Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Der Einfluss von Mitochondrien auf die Aktivierung des Insulinsignalwegs im Podozyten am Beispiel einer OMA1 Deletion

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Kristina Schönfelder
aus Düsseldorf

promoviert am 20. September 2021

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. P. Brinkkötter
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. C. Niessen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. med. Alexander Kuczkowski (Betreuer)
Universitätsprofessor Dr. med. Paul Brinkkötter (Doktorvater)

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 21.01.2021 Unterschrift: *Kristina Schönfelder*

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Paul Brinkkötter und Herrn Dr. med. Alexander Kuczkowski von mir selbst ausgeführt worden.

Bei der Gewinnung von murinen Glomeruli Lysaten sowie der Gewinnung von murinem Blut mittels kardialer Punktion habe ich Herrn Dr. med. Alexander Kuczkowski assistiert.

Die Auswertung der PAS Färbungen erfolgte in Kooperation mit PD Dr. med. J. Becker (Uniklinik Köln) und die Auswertung der EM Bilder erfolgte in Kooperation mit Univ.-Prof. W. Bloch (Sporthochschule Köln).

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Erklärung ... 2
Inhaltsverzeichnis ... 5
Abkürzungsverzeichnis ... 7
1 Einleitung ... 10
1.1 Prolog ... 10
1.2 Grundlagen: Podozyten und der Schlitzmembrankomplex der Niere ... 11
1.3 Der Insulinsignalweg im Podozyten und Einflüsse auf die Pathogenese der Diabetischen Nephropathie ... 13
1.3.1 Einfluss von Insulin auf Podozyten ... 13
1.3.2 Die Insulinkaskade im Podozyten ... 14
1.3.3 Bedeutung des nachgeschalteten Effektors mTOR ... 15
1.4 Mitochondriale Dynamik ... 16
1.4.1 Einfluss von Prohibitinen auf die mitochondriale Fusion und Fission ... 17
1.4.2 OMA1 - Zentraler Regulator der mitochondrialen Dynamik und Stressantwort ... 17
1.5 Der Einfluss von Mitochondrien auf metabolische Signalwege in der Niere ... 20
1.6 OMA1 im Podozyten - Vordaten aus dem Nephrologischen Forschungslabor ... 23
2 Material und Methoden ... 25
2.1 Materialien ... 25
2.1.1 Laborbedarf allgemein ... 25
2.1.2 Puffer und Lösungen ... 27
2.1.3 Materialien ... 30
2.1.4 Geräteliste ... 31
2.1.5 Software ... 33
2.1.6 Zellkultur ... 33
2.1.6.1 Zelllinie ... 33
2.1.6.2 Zellkulturmedien ... 34
2.1.6.3 Kits ... 35
2.1.6.4 Antikörper ... 35
2.1.7 Mausarbeit ... 36
2.1.7.1 Oligonukleotide zur Genotypisierung ... 36
2.1.7.2 Kits und Assays ... 36
2.1.7.3 Antikörper ... 37
2.2 Methoden ... 38
2.2.1 Zellkultur ... 38
2.2.1.1 Zellen ziehen ... 38
2.2.1.2 Behandlung der Zellen mit Doxycyclin ... 39

2.2.1.3 Bestimmung der Proteinmenge ... 39
2.2.1.4 SDS Page Gelelektrophorese und Western Blot ... 39
2.2.1.5 Antikörperfärbung zum immunologischen Nachweis von Proteinen ... 40
2.2.1.6 IF Färbung HSMPs auf FoxO3 ... 41
2.2.2 Mausstudien ... 42
2.2.2.1 Die OMA1/PHB2 Knockout Maus ... 42
2.2.2.2 Nachweis des $OMA1^{ko}$ in Glomeruli Lysaten ... 42
2.2.2.3 Genotyping ... 43
2.2.2.4 Überlebensstudie ... 44
2.2.2.5 Urinanalysen ... 44
2.2.2.6 Blutanalysen ... 44
2.2.2.7 Gewebefärbungen ... 45
2.2.2.7.1 PAS-Färbung: ... 45
2.2.2.7.2 IHC-Färbung: ... 45
2.2.2.7.3 Statistische Auswertung der Gewebeanalysen ... 46
2.2.2.8 EM Bilder ... 46
2.3 Statistische Auswertungsverfahren ... 47
3 Ergebnis ... 48
3.1 Eine PHB2 Reduktion führt zu einem kaskadenartig aktivierten Insulinsignalweg in Podozyten ... 48
3.2.1 Kein Überlebensvorteil durch den Doppelknockout von PHB2 und OMA1 ... 52
3.2.2 Der Doppelknockout von PHB2 und OMA1 im Podozyten führt zu einer gestörten glomerulären Architektur mit renaler Funktionseinschränkung bei den Mäusen ... 56
3.3 Aktivierung des mTOR Signalwegs in Einzel- und Doppelknockout Mäusen ... 64
4 Diskussion ... 67
4.1 Ein PHB2 Knockdown führt zu einem kaskadenartig aktivierten Insulinsignalweg im Podozyten ... 67
4.2. Der doppelte Verlust von OMA1 und PHB2 im Podozyten führt nicht zu einem protektiven Effekt ... 70
4.3 Aktivierung des mTOR Signalwegs in Einzel- und Doppelknockout Mäusen ... 74
5 Conclusio ... 79
6. Literaturverzeichnis ... 80
7. Anhang ... 94
7.1 Abbildungsverzeichnis ... 94
7.2 Tabellenverzeichnis ... 94
Danksagung ... 95
Curriculum vitae ... 96

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AFG3L2	ATPase Family Gene 3-Like 2
Akt	Proteinkinase B/RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
Amp	Ampere
Bad	Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death
bac	C protein immunoglobuin-A-binding beta antigen
bax	Bcl-2 associated x protein
bp	Base pairs
BSA	Bovines Serum Albumin
BUN	Blood Urea Nitrogen
C. elegans	Caenorhabitans legans
CECAD	Cluster of Excellence - Cellular Stres Response in Aging Associated Diseases
cDNA	Complementary DNA
CD2AP	Cluster of differentiation 2 adapter protein
ddH_2O	Doppelt destilliertes Wasser
DAB	3, 3′ diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRP1	Dynamin elated protein 1
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2
EM	Elekronenmikroskop
FAT1	Protocadherin FAT1
FBS	Fetal bovines Serum
Fl/fl	Flox/flox
FoxO	Forkhead-Box Protein O
Fp	Foward primer
FP	Fußfortsatz
FSGS	Fokal segmetale Glomeruloskleose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GSK3	Glykogensynthase Kinase 3
H	Stunde
HEBS	Hepes gepufferte Salzlösung
Het	heterozygot
HFD	High fat diet

Hp	hairpin
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HSMP	Hitzesensitive Mauspodozyten
IF	Immunfluoreszens
IFN	Interferon
Igf1	Insulin-like-growth-factor-1
IHC	Immunhistochemie
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IR	Insulinrezeptor
IRS2	Insulin receptor substrate 2
i.v.	intravenös
kb	Kilo base pairs
KD	Knockdown
KO	Knockout
MAPK	Mitogen activated kinase
MEF	Mouse embryonic fibroblast
Min	Minute
Ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mnf1/2	Mitochondrial nucleoid factr ½
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1/2	mammalian Target of Rapamycin complex 1/2
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDS	Normal donke Serum
NKO	Neuronen spezifischer KO
neph1	Kin of IRRE protein 1
NPHS1	Nephrin
OMA1	Overlapping activity with m-AAA proteases
OMM	Äußere Mitochondrienmembran
OPA1	Optic atrophy 1
L-OPA1	Lange OPA1 Formen
S-OPA1	Kurze OPA1 Formen
OXOPHOS	Oxidative Phosphorylierung
p38	Protein 38
p85	Protein 85
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphat buffert saline
PBST	Phosphat buffert saline + Titon
PCR	Polymerase chain reaction
PDK1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
PFA	Paraformaldehyd
PHB	Prohibitin

PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
Pko	Podozyten spezifischer Knockout
PMSF	Phenlmethylsulfonil-Fluorid
PVFD	Polyvinylidenfluorid
RAPTOR	Egulatory associated protein of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
Rp	Reverse primer
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S6	Ribosomal protein S6
SD	Standarddeviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
SLP2	Stomatin like protein 2
SM	Schlitzmembran
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglycerin
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRCP	Transient receptor potential channel
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
W	Watt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
WT1	Wilms Tumorprotein 1
YME1L	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L
ZO-1	Zoonula occludens protein 1

1 Einleitung

1.1 Prolog

Erkrankungen des Nierenfilters sind eine der häufigsten Ursachen für chronische Nierenfunktionsstörungen. Dabei ist die diabetische Nephropathie eine der Hauptursachen für ein terminales Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit in der westlichen Welt. Dies führt zu einer enormen physischen und psychischen Bürde für die Betroffenen mit drastischer Einschränkung der Lebensqualität. Zudem sind die damit verbundenen Behandlungskosten eine große Belastung für das Gesundheitssystem. Im Jahr 2017 gab es knapp 86.000 ständig dialysepflichtige Menschen in Deutschland [1]. Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion haben je nach Stadium der Niereninsuffizienz eine bis zu 18,6% erhöhte Gesamtmortalität [2]. In diesem Zusammenhang kommt der Erforschung des Nierenfilters eine große Bedeutung zu. Die Struktur des Nierenfilters wird durch Podozyten gebildet. Dabei handelt es sich um einzigartige, viszerale Epithelzellen, die zwischen ihren Fußfortsätzen die Schlitzmembran aufspannen. So bilden sie zusammen mit der glomerulären Basalmembran und dem fenestrierten Endothel den Nierenfilter.

In der Literatur gibt es zunehmend Hinweise für die Bedeutung von Mitochondrien auf die Regulation von metabolischen Signalwegen im Podozyten, die essentiell für die Integrität der Podozyten sind [3,4]. Da die Nahrungszufuhr im Organismus nicht konstant ist, passen sich Mitochondrien an den Energiebedarf der Zellen an [5]. Sie befinden sich in einem dynamischen Wechsel aus Verschmelzung zu langen Mitochondrien und Spaltung zu kleinen Mitochondrien. Die Fusion der Mitochondrien gilt als protektiver Effekt für ihre Funktion [6]. Die Zinkmetalloprotease OMA1 an der inneren Mitochondrienmembran führt zur vermehrten Spaltung der Mitochondrien [5]. In unterschiedlichen kardialen und neurodegenerativen Krankheitsmodellen hat sich die Deletion von OMA1 als protektiv erwiesen. Sie führt zum Beispiel zur Neuroprotektion bei Mitochondrienschaden mit deutlicher Verlängerung der Lebensspanne der Versuchstiere [7]. Publizierte Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen einem podozytären Mitochondrienschaden und dem Insulinsignalweg gibt [3]. Das zusätzliche Abschalten des Insulinsignals führt zu einem längeren Überleben der Mäuse [3]. In der vorliegenden Dissertation habe ich mich anhand eines Mausmodells mit dem Einfluss einer OMA1 Deletion auf einen Mitochondrienschaden im Podozyten beschäftigt, sowie mit der Auswirkung auf den Insulinsignalweg. Das bessere Verständnis der podozytären Signalwege ist von zunehmender Bedeutung für die Identifikation neuer medikamentöser Ansatzpunkte zur Behandlung von Schäden am Nierenfilter.

1.2 Grundlagen: Podozyten und der Schlitzmembrankomplex der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ im Retroperitoneum. Sie erfüllt mannigfaltige, wichtige Funktionen für den Körper – unter anderem reguliert sie den Wasser- und Elektrolythaushalt, den Säure-Basen-Haushalt, ist als endokrines Organ aktiv, reguliert den Blutdruck, betreibt Glukoneogenese, filtert und reabsorbiert wichtige Metabolite wie Glukose und ist mitverantwortlich für die Entgiftung des Körpers. Um diese vielseitigen Aufgaben erfüllen zu können, benötigt sie einen diffizilen Aufbau, der auf diese diversen Anforderungen zugeschnitten ist.

Die Funktionseinheiten der Niere sind die Nephrone, von denen jede Niere etwa eine Million besitzt. Diese Nephrone können nochmal unterteilt werden in die Glomeruli im Kortex und die Tubuli im Nierenmark. Täglich werden die Glomeruli, die mikrovaskulären Einheiten der Niere, von 4.000 bis 5.000 Litern Blut perfundiert. Die Aufgabe der Glomeruli besteht in der Filtration des Blutplasmas und der Produktion des nahezu proteinfreien Primärharns. Die 180 Liter Primärharn, die am Tag produziert werden, können im Tubulussystem auf 1 bis 3 Liter Urin pro Tag konzentriert werden. Die Podozyten, viszerale Epithelzellen, umschlingen mit ihren langen, interdigitiernden Fußfortsätzen vollständig eine Glomeruluskapillare (**Abb. 1**) [8]. Zwischen den Fußfortsätzen spannt sich über einen regelmäßigen Spalt von 40 nm die Schlitzmembran [8]. Diese Schlitzmembran ist ein hochspezialisierter Zell-Zell-Kontakt und fungiert als Teil des dreischichtigen Nierenfilters mit einem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten [8]. Die Filterkriterien von Proteinen sind ihre Ladung, Form und Größe [9,10].

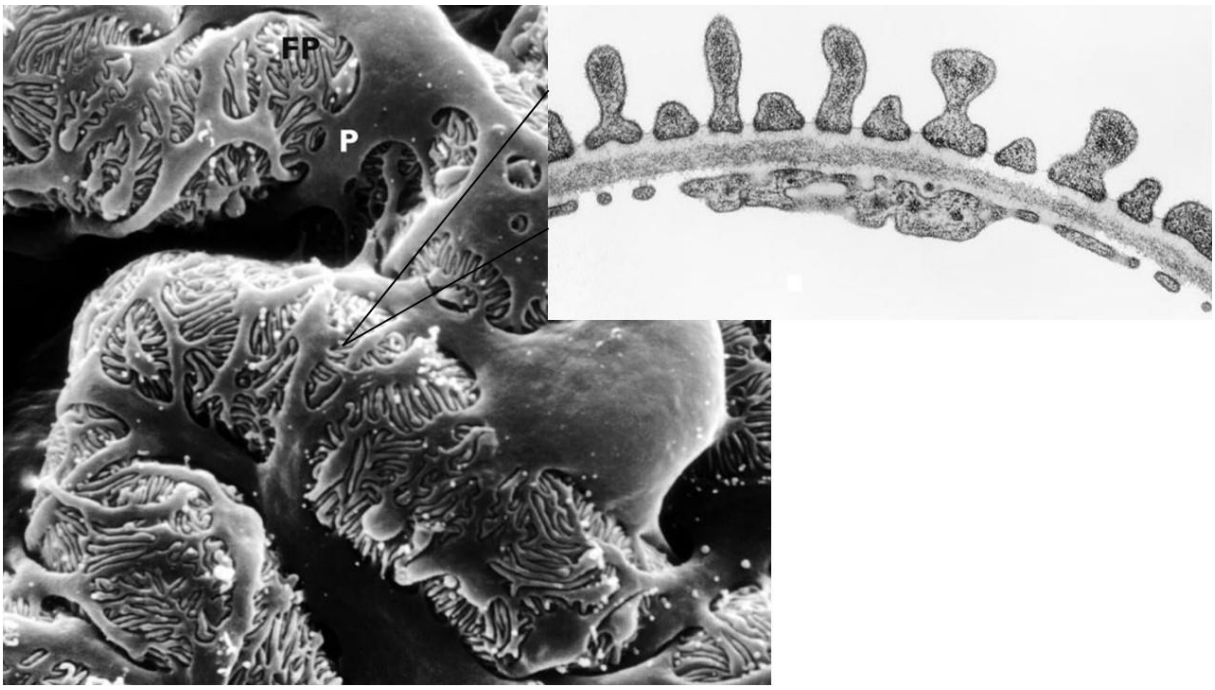


Abbildung 1: Podozyten und Schlitzmembran

Linkes Bild: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Ratten Glomerula. Die dem Urin zugewandte Seite ist von Podozyten (P) mit ihren interdigitiernden Fußfortsätzen (FP) bedeckt. Vergrößerung: x 6000 [8]. Rechtes Bild: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme des glomerulären Filters aus einer Rattenniere. Von unten nach oben: fenestriertes Endothel, GBM und podozytäre Fußfortsätze mit Schlitzmembran. Vergrößerung: x 48.000 [8].

Die Schlitzmembran ist ein flexibler Zell-Zell-Kontakt mit einer aktiv verstellbaren Barriere für Proteine [11,12]. So existiert zwischen dem Zytoskelett des Podozyten und der Schlitzmembran eine dynamische Verbindung [13]. Die Signalwege an der Schlitzmembran sind essentiell, da sie die Funktion der Podozyten regulieren [12,14]. Alle Fußfortsätze des Podozyten bestehen aus einem kontraktilen Netzwerk zusammengesetzt aus Myosin, Talin, Aktin, Paxillin und Vincullin [13,15]. Um ein Sieb zu bilden, müssen die flüssigen Bestandteile der Plasmamembran über Proteine der Schlitzmembran am Aktin - Zytoskelett der Podozyten verankert werden [12,16,17]. Die Komponenten für die glomeruläre Basalmembran werden fast ausschließlich im Podozyten produziert. Dazu zählen Kollagen Typ IV [18], Fibronektin und unter anderem Laminin β2 [19]. Außerdem hat der Podozyt eine sekretorische Funktion. Er gibt VEGF-A und Angiopoetin-I ab [20,21].

Zu den wichtigsten Vertretern des Schlitzmembrankomplexes gehören Nephrin [22–24] und Podocin [25], die miteinander an der Schlitzmembran interagieren (**Abb. 1**) [26–28]. Die

Schlitzmembran wird durch die Interaktion von Nephrin und neph1 gebildet. Dieser Komplex aus Nephrin und neph1 ist konserviert von der Fliege über Nematoden bis hin zu Säugetieren [14]. Die kürzeren neph1 Moleküle (23 nm) haben einen breiten Kontakt zur GBM. Sie werden überlappt von den längeren Nephrin Molekülen (45 nm), die im apikalen Teil der Podozyten der Form der Fußfortsätze folgen [11].

Podocin gehört zur Superfamilie der *Stomatin-like* Proteine und formt Megadalton - Komplexe, die direkt an der Schlitzmembran lokalisiert sind [26,29]. Über die Bildung von spezialisierten Lipid - Mikrodomänen, rekrutiert Podocin Nephrin und vereinfacht dessen Signalwirksamkeit [16]. Nephrin ist ein transmembranäres Adhäsionsprotein, das zur Familie der Immunglobuline zählt [12,22]. Neben seiner strukturellen Aufgabe ist es auch verantwortlich für die Kontrolle der Zytoskelettarchitektur und die Entwicklung des Podozyten [16,26]. Eine Mutation im *NPHS1*, das für Nephrin kodiert, führt zum angeborenen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ [22].

1.3 Der Insulinsignalweg im Podozyten und Einflüsse auf die Pathogenese der Diabetischen Nephropathie

1.3.1 Einfluss von Insulin auf Podozyten

Der erste Zusammenhang zwischen dem Insulinsignal und einem Podozytenschaden in Form einer Proteinurie ist 1980 beobachtet worden. Nachdem Mogensen et al. Patienten Insulin i.v. verabreicht hatten, kam es bei den Patienten zu einer doppelt so hohen renalen Albumin Exkretion bei gleichem Serumglukoselevel [30]. Seitdem ist sehr viel Forschungsarbeit zur Aufklärung dieses Mechanismus geleistet worden. Der Zusammenhang, der im Menschen beobachtet worden ist, konnte im Zell- und im Tiermodell nachgestellt werden [31,32]. Rattenpodozyten reagieren auf einen gesteigerten Insulinreiz mit einer Fußfortsatzverbreiterung - dem Podozyten *Effacement* - und Hypertrophie [33,34]. Die Struktur der Schlitzmembran geht verloren und es kommt zur Proteinurie [17,35]. Bei Diabetes mellitus ist die Applikation von Insulin eine wichtige Therapiemöglichkeit für Typ II Diabetiker und eine lebensnotwendige für Typ I. In Podozyten mit isolierter Hyperinsulinämie wird der Insulinrezeptor im Gegensatz zu Podozyten, die einem zu hohen Glukoselevel ausgesetzt werden, degradiert und nicht mehr exprimiert [32]. Die metabolische Maladaptation führt zu chronischen Nierenschäden. Für beide Diabetes Formen konnte eine Podozytopenie gezeigt werden durch das Ablösen der Podozyten von der glomerulären Basalmembran [33,36,37]. Dieser Verlust an intakten Podozyten ist invers mit dem Ausmaß der Albuminurie korreliert [33,36,38,39]. Podozyten haben als terminal entdifferenzierte Zellen nur begrenzt die

Möglichkeit, sich selbst zu erneuern. Der fortschreitende Podozytenverlust führt zum histologischen Bild der Glomerulosklerose [40]. Entscheidend für die progressive Nierenschädigung ist nicht die Hyperglykämie, sondern der gestörte Glukosemetabolismus im Podozyten [41]. Insulin ist in der Lage, die zelluläre Struktur des Podozyten aufrecht zu erhalten. Darüber hinaus kann Insulin in gesunden Podozyten über eine Umorganisation der Zellstruktur, den Podozyten schnell an veränderte metabolische Prozesse anpassen [42,43]. So kontrolliert Insulin über die Expression von TRCP6 an der Oberfläche des Podozyten dessen Kontraktilität [44]. Des Weiteren induziert Insulin die ROS Produktion im Podozyten, die sich in einer veränderten Permeabilität der Filterfunktion der Podozyten zeigt [45].

1.3.2 Die Insulinkaskade im Podozyten

Dass die Podozyten primärer Ausgangspunkt dieser Signalkaskade sind, wurde durch Studien von Coward et al. 2005 verdeutlicht. Der Podozyt ist im Glomerulum einzigartig dafür verantwortlich, dass Glukose insulinabhängig über die Translokation der Glukoserezeptoren GLUT4 und GLUT1 in den Podozyten aufgenommen wird [42]. Diese Beobachtung wird unterstützt durch die Ergebnisse von Mima et al., die zeigen, dass die Expression des Insulinrezeptors und des Insulinrezeptorsubstrats IRS-1 im Podozyten das höchste Level aufweist im Vergleich zu Mesangium- oder zu Endothelzellen in vitro [46]. Ausgangspunkt der durch Insulin ausgelösten Signalkaskade ist der Insulinrezeptor, der in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen kann - IR-A und IR-B (Überblick **Abb. 4**). Der Insulinrezeptor kann auch einen Hybridrezeptor mit dem IGF1 - Rezeptor bilden [47]. Der IGF1 - Rezeptor ist ein wichtiger Regulator in der Homöostase des Podozyten. Sein Ausschalten führt zu weniger und kleineren Podozyten [48–50]. Die Aktivierung der Insulinrezeptoren führt im Weiteren über die Insulinrezeptorsubstrate 1 bis 4 zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege. Die Signalwege über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und den Weg über die Mitogen-aktivierte-Kinase (MAPK) sind äquivalent zu den durch Insulin ausgelösten Signalwegen in Fett- und Muskelzellen, die ebenfalls zu den schnellen Insulin - sensitiven Zellen zählen [51]. Über die PI3K kommt es zu einer Rekrutierung der Untereinheit p85 zur Zellmembran und zu einer PIP3 - Produktion, wodurch die PDK1 aktiviert wird. PDK1 initiiert die Phosphorylierung von AKT an der Stelle Thr308. mTORC2 wird ebenfalls über die PI3K aktiviert und phosphoryliert AKT an der Stelle Ser473 [52]. Weitere Funktionen, die von AKT beeinflusst werden, sind die zelluläre Glukoseaufnahme [53], die Aktivierung der Glykogensynthetase [54] und die Ausschüttung von Überlebenssignalen durch die FoxO - Transkriptionsfaktoren [55]. Außerdem wird AKT über Podocin und eine Interaktion von Nephrin und CD2AP mit p85 stimuliert [16]. Als Effektor hemmt AKT den Transkriptionsfaktor FOXO im Nukleus. Fällt

das Signal über AKT weg, wird FOXO aktiviert und verlässt den Nukleus. FOXO wiederum inhibiert mTORC1 und aktiviert AKT. So verhindert FOXO die Überaktivierung von mTORC1 und eine Energiekrise in der Zelle [56]. Ein podozytärer AKT Knockout führt zu einem schnelleren Voranschreiten von glomerulären Erkrankungen [57,58]. In immortalisierten humanen Podozyten läuft die Signalweiterleitung verstärkt über IRS2, welches durch Insulin phosphoryliert wird. Ein IRS2 Knockout im Podozyten führt zu Insulinresistenz, geringerer Glukoseaufnahme, gestörter Translokation von GLUT4, verringertem F-Aktin-Remodelling und einer beeinträchtigten Aktivität von AKT. Der Phänotyp präsentiert sich mit einer Albuminurie mit 12 Wochen und histologischen Zeichen einer diabetischen Nephropathie [59]. Durch den Verlust der Insulin stimulierten AKT Phosphorylierung fällt das Überlebenssignal durch den AKT Signalweg weg und die Podozyten sind empfindlicher für den Zelltod [37]. Tejada et al. konnten ebenfalls beobachten, dass das Level an phosphoryliertem AKT in den Glomeruli von 12 Wochen alten diabetischen Mäusen geringer ist als bei gesunden Kontrolltieren. Die Podozyten sind nicht in der Lage auf einen Insulinstimulus über den Insulinrezeptor adäquat zu reagieren [37]. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Insulinsignalweg im Podozyten über aktivierende Phosphorylierungen der entsprechenden Proteine im MAPK- und im PI3K - Weg abläuft. Dabei wird die Insulinantwort im Podozyten von zahlreichen extrinsischen Signalen moduliert, wie z.B. Adiponektin [60]. Die Faktoren, die mit einer Insulinresistenz assoziiert sind, sind gewebespezifisch [61].

1.3.3 Bedeutung des nachgeschalteten Effektors mTOR

Ein weiterer interessanter Faktor in der Weiterleitung des Insulinsignals über den PI3K Weg ist der Komplex mTOR, der sich aus den beiden Untereinheiten mTORC1 und mTORC2 zusammensetzt. Die beiden Einheiten unterscheiden sich in ihrer Wirkung und Funktion sowie in ihrer Rapamycin (mTOR Inhibitor) Sensitivität [62,63]. mTORC1 wird durch Insulin und Wachstumshormone reguliert und unterstützt den Energiemetabolismus mit Lipogenese und Proteinsynthese. mTORC2 wird ebenfalls über Wachstumsfaktoren aktiviert und ist entscheidend für die Architektur des Zytoskeletts und das Zell Überleben [62,63]. Der mTOR Komplex ist permanent im Podozyten aktiv [64]. Der Signalweg über mTOR ist für den Podozyten ein wichtiger Regulator, der die Funktionsfähigkeit und Anpassung der Zelle gewährleistet und darüber hinaus durch das intrazelluläre Glukoselevel beeinflusst wird [65,66]. Unter normalen Bedingungen in vitro zeigt sich nur eine geringe mTORC1 Aktivität in Podozyten. In Mausmodellen mit einer diabetischen Nephropathie konnte allerdings eine gesteigerte mTORC1 Aktivität beobachtet werden mit glomerulärer Hypertrophie [66]. Diese führt zur Proliferation des Mesangiums, größeren Podozyten mit fehlenden Fußfortsätzen,

Glomerulosklerose, einem Fibroblasten Phänotyp von Podozyten und zur Ablösung der Podozyten von der Basalmembran. Die durch mTORC1 verursachten Schäden, sind bis zu einem gewissen Grad reversibel. Aber auch die vollständige mTORC1 Deletion in Mäusen führt zu Proteinurie und Glomerulosklerose. Die mTORC1 Deletion entspricht dem Phänotyp eines podozytären Insulinrezeptor Knockout [65]. Im Tiermodell konnten Welsh et al. 2010 zeigen, dass der podozytäre Verlust des Insulinsignals über einen podozytären Insulinrezeptor Knockout alle Merkmale der diabetischen Nephropathie wiederspiegelt [43]. Dieser Phänotyp kann durch den zusätzlichen Knockout von mTORC2 gesteigert werden [66].

