

Aus dem Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Zinkfingerprotein 580 (ZNF580)  
auf Matrixmetalloprotease-1 (MMP-1) in humanen Podozyten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Spree

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Chronisches Nierenversagen .....	1
1.2 Podozyten und ihre Bedeutung in der Ultrafiltration .....	2
1.2.1 Struktur des Nierenkörperchens.....	2
1.2.2 Adaptation von Podozyten auf mechanische und biochemische Einflüsse .....	4
1.3 Matrixmetalloproteasen (MMP) .....	5
1.3.1 Struktur und Funktion von MMP .....	5
1.3.2 Regulation von MMP und ihre Bedeutung in pathologischen Situationen.....	9
1.3.3 MMP in Nierenerkrankungen .....	10
1.4 Zinkfingerprotein 580 (ZNF580).....	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1 Material.....	16
2.1.1 Chemikalien .....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.3 Geräte .....	17
2.1.4 Puffer.....	18
2.1.5 Lösungen und Nährmedien für die Zellkultur.....	20
2.1.6 Kommerzielle Kits .....	20
2.1.7 Antikörper .....	21
2.1.8 PCR-Primer.....	21
2.1.9 Zytokine und Inhibitoren .....	23
2.1.10 siRNA .....	23
2.2 Methoden .....	24
2.2.1 Zellkultur.....	24
2.2.2 Zytokine und Inhibitoren .....	25
2.2.3 RNA-Interferenz .....	26
2.2.4 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....	27
2.2.4.1 RNA-Extraktion .....	27
2.2.4.2 Reverse Transkription .....	28
2.2.4.3 qRT-PCR.....	28
2.2.4.4 Relative Quantifizierung .....	29
2.2.5 Western Blot .....	29
2.2.5.1 Zelllysat-Herstellung .....	29
2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung .....	30
2.2.5.3 Aufkonzentration des Zellüberstandes .....	30
2.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	30

2.2.5.5 ElektrobloTTing .....	31
2.2.5.6 ProteindetekTion .....	31
2.2.6 Immunfluoreszenz .....	32
2.2.6.1 Zellkultur .....	32
2.2.6.2 Fixierung und Antikörper-Inkubation .....	32
2.2.6.3 Anfertigen des Präparats .....	32
2.2.6.4 Mikroskopie .....	32
2.2.7 Statistische Auswertung .....	33
2.2.7.1 Deskriptive Statistik .....	33
2.2.7.2 Induktive Statistik .....	33
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1 Lokalisation von ZNF580 in humanen Podozyten .....	34
3.2 Auswirkung eines ZNF580-Knockdowns auf MMP/TIMP-mRNA .....	34
3.3 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression von MMP-1, ZNF580 und TIMP-1 .....	38
3.3.1 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die MMP-1-Expression .....	38
3.3.2 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die ZNF580-Expression .....	41
3.3.3 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die TIMP-1-mRNA-Konzentration .....	44
3.4 Expression von MMP-1 und ZNF580 nach ZNF580-Knockdown und IL-1 $\beta$ -Stimulation .....	45
3.5 Beteiligung von MAPK an der erhöhten MMP-1-Expression durch IL-1 $\beta$ -Stimulation .....	48
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>50</b>
4.1 Hauptergebnisse und Schlussfolgerung .....	50
4.2 Diskussion der Hauptergebnisse .....	50
4.2.1 ZNF580 ist im Zellkern humaner Podozyten lokalisiert .....	50
4.2.2 ZNF580-Knockdown bewirkt eine MMP-1-Induktion in Podozyten .....	51
4.2.3 Die IL-1 $\beta$ -abhängige MMP-1-Induktion in Podozyten .....	53
4.2.4 Die IL-1 $\beta$ -abhängige ZNF580-Suppression in Podozyten .....	55
4.2.5 IL-1 $\beta$ hat keinen Einfluss auf die Regulation von TIMP-1 .....	56
4.2.6 IL-1 $\beta$ bewirkt durch Suppression von ZNF580 eine verstärkte MMP-1-Expression in Podozyten .....	57
4.2.7 Die Rolle von MAPK und NF- $\kappa$ B in der Induktion der MMP-1-Expression .....	58
4.3 Bedeutung der Ergebnisse für das Verständnis der Pathophysiologie chronischer Nierenerkrankungen .....	61
4.4 Limitationen dieser Arbeit .....	63
4.5 Ausblick .....	64
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>79</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>80</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>81</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>82</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema eines Nierenkörperchens. (modifiziert nach [12, 14]).....	3
Abb. 2: Proteindomänen der MMP-Klassen. (verändert nach [33, 35, 36]) .....	8
Abb. 3: Lokalisation von ZNF580 in immortalisierter humaner Podozytenzelllinie.....	35
Abb. 4: Suppression von ZNF580-mRNA durch spezifische esiRNA. ....	36
Abb. 5: Auswirkung des ZNF580-Knockdowns auf MMP/TIMP-mRNA.....	37
Abb. 6: Erhöhung der MMP-1-mRNA-Konzentration durch Inkubation mit IL-1 $\beta$ im Zeitgang über 24 h.....	38
Abb. 7: Erhöhung von MMP-1 (Protein) im Zellkulturüberstand durch Inkubation mit IL-1 $\beta$ im Zeitgang über 24 h.....	40
Abb. 8: Verringerung der ZNF580-mRNA-Konzentration durch Inkubation mit IL-1 $\beta$ im Zeitgang über 24 h.....	41
Abb. 9: Verringerung von ZNF580 (Protein) nach Inkubation mit IL-1 $\beta$ im Zeitgang über 48 h. ....	43
Abb. 10: TIMP-1-mRNA nach Inkubation mit IL-1 $\beta$ im Zeitgang über 24 h. ....	44
Abb. 11: ZNF580-Knockdown unter IL-1 $\beta$ -Inkubation. ....	46
Abb. 12: Erhöhung von MMP-1 nach ZNF580-Knockdown unter IL-1 $\beta$ -Inkubation. ....	47
Abb. 13: MMP-1- und ZNF580-mRNA unter IL-1 $\beta$ -Inkubation und spezifischer Inhibition von verschiedenen MAPK. ....	49
Abb. 14: Schema der MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation von Podozyten.....	61

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Substrate der MMP (verändert nach [35, 36]) .....	6
Tab. 2: Chemikalien .....	16
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien .....	17
Tab. 4: Geräte .....	17
Tab. 5: Polyacrylamidgele.....	18
Tab. 6: 5x Probenpuffer .....	19
Tab. 7: Elektrophoresepuffer.....	19
Tab. 8: Transferpuffer .....	19
Tab. 9: PBS-Tween .....	19
Tab. 10: Lösungen und Nährmedien für die Zellkultur .....	20
Tab. 11: Kommerzielle Kits .....	20
Tab. 12: Primäre Antikörper .....	21
Tab. 13: Sekundäre Antikörper .....	21
Tab. 14: PCR-Primer.....	21
Tab. 15: Zytokine und Inhibitoren .....	23
Tab. 16: siRNA .....	23
Tab. 17: Reverse Transkription.....	28
Tab. 18: PCR-Reaktionsansatz.....	28
Tab. 19: Reaktionszeitprofil .....	29

## Zusammenfassung

Die dysregulierte Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP) durch Podozyten scheint eine Schlüsselrolle für die Beeinträchtigung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere und die Entwicklung einer Proteinurie im Rahmen eines chronischen Nierenversagens zu spielen. Zinkfingerprotein 580 (ZNF580) ist ein potenzieller Transkriptionsfaktor aus der Klasse der C2H2-Typ-Zinkfingerproteine, welcher in Endothelzellen eine Beteiligung an der MMP-Expression zeigte. Entsprechende Versuche in Podozyten wurden noch nicht durchgeführt. In dieser Arbeit soll in einer immortalisierten humanen Podozytenzelllinie der Einfluss von ZNF580 auf die Expression von MMP untersucht und daraus Rückschlüsse auf die molekulare Pathophysiologie chronischer Nierenerkrankungen gezogen werden.

Die Lokalisation von ZNF580 in Podozyten wurde mit Immunfluoreszenzmikroskopie sowie Immunoblotting nach Zellfraktionierung untersucht. Mittels spezifischer ZNF580-esiRNA konnte in Podozyten ein ZNF580-Knockdown erreicht werden, die Zellen wurden im Anschluss systematisch auf Veränderungen der relativen mRNA-Konzentration verschiedener MMP analysiert. Weiterhin wurde der Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$  (Stimulus der MMP-Expression) sowie verschiedener MAPK auf ZNF580 und MMP in Podozyten untersucht. Veränderungen auf mRNA-Ebene wurden dabei stets mit quantitativer RT-PCR, Unterschiede auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert.

ZNF580 konnte im Zellkern von Podozyten lokalisiert werden. ZNF580-Knockdown mittels spezifischer esiRNA führte zu einem Anstieg der MMP-1-mRNA-Konzentration, während die mRNA-Konzentrationen aller anderen untersuchten MMP und TIMP (endogenen MMP-Inhibitoren) unverändert blieben. Durch Stimulation von Podozyten mit IL-1 $\beta$  konnte eine Induktion der MMP-1- sowie eine Suppression der ZNF580-Expression herbeigeführt werden. Die spezifische Inhibition verschiedener MAPK (p38, JNK sowie ERK) führte zu einer Abschwächung der MMP-1-Induktion nach IL-1 $\beta$ -Stimulation.

