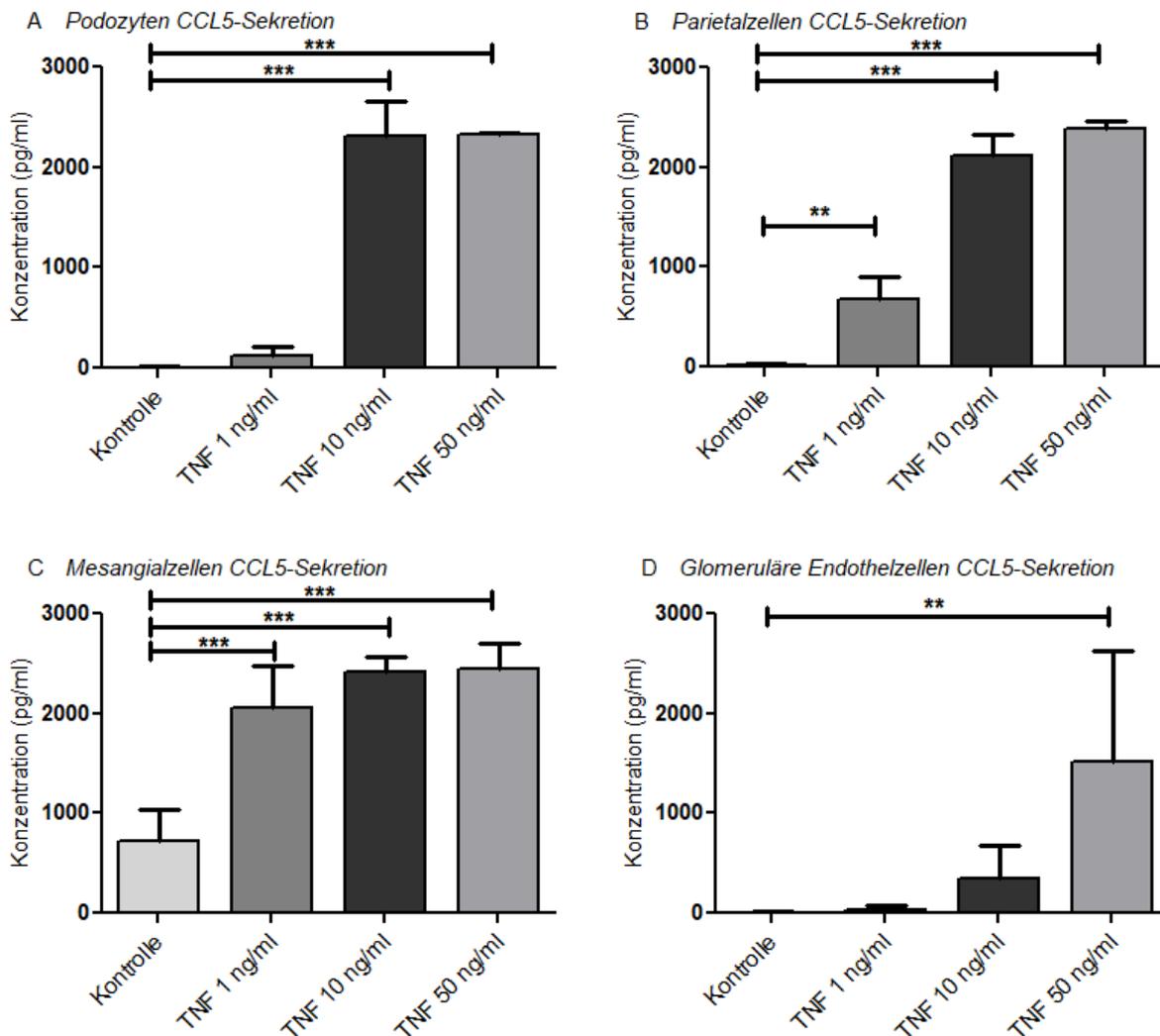


Abbildung 22: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF

Podozyten (A), Parietalzellen (B), Mesangialzellen (C) und glomeruläre Endothelzellen (D) wurden *in vitro* für 24 Stunden mit 3 verschiedenen TNF-Konzentrationen stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Für den Elisa wurde der gewonnene Überstand hergenommen. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen ($n \geq 3$) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 13: CCL5-Sekretion in glomerulären Zellen nach Stimulation mit TNF

(pg/ml)	Podozyten (n=3)	Parietalzellen (n=3)	Mesangialzellen (n=3-9)	Glom. Endothelzellen (n=4-8)
Kontrolle	0,0 ± 0,0	12,2 ± 21,1	720,1 ± 314,3	0,1 ± 0,1
TNF 1 ng/ml	124,1 ± 91,7	684,1 ± 271,0	2046,0 ± 423,1	33,7 ± 46,0
TNF 10 ng/ml	2310,8 ± 340,8	2123,6 ± 199,5	2412,0 ± 162,9	350,3 ± 324,1
TNF 50 ng/ml	2329,6 ± 10,5	2387,8 ± 70,6	2449,0 ± 257,9	1514,0 ± 1119,9

3.3 Fibrose

Ein wesentliches Kennzeichen der FSGS ist die Fibrosierung im Glomerulus [128]. Kollagen 1 und 4 sowie Laminin und Fibronectin sind wichtige Bestandteile der Extrazellulärmatrix im Glomerulus [1]. Eine vermehrte Expression dieser Moleküle geht mit einer Zunahme der Extrazellulärmatrix und somit einer fortschreitenden glomerulären Fibrosierung einher.

3.3.1 Fibroseinduktion in glomerulären Zellen durch Adriamycin und TNF

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in wie weit ADR direkt die Expression der vier oben genannten Matrixmoleküle in den vier verschiedenen glomerulären Zelltypen auf mRNA-Ebene beeinflusst. Des Weiteren wurde untersucht, ob TNF-Stimulation eine verstärkte Expression von Fibrosemarkern induziert. Die Zellen wurden hierfür *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml und TNF der Konzentrationen 1, 10 und 50 ng/ml inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen abgelöst. mRNA wurde extrahiert, umgeschrieben und als cDNA der quantitativen *Real-Time* PCR zugeführt.

Podozyten (Abb. 23, Tabelle 14) und Parietalzellen (Abb. 24, Tabelle 14) zeigen nach Inkubation mit Adriamycin keine signifikant gesteigerte Expression von Pro-Kollagen 1, Pro-Kollagen 4 und Fibronectin. Eine TNF-Stimulation führt ebenfalls nicht zur Expressionsvermehrung. Die Expression von Laminin in beiden Zelllinien wird durch Stimulation mit ADR 0,3 µg/ml signifikant erhöht, ein Anstieg durch TNF ist nicht nachweisbar (Abb. 23D, 24D, Tabelle 14). Dagegen wird durch TNF-Stimulation, nicht jedoch durch ADR-Stimulation die Expression der Matrixmetalloprotease 9 (MMP9) sowohl in Parietalzellen, als auch in Podozyten induziert (Abb. 25B, 25D, Tabelle 15). Die Matrixmetalloprotease 2 (MMP2) - Expression hingegen wird weder durch ADR noch TNF gesteigert (Abb. 25A, 25C, Tabelle 15). MMPs sind für die Degradierung und den Umbau von Matrixmolekülen verantwortlich [129] und werden im Rahmen von fortschreitender Fibrose über unterschiedliche Signalwege vermehrt aktiviert [130].

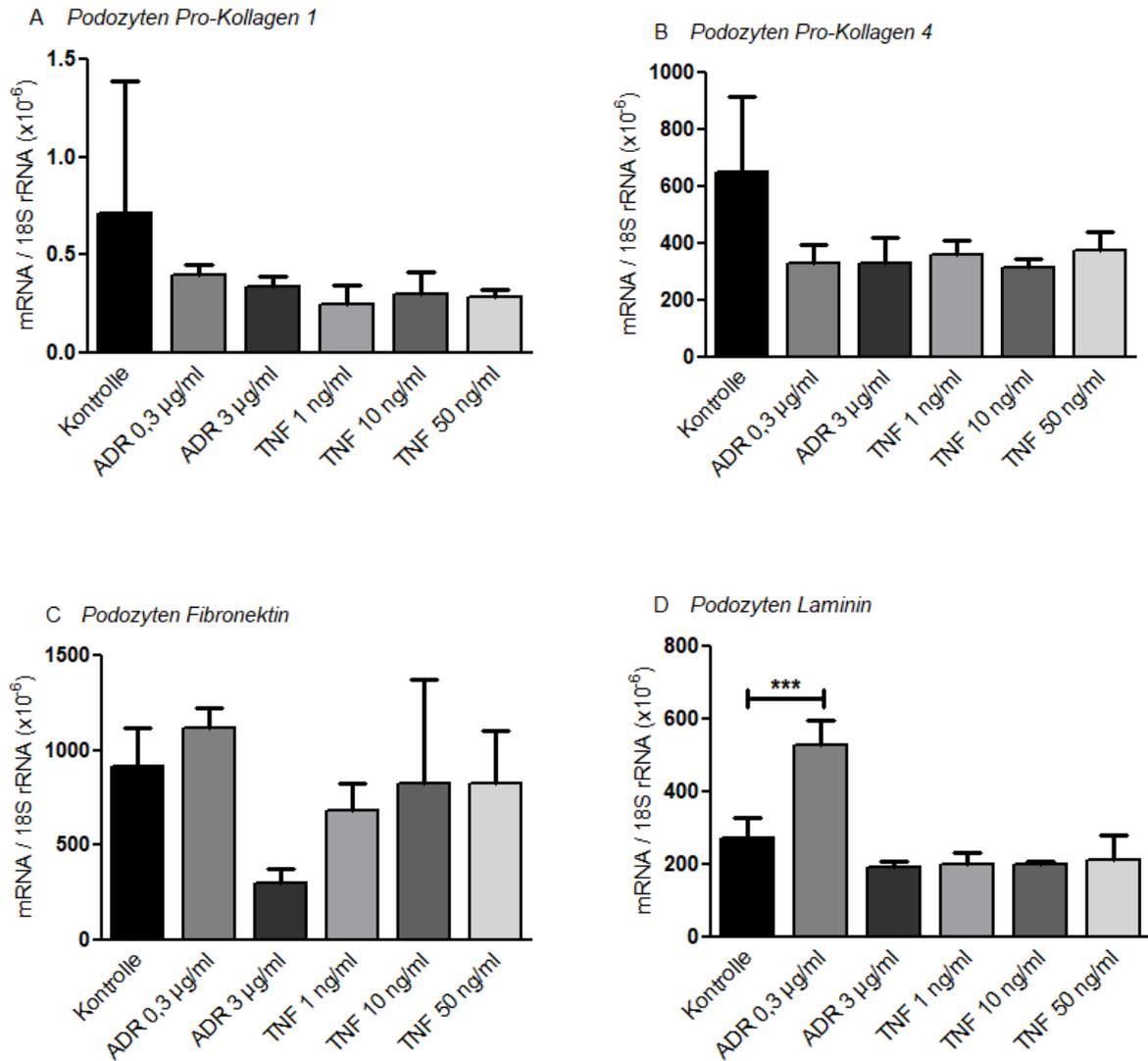


Abbildung 23: Expression von Fibrosemarkern in Podozyten nach Stimulation mit Adriamycin und TNF

Podozyten wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml sowie TNF der Konzentrationen 1, 10 und 50 ng/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen (n=3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. *** p<0,001, Kontrolle versus Stimulation

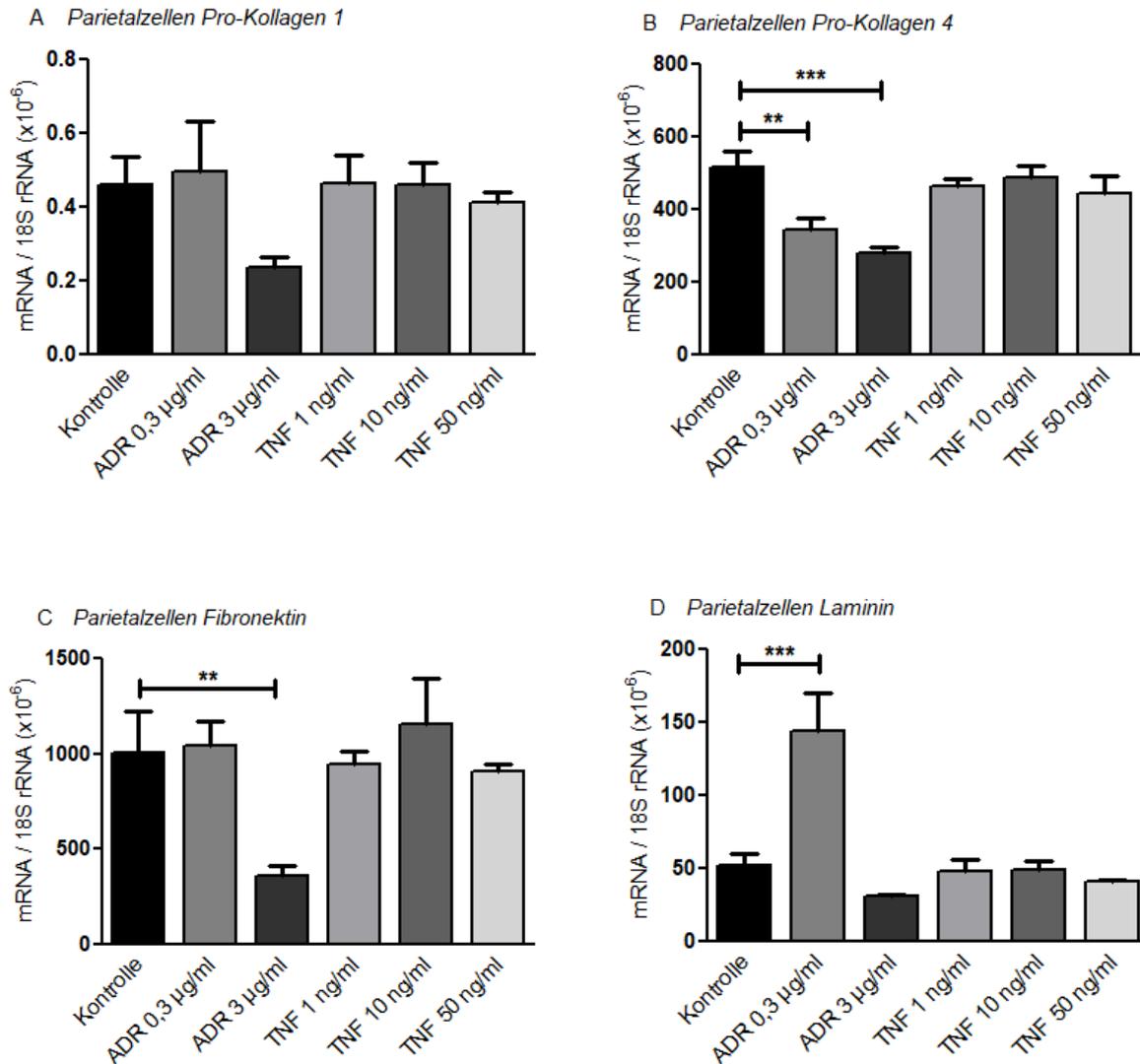


Abbildung 24: Expression von Fibrosemarkern in Parietalzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF

Parietalzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml sowie TNF der Konzentrationen 1, 10 und 50 ng/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen (n=3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. ** p<0,01, *** p<0,001, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 14: Expression von Fibrosemarkern in Podozyten und Parietalzellen nach Stimulation mit ADR und TNF

(mRNA / 18S rRNA 10⁻⁶)	Pro-Kollagen 1	Pro-Kollagen 4	Fibronektin	Laminin
Podozyten (n=3)				
<i>Kontrolle</i>	0,7 ± 0,7	651,6 ± 26,5	919,1 ± 19,7	274,0 ± 54,7
<i>ADR 0,3 µg/ml</i>	0,4 ± 0,1	329,0 ± 6,9	1117,5 ± 10,9	529,4 ± 69,1
<i>ADR 3 µg/ml</i>	0,3 ± 0,1	330,3 ± 8,9	299,9 ± 7,6	191,7 ± 18,1
<i>TNF 1 ng/ml</i>	0,3 ± 0,1	360,9 ± 48,4	685,8 ± 140,3	199,8 ± 31,0
<i>TNF 10 ng/ml</i>	0,3 ± 0,1	315,8 ± 30,1	823,8 ± 550,9	201,0 ± 8,1
<i>TNF 50 ng/ml</i>	0,3 ± 0,0	375,9 ± 62,5	910,6 ± 36,7	213,0 ± 68,0
Parietalzellen (n=3)				
<i>Kontrolle</i>	0,5 ± 0,1	516,2 ± 52,7	1004,8 ± 220,9	51,9 ± 8,6
<i>ADR 0,3 µg/ml</i>	0,5 ± 0,1	344,6 ± 31,6	1045,6 ± 123,3	143,8 ± 26,0
<i>ADR 3 µg/ml</i>	0,2 ± 0,0	282,0 ± 15,1	363,2 ± 53,0	30,9 ± 1,6
<i>TNF 1 ng/ml</i>	0,5 ± 0,1	463,9 ± 21,8	944,1 ± 73,1	48,3 ± 7,6
<i>TNF 10 ng/ml</i>	0,5 ± 0,1	490,7 ± 32,0	1159,0 ± 234,8	49,6 ± 5,8
<i>TNF 50 ng/ml</i>	0,4 ± 0,0	444,2 ± 47,1	910,6 ± 36,7	41,5 ± 0,7

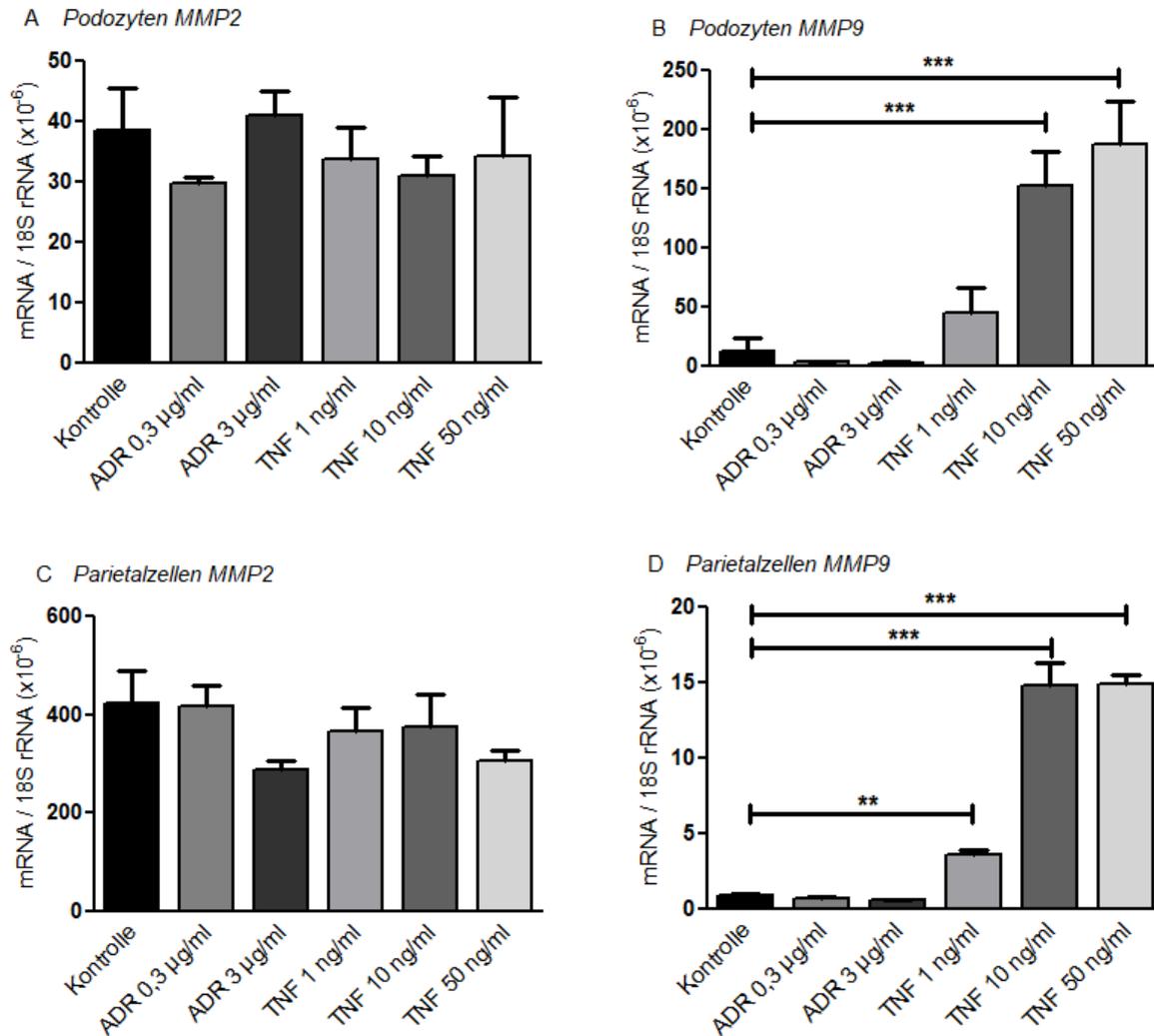


Abbildung 25: Expression von Matrixmetalloproteinase 2 und 9 in Podozyten und Parietalzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF

Podozyten und Parietalzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml sowie TNF der Konzentrationen 1, 10 und 50 ng/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen (n=3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. ** p < 0,01; *** p < 0,001, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 15: Expression von Matrixmetalloproteinasen in Podozyten und Parietalzellen nach Stimulation mit ADR und TNF

(mRNA / 18S rRNA 10 ⁻⁶)	Podozyten (n=3)		Parietalzellen (n=3)	
	MMP2	MMP9	MMP2	MMP9
Kontrolle	38,4 ± 7,0	12,9 ± 10,9	422,0 ± 66,5	0,9 ± 0,1
ADR 0,3 µg/ml	29,8 ± 1,1	3,7 ± 0,6	418,2 ± 41,6	0,7 ± 0,1
ADR 3 µg/ml	41,0 ± 4,0	3,1 ± 1,4	287,5 ± 20,2	0,6 ± 0,0
TNF 1 ng/ml	33,8 ± 5,3	45,4 ± 21,4	367,2 ± 48,7	3,6 ± 0,3
TNF 10 ng/ml	30,9 ± 3,3	152,8 ± 29,0	376,7 ± 66,1	14,8 ± 1,5
TNF 50 ng/ml	34,3 ± 9,6	188,3 ± 36,2	305,3 ± 21,8	14,9 ± 0,6

Mesangialzellen zeigen nach Inkubation mit ADR 0,3 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikant höhere Expression von Pro-Kollagen 1, Pro-Kollagen 4, Fibronectin und Laminin. Nach TNF-Stimulation lässt sich eine solche Expressionsvermehrung nicht nachweisen (Abb. 27, Tabelle 16). Des Weiteren ist in Mesangialzellen die Expression von MMP2 und MMP9 durch ADR nicht signifikant induzierbar (Abb. 27, Tabelle 17). Die Inhibitoren der MMPs TIMP-1 und TIMP-2 werden dagegen nach Stimulation mit ADR vermehrt in Mesangialzellen exprimiert (Abb. 28, Tabelle 17).

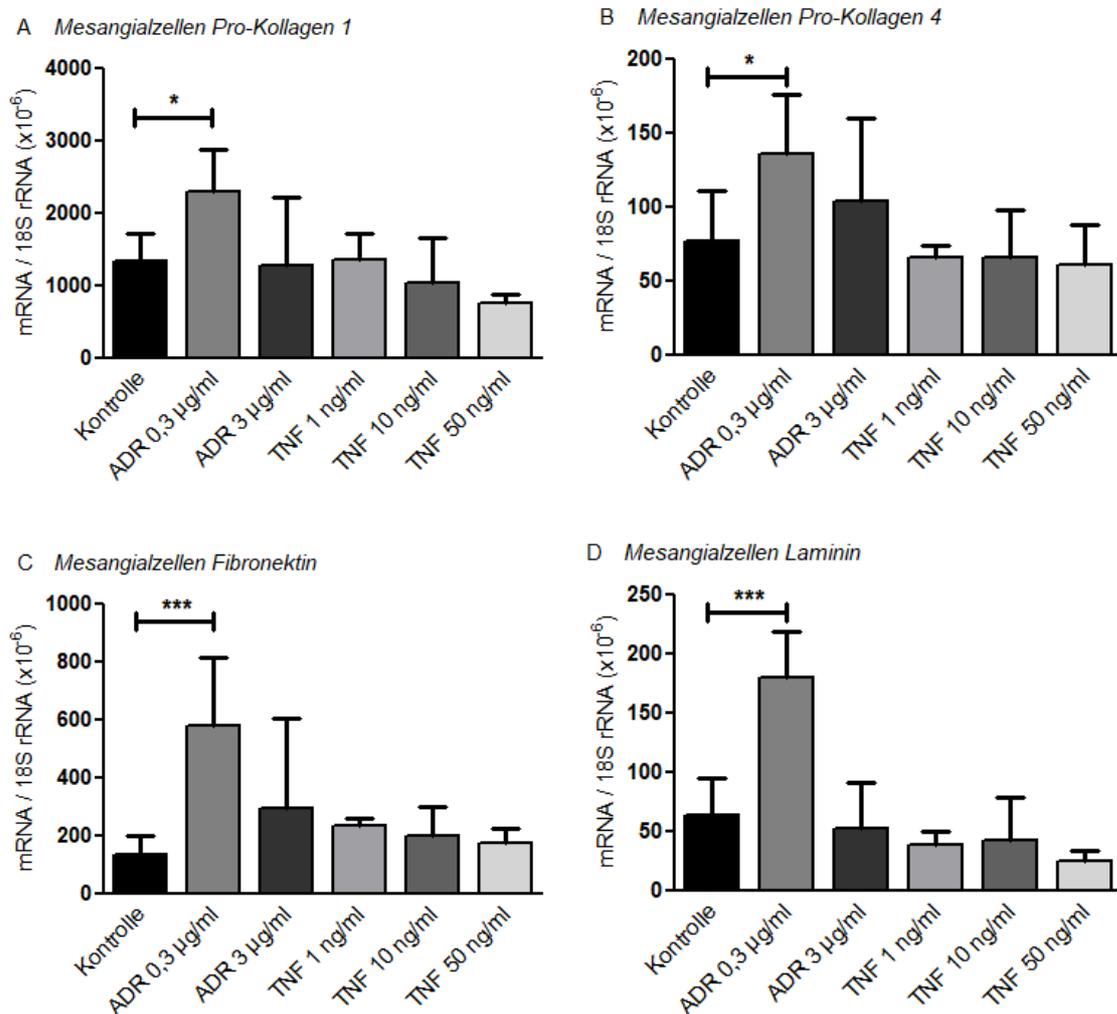


Abbildung 26: Expression von Fibrosemarkern in Mesangialzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF

Mesangialzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 $\mu\text{g/ml}$ und 3 $\mu\text{g/ml}$ sowie TNF der Konzentrationen 1, 10 und 50 ng/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen ($n \geq 3$) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 16: Expression von Fibrosemarkern in Mesangialzellen nach Stimulation mit ADR und TNF

(mRNA / 18S rRNA 10⁻⁶)	<i>Pro-Kollagen 1</i>	<i>Pro-Kollagen 4</i>	<i>Fibronektin</i>	<i>Laminin</i>
<i>Kontrolle (n=9)</i>	1343,0 ± 383,4	77,2 ± 33,6	137,2 ± 63,5	64,4 ± 30,6
<i>ADR 0,3 µg/ml (n=9)</i>	2308,0 ± 578,4	135,9 ± 39,9	582,6 ± 231,8	180,7 ± 38,1
<i>ADR 3 µg/ml (n=9)</i>	1280,0 ± 938,7	103,8 ± 56,1	293,7 ± 311,1	52,5 ± 38,4
<i>TNF 1 ng/ml (n=3)</i>	1373,0 ± 343,6	66,5 ± 7,7	238,3 ± 20,3	39,1 ± 10,8
<i>TNF 10 ng/ml (n=3)</i>	1037,0 ± 621,4	66,5 ± 31,3	203,3 ± 98,1	42,1 ± 37,0
<i>TNF 50 ng/ml (n=3)</i>	772,6 ± 103,4	61,2 ± 26,9	174,6 ± 51,0	25,2 ± 9,3

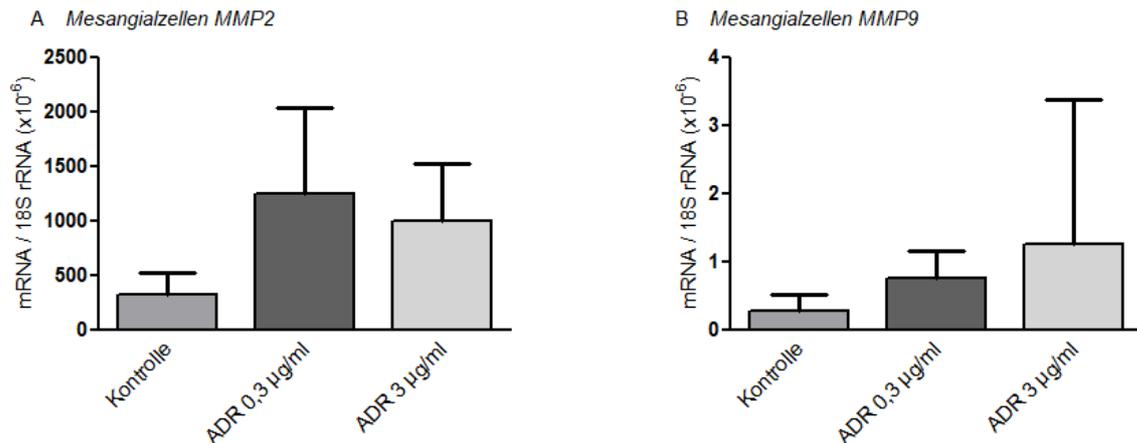


Abbildung 27: Expression von Matrixmetalloproteinasen in Mesangialzellen nach Stimulation mit Adriamycin

Mesangialzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils neun unterschiedlichen Ansätzen (n=9) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p<0,05, Kontrolle versus Stimulation

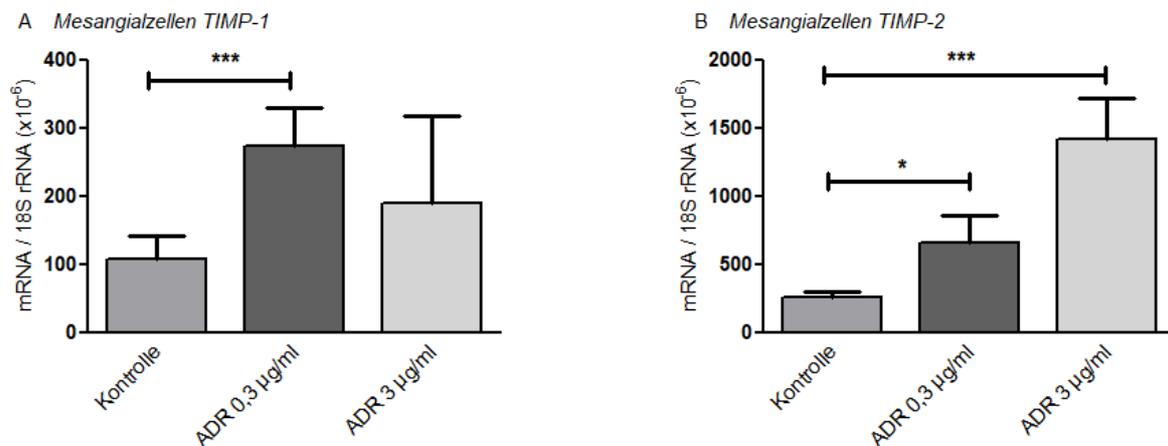


Abbildung 28: Expression von Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen in Mesangialzellen nach Stimulation mit Adriamycin

Mesangialzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils neun unterschiedlichen Ansätzen (n=9) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p<0,05, *** p<0,001 Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 17: Expression von Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren in Mesangialzellen nach Stimulation mit ADR

(mRNA / 18S rRNA 10 ⁻⁶)	MMP2 (n=9)	MMP 9 (n=9)	TIMP-1 (n=9)	TIMP-2 (n=3)
Kontrolle	327,6 ± 202,6	0,3 ± 0,2	10,8 ± 33,8	258,4 ± 45,0
ADR 0,3 µg/ml	1246,0 ± 799,6	0,7 ± 0,4	275,0 ± 55,0	662,9 ± 196,9
ADR 3 µg/ml	1005,0 ± 517,6	1,3 ± 2,1	190,6 ± 127,5	1419,0 ± 298,6

Glomeruläre Endothelzellen exprimieren nach Stimulation mit ADR 0,3 µg/ml signifikant mehr Fibronectin und Laminin, die Expression von Kollagenen hingegen wird nicht induziert, bzw. sinkt nach Stimulation mit ADR 3 µg/ml signifikant ab. Da vorher bereits gezeigt werden konnte, dass ADR in hoher Konzentration zu einem deutlichen Absterben der glomerulären Endothelzellen führt, ist die verminderte Expression möglicherweise Folge dieser Zytotoxizität. Wie in Mesangialzellen konnte auch in glomerulären Endothelzellen keine vermehrte Expression der Fibrosemarker nach Stimulation mit TNF nachgewiesen werden (Abb. 29, Tabelle 18).

Die Expression von MMP2 wird in glomerulären Endothelzellen durch ADR reduziert, die von MMP9 hingegen induziert (Abb. 30, Tabelle 19).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine glomeruläre ADR-Exposition vor allem in Mesangialzellen, gering auch in glomerulären Endothelzellen, direkt die Matrixproduktion induziert. Dies geschieht sowohl durch vermehrte Expression extrazellulärer Matrixmoleküle (Pro-Kollagen 1, Pro-Kollagen 4, Fibronectin, Laminin in Mesangialzellen; Fibronectin und Laminin in glomerulären Endothelzellen) als auch durch Expression von Hemmern Matrix-degradierender MMPs (TIMP-1, TIMP-2 in Mesangialzellen). Ein direkt fibrotischer Effekt von ADR auf Podozyten und Parietalzellen ist gering ausgeprägt, mit Induktion der Laminin-mRNA-Expression. TNF induziert in keiner der glomerulären Zelltypen eine Expression von extrazellulären Matrixmolekülen, allerdings führt TNF-Exposition zur Induktion von MMP9 sowohl in Podozyten als auch Parietalzellen.

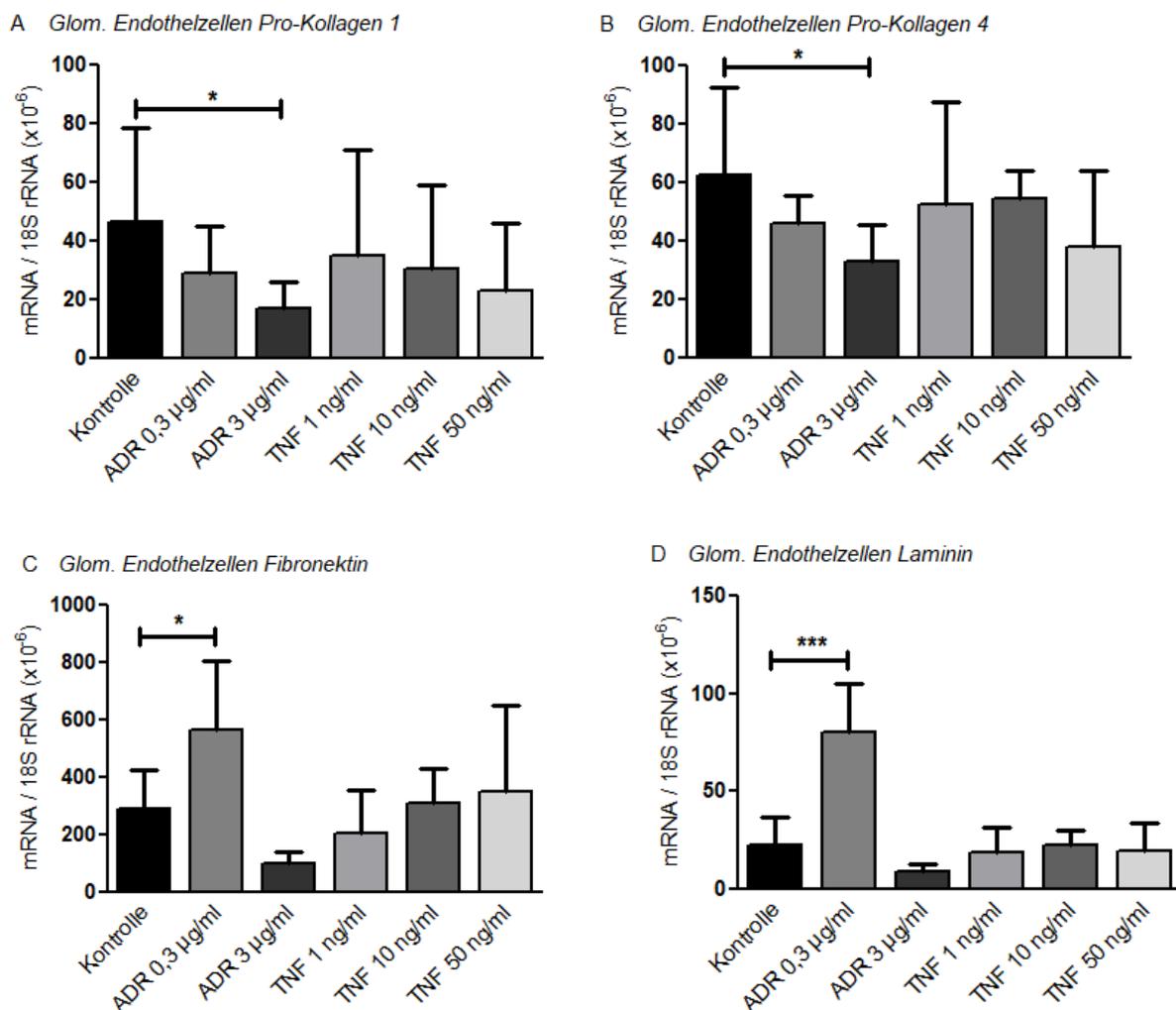


Abbildung 29: Expression von Fibrosemarkern in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit Adriamycin und TNF

Glomeruläre Endothelzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml sowie TNF der Konzentrationen 1, 10 und 50 ng/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils mindestens drei unterschiedlichen Ansätzen (n≥3) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p<0,05, *** p<0,001, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 18: Expression von Fibrosemarkern in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit ADR und TNF

(mRNA / 18S rRNA 10 ⁻⁶)	Pro-Kollagen 1	Pro-Kollagen 4	Fibronektin	Laminin
Kontrolle (n=8)	46,8 ± 32,0	62,7 ± 32,2	289,5 ± 137,6	22,3 ± 14,4
ADR 0,3 µg/ml (n=8)	29,2 ± 15,9	46,2 ± 9,6	567,2 ± 239,9	80,0 ± 24,8
ADR 3 µg/ml (n=8)	17,1 ± 9,0	33,3 ± 12,1	102,8 ± 39,3	9,2 ± 3,9
TNF 1 ng/ml (n=3)	35,2 ± 35,8	52,4 ± 35,4	205,8 ± 148,5	18,9 ± 13,0
TNF 10 ng/ml (n=3)	30,8 ± 28,2	54,5 ± 9,5	308,5 ± 122,0	22,56 ± 7,2
TNF 50 ng/ml (n=3)	22,9 ± 23,3	38,0 ± 25,9	352,8 ± 297,2	19,7 ± 13,9

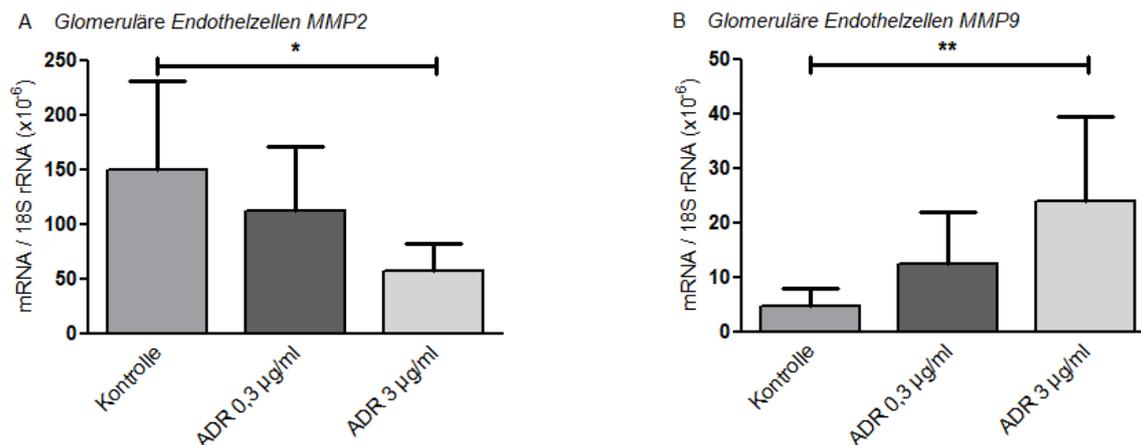


Abbildung 30: Expression von Matrixmetalloproteasen in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit Adriamycin

Glomeruläre Endothelzellen wurden *in vitro* für 24 Stunden mit ADR der Konzentrationen 0,3 µg/ml und 3 µg/ml stimuliert. Für die quantitative *Real-Time* PCR wurde cDNA verwendet. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihre Standardabweichung von jeweils acht unterschiedlichen Ansätzen (n=8) dar. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium ohne zusätzliche Stimulation. * p<0,05, ** p<0,01, Kontrolle versus Stimulation

Tabelle 19: Expression von Matrixmetalloproteasen in glomerulären Endothelzellen nach Stimulation mit ADR

(mRNA / 18S rRNA 10 ⁻⁶)	MMP2 (n=8)	MMP 9 (n=8)
Kontrolle	149,9 ± 81,3	4,7 ± 3,4
ADR 0,3 µg/ml	113,0 ± 58,7	12,6 ± 9,5
ADR 3 µg/ml	57,4 ± 25,3	24,2 ± 15,5

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

In-vitro-Exposition mit Adriamycin induzierte in Mesangial- und glomerulären Endothelzellen Zelltod. Durch Zugabe des Apoptose-Inhibitors ZVAD und des Nekroptose-Inhibitors Nec1s konnte im Vergleich zur alleinigen ADR-Stimulation ein signifikant besseres Überleben erzielt werden. Auch zeigte sich in beiden Zelllinien eine vermehrte Expression Nekroptose-spezifischer Marker auf mRNA-Ebene. Durch Zugabe des TNF-Inhibitors Etanercept konnte eine TNF-abhängige Zelltodinduktion durch Adriamycin für glomeruläre Endothelzellen, nicht jedoch für Mesangialzellen nach ADR-Inkubation nachgewiesen werden.

Die *in-vitro*-Stimulation der Podozyten und Parietalzellen mit Adriamycin zeigte dagegen kein vermehrtes Absterben der Zellen. Auf mRNA-Ebene zeigte sich lediglich eine vermehrte Expression des Nekroptose-assoziierten Markers MLKL in diesen beiden Zelllinien.

Eine signifikant vermehrte TNF-Expression und –Sekretion nach Adriamycin-Exposition konnte in Mesangialzellen nachgewiesen werden. Podozyten, Parietalzellen und glomeruläre Endothelzellen zeigten weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine vermehrte TNF-Bildung nach ADR-Inkubation.

Die proinflammatorischen Chemokine CCL2 und CCL5 wurden in allen vier glomerulären Zelltypen nach Stimulation mit TNF verstärkt exprimiert und sezerniert. Mesangialzellen zeigten auch nach ADR-Stimulation eine signifikant höhere CCL2-Expression und CCL2-Sekretion. Auch in glomerulären Endothelzellen und Parietalzellen, nicht jedoch in Podozyten, induzierte ADR die CCL2-mRNA-Expression. Das durch ADR oder TNF induzierte CCL2 in

glomerulären Zellen könnte insbesondere Mesangialzellen und parietale Endothelzellen auto- oder parakrin aktivieren, die unter ADR-Exposition vermehrt den CCL2-Rezeptor CCR2 exprimieren.