Wie aus den bisher zusammengetragenen Informationen ersichtlich wird, führt sowohl die mTOR Suppression als auch die mTOR Überaktivität zu glomerulären Erkrankungen [65–67]. Durch die Inhibition von mTOR kommt es zur Inhibition der Autophagie von Mitochondrien. Daraus resultieren defekte Mitochondrien, die wiederum eine Proteinurie hervorrufen [67]. Weiterhin hat das mTOR Signal einen dosisabhängigen Effekt auf die Funktion der Mitochondrien im Hinblick auf die mitochondriale ATP Produktion [68]. Eine Homöostase der mTOR Komplexe ist wichtig für die korrekte Funktion des Podozyten [65]. Demnach kann der podozytenspezifsche Knockout von mTORC1 eine progressive diabetische Nephropathie verhindern und die Podozyten schützen. In mTORC1 KO Mäusen ist die Phosphorylierung von S6 herabreguliert und die Phosphorylierung von AKT gesteigert [65]. Meuwly et al. sahen in Endothelzellen eine Aktivierung des MAPK Signalwegs nach der Blockade von mTORC1, was sich positiv auf Angiogenese hemmende Effekte auswirkt [69]. Es zeigt sich auch eine zunehmende Bedeutung im Zusammenspiel der beiden Signalwege besonders in der Krebsforschung [70–73], wie z.B. beim Nierenzellkarzinom [74]. mTORC1 reguliert auch die Expression von Nephrin. Eine abnormale mTORC1 Aktivität kann zu einer falschen Lokalisation von Nephrin im Plasma führen [66]. Zudem ist Nephrin ein mTOR Inhibitor und beeinflusst den Insulinsignalweg auch bei Insulinrezeptor Knockout [75]. Somit ist mTORC1 wichtig für podozytäres Wachstum und die Entwicklung, mTORC2 ist wichtig für die Stressantwort und Stressadaptation im Podozyten [65]. Eine mTOR Inhibition hat keinen Effekt auf die Expression des Insulinrezeptors. Allerdings werden sowohl die korrekte Expression von Nephrin als auch der Insulinrezeptor für die Insulin Sensitivität des Podozyten benötigt [32].

1.4 Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien sind überlebenswichtige Organellen, die vor vielen Milliarden Jahren über Endosymbiose in eukaryotische Zellen aufgenommen worden sind [76]. Ihre unterschiedlichen Funktionen umfassen die ATP Synthese durch OXPHOS, die ROS Kontrolle, die Calcium Homöostase und die Kontrolle der Apoptose [6]. Zudem spielen Mitochondrien eine zentrale

Rolle im Metabolismus der Zelle. Aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben, äußern sich mitochondrielle Mutationen in sehr unterschiedlichen Phänotypen und sind assoziiert mit Krebs, neurodegenerativen Erkrankungen und metabolischen Krankheitsbildern [77]. Die ständige Qualitätskontrolle und Anpassung an den Energiebedarf der Zelle über Fusion und Fission ist für Mitochondrien essenziell.

1.4.1 Einfluss von Prohibitinen auf die mitochondriale Fusion und Fission

Vor dreißig Jahren entdeckte McChung et al. die Prohibitine [78]. PHB1 und 2 liegen als Ringkomplex in der inneren Mitochondrienmembran, gehören zur Superfamilie der Membranproteine und übernehmen die Rolle eines Gerüsts [79–81]. Dabei sind Prohibitine notwendig zur Aufrechterhaltung der tubulären mitochondrialen Struktur und der Cristae Morphologie [5,81,82]. Das Gleichgewicht zwischen Fusion und Fisson reguliert PHB2 über die Kontrolle der Prozessierung von OPA1 an der inneren Mitochondrienmembran über die Inhibition der Zinkmetalloprotease OMA1 [5,83,84]. Durch die langen OPA1 Formen wird die Fusion und durch die kurzen OPA1 Formen die Fission der Mitochondrien gewährleistet [85]. Drüber hinaus beeinflusst OPA1 die Cristae Morphologie und die Stabilität der mitochondrialen DNA. OPA1 Mutationen im Menschen sind in neurodegenerativen Erkrankungen des Nervus opticus beschrieben worden. Eine der wichtigsten Fragen ist allerdings noch unbeantwortet - bisher weiß man noch nicht, worauf der protektive Effekt über OPA1 zurückzuführen ist [6].

1.4.2 OMA1 - Zentraler Regulator der mitochondrialen Dynamik und Stressantwort

OMA1 ist eine Metalloprotease an der inneren Mitochondrien Membran, die ATP unabhängig als Bestandteil des mitochondrialen Qualitäts-Kontroll-Systems fehlgefaltete Proteine prozessiert [86]. Morphologisch erscheinen OMA1 Knockout Zellen unauffällig und zeigen kein eingeschränktes Wachstum [85,86]. Aktiviert wird OMA1 durch diverse Stimuli wie den Verlust mitochondrialer DNA, zellulären ATP-Mangel, Hitze und den Verlust der Membran Spannung [87–90]. Ein gemeinsamer Nenner der unterschiedlichen OMA1-Aktivierungen ist ihr Bezug zu zellulärem Stress [87,89]. Somit ist die Aktivierung von OMA1 die zelluläre Antwort auf mitochondriale Dysfunktionen [89]. Dabei degradiert OMA1 die Protease YME1L, die unter physiologischen Bedingungen für das Fusions - Fissions - Gleichgewicht von Mitochondrien sorgt (**Abb. 2**) [91]. Darüber hinaus besteht auch eine reziproke Regulation zwischen OMA1 und YME1L; OMA1 wird von YME1L abgebaut, wenn es zur Membrandepolarisation kommt [92]. So verhindert YME1L eine Akkumulation von OMA1 und eine Fragmentierung von Mitochondrien [93]. Durch die Aktivierung von OMA1 wird in Eukaryoten, im Gegensatz zu Hefen, OPA1 an der S1 Schnittstelle auf Exon 5 prozessiert [87–89]. Dies führt zu den OPA1-Splicevarianten 1 und 7 [89]. Neben der stressinduzierten

Aktivierung prozessiert OMA1 L-OPA1 auch kontinuierlich unter normalen Bedingungen [89]. Inhibiert wird die Aktivität von OMA1 durch PHB2 [94]. Unter physiologischen Bedingungen ist OMA1 wenig aktiv. Kommt es allerdings zu Zellstress, wird die Inhibition von PHB2 auf OMA1 aufgehoben. Demnach ist OMA1 ein zentraler Regulator zur Steuerung der mitochondrialen Dynamik und Stressantwort je nach metabolischer Lage der Zellen.

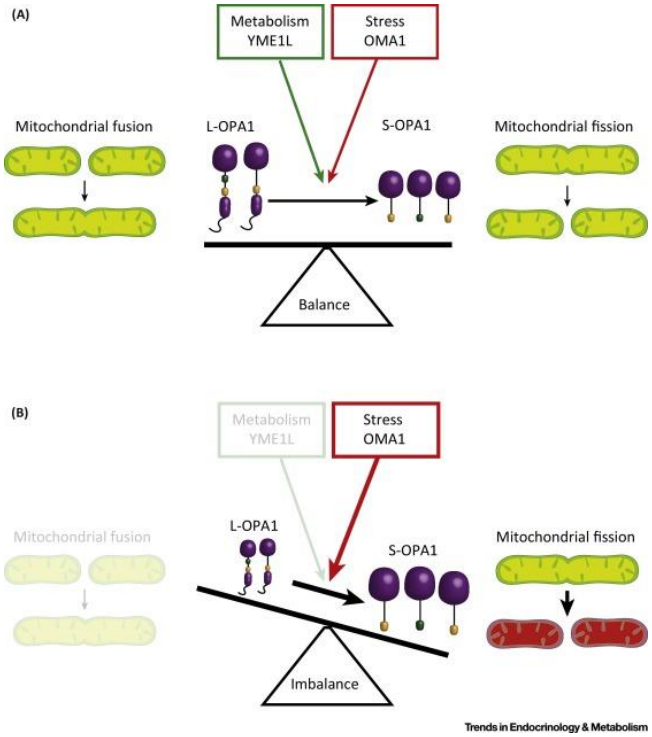


Abbildung 2: Gleichgewicht langer und kurzer OPA1 Formen

A) OMA1 und YME1L prozessieren L-OPA1- und S-OPA1 Formen in einem ausgewogenen Verhältnis.

B) Unter Stressbedingungen überwiegt die Prozessierung durch OMA1. Es werden vermehrt L-OPA1 Formen zu S-OPA1 Formen degradiert, was zu einer gesteigerten Fission und fragmentierten Mitochondrien führt [6].

OMA1 scheint ein verbindender Faktor zwischen mitochondrialer Funktion und dem TOR-Signalweg zu sein [95]. Sowohl in Hefen (*S. cerviciae*) als auch im Pilz *Candida albicans* konnte gezeigt werden, dass es bei OMA1 Deletion zu einer Rapamycin Resistenz und einem aufgehobenen TOR-Signal kommt [95]. In den Modellorganismen Hefe, Zebrafisch und in Eukaryoten konnten Bohovych et al. eine neue, physiologisch konservierte Rolle für OMA1

erarbeiten. Demnach stabilisiert OMA1 die Superkomplexe der Atmungskette und ist damit wichtig für die Feinabstimmung der respiratorischen Funktion in Eukaryoten [96].

Die OMA^{ko} Maus ist erstmalig von Quirós 2012 beschrieben worden. Die Mäuse entwickeln sich normal, sind fertil und haben keinen Überlebensnachteil gegenüber Kontrolltieren [97,98]. Auch in vivo inaktiviert OMA1 L-OPA1[97]. Zudem ist OMA1 wichtig für die metabolische Hämostase [97]. Phänotypisch entwickeln $OMA1^{ko}$ Tiere eine Adipositas durch Hypertrophie von Adipozyten mit Steatosis hepatis und einem Anstieg der TAG's [97]. Die Insulinempfindlichkeit ist gesteigert und die Glukose Clearance ist erhöht [97]. Darüber hinaus zeigt sich bei den Tieren eine gestörte Thermoregulation und eine verminderte zelluläre Apoptose Sensitivität. Die Mitochondrien der OMA1 defizienten Tiere behalten auch unter Stressbedingungen ihre tubuläre Struktur. Durch das Ausschalten von OMA1 ergibt sich ein anti-apoptotisches Signal, das die Fusion von Mitochondrien unterstützt [97]. Es zeigt sich allerdings kein Unterschied in der OXPHOS Funktion von OMA1 defizienten Mitochondrien [97]. Unter Stressbedingungen zeigen sich in dem Mausmodell nur Änderungen in der mitochondrialen Dynamik, es ist kein pathophysiologisches Korrelat beschrieben worden [97]. Auch die Nierenfunktion von acht Wochen alten $OMA1^{ko}$ Mäusen ist intakt und es zeigen sich keine Defekte in der Nierenhistologie [99]. In einem in vivo Modell für akutes Nierenversagen nach Ischämie zeigte sich eine Akkumulation von S-OPA1-3 [99]. Bei Mäusen mit zusätzlichem OMA1 Knockout waren die Tubulusschäden und die Apoptoserate deutlich abgeschwächt; die Mäuse hatten eine bessere Nierenfunktion und es zeigte sich eine reduzierte OPA1 Proteolyse [99].

In Neuronen konnte interessanterweise gezeigt werden, dass ein $PHB2^{NKO}$, der zu Neurodegeneration und einem verfrühten Sterben der Mäuse führt, durch einen zusätzlichen $OMA1^{ko}$ teilweise gerettet werden kann (**Abb. 3A**) [7]. Dabei stellt OMA1 aber nicht die derangierte Cristae Morphologie der Mitochondrien wieder her (**Abb. 3B**). Trotzdem kommt es zu einer verspäteten Neurodegeneration und einem deutlichen Überlebensvorteil der Mäuse von mehreren Wochen (Abb. 3) [7].

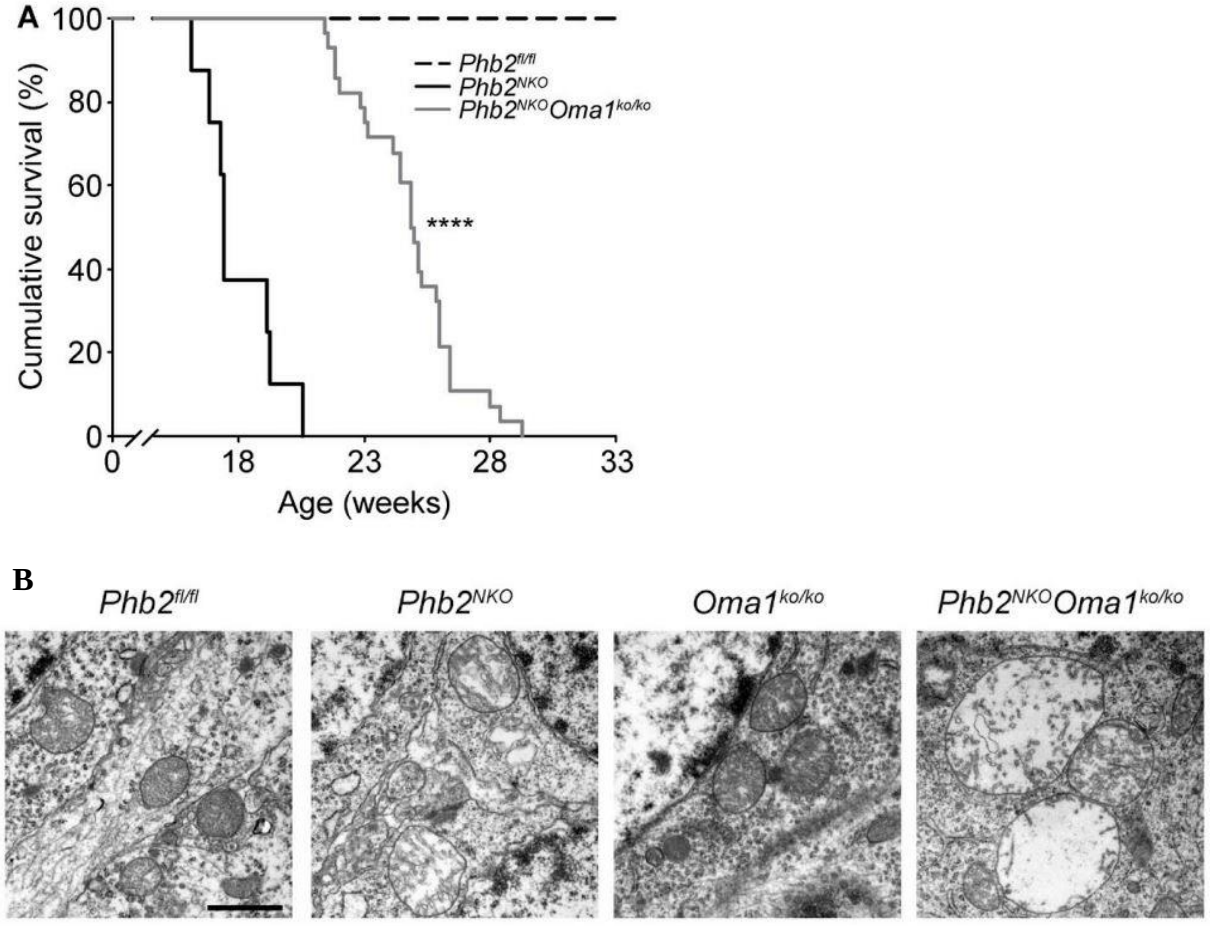


Abbildung 3: Überleben neuronaler OMA1^{NKO} Mäuse

A) Die Kaplan Meier Kurve zeigt, dass der zusätzliche OMA1 Knockout die Lebensspanne des neuronalen PHB2 Knockouts signifikant verlängert [7].

B) Die Cristae Struktur in sechs Wochen alten hippocampalen Mäuseneuronen kann jedoch nicht wiederhergestellt werden. Maßstabbalken entspricht 1,2µm [7].

Am Herzen induziert OMA1 durch mitochondriale Fragmentierung eine dilatative Kardiomyopathie mit konsekutiver Herzinsuffizienz [100]. Auch in Kardiomyozyten kann OMA1 einen Herzschaden durch den Verlust von YME1L retten und die mitochondriale Morphologie wieder herstellen [100]. Laut Acin-Perez ist OMA1 ein zentraler Spieler bei der Vermittlung einer Herzinsuffizienz [98]. So zeigt OMA1 in verschiedenen Modellen für eine Herzinsuffizienz einen protektiven Effekt [98].

1.5 Der Einfluss von Mitochondrien auf metabolische Signalwege in der Niere

Aus den oben herausgearbeiteten Beobachtungen und Forschungsergebnissen ist bereits ersichtlich geworden, wie eng der Insulinsignalweg mit der mitochondrialen Funktion

verknüpft zu sein scheint. Die Brücke zwischen den Mitochondrien und der Funktion des Podozyten ist nach wie vor ein heiß diskutiertes Thema. Ein klares Ergebnis steht derzeit aus. Dass es eine Verbindung zwischen mitochondrialer Dysfunktion, einem dysregulierten Insulinsignalweg und einem Podozytenschaden gibt, ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden [42,43,101,102]. In einem Fallreport über zwei Kinder mit einer FSGS, sahen Gucer et al. 2005 einen Zusammenhang zwischen defekten Mitochondrien im Podozyten und glomerulären Erkrankungen [103]. Die mitochondriale Funktion ist bei Insulinresistenz eingeschränkt [104–106].

Mausstudien haben gezeigt, dass das Ausschalten von mitochondrialen Fusionsproteinen die Glukosehomöostase verändern kann und zu Insulinresistenz und Übergewicht führt [97,107]. Darüber hinaus wirken sich der Knockout der mitochondrialen Fissions Proteine Drp1 und Mnf1 protektiv auf das Überleben von Mäusen mit hochkalorischer Diät (HFD), Insulinresistenz und Übergewicht aus [108,109]. Damit zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Plastizität und dem Glukosemetabolismus in der Zelle. Dennoch fehlt das verbindende Element, über das diese Regulationsmechanismen ablaufen.

Eine interessante Zielstruktur in dem Zusammenhang ist OMA1 als nachgeschaltetes Effektorprotein von PHB2 [5,7]. Im PHB2 Knockdown sind Mitochondrien fragmentiert [5,110], sie haben eine degenerierte Cristae Struktur, und die Fusion der Mitochondrien ist gestört [5]. Durch eine gesteigerte Prozessierung von OPA1 werden die langen OPA1 Isoformen destabilisiert und abgebaut. Der PHB2 Verlust korreliert mit einem gesteigerten Insulinsignal [3,111,112]. Dieser Verlust kann durch den zusätzlichen Knockout des Insulin-, IGF1 - Rezeptors oder eine Behandlung mit Rapamycin teilweise gerettet werden und führt im Mausmodell zu einem längeren Überleben der Tiere [3].

In Mitochondrien ist die Funktion eng an die Morphologie gebunden [100]. Diese mitochondriale Morphologie ist sehr gewebespezifisch und der Einfluss der Mitochondrien auf den Metabolismus von Zellen ist organspezifisch, da die Gewebe unterschiedliche Mengen an L- und S-OPA1 aufweisen [6]. So unterscheidet sich die mitochondriale Morphologie fundamental je nach metabolischem Anspruch des Gewebes. Andersherum beeinflusst aber auch die mitochondriale Morphologie den Metabolismus in vivo [6]. Fragmentierte, nicht funktionstüchtige Mitochondrien finden sich bei besonders fettreicher Ernährung, Adipositas, zellulärer Dysfunktion, kardiovaskulären sowie neurodegenerativen Erkrankungen und in

Krebszellen [113,114]. So kann der Ernährungszustand die mitochondriale Dynamik in vivo modifizieren [115].

Übergewicht ist ein unabhängiger Risikofaktor für eine chronische Nierenerkrankung [116–118]. Dies zeigt sich sowohl in humanen als auch in murinen Nieren funktionell in einer Proteinurie und morphologisch durch eine geringere Podozytendichte mit erweiterten Fußfortsätzen [119–121]. Die mitochondriale Fission durch hohe Glukosekonzentrationen führt ebenfalls zu einem Podozyten Effacement [122]. Der Zusammenhang zwischen Mitochondrienfunktion und Insulinsignal ist zwar bei weitem noch nicht verstanden, aber es gibt schon interessante Ansätze für den klinischen Nutzen. Wei et al. stellte dazu einen neuen Screeningparameter zur Diskussion, da nachgewiesen wurde, dass die mitochondriale DNA im Urin mit der Nierenfunktion korreliert [123].

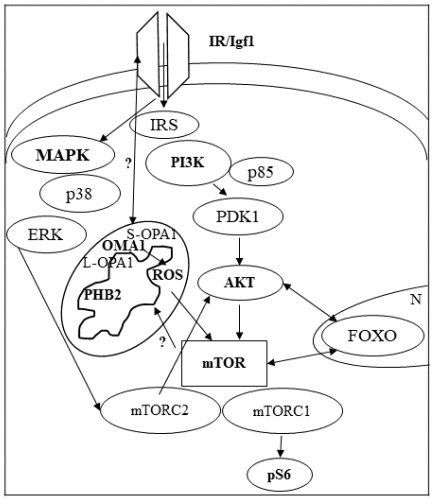


Abbildung 4: Schema: Insulin - Signalwege im Podozyten

Dargestellt ist die Signalkaskade über den Insulin- oder den IGF1 - Rezeptor im Podozyten. Es ist zum einen der Weg über die MAPK und zum anderen der Weg über die PI3K zu sehen. Außerdem ist die Beziehung von AKT zum nachgeschalteten Effektor mTOR gezeigt sowie die Wechselbeziehungen zwischen mTOR, FOXO und AKT (FOXO inhibiert mTORC1 und aktiviert AKT [56]). Das PI3K - AKT - mTOR - Signal führt zu einem höheren PHB2 Level und zur Stabilisierung von Mitochondrien.

1.6 OMA1 im Podozyten - Vordaten aus dem Nephrologischen Forschungslabor

Ising et al. haben 2015 die PHB2^{pko} Maus publiziert. Dabei handelt es sich um eine Maus mit einer podozytenspezifischen Deletion von PHB2. Die mitochondriale Dysfunktion durch das Ausschalten von PHB2 führt zu einem massiven, podozytären Phänotyp mit dem Tod der Tiere fünf Wochen postpartal. Die Mäuse zeigen eine progrediente Niereninsuffizienz mit Podozyten *Effacement* und Albuminurie. Auch die Mitochondrien der PHB2^{pko} Tiere haben derangierte Cristae und sind insgesamt vergrößert [3]. Das zusätzliche Abschalten des Insulinsignalwegs über die Deletion des Insulin- und des Igf1- Rezeptors konnte die Lebensspanne der Mäuse signifikant verlängern [3].

Aus den obigen Ausführungen ergeben sich folgende Forschungsfragen für diese Dissertation:

1. Welchen Einfluss hat die PHB2 Reduktion auf die Aktivierung der Insulinkaskade und den MAPK - Signalweg im Podozyten?

   Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen mitochondrialer Funktionseinschränkung und den beteiligten Signalwegen in der Zelle haben wir uns den Einfluss eines induzierbaren PHB2 KD auf den Insulinsignalweg und die MAPK angesehen, um im Zellkulturmodell unter denselben Rahmenbedingungen die Antwort der Zellen auf ein dysreguliertes mitochondriales Signal darzustellen.
2. Ist der PHB2 Effekt im Podozyten OMA1 vermittelt?

   Wie bereits oben beschrieben, schneidet OMA1 die langen OPA1 Formen PHB2 - abhängig zu kurzen S-OPA1 Formen. In Neuronen konnte ein protektiver Effekt durch den doppelten Knockout von PHB2 und OMA1 erreicht werden mit Verlängerung der Lebensspanne von Mäusen mit PHB2^{NKO}[5,7].

   2.1) Um diesen Effekt im Podozyten nachzustellen und die Frage nach der Lebensspanne der PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Mäuse statistisch aussagekräftig beantworten zu können, haben wir die Tierstudie erweitert. Dazu habe ich in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Dr. med. Alexander Kuczkowski neue Tiere mit den Genotypen PHB2^{pko}, OMA1^{ko} und PHB2^{pko}/OMA1^{ko} gezüchtet. Wir haben das Mausmodell validiert und das Überleben der Mäuse ausgewertet.

   2.2) Außerdem haben wir den Krankheitsverlauf der Mäuse analysiert. Dazu wurde regelmäßig das Gewicht der Mäuse bestimmt. Zur Untersuchung des Einflusses auf die Funktion und Morphologie der Podozyten, haben wir Urin- und Serumanalysen durchgeführt und die Nierenhistologie anhand von Gewebefärbungen und EM Bildern beurteilt. Auch die Morphologie der Mitochondrien wurde berücksichtigt.

3. Wirkt sich der OMA1^{ko} auf den metabolischen Signalweg des Podozyten aus?
   Mitochondriale Dysfunktion und das Insulinsignal sind eng miteinander verknüpft. Der PHB2^{pko} führt zu einem aktivierten mTOR Signalweg im Podozyten [3]. Wir haben ebenfalls den mTOR Signalweg adressiert, um ein mögliches Interaktionssignal zur Regulation der Kommunikation zwischen den Mitochondrien und dem Insulinsignalweg zu finden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborbedarf allgemein

Tabelle 1: Chemikalien

Name	Produkt Nummer	Hersteller
37%ige Formaldehyd Lösung	4979.1	Th. Geyer GmbH
Agarose	A9539	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat		
Aqua ad inject.		Braun
Bromphenolblau	38026-5G	Sigma - Aldrich
BSA (Bovines Serum Albumin)	A7030-50G	Sigma
Calciumchlorid		
Cumarsäure	C9008	Sigma
Dimethylsulfoxid	D2650	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat		
Dithiothreitol (DTT)	6908	Applichem
Essigsäure 99%	7332	Carl Roth
Ethanol 96%ig + 1% Methyl Ethyl Ketone	WAL641.5000	Th. Geyer Group
Ethanol 99%ig + 1% Methyl Ethyl Ketone	A5007	Applichem
Ethanol 80%ig + 1% Methyl Ethyl Ketone	11719628	Th. Geyer
Ethanol absolut	9065	Carl Roth
Ethidiumbromid (1%ig)	2218	Car Roth
Ethylendiamintetraesigsäure (EDTA)	E5134	Sigma
GeneRuler 1kb DNA Marker	#SM0311	Life Technologies
GeneRuler 500bp DNA Marker	#SM0372	Thermo Fisher Scientific
Glycerol	3783	Carl Roth

Glycin	3908	Carl Roth
Histomount	HS-103	Biozym Scientific GmbH
Incidin Plus	3011520	Ecolab
Isopropanol	6752.4	Carl Roth
Kaliumchlorid	6781	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	SIAL04243	Sigma
Loading Dye (6X) DNA Marker	R0611	Thermo Fisher Scientific
Luminol 97%	123072-5G	Sigma Aldrich
Mayer's Hämatoxylin pH 2,4 AT	MH916-500ML	Sigma Aldrich
Methanol	4627.5	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367	Carl Roth
Natriumazid	S2002	Sigma
Natriumchlorid 0,9% (isotonische Kochsalzlösung)	S5886	Sigma
Natriumdiphosphat		
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	CN30	Carl Roth
Natriumfluorid	S1504	Sigma
Natriumhydrogenkarbonat	106329	Merck
Natriumorthovanadat	S6508	Sigma
Natronlauge 2N	T135.1	Carl Roth
Normales Eselserum (NDS)	017-000-121	Dianova
PageRuler plus prestained Protein ladder (Proteinmaker Westernblot)	26619	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma
Perjodsäure 99%ig	3257	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	P7626	Sigma

Polyacrylamid	T802.1	Carl Roth
Polyacrylsäure		
ProLong Gold + DAPI	8961 S	New England Biolabs
Schiff'sche Reagenz	1.090.330.500	VWR
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan HCL	9090.3	Carl Roth
Triton X-100	108603	Merck
Trizma Base	T1503	Sigma
Trizol® Reagent	T9424	Sigma
Trypsin	T6567	Sigma
Tween®20	3472	Caesar&Lorentz
Wasserstoffperoxid 30%	1.072.090.250	Merck
Xylol >98%	0371.5000	Th. Geyer

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Antikörper Puffer	1x PBS + 5% NDS + 0,1% Triton X-100 + 0,05% NaN_3
Base Lösung pH 12	0.025 mM NaH 0.2 mM EDTA
Blocking Lösung	1x PBS + 5% NDS + 0,1% Triton X-100
ECL pH 8,5	100 mM Tris 1,25 mM Luminol 0,2 mM Coumarin Säure 0,75% H_2O_2
EM Antikörper Puffer	1% BSA

	0,5% Tween®20 0,1% Triton X-100 0.1 M Tris
IP Puffer pH 7,5	20 mM Tris/HCL 1% Triton X-100 50 mM NaCl 15 mM $Na_4P_2O_7$ 50 mM NaF vor Gebrauch: +2 mM Na_3VO_4
Lämmli Puffer (2x) pH 6,7	100 mM Tris 4% SDS 20% Glycerol 0,2% Bromphenol Blau 100 mM DTT
Lämmli Puffer (5x) pH 6,8	250 mM Tris 50% Glycerol 10% SDS 0,4 % Bromphenolblau 250 mM DTT
Laufpuffer für Westernblot	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
Neutralisationslösung pH 5	40 mM Tris - HCl
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4
Phosphatgepufferte Salzlösung zum Färben	1 x PBS + 1 mM CaCl + 0,5 mM Mg Cl_2
PBST	PBS zum Färben 0,05% Triton X - 100
Sammelgelpuffer für WB	250 mM Tris