ZNF580 scheint somit ein Repressor der MMP-1-Expression in Podozyten zu sein. Die Stimulation von Podozyten mit IL-1 $\beta$  führte also durch die Suppression von ZNF580 zu einem Wegfall dieser „Bremse“ und somit zu vermehrter MMP-1-Expression. Die Lokalisation von ZNF580 im Zellkern von Podozyten stärkt dabei die Hypothese, dass ZNF580 als Transkriptionsfaktor wirkt. Angesichts der mutmaßlichen Beteiligung von MMP-1 an der Entwicklung der Proteinurie bei chronischen Nierenerkrankungen ist ZNF580 daher als ein potenziell protektiver Faktor in der Pathophysiologie der Proteinurie anzusehen.

## Abstract

A dysregulated expression and secretion of matrix metalloproteinases (MMPs) by podocytes seems to play a key role for the impairment of the integrity of the glomerular filtration barrier and the development of proteinuria in the context of chronic kidney failure. Zinc finger protein 580 (ZNF580), a putative C2H2 zinc finger transcription factor, participates in the regulation of MMP expression in endothelial cells. However, similar experiments have not yet been performed in podocytes. Therefore, the aim of the present thesis was to investigate possible relationships between ZNF580 and MMP expression in an immortalized human podocyte cell line and to draw conclusions about the molecular pathophysiology of chronic kidney diseases.

The localization of ZNF580 in podocytes was investigated by immunofluorescence microscopy and immunoblotting after separating nuclear and cytosolic protein fractions. ZNF580 knockdown in podocytes was achieved using specific ZNF580 esiRNA, the cells were subsequently systematically examined about changes in the relative mRNA concentrations of different MMPs. Furthermore, the impact of IL-1 $\beta$  (inflammatory cytokine and stimulus of MMP expression) and different MAPK on ZNF580 and MMP expression in podocytes was investigated. Changes at the mRNA level were analyzed using quantitative RT-PCR, differences at the protein level by western blot.

ZNF580 was localized in the nucleus of podocytes. ZNF580 knockdown by specific ZNF580 esiRNA resulted in increased MMP-1 mRNA concentration, while the mRNA concentrations of other MMPs and TIMPs (endogenous inhibitors of MMPs) remained unchanged. Stimulating podocytes with IL-1 $\beta$  led to induction of MMP-1 and suppression of ZNF580 expression. Specific inhibition of different MAPK (p38, JNK and ERK) revealed attenuated induction of MMP-1 after stimulation of podocytes with IL-1 $\beta$ .

Thus, ZNF580 seems to act as a repressor of the MMP-1 expression in podocytes. Stimulation of podocytes with IL-1 $\beta$  led to the suppression of ZNF580 so that this "brake" of the MMP-1 expression was attenuated. Consequently, an induction of MMP-1 was observed. The localization of ZNF580 in the nucleus of podocytes strengthens the hypothesis that ZNF580 operates as a transcription factor. Given the role of MMP-1 in the development of proteinuria ZNF580 appears to act as a protective factor in the pathophysiology of proteinuria.

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronisches Nierenversagen

Chronisches Nierenversagen kennzeichnet das Endstadium einer chronischen Nierenerkrankung und wird im engeren Sinn durch eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unterhalb von  $15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  definiert [1, 2]. Wird in der Folge kein Nierenersatzverfahren wie Hämodialyse, Peritonealdialyse oder Nierentransplantation eingeleitet, führt die Erkrankung in der Regel zum Tod [1]. In Deutschland wurden im Jahr 2016 über 90.000 Patienten in Dialyseinrichtungen behandelt [3]. Laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes (GBE) betrug die Summe der Krankheitskosten für chronische Niereninsuffizienz im Jahr 2015 in Deutschland etwa 1,7 Mrd. € [4].

Chronische Nierenerkrankungen werden als typische Erkrankungen der älteren Bevölkerung betrachtet. Das liegt daran, dass sich die Niere im Alter strukturell und funktionell verändert, es kommt beispielsweise zu einer Verminderung der Anzahl funktionstüchtiger Nephrone [5, 6]. Aufgrund der fortschreitenden Überalterung der Gesellschaft im Rahmen des demographischen Wandels ist ein starker Anstieg der Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen und somit auch des chronischen Nierenversagens zu erwarten [6]. Angesichts der immensen Kosten für eine Nierenersatztherapie stellt diese Entwicklung eine bedeutsame Herausforderung für das deutsche Gesundheitssystem dar [6]. Auch die psychosoziale Belastung durch regelmäßig erforderliche Hämodialyse ist beträchtlich. Die Lebensqualität der betroffenen Patienten ist laut einer Studie von Mittal et al. deutlich reduziert und liegt im Durchschnitt sogar unter der Lebensqualität von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz oder malignen neoplastischen Erkrankungen [7]. Das Verständnis der genauen pathophysiologischen Mechanismen chronischer Nierenerkrankungen ist daher von außerordentlicher Bedeutung, um Medikamente zu entwickeln, welche die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens verhindern.

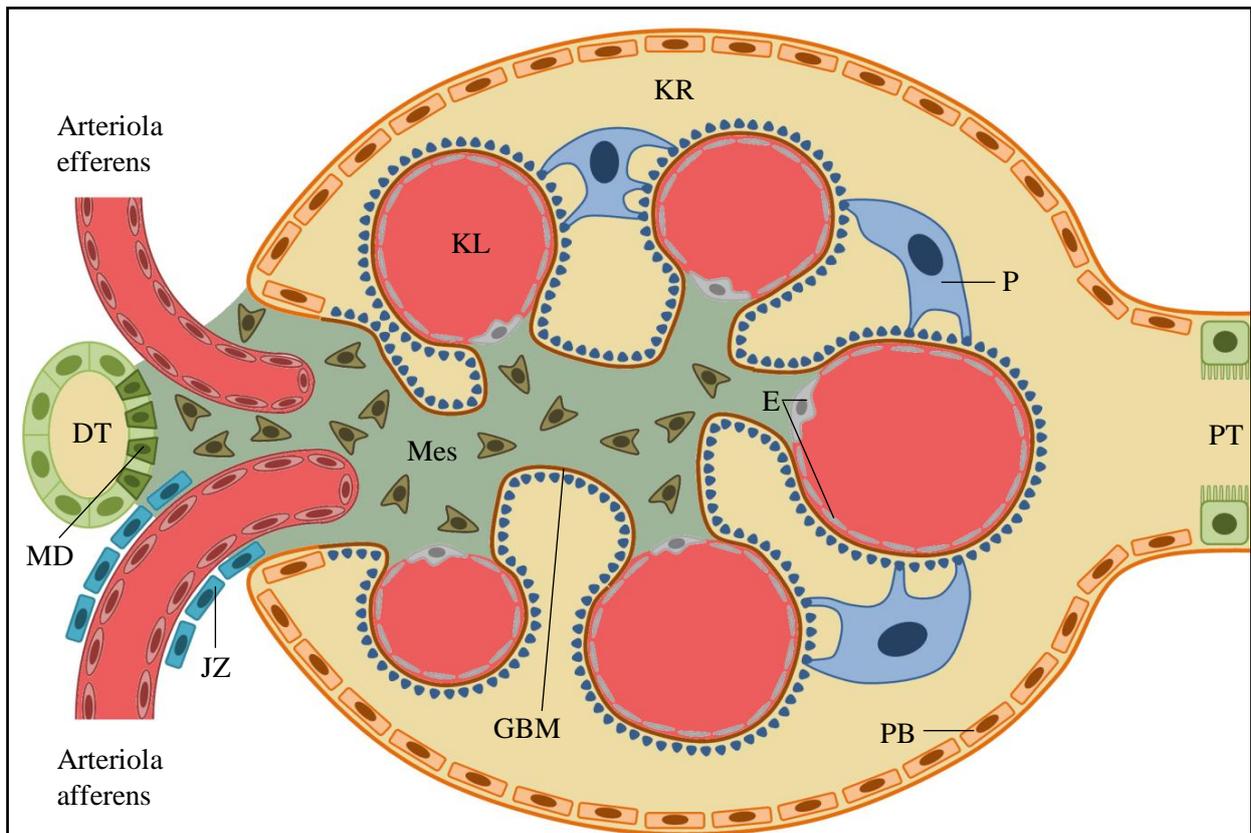
Chronische Nierenerkrankungen beginnen häufig in den Glomeruli der Niere, da diese nach einer Schädigung nur in einem sehr begrenzten Rahmen regenerieren können [8]. Eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere nehmen hierbei Podozyten ein, eine Gruppe spezialisierter epithelialer Zellen [9]. Ausdifferenzierte Podozyten können sich nicht mehr teilen. Die Funktion jedes „verlorenen“ Podozyten muss daher von den verbliebenen Podozyten übernommen werden. Ist der Verlust von Podozyten nicht mehr kompensierbar, kommt es zu weiteren Schäden der betroffenen Glomeruli bis hin zum kompletten Verlust des Nephrons [8, 10].