ADR-Exposition induzierte in Mesangialzellen direkt eine signifikant verstärkte Expression der extrazellulären Matrixmoleküle Pro-Kollagen 1, Pro-Kollagen 4, Fibronectin und Laminin. Zusätzlich verstärkte ADR in Mesangialzellen die Expression der Matrix-Metalloprotease-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2. Durch Zugabe von TNF war keine Expressionsvermehrung dieser Moleküle auf mRNA-Ebene nachweisbar, sodass die ADR-abhängige Expressionsinduktion nicht durch TNF vermittelt wird. In geringerem Maße konnte eine ADR-nicht jedoch TNF-induzierte Expression extrazellulärer Matrixmoleküle auch in glomerulären Endothelzellen mit gesteigerter Expression von Fibronectin und Laminin sowie in Podozyten und Parietalzellen mit vermehrter Expression von Laminin nachgewiesen werden. Zudem zeigt sich eine TNF-induzierte Expressionsvermehrung von MMP9 in Podozyten und Parietalzellen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass bei der Adriamycin-Nephropathie als tierexperimentelles Modell der FSGS in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen durch Adriamycin Zelltod unter anderem in Form von Apoptose und Nekroptose induziert wird. Insbesondere in glomerulären Endothelzellen scheint ADR-induzierter Zelltod teilweise TNF-vermittelt zu sein. Dagegen löst ADR-Exposition in Podozyten und Parietalzellen direkt keinen relevanten Zelltod aus. Des Weiteren führt ADR-Exposition zu einer entzündlichen Aktivierung glomerulärer Zellen. ADR induziert die Expression des Zytokins TNF und des proinflammatorischen Chemokins CCL2 in Mesangialzellen. Eine verstärkte CCL2-mRNA-Expression zeigt sich auch in ADR-exponierten glomerulären Endothelzellen und Parietalzellen, nicht jedoch in Podozyten. Dagegen induziert TNF in allen vier untersuchten glomerulären Zelltypen eine CCL2-Expression. Schließlich induziert ADR in exponierten glomerulären Zellen direkt eine profibrotische Reaktion, besonders in Mesangialzellen mit verstärkter Expression von extrazellulären Matrixmolekülen wie Pro-Kollagenen, Fibronectin und Laminin und vermehrter Expression von Hemmern der Matrix-degradierender Metalloproteasen wie TIMP-1 und TIMP-2. Aber auch in glomerulären Endothelzellen sowie Podozyten und Parietalzellen bewirkt ADR-Exposition die verstärkte Bildung einzelner extrazellulärer Matrixmoleküle (Fibronectin und Laminin bzw. Laminin).

Darüber hinaus induziert Adriamycin auf mRNA-Ebene die Expression der Matrix-Metalloproteinase 9 in Podozyten und Parietalzellen als Zeichen eines verstärkten extrazellulären Matrixumbaus.

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

Die Ergebnisse dieser *in-vitro*-Versuche führen zu mehreren wichtigen Aussagen über pathophysiologische Mechanismen der Adriamycin-induzierten Nephropathie als Modell der FSGS. Erstens führt Adriamycin nicht zu einer direkten Schädigung der Podozyten, sondern wirkt vielmehr zytotoxisch auf Mesangial- und glomeruläre Endothelzellen. Des Weiteren führt Adriamycin zu einer verstärkten TNF-Freisetzung in Mesangialzellen, welches wiederum proinflammatorisch auf die anderen glomerulären Zelltypen wirken kann, unter anderem durch Steigerung der Expression proinflammatorischer Chemokine wie CCL2 und CCL5. Besonders hervorzuheben ist, dass Adriamycin direkt profibrotische Reaktionen mit vermehrter Matrixmolekülproduktion in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen, in geringem Umfang auch in Podozyten und Parietalzellen induziert.

Diese Daten weisen zumindest im Adriamycin-induzierten Modell der FSGS auf eine primäre Schädigung von Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen hin. Dies umfasst Zelltod, inflammatorische Aktivierung und Matrixproduktion und führt möglicherweise erst sekundär zu dem für die FSGS charakteristischen Podozytenschaden.

4.2.1 Mechanismen der Podozytenschädigung bei der FSGS

Wie *Lee et al.* beschreiben ist das Modell der Adriamycin-Nephropathie seit Jahren ein etabliertes Modell zur Induktion eines der FSGS gleichwertigen Krankheitsbildes in Nagetieren. Die Effekte von Adriamycin *in vivo* auf den Gesamtglomerulus mit Podozytenschädigung, initial erkennbar am Verlust der podozytären Fußfortsätze, im Verlauf durch Verlust von Podozyten sowie die Ausdünnung der glomerulären Basalmembran sind bereits gut charakterisiert [106]. Jedoch sind die zugrundeliegenden molekularen

Mechanismen und zellbiologischen Prozesse, die zu diesem Podozytenschaden führen, noch nicht hinreichend verstanden.

Unabhängig von der Ursache der jeweiligen Glomerulopathie wird die Schädigung von Podozyten als ein Schlüsselfaktor für die Progression von glomerulären Erkrankungen beschrieben [131]. Zudem hat sich gezeigt, dass ein podozytärer Schaden essentiell mit einer glomerulären Filtrationsstörung und der daraus resultierenden Proteinurie verbunden ist [132]. *Li et al.* bestätigen am Rattenmodell, dass es durch die Toxizität von ADR zu einem podozytären Schaden mit Verlust und Apoptose der Zellen kommt [133]. Zytoskelettveränderungen mit Verlust der Podozyten im ADR-Mausmodell sowie das zytotoxische Potential von ADR auf humane Podozyten *in vitro* wird von *Chen et al.* beschrieben [115]. Auch *Yu et al.* zeigen ein vermehrtes Absterben muriner Podozyten nach ADR-Exposition [93]. Allerdings gibt es auch Arbeiten, die zeigen, dass murine Podozyten *in vitro* eine ADR-Stimulation mit 3 µg/ml über 72 Stunden überleben [114]. Eine direkte Zytotoxizität von ADR auf kultivierte murine Podozyten konnte auch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Außerdem wird beschrieben, dass neben Podozytenschäden auch eine primäre Schädigung anderer Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere (glomeruläre Endothelzellen und glomeruläre Basalmembran) eine Proteinurie und eine fortschreitende glomeruläre Sklerose verursachen und dem Podozytenschaden vorausgehen können [1, 109, 112]. *Sun et al.* haben gezeigt, dass ADR zu einer vermehrten Apoptose in glomerulären Endothelzellen führt und dass diese einem podozytären Absterben im Verlauf der ADR-Nephropathie vorausgeht [112]. Auch konnte gezeigt werden, dass ein durch oxidativen Stress hervorgerufener Untergang glomerulärer Endothelzellen in der ADR-Nephropathie zur Podozytenschädigung führt [28]. *Miller et al.* beschrieben eine vermehrte Apoptose auch in Mesangialzellen durch Stimulation mit ADR [134]. Diese Daten sind gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar, die zeigen, dass ADR zytotoxisch auf nicht podozytäre glomeruläre Zellen wirkt. Besonders Mesangialzellen und glomeruläre Endothelzellen, zu einem kleinen Teil auch Parietalzellen sterben nach der Applikation von Adriamycin (Abb. 8). Der für die ADR-Nephropathie charakteristische Verlust von Podozyten scheint dagegen entsprechend der hier vorgelegten Daten nicht direkt durch ADR induziert zu werden, sondern sekundär nach Schädigung der weiteren glomerulären Zelltypen aufzutreten.

Die Zelltod-Inhibitoren ZVAD und Nec1s wurden eingesetzt, um den Anteil an ablaufender Apoptose und Nekroptose am ADR-induzierten Zelltod zu charakterisieren. Hierbei hat sich herausgestellt, dass sich sowohl ein Teil des ablaufenden Zelltodes in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen der Apoptose zuschreiben lässt, ein anderer Teil der Nekroptose. Nekroptose ist eine Form der regulierten Nekrose, welche Caspase-unabhängig abläuft und meist durch extrinsische Signale wie etwa TNF, Interferone oder Toll-like-Rezeptor-Liganden ausgelöst wird [135]. Der Ablauf von Nekroptose in vielen unterschiedlichen Organen wurde bereits mehrfach dargestellt [136-139]. Auch in der Niere spielt Nekroptose eine wichtige Rolle. *Liu et al.* demonstrierten das Auftreten von Nekroptose bei der murinen Oxalat-Nephropathie und bei murinen Ischämie-Reperfusionsschäden [135]. *Mulay et al.* konnten Nekroptose an dem Modell der akuten Kristall-Nephropathie nachweisen [140]. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass Nekroptose auch zum Zelltod im Adriamycin-Mausmodell der FSGS beiträgt. Mesangialzellen und glomeruläre Endothelzellen unterlaufen diese Form der regulierten Nekrose nach Stimulation mit ADR (Abb. 9). Des Weiteren exprimieren beide Zelltypen nach ADR-Exposition signifikant mehr RIPK3 und MLKL (Abb. 10), glomeruläre Endothelzellen auch RIPK1. Diese Moleküle sind essentielle Bestandteile der Nekroptose-Signalkaskade (siehe hierzu Kapitel 1.4). Eine TNF-abhängige Zelltodinduktion durch Adriamycin konnte für glomeruläre Endothelzellen gezeigt werden (Abb. 12), sodass autokrin oder auch durch ADR-stimulierte Mesangialzellen produziertes TNF parakrin in diesen Zellen Nekroptose auslösen könnte. In Mesangialzellen zeigte sich tendenziell ebenfalls eine allerdings nicht signifikante Reduktion des ADR-induzierten Zelltods unter TNF-Blockade. Allerdings wurde sowohl in Mesangial- als auch in glomerulären Endothelzellen der ADR-induzierte Zelltod durch kombinierte Blockade von Apoptose und Nekroptose nicht vollständig gehemmt. Diese Daten weisen darauf hin, dass ADR in diesen Zellen über weitere Mechanismen nicht regulierten oder regulierten Zelltod induziert. Da ADR über vermehrten oxidativen Stress zytotoxisch wirkt, könnte beispielsweise auch Ferroptose, die durch Eisen-abhängigen oxidativen Stress und Lipidperoxidation charakterisiert ist [141], einen weiteren Mechanismus eines ADR-induzierten regulierten Zelltodes darstellen.

Im Gegensatz zu Podozyten induzierte ADR-Exposition in hoher Konzentration auch Zelltod in Parietalzellen, der allerdings nur gering ausgeprägt war. Dieser Zelltod scheint sowohl in Form von Apoptose als auch Nekroptose abzulaufen, da ihn nur eine gleichzeitige Behandlung mit ZVAD und Nec1s inhibierte. Parietalzellen sind potentielle glomeruläre Stammzellen, die nach

einem Podozytenschaden in begrenztem Maße zu ihrer Regeneration beitragen können [142, 143]. Der direkte zytotoxische Effekt von ADR auf Parietalzellen könnte somit die Regenerationsfähigkeit für Podozyten im Verlauf der ADR-Nephropathie begrenzen. Passend zu fehlender oder nur gering ausgeprägter ADR-induzierter Zytotoxizität und Nekroptose in Podozyten bzw. Parietalzellen zeigte sich in diesen Zellen zwar nach ADR-Exposition auf mRNA-Ebene eine signifikant höhere MLKL-Expression, aber keine vermehrte RIPK1-Expression und nur in Parietalzellen eine tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöhte Expression von RIPK3. MLKL wird in der Regel RIPK3-abhängig phosphoryliert und setzt so die Nekroptose-Kaskade in Gang [67]. Die fehlende oder nur gering vermehrte RIPK3-Expression in Podozyten bzw. Parietalzellen korreliert somit mit dem geringen Ausmaß der direkten Zytotoxizität in diesen Zellen.

4.2.2 Mechanismen der glomerulären Entzündungsreaktion bei der FSGS

Ein inflammatorisches Milieu mit gesteigerter renaler Expression proinflammatorischer Moleküle im Rahmen der FSGS wurde bereits beschrieben [46]. Ebenfalls gut charakterisiert ist die Rolle des proinflammatorischen Zytokins TNF als inflammatorischer Mediator in renalen Erkrankungen [73]. TNF steht in Zusammenhang mit glomerulärer Hypertrophie, vermehrter Matrixproduktion, Proteinurie, Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose [144]. Nach Induktion einer ADR-Nephropathie in Ratten konnte eine vermehrte glomeruläre TNF-Expression nachgewiesen werden [145]. Auch *Wang et al.* beschrieben erhöhte TNF-Serumspiegel und eine vermehrte renale TNF-Expression in Ratten mit ADR-Nephropathie [144]. Vordaten aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass in Mäusen nach Applikation von ADR die TNF-Produktion im Gesamtglomerulus signifikant ansteigt [146]. Expressionsanalysen an humanen Nierenbiopsien und humanen Podozyten weisen auf eine Aktivierung TNF-abhängiger Signalwege bei der FSGS hin [101, 103], ebenso wie klinische Studien mit TNF-blockierenden Therapien [99, 100].

Übereinstimmend konnte in dieser Arbeit eine vermehrte Produktion von TNF in Mesangialzellen dosisabhängig nach Stimulation mit ADR sowohl auf mRNA-Ebene durch quantitative *Real-Time* PCR als auch auf Proteinebene durch Elisa-Untersuchungen

nachgewiesen werden. Eine vermehrte TNF-Expression bzw. -produktion in den drei anderen glomerulären Zelltypen wurde in dieser Arbeit nicht gefunden. Im Gegensatz hierzu konnten *Yu et al.* eine vermehrte TNF-Expression und Sekretion in murinen Podozyten nach ADR-Stimulation nachweisen [93]. Allerdings bleibt dabei unklar, mit welcher Adriamycindosis die Podozyten stimuliert wurden. Eine TNF-Induktion durch höhere Adriamycinkonzentrationen als sie in dieser Arbeit verwendet wurden, ist denkbar.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ADR in einer Dosis von 0,3 µg/ml in Mesangialzellen eine Expression und Sekretion und in glomerulären Endothelzellen die mRNA-Expression des proinflammatorischen Chemokins CCL2 induziert. Auch in Parietalzellen wird diese durch ADR 0,3 µg/ml induziert. Dass es durch höhere ADR-Konzentrationen nicht zur vermehrten Chemokin-Ausschüttung kommt, könnte durch die zytotoxischen Effekte von ADR in hoher Konzentration zu erklären sein. So konnten etwa *Jin et al.* zeigen, dass ADR bereits in geringen Konzentrationen von 0,2 µg/ml zu Veränderungen des Zytoskeletts in Mesangialzellen führt [147]. Ähnliches ist für Parietalzellen denkbar. Die Ergebnisse des Proliferations-Assays in dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese (Abb. 8). Hingegen bewirkt ADR keine CCL2-Induktion in Podozyten. Die prominente CCL2-Produktion insbesondere durch ADR-exponierte Mesangialzellen wurde durch eine kürzlich publizierte Einzelzell-mRNA Sequenzierungsstudie an Mausglomeruli bestätigt. Hier konnte im Verlauf verschiedener glomerulärer Krankheitsmodelle, unter anderem auch der Adriamycin-Nephropathie, eine gesteigerte CCL2-mRNA-Expression in Mesangialzellen nachgewiesen werden [148]. Dagegen wird durch TNF-Stimulation die CCL2-Expression und -Konzentration in allen vier glomerulären Zelltypen signifikant induziert. Eine höhere TNF-Dosis führt hierbei auch zu vermehrter CCL2-Sekretion.