	5% PAA 0,2% SDS pH 6,8
Stripping Puffer für Westernblotmembranen	40 mM Glycin pH 2 5% SDS
TAE 1x	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
Transferpuffer für Westernblot	25 mM Tris 188 mM Glycin 0,1% SDS
Trenngelpuffer für WB	750 mM Tris 10% PAA 0,2% SDS pH 8,8
Tris Puffer (TBS) 10x pH 7,6	150 mM Tris HCl 45 mM Tris 1,5 M NaCl
Tris EDTA Puffer pH 9 (Antigen Retrival IHC)	10 mM Tris 1 mM EDTA 0,05% Tween 20
Tris Puffer mit Tween (TBS-T)	1x TBS 0,025% Tween 20
Waschpuffer für Westernblot pH 7,5	30 mM Tris 300 mM NaCl 0,3% Tween® 20

Tabelle 3: Westerngel und ECL

Westerngel (SDS-Polyacrylamid-Gel)	Trenngel 10% 1,67 ml ddH_2O 1,67 ml 40% Polyacrylamid 3,34 ml Trenngelpuffer 66,67 µl 10% APS

	10 µl TEMED Sammelgel 5% 0,63 ml ddH_2O 0,2 ml 40% Polyacrylamid 0,83 ml Sammelgelpuffer 16,67 µl 10% APS 2,5 µl TEMED
ECL	Lösung A 100 mM Tris pH 8,5 2,5 mM Luminol 0,4 mM Coumarsäure Lösung B 100 mM Tris pH 8,5 1,5% H_2O_2

2.1.3 Materialien

Tabelle 4: Materialien

Name	Katalognummer	Hersteller
BD Primaria™ Zellkulturschalen	734-0072	BD Biosciences
Blotting Papier (BF4)	732-4094	VWR
Deckglas Ø 18mm	CB00180RAC	Menzel Gläser
Deckglas 24 x 24 mm Nr. 1,5 (6 well)	MENZBB024024	VWR
Falcon 15ml	734-0451	VWR
Falcon 50ml	734-0448	VWR
Histosette® I	M490-3 (pink) M490-4 (grün)	Simport
Mikro - Schraubröhrchen 2ml	72.609.001	Sarstedt
Multiply®-µStrip 0,2ml	72.985.002	Sarstedt
Pipetboy	613-4438	Integra

Pipettenspitzen TipOne 0,1-10 µl	S1110-3810-c	Starlab
Pipettenspitzen TipOne 1-200 µl	S1111-1816-c	Starlab
Pipettenspitzen TipOne 101-1000 µl	S1110-2831-c	Starlab
Pipettenpitzen, 5 - 300µl, unsteril	732110	Brand
PVFD Membran Millipore Immobilon-P WB	T831.1	Carl Roth
Reaktionsgefäß 1,5 ml	72.690.001	Sarstedt
Safe Lock Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5ml, farblos	30123328	LMS
Spritze 1 ml	7392/2007	BD
Stripette 5 ml	4051	LMS
Stripette 10 ml	4101	LMS
Stripette 25 ml	4251	LMS
Waagschale 100ml	611-9169	VWR
Waagschale 300ml	2159.2	Carl Roth
Westerngelkammer		VWR (Peqlab)

2.1.4 Geräteliste

Tabelle 5: Geräte

Name	Katalognummer	Hersteller
AxioCam	ICc1	Zeiss
AxioCam	MRm	Zeiss
Axiovert Mikroskop	200M	Carl Zeiss MicroImaging
Dampfgarer Multigourmet FS20		Braun
Fusion Solo Fluoreszenzmikroskop WB	60-FU-SOLO	PeqLab
Heizblock	TH 21	Ditabis

Inkubator (Agarose Gel)	BD 115	Binder
Inkubator Zellkultur	MCO-20AIC	Sanyo
Kryostat	CM1850 UV	Leica
Lichtmikroskop 57B350	630-1578	VWR
Rollenmischer	D-8400	Neolab
Membranvakuumpumpe	181-0067DE	VWR
Mikrotom	RM2235	Leica
Mikrozentrifuge	5421	Eppendorf
Minizentrifuge	521-2844	VWR
Mithras Mikroplattenleser	LB 940	Berthold Technologies
Multimode Plate Reader Enspire		Perkin Elmer
Multiphotonen - Mikroskop LSM/Axiobserver Z1	LSM 710	Zeiss
Netzteil	700-0115	VWR
Netzteil	EV23	Consort
Operationsschere	501754	WPI
Pipetten 0,5 - 10µl; 10 - 100µl; 100 - 1000µl	613-1143	Eppendorf
Pipettierhilfe	613-4438	Integra
Real-Time PRC System	7900HT	ABI
Rollenmischer mit 6 Rollen SRT 6	444-1606	VWR
Schüttler (Shaker)	SSL3	Stuart
Slidescanner	SCN400	Leica
Thermoschüttler	444-0823	Grant
Thermozykler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Thermozykler	070-601	Biometra
Tischzentrifuge Ministar Silverline	521-2844	VWR
Vannas Mikroschere	500086	WPI
Vortex Schüttler	444-1372	VWR
Wasserbad	HI1210	Leica

Werkbank	021928	Kojair

2.1.5 Software

Tabelle 6: Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS4 14.0.0	Adobe
FusionCAPT 15.16	Vilbert Lourmat
GraphPad Prism 7.04/8	GraphPad Software Inc.
ImageJ/Fiji 1.51j8	Wayne Rasband
Mausoleum 6.6.1	H.E. Stöffler
Microsoft Office Power Point 365 ProPlus	Microsoft
Microsoft Word 365 ProPlus	Microsoft
NCBI; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (online)	U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894
NCBI PubMed; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed (online)	U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894
Zen Software	Zeiss

2.1.6 Zellkultur

2.1.6.1 Zelllinie

Zur Arbeit in der Zellkultur wurden HSMPs genutzt. Es handelt sich hierbei um immortalisierte, hitzesensitive, murine Podozyten [124]. Die hpPHB2 KD Zellen sowie die mir neg Kontrollzellen mit eingebauter „scrambeled“ Kontroll-RNAi wurden von Dr. rer. nat. Christina Ising konzipiert und erstellt [3].

2.1.6.2 Zellkulturmedien

Tabelle 7: Zellkulturmedien und Chemikalien

Name	Zusammensetzung	Produkt Nummer	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)			
Doxycyclin hyclat	2 µg/µl	A2951	Applichem
FBS (Fetal bovines Serum)		P30-2120	Pan Biotech
Freezing/Einfrier - Medium	40% RPMI 1640 Medium 40% FBS 10% DMSO		
HEPES 1M		H0887-100ML	Sigma
HSMP++++ Zellkulturmedium (murine Podozyten)	RPMI 1640 Medium + 10% FBS + 5ml 100 mM Natrium Pyruvat + 5ml 1M HEPES		
Interferon-gamma, murin		1476960100	provitro
KollagenI (bovin)	150ul auf 10ml ddH2O	A1064401	Invitrogen
Lyse der Zellen	1ml IP Puffer 4,4µl PMSF 20µl Na_3VO_4		
Natriumpyruvat 100mM		S8636-100ML	Sigma
Opti-MEM®		31985062	Life Technologies
RPMI 1640		R8758-24X500ML	Sigma
Trypsin + EDTA 1x		25300096	Thermo Fisher Scientific

2.1.6.3 Kits

Tabelle 8: Kits Zellkultur

Name	Produkt Nummer	Hersteller
BCA Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration	23227	Thermo Scientific
SuperSignal West Femto	34095	Thermo Scientific

2.1.6.4 Antikörper

Tabelle 9: Primärantikörper Zellkultur

Antigen/Epitop	Klonalität	Wirtskörper	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
ß-Tubulin WB	monoklonal	Maus	1:1000	T0198	Sigma
PHB2	polyklonal	Kaninchen	1:1000	611802	BioLegend
S6	monoklonal	Kaninchen	1:1000	2217	Cell Signalling
Phospho S6	monoklonal	Kaninchen	1:1000	4858	Cell Signalling
AKT	polyklonal	Kaninchen	1:1000	9272	Cell Signalling
Phospho AKT	monoklonal	Kaninchen	1:1000	4058	Cell Signalling
P38	polyklonal	Kaninchen	1:1000	9212	Cell Signalling
Phospho-p38	monoklonal	Kaninchen	1:1000	9215	Cell Signalling
ERK1/2 (p44/42)	polyklonal	Kaninchen	1:1000	9102	Cell Signalling
Phospho-ERK1/2 (phospho p44/42)	monoklonal	Kaninchen	1:1000	4370	Cell Signalling
hFoxO	polyklonal	Kaninchen	1:100	Ab23683	abcam

Tabelle 10: Sekundärantikörper Zellkultur

Antigen/Epitop	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Cy3-AffiniPure Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:400	711-165-152	Dianova/Jackson ImmunoResearch

2.1.7 Mausarbeit

2.1.7.1 Oligonukleotide zur Genotypisierung

Tabelle 11: Oligonukleotide Genotypisierung

Primer	Sequenz 5‘ -> 3‘
β - Globin fp	TGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG
β - Globin rp	GGCTGTCCAAGTGATTCAGGCCATCG
Cre rp2	GCAAACGGACAGAAGCATTT
OMA1 fp	GAGTGCTGTTTCTCTGGGTGT
OMA1 rp 1	TGCCCTAAACTGAAGGTGTG
OMA1 rp 2	TAGACCGCGGCTAGAGGTA
PHB2 1	ATCGTATTGGTGGCGTGCAGCA
PHB2 2	CGAGGTCTGGCCCGAATGTCAT
PHB2 3	AGGGAGGCTTGGTTTGAGGGGA
Pod cre fp	ACCCGACGGTCTTTAGGG

2.1.7.2 Kits und Assays

Tabelle 12: Kits und Assays Mausstudie

Name	Produkt Nummer	Hersteller
ABC Elite Reagent: HRP, Ready to use, Vectastain	PK-7100	Linaris
Avidin/Biotin Blocking Kit	SP-2001	Linaris
Creatinin Assay Kit	Cay 500701-96	Biomol
DAB Substrat Kit	34002	Thermo Scientific
DNeasy blood and tissue Kit	69504	Qiagen

Maus Albumin ELISA kIT	E-90AL	ICL / Dunn Labortechnik GmbH
Quick-Load® Taq 2X Master Mix	M0271 I	New England Biolabs
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaktions Mix	R2523	Sigma
Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit - Invitrogen	EIABUN	Thermo Scientific

2.1.7.3 Antikörper

Tabelle 13: Primärantikörper Nierenschnitte Maus

Antigen	Typ	Gewonnen aus	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Podocin IF C - terminal 367-383	polyklonal	Kaninchen	1:1000	P0372	Sigma
Phospho S6	monoklonal	Kaninchen	1:400	4858	Cell Signalling
WT1	monoklonal	Maus	1:400	Sc7385	Santa Cruz

Tabelle 14: Sekundärantikörper Nierenschnitte Maus

Antigen/Epitop	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Biotin IgG (H+L)-Biotin anti-Rabbit		711-065-152	Jackson ImmunoResearch
Rabbit on Rodent HRP Polymer		RMR622G	Zytomed
Rodent Block M		RBM961H	Zytomed

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank. Die verwendeten Reagenzien und eingesetztes Arbeitsmaterial wurden vor Benutzung autoklaviert. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich, um HSMPs, die über einen lentiviralen Transfer mit einem induzierbaren PHB2 Knockdown ausgestattet sind. Als Kontrollgruppe dienen ebenfalls HSMPs, die einen lentiviralen Transfer mit einer „scrambeled" Kontroll-RNAi erfahren haben.

2.2.1.1 Zellen ziehen

Zum Auftauen werden die verwendeten HSMPs erst wenige Minuten bei Raumtemperatur im Reagiergefäß unter der Werkbank belassen, da sie sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren [124]. Danach werden sie mit 1 ml Medium versetzt und auf eine mit Medium und INF-ɤ vorbereitete 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Die Schale ist zuvor mit KollagenI beschichtet worden.

Die Zellen werden in einem Inkubator bei 33 °C mit 5 % CO_2 kultiviert. Bei 33 °C teilen sich die modifizierten Zellen immer weiter. Um die Zellen zur Differenzierung anzuregen, werden sie ohne die Zugabe von Interferon ɤ über 10 Tage bei 37 °C gehalten. Der Temperaturwechsel führt zur Differenzierung der Podozyten, die über das thermosensible SV40-Antigen immortalisierte Wachstumseigenschaften bei 33 °C zeigen [125]. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin 5 min inkubiert. Die Verdaureaktion wird mit Medium gestoppt und die Zellen können entsprechend ihrer Dichte wieder neu auf vorbereitete Zellkulturschalen ausgesät werden.

Zum Einfrieren werden die Zellen gewaschen und mit Trypsin angedaut. Sobald sich die Zellen von der Zellkulturschale lösen, werden sie mit 9 ml Medium abgelöscht und in Falcons überführt. Dann werden die Zellen 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Die konzentrierten Zellen am Boden des Falcon werden nach gewünschter Dichte mit 1 ml Freezing Medium resuspendiert und in Reagiergefäße mit Sicherheitsverschluss abgefüllt. Die Zellen werden bei – 80 °C gelagert.

Um die Proteine aus den Zellen herauszulösen und zu analysieren, werden die Zellen auf Eis gestellt, um weitere Stoffwechselvorgänge zu unterbinden. Die Zellen werden mit kaltem PBS gewaschen und mit IP-Puffer versetzt. Dies führt zum Aufbrechen der Zellmembranen, sodass die einzelnen Proteine frei werden. Die Suspension wird unter

Druck mit einem Zellkratzer von der Zellkulturschale gekratzt und in ein Reagiergefäß überführt. Danach bleiben die Zellen für 30 min auf Eis stehen, damit sich die festen Bestandteile absetzen können. Im nächsten Schritt wird die Suspension bei 15.000 rpm über 30 min in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4 °C geschleudert, damit sich der Zelldetritus absetzt. Zum Schluss wird der proteinreiche Überstand in ein Reagiergefäß pipettiert.

2.2.1.2 Behandlung der Zellen mit Doxycyclin

Die hpPHB2- und die mir neg- Zellen sind mit einem über Doxycyclin induzierbaren Knockdown versehen. Dazu sind in die Zellen pLenti4/TO Konstrukte eingebracht worden [3].

Zur Induktion des Knockdowns werden die Zellen mit 2 ug Doxycyclin und 1 ml Medium für 72 bis 96 h behandelt. Dazu werden die Zellen an Tag 0 direkt in Doxycyclin haltiges Medium gegeben, 24 h später gibt man erneut 2 ug/ml Doxycyclin hinzu. An Tag 2 wird einmal das komplette Medium gewechselt und mit frischem Doxycyclin versetzt. Nach 72 h an Tag 3, erhalten die Zellen die letzte Einheit Doxycyclin. Nach weiteren 24 h kann man die gewünschten Experimente durchführen.

2.2.1.3 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Gleichmäßigen Beladung der SDS Page wird die Proteinmenge der Zelllysate mit Hilfe des BCA Kits von Thermo Fisher Scientific bestimmt. Dazu werden 5 µl von jedem Zelllysat (im Verhältnis 1:2 verdünnt) mit jeweils 150 µl des Standardmix A und 3 µl des Standardmix B in eine 96 Mikrotiterplatte pipettiert. Für jede Probe wir ein Duplikat angefertigt. Nach dem Beladen wird die Platte 15 sek bei 300 rpm geschüttelt und anschließend 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption kann im Mithras Microplate Reader gemessen werden. Neben den Proben wird auch ein acht - stufiger BSA Standard mit vermessen. Die Probenkonzentration kann rechnerisch anhand des linearen Zusammenhangs zwischen Proteinkonzentration und Absorption ermittelt werden.

2.2.1.4 SDS Page Gelelektrophorese und Western Blot

Nach Ermittlung der korrekten Proteinmenge, werden die Zelllysate entsprechend mit 5x – oder 2x – Lämmli versetzt, um die Proteine zu denaturieren. Dazu werden die Protein-Lämmli-Suspensionen 5 min bei 95 °C erhitzt.

In der SDS - Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrer Größe aufgeteilt. Dazu werden die vorbereiteten Suspensionen zusammen mit einem Marker auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses Polyacrylamidgel besteht aus zwei Phasen - dem

Trenn- und dem Sammelgel. Das Trenngel wird mit Isopropanol bedeckt bis es auspolymerisiert ist. Im Trenngel werden mittels eines Plastikkammes Taschen geformt, in die die Zelllysate pipettiert werden können. Die Gelkammer wird mit Laufpuffer gefüllt und die vorbereiteten Proben (unter 3.2.1.7) werden mit einer Hamiltonspritze in die Taschen pipettiert. Dann wird Strom durch die Kammer geleitet. Die Sammelphase erfolgt bei 70 V und maximaler Stromspannung für 30 min. Die Trennphase, in der die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei 250 V, je 0,03 Amp pro Gel und je nach Größe der gesuchten Proteine für 1:15 h.

Anschließend werden die aufgetrennten Proteine in einem halbtrockenen Verfahren vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu werden das Gel, zwei Whatmannpapiere und die Membran, die zuvor 1 min in Methanol aktiviert worden ist, in Transferpuffer eingelegt. In der Transferkammer werden die Materialien wie folgt übereinandergestapelt, sodass die einzelnen Schichten zwar feucht sind, sich aber keine Luftblasen bilden. Ganz unten liegt ein Whatmannpapier, darauf die Membran, dann das Gel und zum Schluss ganz oben auf noch ein Whatmannpapier. Der Strom läuft von oben nach unten durch die Schichten und überführt so die Proteine vom Gel auf die Membran. Die verwendete Geräteeinstellung lautet: 12 V für 1 h.

2.2.1.5 Antikörperfärbung zum immunologischen Nachweis von Proteinen

Die Membran mit den übertragenen Proteinbanden wird mit einem Antikörper gefärbt. Dazu werden die möglichen Andockstellen für weitere unspezifische Proteine mit 5 % BSA in Waschpuffer blockiert. Dazu wird die Membran 30 min auf einem Tischrüttler inkubiert. Danach wird die Membran dreimal 5 min in Waschpuffer gewaschen und über Nacht unter ständiger Bewegung auf einem Rollenschüttler bei 4 °C in den Primärantikörper gelegt. Am nächsten Tag wird die Membran erneut dreimal jeweils 5 min in Waschpuffer gewaschen und kommt danach für 30 min in den Sekundärantikörper, der spezifisch gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Außerdem richtet sich dieser nach der Spezies des primären Antikörpers. Abschließend wird die Membran erneut dreimal 5 min gewaschen.

Die so vorbereitete Membran wird mit hausgemachtem ECL beträufelt. Dies führt zur Reaktion der Rettichperoxidase. Unter der Fusion Kamera wird eine Aufnahme der Membran gemacht. Die Einstellungen trifft die Software je nach Stärke der Banden selber.

Um den Unterschied im Signal für den phosphorylierten und den nicht phosphorylierten Teil des Proteins quantifizieren zu können, wird dieselbe Membran zur Färbung beider Antikörper verwendet. Nach der Färbung auf den phosphorylierten Antikörper, wird die Membran mit einem Stripping Puffer behandelt, um jegliches Signal des phosphorylierten Proteinanteils zu eliminieren. Dazu wird die Membran zweimal 10 min bei RT in TBS-0,1 % Tween gewaschen und anschließend über Nacht mit 25 ml Stripping Puffer inkubiert. Der Stripping Puffer wird mit 1x PBS 10 min abgewaschen, anschließend erfolgen drei weitere Waschschritte mit TBS-0,1 % Tween. Dann wird die Membran mit 5 % BSA für 30 min geblockt. Es erfolgt ein weiterer dreimaliger Waschschritt mit Waschpuffer für je 5 min. Zur Qualitätskontrolle wird die Membran mit dem Sekundärantikörper passend zum vorherigen Phosphoantikörper 30 min inkubiert. Nach den beschriebenen Waschschritten wird eine Aufnahme mit dem Fusion gemacht, um zu kontrollieren, dass kein Signal mehr von den Phosphoantikörpern ausgeht. Danach wird die Membran gewaschen und mit dem zugehörigen Primärantikörper inkubiert.

2.2.1.6 IF Färbung HSMPs auf FoxO3

Zum Färben werden die Zellen in 6 - Loch - Platten auf Objektträgern ausgesät. Die Zellen werden auf Eis gestellt. Dann werden die Zellen kurz mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung der Zellen mit 4 % PFA in PBS für 15 min bei RT. Danach werden die Zellen dreimal 3 min in PBS gewaschen und in 5 % NDS in PBST für 30 min bei RT geblockt. Der Primärantikörper wird je nach Herstellerangaben verdünnt in PBST und die Zellen werden über Nacht bei 4 °C damit inkubiert. Am anderen Tag erfolgt ein dreimaliger Waschschritt je 3 min mit PBS+. Der zweite Antikörper wird entsprechend der verwendeten Spezies ausgesucht und wird im Verhältnis 1:400 in PBST verdünnt. Der Antikörper wird 1 h bei RT im Dunklen auf den Zellen belassen. Auch der folgende Waschschritt wird möglichst im Dunklen ausgeführt. Gewaschen wird dreimal 3 min in PBS+. Zum Schluss werden die Zellen mit Prolong Gold + DAPI zur Darstellung der Zellkerne eingedeckelt. Nach dem Trocknen der eingedeckelten Zellen, kann man die Fluoreszensfärbung am Confocal Mikroskop darstellen.

2.2.2 Mausstudien

Die Mäuse wurden entsprechend der Tierschutzrichtlinien der Universität zu Köln in der Tierabteilung des CECAD unter standardisierten, pathogenfreien Bedingungen gehalten mit Futter und Wasser ad libitum.

Für sämtliche Ergebnisse (Überlebensstudie, Urin - und Blutanalysen sowie Färbungen) wurden Tiere mit 21 Tagen geopfert bzw. wenn sie ein kritisches Untergewicht mit einem Gewichtsverlust von 15 bis 20 % erreicht hatten gemäß den Tierschutzvorschriften.

2.2.2.1 Die OMA1/PHB2 Knockout Maus

Die verwendete Oma1 Knockout Maus beschrieben in Quirós et al. 2012, wurde uns freundlicherweise von der AG Langer zur Verfügung gestellt.

In der OMA1 Maus ist das Exon 2 des OMA1 Gens durch eine Neomycin Kassette ersetzt worden. Im Zielvektor V916 wurde ein SalI - NotI Fragment mit Exon 1 und Teilen von Intron 1, sowie das Intron 2 mit Exon 3 über XhoI - ClaI - Schnittstellen und die Neomycinkassette als positiver Marker als Ersatz für Exon 2 eingebracht. Der mit NotI verdaute Vektor wurde dann in embryonale Stammzellen im Stadium G4 über Elektroporation transferiert. Anschließend erfolgte eine Selektion über G418 und Ganciclovir. Positive Klone wurden über Southern Blot Analysen identifiziert und die positiven Zellen in Blastozysten injiziert, um Chimären zu generieren. Bei der weiteren Verkreuzung entstanden $OMA1^{ko/ko}$ Mäuse [97].

Die $OMA1^{ko}$ Maus ist mit der $PHB2^{fl/fl}$ Maus aus unserem Labor verpaart worden. Die $PHB2^{fl/fl}$ Maus exprimiert die Rekombinase Cre unter einem Podozyten spezifischen Podocin - Promotor. Unter Verwendung der cre/loxP - Technologie entstehen so Mäuse mit einer podozyten spezifischen PHB2 Deletion und einer OMA1 Deletion in allen Körperzellen. Die $PHB2^{pko}$ Maus ist von Ising et al. 2015 beschrieben worden. Zur Generierung der Mäuse, werden Exon 3 und 4 des Phb2 Gens mit zwei loxP Sequenzen versehen und mit NPHS2.Cre Mäusen verpaart. So erhält man den podozytenspezifischen PHB2 Knockout. Die $PHB2^{fl/fl}$ Tiere dienen als Kontrollgruppe [3]. Alle Tiere wurden in den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt. In der vorliegenden Studie sind Mäuse beider Geschlechter eingeschlossen worden.

2.2.2.2 Nachweis des $OMA1^{ko}$ in Glomeruli Lysaten

Da es sich bei der $OMA1^{ko}$ Maus um eine Deletion des OMA1 Gens im gesamten Körper der Maus handelt, haben wir speziell nachgewiesen, dass der Knockout auch in den Nierenzellen erfolgreich ist und insbesondere in den Glomeruli. Dazu wird aus Lysaten

von Glomeruli die genomische DNA extrahiert mit dem DNeasy blood and tissue Kit von Qiagen und anschließend eine Deletions - PCR durchgeführt. Anschließend wird das PCR Produkt auf 2 %igem Agarose Gel elektrisch aufgetrennt. Die Gewinnung der Glomeruli Lysate erfolgte wie beschrieben in Boerries et al. 2013 [126] durch Herrn Dr. med. Alexander Kuczkowski mit meiner Assistenz.

2.2.2.3 Genotyping

Zur Identifizierung der Genotypen, wird DNA aus Ohr- oder Schwanzspitzenbiopsien der Mäuse gewonnen. Dazu werden die Schwanzspitzen mit jeweils 75 bis 150 µl Base-Lösung für einen Zeitraum von 30 min bei 95 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wird dieselbe Menge an Neutralisations-Lösung hinzugefügt.

Die PCR wird nach Laborstandard und Herstellerangaben pipettiert mit den unter Tabelle 15 aufgeführten Primersequenzen. Für das OMA1 Genotyping wird der Quick Load® Taq 2x Master Mix genutzt und für das PHB2 Genotyping der REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix. Im Anschluss an die PCR werden die Produkte auf ein 2 %iges Agarosegel pipettiert und mittels Elektrophorese nach Größe aufgeteilt. Die erwarteten PCR-Produkte für OMA1 liegen für Wildtyptiere bei 400 bp und für Transgene-OMA1^{ko} Tiere bei 250 bp. Bei den PHB2^{pko} Tieren liegen die erwarteten PCR Produkte für Wildtyptiere bei 378 bp, für Transgene-Tiere bei 506 bp und das Deleter-Allel bei 699 bp. Die β - Globin Kontrolle für pod.Cre liegt bei 494 bp und die Bande für transgene Tiere bei 269 bp.

Tabelle 15: Genotyping: Mastermix und Cyclerprogramm

Bezeichnung	Mastermix	Cyclerprogramm
OMA1	12,5µl Quick Load® Taq 2x Master Mix 1µl OMA1 fp 1µl OMA1 rp1 1µl OMA1 rp2 7µl ddH_2O 2,5µl DNA	95°C – 5min 95°C – 30sek 57°C – 30sek 72°C – 1min zurück zu 2, Wiederholung 35-mal 72°C – 5min 10°C – Halten
PHB2	12,5µl REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix 1µl PHB2 P1 0,5µl PHB2 P2	95°C – 2min 95°C – 30sek 95°C – 30sek

	0,5µl PHB2 P3 8µl ddH_2O 2,5µl DNA	72°C – 45sek zurück zu 2, Wiederholung 40-mal 72°C – 1,5min 10°C - Halten
Pod:Cre	12,5µl Quick Load® Taq 2x Master Mix 0,625µl β - globin fp 0,625µl β- globin rp 0,625µl Pod cre fp 0,625µl Cre rp2 7,5µl ddH_2O 2,5µl DNA	94°C – 3min 94°C – 30sek 55°C – 30sek 72°C – 30sek zurück zu 2, Wiederholung 35-mal 72°C – 5min 15°C - Halten

2.2.2.4 Überlebensstudie

In die Überlebensstudien wurden sowohl weibliche als auch männliche Mäuse eingeschlossen. Das Kriterium für das Opfern der Tiere war ein Gewichtsverlust von 15 bis 20 %. Zur Auswertung der Überlebensdaten wurde ein Log Rank Test durchgeführt und die Daten als Kaplan Meier Kurve dargestellt. Das 50 % Überleben der Tiere wurde mit einem t - Test validiert.

2.2.2.5 Urinanalysen

Die Urinanalysen zur Messung der Kreatinin Konzentration werden mit dem Creatinine Assay Kit von Biomol durchgeführt.

Die Messung der Albumin Konzentration im Urin erfolgt mittels des Maus Albumin ELISA Kit von ICL/Dunn Labortechnik.