## 1.2 Podozyten und ihre Bedeutung in der Ultrafiltration

### 1.2.1 Struktur des Nierenkörperchens

Das Parenchym der menschlichen Niere setzt sich aus Nierenkörperchen (Corpusculae renales), Nierenkanälchen (Tubuli renales), Verbindungstubuli (Tubuli renales arcuatae), Sammelrohren (Tubuli renales colligens) sowie den jeweiligen versorgenden Blutgefäßen zusammen [11]. Die wesentliche funktionelle Einheit stellt dabei das Nephron dar, welches aus einem Corpusculum renale und dem sich danach anschließenden Tubulus renalis gebildet wird [12]. Da Verbindungstubulus und Sammelrohr eine andere embryologische Herkunft haben, zählen sie formal nicht zum Nephron [13]. Das Corpusculum renale besteht aus einem von einer doppelwandigen Kapsel (Bowman-Kapsel) umgebenen kapillären Gefäßknäuel (Glomerulus) sowie dem in der Mitte des Glomerulus liegenden Mesangium. Das Mesangium setzt sich aus in extrazellulärer Matrix (EZM) eingebundenen Mesangiumzellen zusammen und stabilisiert das Glomerulus [12]. Sowohl die dem Glomerulus Blut zuführende Arteriola afferens als auch die blutabführende Arteriola efferens treten am Gefäßpol des Corpusculum renale ein beziehungsweise aus. Die doppelwandige Bowman-Kapsel setzt sich aus einem parietalen Blatt (einschichtiges Plattenepithel) sowie einem viszeralem Blatt (bestehend aus Podozyten, welche spezialisierte Epithelzellen darstellen) zusammen. In den dazwischenliegenden Kapselraum wird der Primärharn über die im nächsten Absatz näher beschriebene Blut-Harn-Schranke filtriert [14]. Am Harnpol des Corpusculum renale tritt der Primärharn anschließend in das Tubulussystem über, wo er über aktive Rückresorption sowie Sekretion konzentriert und modifiziert wird [12]. Über den juxtaglomerulären Apparat, welcher aus der Macula densa im distalen Tubulus, dem extraglomerulären Mesangium sowie den juxtaglomerulären Zellen in der Wand der Arteriola afferens besteht, wird eine tubuloglomeruläre Rückkopplung ermöglicht. Eine von den Zellen der Macula densa gemessene hohe NaCl-Konzentration im Tubulus führt über eine Vasokonstriktion der Arteriola afferens des Glomerulus zur Reduktion der Primärharnbildung [15]. Ein Schema eines Nierenkörperchens ist in Abbildung 1 (Seite 3) dargestellt.

Ein Teil des Plasmas des durch die Arteriola afferens fließenden Blutes wird im Glomerulus durch die Blut-Harn-Schranke in den Tubulus hinein ultrafiltriert. Die Blut-Harn-Schranke wird daher auch als glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB) bezeichnet. Sie setzt sich aus drei Schichten zusammen: Am Rand des Kapillarlumens befindet sich zunächst das Endothel der Glomeruluskapillaren. Dieses besitzt eine negativ geladene Glykokalix sowie etwa 60-100 nm große Poren und wird daher auch als fenestriert bezeichnet. Die zweite Schicht stellt die glomeruläre



**Abb. 1: Schema eines Nierenkörperchens.** (modifiziert nach [12, 14])

Dargestellt ist die schematische Abbildung des Querschnitts eines Nierenkörperchens. **DT:** Distaler Tubulus, pars recta. **E:** fenestriertes Kapillarendothel. **GBM:** Glomeruläre Basalmembran. **JZ:** Juxtaglomeruläre Zellen. **KL:** Kapillarlumen. **KR:** Kapselraum der Bowman-Kapsel. **MD:** Macula densa. **Mes:** Mesangium. **P:** Podozyt. **PB:** parietales Blatt der Bowman-Kapsel. **PT:** Proximaler Tubulus, pars convoluta. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Basalmembran (GBM) dar. Sie besteht aus einer zentralen, hauptsächlich aus Collagen Typ IV und Laminin zusammengesetzten Lamina densa, einer dem Endothel zugewandten Lamina rara interna sowie einer den Podozyten zugewandten Lamina rara externa. Die beiden Laminae rarae setzen sich hauptsächlich aus Zelladhäsionsproteinen sowie negativ geladenen Glykosaminoglykanen zusammen. Die dritte Schicht bilden schließlich die Podozyten. Sie sitzen auf der Harnseite der GBM und bilden Primärfortsätze aus, welche sich wiederum in Sekundärfortsätze (auch als Fußfortsätze bezeichnet) aufteilen. Diese sind an der GBM befestigt und interagieren mit den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten ähnlich zweier Hände mit verschränkten Fingern [12]. Dadurch entstehen etwa 40 nm schmale Filtrationsschlitze zwischen zwei Podozyten, welche von einem aus Nephrinmolekülen bestehenden Schlitzdiaphragma überspannt werden [16]. Das Schlitzdiaphragma unterteilt den jeweiligen Filtrationsschlitz in zahlreiche kleine Poren, welche

erstmalig 1974 von Rodewald und Karnovsky detailliert als rechteckige, 4x14 nm große Poren beschrieben wurden [17]. In neueren Untersuchungen wurde dieses Modell erheblich modifiziert und die Schlitzmembran als ein dynamisches Proteingerüst mit Abständen von etwa 7 nm zwischen den einzelnen Proteinen dargestellt [18, 19]. Wasser, Ionen sowie kleine Moleküle wie Glucose, Aminosäuren oder Kreatinin können ungehindert durch die GFB hindurchtreten und werden daher als frei filtrierbar bezeichnet. Zelluläre Bestandteile des Bluts wie Erythrozyten und größere Proteine wie Albumin können hingegen nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß filtriert werden [12]. Die Filtrierbarkeit von Molekülen ist dabei neben der Größe auch von der Ladung des Moleküls abhängig: Negativ geladene Moleküle werden aufgrund negativ geladener Bestandteile der GFB schlechter filtriert als gleich große neutrale oder positiv geladene Moleküle [20].

### **1.2.2 Adaptation von Podozyten auf mechanische und biochemische Einflüsse**

Bedingt durch ihre Lokalisation sind Podozyten vielfältigen mechanischen und biochemischen Einflüssen ausgesetzt. Der hydrostatische Druck in den Kapillaren des Glomerulus ist als entscheidende Kraft für die Ultrafiltration erforderlich, setzt die Kapillare allerdings auch einer starken Wandspannung aus. Diese wird sowohl durch das Kapillarendothel als auch über die GBM sowie die Podozyten-Fußfortsätze abgefangen [21, 22]. Die Ultrafiltration führt aufgrund des Primärharnflusses durch die GFB zu einer auf die Podozyten einwirkenden Wandschubspannung [22]. Eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks in den Kapillaren führt zu einer verstärkten mechanischen Belastung der Podozyten, welche daraufhin in vergleichbaren Experimenten *in vitro* mit einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts reagieren [23]. Auch auf eine erhöhte Wandschubspannung reagieren Podozyten über eine Aktivierung verschiedener Tyrosinkinase mit einer Reorganisation des Zytoskeletts [22].

Neben den mechanischen Kräften wirken biochemische Einflüsse auf Podozyten ein. In Patienten mit Diabetes mellitus sind Podozyten erhöhten Blutglucosewerten ausgesetzt. Mit hohen Glucosekonzentrationen behandelte Podozyten zeigen eine Desorganisation des F-Aktin-Zytoskeletts sowie erhöhte Albuminpermeabilität in einem Podozyten-Permeabilitätsassay [24]. Inflammatorische Zytokine und Chemokine können die Genexpression von Podozyten beeinflussen. In einer Mauspodozyten-Zellkulturstudie wurde nach Inkubation der Zellen mit Serum-Amyloid-A1, einem Akute-Phase-Protein, eine erhöhte mRNA-Expression von zahlreichen Interleukinen sowie Chemokinen beobachtet [25]. In weiteren Untersuchungen wurde eine ver-

minderte Promotoraktivität von Nephrin nach Inkubation von Mauspodozyten mit stimulierten Makrophagen festgestellt [26].

Nicht jede Zellbelastung führt zwangsläufig zu einer Zellschädigung, da Podozyten ausgeprägte Adaptationsmechanismen besitzen. So wurde beispielsweise bei pathologischer Erweiterung der Glomeruli eine Hypertrophie der Podozyten beobachtet, wodurch die GBM bei gleichbleibender Podozytenanzahl weiterhin vollständig von Podozytenfortsätzen bedeckt blieb [27]. In einem Tiermodell mit durch Überernährung induzierter Vergrößerung der Glomeruli konnte zunächst ebenfalls eine Hypertrophie der Podozyten festgestellt werden [28]. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf kam es allerdings zu strukturellen Veränderungen wie vermehrter Desmin-Expression (einem Intermediärfilament) sowie zu verminderter Nephrin-Expression der Podozyten. Wurde die kompensatorische Kapazität der Zellen überschritten, konnte eine Proteinurie beobachtet werden, welche auf eine Beschädigung der GFB hindeutet. Im weiteren Verlauf wurde schließlich sogar ein Ablösen der Podozyten vom Glomerulus festgestellt [28]. Anscheinend können Podozyten nur bis zu einem gewissen Grad adaptieren, sodass bei weiterer Belastung die Integrität der GFB nicht mehr gewährleistet werden kann.