CCL2 ist ein wichtiges inflammatorisches Chemokin, welches die Einwanderung von Monozyten und Makrophagen vermittelt und zur entzündlichen Aktivität im Gewebe beiträgt [149]. Seine Konzentration ist dabei entscheidend für das Ausmaß der Leukozyteninfiltration und des damit verbundenen renalen Schadens [150]. Tatsächlich konnten Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass im Mausmodell die glomeruläre Expression von CCL2 im Verlauf der ADR-Nephropathie ansteigt und mit dem Ausmaß des progredienten Podozytenschadens korreliert [146]. Eine wichtige proinflammatorische Rolle von CCL2 in der ADR-Nephropathie wurde durch Untersuchungen von Chemokin-Rezeptor-2 (CCR2) -

defizienten Knockout-Mäusen nachgewiesen. CCR2 ist der Hauptrezeptor für CCL2, der dessen proinflammatorische Wirkung vermittelt. In CCR2-defizienten Mäusen verläuft die ADR-Nephropathie im Vergleich zu Wildtyp-Tieren deutlich abgeschwächt ab [146]. Die pathophysiologische Bedeutung der CCL2-CCR2-vermittelten Entzündungsreaktion bei der ADR-Nephropathie wird zudem durch eine Studie mit einem CCR2-Antagonisten belegt. Auch eine CCR2-Blockade mit der kleinmolekularen Substanz CCX872 führt in Mäusen zu einem abgeschwächten Verlauf der ADR-Nephropathie [126].

Des Weiteren führt TNF in allen vier glomerulären Zelltypen zu einer vermehrten Ausschüttung des Chemokins CCL5. Eine Induktion durch Adriamycin selbst konnte in keiner Zellreihe nachgewiesen werden. Auch CCL5 ist ein proinflammatorisches Chemokin, das die Leukozyteninfiltration in entzündliches Gewebe stimuliert [127]. Die Gruppe von *Wu et al.* konnten bereits zeigen, dass neben CCL2 auch CCL5 eine wichtige Rolle in der Adriamycin-Nephropathie spielt, und dass deren Blockade zur Besserung der renalen Funktion in Ratten führt [151].

Aus den hier vorgelegten Untersuchungen lässt sich ableiten, dass das inflammatorische Milieu, welches bei der FSGS vorherrscht, unter anderem durch lokal gebildetes TNF und CCL2 hervorgerufen wird. TNF wird nach ADR-Exposition in Mesangialzellen gebildet. Die Mesangialzelle könnte somit am Anfang einer entzündlichen Kaskade stehen, die über mesangial gebildetes TNF parakrin die benachbarten glomerulären Zellen aktiviert, unter anderem zur CCL2-Produktion. Die erhobenen *in-vitro*-Daten sprechen allerdings auch dafür, dass im Modell der ADR-Nephropathie ADR-Exposition selbst in Mesangialzellen, glomerulären Endothelzellen und Parietalzellen eine CCL2-Sekretion induziert. Ein pathophysiologisch relevanter Cross-talk der einzelnen glomerulären Zellen untereinander wird postuliert. *Schlöndorff et al.* beschrieben bereits 2009 die Mesangialzelle als spezialisierten Perizyten, welcher in enger anatomischer und physiologischer Beziehung mit glomerulären Endothelzellen und Podozyten steht [22]. Zwischenzeitlich ist das Zusammenspiel der glomerulären Zellen untereinander besser verstanden. So ist inzwischen klar, dass die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere nur durch ein Miteinander und eine Kommunikation zwischen Podozyten, Mesangialzellen, glomerulären Endothelzellen und Parietalzellen funktioniert [152]. Beispielsweise zeigten *Daehn et al.* im Modell der Adriamycin-Nephropathie, dass eine multidirektionale Interaktion zwischen Podozyten und Endothelzellen zur Krankheitsprogression der FSGS führt. So wird der

Podozytenverlust bei der Glomerulosklerose vom Ausmaß des mitochondrialen oxidativen Stresses in glomerulären Endothelzellen mitbestimmt, der seinerseits durch podozytäre Endothelin-1-Freisetzung ausgelöst wird [28]. Auch eine Interaktion zwischen Podozyten und Parietalzellen sowie inflammatorisch getriggerte Parietalzellen, die als mögliches Stammzellreservoir für Podozyten fungieren, ist bekannt [153, 154]. Zudem wurde in einem Modell der IgA-Nephropathie beschrieben, dass in Mesangialzellen generiertes TNF über lokale Interaktion zur Aktivierung von Podozyten führt und diese wiederum inflammatorische Moleküle ausschütten, was einen tubulären Schaden, Monozyteninfiltration und Fibrose verursacht [20].

4.2.3 Mechanismen der glomerulären Fibrosierung bei der FSGS

Ein weiteres Kennzeichen der FSGS ist die fortschreitende Fibrose und Sklerosierung der Nierenkörperchen [153]. Fibrose wird definiert als die Formierung und Anhäufung von extrazellulärer Matrix. Sie ist essentieller Bestandteil der Wundheilung nach Gewebeerletzungen und somit eng mit Inflammation und Regeneration verknüpft. Viele Zellen sind an der Entstehung der Fibrose beteiligt, so etwa Fibroblasten, Perizyten, epitheliale und endotheliale Zellen und inflammatorische Zellen, die untereinander wiederum über interzellulären Cross-talk in Verbindung stehen [7]. Auch im Modell der Adriamycin-Nephropathie zeigt sich mit fortschreitendem Krankheitsverlauf eine zunehmende Sklerosierung der Glomeruli mit narbigem Ersatz der glomerulären Kapillaren [133, 155]. Die FSGS ist somit Folge einer vernarbenden Defektheilung nach Schädigung glomerulärer Zellen, insbesondere der kaum regenerierbaren Podozyten.

Hauptbestandteile der Extrazellulärmatrix im Glomerulus sind Kollagen 1, Kollagen 4, Fibronectin und Laminin [1]. Mesangialzellen sind mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase dieser Matrix [10]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es durch Adriamycin-Stimulation direkt zu einer signifikant erhöhten Matrixmolekülproduktion vor allem durch aktivierte Mesangialzellen kommt. Dies lässt sich nach Stimulation von ADR in der Dosis 0,3 µg/ml beobachten. Bei Stimulation mit der höheren Konzentration bleiben signifikante Effekte aus. Hier ist wieder ein überwiegend zytotoxischer Effekt von Adriamycin als Erklärung denkbar. Mesangialzellen exprimieren nach Stimulation

mit der niedrigen ADR-Konzentration signifikant mehr Pro-Kollagen 1, welches besonders in späten Stadien der Glomerulosklerose detektiert wird [156], sowie Pro-Kollagen 4, Fibronectin und Laminin. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass die Mesangialzelle die hauptverantwortliche Zelle für die Ausbildung von interstitiellen Matrixkomponenten wie etwa Kollagen 1 und Fibronectin ist. Dies führt zur mesangialen Expansion und in der Folge zur Glomerulosklerose, beispielsweise auch im Verlauf der diabetischen Nephropathie [156].

In dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, dass Adriamycin die Expression von Matrixmetalloproteasen wie MMP2 und MMP9 in Mesangialzellen induziert (Abb. 27). Vielmehr kommt es zu einer Aktivierung der MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 (Abb. 28). Möglicherweise wird durch deren Induktion der Matrixabbau gehemmt, was zu glomerulärer Sklerosierung beitragen könnte. Es ist zu diskutieren, dass die überlebenden Mesangialzellen als Folge des großen Mesangialzellverlustes durch ADR vermehrt extrazelluläre Matrix bilden, umso die Stabilität des Glomerulus im Sinne einer Defektheilung weiterhin aufrecht zu erhalten. Tatsächlich könnte das Auftreten der kollabierenden Form der FSGS darauf hinweisen, dass diese Mesangialzell-induzierte Defektheilung aufgrund einer unzureichenden Matrixproduktion nicht ausreichend abläuft.

Sun et al. konnten in ihrer Studie des Weiteren zeigen, dass Mäuse mit einer Endothelzelldysfunktion nach ADR-Stimulation signifikant mehr Kollagen 1 und Fibronectin exprimieren [112], was vermuten lässt, dass auch glomeruläre Endothelzellen zur Progression der Sklerose beitragen. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl glomeruläre Endothelzellen als auch Podozyten und Parietalzellen durch ADR in der Dosis 0,3 µg/ml zur Expression von Laminin stimuliert werden. Darüber hinaus exprimieren glomeruläre Endothelzellen auch vermehrt Fibronectin nach ADR-Exposition (Abb. 29). Somit können auch diese Zelltypen im Modell der Adriamycin-Nephropathie zur fortschreitenden Sklerosierung beitragen, allerdings offensichtlich in deutlich geringerem Maße als die Mesangialzellen. Die prominente Expression extrazellulärer Matrixmoleküle in ADR-exponierten Mesangialzellen *in vivo* wurde auch in der glomerulären Einzelzell-mRNA-Sequenzierungsstudie von *Chung et al.* aufgezeigt [148].

Eine Induktion extrazellulärer Matrix-Komponenten durch TNF ist unabhängig von der TNF-Dosis in keiner glomerulären Zellreihe zu detektieren. TNF scheint somit neben seiner proinflammatorischen Funktion keine entscheidende Rolle als direkter profibrotischer Mediator zu spielen. Jedoch führt TNF zu einer verstärkten mRNA-Expression von MMP9 in

Podozyten und Parietalzellen (Abb. 25), während in glomerulären Endothelzellen eine ADR-Exposition direkt eine vermehrte MMP9-Expression induziert (Abb. 30). Die erhöhte Expression von MMP9 könnte neben einem verstärkten Matrixumbau während des Sklerosierungsprozesses zu einer verstärkten Schädigung der glomerulären Basalmembran führen und in der Folge die glomeruläre Entzündung fördern.

4.2.4 Limitationen der Arbeit

Die vorgestellte Arbeit umfasst ausschließlich *in vitro* Experimente mit immortalisierten Zelllinien. Naturgemäß ist daher die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf *in-vivo*-Situationen limitiert. ADR-induzierte Effekte auf primäre glomeruläre Zellen *in vitro*, vor allem aber auf glomeruläre Zellen im intakten Glomerulus und Gesamtorganismus könnten sich von den hier erhobenen Daten unterscheiden. Beispielsweise schließt die fehlende Zelltod-Induktion durch ADR in den immortalisierten Podozyten einen direkt zytotoxischen ADR-Effekt auf Podozyten *in vivo* nicht aus. Allerdings handelt es sich bei allen vier untersuchten glomerulären Zelllinien um immortalisierte Zellen. Die deutlichen Unterschiede hinsichtlich des ADR-induzierbaren Zelltodes sprechen in jedem Fall dafür, dass im Gegensatz zu Podozyten insbesondere Mesangial- und glomeruläre Endothelzellen direkt durch ADR zytotoxisch geschädigt werden.

Zudem wurden in dieser Arbeit ausschließlich Monokulturen der verschiedenen glomerulären Zelllinien untersucht. Inwieweit das von ADR-exponierten Mesangialzellen sezernierte TNF oder weitere inflammatorische Mediatoren auf umgebende Podozyten und Parietalzellen zytotoxisch wirken, wurde nicht untersucht. Ebenso wurden Effekte der ADR- oder TNF-induzierten glomerulären CCL2-Expression auf Inflammation und nachfolgenden Zelltod im Sinne einer Nekroinflammation [70] nicht untersucht. Hierfür müssten Stimulationsexperimente mit CCL2 bzw. Ko-Kulturen von ADR-exponierten Mesangialzellen mit den übrigen glomerulären Zelllinien durchgeführt werden.

Schließlich erlaubt die *in-vitro*-Situation nicht, Effekte einwandernder Leukozyten auf die glomeruläre Zellschädigung und Sklerose zu untersuchen. Interessanterweise konnte die glomeruläre Einzelzell-Transkriptionsstudie eine prominente glomeruläre Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Verlauf der ADR-Nephropathie nachweisen, möglicherweise

induziert durch eine mesangiale Expression der Neutrophilen-Chemokins CXCL1 [148]. Eine glomeruläre Neutrophilenakkumulation könnte zur glomerulären Schädigung und glomerulärem Zelltod beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings die mesangiale CXCL1-Expression in ADR-exponierten glomerulären Zellen nicht untersucht. Die nachgewiesene glomeruläre CCL2-Expression [146, 148] könnte auch eine glomeruläre Matrixsynthese verstärken oder zu glomerulärer Akkumulation von CCR2-positiven Fibrozyten führen, die zur lokalen Inflammation oder direkt zur glomerulären Matrixsynthese beitragen könnten [146]. Zur Untersuchung dieser Mechanismen sind weitere *in-vivo*-Studien unter Verwendung Zelltyp-spezifischer Knockouts (z.B. CXCL1 oder CCL2 in Mesangialzellen) notwendig.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit wichtige zelluläre Mechanismen beschrieben werden, die im Modell der ADR-Nephropathie zur Glomerulosklerose führen. ADR führt zur Induktion von Apoptose, Nekroptose, aber auch weiteren, bisher nicht charakterisierten Formen des Zelltodes in Mesangialzellen, glomerulären Endothelzellen und in geringem Maße auch in Parietalzellen. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit kein direkter zytotoxischer Effekt von ADR auf Podozyten nachgewiesen werden. Schädigung und Verlust von Podozyten wird als führende Ursache einer FSGS angenommen. Die hier erarbeiteten Daten legen nahe, dass im Modell der ADR-Nephropathie, das ebenfalls mit fortschreitender Podozytenschädigung und -verlust einhergeht [146], dieser Podozytenschaden indirekt nach initialer ADR-induzierter Schädigung und inflammatorischer Aktivierung von Mesangialzellen, glomerulären Endothelzellen und Parietalzellen vermittelt wird. Tatsächlich konnte bei der ADR-Nephropathie ein sekundärer Podozytenschaden in Abhängigkeit von einer vorangehenden Schädigung glomerulärer Endothelzellen nachgewiesen werden [28].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen darüber hinaus, dass es über eine ADR-induzierte Aktivierung der Mesangialzellen zu einer inflammatorischen und fibrotischen Reaktion im Glomerulus kommt. Proinflammatorische Mediatoren wie TNF, die von ADR-exponierten Mesangialzellen gebildet werden, können parakrin zu einer weiteren Aktivierung von Podozyten, Parietalzellen und glomerulären Endothelzellen und so zu einer Verstärkung der

glomerulären Inflammation führen. Zusätzlich könnte autokrine TNF-Sekretion in glomerulären Endothelzellen zur ADR-induzierten Toxizität beitragen, da TNF-Blockade mit Etanercept Zelltod in ADR-exponierten Endothelzellen reduzierte. Inwieweit von Mesangialzellen sezerniertes TNF parakrin Zelltod in den benachbarten glomerulären Zelltypen induziert, wurde in dieser Arbeit (z.B. unter Verwendung von Ko-Kultursystemen) nicht untersucht.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass zwischen den einzelnen glomerulären Zellen eine interzelluläre Kommunikation in Form eines „Cross-talk“ besteht, der zur Krankheitsprogression beiträgt. Hier sind weitere Studien mit Ko-Kultursystemen oder *in-vivo*-Studien mit zelltypspezifischen Knockouts erforderlich, um die weiteren molekularen Mechanismen zu entschlüsseln.