Die Durchführung der Versuche erfolgt nach Gebrauchsanweisung des Herstellers.

2.2.2.6 Blutanalysen

Das Blut der Versuchstiere wird durch Punktion der linken Herzkammer gewonnen (durchgeführt von Dr. med. A. Kuczkowski) im Rahmen der Probenentnahme an Tag 21. Die Tiere werden dazu nach den Tierschutzrichtlinien anästhesiert. Das Blut wird bei 4 °C 5 min mit 3000 rpm abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wird umpipettiert und zur weiteren Probenaufbereitung und Analyse an das Zentrallabor der Uniklinik zu Köln weitergeleitet. So werden die Werte für Serum Kreatinin und Serum Harnstoff ermittelt.

2.2.2.7 Gewebefärbungen

Die Mäuse werden mittels zervikaler Dislokation getötet und beide Nieren entnommen. Die Nieren werden mit 4 °C kaltem PBS perfundiert. Die Organkapsel der Niere wird entfernt und die Nieren werden für 24 Stunden in 4 % Formalin eingelegt. Zur weiteren Dehydrierung werden die Nieren ins Pathologische Institut der Universitätsklinik Köln gebracht. Danach werden die Nieren in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom in 0,2µm dicke Schnitte unterteilt.

2.2.2.7.1 PAS-Färbung:

Die PAS-Färbung wird durchgeführt zur Darstellung der Morphologie des Gewebes. Nach der Färbung erscheinen die Zellkerne blau und das Zytoplasma der Zellen rosa. Zum Deparaffinisieren werden die Schnitte jeweils 10 min in Alkohol mit absteigender Konzentration getaucht. Anschließend erfolgt eine 10 - minütige Oxidation mit 0,9 %iger Perjodsäure. Nach einem Waschschritt mit destilliertem Wasser wird das Gewebe mit Schiffscher Reagenz 10 min angefärbt. Es zeigt sich ein typischer Farbumschlag zu Magenta. Nach einem weiteren Waschschritt unter Kranwasser erfolgt die Färbung mit Hämalaun nach Mayer für weitere 10 min. Nach einem letzten achtminütigen Waschschritt unter Kranwasser folgt die Dehydratation der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe, um ein Schrumpfen der Präparate zu verhindern. Zum Schluss werden die gefärbten Schnitte mit Histomount auf den Objektträgern fixiert.

Die Auswertung der PAS Färbungen erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn. Prof. Dr. med. Becker (Pathologie Uniklinik Köln).

2.2.2.7.2 IHC-Färbung:

Die IHC Färbungen werden zur selektiven Darstellung der Proteine pS6, Podocin, und WT1 angefertigt. Dabei werden die Gewebeschnitte zuerst 4 Tage bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffinisiert. Dabei kommen die Schnitte jeweils zweimal zehn Minuten in Xylol, fünf Minuten in 100prozentigen Ethanol, fünf Minuten in 95prozentigen Ethanol, fünf Minuten in 75prozentigen Ethanol und werden abschließend zweimal für zwei Minuten mit TBS-T (pS6) oder TBS (WT1 und Podocin) gewaschen. Um die Schnitte von interferierenden Antigenen zu befreien, werden die Schnitte in einem Puffer mit pH 9 (EDTA 10x + Tween) erhitzt. Anschließend werden die Schnitte zweimal für jeweils 2,5 Minuten mit TBS-T bzw. TBS gewaschen. Im Anschluss erfolgt das Blocken der endogenen Peroxidase mit 3 %igem Schwefelwasserstoff in doppelt destilliertem Wasser. Nach einem Waschschritt mit TBS-T bzw. TBS für zehn Minuten, können die Gewebestücke

mit einem PAP - Stift umrandet werden. Danach wird das Gewebe in einem zweiten Blocker - Schritt mit Avidin und Biotin (pS6 und Podocin) bzw. mit dem Rodent Block M (WT1) für jeweils 15 Minuten inkubiert und anschließend mit TBS-T bzw. TBS gewaschen. Über Nacht werden die Schnitte mit dem primären Antikörper bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit TBS-T bzw. TBS (dreimal zwei Minuten) wird der sekundäre Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Danach wurde das Gewebe nach einem Waschschritt mit TBS-T bzw. TBS für dreimal 2,5 Minuten, mit DAB (pS6 und Podocin) oder dem HRP Polymer rabbit on rodent (WT1) markiert. Dazu wird das ABC Kit (pS6 und Podocin) verwendet. Das Gewebe wird nach einem Waschschritt mit TBS-T bzw. TBS für fünf Minuten mit 37 °C warmen TBS-T bzw. TBS vorbereitet und bis zu 20 Minuten mit der auf 37 °C erhitzten DAB Lösung inkubiert. Anschließend erfolgt ein fünfminütiger Waschschritt in destilliertem Wasser. Die Inkubationszeit mit der DAB Lösung ist je nach genutztem Antikörper variabel und richtet sich nach dem braunen Farbumschlag. Dann wird eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin angefertigt, um die Zellen sichtbar zu machen und die Lokalisation des gefärbten Proteins darzustellen. Nach 15 Sekunden in Hämatoxylin, werden die Schnitte drei Minuten unter laufendem Wasser gewaschen. Zur Dehydratation werden die Gewebeproben in eine aufsteigende Alkoholreihe gestellt. Zum Schluss werden die Objektträger mit Histomount eingebettet.

2.2.2.7.3 Statistische Auswertung der Gewebeanalysen

Die WT1 Auswertung und die p S6 Auswertung erfolgten durch das Auszählen von positiven Nuclei unter dem Mikroskop. Dazu wird der Objektträger S-förmig zur Durchmusterung bewegt. Die Auszählung erfolgte verblindet mit dem Wechsel von zwei Personen am Mikroskop. Die Methode der WT1 Auszählung ist bereits mehrfach publiziert [127–130].

2.2.2.8 EM Bilder

Die EM Bilder wurden in der Imaging Facility des CECAD (Dr. Astrid Schauss) hergestellt. Dazu wurden die Nieren der Versuchstiere durch Herrn Dr. med. Alexander Kuczkowski mit EM Fixationspuffer perfundiert. Anschließend erfolgt die Lagerung der Nieren in Fixationspuffer für 2 Wochen bei 4 °C. Anschließend werden die Poben zur weiteren Aufarbeitung an die Imaging Facility übergeben.

Die Auswertung der EM Bilder erfolgte in Kooperation mit Prof. Bloch (Sporthochschule Köln).

2.3 Statistische Auswertungsverfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism Version 7.04. Die Lebenszeitanalyse wurde mit OASIS durchgeführt [131]. Alle beschriebenen Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte ± Standardfehler (MEAN ± SEM). Die Signifikanztestung für zwei Gruppen wurde in nahezu allen Ergebnissen mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Mittelwerte, wurde die einfache Varianzanalyse (one way ANOVA) mit anschließendem Tukey Post hoc Test angewandt. Die Signifikanz Analyse der Kaplan Meier Kurve wurde mit einem Log Rank Test gemacht. Das Signifikanzniveau wurde in allen Ergebnissen auf $p < 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnis

3.1 Eine PHB2 Reduktion führt zu einem kaskadenartig aktivierten Insulinsignalweg in Podozyten

Zur weiteren Darstellung des Einflusses von Mitochondriopathien auf die metabolische Regulation von Signalwegen im Podozyten, haben wir die Insulinsignalkaskade im Zellkulturmodell aufgearbeitet und die unterschiedlichen Stationen des Insulinsignals dargestellt.

Studien in Hefen und im Wurm *C. elegans* weisen darauf hin, dass der $PHB2^{ko}$ zu einem gesteigerten Insulinsignal führt [111,112,132–136]. Erste Hinweise auf eine Hyperaktivierung des Insulinsignalwegs in Podozyten mit $PHB2^{pko}$ liefern die Studien von Ising et al. aus den Jahren 2015 und 2016 [3,4]. Um diesen mitochondrialen Einfluss auf den Insulinsignalweg im nicht differenzierten Podozyten genauer zu eruieren, haben wir weitere Stationen des Insulinsignalwegs adressiert. Hierzu werden zwei biochemische Verfahren herangezogen: die Proteindarstellung aus Maus-Podozyten mittels SDS-Page Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot, sowie die Darstellung von Podozyten in Fluoreszenz-Färbung.

Auf Proteinebene zeigt sich der mitochondriale Beitrag zum Insulinsignal im Zellkulturmodell in Abbildung 6A. Links ist die Validierung der PHB2 Reduktion nach viertägiger Behandlung mit Doxycyclin dargestellt. Tubulin fungiert als Ladekontrolle. In den hp PHB2 Zellen ist nur noch ein sehr schwaches PHB2 Signal wahrnehmbar. Bei den Proteine AKT, p38, S6 und ERK1/2 (**Abb. 6A** Mitte und rechts) zeigt sich ein Anstieg des Anteils an phosphorylierten Proteinen in PHB2 reduzierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 6A**). Ein besonders deutliches Signal erhält man für pS6. Somit lässt sich auf Proteinebene in nicht differenzierten Podozyten ein gesteigertes Signal der phosphorylierten Proteine nachweisen.

Ein weiteres biochemisches Modell, dass die Aktivierung des Insulinsignalwegs im Podozyten bei PHB2 Knockdown zeigt, ist die Fluoreszenz-Färbung zur Analyse der subzellulären Verteilung von FoxO3A in murinen Podozyten. Abbildung 6B zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der Zellen unter einem Konfokal-Mikroskop. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und erscheinen blau. In der Überlagerung sieht man, dass bei den PHB2 Knockdown Zellen vermehrt FoxO3A aus dem Nukleus austritt und im Plasma der Zellen sichtbar wird. Bei der Kontrollgruppe verbleibt FoxO3a vermehrt im Zellkern. Dies wird durch die Pfeile in Abbildung 6B dargestellt. Sie zeigen auf die FoxO3A positiven Zellkerne. Auch dies ist ein Ausdruck des aktivierten Insulinsignalwegs in murinen Podozyten mit mitochondrialer Dysfunktion. Die statistische Auswertung belegt den optischen Eindruck (**Abb. 6D**). Bei der

Kontrollgruppe befindet sich FoxO3A dreimal häufiger im Zellkern als in den PHB2 reduzierten Zellen. Zur Auswertung wurden die nukleären und nicht nukleären FoxO3A Lokalisationen von zwei unterschiedlichen Betrachtern verblindet unter dem Konfokal - Mikroskop ausgezählt. Der Anteil an nukleär lokalisiertem FoxO3A liegt für die mirneg Kontrollen bei 0,269 $\pm$ 0,03032 respektive der anteiligen Lokalisation von FoxO3A innerhalb des Zellkerns bei PHB2 KD Zellen von 0,09767 $\pm$ 0,01126. Auch hier zeigt sich ein aktivierter Insulinsignalweg in HSMPs mit PHB2 Reduktion.

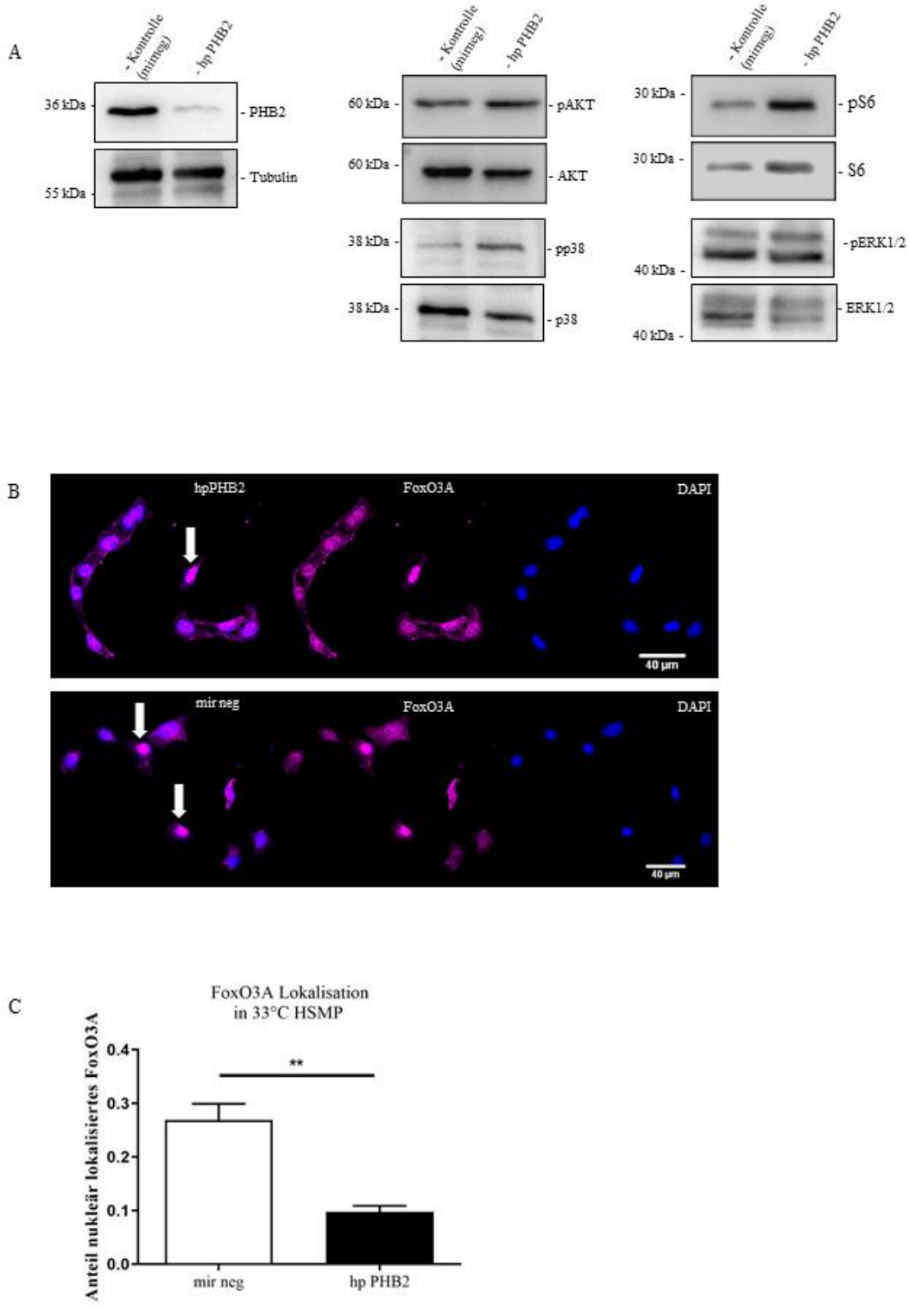


Abbildung 5: Ein PHB2 Knockdown führt zu einem aktivierten Insulinsignalweg im Podozyten

A Western Blot mit Doxycyclin behandelten undifferenzierten HSMPs (33 °C). Gezeigt sind die Validierung des Knockdowns von PHB2 in den hpPHB2 HSMPs; sowie die

Gegenüberstellung der Proteinmenge an phosphoryliertem AKT, p38, S6 und ERK1/2 (p44/42) mit dem nicht phosphorylierten Pendant. In den PHB2 Knockdown Zellen ist das Signal der phosphorylierten Proteine stärker als in der Kontrollgruppe.

B Immunfluoreszenz-Färbung von undifferenzierten HSMP Zellen mit dem FoxO3A Antikörper. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Bei den PHB2 Knockdown Zellen zeigt sich weniger FoxO3A im Nukleus zugunsten eines vermehrten Auftretens im Plasma der Zellen. Bei den mir neg Kontrollen ist das Verhältnis genau umgekehrt. Die weißen Pfeile zeigen auf die Zellen, bei denen FoxO3A im Nukleus lokalisiert ist.

C Auszählung der Zellen mit nukleärem FoxO3A. Bei der Kontrollgruppe (mir neg) befindet sich FoxO3A etwa dreimal häufiger im Zellkern als bei den PHB2 Knockdown Zellen (mir neg: 0,269 $\pm$ 0,03032 Anteile an nukleärem FoxO, n=3 versus hp PHB2: 0,09767 $\pm$ 0,01126 Anteile an nukleär lokalisiertem FoxO, n=3; p= 0,0061). Die Auszählung erfolgte verblindet durch zwei unterschiedliche Personen. Einfacher t-Test mit MEAN $\pm$ SEM; ** $p < 0,01$.

3.2.1 Kein Überlebensvorteil durch den Doppelknockout von PHB2 und OMA1

Um der Hypothese nachzugehen, dass der PHB2 Effekt in Podozyten im Wesentlichen durch OMA1 vermittelt ist, haben wir den Zusammenhang zwischen PHB2 und dem nachgeschalteten Effektor OMA1 ins Mausmodell übertragen.

Wie in der Literatur beschrieben, führt der $OMA1^{ko}$ zu keinem fassbaren Phänotyp der Mäuse im Beobachtungszeitraum von bis zu vier Wochen [97]. Sie werden nach der zu erwartenden Mendelschen Verteilung geboren mit 25 % homozygoten $OMA1^{ko}$ Mäusen und 22 % homozygoten OMA1 Wildtyp Mäusen sowie 53 % heterozygoten $OMA1^{ko/wt}$ Mäusen (**Abb. 7A**). Abbildung 7B zeigt die Knockout Kontrolle auf Ebene der genomischen DNA. Da es sich beim $OMA1^{ko}$ um eine Deletion des OMA1 Gens im gesamten Organismus handelt, haben wir die Knockout Effizienz speziell in den Glomeruli der Versuchstiere nachgewiesen. Dazu wird eine Deletions - PCR aus lysierten Glomeruli durchgeführt (S. 48ff.). Wie die Bande bei 250bp anzeigt, handelt es sich um $OMA1^{ko/ko}$ Zellen. Damit haben wir nachgewiesen, dass es in den Glomeruli der Tiere zu einem OMA1 Verlust kommt.

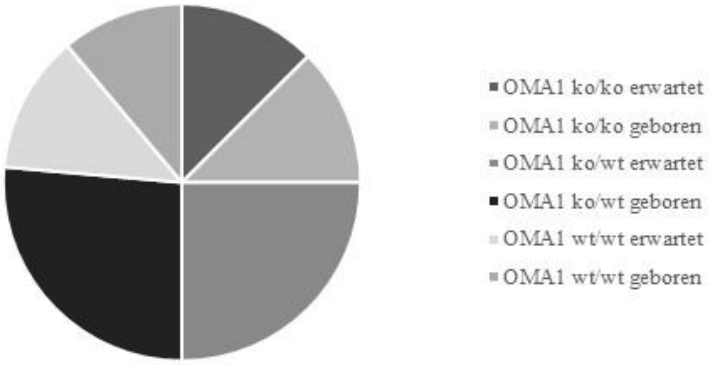
Zum weitern Studium haben wir die so validierte $OMA1^{ko}$ Maus mit der $PHB2^{fl/fl}$ Maus verpaart [5] sowie mit der Cre - Reportermaus (NPH2.cre) [137]. Als Vergleichsgruppe wurden $PHB2^{pko}$ Mäuse generiert, die von Ising et al. publiziert worden sind [3]. Als Kontrollgruppe dienen die $PHB^{fl/fl}$ Tiere. Die Mäuse aus allen Kontrollgruppen werden lebendig und phänotypisch gesund geboren. Es zeigt sich auch kein signifikanter Unterschied im Gewicht der Mäuse im Beobachtungszeitraum von vier Wochen (Daten nicht gezeigt).

Der entscheidende Punkt, der uns im ersten Teil des Experiments interessiert hat, war das Überleben der unterschiedlichen Versuchskohorten. Das Überleben der Tiere ist in einer Kaplan Meier Überlebenskurve dargestellt (**Abb. 7C**). In die Überlebensstatistik wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere einbezogen. Es ist kein Tier zensiert worden. In die Versuchsgruppe $PHB2^{fl/fl}/OMA1^{ko/ko}$ sind 16 Tiere eingeschlossen, in die $PHB2^{pko}/OMA1^{ko/ko}$ Gruppe 17 Tiere und in die $PHB2^{pko}/OMA1^{ko/ko}$ Gruppe 15 Mäuse.

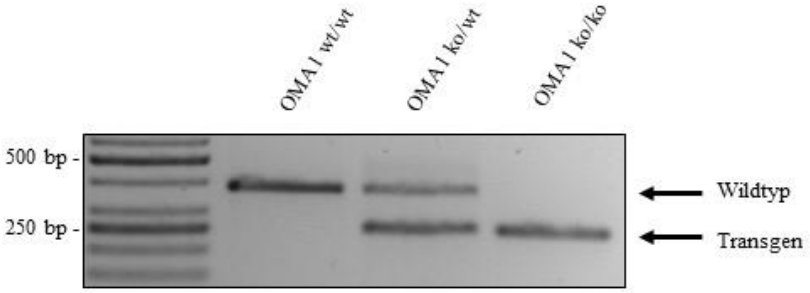
Wie Abbildung 7C deutlich zeigt, gibt es keinen Überlebensvorteil für die $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ Mäuse im Vergleich zu den $PHB2^{pko}$ Tieren. Die $OMA1^{ko/ko}$ Tiere zeigen keine verkürzte Lebensspanne wie bei Quirós et al. [97]. Interessant ist der genaue Subgruppenvergleich zwischen den $PHB2^{pko}$ Mäusen und den $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ Tieren. Die Auswertung der Daten zu mittlerem Überleben $\pm$ der Standardfehler (SEM), Mortalität sowie der Log Rank Test der Gruppen, erfolgten mit der Online Applikation OASIS Lifespan Statistics [131]. Unsere $PHB2^{pko}$ Mäuse haben eine mittlere Überlebenszeit von 32,29 $\pm$ 0,97 Tagen. Dies deckt sich

mit den publizierten Daten von Ising et al. (32,17 ± 0,89 Tage) [3]. Trotz der Differenz der mittleren Überlebenszeit, zeigt sich insgesamt kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil der PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Tiere gegenüber den PHB2^{pko} Mäusen wie der Log Rank Test zeigt mit p = 0,2223. Dennoch unterscheiden sich die Überlebenskurven. Die PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Mäuse sterben später mit einer 25 % Mortalität an Tag 33 vs. PHB2^{pko} mit Tag 29. Dafür sterben die PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Tiere schneller. Bereits einen Tag später ist an Tag 34 die 50 % Mortalität erreicht. Die Kaplan Meier Überlebenskurve (**Abb. 7C**) zeigt, dass kein Überlebensvorteil von PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Mäusen gegenüber PHB2^{pko} Tieren vorliegt, auch wenn sich eine leichte Tendenz zu mehr Widerstandsfähigkeit im mittleren Überleben der Tiere mit doppeltem Knockout (**Abb. 7D**) zeigt.

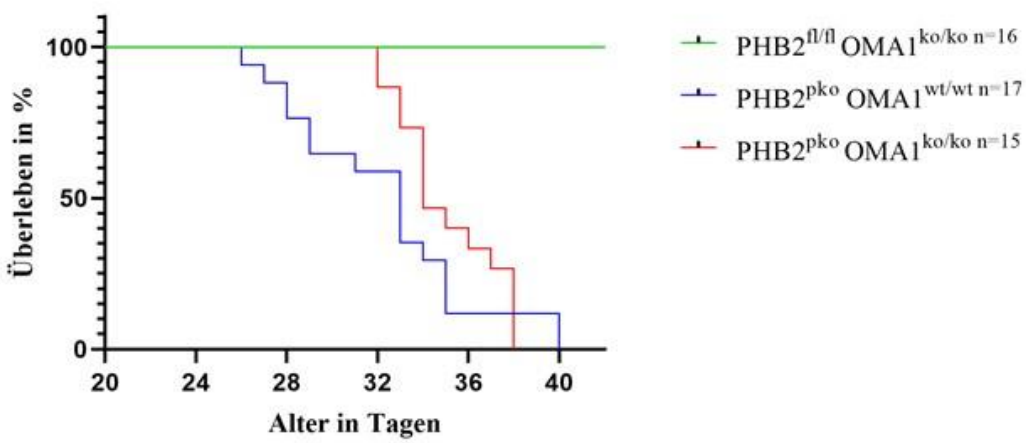
A



B



C



D

	Anzahl der Tiere	Mittleres Überleben ± SE	25% Mortalität	50% Mortalität	75% Mortalität	Log rank Test p vs. PHB2 pko
PHB2^{pko}	17	32,29 ± 0,97	29	33	35	
OMA1^{KO}/PHB2^{pko}	15	35,07 ± 0,56	33	34	38	0,2223
Exakter Test nach Fisher (p)			0,122	0,4670	0,2095	

Abbildung 6: Kein Überlebensvorteil durch den doppelten Knockout von PHB2 und OMA1

A Mendelsche Verteilung der erwarteten und der tatsächlich geborenen OMA1^{ko} Mäuse. Es werden 53 % heterozygote Tiere geboren, 22 % homozygote OMA1^{wt} Mäuse und 25 % Tiere

mit $OMA1^{ko}$. Somit deckt sich die Verteilung der erwarteten mit der Verteilung der tatsächlich geboren Mäuse.

B Validierung des $OMA1^{ko}$ in den Mäusen mittels Deletions - PCR auf Ebene der genomischen DNA. Es werden Lysate von Glomeruli aus $OMA1^{ko}$ Tieren verwendet. Die OMA1 Wildtypbande liegt bei 400 bp, die Bande für die transgenen Tiere mit $OMA1^{ko}$ bei 250 bp.

C Kaplan Meier Kurve mit Darstellung des Überlebens der Einzel- und der Doppel - Knockout Mäuse. Die grüne Kurve zeigt das Überleben der OMA1 Tiere. Die blaue Linie stellt das Überleben der $PHB2^{pko}$ Tiere und die rote Kurve das Überleben der Doppel - Knockout Tiere dar. Die Anzahl der Tiere in den entsprechenden Kohorten ist jeweils zweistellig. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Überleben der Tiere mit $PHB2^{pko}$ und $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ (Log Rank Test $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ gegen $PHB2^{pko}$: p= 0,2223).

D Auswertung der Kaplan Meier Kurve von $PHB2^{pko}$ und $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ Mäusen. Für $PHB2^{pko}$ Mäuse ergibt sich ein mittleres Überleben von 32,29 $\pm$ 0,97 Tage, n=17 versus ein mittleres Überleben von 35,07 $\pm$ 0,5 für die $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ Mäuse, n=15. Außerdem ist die 25 % - , die 50 %- und die 75 % - Mortalität dargestellt. Hierin unterscheiden sich die beiden Gruppen laut Exaktem Fisher Test nicht signifikant, wie auch die Gesamtauswertung im Log Rank Test zeigt.

3.2.2 Der Doppelknockout von PHB2 und OMA1 im Podozyten führt zu einer gestörten glomerulären Architektur mit renaler Funktionseinschränkung bei den Mäusen

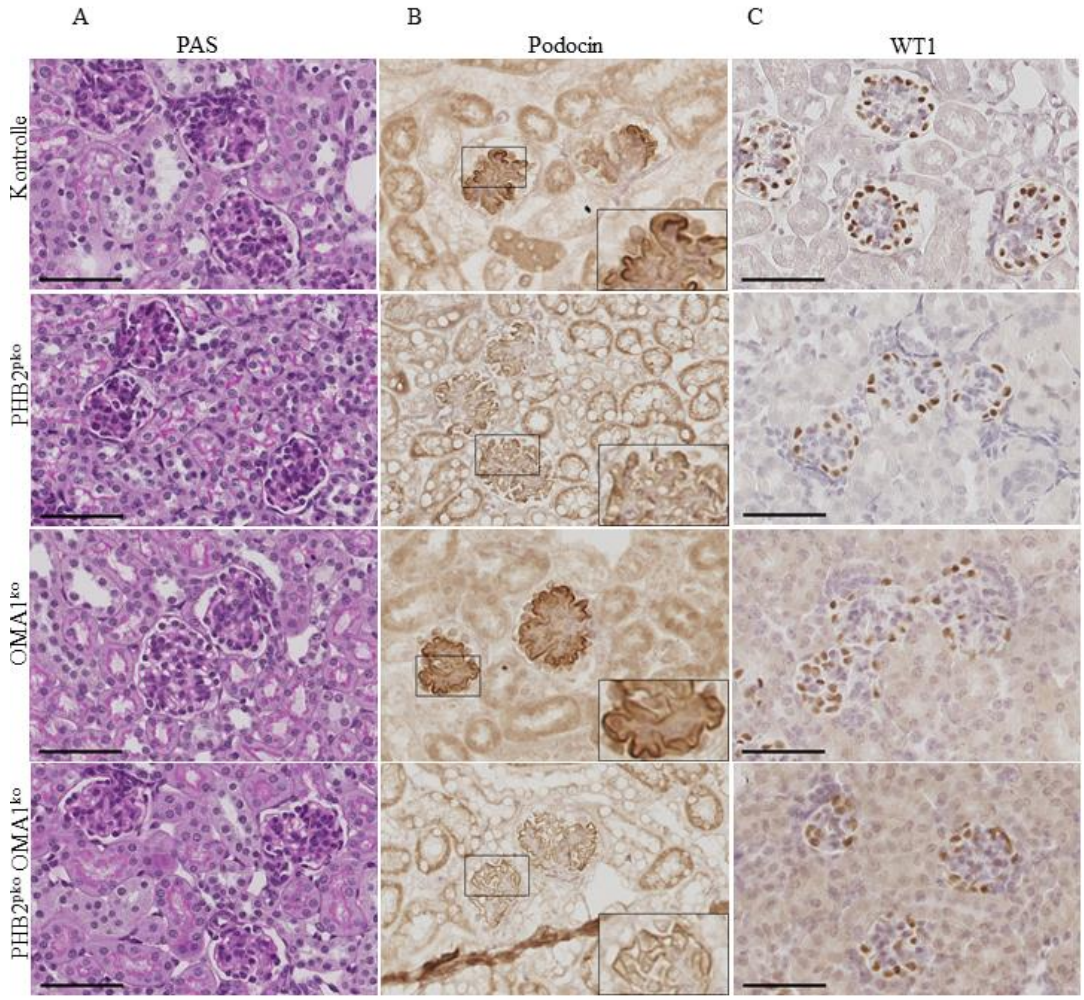
Wie bereits beschrieben, zeigt der PHB2^{pko}/OMA1^{ko} keinen statistisch signifikanten Überlebensvorteil für die Mäuse. Zur weiteren Differenzierung des Phänotyps von PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Mäusen haben wir uns die morphologische Struktur der Mäusenieren angeschaut und den Krankheitsverlauf der Tiere mittels ihrer renalen Aktivität durch Funktionsassays überprüft. Für den PHB2^{pko} sind diese Daten bereits publiziert worden [3]. Unsere hier erhobenen Daten zum PHB2^{pko} decken sich mit den Daten von Ising et al. [3].