Eine entscheidende Barriere für die Filtration von Proteinen stellt die von den Podozyten gebildete Schlitzmembran dar. Ihre Bedeutung wird anhand der Ursache des kongenitalen nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ, einer von massiver Proteinurie gekennzeichneten Erkrankung, deutlich: Grund dieser Erkrankung sind Mutationen im NPHS-1-Gen, welches für Nephrin, den Hauptbestandteil der Schlitzmembran, kodiert [29]. Da Proteinurie ein klassisches Merkmal chronischer Nierenerkrankungen ist, werden Podozytenveränderungen als Schlüssel für das Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungen betrachtet [30].

## **1.3 Matrixmetalloproteasen (MMP)**

### **1.3.1 Struktur und Funktion von MMP**

Matrixmetalloproteasen (MMP), eine Familie Zink- und Kalzium-abhängiger Endopeptidasen, sind dazu imstande, verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) proteolytisch abzubauen [31]. Die erste Beschreibung von MMP in der Literatur stammt aus dem Jahr 1962 von Gross und Lapiere. In ihren Experimenten beobachteten sie ein Enzym mit kollagenolytischer Aktivität in Kaulquappen während ihrer Metamorphose [32]. Mittlerweile sind 23 strukturell miteinander verwandte Proteinase bekannt, die als MMP zusammengefasst werden [33].

Während MMP anfangs ausschließlich als EZM-abbauende Enzyme gesehen wurden, ist mittlerweile bekannt, dass ihre Funktion deutlich komplexer ist. So können einige MMP beispielsweise Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren oder inflammatorische Zytokine proteolytisch spalten und sie dadurch entweder aktivieren oder inaktivieren [34, 35]. Eine Übersicht der wichtigsten Substrate der einzelnen MMP ist in Tabelle 1 zu finden.

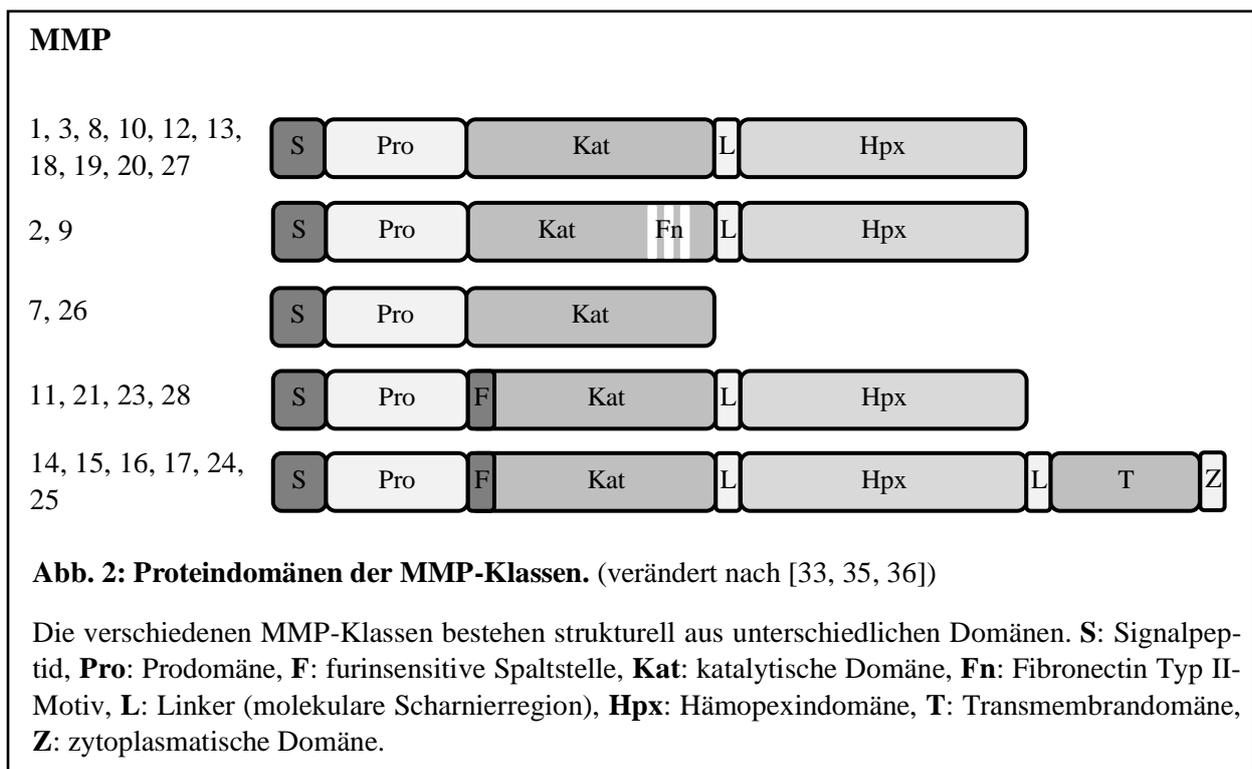
Tab. 1 Substrate der MMP (verändert nach [35, 36])

	<b>MMP</b>	<b>Alternative Bezeichnung</b>	<b>Substrate (Auswahl)</b>
<b>Collagenasen</b>	MMP-1	Collagenase-1	Collagen (Typ I, II, III, VII, VIII und X), Aggrecan, Casein, Entactin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, proMMP-1, -2, -9, IL-1 $\beta$ , proIL-1 $\beta$ , proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin
	MMP-8	Collagenase-2	Collagen (Typ I, II, III, VII, X), Aggrecan, Fibrinogen, Fibronectin, $\alpha_2$ -Macroglobulin, Angiotensin I und II, Bradykinin
	MMP-13	Collagenase-3	Collagen (Typ I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV), Aggrecan, Casein, Entactin, Fibrinogen, Fibronectin, Gelatin, proMMP-9, -13, proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin
<b>Gelatinasen</b>	MMP-2	Gelatinase A	Collagen (Typ I, II, III, IV, V, VII, X), Aggrecan, Elastin, Entactin, Fibronectin, Gelatin, Vitronectin, proMMP-1, -2, -9, -13, proTGF- $\beta$ , proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin
	MMP-9	Gelatinase B	Collagen (Typ IV, V, X, XIV), Aggrecan, Elastin, Gelatin, Laminin, Vitronectin, proTGF- $\beta$ , proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin, Angiotensin I und II
<b>Stromelysine</b>	MMP-3	Stromelysin-1	Aggrecan, Entactin, Gelatin, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Plasminogen, Vitronectin, proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin, proMMP-1, -3, -7, -8, -9, -13
	MMP-10	Stromelysin-2	Collagen (Typ III, IV, V), Aggrecan, Casein, Elastin, Gelatin, Fibronectin, Laminin, proMMP-1, -7, -8, -9
	MMP-11	Stromelysin-3	Collagen (Typ IV), Aggrecan, Gelatin, Fibronectin, Laminin, $\alpha_2$ -Macroglobulin
	MMP-19	Stromelysin-4	Collagen (Typ IV), Aggrecan, Entactin, Fibrinogen, Fibronectin, Gelatin, Laminin

<b>Matrilysine</b>	MMP-7	Matrilysin	Collagen (Typ I und IV), Aggrecan, Elastin, Entactin, Gelatin, Fibronectin, Laminin, proMMP-1, -2, -7, -9, proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin
	MMP-26	Matrilysin-2	Collagen (Typ IV), Fibrinogen, Fibronectin, Gelatin, Vitronectin, proMMP-9, $\alpha_2$ -Macroglobulin, $\beta$ 4-Integrin, E-Cadherin,
<b>Membrangebundene MMP</b>	MMP-14	MT1-MMP	Collagen (Typ I, II, III), Aggrecan, Entactin, Fibrinogen, Fibronectin, Gelatin, Laminin, Vitronectin, proMMP-2, -13, CD44, proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin
	MMP-15	MT2-MMP	Aggrecan, Entactin, Fibronectin, Laminin, proMMP-2, proTNF $\alpha$ , Transglutaminase-2
	MMP-16	MT3-MMP	Collagen (Typ III), Gelatin, Fibronectin, Vitronectin, proMMP-2, $\alpha_2$ -Macroglobulin, Transglutaminase-2
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, Gelatin, proTNF $\alpha$
	MMP-24	MT5-MMP	Fibronectin, Gelatin, Proteoglykane, proMMP-2, Transglutaminase-2
	MMP-25	MT6-MMP	Collagen (Typ IV), Fibrinogen, Fibronectin, Gelatin, Proteoglykane, proMMP-2
<b>Weitere MMP</b>	MMP-12	Metalloelastase	Collagen (Typ I und IV), Aggrecan, Casein, Elastin, Entactin, Fibronectin, Fibrinogen Gelatin, Laminin, Plasminogen, Vitronectin, proTNF $\alpha$ , $\alpha_2$ -Macroglobulin
	MMP-20	Enamelysin	Aggrecan, Amelogenin
	MMP-21		Casein, Gelatin
	MMP-23		Gelatin
	MMP-27		Casein, Gelatin
	MMP-28	Epilysin	Casein, Neurales Zelladhäsionsmolekül 1