Abbildung 31 zeigt zusammenfassend die Wirkung von Adriamycin auf glomeruläre Zellen und die in dieser Arbeit herausgearbeiteten Zusammenhänge.

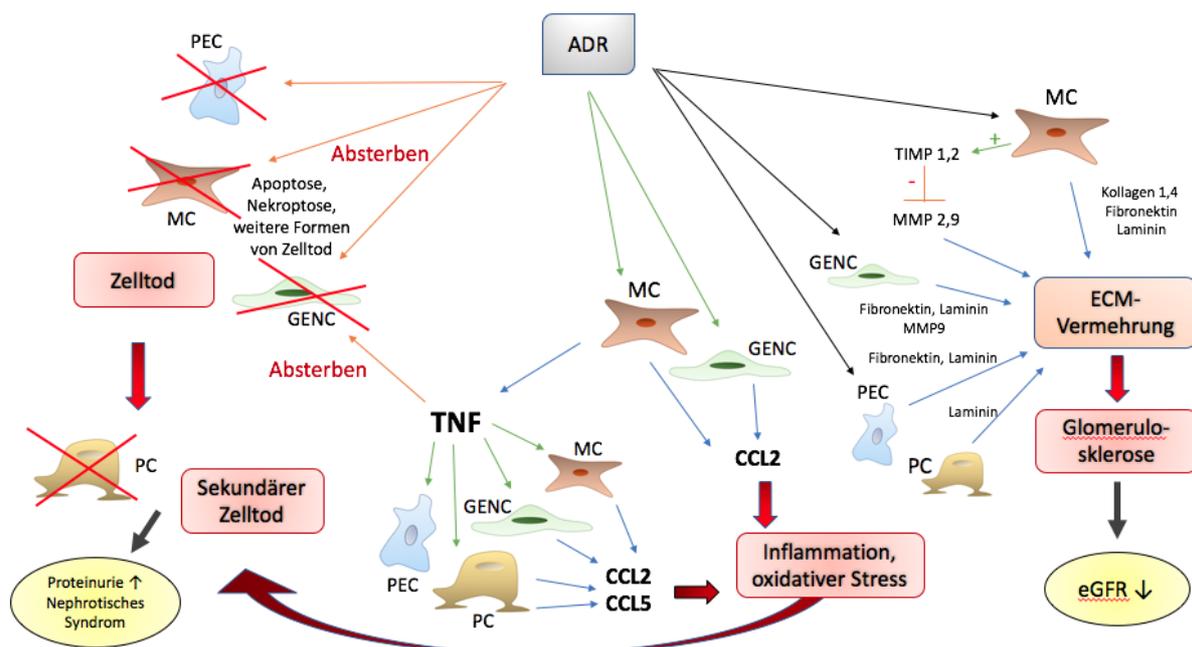


Abbildung 31: Wirkung von Adriamycin auf glomeruläre Zellen

Adriamycin führt zu einem vermehrten Zelltod von Mesangialzellen (MC), glomerulären Endothelzellen (GENC) und in geringem Maße auch Parietalzellen (PEC). Darüber hinaus induziert es eine CCL2-Sekretion in Mesangialzellen und glomerulären Endothelzellen, sowie eine TNF-Sekretion in Mesangialzellen, was wiederum die glomerulären Zellen zur CCL2- und CCL5-Sekretion aktiviert und Zelltod in glomerulären Endothelzellen fördert. Weiterhin induziert ADR eine erhöhte Expression profibrotischer Marker in Mesangialzellen (Pro-Kollagen 1, Pro-Kollagen 4, Fibronektin, Laminin, TIMP-1,-2), glomerulären Endothelzellen (Fibronektin, Laminin, MMP9), Parietalzellen (Fibronektin, Laminin) und Podozyten (Laminin).

Im medizinischen Alltag ist es nicht Adriamycin, welches in der humanen Niere zu dem Krankheitsbild der FSGS führt. Hier wird vermutet, dass es neben genetischen Mutationen [43] auch zirkulierende Faktoren gibt [45, 46], die die Erkrankung auslösen. Zudem ist die medizinisch hochrelevante diabetische Nephropathie durch eine zunehmende Glomerulosklerose gekennzeichnet. Die hier erarbeiteten Daten tragen jedoch dazu bei, Mechanismen auf zellulärer Ebene zu entschlüsseln, die zur glomerulären Zellschädigung mit nachfolgender Sklerose führen. Gerade die Erkenntnis, wie wichtig der Cross-talk zwischen einzelnen glomerulären Zellen für die Entwicklung einer FSGS ist, ist bedeutend. Tatsächlich konnten in der kürzlich publizierte glomerulären Einzelzell-Transkriptionsanalyse gezeigt werden, dass nur 20 von 50 bekannten FSGS-Risikogenen ausschließlich in Podozyten exprimiert wurden. Zum Teil wurden diese Gene deutlich stärker in anderen glomerulären Zelltypen, z.B. Mesangialzellen exprimiert [148]. Diese Daten sprechen dafür, dass wie nach ADR-Exposition die Podozytenschädigung bei der Glomerulosklerose erst sekundär nach Schädigung anderer glomerulärer Zellen auftreten kann. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Mechanismen der glomerulären Zellinteraktion und ihre Mediatoren besser zu charakterisieren. Dies ist Voraussetzung, um schlussendlich medikamentöse Ansätze zur Therapie von FSGS-Patienten zu entwickeln. Die hier erarbeiteten Ergebnisse legen nahe, dass insbesondere zytoprotektive Therapiestrategien gegenüber Mesangial- und glomerulären Endothelzellen einen sekundären Podozytenschaden und Glomerulosklerose verhindern könnten. Auch die Blockade inflammatorischer Mediatoren wie TNF und vor allem CCL2 scheint vielversprechend. Tatsächlich konnte bereits in mehreren Phase-II-Studien bei der diabetischen Nephropathie glomerulärer Schaden durch Blockade von CCR2 oder CCL2 reduziert werden [157, 158]. Klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit einer CCR2-/CCL2-blockierender Therapie bei der FSGS wurden bisher allerdings nicht durchgeführt. Zur Verhinderung der glomerulären Matrixproduktion könnte ebenfalls die Mesangialzelle die geeignete Zielzelle einer antifibrotischen Therapie sein. Allerdings ist zu diskutieren, ob ein antifibrotischer Therapieansatz bei der FSGS mit Reduzierung der vernarbenden Defektheilung ohne Abmilderung des primären glomerulären Zellschadens erfolversprechend sein kann oder eher zu einer kollabierenden Form der FSGS führt.

Literaturverzeichnis

1. Haraldsson, B., J. Nystrom, and W.M. Deen, *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(2): p. 451-87.
2. Fogo, A.B., C.E. Alpers, A.H. Cohen, R.B. Colvin, and C.E. Jennette, *Fundamentals of Renal Pathology*. Springer, Berlin, 2014.
3. Schermer, B. and T. Benzing, Kidney Research Center Cologne, <https://www.kidneyresearchcenter.org/21/>. Online, accessed 12-March-2021.
4. Fu, J., K. Lee, P.Y. Chuang, Z. Liu, and J.C. He, *Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015. **308**(4): p. F287-97.
5. Schlondorff, D., *The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte*. *FASEB J*, 1987. **1**(4): p. 272-81.
6. Mene, P., M.S. Simonson, and M.J. Dunn, *Physiology of the mesangial cell*. *Physiol Rev*, 1989. **69**(4): p. 1347-424.
7. Djurdjaj, S. and P. Boor, *Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis*. *Mol Aspects Med*, 2018.
8. Baud, L. and R. Ardaillou, *Reactive oxygen species: production and role in the kidney*. *Am J Physiol*, 1986. **251**(5 Pt 2): p. F765-76.
9. Abboud, H.E., *Mesangial cell biology*. *Exp Cell Res*, 2012. **318**(9): p. 979-85.
10. Ning, L., H. Kurihara, S. de Vega, N. Ichikawa-Tomikawa, Z. Xu, R. Nonaka, S. Kazuno, Y. Yamada, J.H. Miner, and E. Arikawa-Hirasawa, *Laminin alpha1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF-beta pathway*. *Am J Pathol*, 2014. **184**(6): p. 1683-94.
11. Jameson, J.L., A.S. Fauci, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo, and J. Loscalzo, *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw Hill Education, 2018. **20th edition**.
12. Manski, D., Urologielehrbuch.de, <https://www.urologielehrbuch.de/nieren-nephron-glomerulus.html>. Online; accessed 12-March-2021.
13. Kitching, A.R. and H.L. Hutton, *The Players: Cells Involved in Glomerular Disease*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016. **11**(9): p. 1664-1674.
14. Huber, T., The kidneys - intelligent filtration, <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/news/the-kidneys-intelligent-filtration>. Online, accessed 12-March-2021.
15. Satchell, S.C. and F. Braet, *Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **296**(5): p. F947-56.
16. Gbadegesin, R., P. Lavin, J. Foreman, and M. Winn, *Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update*. *Pediatr Nephrol*, 2011. **26**(7): p. 1001-15.
17. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. 2. korrigierte Auflage ed. 2005: Thieme.
18. Kriz, W., *Biologie des Podozyten*. *Nephrologe*, 2006. **1**: p. 144-152.
19. Wiggins, R.C., *The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases*. *Kidney Int*, 2007. **71**(12): p. 1205-14.
20. Lai, K.N., J.C. Leung, L.Y. Chan, M.A. Saleem, P.W. Mathieson, F.M. Lai, and S.C. Tang, *Activation of podocytes by mesangial-derived TNF-alpha: glomerulo-podocytic*

- communication in IgA nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(4): p. F945-55.
21. Al-Lamki, R.S., J. Wang, J.N. Skepper, S. Thiru, J.S. Pober, and J.R. Bradley, *Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants*. Lab Invest, 2001. **81**(11): p. 1503-15.
 22. Schlondorff, D. and B. Banas, *The mesangial cell revisited: no cell is an island*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(6): p. 1179-87.
 23. Sampson, A.L., R.F. Singer, and G.D. Walters, *Uric acid lowering therapies for preventing or delaying the progression of chronic kidney disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **10**: p. CD009460.
 24. Ruggenti, P., P. Cravedi, and G. Remuzzi, *Mechanisms and treatment of CKD*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(12): p. 1917-28.
 25. Levey, A.S. and J. Coresh, *Chronic kidney disease*. Lancet, 2012. **379**(9811): p. 165-80.
 26. Hoberg, E. et al, *Umsetzungsempfehlungen von Diagnose- und Therapieleitlinien bei chronischen Nierenerkrankungen*, herzm 24, 2007, 3: S. 136-146
 27. Remuzzi, G., A. Benigni, and A. Remuzzi, *Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 288-96.
 28. Daehn, I., G. Casalena, T. Zhang, S. Shi, F. Fenninger, N. Barasch, L. Yu, V. D'Agati, D. Schlondorff, W. Kriz, B. Haraldsson, and E.P. Bottinger, *Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(4): p. 1608-21.
 29. Bertani, T., F. Cutillo, C. Zoja, M. Brogгинi, and G. Remuzzi, *Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy*. Kidney Int, 1986. **30**(4): p. 488-96.
 30. Remuzzi, G. and T. Bertani, *Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules?* Kidney Int, 1990. **38**(3): p. 384-94.
 31. Banham, G.D., S.M. Flint, N. Torpey, P.A. Lyons, D.N. Shanahan, A. Gibson, C.J.E. Watson, A.M. O'Sullivan, J.A. Chadwick, K.E. Foster, R.B. Jones, L.R. Devey, A. Richards, L.P. Erwig, C.O. Savage, K.G.C. Smith, R.B. Henderson, and M.R. Clatworthy, *Belimumab in kidney transplantation: an experimental medicine, randomised, placebo-controlled phase 2 trial*. Lancet, 2018.
 32. Rockey, D.C., P.D. Bell, and J.A. Hill, *Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 96.
 33. Schwartz, M.M., S.M. Korbet, J. Rydell, R. Borok, and R. Genchi, *Primary focal segmental glomerular sclerosis in adults: prognostic value of histologic variants*. Am J Kidney Dis, 1995. **25**(6): p. 845-52.
 34. Chun, M.J., S.M. Korbet, M.M. Schwartz, and E.J. Lewis, *Focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic adults: presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 2169-77.
 35. D'Agati, V.D., A.B. Fogo, J.A. Bruijn, and J.C. Jennette, *Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal*. Am J Kidney Dis, 2004. **43**(2): p. 368-82.
 36. Kitiyakara, C., P. Eggers, and J.B. Kopp, *Twenty-one-year trend in ESRD due to focal segmental glomerulosclerosis in the United States*. Am J Kidney Dis, 2004. **44**(5): p. 815-25.