Zur morphologischen Aufarbeitung werden die Mäuse jeweils an Tag 21 postpartum geopfert und die Nieren zur histologischen Bearbeitung entnommen (Arbeitsschritte siehe S. 50ff.). Der Zeitpunkt wurde von uns auf Grundlage der publizierten Daten zur PHB2^{pko} Maus gewählt [3]. An Tag 14 postpartum ist die Glomerulogenese der Mäuse gerade erst abgeschlossen und es zeigt sich noch keine Veränderung in den PHB2^{pko} Mäusen. Am 28. Tag nach Geburt ist die Nierenhistologie der Tiere schon so weit derangiert, dass sie nur noch schwer auswertbar ist. Die ersten Veränderungen kommen in den PHB2^{pko} Tieren mit 21 Tagen nach Geburt zum Tragen [3]. Deshalb haben wir uns für eben diesen Zeitpunkt zur histologischen und funktionellen Analyse unserer Versuchstiere entschieden. Es wurden PAS Färbungen zur Beurteilung der glomerulären Architektur, Podocin Färbungen zur Darstellung der Schlitzmembran und WT1 Färbungen als Marker von Podozyten angefertigt. Für jede Versuchsgruppe wurden mindestens drei unterschiedliche Tiere pro Genotyp ausgewertet. Die Kontrollgruppe wird durch die PHB2$^{fl/fl}$ Tiere gestellt.

Um in der Übersicht einen ersten Eindruck von der Nierenstruktur zu erhalten sowie zur morphologischen Beurteilung der glomerulären Architektur der Mäusenieren haben wir eine konventionelle PAS Färbung durchgeführt (**Abb. 8A**). Das Zytoplasma der Zellen ist rosa und die Zellkerne sind mit Hämalaun blauviolett gefärbt. Die PHB2$^{fl/fl}$ Kontrolltiere sowie OMA1^{ko} Tiere zeigen eine unauffällige glomeruläre Morphologie (**Abb. 8A**). Auch die PHB2^{pko} und PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Tiere haben morphologisch noch eine weitgehend unauffällige Nierenhistologie. In einigen Abschnitten fällt bei der Durchmusterung des Nierenkortex eine beginnende, milde Glomerulosklerose auf (**Abb. 8A**). In der PAS Färbung gibt es noch keinen Anhalt für den gravierenden Unterschied in der Lebensspanne der Mauskohorten. Die Morphologie der Glomeruli ist lichtmikroskopisch in der PAS Färbung mit 21 Tagen postpartum noch intakt.

Zur weiteren Differenzierung der Bestandteile des Glomerulums, haben wir IHC - Färbungen angefertigt. Podocin wird nur in Podozyten exprimiert und ist exklusiv an der Schlitzmembran lokalisiert [28]. So dient die Podocin Färbung als Marker für die Integrität der Schlitzmembran. Die Darstellung der Schlitzmembran der $PHB2^{fl/fl}$ Mäuse sowie der $OMA1^{ko}$ Tiere (**Abb. 8B**) zeigt ein kräftig angefärbtes, durchgehendes, braunes Band, das sich um ein Glomerulum legt (**Abb. 8B** Vergrößerung unten rechts im Bild). Im Gegensatz zur recht unauffälligen PAS Färbung der $PHB2^{pko}$ und $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ Tiere, sieht man in der Podocin Färbung ein deutlich abgeschwächtes Signal. Das braune Band ist nicht mehr durchgehend, sondern fragmentiert. Dies spricht für eine deutliche Podocin Reduktion und ist ein Anzeichen für eine veränderte Struktur der Schlitzmembran im $PHB2^{pko}$ und im $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ (**Abb. 8B** Vergrößerung unten rechts im Bild).

Weiterhin haben wir die Nierenschnitte ebenfalls mit einer IHC - Färbung gegen den podozytären Transkriptionsfaktor WT1 gefärbt (**Abb. 8C**). Die braun erscheinenden Punkte stehen für jeweils einen angefärbten Podozyten. Sie liegen ähnlich wie in der Podocin Färbung außen um das Glomerulum herum. Rein optisch ist es schwer, Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen auszumachen. Alleine die Kontrollgruppe sticht hervor mit einer großen Podozytendichte pro Glomerulum. Die Auswertung der WT1 Färbung erfolgte mittels Auszählung der WT1 positiven Zellen unter dem Lichtmikroskop mit einer Vergrößerung von 40x. Die Schnitte wurden verblindet ausgezählt mit Wechsel der Person am Mikroskop. Je Nierenschnitt wurden 20 aufeinander folgende Glomeruli ausgezählt mit jeweils drei Tieren pro Versuchsgruppe. Insgesamt wurden so 60 Glomeruli je Genotyp gewertet (**Abb. 8D**). Die Kontrollgruppe weist die meisten Podozyten pro Glomerulum auf ($12{,}83 \pm 0{,}3622$), was den optischen Eindruck der WT1 Färbung (**Abb. 8C**) bestätigt. Alle Vergleichsgruppen haben eine geringere Anzahl an Podozyten pro Glomerulum (**Abb. 8D**). Der $PHB2^{pko}$ hat mit durchschnittlich $9{,}383 \pm 0{,}3453$ Podozyten pro Glomerulum die geringste Anzahl, gefolgt vom $OMA1^{ko}$ mit $10{,}87 \pm 0{,}2916$ Podozyten pro Glomerulum. Der $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ hat mit $11{,}3 \pm 0{,}2451$ Podozyten pro Glomerulum eine sehr ähnliche durchschnittliche Anzahl an Podozyten. Sortiert man die Versuchsgruppen nach aufsteigender Anzahl der Podozyten pro Glomerulum, erhält man folgende Reihenfolge: $PHB2^{pko} < OMA1^{ko} = PHB2^{pko}OMA1^{ko} < PHB2^{fl/fl}$. Hier zeigt sich ein OMA1 Effekt zum einen beim Vergleich der $OMA1^{ko}$ Tiere mit der Kontrollgruppe sowie ein Benefit des $PHB2^{pko}OMA1^{ko}$ im Vergleich zum $PHB2^{pko}$.


A
PAS
B
Podocin
C
WT1
Kontrolle
PHB2pko
OMA1ko
PHB2pko OMA1ko

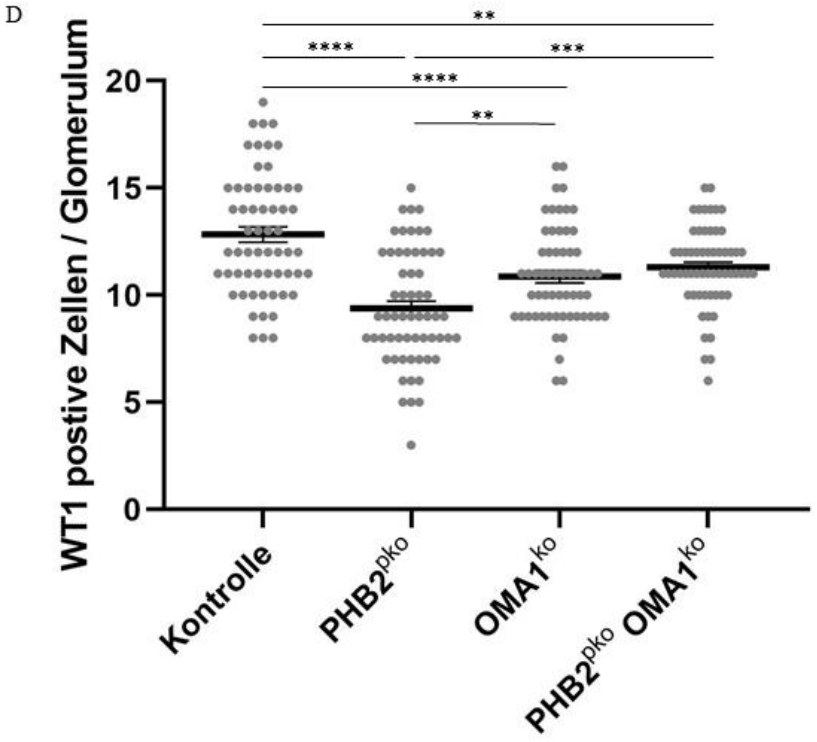

D
WT1 postive Zellen / Glomerulum
0
5
10
15
20
**
****
***
****
**
Kontrolle
PHB2pko
OMA1ko
PHB2pko OMA1ko

Abbildung 7: Der doppelte Knockout von PHB2^{pko}/OMA1^{ko} führt zu einer gestörten glomerulären Architektur

Die Nierenschnitte sind alle aus 21 Tage alten Mäusen entnommen. Es handelt sich um 0,2 µm dicke Schnitte, die in Paraffin eingebettet sind. Schwarzer Maßstabsbalken: 40 µm

A Repräsentativer Ausschnitt aus dem Kortex von Mäusenieren in PAS Färbung zur morphologischen Beurteilung der Glomeruli. Es zeigt sich eine mild beginnende Glomerulosklerose in den PHB2^{pko} und in den PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Tieren. Die Morphologie der OMA1^{ko} Tiere sowie der Kontrollgruppe (PHB2$^{fl/fl}$) ist unauffällig.

B Repräsentativer Ausschnitt aus dem Kortex von Mäusenieren in IHC-Färbung auf Podocin zur Darstellung der Schlitzmembran. Rechs in der unteren Bildhälfte findet sich jeweils eine Vergrößerung aus dem Bild zur besseren Darstellung der Podocin positiven Anteile der Schlitzmembran. Die PHB2^{pko} sowie die PHb2^{pko}/OMA1^{ko} Gruppe zeigt eine derangierte Schlitzmembran mit deutlich geringerem Signal als in der Vergleichsgruppe. Der OMA1^{ko} sowie die Kontrollgruppe präsentieren sich mit einer intakten Schlitzmembran mit einem durchgängig starken Signal für Podocin.

C Repräsentativer Ausschnitt aus dem Kortex von Mäusenieren in IHC-Färbung auf WT1 als Marker zur Darstellung von Podozyten. Die Anzahl der WT1 positiven Zellen ist unterschiedlich. Die meisten WT1 positiven Zellen finden sich in der Kontrollgruppe. In den anderen drei Versuchsgruppen scheint die Zahl der WT1 positiven Zellen pro Glomerulum reduziert zu sein.

D Auszählung von WT1 positiven Zellen aus jeweils 20 Glomeruli pro Nierenschnitt von 21 Tage alten Mäusen. Pro Versuchsgruppe sind jeweils drei Schnitte von zwei unterschiedlichen Betrachtern verblindet ausgezählt worden. (One way ANOVA mit Tukeys Multiple Comparison Post hoc Test; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; ****$p<0,0001$).

Zur weiteren und detaillierten Aufarbeitung der Morphologie der glomerulären Struktur, haben wir in der Imaging Facility des CECAD EM Bilder von den Versuchstieren anfertigen lassen, um so die Struktur der Schlitzmembran mit den Fußfortsätzen der Podzyten darstellen zu können. Da der PHB2^{pko} zu einer Mitochondriopathie führt mit fragmentierten Mitochondrien, dem Verlust der Cristae Struktur sowie der Ansammlung von ballonierten intramitochondrialen Strukturen [3,5,7], haben wir auch die Morphologie der Mitochondrien analysiert. Auch in den hochaufgelösten EM Bildern bestätigen sich die Ergebnisse aus den lichtmikroskopischen Beobachtungen (**Abb. 9A - C**). Die Kontrolltiere und die OMA1^{ko} Tiere zeigen in der Übersicht eine unauffällige glomeruläre Struktur (**Abb. 9A**) mit regelmäßigen Fußfortsätzen und einer intakten Schlitzmembran (**Abb. 9B**). Die Mitochondrien der beiden Versuchsgruppen stellen sich ohne Auffälligkeiten dar, wie es für OMA1^{nko} bereits gezeigt worden ist [7]. Die Cristae Struktur ist intakt. Der OMA1^{ko} beeinträchtigt die mitochondriale und glomeruläre Struktur der Podozyten nicht. Der PHB2^{pko} entwickelt, wie in der Literatur beschrieben [3,4], einen dramatischen podozytären Phänotyp mit Verbreiterung und Abflachung der podozytären Fußfortsätze, Zerstörung der Schlitzmembran Architektur und entwickelt das Vollbild eines Podozyten *Effacement* (**Abb. 9A und B**). Auch die Mitochondrien des PHB2^{pko} stellen ich wie vorbeschrieben [3,4] dar. Sie sind balloniert und haben keine intakten Cristae Lamellen (**Abb. 9C**). Auch der PHB2^{pko}/OMA1^{ko} zeigt in der Übersicht ein Podozyten *Effacement* (**Abb. 9A**). Die Fußfortsätze der Podozyten sind verbreitet und abgeflacht, was eine gestörte Architektur der Schlitzmembran nach sich zieht (**Abb. 9B**). Die Mitochondrien im PHB2^{pko}/OMA1^{ko} unterscheiden sich morphologisch sehr stark. Man findet die geschwollenen Mitochondrien mit Verlust der Cristae Struktur, wie sie für den neuronalen PHB2^{NKO}/OMA1^{ko} beschrieben sind [7] (**Abb. 9C**). Zusätzlich findet man auch zahlreiche Mitochondrien wie im kleinen Ausschnitt in der rechten Spalte gezeigt, die noch intakt erscheinen, mit einer leicht granulierten Cristae Struktur. Insgesamt ist das Bild des PHB2^{pko}/OMA1^{ko} inhomogener mit Abschnitten von intakten und zerstörten Glomeruli.

Zusätzlich zur morphologischen Analyse der Podozyten und des Schlitzmembran Komplexes, haben wir uns mit der Nierenfunktion der Mäuse beschäftigt. Dabei hat uns insbesondere der Vergleich der PHB2^{pko} Tiere mit den PHB2^{pko}/OMA1^{ko} interessiert. Zur Analyse der Nierenfunktion wurden Blutproben und der Urin von 21 Tage alten Tieren gesammelt. Nach 21 Tagen zeigen die PHB2$^{fl/fl}$ Kontrolltiere und die OMA1^{ko} Mäuse keine Albuminurie, wie der Albumin - Kreatinin - Quotient zeigt (PHB2$^{fl/fl}$: 0,3051$\pm$ 0,1165 mg/mg; OMA1^{ko}: 0,1617 $\pm$ 0,04074 mg/mg) (**Abb. 9D**). Der Phb2^{pko} entwickelt eine Albuminurie (155,7 $\pm$ 8,771 mg/mg) wie bereits publiziert [3]. Auch der PHB2^{pko}/OMA1^{ko} entwickelt eine Albuminurie (86,17 $\pm$

21,51 mg/mg). Im Vergleich der beiden Gruppen über einen ungepaarten t -Test, ergibt sich an Tag 21 postpartum eine signifikant geringere Albuminurie in der Doppel Knockout Gruppe (p= 0,0173). Um diesen Trend weiter zu verfolgen, haben wir uns die Nierenwerte und Retentionsparameter der beiden Subgruppen zum Zeitpunkt des Todes angesehen. Das Serum Kreatinin unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen ($PHB2^{pko}$: 0,4375 ± 0,07609 mg/dl; $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$: 0,5075 ± 0,03351 mg/dl) (**Abb. 9E**). Auch der BUN (Blut - Harnstoff - Stickstoff) als Retentionswert der Niere, unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Versuchstieren ($PHB2^{pko}$: 165,9 ± 19,75 mg/dl; $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$: 233,1 ± 36,53 mg/dl) (**Abb. 9E**).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der $OMA1^{ko}$ sich ähnlich darstellt wie die $PHB^{fl/fl}$ Kontrolltiere mit intakten Podozyten und morphologisch unauffälliger Schlitzmembran Architektur. Auf Proteinebene zeigt sich aber ein Verlust an WT1. Trotzdem zeigen die Mäuse funktionell keine Nierenfunktionseinschränkung und haben morphologisch unauffällige Mitochondrien. Die $PHB2^{pko}$ Tiere präsentieren sich wie in der Literatur beschrieben [3] mit einem Podozten *Effacement*, einer zerstörten Schlitzmembran, einem bisher nicht gezeigten Podozyten Verlust und einer deutlichen Nierenfunktionseinschränkung mit Albuminurie ab 21 Tagen. Die Mitochondrien sind balloniert und haben keine lamellare Cristae Struktur. Auch die $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ Mäuse präsentieren ein Podozyten *Effacement* mit Verlust der Zytoarchitektur der Schlitzmembran und einer zum Todeszeitpunkt eingeschränkten Nierenfunktion. Das morphologische Bild im EM erscheint inhomogener als beim $PHB2^{pko}$ mit intakten und derangierten Mitochondrien. Der $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ weist bei genauer Betrachtung einen höheren Anteil des Transkriptionsfaktors WT1 auf als Benefit der OMA1 Deletion, der sich bei 21 Tage alten Mäusen in einer signifikant geringeren Albuminurie im Vergleich zu $PHB2^{pko}$ Mäusen äußert. Insgesamt zeigt sich aber deutlich, dass der $OMA1^{ko}$ nicht in der Lage ist, die Nierenfunktion der Mäuse nachhaltig zu verbessern.

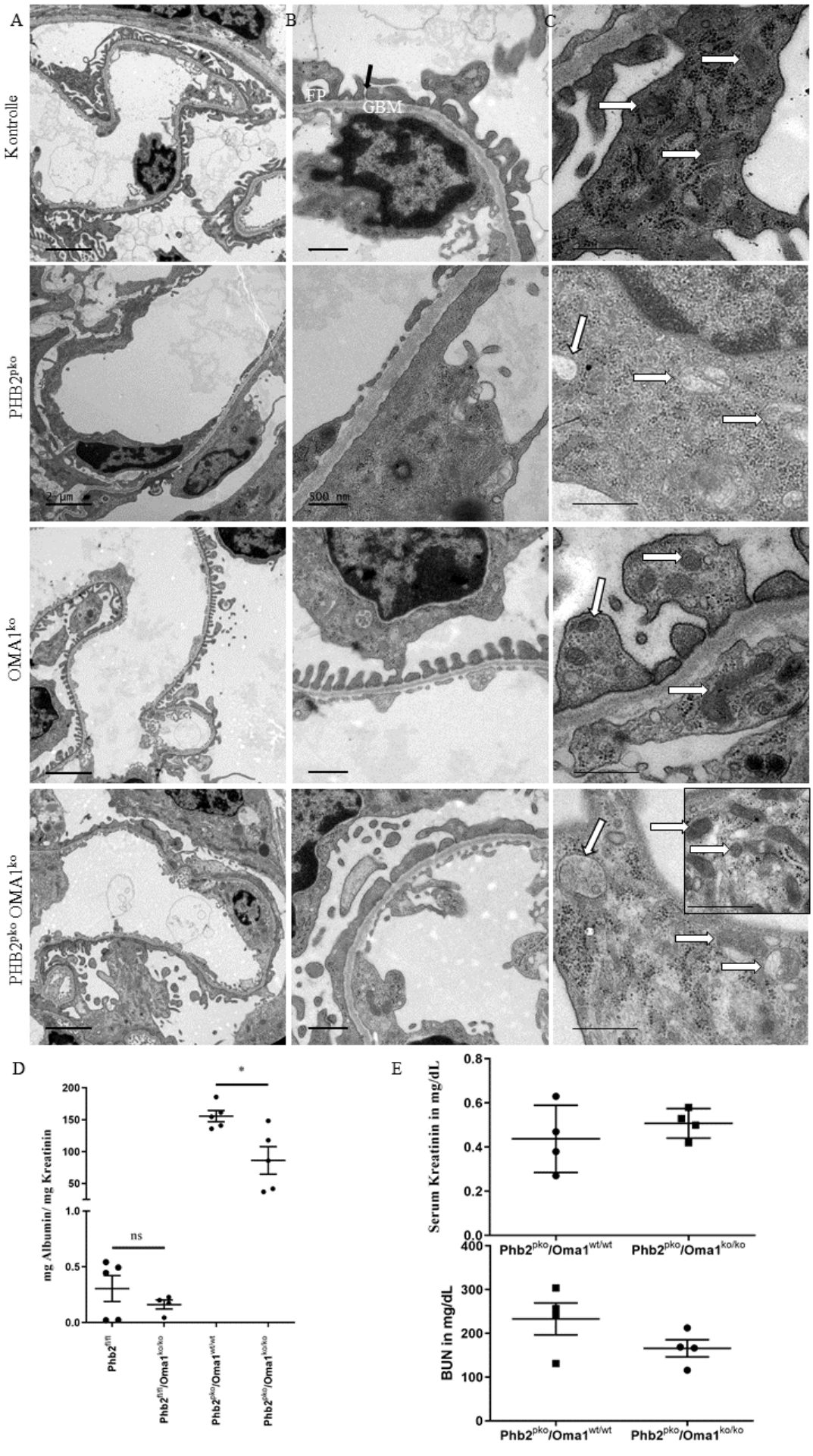

A
B
C
Kontrolle
PHB2pko
OMA1ko
PHB2pko OMA1ko
FP
GBM
2 µm
500 nm
D
mg Albumin/ mg Kreatinin
ns
*
Phb2fl/fl
Phb2fl/fl/Oma1ko/ko
Phb2pko/Oma1wt/wt
Phb2pko/Oma1ko/ko
E
Serum Kreatinin in mg/dL
BUN in mg/dL
Phb2pko/Oma1wt/wt
Phb2pko/Oma1ko/ko

Abbildung 8: Der PHB2^{pko}/OMA1^{ko} zeigt im EM Bild und funktionell keinen anhaltenden Vorteil gegenüber dem PHB2^{pko}

EM Aufnahmen von Nierenschnitten 21 Tage alter Mäuse:

A Übersichtsaufnahmen (Maßstabbalken 1,14 µm, wenn nicht anders angegeben); **B** Darstellung des Nierenfilters mit glomerulärer Basalmembran (GBM), Schlitzmembran (schwarzer Pfeil) und podozytären Fußfortsätzen (FP) (Maßstabbalken Kontrolle: 375 nm, OMA1^{ko} und PHB2^{pko}/OMA1^{ko}: 625 nm); **C** repräsentative Ausschnitte mit Mitochondrien (weiße Pfeile)).

D Nierenfunktionsanalysen mit Darstellung des Albumin - Kreatinin - Quotienten (links) mit Urin von 21 Tage alten Mäusen (PHB2$^{fl/fl}$: 0,3051 ± 0,1165 mg/mg, n=5 versus OMA1^{ko}: 0,1617 ± 0,04074 mg/mg, n=4, p= 0,3295; PHB2^{pko}: 155,7 ± 8,771 mg/mg, n=5 versus PHB2^{pko}/OMA1^{ko}: 86,17 ± 21,51 mg/mg, n=5, * p= 0,0173); **E** Darstellung des Serum Kreatinins (rechts oben) zum Zeitpunkt des Todes (PHB2^{pko}: 0,4375 ± 0,07609 mg/dl, n=4 versus PHB2^{pko}/OMA1^{ko}: 0,5075 ± 0,03351 mg/dl, n=4, p= 0,4321) und Darstellung des BUN (rechts unten) zum Zeitpunkt des Todes (PHB2^{pko}: 165,9 ± 19,75 mg/dl, n=4 versus PHB2^{pko}/OMA1^{ko}: 233,1 ± 36,53 mg/dl, n=4, p= 0,1567). Alle Werte sind angegeben als MEAN ± SEM; zum Vergleich von zwei Gruppen wurde jeweils ein ungepaarter t-Test durchgeführt mit * $p<0,05$.

3.3 Aktivierung des mTOR Signalwegs in Einzel- und Doppelknockout Mäusen

Da der OMA1^{ko} nicht in der Lage ist, den PHB2^{pko} zu retten, sich aber Unterschiede in der Morphologie und der Nierenfunktion von PHB2^{pko}/OMA1^{ko} gezeigt haben, haben wir uns auf die Suche nach einem unterschiedlichen Signal zur Regulation beider Phänotypen gemacht. Der PHB2^{pko} spricht sehr gut auf den zusätzlichen Wegfall des Insulinsignals an [3]. mTOR als zentraler Regulator der metabolischen Signalwege im Podozyten spielt dabei eine entscheidende Rolle. Um die Aktivität des Insulinsignalwegs in den OMA1^{ko} Mäusen sowie den PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Mäusen darzustellen, haben wir Nieren von 21 Tage alten Mäusen entnommen und mit einer Immunhistochemischen Färbung auf pS6 bearbeitet (S. 50ff.). Das phosphorylierte Protein S6 ist ein nachgeschalteter Effektor des mTOR Signalwegs und dient zur Darstellung der Aktivität von mTOR [66,138].

Das der PHB2^{pko} zu einer Aktivierung des mTOR Signalwegs führt, ist bereist publiziert [3]. Die PHB2$^{fl/fl}$ Kontrolltiere zeigen unter normalen Bedingungen nur eine sehr geringe mTOR Aktivität (**Abb. 10A**). Interessanterweise ist auch im OMA1^{ko} die mTOR Aktivität erhöht. Man sieht im Vergleich zur Kontrolle deutlich mehr pS6 positive Zellen im PHB2^{pko} und im OMA1^{ko} (braune Punkte stehen für pS6 positive Zellen). Die beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich rein optisch nicht wesentlich in der Anzahl an pS6 positiven Zellen je Glomerulum (**Abb. 10A**). Im PHB2^{pko}/OMA1^{ko} sieht man noch mehr pS6 positive Zellen pro Glomerulum als in den Einzelknockout Tieren. Es kommt zu einem synergistischen Signal im Doppelknockout.

Zur Validierung der optischen Eindrücke unter dem Mikroskop, haben wir die pS6 positiven Zellen pro Glomerulum ausgezählt analog zu der WT1 Auszählung. Die Auszählung erfolgte verblindet durch zwei unterschiedliche Personen. In die Auswertung flossen 50 aufeinander folgende Glomeruli pro Nierenschnitt ein inklusive der Glomeruli ohne pS6 positive Zellen. Der optische Eindruck wird durch die Analyse bestätigt (**Abb. 10B**). Die PHB2$^{fl/fl}$ Tiere zeigen im Schnitt die geringste mTOR Aktivität mit 0,7 $\pm$ 0,09692 pS6 positiven Zellen pro Glomerulum. Der PHB2^{pko} und der OMA1^{ko} zeigen eine nahezu doppelt so starke Aktivität mit 1,156 $\pm$ 0,1028 positiven Zellen respektive 1,28 $\pm$ 0,1015 positive Zellen. Die höchste Aktivität weist der PHB2^{pko}/OMA1^{ko} auf mit 1,69 $\pm$ 0,1168 pS6 positiven zellen pro Glomerulum.

Somit zeigt sich sowohl im PHB2^{pko} als auch im OMA1^{ko} ein aktivierter Insulinsignalweg. Im Doppelknockout scheint es zu einer additiven Hyperaktivität des mTOR Signalwegs zu kommen.