MMP bestehen strukturell aus verschiedenen Domänen. Eine Übersicht der strukturellen Zusammensetzung der unterschiedlichen MMP gibt Abbildung 2 (Seite 8). Üblicherweise besitzt eine MMP eine etwa 80 Aminosäuren lange Prodomäne, eine katalytische Domäne mit einer Länge von ungefähr 170 Aminosäuren, eine variable molekulare Scharnierregion (auch als „Linker“ oder „hinge region“ bezeichnet) sowie eine etwa 200 Aminosäuren lange Hämopexin-Domäne. Ein Signalpeptid ist für die Sekretion der MMP aus der Zelle in den extrazellulären

Raum verantwortlich [33]. Die Prodomäne besitzt einen Cysteinrest, dessen SH-Gruppe mit dem katalytischen Zinkion der katalytischen Domäne interagiert. Dadurch wird die Bindung und Proteolyse der jeweiligen Substrate der MMP verhindert, sodass die als Proenzyme sezernierten MMP initial bis zu ihrer Aktivierung biologisch inaktiv sind [36]. Die katalytische Domäne beinhaltet drei Histidinreste, welche koordinativ das für die enzymatische Aktivität des Enzyms verantwortliche Zinkion binden. Über die Scharnierregion ist die katalytische Domäne von der Hämapexindomäne separiert. Die Hämapexindomäne, eine vierblättrige  $\beta$ -Propeller-Struktur, ist zusammen mit der katalytischen Domäne der jeweiligen MMP für die Substratspezifität verantwortlich [33]. Weiterhin sind über diese Domäne Protein-Protein-Interaktionen mit Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), einer Gruppe von endogenen Inhibitoren der MMP, möglich [36]. Gelatinasen (MMP-2 und -9) besitzen in ihrer katalytischen Region drei Fibronectin Typ II-Motive, welche die effektive Proteolyse von Gelatin ermöglichen [37, 38]. Matrilysine (MMP-7 und -26) besitzen keine Hämapexindomäne [33]. Membrangebundene MMP (MMP-14, -15, -16, -17, -24 und -25) beinhalten in ihrer Proteinstruktur zusätzlich eine Transmembrandomäne sowie – wie auch MMP-11, -21, -23 und -28 – eine furinsensitive Spaltstelle am C-Terminus des Propeptids. Dadurch können diese MMP intrazellulär aktiviert werden, sodass sie bereits bei Erreichen ihrer Position in der Zellmembran beziehungsweise in der extrazellulären Matrix biologisch aktiv sind [35, 39].



MMP werden klassischerweise als Prä-Proenzyme synthetisiert und nach Abspaltung des Signalpeptids während der Translation als Proenzyme in den extrazellulären Raum sezerniert. Um ihre biologische Aktivität zu erhalten, ist die Abspaltung der Prodomäne durch Proteasen wie Plasmin, Trypsin oder bereits aktivierte MMP erforderlich [36, 40]. Dadurch kommt es zu einer Destabilisierung der Interaktion zwischen dem Cysteinrest der Prodomäne und dem katalytischen Zinkion der katalytischen Domäne (auch als „cysteine switch“ bezeichnet), wodurch die katalytische Domäne nun ihre jeweiligen Substrate binden und proteolytisch spalten kann [40]. Eine Ausnahme sind MMP mit einer furinsensitiven Spaltstelle, diese können bereits intrazellulär durch Subtilisin-ähnliche Serinproteasen über die Abspaltung der Prodomäne aktiviert werden [35]. Die Aktivierung von ProMMP-2 findet vor allem an der Zelloberfläche statt und wird durch MT-MMP vermittelt [41].

### **1.3.2 Regulation von MMP und ihre Bedeutung in pathologischen Situationen**

Aufgrund des potenziellen EZM-zerstörenden Effekts einer überschießenden MMP-Aktivität ist eine präzise Regulation sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Ebene der proteolytischen Aktivität der Enzyme in der EZM erforderlich. Die konstitutive Expression von MMP befindet sich in nicht-pathologischen Situationen auf einem vergleichsweise niedrigen Niveau [42]. Bei einem erforderlichen vermehrten EZM-Umbau wird über unterschiedliche Stimuli wie Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) die Transkription der benötigten MMP erhöht [42, 43]. Die Beeinflussung der MMP-Transkription durch diese Stimuli geschieht über verschiedene Signalkaskaden, besonders mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK), Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) sowie nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) sind hier von entscheidender Bedeutung [42]. Da die verschiedenen MMP ähnliche Promotorsequenzen besitzen, wird bei einem Stimulus in der Regel eine Gruppe aus mehreren MMP herauf- oder herabreguliert [44]. Die enzymatische Aktivität bereits sezernierter MMP kann durch  $\alpha_2$ -Macroglobulin und TIMP inhibiert werden. Die Mehrzahl aktivierter MMP kann eine bestimmte Region des  $\alpha_2$ -Macroglobulins proteolytisch spalten. Infolgedessen kommt es zu einer Konformationsänderung des  $\alpha_2$ -Macroglobulins, die MMP wird dabei in das Protein eingeschlossen und somit funktionell inaktiv [33]. TIMP, eine Klasse endogener MMP-Inhibitoren, interagieren mit der katalytischen sowie der Hämopexindomäne der jeweiligen MMP in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 und führen so zu einer Inhibition der MMP. Die vier bekannten TIMP haben dabei unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die verschiedenen MMP [34].

Die Bedeutung der präzisen Regulation der MMP-Aktivität ist besonders in pathologischen Situationen ersichtlich. In atherosklerotischen Plaques ist die MMP-Expression in glatten Muskelzellen und Endothelzellen vor allem durch inflammatorische Zytokine erhöht [45, 46]. Dieser Prozess ist mit der Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima assoziiert, einem für die Atherosklerose typischen Phänomen [47]. Weiterhin führt die MMP-Sekretion durch die sich in dem Plaque befindenden Makrophagen zu einem Abbau der fibrösen Kappe des Plaques. Dadurch wird eine Ruptur des Plaques begünstigt, was wiederum je nach Lokalisation des Plaques zu Ereignissen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall führen kann [48]. Auch in der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis sowie der Arthrosis deformans spielt eine erhöhte MMP-Aktivität eine bedeutsame Rolle. In beiden Erkrankungen führen inflammatorische Zytokine, vor allem IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , zu einer Stimulation der MMP-Expression [49, 50]. Besonders die primär von Synovialozyten sezernierte MMP-1 sowie die hauptsächlich von Chondrozyten sezernierte MMP-13 bewirken in der Folge einen vermehrten Abbau der Kollagenfibrillen des hyalinen Gelenknorpels. Infolgedessen kommt es zu einer fortschreitenden Degeneration der Knorpelmatrix [50, 51]. MMP tragen erheblich zur Zerstörung des Lungengerüsts im Rahmen eines durch Zigarettenrauch induzierten Lungenemphysems bei [52]. Vor allem die von alveolären Makrophagen infolge des Zigarettenrauchs sezernierte MMP-12 führt dabei zur Destruktion des Lungenparenchyms [53, 54].

### **1.3.3 MMP in Nierenerkrankungen**

Auch bei renalen Erkrankungen wurden Veränderungen in der Expression und Aktivität von MMP beobachtet. Die renale Fibrose wird als gemeinsame Endstrecke verschiedener chronischer Nierenerkrankungen wie Glomerulonephritis, diabetischer Nephropathie oder hypertensiver Nephropathie betrachtet. Die pathologische Akkumulation von EZM wird dabei durch unterschiedliche Prozesse einschließlich Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, Epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) von Tubuluszellen sowie der Aktivierung von Fibroblasten verstärkt [55]. MMP können potenziell an jedem dieser Prozesse beteiligt sein. So führt beispielsweise eine Überaktivität von MMP-9 über die Generierung von chemotaktisch wirkenden Kollagenfragmenten zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [56]. Damit vereinbar zeigten Patienten mit schwerer chronischer Nierenerkrankung in einer Studie erhöhte MMP-9-Spiegel im Serum [57]. Im Gegensatz dazu kann MMP-13 das Interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), über dessen Bindung Leukozyten in das Gewebe einwandern, proteolytisch spalten und so potenziell antiinflammatorisch wirken [58]. Somit ist eine Betrachtung von MMP als rein proinflammatorisch wirkende Enzyme nicht zutreffend. EMT beschreibt einen Prozess

der Umwandlung des Phänotyps von ausdifferenzierten Epithelzellen zu Fibroblasten beziehungsweise Myofibroblasten und wird nach Gewebsverletzung in der Niere beobachtet. Sowohl mit MMP-2 behandelte proximale Tubuluszellen als auch Tubuluszellen MMP-2-überexprimierender Mäuse zeigten die Entwicklung von EMT [59, 60]. Die genaue Rolle von EMT in der Pathophysiologie der Nierenfibrose wird jedoch kontrovers diskutiert [61].