37. Sethi, S., L. Zand, S.H. Nasr, R.J. Glassock, and F.C. Fervenza, *Focal and segmental glomerulosclerosis: clinical and kidney biopsy correlations*. Clin Kidney J, 2014. **7**(6): p. 531-7.
38. Braden, G.L., J.G. Mulhern, M.H. O'Shea, S.V. Nash, A.A. Ucci, Jr., and M.J. Germain, *Changing incidence of glomerular diseases in adults*. Am J Kidney Dis, 2000. **35**(5): p. 878-83.
39. Haas, M., S.M. Meehan, T.G. Karrison, and B.H. Spargo, *Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997*. Am J Kidney Dis, 1997. **30**(5): p. 621-31.
40. Komers, R., D.S. Gipson, P. Nelson, S. Adler, T. Srivastava, V.K. Derebail, K.E. Meyers, P. Pergola, M.E. MacNally, J.L. Hunt, A. Shih, and H. Trachtman, *Efficacy and Safety of Sparsentan Compared With Irbesartan in Patients With Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: Randomized, Controlled Trial Design (DUET)*. Kidney Int Rep, 2017. **2**(4): p. 654-664.
41. Hull, R.P. and D.J. Goldsmith, *Nephrotic syndrome in adults*. BMJ, 2008. **336**(7654): p. 1185-9.
42. Brinkkoetter, P.T., C. Ising, and T. Benzing, *The role of the podocyte in albumin filtration*. Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(6): p. 328-36.
43. Sadowski, C.E., S. Lovric, S. Ashraf, W.L. Pabst, H.Y. Gee, S. Kohl, S. Engelmann, V. Vega-Warner, H. Fang, J. Halbritter, M.J. Somers, W. Tan, S. Shril, I. Fessi, R.P. Lifton, D. Bockenbauer, S. El-Desoky, J.A. Kari, M. Zenker, M.J. Kemper, D. Mueller, H.M. Fathy, N.A. Soliman, S.S. Group, and F. Hildebrandt, *A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(6): p. 1279-89.
44. De Vriese, A.S., S. Sethi, K.A. Nath, R.J. Glassock, and F.C. Fervenza, *Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(3): p. 756-774.
45. Reiser, J., C.C. Nast, and N. Alachkar, *Permeability factors in focal and segmental glomerulosclerosis*. Adv Chronic Kidney Dis, 2014. **21**(5): p. 417-21.
46. Kronbichler, A., J. Leierer, J. Oh, B. Meijers, and J.I. Shin, *Immunologic Changes Implicated in the Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 2150451.
47. D'Agati, V., J.I. Suh, L. Carbone, J.T. Cheng, and G. Appel, *Pathology of HIV-associated nephropathy: a detailed morphologic and comparative study*. Kidney Int, 1989. **35**(6): p. 1358-70.
48. Praga, M., E. Hernandez, E. Morales, A.P. Campos, M.A. Valero, M.A. Martinez, and M. Leon, *Clinical features and long-term outcome of obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(9): p. 1790-8.
49. Mohamed, N., J. Goldstein, J. Schiff, and R. John, *Collapsing glomerulopathy following anthracycline therapy*. Am J Kidney Dis, 2013. **61**(5): p. 778-81.
50. *Chapter 6: Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in adults*. Kidney Int Suppl (2011), 2012. **2**(2): p. 181-185.
51. Sethi, S., R.J. Glassock, and F.C. Fervenza, *Focal segmental glomerulosclerosis: towards a better understanding for the practicing nephrologist*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(3): p. 375-84.
52. Stokes, M.B. and V.D. D'Agati, *Morphologic variants of focal segmental glomerulosclerosis and their significance*. Adv Chronic Kidney Dis, 2014. **21**(5): p. 400-7.

53. Thomas, D.B., N. Franceschini, S.L. Hogan, S. Ten Holder, C.E. Jennette, R.J. Falk, and J.C. Jennette, *Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants*. *Kidney Int*, 2006. **69**(5): p. 920-6.
54. Konigshausen, E. and L. Sellin, *Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 3765608.
55. Dijkman, H., B. Smeets, J. van der Laak, E. Steenberg, and J. Wetzels, *The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis*. *Kidney Int*, 2005. **68**(4): p. 1562-72.
56. Savin, V.J., R. Sharma, M. Sharma, E.T. McCarthy, S.K. Swan, E. Ellis, H. Lovell, B. Warady, S. Gunwar, A.M. Chonko, M. Artero, and F. Vincenti, *Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(14): p. 878-83.
57. Chang, J.W., V. Pardo, J. Sageshima, L. Chen, H.L. Tsai, J. Reiser, C. Wei, G. Ciancio, G.W. Burke, 3rd, and A. Fornoni, *Podocyte foot process effacement in postreperfusion allograft biopsies correlates with early recurrence of proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis*. *Transplantation*, 2012. **93**(12): p. 1238-44.
58. Segerer, S. and P.J. Nelson, *Chemokines in Renal Diseases*. *ScientificWorldJournal*, 2005. **5**: p. 835-844.
59. Vielhauer, V., H.J. Anders, M. Mack, J. Cihak, F. Strutz, M. Stangassinger, B. Luckow, H.J. Grone, and D. Schlondorff, *Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(6): p. 1173-87.
60. Panzer, U., O.M. Steinmetz, R.A. Stahl, and G. Wolf, *Kidney Diseases and Chemokines*. *Curr Drug Targets*, 2006. **7**(1): p. 65-80.
61. Anders, H.J., V. Vielhauer, M. Kretzler, C.D. Cohen, S. Segerer, B. Luckow, L. Weller, H.J. Grone, and D. Schlondorff, *Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(5): p. 919-31.
62. Perez de Lema, G., H. Maier, E. Nieto, V. Vielhauer, B. Luckow, F. Mampaso, and D. Schlondorff, *Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(7): p. 1369-82.
63. Larsen, B.D. and C.S. Sorensen, *The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond*. *FEBS J*, 2017. **284**(8): p. 1160-1170.
64. Jouan-Lanhouet, S., F. Riquet, L. Duprez, T. Vanden Berghe, N. Takahashi, and P. Vandenabeele, *Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014. **35**: p. 2-13.
65. Liu, M., L. Shi, X. Zou, X. Zheng, F. Zhang, X. Ding, H. Zhu, and Y. Shen, *Caspase inhibitor zVAD-fmk protects against acute pancreatitis-associated lung injury via inhibiting inflammation and apoptosis*. *Pancreatology*, 2016. **16**(5): p. 733-8.
66. Zhang, D.W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B.J. Lu, S.C. Lin, M.Q. Dong, and J. Han, *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. *Science*, 2009. **325**(5938): p. 332-6.
67. Honarpisheh, M., J. Desai, J.A. Marschner, M. Weidenbusch, M. Lech, V. Vielhauer, H.J. Anders, and S.R. Mulay, *Regulated necrosis-related molecule mRNA expression in humans and mice and in murine acute tissue injury and systemic autoimmunity*

- leading to progressive organ damage, and progressive fibrosis.* Biosci Rep, 2016. **36**(6).
68. Cho, Y.S., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T.D. Ray, M. Guildford, and F.K. Chan, *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation.* Cell, 2009. **137**(6): p. 1112-23.
 69. Vanden Berghe, T., A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak, and P. Vandenabeele, *Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 135-47.
 70. Mulay, S.R., S.V. Kumar, M. Lech, J. Desai, and H.-J. Anders, *How Kidney Cell Death Induces Renal Necroinflammation.* Semin Nephrol, 2016. **36**(3): p. 162-173.
 71. Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer, *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 700-14.
 72. Budak, D., V.T. Yilmaz, H. Akbas, G. Suleymanlar, and G. Yucel, *Association between graft function and serum TNF-alpha, TNFR1 and TNFR2 levels in patients with kidney transplantation.* Ren Fail, 2015. **37**(5): p. 871-6.
 73. Vielhauer, V. and T.N. Mayadas, *Functions of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation.* Semin Nephrol, 2007. **27**(3): p. 286-308.
 74. Al-Lamki, R.S. and T.N. Mayadas, *TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction.* Kidney Int, 2015. **87**(2): p. 281-96.
 75. Pfeffer, K., *Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors.* Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 185-91.
 76. Hernandez, T. and T.N. Mayadas, *Immunoregulatory role of TNFalpha in inflammatory kidney diseases.* Kidney Int, 2009. **76**(3): p. 262-76.
 77. Fiers, W., *Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level.* FEBS Lett, 1991. **285**(2): p. 199-212.
 78. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.* Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
 79. Cessak, G., O. Kuzawska, A. Burda, K. Lis, M. Wojnar, D. Mirowska-Guzel, and E. Balkowiec-Iskra, *TNF inhibitors - Mechanisms of action, approved and off-label indications.* Pharmacol Rep, 2014. **66**(5): p. 836-44.
 80. Poher, J.S., *Endothelial activation: intracellular signaling pathways.* Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S109-16.
 81. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias, *Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1397-411.
 82. Kalliolias, G.D. and L.B. Ivashkiv, *TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies.* Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(1): p. 49-62.
 83. Speeckaert, M.M., R. Speeckaert, M. Laute, R. Vanholder, and J.R. Delanghe, *Tumor necrosis factor receptors: biology and therapeutic potential in kidney diseases.* Am J Nephrol, 2012. **36**(3): p. 261-70.
 84. Naude, P.J., J.A. den Boer, P.G. Luiten, and U.L. Eisel, *Tumor necrosis factor receptor cross-talk.* FEBS J, 2011. **278**(6): p. 888-98.

85. Kelliher, M.A., S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B.Z. Stanger, and P. Leder, *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal*. *Immunity*, 1998. **8**(3): p. 297-303.
86. Hehlgans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. *Immunology*, 2005. **115**(1): p. 1-20.
87. MacEwan, D.J., *TNF ligands and receptors--a matter of life and death*. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(4): p. 855-75.
88. Rothe, M., M.G. Pan, W.J. Henzel, T.M. Ayres, and D.V. Goeddel, *The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins*. *Cell*, 1995. **83**(7): p. 1243-52.
89. Croft, M. and R.M. Siegel, *Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases*. *Nat Rev Rheumatol*, 2017. **13**(4): p. 217-233.
90. Baud, L., J.P. Oudinet, M. Bens, L. Noe, M.N. Peraldi, E. Rondeau, J. Etienne, and R. Ardaillou, *Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide*. *Kidney Int*, 1989. **35**(5): p. 1111-8.
91. Gomez-Guerrero, C., M.J. Lopez-Armada, E. Gonzalez, and J. Egido, *Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation*. *J Immunol*, 1994. **153**(11): p. 5247-55.
92. Niemir, Z.I., M. Ondracek, G. Dworacki, H. Stein, R. Waldherr, E. Ritz, and H.F. Otto, *In situ upregulation of IL-10 reflects the activity of human glomerulonephritides*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(1): p. 80-92.
93. Yu, J., W. Gong, Y. Wu, S. Li, Y. Cui, Y. Ma, Y. Zhang, G. Yang, S. Huang, Z. Jia, and A. Zhang, *mPGES-1-derived PGE2 contributes to adriamycin-induced podocyte injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016. **310**(6): p. F492-8.
94. Donnahoo, K.K., X. Meng, L. Ao, A. Ayala, B.D. Shames, M.P. Cain, A.H. Harken, and D.R. Meldrum, *Differential cellular immunolocalization of renal tumour necrosis factor-alpha production during ischaemia versus endotoxaemia*. *Immunology*, 2001. **102**(1): p. 53-8.
95. Benador, N.M., G.E. Grau, C. Ruef, and E.P. Girardin, *Endogenous TNF-alpha modulates the proliferation of rat mesangial cells and their prostaglandin E2 synthesis*. *Microvasc Res*, 1995. **50**(2): p. 154-61.
96. Meldrum, K.K., D.R. Meldrum, K.L. Hile, E.B. Yerkes, A. Ayala, M.P. Cain, R.C. Rink, A.J. Casale, and M.A. Kaefer, *p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **281**(2): p. C563-70.
97. Timoshanko, J.R., *Intrinsic Renal Cells Are the Major Source of Tumor Necrosis Factor Contributing to Renal Injury in Murine Crescentic Glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(7): p. 1785-1793.
98. Suranyi, M.G., A. Guasch, B.M. Hall, and B.D. Myers, *Elevated Levels of Tumor Necrosis Factor-alpha in the Nephrotic Syndrome in Humans*. *Am J Kidney Dis.*, 1993. **21**(3): p. 251-259.
99. Joy, M.S., D.S. Gipson, L. Powell, J. MacHardy, J.C. Jennette, S. Vento, C. Pan, V. Savin, A. Eddy, A.B. Fogo, J.B. Kopp, D. Cattran, and H. Trachtman, *Phase 1 Trial of Adalimumab in Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS): II. Report of the FONT (Novel Therapies for Resistant FSGS) Study Group*. *Am J Kidney Dis.*, 2010. **55**(1): p. 50-60.

100. Peyser, A., N. MacHardy, F. Tarapore, J. MacHardy, L. Powell, D.S. Gipson, V. Savin, C. Pan, T. Kump, S. Vento, and H. Trachtman, *Follow-up of phase I trial of adalimumab and rosiglitazone in FSGS: III. Report of the FONT study group*. BMC Nephrology, 2010. **11**(1).
101. Chung, C.-F., T. Kitzler, N. Kachurina, K. Pessina, S. Babayeva, M. Bitzan, F. Kaskel, I. Colmegna, N. Alachkar, P. Goodyer, A.V. Cybulsky, and E. Torban, *Intrinsic tumor necrosis factor- α pathway is activated in a subset of patients with focal segmental glomerulosclerosis*. Plos One, 2019. **14**(5): p. e0216426.
102. Pedigo, C.E., G.M. Ducasa, F. Leclercq, A. Sloan, A. Mitrofanova, T. Hashmi, J. Molina-David, M. Ge, M.I. Lassenius, C. Forsblom, M. Lehto, P.-H. Groop, M. Kretzler, S. Eddy, S. Martini, H. Reich, P. Wahl, G. Ghiggeri, C. Faul, G.W. Burke, O. Kretz, T.B. Huber, A.J. Mendez, S. Merscher, and A. Fornoni, *Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury*. J Clin Invest., 2016. **126**(9): p. 3336-3350.
103. Otalora, L., E. Chavez, D. Watford, L. Tueros, M. Correa, V. Nair, P. Ruiz, P. Wahl, S. Eddy, S. Martini, M. Kretzler, G.W. Burke, A. Fornoni, and S. Merscher, *Identification of glomerular and podocyte-specific genes and pathways activated by sera of patients with focal segmental glomerulosclerosis*. Plos One, 2019. **14**(10): p. e0222948.
104. Sternberg, S.S., *Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis*. Lab Invest, 1970. **23**(1): p. 39-51.
105. Burke, J.F., Jr., J.F. Laucius, H.S. Brodovsky, and R.Z. Soriano, *Doxorubicin hydrochloride-associated renal failure*. Arch Intern Med, 1977. **137**(3): p. 385-8.
106. Lee, V.W. and D.C. Harris, *Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis*. Nephrology (Carlton), 2011. **16**(1): p. 30-8.
107. Yesair, D.W., E. Schwartzbach, D. Shuck, E.P. Denine, and M.A. Asbell, *Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species*. Cancer Res, 1972. **32**(6): p. 1177-83.
108. Wang, Y., Y.P. Wang, Y.C. Tay, and D.C. Harris, *Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1797-804.
109. Jeansson, M., K. Bjorck, O. Tenstad, and B. Haraldsson, *Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(1): p. 114-22.
110. Otaki, Y., N. Miyauchi, M. Higa, A. Takada, T. Kuroda, F. Gejyo, F. Shimizu, and H. Kawachi, *Dissociation of NEPH1 from nephrin is involved in development of a rat model of focal segmental glomerulosclerosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(5): p. F1376-87.
111. Pippin, J.W., P.T. Brinkkoetter, F.C. Cormack-Aboud, R.V. Durvasula, P.V. Hauser, J. Kowalewska, R.D. Krofft, C.M. Logar, C.B. Marshall, T. Ohse, and S.J. Shankland, *Inducible rodent models of acquired podocyte diseases*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(2): p. F213-F229.
112. Sun, Y.B., X. Qu, X. Zhang, G. Caruana, J.F. Bertram, and J. Li, *Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55027.
113. Barbey, M.M., L.M. Fels, M. Soose, K. Poelstra, W. Gwinner, W. Bakker, and H. Stolte, *Adriamycin affects glomerular renal function: evidence for the involvement of oxygen radicals*. Free Radic Res Commun, 1989. **7**(3-6): p. 195-203.