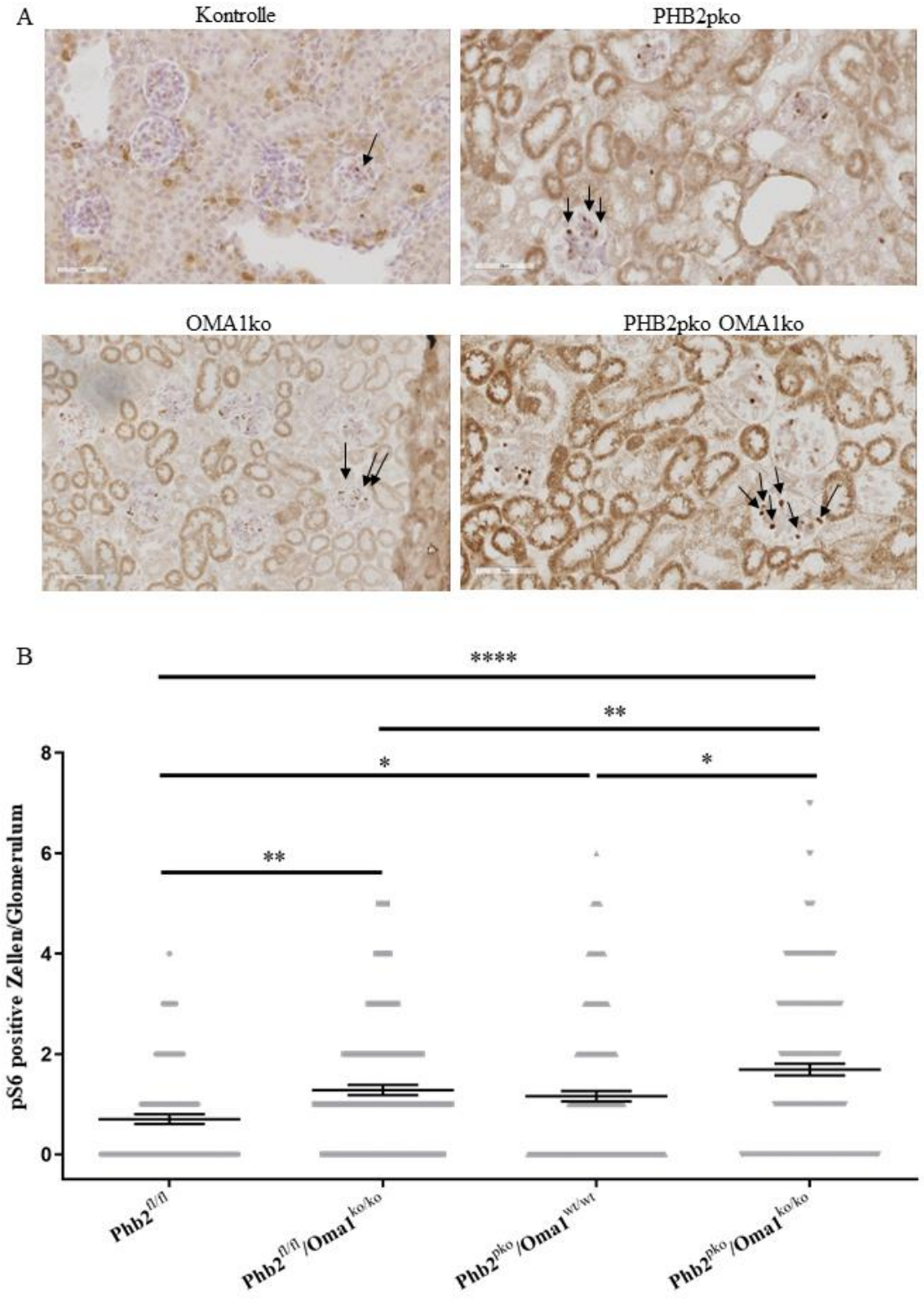


Abbildung 9: Aktivierung des mTOR Signalwegs in Einzel- und Doppelknockout Mäusen

A Repräsentative Schnitte aus Mäusenieren von 21 Tage alten Tieren mit einer IHC-Färbung auf pS6. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die pS6 positiven Zellen in den Glomeruli. Im

$PHB2^{pko}$ sowie im $OMA1^{ko}$ finden sich nahezu gleichviele pS6 positive Zellen. Im $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ finden sich doppelt so viele pS6 positive Zellen. (Maßstabbalken 50 µm).

B Auszählung von jeweils 50 Glomeruli pro Nierenschnitt. Dargestellt sind die pS6 positiven Zellen. In die Auswertung sind auch nicht positive Glomeruli eingeflossen. Es ergeben sich folgende Werte für MEAN $\pm$ SEM: $PHB2^{fl/fl}$ 0,7 $\pm$ 0,09692 Zellen, n=2; $OMA1^{ko}$: 1,28 $\pm$ 0,1028 Zellen, n=3; $PHB2^{pko}$: 1,156 $\pm$ 0,1028 Zellen, n=4; $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$: 1,69 $\pm$ 0,1168 Zellen, n=4. Die Auswertung erfolgte mittels einer One way ANOVA mit Tuckey's multiple comparison Post hoc Test, $PHB2^{fl/fl}$ versus $OMA1^{ko}$ p=0,0082; $PHB2^{fl/fl}$ versus $PHB2^{pko}$ p=0,0424; $PHB2^{fl/fl}$ versus $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ p<0,0001; $Oma1^{ko}$ versus $PHB2^{pko}$ p=0,8475; $Oma1^{ko}$ versus $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ p=0,001; $PHB2^{pko}$ versus $OMA1^{ko}$ p=0,0365. Signifikanzniveaus: * p<0,05; ** p<0,01; **** p<0,001.

4 Diskussion

4.1 Ein PHB2 Knockdown führt zu einem kaskadenartig aktivierten Insulinsignalweg im Podozyten

Unser Interesse in der vorliegenden Arbeit gilt dem Einfluss von Mitochondrien auf den Insulinsignalweg im Podozyten. Um uns diesem komplexen Thema zu nähern, haben wir uns im Zellkulturmodell den Einfluss einer mitochondriellen Dysregulation auf die Aktivität des Insulinsignals angeschaut. In unseren Experimenten stellten wir eine deutliche Aktivierung der Insulinkaskade dar über die PI3K, AKT und FOXO im PHB2 KD (**Abb. 5**). Ein weiteres Ergebnis unserer Arbeit ist die Darstellung eines hochregulierten MAPK - Signalwegs (**Abb. 5**). Außerdem konnten wir einen hyperaktivierten mTOR Signalweg nachweisen (**Abb. 5**).

In der Literatur finden sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Insulinsignalwegs und dem Knockout von PHB2. Die genaue Verbindung zwischen der mitochondriellen Dysfunktion und dem Insulinsignal ist nach wie vor nicht aufgeklärt. Ising et al. konnte 2015 zeigen, dass der podozytäre $PHB2^{pko}$ zu einem hyperaktiven mTOR Signalweg führt [3]. Dieses Ergebnis können wir mit dem vorliegenden Experiment in Podozyten bestätigen (**Abb. 5**).

Basierend auf diesen Ergebnissen stellen wir die Hypothese auf, dass eine komplette Kaskadenaktivierung des Insulinsignalwegs inklusive des MAPK Signalwegs in undifferenzierten Podozyten mit Mitochondrienschaden stattfindet. Daher gehen wir in Zusammenschau unserer Experimente und der Ergebnisse von Ising et al. 2015 davon aus, dass es sich bei dem hochregulierten pS6 nicht um ein intrinsisches Phänomen durch eine andere Interaktion mit den angegriffenen podozytären Mitochondrien handelt, sondern am ehesten um eine Rezeptor vermittelte Reaktion über den Insulin- und den IgF1-Rezeptor [3].

Der Signalweg über PI3K, AKT und FOXO ist erstmals in *C. elegans* beschrieben worden, wo der Knockout der PI3K zu einem signifikant längeren Überleben der Würmer führt [134,136]. Darüber hinaus zeigte Kenyon et al. bereits 1993, dass eine daf - 2 Mutante als Homolog für den IGF-1R/IR eine verlängerte Überlebensspanne hat in Zusammenspiel mit daf - 16, dem Wurmhomolog für FOXO [133]. Die Expression von daf - 16 im Zytoplasma von *C. elegans* stellt sich auch bei PHB2 KD dar [3]. Zellstress führt zur Aktivierung von FOXO, wodurch FOXO mTORC1 hemmt, um die zelluläre Homöostase unter Stressbedingungen zu erhalten [139]. So wird die anabole, energieverbrauchende Aktivität von mTORC1 abgeschaltet. Außerdem aktiviert FOXO AKT, was als Rückkopplungsschleife zur Inhibition von FOXO führt [139]. Die Überexpression von FOXO kann im diabetischen Umfeld protektiv wirken

[140]. Das ist in unserem PHB2 KD nicht zu erkennen, da sowohl FOXO3A aus dem Zellkern austritt, als auch pS6 als Effektor von mTORC1 hochreguliert wird. Möglicherweise reicht hier das protektive Signal über FOXO nicht aus, oder der mTOR Signalweg wird durch ein weiteres Signal aus den defekten Mitochondrien zum Insulinrezeptor konsequent aktiviert. Auch in *C. elegans* konnte ein AGE 1 KO, dem Wurmhomolog für die PI3K, die Lebensspanne des PHB2 KO nicht verlängern [141]. Hier klingt an, was sich in den Experimenten dieser Arbeit deutlich abzeichnet. In gesunden Würmern führt der AGE 1 KO zu einem verlängerten Überleben der Tiere. Kommt es jedoch zu einem zusätzlichen Hit/Stressfaktor wie hier dem PHB2 KD - wirkt sich dieses System nicht mehr förderlich auf die Lebensspanne des Wurms aus [141].

Zusammenfassend zeigt sich in unserem Zellkulturmodell neben der bekannten mTOR Aktivierung durch einen PHB2 KD zusätzlich die kaskadenartige Aktivierung des Insulinsignalwegs über AKT bis hin zu FOXO3A. Pende et al. und Salmond et al. zeigen beachtenswerte Studien zur Aktivierung von S6/pS6 und schlagen einen Signalweg über MAPK unabhängig von mTOR vor [70,142]. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die doppelte Inhibition des IGF1- Rezeptors und eine zusätzliche Behandlung mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin im Mausmodell mit PHB2 KO, um eine möglicherweise noch deutlichere Verlängerung der Lebensspanne zu sehen verglichen mit den $PHB2^{pko}$/$IGF1^{ko}$ Mäusen. Erste vielversprechende Ergebnisse dazu gibt es aus C. elegans [141].

Die Darstellung eines hochregulierten MAPK - Signalwegs steht im Einklang mit der hiesigen Literatur. Die Phosphorylierung von p38 dient als Kommunikation der Zelle zwischen Umgebung und Nukleus. P38 wird in Podozyten für die Apoptose benötigt [143]. Noch unveröffentlichte Daten aus dem Nephrologischen Forschungslabor zeigen dieselbe Hochregulation von pp38 von $PHB2^{pko}$ Mäusenieren. Bereits 2004 konnte Stambe et al. ein hochreguliertes pp38 in glomerulären, tubulären und interstitiellen Zellen in Assoziation mit Nierenversagen und Proteinurie beschreiben. Für uns besonders spannend sind auch die Beobachtungen von Komers et al., der die Aktivierung von MAPK mit p38 im dysregulierten Insulinsignalweg bei diabetischen Ratten beschrieben hat einhergehend mit einer Albuminurie und Glomerulosklerose [144]. Dabei ist das gesteigerte pp38 Signal protektiv und verhindert nach Meinung der Autoren über die Stabilisierung des Aktinzytoskeletts ein Podozyten *Effacement* mit konsekutiver Proteinurie [144,145]. In unserem Kontext kann das gesteigerte pp38 Signal neben der Aktivierung des Insulinsignalwegs auch Ausdruck für einen gesteigerten Autophagiebedarf der PHB2 KD Zellen sein, da vermehrt fehlgefaltete Proteine anfallen, die

eliminiert werden müssen. Die Möglichkeiten dieses protektiven Signalwegs werden in podozytären PHB2^{pko} Mäusen jedoch überschritten [3].

Dasselbe Regulationsmuster wie in unserem Zellkulturmodell mit PHB2 KD konnte Landau et al. im Mausmodell mit einem induzierten Typ I Diabetes mellitus darstellen. Auf Proteinebene kommt es in den murinen Nieren Lysaten wie bei unseren PHB2 KD Zelllysaten zu einer Hochregulation von pAkt-, p-rpS6- und p-mTOR[146]. Ein neuer Aspekt, der in der Arbeit von Landau et al. beschrieben wird und im Kontext unserer Ergebnisse diskutiert werden kann, ist der Nachweis eines angeschalteten MAPK Signalwegs. Interessant daran ist, dass diese Signaltransduktion nicht durch den Igf1 - Rezeptor vermittelt worden ist sondern durch ein bisher nicht näher beschriebenes Signal [146]. Wir sehen in unserem Zellkulturmodell mit mitochondrialer Dysfunktion genau dieselbe Signalwegregulation. Sowohl der mTOR- als auch der Insulinsignalweg und der MAPK- Signalweg sind hochreguliert. Eine mögliche Verbindung zwischen dem mTOR Signalweg und dem MAPK Signalweg stellt laut Literatur die Aktivierung von ERK1/2 dar. Dabei wird mTORC1 als Substrat für ERK1/2 diskutiert [147]. Aus unseren Daten eröffnet sich die Möglichkeit, diese Interaktion zwischen einem aktivierten m-TOR Signal und einem MAPK Signal über pERK1/2. Auch in vivo führt ein Insulinstimulus bei IR Knockout Mäusen zu einem gesteigerten pERK1/2 Signal [43].

Allgemein gilt, dass die mitochondriale Funktion bei Insulinresistenz eingeschränkt ist [104–106]. Deshalb haben wir uns die Frage gestellt, ob es mitochondriale Signale gibt, die auf den Insulinsignalweg im Podozyten wirken und wo diese Signale wirken könnten. Ein in vitro Zellkulturmodell hat dabei natürlich nur begrenzte Aussagekraft. Valide werden die Ergebnisse, wenn man sie in Zusammenschau mit Ergebnissen aus der Literatur kritisch diskutieren kann. Zudem bietet das Zellkulturmodell ein verhältnismäßig einfaches Verfahren, um erste Ideen zu sammeln, die anschließend im Mausmodell umgesetzt werden können [148].

Unsere Daten zeigen, dass bei einem PHB2 KD in HSMPs sowohl der Insulinsignalweg über AKT und FOXO, sowie der mTOR Signalweg mit pS6 und der MAPK Signalweg aktiv sind. Es gib in Zusammenschau mit Angaben aus der Literatur Hinweise darauf, dass der AKT - FOXO Signalweg und der mTOR Signalweg nicht in direkter Verbindung zueinanderstehen, sondern durch unterschiedliche Signale möglicherweise direkt aus den Mitochondrien an den Insulinrezeptor hyperaktiv reagieren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit eines Einflusses durch den MAPK Signalweg. Ein Zusammenspiel des mTOR und des MAPK Signalwegs ist in diversen Krankheitsentitäten beschrieben worden und spielt eine zunehmende Rolle in onkologischen Therapien [73], [74]. Auch in Kardiomyozyten kommt dem Doppelknockout

eine protektive und Angiogenese hemmende Wirkung zu [69,72]. In Neuronen gibt es unter anderem einen Nachweis für das Zusammenspiel von mTOR und MAPK bei der Plastizität von Synapsen [71]. So ergeben sich aus unserer dargestellten Übersicht von Aktivierungen im Zellkulturmodell zahlreiche Ansatzpunkte, um die vielfältigen Auswirkungen einer mitochondrialen Dysfunktion auf den metabolischen Signalweg im Podozyten genauer zu betrachten, da es sich vermutlich um eine Interaktion verschiedener Stimuli aus den dysregulierten Mitochondrien handelt. Unsere Darstellung ist interessant, da sie deutlich zeigt, dass der Mitochondrienschaden durch einen PHB2 KD zu einer gleichen metabolischen Regulation wie ein Insulinsignal führt.

4.2. Der doppelte Verlust von OMA1 und PHB2 im Podozyten führt nicht zu einem protektiven Effekt

Die zweite Forschungsfrage dieser Dissertation behandelt den Effekt von OMA1 auf den PHB2 Defekt im Podozyten. Inspiriert durch die vorher dargestellten Ergebnisse haben wir die Hypothese formuliert, dass ein $OMA1^{ko}$ auch zu einer Verlängerung der Lebensspanne eines podozytären $PHB2^{pko}$ führt, da wir davon ausgegangen sind, dass der PHB2 Effekt, der sich in Podozyten zeigt, OMA1 vermittelt ist.

Wir konnten in unseren Doppelknockout Mäusen einen geringen, statistisch aber nicht signifikanten Überlebensvorteil gegenüber $PHB2^{pko}$ Tieren beobachten (**Abb. 6**). Was uns dennoch aufgefallen ist, ist der deutlich spätere Zeitpunkt, an dem das erste Doppelknockout Tier verstirbt (**Abb. 6**). Die erste $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ Maus stirbt, wenn bereits 50% der $PHB2^{pko}$ Tiere verstorben sind. Dafür sterben die Doppelknockouts in der Hälfte der Zeit. Unsere hier erhobenen Überlebensdaten für die $PHB2^{pko}$ Mäuse decken sich mit der Publikation von Ising et al. [3]. Die Unterschiede in der Überlebenszeit lassen spekulativ anhand unserer Daten an einen Schutz - Mechanismus durch den $OMA1^{ko}$ denken, der bis zu einem gewissen Grad protektiv wirkt, den Phänotyp des $PHB2^{pko}$ aber nicht retten kann. Neueste Studien von Brinkkötter et al. aus dem Jahr 2019 zeigen, dass Podozyten unter physiologischen Bedingungen keine intakte Fissionsmaschinerie benötigen, um funktionstüchtig zu sein [149]. Dies sehen wir auch in unserem $OMA1^{ko}$. Die Inhibition der Spaltung der Mitochondrien mit einem Übergewicht der Fusionsmechanismen beeinträchtigt die Mäuse nicht.

Wie bereits für den $PHB2^{pko}$ gezeigt worden ist, führt er zu einem massiven podozytären Phänotyp mit Proteinurie, Wachstumsverzögerung, Gewichtsverlust, Nierenversagen und vorzeitigem Tod um Tag 31 postpartum mit einer entsprechend derangierten Nierenhistologie [3]. In unseren Analysen lassen sich die Ergebnisse aus den vorherigen Veröffentlichungen [3]

der Arbeitsgruppe bzgl. des PHB2^{pko} bestätigen (**Abb.8, 9, 10C**). Der einzige Unterschied in unseren Daten betrifft die Anzahl der Podozyten pro Glomerulum (**Abb. 9**). Für den PHB2^{pko} ist publiziert, dass der PHB2 Verlust im Podozyten zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 21 nach Geburt) nicht zu einer Reduktion der Podozytenanzahl führt und es keine gesteigerte Apoptoserate in PHB2^{pko} Glomeruli gibt [150]. In unseren Auszählungen ist die Anzahl an WT1 positiven Zellen an Tag 21 signifikant geringer als in der PHB2$^{fl/fl}$ Kontrollgruppe (**Abb. 8**). In der Literatur ist eine gesteigerte Apoptosesensitivität PHB2 defizienter Zellen beschrieben worden [5]. Ising et al. hat doppelt so viele Glomeruli je Versuchstier ausgezählt [150]. Es wäre möglich, dass sich der Effekt in einer größeren Kohorte nicht mehr signifikant darstellt. Auf der anderen Seite ist die WT1 Auszählung kein 100 % reliables System zur Bestimmung der Podozytenzahl, da Podozyten aufgrund von Dedifferenzierungsprozessen nicht mehr als WT1 positiv erscheinen. So kann es sein, dass man eine falsche Zahl an Podozyten auszählt. Natürlich spielen auch die Einschlusskriterien des Betrachters eine entscheidende Rolle bei der Auszählung [128].

In den OMA1^{ko} Nieren sehen wir keine histologischen Auffälligkeiten nach 21 Tagen postpartum (**Abb. 8, 9**). Auch die Struktur der Mitochondrien wird durch einen OMA1^{ko} morphologisch nicht beeinflusst (**Abb. 9**). Darüber hinaus präsentiert unser OMA1^{ko} im Vergleich zum PHB2^{pko} eine größere Anzahl an Podozyten (**Abb. 9**). Dass es in den OMA1 KO Zellen zu einem geringeren Zellverlust kommt, scheint nicht verwunderlich, da die murinen OMA1 KD Zellen weniger Apoptose sensibel sind [97] In den von uns durchgeführten Nierenfunktionsassays sahen wir keine eingeschränkte Nierenfunktion in OMA1^{ko} Tieren (**Abb. 10**). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Publikation, in der Xiao et al. sich den Einfluss eines OMA1 Verlustes auf Tubuluszellen der Niere bei akutem, ischämischem Nierenversagen angeschaut hat [99]. Der Autor beschreibt in acht Wochen alten OMA1^{ko} Mäusen keine histologischen oder funktionellen renalen Auffälligkeiten. Interessanterweise kann in dem dargestellten Krankheitsmodell der tubuläre Schaden nach Reperfusion durch einen OMA1^{ko} histologisch und funktionell verbessert werden. Die Apoptoserate in OMA1^{ko} Mäusen ist nach Reperfusion geringer und es zeigen sich weniger fragmentierte Mitochondrien als in Wildtyp Tieren nach Reperfusion [73]. Genau dasselbe Phänomen sieht Korwitz et al. als Einfluss eines OMA1 Verlustes auf Neuronen [7]. Der singuläre OMA1^{ko} zeigt in Neuronen keine Auffälligkeiten auch nicht in Bezug auf die Mitochondrien. Aber der OMA1 Knockout führt zu einem deutlichen Überlebensvorteil von PHB2^{NKO} Mäusen und schützt vor Apoptose. Morphologisch stellt OMA1 allerdings nicht, die durch PHB2 derangierte Cristae Struktur der Mitochondrien wieder her [7].

Im Gegensatz dazu bestand bei uns -wie nach der Auswertung unserer Überlebenskurve zu erwarten war, im PHB2^{pko}/OMA1^{ko} weiterhin das Bild einer Glomerulosklerose, eine auffällige Schlitzmembran (**Abb. 8**), sowie ein Podozyten *Effacement* (**Abb. 9**). Auch die Morphologie der derangierten mitochondrialen Struktur lässt sich nicht wiederherstellen (**Abb. 9**). Allerdings ist das Bild des Doppelknockouts deutlich heterogener als der PHB2^{pko}. Es zeigen sich teilweise noch eine intakte Schlitzmembran und nicht veränderte Mitochondrien. In diesem Zusammenhang ist es nicht verwunderlich, dass der Doppelknockout nach 21 Tagen noch eine signifikant geringere Albuminurie aufweist als der PHB2^{pko} (**Abb. 9**). Passend dazu ist auch unsere WT1 Auszählung, die für den PHB2^{pko}/OMA1^{ko} eine höhere Podozytenzahl zeigt als im PHB2^{pko} (**Abb. 8**). Es zeigt sich auch kein Podozytenverlust gegenüber dem OMA1^{ko}. Allerdings gibt es im Albumin - Kreatinin - Quotienten eine große Schwankung zwischen den Werten der Tiere (**Abb. 9**). Darüber hinaus bildet sich in unseren Funktionsassays eine eingeschränkte Nierenfunktion ab (**Abb. 10**). Damit zeigt sich auch in den Funktionsassays, dass der OMA1^{ko} den PHB2^{pko} funktionell nicht retten kann. Im OMA1^{ko} kommt es nicht zur Albuminurie. Damit erscheint die Signaltransduktion an der Schlitzmembran als der entscheidende Einflussfaktor für den Erhalt der Nierenfunktion. Ohne PHB2 fehlt ein entscheidender Baustein für die Integrität der Schlitzmembran.

Mitochondrien passen ihre Form ständig den metabolischen Gegebenheiten an. So führt eine gesteigerte ATP Produktion zu fusionierten Mitochondrien, wohingegen eine reduzierte OXPHOS Funktion, die gesteigerte ROS Produktion und ein Verlust an mitochondrialer DNA zur Fission von Mitochondrien führt [6]. Die stressinduzierte Fission von Mitochondrien zeigt sich deutlich im PHB2^{pko} (**Abb. 9C**) [4]. Durch den Wegfall der Inhibition durch PHB2 beschleunigt OMA1 den Abbau der L -OPA1 Formen und führt zur Fission von Mitochondrien. Dies resultiert in kleinen Mitochondrien mit Verlust der Cristae Struktur. Der OMA1^{ko} führt a priori zu keiner morphologischen mitochondrialen Veränderung - wie auch in Neuronen gezeigt werden konnte (**Abb. 3**) [7]. Dennoch kann der doppelte Knockout von PHB2 und OMA1 die mitochondriale Struktur nicht retten (**Abb. 3, 9**) [7]. Die von uns dargestellte mitochondriale Struktur zeigt große Ähnlichkeit mit den von Szeto et al. beschriebenen Mitochondrien in Mauspodozyten, bei Diabetischer Nephropathie [127]. Die Autoren beschreiben, runde, unorganisierte Mitochondrien, mit einem Verlust der Cristae Membran und einer geringeren Matrixdichte [127].

Diese Angaben aus der Literatur lassen sich sehr gut mit den von uns erhobenen Daten diskutieren. Auch in unserem Mausmodell erweist sich der OMA1^{ko} als ein Schutz vor

Apoptose (**Abb. 8**). Auch hier zeigt sich in unseren Daten wieder eine mögliche aber statistisch nicht signifikante Schutzfunktion des $OMA1^{ko}$, die sowohl im Mausmodell von Xiao et al. als auch bei Korwitz et al. zum Tragen kommt. Wie bei Korwitz et al. kann auch in unserem Doppelknockout die Morphologie der Mitochondrien nicht wiederhergestellt werden. Das in unseren Experimenten die Nierenfunktion der $PHB2^{pko}$ Mäuse mit einem zusätzlichen $OMA1^{ko}$ nicht verbessert werden kann, ist ein weiterer Beweis für die extramitochondriale Funktion von PHB2 speziell im Podozyten. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit unserer Ergebnisse wäre die veränderte metabolische Regulation im Podozyten. Wie Brinkkötter et al. gezeigt haben, ist der Podozyt eine der wenigen Zellen, die ihren Energiebedarf unter Ruhebedingungen nahezu vollständig aus der anaeroben Glykolyse bezieht [149]. Damit unterscheidet sich der Podozyt fundamental von der metabolischen Regulation anderer Zellen - selbst die Regulation der renalen Tubuluszellen wie bei Xiao et al. hat nichts mit dem podozytären Metabolismus gemein. In diesem Zusammenhang wäre es auch verständlich, dass sich eine Mitochondriopathie im Podozyten anders auswirkt als in Neuronen oder Tubuluszellen.

Eine Erklärung für das differierende Schutzverhalten von einem $PHB2^{pko}/OMA1^{ko}$ im Podozyten gegenüber dem in Neuronen oder im Herzen ist die von uns propagierte doppelte Funktion von PHB2 im Podozyten. Dort erfüllt PHB2 neben seiner Funktion der Stabilisierung der Mitochondrienmembran eine weitere entscheidende Aufgabe. So konnte Ising et al. zeigen, dass PHB2 zusätzlich zu seiner mitochondrialen Lokalisation an der Schlitzmembran zu finden ist und dort verantwortlich ist für die Integrität der podozytären Struktur [4]. Nach wie vor ist die genaue Funktion von PHB2 an der Schlitzmembran ungeklärt und es ist schwierig, den podozytären Phänotyp des $PHB2^{pko}$ entweder der mitochondrialen Dysfunktion oder der Funktion von PHB2 an der Schlitzmembran zuzuordnen. Erste Ansätze zu einer extramitochondrialen Funktion von PHB2 außerhalb von Mitochondrien werden in der Literatur schon länger diskutiert [110]. Für OMA1 ist beim Abschluss dieser Dissertation noch keine extramitochondriale Lage beschrieben worden. Da OMA1 als nachgeschalteter Effektor von PHB2 wirkt und der Doppelknockout sich in Neuronen als protektiv erwiesen hat [7], unterstützen die Überlebensdaten der Mauskohorten eine doppelte Funktion von PHB2 im Podozyten. Der doppelte Schaden, der durch den PHB2 Verlust an den Mitochondrien und an der Schlitzmembran hervorgerufen wird, kann nicht allein durch einen zusätzlichen $OMA1^{ko}$ behoben werden. Hier werden in Zukunft weitere Studien benötigt, um die Funktion von PHB2 an der Schlitzmembran genauer zu erarbeiten. Der Podozyt ist mit seiner Schlitzmembran eine besonders interessante und einmalige Zelle.