Eine der bedeutsamsten Komplikationen des Diabetes mellitus ist die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie (DN). Diese stellt in Deutschland die häufigste Ursache von dialysepflichtiger Niereninsuffizienz dar [62, 63]. Der Niereninsuffizienz vorausgehend ist eine oft jahrelange, klinisch stumme Phase, in welcher bereits strukturelle Veränderungen der Niere auftreten. Dazu zählt vor allem die Verdickung der glomerulären Basalmembran (GBM) [64, 65]. Viele Bestandteile der GBM werden physiologisch fortwährend umgebaut. Dieser Umbau wird hauptsächlich über Podozyten vermittelt, welche sowohl neue GBM-Proteine synthetisieren und sezernieren, als auch über MMP-Sekretion den Abbau von Komponenten der GBM ermöglichen [9, 66]. Eine präzise Ausbalancierung dieses permanenten Umbaus ist von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung der Integrität und Funktion der GBM. Die Hyperglykämie im Rahmen des Diabetes mellitus führt zu einer Schädigung der Podozyten mit einer Störung der Balance zwischen Auf- und Abbau der GBM [66]. So synthetisieren Podozyten einerseits vermehrt Moleküle der GBM, andererseits ist aber ihre MMP-Sekretion dysreguliert [67, 68]. Während in einigen Studien eine verminderte MMP-Expression beziehungsweise -Aktivität in DN-veränderten Glomeruli beobachtet wurde, konnte in den meisten Untersuchungen das Gegenteil festgestellt werden [69–72]. Ein erhöhter MMP-9-Spiegel im Urin wurde experimentell als potenzieller Biomarker für die DN ausgemacht [73]. Der Einfluss von MMP auf die Pathogenese der DN ist bislang unklar. Initial wurde eine erhöhte MMP-Aktivität eher als ein positiver Faktor gewertet, da durch die vermehrte proteolytische Aktivität eine Normalisierung der pathologisch verdickten GBM erwartet wurde. Mittlerweile hat sich diese Ansicht allerdings verändert. MMP können neben Bestandteilen der EZM auch eine Vielzahl an Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren sowie inflammatorischen Zytokinen proteolytisch spalten. Weiterhin besitzen auch Abbauprodukte der EZM eine biologische Aktivität [34]. Eine am Modell einer diabetischen Maus durchgeführte Studie zeigte abgemilderte strukturelle Veränderungen des Glomerulus sowie verminderte Proteinurie im Rahmen der DN nach MMP-2-Inhibition [74]. Eine MMP-2-Knockout-Maus zeigte dagegen erhöhte Albuminurie sowie EZM-Akkumulation im glomerulären Bereich [75]. Anscheinend ist also weder eine überschießende MMP-Aktivität noch ein komplettes Fehlen der MMP-Aktivität für den Verlauf der DN vorteilhaft. Diese Beobachtungen verdeutlichen

die Notwendigkeit einer genau austarierten Regulation der MMP-Expression von Podozyten. Zusammenfassend bleibt dennoch unklar, ob die beobachteten MMP-Veränderungen als Reaktion auf die Pathogenese der DN oder aber als Teil dieser Pathogenese zu verstehen sind.

Auch nach Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere, einer Ursache des akuten Nierenversagens, wurde eine erhöhte MMP-2/9-Expression vor allem im Tubulus sowie im tubulointerstitiellen Raum beobachtet [76]. Am Mausmodell durchgeführte Untersuchungen konnten einen erniedrigten Serumkreatininwert bei mit einem Breitspektrum-MMP-Inhibitor behandelten Mäusen nach Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe feststellen [77]. Diese Beobachtungen lassen einen eher negativen Einfluss erhöhter MMP-Expression in der Pathophysiologie des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens vermuten.

Zusammenfassend wird deutlich, dass eine Dysregulation der MMP-Expression und -Aktivität eine bedeutsame Rolle in verschiedenen renalen Erkrankungen spielt. Die dahinterliegenden genauen molekularen Mechanismen sind allerdings in vielen Fällen bislang unzureichend erforscht.

#### **1.4 Zinkfingerprotein 580 (ZNF580)**

Zinkfingerprotein 580 (ZNF580) wird durch ein auf Chromosom 19 liegendes Gen kodiert, welches erstmals 2003 von Zhang et al. im Zusammenhang mit Low Density Lipoprotein (LDL) in humanen Endothelzellen beschrieben wurde [78]. Es kodiert ein 172 Aminosäuren langes Protein mit einer molekularen Masse von 18.756 Da, welches am C-Terminus drei aufeinanderfolgende Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup>-Motive (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) besitzt und somit zur Klasse der Zinkfingerproteine gehört [78, 79].

Zinkfingerproteine vom C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typ gehören zu den häufigsten DNA-bindenden Proteinen, ihre mehr als 700 Gene machen etwa 3 % des humanen Genoms aus [80]. Sie beinhalten ein oder mehrere charakteristische C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger motive. Ein C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger besteht aus einer Polypeptidkette mit zwei Cystein- und zwei Histidin-Resten, in der Mitte dieser Struktur befindet sich ein koordinativ gebundenes Zinkion [81]. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger können mit verschiedenen Biomolekülen interagieren, klassischerweise bindet ein Zinkfinger jedoch an ein bestimmtes DNA-Tri- oder Tetranucleotid [80, 82]. Da ein Zinkfingerprotein meist mehrere dicht hintereinanderliegende C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger besitzt, können so spezifische DNA-Sequenzen gebunden werden [81]. Einige C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger können allerdings auch an Sequenzen in RNA oder Proteinen binden [83, 84]. Aufgrund ihrer Fähigkeit, spezifische DNA-Sequenzen zu binden, fungieren viele

C2H2-Zinkfingerproteine als Transkriptionsfaktoren. Dabei können sie entweder als Induktoren oder als Repressoren der Transkription agieren. Induktoren beeinflussen meistens direkt den Präinitiationskomplex der Transkription, Repressoren bewirken häufig eine Histonmodifikation, beispielsweise eine Deacetylierung oder eine Methylierung des jeweiligen Histons. Diese Prozesse führen wiederum zu einer Suppression des Zielgens [81, 85].

ZNF580 besitzt in seinem strukturellen Aufbau Ähnlichkeiten zu Proteinen der specificity protein/Krüppel-like factor-Familie (Sp/KLF). Diese besitzen ebenso wie ZNF580 drei aufeinanderfolgende C2H2-Zinkfinger an ihrem C-Terminus [86]. Proteine der Sp/KLF-Familie wirken als Transkriptionsfaktoren für die Expression verschiedener Gene. Sie sind beispielsweise an der Regulation der Zelldifferenzierung während der Erythropoese oder der Zellproliferation von Fibroblasten beteiligt [87–89]. Aufgrund der Ähnlichkeit zu diesen Transkriptionsfaktoren wird angenommen, dass ZNF580 ebenfalls als Transkriptionsfaktor agiert. Allerdings ist bislang wenig erforscht, welche Rolle ZNF580 in der Genexpression spielt.

Sun et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass S1P, ein Angiogenese-induzierendes Sphingolipid, in EA.hy926-Zellen (einer endothelialen Zelllinie) zu einer Erhöhung der ZNF580-Expression führte [90]. Eine ZNF580-Überexpression führte wiederum zu einem Anstieg der MMP-2- und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) -Expression sowie zu einer vermehrten Proliferation und Migration der EA.hy926-Zellen [90]. In einem Microarray unserer Arbeitsgruppe wurde eine Suppression der mRNA-Expression von MMP-1 sowie MMP-10 in EA.hy926-Zellen nach ZNF580-Knockdown mittels einer spezifischen siRNA beobachtet (Zakrzewicz et al., persönliche Mitteilung). Luo et al. fokussierten ihre Untersuchungen zu ZNF580 auf potentielle Interaktionen zwischen ZNF580 und anderen Proteinen verschiedener Signalkaskaden in HEK-293-Zellen. Sie konnten mittels eines *Yeast Two-Hybrid*-Systems 14 verschiedene humane Proteine identifizieren, mit denen ZNF580 potenziell interagieren kann, darunter SMAD Family Member 2 (SMAD2) [91]. SMAD2 ist ein wichtiger Bestandteil der TGF- $\beta$ -Signaltransduktionskaskade [92], woraus geschlossen wurde, dass ZNF580 in diese Kaskade integriert sei [91]. Weiterhin konnten Luo et al. mittels Immunofluoreszenz zeigen, dass sich ZNF580 im Zellkern von EA.hy926-Zellen befindet [91]. In weiteren Untersuchungen zu dem vermuteten Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$  und ZNF580 konnten Luo et al. eine Suppression der ZNF580-Expression in EA.hy926-Zellen nach Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$  beobachten [93]. Zudem wurde in ihren Versuchen eine Induktion der Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) nach ZNF580-Überexpression sowie eine Suppression der eNOS-Expression durch Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$  festgestellt. Mittels ZNF580-

Überexpression konnte eine durch Stimulation der EA.hy926-Zellen mit TGF- $\beta$  erreichte Inhibition der Zellproliferation abgeschwächt werden [93].

ZNF580 kann auch mit inflammatorischen Signaltransduktionsmolekülen interagieren. DangLi et al. konnten in ihren Versuchen eine Induktion der ZNF580-Expression nach Behandlung von EA.hy926-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachten. Eine ZNF580-Überexpression führte wiederum zu einer Induktion der Interleukin-8 (IL-8) -Expression [94]. Hoffmann et al. zeigten in ihren Untersuchungen zu ZNF580 eine Suppression der ZNF580-Expression nach Behandlung von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) mit oxidiertem LDL (oxLDL) [95]. Je größer dabei der oxLDL-Anteil des Gesamt-LDLs war, umso stärker war auch die Suppression von ZNF580. Ein ZNF580-Knockdown mittels einer spezifischen siRNA in HUVEC führte zu einem Anstieg der IL-8-Expression. Dieser Effekt wurde ebenfalls bei hohen oxLDL/LDL-Verhältnissen beobachtet. Der Knockdown von ZNF580 in HUVEC führte weiterhin zu einer erhöhten Monozytenadhäsion. In Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte die Lokalisation von ZNF580 im Zellkern bestätigt werden [95].