114. Guo, J., R. Ananthakrishnan, W. Qu, Y. Lu, N. Reiniger, S. Zeng, W. Ma, R. Rosario, S.F. Yan, R. Ramasamy, V. D'Agati, and A.M. Schmidt, *RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 961-72.
115. Chen, Z., X. An, X. Liu, J. Qi, D. Ding, M. Zhao, S. Duan, Z. Huang, C. Zhang, L. Wu, B. Zhang, A. Zhang, Y. Yuan, and C. Xing, *Hyperoside alleviates adriamycin-induced podocyte injury via inhibiting mitochondrial fission*. Oncotarget, 2017. **8**(51): p. 88792-88803.
116. Akis, N. and M.P. Madaio, *Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from mouse glomeruli*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2223-2227.
117. Satriano, J.A., B. Banas, B. Luckow, P. Nelson, and D.O. Schlondorff, *Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(4): p. 596-603.
118. Schiwiek, D., N. Endlich, L. Holzman, H. Holthöfer, W. Kriz, and K. Endlich, *Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines*. Kidney Int, 2004. **66**(1): p. 91-101.
119. Ohse, T., J.W. Pippin, M.R. Vaughan, P.T. Brinkkoetter, R.D. Krofft, and S.J. Shankland, *Establishment of Conditionally Immortalized Mouse Glomerular Parietal Epithelial Cells in Culture*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(10): p. 1879-1890.
120. Mundel, P., J. Reiser, A. Zuniga Mejia Borja, H. Pavenstadt, G.R. Davidson, W. Kriz, and R. Zeller, *Rearrangements of the Cytoskeleton and Cell Contacts Induce Process Formation during Differentiation of Conditionally Immortalized Mouse Podocyte Cell Lines*. Exp Cell Res, 1997. **236**(1): p. 248-58.
121. Mühe, A., *Entzündliche Mechanismen der Glomerulosklerose und sekundären interstitiellen Nierenschädigung: Rolle von Tumornekrosefaktor*. Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, 2015.
122. Jamur, M.C. and C. Oliver, *Permeabilization of Cell Membranes*. 2010. **588**: p. 63-66.
123. Wu, Y.T., H.L. Tan, Q. Huang, X.J. Sun, X. Zhu, and H.M. Shen, *zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNFalpha mediated by the PKC-MAPKs-AP-1 pathway*. Cell Death Differ, 2011. **18**(1): p. 26-37.
124. Vandenabeele, P., S. Grootjans, N. Callewaert, and N. Takahashi, *Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models*. Cell Death Differ, 2013. **20**(2): p. 185-7.
125. Di Paola, R., E. Mazzone, C. Muia, C. Crisafulli, D. Terrana, S. Greco, D. Britti, D. Santori, G. Oteri, G. Cordasco, and S. Cuzzocrea, *Effects of etanercept, a tumour necrosis factor-alpha antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(3): p. 286-97.
126. Miao, Z., L.S. Ertl, D. Newland, B. Zhao, Y. Wang, X. Zang, J.J. Campbell, X. Liu, T. Dang, S. Miao, A. Krasinski, S. Punna, Y. Zeng, J. McMahon, P. Zhang, I.F. Charo, T.J. Schall, R. Singh, and Z. Jia, *CCR2 antagonism leads to marked reduction in proteinuria and glomerular injury in murine models of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)*. PloS One, 2018. **13**(3): p. e0192405.
127. Vielhauer, V., E. Berning, V. Eis, M. Kretzler, S. Segerer, F. Strutz, R. Horuk, H.J. Grone, D. Schlondorff, and H.J. Anders, *CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome*. Kidney Int, 2004. **66**(6): p. 2264-78.
128. Jefferson, J.A. and S.J. Shankland, *The pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis*. Adv Chronic Kidney Dis, 2014. **21**(5): p. 408-16.

129. Altemtam, N., M.E. Nahas, and T. Johnson, *Urinary matrix metalloproteinase activity in diabetic kidney disease: a potential marker of disease progression*. *Nephron Extra*, 2012. **2**: p. 219-32.
130. Cheng, Z., M.H. Limbu, Z. Wang, J. Liu, L. Liu, X. Zhang, P. Chen, and B. Liu, *MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(4).
131. Patrakka, J. and K. Tryggvason, *New insights into the role of podocytes in proteinuria*. *Nat Rev Nephrol*, 2009. **5**(8): p. 463-8.
132. Mundel, P. and S.J. Shankland, *Podocyte biology and response to injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(12): p. 3005-15.
133. Li, Y., Y. Sun, C. Zhang, K. Wang, P. Shen, D. Huang, W. Ma, J. Zhang, L. Li, and L. He, *Moxibustion Alleviates Injury in a Rat Focal Segmental Glomerulosclerosis Model*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017. **2017**: p. 7169547.
134. Miller, B., V.A. Patel, and A. Sorokin, *Cyclooxygenase-2 rescues rat mesangial cells from apoptosis induced by adriamycin via upregulation of multidrug resistance protein 1 (P-glycoprotein)*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(4): p. 977-85.
135. Liu, W., B. Chen, Y. Wang, C. Meng, H. Huang, X.R. Huang, J. Qin, S.R. Mulay, H.J. Anders, A. Qiu, B. Yang, G.J. Freeman, H.J. Lu, H.Y. Lin, Z.H. Zheng, H.Y. Lan, Y. Huang, and Y. Xia, *RGMB protects against acute kidney injury by inhibiting tubular cell necroptosis via an MLKL-dependent mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(7): p. E1475-E1484.
136. Kung, G., K. Konstantinidis, and R.N. Kitsis, *Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart*. *Circ Res*, 2011. **108**(8): p. 1017-36.
137. Welz, P.S., A. Wullaert, K. Vlantis, V. Kondylis, V. Fernandez-Majada, M. Ermolaeva, P. Kirsch, A. Sterner-Kock, G. van Loo, and M. Pasparakis, *FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation*. *Nature*, 2011. **477**(7364): p. 330-4.
138. Dhib-Jalbut, S. and D.V. Kalvakolanu, *Microglia and necroptosis: The culprits of neuronal cell death in multiple sclerosis*. *Cytokine*, 2015. **76**(2): p. 583-584.
139. Dannappel, M., K. Vlantis, S. Kumari, A. Polykratis, C. Kim, L. Wachsmuth, C. Eftychi, J. Lin, T. Corona, N. Hermance, M. Zelic, P. Kirsch, M. Basic, A. Bleich, M. Kelliher, and M. Pasparakis, *RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis*. *Nature*, 2014. **513**(7516): p. 90-4.
140. Mulay, S.R., J. Desai, S.V. Kumar, J.N. Eberhard, D. Thomasova, S. Romoli, M. Grigorescu, O.P. Kulkarni, B. Popper, V. Vielhauer, G. Zuchtriegel, C. Reichel, J.H. Brasen, P. Romagnani, R. Bilyy, L.E. Munoz, M. Herrmann, H. Liapis, S. Krautwald, A. Linkermann, and H.J. Anders, *Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10274.
141. Tang, M., Z. Chen, D. Wu, and L. Chen, *Ferritinophagy/ferroptosis: Iron-related newcomers in human diseases*. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(12): p. 9179-9190.
142. Hakrrouch, S., A. Cebulla, T. Schaldecker, D. Behr, P. Mundel, and A. Weins, *Extensive Podocyte Loss Triggers a Rapid Parietal Epithelial Cell Response*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2014. **25**(5): p. 927-938.
143. Miesen, L., E. Steenbergen, and B. Smeets, *Parietal cells—new perspectives in glomerular disease*. *Cell Tissue Res*, 2017. **369**(1): p. 237-244.
144. Wang, Z., W. Huang, H. Li, L. Tang, H. Sun, Q. Liu, and L. Zhang, *Synergistic action of inflammation and lipid dysmetabolism on kidney damage in rats*. *Ren Fail*, 2018. **40**(1): p. 175-182.

145. Gomez-Chiarri, M., A. Ortiz, J.L. Lerma, M.J. Lopez-Armada, F. Mampaso, E. Gonzalez, and J. Egido, *Involvement of tumor necrosis factor and platelet-activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats*. *Lab Invest*, 1994. **70**(4): p. 449-59.
146. Wilkening, A., J. Krappe, A.M. Mühe, M.T. Lindenmeyer, N. Eltrich, B. Luckow, and V. Vielhauer, *C–C chemokine receptor type 2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2020. **35**(2): p. 227-239.
147. Jin, J.S., C.W. Yao, T.Y. Chin, S.H. Chueh, W.H. Lee, and A. Chen, *Adriamycin impairs the contraction of mesangial cells through the inhibition of protein kinase C and intracellular calcium*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(2): p. F188-94.
148. Chung, J.-J., L. Goldstein, Y.-J.J. Chen, J. Lee, J.D. Webster, M. Roose-Girma, S.C. Paudyal, Z. Modrusan, A. Dey, and A.S. Shaw, *Single-Cell Transcriptome Profiling of the Kidney Glomerulus Identifies Key Cell Types and Reactions to Injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2020. **31**(10): p. 2341-2354.
149. Boels, M.G.S., A. Koudijs, M.C. Avramut, W. Sol, G. Wang, A.M. van Oeveren-Rietdijk, A.J. van Zonneveld, H.C. de Boer, J. van der Vlag, C. van Kooten, D. Eulberg, B.M. van den Berg, I.J. DHT, and T.J. Rabelink, *Systemic Monocyte Chemotactic Protein-1 Inhibition Modifies Renal Macrophages and Restores Glomerular Endothelial Glycocalyx and Barrier Function in Diabetic Nephropathy*. *Am J Pathol*, 2017. **187**(11): p. 2430-2440.
150. Anders, H.J., V. Vielhauer, and D. Schlondorff, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease*. *Kidney Int*, 2003. **63**(2): p. 401-15.
151. Wu, H., Y. Wang, Y.C. Tay, G. Zheng, C. Zhang, S.I. Alexander, and D.C. Harris, *DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin nephropathy*. *Kidney Int*, 2005. **67**(6): p. 2178-86.
152. Daehn, I.S., *Glomerular Endothelial Cells Stress and Cross-Talk With Podocytes in the Development of Diabetic Kidney Disease*. *Front Med (Lausanne)*, 2018. **5**: p. 76.
153. Luque, Y., O. Lenoir, P. Bonnin, L. Hardy, A. Chipont, S. Placier, S. Vandermeersch, Y.C. Xu-Dubois, B. Robin, H. Lazareth, M. Souyri, L. Guyonnet, V. Baudrie, E. Camerer, E. Rondeau, L. Mesnard, and P.L. Tharaux, *Endothelial *Epas1* Deficiency Is Sufficient To Promote Parietal Epithelial Cell Activation and FSGS in Experimental Hypertension*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(12): p. 3563-3578.
154. Ohse, T., M.R. Vaughan, J.B. Kopp, R.D. Krofft, C.B. Marshall, A.M. Chang, K.L. Hudkins, C.E. Alpers, J.W. Pippin, and S.J. Shankland, *De novo expression of podocyte proteins in parietal epithelial cells during experimental glomerular disease*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. **298**(3): p. F702-11.
155. Wang, Y., Y. He, M. Wang, P. Lv, J. Liu, and J. Wang, *Role of Protease-Activated Receptor 2 in Regulating Focal Segmental Glomerulosclerosis*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **41**(3): p. 1147-1155.
156. Mason, R.M. and N.A. Wahab, *Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(5): p. 1358-73.
157. Menne, J., D. Eulberg, D. Beyer, M. Baumann, F. Saudek, Z. Valkusz, A. Wiecek, H. Haller, and G. Emapticap Study, *C-C motif-ligand 2 inhibition with emapticap pegol (NOX-E36) in type 2 diabetic patients with albuminuria*. *Nephrol Dial Transplant*, 2017. **32**(2): p. 307-315.
158. de Zeeuw, D., P. Bekker, E. Henkel, C. Hasslacher, I. Gouni-Berthold, H. Mehling, A. Potarca, V. Tesar, H.J.L. Heerspink, and T.J. Schall, *The effect of CCR2 inhibitor*

CCX140-B on residual albuminuria in patients with type 2 diabetes and nephropathy: a randomised trial. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(9): p. 687-696.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all den Personen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und mir dies ermöglicht haben. Insbesondere den folgenden Personen:

Meine Eltern, Petra und Joachim. Ihr habt mich bedingungslos auf allen Wegen unterstützt und mir emotional sowie fachlich mit eurer ganzen Tatkraft zur Seite gestanden und mir Halt gegeben.

Besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Volker Vielhauer für die ausgezeichnete Betreuung während meiner Promotionen, die klugen Ideen und wissenschaftlichen kritischen Diskussionen, die mich gefördert und gefordert haben. Ich denke immer wieder gerne an meine tolle Zeit im Labor zurück.

Weiterer großer Dank geht an Nuru Eltrich für die geduldige Einarbeitung in alle Methoden sowie die wertvolle Unterstützung bei Problemen und Fragen.

Meinen Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen danke ich für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor und all die schönen Stunden, die wir dort verbracht haben.

Professor Dr. Hans-Joachim Anders möchte ich danken für die freundliche Mitbenutzung seines Labors. Dank geht auch an Santhosh Kumar für die hilfsbereite Unterstützung bei der Anzucht der Podozyten und Parietalzellkulturen.

Zuletzt danke ich Charles Smith für die bedingungslose Liebe und Unterstützung von Anfang bis Ende meiner Promotion.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Mechanismen von glomerulärem Zelltod, Entzündung und Fibrosierung bei der Adriamycin-induzierten Glomerulosklerose in 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.

München, den 04.11.2022

Ort, Datum

Julia Krappe

Unterschrift Doktorandin

Publikationen

Wilkening A, Krappe J, Mühe AM, Lindenmeyer MT, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V.

C-C chemokine receptor type 2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2020 Feb 1;35(2):227-239

Paal M, Arend FM, Lau T, Hasmann S, Soreth-Rieke D, Sorodoc-Otto J, Beuthien W, Krappe J, Toepfer M, von Gersdorff G, Thaller N, Rau S, Northoff B, Teupser D, Bruegel M, Fischereeder M, Schönermarck U.

Antibody response to mRNA SARS-CoV-2 vaccines in haemodialysis patients. *Clin Kidney J.* 2021 Jul 6;14(10):2234-2238

Sams LE, Krappe J, Czihal M, Hoppe JM.

Zieve syndrome presenting with lipaemia and treated by plasmapheresis. *BMJ Case Rep.* 2022 Apr 6;15(4):e245257