4.3 Aktivierung des mTOR Signalwegs in Einzel- und Doppelknockout Mäusen

Da sich kein Vorteil aus dem PHB2^{pko}/OMA1^{ko} für den Podozyten ergibt, stellten wir uns die Frage nach einem extramitochondrialen Einfluss von OMA1. Da die mitochondriale Dysfunktion und der Insulinsignalweg eine Wechselwirkung haben, haben wir uns angeschaut, wie sich ein OMA1^{ko} auf den metabolischen Signalweg im Podozyten auswirkt und ob OMA1 einen Einfluss auf das mTOR Signal hat.

Hier erhielten wir wieder ein überraschendes Ergebnis - der OMA1^{ko} führt ebenso wie der PHB2^{pko} [3] zu einem gesteigerten pS6 Signal (**Abb. 9A**). Das quantitative Ausmaß dieser Aktivierung ist für die beiden Einzelknockouts vergleichbar (**Abb. 8b**).

Im OMA1^{ko} zeigt sich ein gesteigertes pS6 Signal ohne einen Phänotyp. Da die Rahmenbedingungen für alle Tiere gleich waren, die Futtermenge jedoch nicht beschränkt war, wäre es theoretisch möglich, dass der OMA1^{ko} zu einem gesteigerten Hungergefühl der Tiere führt und es folglich zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme käme. Dies ist nicht in der Literatur beschrieben und spiegelt sich auch nicht im Körpergewicht der 21 Tage alten Mäuse wider (Daten nicht gezeigt). Theoretisch wäre es auch denkbar, dass es sich bei der pS6 Hochregulation um ein anderes Signal aus den Mitochondrien handelt, dass nicht durch den Insulinsignalweg und eine gesteigerte mTOR Aktivität beeinflusst wird. Unveröffentlichte Daten aus dem Nephrologischen Forschungslabor zeigen in OMA1^{ko} Nieren eine Steigerung des pAKT Signals. Dies wäre ein weiterer Hinweis für die Aktivierung der Insulinsignalkaskade. Der Doppelknockout von PHB2 und OMA1 führt im Sinne eines synergistischen bzw. additiven Effekts zur stärksten pS6 Aktivierung im Podozyten (**Abb. 10**). Man könnte insgesamt bemängeln, dass die absolute Anzahl der pS6 positiven Zellen pro Glomerulum sich im Mittel nur um eine Zelle je Glomerulum unterscheidet. Allerdings sind in die Analyse auch alle Glomeruli eingeflossen, die überhaupt keine mTOR Aktivität zeigen. Wenn man die Anzahl der Zellen auf die Gesamtzahl der Glomeruli extrapoliert, ergibt sich ein deutlich gesteigertes pS6 Signal für die Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrolle. Zudem stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob Glomeruli, die im Doppelknockout nicht auf pS6 angefärbt werden können, dieselbe Bedeutung haben wie in der Kontrollgruppe.

Weitere Ideen zur Frage eines gesteigerten pS6 Signals im OMA1^{ko} liegen aus der Forschung an Neuronen bereits vor. Die Induktion der Autophagie über den PI3K/AKT/mTOR Signalweg kann neuroprotektiv wirken [151]. Auch in unseren OMA1^{ko} Mäusen zeigt sich ein gesteigerter Zellverlust (**Abb. 8**). Denkbar wäre eine Induktion der Autophagie über den oben beschriebenen Signalweg in unseren OMA1^{ko} Podozyten, der sich protektiv auf die Zellen

auswirkt. Über denselben Signalweg mit pS6 können Neuronen vorbereitet werden, andere Energieträger als Glukose zu nutzen [152]. Auch das Entkoppeln von Mitochondrien wird als protektiv diskutiert mit der Inhibition des mTOR und des Insulinsignalwegs [153]. Der $Oma1^{ko}$ wirkt aber nur isoliert protektiv. Sobald es im Rahmen eines „2nd Hit-Modells“ zu einem weiteren Trigger kommt, funktioniert das System nicht mehr. Wenn man $OMA1^{ko}$ Mäuse mit einer hochkalorischen Diät füttert, sind sie besonders anfällig für einen adipösen Phänotyp und Auffälligkeiten im Lipidstoffwechsel [97]. Aus unseren Daten zeigt sich ebenfalls die Anfälligkeit des OMA1 Knockouts. Erwartet haben wir einen teilweise geretteten Phänotyp wie in Neuronen, der über L-OPA1 die Destabilisierung der Mitochondrienmembran auffängt [7]. Aber der Doppelknockout von PHB2 und OMA1 führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit einem aktivierten Insulinsignalweg und letztendlich einem metabolischen Wechsel im Podozyten.

Sowohl im $OMA1^{ko}$ als auch im $PHB2^{pko}$ ist das OXPHOS System der Mitochondrien intakt [97,150]. Allerdings sind Podozyten unter Ruhebedingungen unabhängig von der mitochondrialen Energieproduktion, da sie ihre Energie hauptsächlich aus der anaeroben Glykolyse beziehen unter gesteigerter ROS Produktion [149]. Beim $PHB2^{pko}$ käme es gewissermaßen zu einer Überversorgung der Podozyten durch ein derangiertes Insulinsignal, was sie schädigt. Während der Differenzierung von prämaturen Podozyten ist der oxidative Energiemetabolismus aktiviert. Unter Stressbedingungen während der Entwicklung durch einen hohen Glukosegehalt des Mediums, kommt es zu einem glykolytischen Wechsel im Podozyten mit gesteigerter Glykolyse [127]. Dieses Verhalten erinnert an den Warburgeffekt in Krebszellen [76,154]. Während Erkrankungen dedifferenzieren Podozyten zur Proliferation und es werden Signalwege aus der Entwicklung angeschaltet [66,154]. Nahrungsabhängige Signalwege wie mTOR regulieren die mitochondriale Funktion [76]. Spekulativ kann man im von uns nachgewiesenen gesteigerten pS6 Signal im $PHB2^{pko}$ und im $OMA1^{ko}$ ein Signal für den glykolytischen Wechsel der Zellen sehen zurück zum oxidativen Energiemetabolismus aus der Entwicklung. Unter diesen Bedingungen könnte der $OMA1^{ko}$ sich als Nachteil erweisen, da OMA1 mutmaßlich an der Stabilisierung der Atmungskette beteiligt ist [95]. Zudem kommt es im $OMA1^{ko}$ zu einer geringeren β - Oxidation, da die Oxidation von Fettsäuren nicht möglich ist [97]. Auch wenn die Fettsäuren Oxidation unter normalen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielt [149], könnte der Podozyt im Krankheitsfall darauf zurückgreifen. Auch in diesem Szenario wäre ein OMA1 Knockout ein Nachteil. Ein ambivalenter Effekt von OMA1 wird auch in der Krebsforschung und Krebstherapie beobachtet und diskutiert. Demnach kann OMA1 sowohl protektiv als auch aggravierend wirken [155]. In Hefen zeigten

Yong et al. 2011, dass eine Herabregulation von mTORC1 die ROS Produktion steigert und das mitochondriale ROS Signal zu einer längeren Lebensspanne führt [156]. Darüber hinaus zeigen Hefen und der Pilz *C. albicans* mit OMA1 Knockout eine mTOR Resistenz und ein vermindertes nachgeschaltetes Signal durch mTORC1. Die Zellen sind anfälliger für oxidativen Stress [95]. Im Stressprovokationstest zeigt der Doppelknockout von OMA1 und mTOR das beste Überleben, gefolgt von einem mTOR Knockout und den Wildtyp Zellen. Die OMA1 defizienten Zellen zeigen im Stressprovokationstest das kürzeste Überleben [95]. Die Autoren formulieren die Hypothese, dass eine gesteigerte ROS Produktion im OMA1 Knockout zu einem gesteigerten mTORC1 Signal führt, dass sich negativ auf den nachgeschalteten nukleären Signalweg auswirkt und zu einer verminderten Stresstoleranz der OMA1 Knockout Hefen führt [95]. Da der Podozyt über die anaerobe Glykolyse stetig ROS produziert [149], könnte dies zu einem gesteigerten mTOR Signal im OMA1^{ko} führen.

In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass eine mitochondriale Dysfunktion in Kombination mit einem dysregulierten Insulin Signalweg zu einem Podozytenschaden führt [42,43,101,102]. Der Signalweg über mTOR gilt als einer der zentralen Signalstellen und Regulatoren im Metabolismus von Zellen - auch im Podozyten. mTOR spielt in diversen Nierenerkrankungen eine aktive Rolle, wie z.B. bei der diabetischen Nephropathie. Dabei ist die Auswirkung des mTOR Signals sehr fein justiert. Eine Studie von Zschiederich et al. aus dem Jahr 2017 zeigt, dass es keine lineare Rolle für den mTOR Effekt gibt [68]. So führt ein chronisch aktiver mTOR Signalweg zu einer podozytären Hypertrophie [157], aber ein kompletter mTOR Knockout führt ebenfalls zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion und einem beschleunigten Krankheitsverlauf [68]. Der Knockout von nur einem RAPTOR Allel mit einer reduzierten mTOR Aktivität verbessert hingegen den Krankheitsverlauf der FSGS. Zschiedrich et al. fanden ferner heraus, das mTOR einen dosisabhängigen Effekt auf die Effektivität und Funktionalität von Mitochondrien im Podozyten hat. Ein gesteigertes mTOR Signal führt demnach zu einer reduzierten mitochondrialen Atmung und einer geringeren ATP Produktion zugunsten einer gesteigerten ROS Produktion [68]. Frei nach der alten Hormesis Hypothese von Paracelsus, dass die Dosis das Gift macht. Dieser Idee folgend, ist der protektive Effekt eines reduzierten mTOR Signalwegs in der ROS Adaptation bereits beschrieben [158]. Neben der Dosis ist auch der Zeitpunkt der Inhibition entscheidend [159–161].

Wir sehen in unserem Tiermodell, dass eine moderate mTOR Aktivierung in OMA1^{ko} Mäusen nicht krankheitsauslösend wirkt. Kommt jedoch ein zweites Ereignis hinzu z.B. ein zusätzlicher Mitochondrienschaden mit einem PHB2^{pko}, wird der mTOR Signalweg hyperaktiviert, was

wiederum krankheitsauslösend ist. Dies zeigt einmal mehr, wie kompliziert und feinreguliert die Einwirkungen und Auswirkungen auf und vom mTOR Signal sind. So ist noch unklar, wie die moderate mTOR Inhibition im FSGS Modell den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst. Die Autoren schlagen einen metabolischen Shift im Podozyten vor, der den Podozyten in einen Ruhezustand versetzt und damit seine Stressresistenz erhöht [68]. Bei $PHB2^{pko}$ Tieren sieht man auch einen moderat aktivierten mTOR Signalweg, der vergleichbar mit der mTOR Aktivierung in $OMA1^{ko}$ Tieren ist. Auch in den $PHB2^{pko}$ Tieren führt die moderate Inhibition von mTOR wie im FSGS Modell zu einem signifikant verlängerten Überleben der Mäuse [150]. Die Podozytenzahlen verändern sich in beiden Tiermodellen nicht. Im Gegensatz zum FSGS Modell bleibt beim $PHB2^{pko}$ eine Besserung der Proteinurie aus, da PHB2 eine zusätzliche Funktion an der Schlitzmembran erfüllt [4,150]. Was den Vergleich der mTOR Aktivität erschwert, ist die fehlende verbindliche Quantifizierbarkeit des mTOR Signals.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der moderat aktivierte mTOR Signalweg oder der moderat inhibierte mTOR Signalweg sich protektiv auf glomeruläre Erkrankungen auswirkt [68,150]. Neu ist unser Aspekt, dass der moderat aktivierte mTOR Signalweg auch über einen langen Zeitraum nicht per se einen glomerulären Schaden hervorruft. Es braucht einen weiteren Effekt wie einen Schlitzmembran Schaden beim $PHB2^{pko}$ oder die FSGS, um krankheitsauslösend zu wirken. Da es sich bei Podozyten um entdifferenzierte, ruhende Zellen handelt, weisen sie starke metabolische Veränderungen im Vergleich zu anderen Zellen auf [162]. Dabei muss die Energieproduktion der Mitochondrien nicht notwendigerweise gestört sein, um krankheitsauslösend zu wirken [163].

Die komplizierten Zusammenhänge im Zusammenspiel von Mitochondrien und der metabolischen Regulation im Podozyten sind noch lange nicht erschöpfend erforscht. Wie in dieser Arbeit gezeigt worden ist, gibt es noch viel Forschungsbedarf, um die Signalwege zwischen mTOR und den Mitochondrien aufzuklären.

Auch die Protease OMA1 bietet noch sehr viel Forschungspotential. Bisher ist noch recht wenig über den genauen Aufbau und die Funktionen von OMA1 bekannt. Neue Studien deuten auf eine deutlich differenziertere und vielseitigere Aufgabe und Regulation von OMA1 hin, als bisher angenommen [164], [165]. Mit der zunehmenden Forschungsarbeit an OMA1 stehen auch bessere Methoden zum Nachweis von OMA1 zur Verfügung. Der kommerziell erhältliche Antikörper liefert keinen sicheren Nachweis von OMA1, weshalb der $OMA1^{ko}$ auf Proteinebene durch den Nachweis von kurzen OPA1 Formen erbracht wird. Seit Mai 2019 ist ein fluoreszenzbasierter Aktivitätsassay für OMA1 publiziert [166]. So öffnet sich ein weiteres

spannendes Forschungsfeld auf dem Gebiet der Mitochondrien Interaktion mit dem Zellmetabolismus.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein PHB2^{pko} als Ausdruck eines Mitochondrienschadens zu einem gesteigerten Insulinsignal führt. Durch den zusätzlichen Knockout des IGF1 - und des Insulinrezeptors oder durch die partielle Inhibition des nachgeschalteten Insulinsignal Effektors mTORC1 mit Rapamycin, kann das Überleben des mitochondrialen Phänotyp gebessert werden [150]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch der OMA1^{ko} zu einem gesteigerten Insulinsignal führt, das aber keinen renalen Phänotyp hervorruft (**Abb. 9**). Da der OMA1^{ko} den PHB2^{pko} nicht retten kann, sondern es sogar zu einem synergistisch aktivierten mTOR Signal kommt, schließen wir daraus, dass es durch ein Signal aus den defekten Mitochondrien an den Insulinrezeptor unabhängig von PHB2 und OMA1 zu einer Sensitivierung des Insulinsignalwegs kommt (**Abb. 11**).

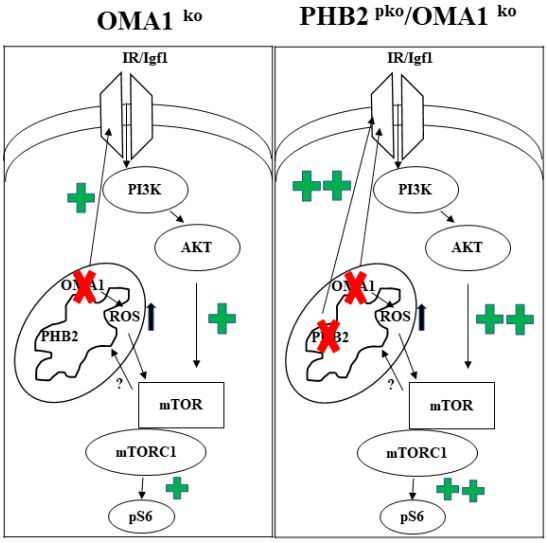


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Signalwege in OMA1^{ko} und PHB2^{pko}/OMA1^{ko} Mäusen

Im OMA1^{ko} links im Bild zeigt sich ein gesteigertes pS6 als Ausdruck eines aktivierten mTOR Signalwegs. mTOR erhält sein Signal über direkte Einflüsse von ROS aus den Mitochondrien sowie über den Insulin– und den Igf1 – Rezeptor, PI3K und AKT, die ebenfalls ein direktes Signal aus den Mitochondrien erhalten. Der gemeinsame Knockout von OMA1 und PHB2 führt zu einem hyperaktiven mTOR Signal durch ein gesteigertes Signal aus den Mitochondrien.

5 Conclusio

Der Einfluss von Mitochondrien auf den Insulinsignalweg im Podozyten ist noch nicht ausreichend erforscht. Wie unsere Ergebnisse bestätigen, gibt es eine Verbindung zwischen Mitochondrien, Mitochondriopathien und dem Insulinsignalweg im Podozyten. Wie Mitochondrien das Insulinsignal beeinflussen und auf welchem Weg ist noch unklar. In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass die Zerstörung des Fusions- und Fissions-Gleichgewichts der Mitochondrien zu einem aktivierten Insulinsignalweg führt, der allein aber keine Podozytopathie verursachen muss und ohne podozytenspezifischen Phänotyp bleibt. Vielmehr kommt es zu einer metabolischen Veränderung bzw. Sensibilisierung des Signalwegs, wodurch ein zusätzlicher Trigger zum Podozytenschaden führt. Der zusätzliche Trigger in unserem Modell ist der PHB2 Verlust, der zu einem kürzeren Überleben der Tiere mit deutlichem Nierenschaden führt. So kann diese Dissertation zum einen die extramitochondriale Funktion von PHB2 an der Schlitzmembran weiter stärken. Zum anderen leistet die Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Wechselwirkungen und Interaktion zwischen Mitochondrien und dem Insulinsignalweg. Das Verständnis dieser Regulation ist essentiell, da es einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Insulinsignal und der Nierenfunktion gibt. Neben wertvollen Erkenntnissen für die Behandlung der diabetischen Nephropathie, liefert insbesondere die molekulare Grundlagenforschung einen wichtigen Beitrag für eine hochspezialisierte und gezielte personalisierte Medizin, die nur erfolgreich sein kann, wenn wir die Feinregulation von Signalwegen erforschen, die sich über Millionen Jahre der Evolution immer perfekter angepasst haben. Daraus ergibt sich ein spektakuläres und spannendes Forschungsfeld für die Zukunft mit immensem Potential für die Therapiemöglichkeiten in der Behandlung von Erkrankungen des Nierenfilters.

6. Literaturverzeichnis

1. Potthoff F, Weber W, Berendes A, Münscher C. Zusammenfassender Jahresbericht der Berichtersteller für das Berichtsjahr 2017 Eine Auswertung im Auftrag des Gemeinsamen Bundesausschusses gemäß §13 der Qualitätssicherungs-Richtlinie Dialyse [Internet]. MNC - Medical Netcare GmbH; 2018 [cited 2019 Mar 9]. Available from: https://www.g-ba.de/downloads/39-261-3487/2018-09-20_QSD-RL_MNC-Jahresbericht-2017.pdf

2. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Prävalenz der eingeschränkten Nierenfunktion [Internet]. Deutsches Ärzteblatt. 2016 [cited 2019 Feb 10]. Available from: https://www.aerzteblatt.de/archiv/174771/Praevalenz-der-eingeschraenkten-Nierenfunktion

3. Ising C, Koehler S, Brähler S, Merkwirth C, Höhne M, Baris OR, Hagmann H, Kann M, Fabretti F, Dafinger C, Bloch W, Schermer B, Linkermann A, Brüning JC, Kurschat CE, Müller R-U, Wiesner RJ, Langer T, Benzing T, Brinkkoetter PT. Inhibition of insulin/IGF-1 receptor signaling protects from mitochondria-mediated kidney failure. EMBO Mol Med. 2015 Mar 1;7(3):275–87.

4. Ising C, Bharill P, Brinkkoetter S, Brähler S, Schroeter C, Koehler S, Hagmann H, Merkwirth C, Höhne M, Müller RU, Fabretti F, Schermer B, Bloch W, Kerjaschki D, Kurschat CE, Benzing T, Brinkkoetter PT. Prohibitin-2 Depletion Unravels Extra-Mitochondrial Functions at the Kidney Filtration Barrier. Am J Pathol. 2016 May 1;186(5):1128–39.

5. Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Löwer B, Wunderlich FT, Kleist-Retzow J-C von, Waisman A, Westermann B, Langer T. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. Genes Dev. 2008 Feb 15;22(4):476–88.

6. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. Trends Endocrinol Metab. 2016 Feb 1;27(2):105–17.

7. Korwitz A, Merkwirth C, Richter-Dennerlein R, Tröder SE, Sprenger H-G, Quirós PM, López-Otín C, Rugarli EI, Langer T. Loss of OMA1 delays neurodegeneration by preventing stress-induced OPA1 processing in mitochondria. J Cell Biol. 2016 Jan 18;212(2):157–66.

8. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. Physiol Rev. 2003 Jan 1;83(1):253–307.

9. Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. Am J Physiol-Ren Physiol. 1978 Jun 1;234(6):F455–60.

10. Rennke HG, Venkatachalam MA. Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. [Internet]. 1979 [cited 2019 Feb 7]. Available from: https://www.jci.org/articles/view/109354/pdf

11. Grahammer F, Wigge C, Schell C, Kretz O, Patrakka J, Schneider S, Klose M, Arnold SJ, Habermann A, Bräuniger R, Rinschen MM, Völker L, Bregenzer A, Rubbenstroth

D, Boerries M, Kerjaschki D, Miner JH, Walz G, Benzing T, Fornoni A, Frangakis AS, Huber TB. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. JCI Insight. 2016 Jun 16;1(9).

12. Benzing T. Signaling at the Slit Diaphragm. J Am Soc Nephrol. 2004 Jun 1;15(6):1382–91.

13. Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Actin Filament Organization of Foot Processes in Rat Podocytes. J Histochem Cytochem. 2003 Dec 1;51(12):1589–600.

14. Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2005 May;14(3):211–6.

15. Drenckhahn D, Schnittler H, Nobiling R, Kriz W. Ultrastructural organization of contractile proteins in rat glomerular mesangial cells. Am J Pathol. 1990 Dec;137(6):1343–51.

16. Huber TB, Hartleben B, Kim J, Schmidts M, Schermer B, Keil A, Egger L, Lecha RL, Borner C, Pavenstädt H, Shaw AS, Walz G, Benzing T. Nephrin and CD2AP Associate with Phosphoinositide 3-OH Kinase and Stimulate AKT-Dependent Signaling. Mol Cell Biol. 2003 Jul;23(14):4917–28.

17. Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V, Mundel P, Mathieson PW. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. Am J Pathol. 2002 Oct;161(4):1459–66.

18. Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza D-B, John PLS. Cellular Origins of Type IV Collagen Networks in Developing Glomeruli. J Am Soc Nephrol. 2009 Jul 1;20(7):1471–9.

19. Miner JH, Go G, Cunningham J, Patton BL, Jarad G. Transgenic isolation of skeletal muscle and kidney defects in lamininβ 2 mutant mice: implications for Pierson syndrome. Development. 2006 Mar 1;133(5):967–75.

20. Eremina V, Cui S, Gerber H, Ferrara N, Haigh J, Nagy A, Ema M, Rossant J, Jothy S, Miner JH, Quaggin SE. Vascular endothelial growth factor a signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. J Am Soc Nephrol JASN. 2006 Mar;17(3):724–35.

21. Satchell SC, Harper SJ, Tooke JE, Kerjaschki D, Saleem MA, Mathieson PW. Human Podocytes Express Angiopoietin 1, a Potential Regulator of Glomerular Vascular Endothelial Growth Factor. J Am Soc Nephrol. 2002 Feb 1;13(2):544–50.

22. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein—Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. Mol Cell. 1998 Mar 1;1(4):575–82.

23. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. Proc Natl Acad Sci. 1999 Jul 6;96(14):7962–7.

24. Holthöfer H, Ahola H, Solin M-L, Wang S, Palmen T, Luimula P, Miettinen A, Kerjaschki D. Nephrin Localizes at the Podocyte Filtration Slit Area and Is Characteristically Spliced in the Human Kidney. Am J Pathol. 1999 Nov 1;155(5):1681–7.

25. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. Nat Genet. 2000 Apr;24(4):349–54.

26. Huber TB, Köttgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with Podocin Facilitates Nephrin Signaling. J Biol Chem. 2001 Nov 9;276(45):41543–6.

27. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. J Clin Invest. 2001 Dec;108(11):1621–9.

28. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gubler M-C, Antignac C. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. Am J Pathol. 2002 Jan;160(1):131–9.

29. Huber TB, Schermer B, Benzing T. Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. Nephron Exp Nephrol. 2007;106(2):e27-31.

30. Mogensen CE, Christensen NJ, Gundersen HJ. The acute effect of insulin on heart rate, blood pressure, plasma noradrenaline and urinary albumin excretion. The role of changes in blood glucose. Diabetologia. 1980 Jun;18(6):453–7.

31. Audzeyenka I, Rogacka D, Piwkowska A, Rychlowski M, Bierla JB, Czarnowska E, Angielski S, Jankowski M. Reactive oxygen species are involved in insulin-dependent regulation of autophagy in primary rat podocytes. Int J Biochem Cell Biol. 2016 Jun 1;75:23–33.

32. Lay AC, Hurcombe JA, Betin VMS, Barrington F, Rollason R, Ni L, Gillam L, Pearson GME, Østergaard MV, Hamidi H, Lennon R, Welsh GI, Coward RJM. Prolonged exposure of mouse and human podocytes to insulin induces insulin resistance through lysosomal and proteasomal degradation of the insulin receptor. Diabetologia. 2017 Nov 1;60(11):2299–311.

33. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. J Clin Invest. 1997 Jan 15;99(2):342–8.

34. Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto K, Nagata M. Podocyte injury promotes progressive nephropathy in zucker diabetic fatty rats. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 2002 Jan;82(1):25–35.

35. Kriz W, Hosser H, Hähnel B, Gretz N, Provoost AP. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. Nephrol Dial

Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 1998 Nov;13(11):2781–98.

36. White KE, Bilous RW, Marshall SM, Nahas ME, Remuzzi G, Piras G, Cosmo SD, Viberti G. Podocyte Number in Normotensive Type 1 Diabetic Patients With Albuminuria. Diabetes. 2002 Oct 1;51(10):3083–9.

37. Tejada T, Catanuto P, Ijaz A, Santos JV, Xia X, Sanchez P, Sanabria N, Lenz O, Elliot SJ, Fornoni A. Failure to phosphorylate AKT in podocytes from mice with early diabetic nephropathy promotes cell death. Kidney Int. 2008 Jun;73(12):1385–93.

38. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. Diabetologia. 1999 Nov;42(11):1341–4.

39. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. Diabetes. 2006 Jan;55(1):225–33.

40. Brinkkoetter PT, Ising C, Benzing T. The role of the podocyte in albumin filtration. Nat Rev Nephrol. 2013 Jun;9(6):328–36.

41. Guzman J, Jauregui AN, Merscher-Gomez S, Maiguel D, Muresan C, Mitrofanova A, Diez-Sampedro A, Szust J, Yoo T-H, Villarreal R, Pedigo C, Molano RD, Johnson K, Kahn B, Hartleben B, Huber TB, Saha J, Burke GW, Abel ED, Brosius FC, Fornoni A. Podocyte-Specific GLUT4-Deficient Mice Have Fewer and Larger Podocytes and Are Protected From Diabetic Nephropathy. Diabetes. 2014 Feb;63(2):701–14.

42. Coward RJM, Welsh GI, Yang J, Tasman C, Lennon R, Koziell A, Satchell S, Holman GD, Kerjaschki D, Tavaré JM, Mathieson PW, Saleem MA. The Human Glomerular Podocyte Is a Novel Target for Insulin Action. Diabetes. 2005 Nov 1;54(11):3095–102.

43. Welsh GI, Coward RJ. Podocytes, glucose and insulin: Curr Opin Nephrol Hypertens. 2010 Jul;19(4):379–84.

44. Kim DK, Nam BY, Li JJ, Park JT, Lee SH, Kim DH, Kim JY, Kang HY, Han SH, Yoo TH, Han DS, Kang SW. Translationally controlled tumour protein is associated with podocyte hypertrophy in a mouse model of type 1 diabetes. Diabetologia. 2012 Apr 1;55(4):1205–17.

45. Piwkowska A, Rogacka D, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M. Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type Iα subunits. Biochim Biophys Acta. 2013 Jun;1832(6):791–804.

46. Mima A, Ohshiro Y, Kitada M, Matsumoto M, Geraldes P, Li C, Li Q, White GS, Cahill C, Rask-Madsen C, King GL. Glomerular-specific protein kinase C-β-induced insulin receptor substrate-1 dysfunction and insulin resistance in rat models of diabetes and obesity. Kidney Int. 2011 Apr;79(8):883–96.

47. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. Endocr Rev. 2009 Oct;30(6):586–623.

48. Bridgewater DJ, Matsell DG. Insulin-like growth factor binding protein-2 modulates podocyte mitogenesis. Pediatr Nephrol. 2003 Nov 1;18(11):1109–15.