Aufgrund der Effekte auf Endothelzellen ist ZNF580 als vielversprechendes Ziel für therapeutische Interventionen nach Stent-Implantation im Rahmen einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) diskutiert worden. Mithilfe von biologisch abbaubaren Mikropartikeln erfolgte die Transfektion eines Fusionsplasmids aus enhanced green fluorescent protein (pEGFP) und ZNF580 in arterielle Endothelzellen, um die Proliferation und Migration der Zellen zu erhöhen. Dadurch soll die Endothelialisierung eines implantierten Stents beschleunigt werden. Die Forschung auf diesem Gebiet ist allerdings bislang nur im Rahmen von Grundlagenarbeiten durchgeführt worden, eine klinische Erprobung steht noch aus [96–98].

Die Rolle von ZNF580 in Podozyten ist bislang kaum erforscht. Leppert et al. konnten in ihren Versuchen an humanen Podozyten die Expression von ZNF580 in Podozyten sowie eine verminderte ZNF580-Expression nach Inkubation der Zellen mit BAY 11-7082 (NF- $\kappa$ B-Inhibitor) beobachten [99]. Die intrazelluläre Lokalisation von ZNF580 sowie eine mutmaßliche Beteiligung an der Genexpression wurden bislang in Podozyten nicht untersucht.

Es bleibt zu betonen, dass in den dargelegten Forschungsergebnissen bislang noch nicht abschließend gezeigt werden konnte, dass ZNF580 tatsächlich als Transkriptionsfaktor agiert. Die genaue Rolle des Proteins in der Zelle bleibt damit großteils unklar. Die bisherigen Untersuchungen zu ZNF580 lassen allerdings einen Zusammenhang zwischen ZNF580 und Inflammation, der TGF- $\beta$ -Signaltransduktionskaskade sowie der MMP-Expression erkennen.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Eine dysregulierte MMP-Expression in Podozyten spielt in der Pathophysiologie zahlreicher chronischer Nierenerkrankungen eine zentrale Rolle. Die dabei wirkenden pathophysiologischen Mechanismen sind bislang unzureichend erforscht. Um neue pharmakologische Angriffspunkte für die Behandlung dieser Erkrankungen zu finden und damit die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens zu verhindern, ist ein genaues Verständnis der an der MMP-Regulation in Podozyten beteiligten Signalwege von größter Bedeutung. ZNF580, ein potenzieller Transkriptionsfaktor aus der Klasse der Zinkfingerproteine vom C2H2-Typ, zeigte in Studien eine Beteiligung an der MMP-Expression in Endothelzellen. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass auch in Podozyten eine Interaktion zwischen ZNF580 und der MMP-Expression stattfindet. Untersuchungen dieser Art wurden in Podozyten bislang nicht durchgeführt.

In dieser Arbeit soll daher das Zusammenspiel zwischen ZNF580 und der MMP-Expression in einer immortalisierten humanen Podozytenzelllinie charakterisiert werden [100]. Dazu sind zunächst der Nachweis einer ZNF580-Expression sowie die Ermittlung der intrazellulären Lokalisation von ZNF580 in der verwendeten Zelllinie von Bedeutung. Um eine mögliche Beteiligung von ZNF580 an der Expression von MMP in Podozyten zu erforschen, sollen die verschiedenen MMP-Klassen systematisch auf Veränderungen ihres mRNA-Niveaus nach einem spezifischen ZNF580-Knockdown untersucht werden. Darüber hinaus sollen ZNF580-regulierte MMP durch bereits bekannte Stimuli induziert werden, um eine etwaige Beteiligung von ZNF580 an diesen Signalwegen zu untersuchen. Im Ausblick dieser Arbeit sollen deren Ergebnisse auf die Pathophysiologie chronischer Nierenerkrankungen extrapoliert werden, um dadurch das Verständnis dieser Erkrankungen zu verbessern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe verwendet.

Tab. 2: Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Fluka Chemie, St. Gallen, CH
Acrylamid 30% Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich , St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogensulfat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol (vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (Tween® 20)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Precision Plus Protein Dual Standard	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Salzsäure 32 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, D

---

Triton® X 100

Carl Roth, Karlsruhe, D

---

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
12-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, D
24-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, D
6-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-Well-Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Filterpapier	VWR International, Radnor, PA, USA
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Pipettenspitzen	VWR International, Radnor, PA, USA
Serologische Pipetten für Zellkultur	Falcon (Corning Life Sciences), Corning, NY, USA
PVDF-Membran Immun-Blot® 0,2 µm	Bio-Rad, München, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Schraubrohren	Sarstedt, Nümbrecht, D
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Düren
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturschalen 35x10 mm	Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA

### 2.1.3 Geräte

Tab. 4: Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Chemilumineszenz-Imager Calvin® S	Biostep, Burkhardtsdorf, D
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Cytoperm 8080	Heraeus, Hanau, D
Energieversorger Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Gelelektrophorese-Kammer Mini-Protean®	Bio-Rad, München, D
Hybridisierungsofen Hybaid Shake ´n´ Stack	Thermo Scientific, Waltham, MA,

	USA
Inkubationsschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Inkubationsschüttler	Biometra, Göttingen, D
Inverses Mikroskop DMI6000 B	Leica Camera, Wetzlar, D
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, D
Mikroplattenphotometer Spectra F039200 A-5082	Tecan, Männedorf, CH
Neubauer-Zellzählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, D
PCR-Thermocycler Uno II	Biometra, Göttingen, D
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Präzisionswaage 440-21N	Kern, Balingen-Frommern, D
Real-Time PCR Thermocycler Rotor Gene 2000	LTF, Wasserburg, D
Rotations-Vakuumkonzentrator UNIVAPO 100H	UniEquip, Planegg, D
Sicherheitswerkbank LaminAir® HB 2448	Heraeus, Hanau, D
Spektralphotometer Ultrospec 2100®	GE Healthcare, Little Chalfont, GB
Western-Blot-Kammer Mini Trans-Blot®	Bio-Rad, München, D
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Biofuge™ Stratos™	Heraeus, Hanau, D

### 2.1.4 Puffer

Für die nachfolgenden Puffer wurde mit einem Biopak® Ultrafilter (Merck) gefiltertes MilliQ®-Wasser verwendet.

Tab. 5: Polyacrylamidgele

<b>Chemikalie</b>	<b>Trenngel (12 %)</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>
Aqua dest.	33,9 %	72,8 %
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	25 %	-
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	12,4 %
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	40 %	13,6 %
20 % SDS	0,5 %	0,5 %
TEMED	0,1 %	0,2 %
10 % APS	0,5 %	0,5 %

Tab. 6: 5x Probenpuffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mmol/L
Glycerol	20 %
SDS	2 %
DTT	50 mmol/L
Bromphenolblau	0,01 %

Tab. 7: Elektrophoresepuffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
Glycin	192 mmol/L
Tris	25 mmol/L
SDS	3,47 mmol/L

Tab. 8: Transferpuffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
Glycin	149,2 mmol/L
Tris	24,8 mmol/L
Ethanol	10 %

Tab. 9: PBS-Tween

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	140 mmol/L
KCl	2,7 mmol/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mmol/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10 mmol/L
Tween® 20	0,1 %

### 2.1.5 Lösungen und Nährmedien für die Zellkultur

Tab. 10: Lösungen und Nährmedien für die Zellkultur

Substanz	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ (8000 mg/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1150 mg/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mg/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Biochrom, Berlin, D
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL / 10.000 $\mu\text{g/mL}$ )	Biochrom, Berlin, D
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium	Fisher Scientific, Hampton, NH, USA
Trypsin/EDTA (0,5 %/0,2 %)	Biochrom, Berlin, D

### 2.1.6 Kommerzielle Kits

Tab. 11: Kommerzielle Kits

Kitsystem	Hersteller	Katalognummer
DRAQ5™ (DNA-bindender Kernmarker)	Abcam, Cambridge, UK	ab108410
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	K1612
GoTaq® qPCR Master Mix for Dye-Based Detection	Madison, WI, USA	A6001
Lipofectamine® 2000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	11668027
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	78833
RIPA Lysis Buffer System	Santa Cruz, Dallas, TX, USA	sc-24948
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	34095
Universal RNA Purification Kit	EURx, Gdansk, PL	E3598-02
Western Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer, Waltham, MA, USA	NEL104001EA

## 2.1.7 Antikörper

Tab. 12: Primäre Antikörper

Antigen	Klonalität	Host	Hersteller	Katalognummer	Verwendete Verdünnung
GAPDH	monoklonal	Maus	Proteintech, Rosemont, IL, USA	HRP-60004	1:400.000
MMP-1	polyklonal	Kaninchen	Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA	ARP42039_T100	1:1.000
ZNF580	polyklonal	Kaninchen	Atlas Antibodies, Stockholm, SE	HPA054058	1:500 (Western Blot) 1:50 (Immunfluoreszenz)

Tab. 13: Sekundäre Antikörper

Antigen	Klonalität	Konjugat	Host	Hersteller	Katalognummer	Verwendete Verdünnung
Anti-rabbit	polyklonal	HRP	Ziege	Dako, Glostrup, DK	P044801-2	1:2.000
Anti-rabbit	polyklonal	Alexa Fluor® 594	Ziege	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	R37117	1:1.000