49. Rogers SA, Powell-Braxton L, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. Dev Genet. 1999;24(3–4):293–8.

50. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. Kidney Int. 2005 Apr 1;67(4):1308–14.

51. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. N Engl J Med. 1999 Jul 22;341(4):248–57.

52. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Feb;7(2):85–96.

53. Sano H, Kane S, Sano E, Mîinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. J Biol Chem. 2003 Apr 25;278(17):14599–602.

54. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995 Dec 21;378(6559):785–9.

55. Wang HG, Reed JC. Bc1-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. BioFactors Oxf Engl. 1998;8(1–2):13–6.

56. Hay N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. Biochim Biophys Acta. 2011 Nov;1813(11):1965–70.

57. Canaud G, Bienaimé F, Viau A, Treins C, Baron W, Nguyen C, Burtin M, Berissi S, Giannakakis K, Muda AO, Zschiedrich S, Huber TB, Friedlander G, Legendre C, Pontoglio M, Pende M, Terzi F. AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease. Nat Med. 2013 Oct;19(10):1288–96.

58. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. Cell Signal. 2011 Oct;23(10):1515–27.

59. Santamaria B, Marquez E, Lay A, Carew RM, González-Rodríguez Á, Welsh GI, Ni L, Hale LJ, Ortiz A, Saleem MA, Brazil DP, Coward RJ, Valverde ÁM. IRS2 and PTEN are key molecules in controlling insulin sensitivity in podocytes. Biochim Biophys Acta. 2015 Dec;1853(12):3224–34.

60. Lay A, Coward RJ. Recent advances in our understanding of insulin signalling to the podocyte. Nephrol Dial Transplant. 2014 Jun 1;29(6):1127–33.

61. Könner AC, Brüning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. Cell Metab. 2012 Aug 8;16(2):144–52.

62. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Feb 1;4(2):a011593.

63. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell. 2012 Apr 13;149(2):274–93.

64. McMahon G, Datta D, Bruneau S, Kann M, Khalid M, Ho J, Seto T, Kreidberg JA, Stillman IE, Briscoe DM. CONSTITUTIVE ACTIVATION OF THE mTOR SIGNALING PATHWAY WITHIN THE NORMAL GLOMERULUS. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 24;425(2):244–9.

65. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, Liu S, Zschiedrich S, Lu S, Debreczeni-Mór A, Lindenmeyer MT, Rastaldi M-P, Hartleben G, Wiech T, Fornoni A, Nelson RG, Kretzler M, Wanke R, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Cohen CD, Hall MN, Rüegg MA, Inoki K, Walz G, Huber TB. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. J Clin Invest. 2011 Jun 1;121(6):2197–209.

66. Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, Blattner SM, Ikenoue T, Rüegg MA, Hall MN, Kwiatkowski DJ, Rastaldi MP, Huber TB, Kretzler M, Holzman LB, Wiggins RC, Guan K-L. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. J Clin Invest. 2011 Jun 1;121(6):2181–96.

67. Cinà DP, Onay T, Paltoo A, Li C, Maezawa Y, De Arteaga J, Jurisicova A, Quaggin SE. Inhibition of MTOR disrupts autophagic flux in podocytes. J Am Soc Nephrol JASN. 2012 Mar;23(3):412–20.

68. Zschiedrich S, Bork T, Liang W, Wanner N, Eulenbruch K, Munder S, Hartleben B, Kretz O, Gerber S, Simons M, Viau A, Burtin M, Wei C, Reiser J, Herbach N, Rastaldi M-P, Cohen CD, Tharaux P-L, Terzi F, Walz G, Gödel M, Huber TB. Targeting mTOR Signaling Can Prevent the Progression of FSGS. J Am Soc Nephrol. 2017 Jul;28(7):2144–57.

69. Dormond-Meuwly A, Roulin D, Dufour M, Benoit M, Demartines N, Dormond O. The inhibition of MAPK potentiates the anti-angiogenic efficacy of mTOR inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Apr 22;407(4):714–9.

70. Salmond RJ, Emery J, Okkenhaug K, Zamoyska R. MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase, and mammalian target of rapamycin pathways converge at the level of ribosomal protein S6 phosphorylation to control metabolic signaling in CD8 T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2009 Dec 1;183(11):7388–97.

71. Pirbhoy PS, Farris S, Steward O. Synaptically driven phosphorylation of ribosomal protein S6 is differentially regulated at active synapses versus dendrites and cell bodies by MAPK and PI3K/mTOR signaling pathways. Learn Mem Cold Spring Harb N. 2017;24(8):341–57.

72. Chen L, Li Q, Lei L, Li T. Dioscin ameliorates cardiac hypertrophy through inhibition of the MAPK and Akt/GSK3β/mTOR pathways. Life Sci. 2018 Sep 15;209:420–9.

73. Xu Y, Li N, Xiang R, Sun P. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. Trends Biochem Sci. 2014 Jun;39(6):268–76.

74. Chauhan A, Semwal DK, Mishra SP, Goyal S, Marathe R, Semwal RB. Combination of mTOR and MAPK Inhibitors—A Potential Way to Treat Renal Cell Carcinoma. Med Sci. 2016 Dec;4(4):16.

75. Villarreal R, Mitrofanova A, Maiguel D, Morales X, Jeon J, Grahammer F, Leibiger IB, Guzman J, Fachado A, Yoo TH, Busher Katin A, Gellermann J, Merscher S, Burke GW, Berggren P-O, Oh J, Huber TB, Fornoni A. Nephrin Contributes to Insulin Secretion and Affects Mammalian Target of Rapamycin Signaling Independently of Insulin Receptor. J Am Soc Nephrol JASN. 2016 Apr;27(4):1029–41.

76. Yu SB, Pekkurnaz G. Mechanisms Orchestrating Mitochondrial Dynamics for Energy Homeostasis. J Mol Biol. 2018 Oct 19;430(21):3922–41.

77. Che R, Yuan Y, Huang S, Zhang A. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. Am J Physiol - Ren Physiol. 2014 Feb 15;306(4):F367–78.

78. McClung JK, Danner DB, Stewart DA, Smith JR, Schneider EL, Lumpkin CK, Dell'Orco RT, Nuell MJ. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Nov 15;164(3):1316–22.

79. Tavernarakis N, Driscoll M, Kyrpides NC. The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. Trends Biochem Sci. 1999 Nov 1;24(11):425–7.

80. Ikonen E, Fiedler K, Parton RG, Simons K. Prohibitin, an antiproliferative protein, is localized to mitochondria. FEBS Lett. 1995 Jan 30;358(3):273–7.

81. Osman C, Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. J Cell Sci. 2009 Nov 1;122(21):3823–30.

82. Kasashima K, Sumitani M, Satoh M, Endo H. Human prohibitin 1 maintains the organization and stability of the mitochondrial nucleoids. Exp Cell Res. 2008 Mar 10;314(5):988–96.

83. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. EMBO J. 2006 Jul 12;25(13):2966.

84. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. J Cell Biol. 2007 Aug 27;178(5):749.

85. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, Langer T. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. J Cell Biol. 2014 Mar 17;204(6):919–29.

86. Käser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B, Langer T. Oma1, a Novel Membrane-bound Metallopeptidase in Mitochondria with Activities Overlapping with the m-AAA Protease. J Biol Chem. 2003 Nov 21;278(47):46414–23.

87. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou J-C, Westermann B, Rugarli EI, Langer T. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. J Cell Biol. 2009 Dec 28;187(7):1023–36.

88. Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, Bliek AM van der. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. J Cell Biol. 2009 Dec 28;187(7):959–66.

89. Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, Korwitz A, Anand R, Tatsuta T, Langer T. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. EMBO J. 2014 Mar 18;33(6):578–93.

90. Jones E, Gaytan N, Garcia I, Herrera A, Ramos M, Agarwala D, Rana M, Innis-Whitehouse W, Schuenzel E, Gilkerson R. A threshold of transmembrane potential is required for mitochondrial dynamic balance mediated by DRP1 and OMA1. Cell Mol Life Sci. 2017 Apr 1;74(7):1347–63.

91. Rainbolt TK, Saunders JM, Wiseman RL. YME1L degradation reduces mitochondrial proteolytic capacity during oxidative stress. EMBO Rep. 2015 Jan;16(1):97–106.

92. Rainbolt TK, Lebeau J, Puchades C, Wiseman RL. Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity during Stress. Cell Rep. 2016 Mar 8;14(9):2041–9.

93. Consolato F, Maltecca F, Tulli S, Sambri I, Casari G. m-AAA and i-AAA complexes coordinate to regulate OMA1, the stress-activated supervisor of mitochondrial dynamics. J Cell Sci. 2018 Apr 1;131(7):jcs213546.

94. Zhang K, Li H, Song Z. Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. EMBO Rep. 2014 May 1;15(5):576–85.

95. Bohovych I, Kastora S, Christianson S, Topil D, Kim H, Fangman T, Zhou YJ, Barrientos A, Lee J, Brown AJP, Khalimonchuk O. Oma1 Links Mitochondrial Protein Quality Control and TOR Signaling To Modulate Physiological Plasticity and Cellular Stress Responses. Mol Cell Biol. 2016 Aug 12;36(17):2300–12.

96. Bohovych I, Fernandez MR, Rahn JJ, Stackley KD, Bestman JE, Anandhan A, Franco R, Claypool SM, Lewis RE, Chan SSL, Khalimonchuk O. Metalloprotease OMA1 Fine-tunes Mitochondrial Bioenergetic Function and Respiratory Supercomplex Stability. Sci Rep [Internet]. 2015 Sep 14;5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568518/

97. Quirós PM, Ramsay AJ, Sala D, Fernández-Vizarra E, Rodríguez F, Peinado JR, Fernández-García MS, Vega JA, Enríquez JA, Zorzano A, López-Otín C. Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. EMBO J. 2012 May 2;31(9):2117–33.

98. Acin-Perez R, Lechuga-Vieco AV, Muñoz M del M, Nieto-Arellano R, Torroja C, Sánchez-Cabo F, Jiménez C, González-Guerra A, Carrascoso I, Benincá C, Quiros PM, López-Otín C, Castellano JM, Ruíz-Cabello J, Jiménez-Borreguero LJ, Enríquez JA. Ablation of the stress protease OMA1 protects against heart failure in mice. Sci Transl Med. 2018 Mar 28;10(434):eaan4935.

99. Xiao X, Hu Y, Quirós PM, Wei Q, López-Otín C, Dong Z. OMA1 mediates OPA1 proteolysis and mitochondrial fragmentation in experimental models of ischemic kidney injury. Am J Physiol - Ren Physiol. 2014 Jun 1;306(11):F1318–26.

100. Wai T, García-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, Rupérez FJ, Barbas C, Ibañez B, Langer T. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. Science. 2015 Dec 4;350(6265):aad0116.

101. Su M, Dhoopun A-R, Yuan Y, Huang S, Zhu C, Ding G, Liu B, Yang T, Zhang A. Mitochondrial dysfunction is an early event in aldosterone-induced podocyte injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2013 Aug 15;305(4):F520-531.

102. Zhou Y, Bian X, Fang L, He W, Dai C, Yang J. Aristolochic acid causes albuminuria by promoting mitochondrial DNA damage and dysfunction in podocyte. PloS One. 2013;8(12):e83408.

103. Güçer Ş, Talim B, Aşan E, Korkusuz P, Özen S, Ünal Ş, Kalkanoğlu SH, Kale G, Çağlar M. Focal Segmental Glomerulosclerosis Associated with Mitochondrial Cytopathy: Report of Two Cases with Special Emphasis on Podocytes. Pediatr Dev Pathol. 2005 Dec 1;8(6):710–7.

104. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. Science. 2005 Jan 21;307(5708):384–7.

105. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. N Engl J Med. 2004 Feb 12;350(7):664–71.

106. Turner N, Heilbronn LK. Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? Trends Endocrinol Metab TEM. 2008 Nov;19(9):324–30.

107. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, Sorianello E, Muñoz JP, Sala D, Waget A, Liesa M, Paz JC, Gopalacharyulu P, Orešič M, Pich S, Burcelin R, Palacín M, Zorzano A. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 3;109(14):5523–8.

108. Huang S, Wang Y, Gan X, Fang D, Zhong C, Wu L, Hu G, Sosunov AA, McKhann GM, Yu H, Yan SS. Drp1-mediated mitochondrial abnormalities link to synaptic injury in diabetes model. Diabetes. 2015 May;64(5):1728–42.

109. Kulkarni SS, Joffraud M, Boutant M, Ratajczak J, Gao AW, Maclachlan C, Hernandez-Alvarez MI, Raymond F, Metairon S, Descombes P, Houtkooper RH, Zorzano A, Cantó C. Mfn1 Deficiency in the Liver Protects Against Diet-Induced Insulin Resistance and Enhances the Hypoglycemic Effect of Metformin. Diabetes. 2016 Dec;65(12):3552–60.

110. Kasashima K, Ohta E, Kagawa Y, Endo H. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. J Biol Chem. 2006 Nov 24;281(47):36401–10.

111. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology. Trends Endocrinol Metab TEM. 2009 Oct;20(8):394–401.

112. Schleit J, Johnson SC, Bennett CF, Simko M, Trongtham N, Castanza A, Hsieh EJ, Moller RM, Wasko BM, Delaney JR, Sutphin GL, Carr D, Murakami CJ, Tocchi A,

Xian B, Chen W, Yu T, Goswami S, Higgins S, Holmberg M, Jeong K-S, Kim JR, Klum S, Liao E, Lin MS, Lo W, Miller H, Olsen B, Peng ZJ, Pollard T, Pradeep P, Pruett D, Rai D, Ros V, Singh M, Spector BL, Vander Wende H, An EH, Fletcher M, Jelic M, Rabinovitch PS, MacCoss MJ, Han J-DJ, Kennedy BK, Kaeberlein M. Molecular mechanisms underlying genotype-dependent responses to dietary restriction. Aging Cell. 2013 Dec;12(6):1050–61.

113. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. Cell Metab. 2013 Apr 2;17(4):491–506.

114. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 21;103(8):2653–8.

115. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacín M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. Diabetes. 2005 Sep;54(9):2685–93.

116. Chertow GM, Soroko SH, Paganini EP, Cho KC, Himmelfarb J, Ikizler TA, Mehta RL. Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. Kidney Int. 2006 Sep;70(6):1120–6.

117. de Vries APJ, Ruggenenti P, Ruan XZ, Praga M, Cruzado JM, Bajema IM, D'Agati VD, Lamb HJ, Barlovic DP, Hojs R, Abbate M, Rodriquez R, Mogensen CE, Porrini E. Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014 May 1;2(5):417–26.

118. Wang Y, Chen X, Song Y, Caballero B, Cheskin LJ. Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. Kidney Int. 2008 Jan;73(1):19–33.

119. Chen H-M, Liu Z-H, Zeng C-H, Li S-J, Wang Q-W, Li L-S. Podocyte lesions in patients with obesity-related glomerulopathy. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 2006 Nov;48(5):772–9.

120. Deji N, Kume S, Araki S-I, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Uzu T. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jan;296(1):F118-126.

121. Wicks SE, Nguyen T-T, Breaux C, Kruger C, Stadler K. Diet-induced obesity and kidney disease - In search of a susceptible mouse model. Biochimie. 2016 May;124:65–73.

122. Wang W, Wang Y, Long J, Wang J, Haudek SB, Overbeek P, Chang BHJ, Schumacker PT, Danesh FR. Mitochondrial Fission Triggered by Hyperglycemia Is Mediated by ROCK1 Activation in Podocytes and Endothelial Cells. Cell Metab. 2012 Feb 8;15(2):186–200.

123. Wei PZ, Kwan BC-H, Chow KM, Cheng PM-S, Luk CC-W, Li PK-T, Szeto CC. Urinary mitochondrial DNA level is an indicator of intra-renal mitochondrial depletion and renal scarring in diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2018 01;33(5):784–8.

124. Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, Mundel P. Podocytes in culture: past, present, and future. Kidney Int. 2007 Jul;72(1):26–36.

125. Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jun 15;88(12):5096–100.

126. Boerries M, Grahammer F, Eiselein S, Buck M, Meyer C, Goedel M, Bechtel W, Zschiedrich S, Pfeifer D, Laloë D, Arrondel C, Gonçalves S, Krüger M, Harvey SJ, Busch H, Dengjel J, Huber TB. Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. Kidney Int. 2013 Jun 1;83(6):1052–64.

127. Szeto HH, Liu S, Soong Y, Alam N, Prusky GT, Seshan SV. Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury. Kidney Int. 2016;90(5):997–1011.

128. Sanden SK, Wiggins JE, Goyal M, Riggs LK, Wiggins RC. Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. J Am Soc Nephrol JASN. 2003 Oct;14(10):2484–93.

129. Hudkins KL, Pichaiwong W, Wietecha T, Kowalewska J, Banas MC, Spencer MW, Mühlfeld A, Koelling M, Pippin JW, Shankland SJ, Askari B, Rabaglia ME, Keller MP, Attie AD, Alpers CE. BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol JASN. 2010 Sep;21(9):1533–42.

130. Pichaiwong W, Hudkins KL, Wietecha T, Nguyen TQ, Tachaudomdach C, Li W, Askari B, Kobayashi T, O'Brien KD, Pippin JW, Shankland SJ, Alpers CE. Reversibility of structural and functional damage in a model of advanced diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol JASN. 2013 Jun;24(7):1088–102.

131. Yang J-S, Nam H-J, Seo M, Han SK, Choi Y, Nam HG, Lee S-J, Kim S. OASIS: online application for the survival analysis of lifespan assays performed in aging research. PloS One. 2011;6(8):e23525.

132. Lourenço AB, Muñoz-Jiménez C, Venegas-Calerón M, Artal-Sanz M. Analysis of the effect of the mitochondrial prohibitin complex, a context-dependent modulator of longevity, on the C. elegans metabolome. Biochim Biophys Acta. 2015 Nov;1847(11):1457–68.

133. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. Nature. 1993 Dec 2;366(6454):461–4.

134. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in Caenorhabditis elegans. Nature. 1996 Aug 8;382(6591):536–9.

135. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in Caenorhabditis elegans. Science. 1997 Aug 15;277(5328):942–6.

136. Johnson TE. Increased life-span of age-1 mutants in Caenorhabditis elegans and lower Gompertz rate of aging. Science. 1990 Aug 24;249(4971):908–12.

137. Moeller MJ, Sanden SK, Soofi A, Wiggins RC, Holzman LB. Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. Genes N Y N 2000. 2003 Jan;35(1):39–42.

138. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. 2004 Aug 15;18(16):1926–45.

139. Chen C-C, Jeon S-M, Bhaskar PT, Nogueira V, Sundararajan D, Tonic I, Park Y, Hay N. FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. Dev Cell. 2010 Apr 20;18(4):592–604.

140. Du M, Wang Q, Li W, Ma X, Wu L, Guo F, Zhao S, Huang F, Wang H, Qin G. Overexpression of FOXO1 ameliorates the podocyte epithelial-mesenchymal transition induced by high glucose in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Mar 18;471(4):416–22.

141. Gatsi R, Schulze B, Rodríguez-Palero MJ, Hernando-Rodríguez B, Baumeister R, Artal-Sanz M. Prohibitin-Mediated Lifespan and Mitochondrial Stress Implicate SGK-1, Insulin/IGF and mTORC2 in C. elegans. PLoS ONE [Internet]. 2014 Sep 29;9(9). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4180437/

142. Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, Thomas G. S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. Mol Cell Biol. 2004 Apr;24(8):3112–24.

143. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. Kidney Int. 2006 Jun;69(12):2131–47.

144. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Cohen DM, Anderson S. Renal p38 MAP kinase activity in experimental diabetes. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 2007 Jun;87(6):548–58.

145. Dai T, Natarajan R, Nast CC, LaPage J, Chuang P, Sim J, Tong L, Chamberlin M, Wang S, Adler SG. Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton. Kidney Int. 2006 Mar;69(5):806–14.

146. Landau D, Eshet R, Troib A, Gurman Y, Chen Y, Rabkin R, Segev Y. Increased renal Akt/mTOR and MAPK signaling in type I diabetes in the absence of IGF type 1 receptor activation. Endocrine. 2009 Aug;36(1):126–34.

147. Langlais P, Yi Z, Mandarino LJ. The identification of raptor as a substrate for p44/42 MAPK. Endocrinology. 2011 Apr;152(4):1264–73.

148. Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. Exp Cell Res. 1997 Oct 10;236(1):248–58.

149. Brinkkoetter PT, Bork T, Salou S, Liang W, Mizi A, Özel C, Koehler S, Hagmann HH, Ising C, Kuczkowski A, Schnyder S, Abed A, Schermer B, Benzing T, Kretz O, Puelles VG, Lagies S, Schlimpert M, Kammerer B, Handschin C, Schell C, Huber TB. Anaerobic Glycolysis Maintains the Glomerular Filtration Barrier Independent of Mitochondrial Metabolism and Dynamics. Cell Rep. 2019 Apr 30;27(5):1551–1566.e5.

150. Ising C, Koehler S, Brähler S, Merkwirth C, Höhne M, Baris OR, Hagmann H, Kann M, Fabretti F, Dafinger C, Bloch W, Schermer B, Linkermann A, Brüning JC, Kurschat CE, Müller R-U, Wiesner RJ, Langer T, Benzing T, Brinkkoetter PT. Inhibition of insulin/IGF-1 receptor signaling protects from mitochondria-mediated kidney failure. EMBO Mol Med. 2015 Mar;7(3):275–87.

151. Chen A, Xiong L-J, Tong Y, Mao M. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. Mol Med Rep. 2013 Oct;8(4):1011–6.

152. Chenal J, Pierre K, Pellerin L. Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. Eur J Neurosci. 2008 Jan;27(1):53–65.

153. Liu D, Zhang Y, Gharavi R, Park HR, Lee J, Siddiqui S, Telljohann R, Nassar MR, Cutler RG, Becker KG, Mattson MP. The mitochondrial uncoupler DNP triggers brain cell mTOR signaling network reprogramming and CREB pathway up-regulation. J Neurochem. 2015;134(4):677–92.

154. Imasawa T, Obre E, Bellance N, Lavie J, Imasawa T, Rigothier C, Delmas Y, Combe C, Lacombe D, Benard G, Claverol S, Bonneu M, Rossignol R. High glucose repatterns human podocyte energy metabolism during differentiation and diabetic nephropathy. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2017;31(1):294–307.

155. Alavi MV. Targeted OMA1 therapies for cancer. Int J Cancer. 2019 Feb 4;

156. Pan Y, Schroeder EA, Ocampo A, Barrientos A, Shadel GS. Regulation of Yeast Chronological Life Span by TORC1 via Adaptive Mitochondrial ROS Signaling. Cell Metab. 2011 Jun 8;13(6):668–78.

157. Inoki K, Huber TB. Mammalian target of rapamycin signaling in the podocyte. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2012 May;21(3):251–7.

158. Gems D, Partridge L. Stress-Response Hormesis and Aging: “That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger.” Cell Metab. 2008 Mar 5;7(3):200–3.

159. Vollenbröker B, George B, Wolfgart M, Saleem MA, Pavenstädt H, Weide T. mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. Am J Physiol-Ren Physiol. 2009 Feb 1;296(2):F418–26.

160. Biancone L, Bussolati B, Mazzucco G, Barreca A, Gallo E, Rossetti M, Messina M, Nuschak B, Fop F, Medica D, Cantaluppi V, Camussi G, Segoloni GP. Loss of Nephrin Expression in Glomeruli of Kidney-Transplanted Patients Under m-TOR Inhibitor Therapy. Am J Transplant. 2010 Oct 1;10(10):2270–8.

161. Stallone G, Infante B, Pontrelli P, Gigante M, Montemurno E, Loverre A, Rossini M, Schena FP, Grandaliano G, Gesualdo L. Sirolimus and Proteinuria in Renal Transplant Patients: Evidence for a Dose-Dependent Effect on Slit Diaphragm-Associated Proteins. Transplantation [Internet]. 2011;91(9). Available from: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2011/05150/Sirolimus_and_Proteinuria_in_Renal_Transplant.10.aspx

162. Valcourt JR, Lemons JMS, Haley EM, Kojima M, Demuren OO, Coller HA. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. Cell Cycle Georget Tex. 2012 May 1;11(9):1680–96.

163. Raimundo N, Song L, Shutt TE, McKay SE, Cotney J, Guan M-X, Gilliland TC, Hohuan D, Santos-Sacchi J, Shadel GS. Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. Cell. 2012 Feb 17;148(4):716–26.

164. Fung TS, Ji W-K, Higgs HN, Chakrabarti R. Two distinct actin filament populations have effects on mitochondria, with differences in stimuli and assembly factors. J Cell Sci. 2019 Aug 14;

165. Bohovych I, Dietz JV, Swenson S, Zahayko N, Khalimonchuk O. Redox Regulation of the Mitochondrial Quality Control Protease Oma1. Antioxid Redox Signal. 2019 Aug 20;31(6):429–43.

166. Tobacyk J, Parajuli N, Shrum S, Crow JP, MacMillan-Crow LA. The first direct activity assay for the mitochondrial protease OMA1. Mitochondrion. 2019 Mar 26;

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Podozyten und Schlitzmembran 12
Abbildung 2: Gleichgewicht langer und kurzer OPA1 Formen 18
Abbildung 3: Überleben neuronaler $OMA1^{NKO}$ Mäuse 20
Abbildung 4: Schema: Insulin - Signalwege im Podozyten 22
Abbildung 5: Ein PHB2 Knockdown führt zu einem aktivierten Insulinsignalweg im Podozyten 50
Abbildung 6: Kein Überlebensvorteil durch den doppelten Knockout von PHB2 und OMA1 54
Abbildung 7: Der doppelte Knockout von $PHB2^{pko}$/$OMA1^{ko}$ führt zu einer gestörten glomerulären Architektur 59
Abbildung 8: Der $PHB2^{pko}$/$OMA1^{ko}$ zeigt im EM Bild und funktionell keinen anhaltenden Vorteil gegenüber dem $PHB2^{pko}$ 63
Abbildung 9: Aktivierung des mTOR Signalwegs in Einzel- und Doppelknockout Mäusen 65
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Signalwege in $OMA1^{ko}$ und $PHB2^{pko}$/$OMA1^{ko}$ Mäusen 78

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien 25
Tabelle 2: Puffer und Lösungen 27
Tabelle 3: Westerngel und ECL 29
Tabelle 4: Materialien 30
Tabelle 5: Geräte 31
Tabelle 6: Software 33
Tabelle 7: Zellkulturmedien und Chemikalien 34
Tabelle 8: Kits Zellkultur 35
Tabelle 9: Primärantikörper Zellkultur 35
Tabelle 10: Sekundärantikörper Zellkultur 36
Tabelle 11: Oligonukleotide Genotypisierung 36
Tabelle 12: Kits und Assays Mausstudie 36
Tabelle 13: Primärantikörper Nierenschnitte Maus 37
Tabelle 14: Sekundärantikörper Nierenschnitte Maus 37
Tabelle 15: Genotyping: Mastermix und Cyclerprogramm 43

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Professor Benzing, Professor Schermer und Professor Brinkkötter, die durch ihre Arbeit und ihren unablässigen Einsatz eine hervorragende Forschungsinfrastruktur geschaffen haben, sodass diese Dissertation möglich war. Ganz besonders herzlich möchte ich meinem Doktorvater Professor Brinkkötter für die Überlassung des spannenden Forschungsthemas danken. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen und hat durch zahlreiche Gespräche und Ideen maßgeblich zum Fortschritt und Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank auch an meinen Betreuer Dr. med. Alexander Kuczkowski, der mir die Einarbeitung im Labor und die Sensibilisierung für das Thema ermöglicht hat.

Ein herzliches Dankeschön an die Mitglieder der AG Brinkkötter - Dr. rer. nat. Sybille Köhler, Nicole Mangold, Christina Schroeter und Angelika Köser, die mir stets mit Rat und Tat bei Experimenten beiseite standen und geduldig alle meine Fragen beantwortet haben.

Generell gilt mein Dank dem NephroLab für die gute Arbeitsatmosphäre. Jederzeit wurden meine Fragen beantwortet. Persönlich bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Claudia Dafinger, die mir bei den Tierexperimenten sehr behilflich war.

Viel Spaß hatte ich mit Amrei Mandel und Lukas Schlößer, die zusammen mit mir ihre Dissertation begonnen haben. Ich denke gerne an die Stunden im und außerhalb des Labors!

Der größte Dank gilt unter anderem meinen Eltern und Geschwistern, die mich ideell unterstützt haben und mit ihrem Verständnis und ständiger Aufmunterung diese Dissertation immer positiv begleitet haben.

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.