## 2.1.8 PCR-Primer

Tab. 14: PCR-Primer

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur (°C)	Produktgröße (Basenpaare)
GAPDH forward	5'-TCA AGA AGG TGG TGA AGC AG-3'	60	198
GAPDH	5'-CCC TGT TGC TGT AGC CAA AT-3'	60	198

reverse			
MMP-1	5'-AGC AGC TTC AAG CCC ATT TGG	66	189
forward	CA-3'		
MMP-1	5'-CCC ATC GGC CCA CAA ACC CC-3'	66	189
reverse			
MMP-10	5'-GGC TCT TTC ACT CAG CCA AC-3'	59	185
forward			
MMP-10	5'-CAT CTC AGA TCC CGA AGG AA-3'	56	185
reverse			
MMP-13	5'-CAC CTA CAC CGG CAA AAG CCA	65	203
forward	CT-3'		
MMP-13	5'-GCA GGC GCC AGA AGA ATC TGT	65	203
reverse	CTT T-3'		
MMP-14	5'-GCA GAA GTT TTA CGG CTT CG-3'	58	197
forward			
MMP-14	5'-TGG GGG TGT AAT TCT GGA TG-3'	57	197
reverse			
MMP-2	5'-CCT AGC CAG TCG GAT TTG AT-3'	56	189
forward			
MMP-2	5'-GAA AAT GGA TCC TGG CTT CC-3'	56	189
reverse			
MMP-7	5'-GAG TGA GCT ACA GTG GGA ACA-	59	158
forward	3'		
MMP-7	5'-CTA TGA CGC GGG AGT TTA ACA	59	158
reverse	T-3'		
MMP-9	5'- GGG AAG ATG CTG CTG TTC A-3'	58	187
forward			
MMP-9	5'-AAC TCA CGC GCC AGT AGA AG-3'	60	187
reverse			
TIMP-1	5'-CAT CCC CTA AGG CTT GGA A-3'	56	199
forward			
TIMP-1	5'-CTG TTG TTG CTG TGG CTG AT-3'	59	199
reverse			

TIMP-2 forward	5'-GGA GAT GTA GCA CGG GAT CA-3'	59	197
TIMP-2 reverse	5'-TGG ACG TTG GAG GAA AGA AG-3'	57	197
ZNF580 forward	5'-GGG TCC CCT ACA CAT ACA CG-3'	60	136
ZNF580 reverse	5'-AGA GGG CTG GCA AAG ACA C-3'	60	136

### 2.1.9 Zytokine und Inhibitoren

Tab. 15: Zytokine und Inhibitoren

Substanz	Hersteller
Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Recombinant Human IL-1 $\beta$	PeproTech, Rocky Hill, CT, USA
SB 203580, Free Base	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
SP600125	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
U0126	LC Laboratories, Woburn, MA, USA

### 2.1.10 siRNA

Tab. 16: siRNA

siRNA	Hersteller
MISSION® esiRNA targeting human ZNF580	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MISSION® siRNA Universal Negative Control #1	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze wurden sämtliche Zellkulturarbeiten an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich autoklavierte oder in sterilem Zustand erworbene Materialien verwendet.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden an einer immortalisierten humanen Podozytenzelllinie durchgeführt [100]. Diese Zelllinie exprimiert ein temperatursensitives *Simian virus 40* large T antigen (SV40-LT), welches an verschiedene Tumorsuppressorgene wie p53 und Retinoblastom-Protein (pRb) bindet und diese inaktiviert [100, 101]. Dieser Prozess verursacht den Eintritt der sich normalerweise nicht teilenden Podozyten in die S-Phase der Mitose mit anschließender Zellteilung. Da das SV40-LT-Genkonstrukt temperatursensitiv ist, proliferieren die Podozyten bei einer Temperatur von 33 °C. Bei einem Wechsel der Temperatur zu 37 °C und der damit einhergehenden Inaktivierung von SV40-LT stoppt die Zellproliferation und die endgültige Zelldifferenzierung wird eingeleitet [100]. Nach mindestens 14 Tagen bei 37 °C und somit in ausdifferenziertem Zustand wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche verwendet.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden bei 33 bzw. 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640, welches mit 10 % FKS sowie 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin supplimentiert wurde, verwendet. Dreimal pro Woche wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben.

Zur Aussiedlung auf Zellkultur-Platten oder zur Zellpassagierung wurden die konfluenten Zellen zunächst zweifach mit Dulbecco's PBS gewaschen, im Anschluss mittels 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in der Trypsin-EDTA-Lösung zusammen mit 3 mL RPMI 1640-Medium in eine 15 mL-Schraubröhre überführt und für 5 Minuten bei 21 °C und 300 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 10 mL PBS resuspendiert und die Zellanzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellen erneut für 5 Minuten bei 21 °C und 300 g zentrifugiert und im Anschluss mit RPMI 1640-Medium auf eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/mL Medium eingestellt. Anschließend wurden die Zellen entweder für Experimente auf Zellkulturplatten oder in neue Zellkulturflaschen zur Generierung einer subkonfluenten Zellkultur ausgesät (1 Mio. Zellen/Zellkulturflasche).

### 2.2.2 Zytokine und Inhibitoren

Für einige Experimente wurden ausdifferenzierte, in 6-, 12- bzw. 24-Well-Zellkulturplatten ausgesäte Podozyten (500.000, 300.000 bzw. 150.000 Zellen pro Well) mit dem inflammatorischen Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) behandelt. 16 h vor der Stimulation wurde ein Mediumwechsel zu RPMI-Medium ohne FKS mit Penicillin/Streptomycin durchgeführt. IL-1 $\beta$  wurde aus einer 100 ng/mL-Stammlösung (Lösungsmittel: PBS) in RPMI-Medium ohne FKS mit Penicillin/Streptomycin auf eine finale Konzentration von 5 ng/mL verdünnt. Als Negativkontrolle wurde die entsprechende Menge an Lösungsmittel (PBS) in RPMI-Medium ohne FKS mit Penicillin/Streptomycin gegeben. Anschließend wurden die jeweiligen Lösungen auf die entsprechenden Wells der Zellkulturplatte gegeben (6-Well-Platte: 1000  $\mu$ L pro Well, 12-Well-Platte: 500  $\mu$ L pro Well, 24-Well-Platte: 250  $\mu$ L pro Well).

Im Rahmen einiger Experimente wurden ausdifferenzierte, in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesäte Podozyten (300.000 Zellen pro Well) mit spezifischen Inhibitoren gegen p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK) (SB203580), c-Jun-N-terminale Kinasen 1, 2, 3 (JNK1, 2, 3) (SP600125), mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinasen 1, 2 (MEK1, 2) (U0126) bzw. NF- $\kappa$ B (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC) behandelt.

SB203580 ist ein hochspezifischer, zellpermeabler, selektiver Inhibitor der p38-MAPK, der über eine Bindung in der ATP-Bindungsstelle der p38-MAPK deren katalytische Aktivität unterbindet [102]. SB203580 wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, anschließend wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mmol/L hergestellt.

SP600125 ist ein hochspezifischer, zellpermeabler, selektiver Inhibitor der JNK1, 2 und 3. Auch dieser Inhibitor unterbindet ATP-kompetitiv die Aktivität seiner Zielproteine [103]. SP600125 wurde in DMSO gelöst, anschließend wurde eine Stammlösung von 10 mmol/L hergestellt.

U0126 ist ein spezifischer, nicht-kompetitiver Inhibitor von MEK1 und 2. Diese Enzyme phosphorylieren die Extracellular-signal Regulated Kinases 1 und 2 (ERK1 und 2), welche zu den MAPK gehören. Somit führt die Inhibition von MEK1 und 2 zu einer verminderten Aktivität von ERK1 und 2 [104]. U0126 wurde in DMSO gelöst, anschließend wurde eine Stammlösung von 10 mmol/L hergestellt.

PDTC ist ein spezifischer Inhibitor von NF- $\kappa$ B, der seine Wirkung über die Inhibition der I $\kappa$ B-Degradation entfaltet [105]. PDTC wurde in DMSO gelöst, anschließend wurde eine Stammlösung von 100 mmol/L hergestellt.

Ausdifferenzierte, auf 12-Well-Zellkulturplatten ausgesäte Podozyten (300.000 Zellen pro Well) wurden 16 h vor der Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor mit RPMI-Medium ohne FKS mit Penicillin/Streptomycin versetzt. 0,5 µL der Stammlösung des jeweiligen Inhibitors wurde in 499,5 µL RPMI-Medium ohne FKS mit Penicillin/Streptomycin gelöst, sodass die Endkonzentration von DMSO 0,1 % betrug. Die finale Konzentration der Inhibitoren im Medium betrug 10 µmol/L (SB203580, SP600125, U0126) bzw. 100 µmol/L (PDTC). Als Negativkontrolle wurde 0,1 % DMSO verwendet. Im Anschluss wurden die Lösungen auf die jeweiligen Wells der Zellkulturplatte gegeben. Nach 1 h Inkubation wurde IL-1 $\beta$  in einer Konzentration von 5 ng/mL auf die Zellen gegeben.

### **2.2.3 RNA-Interferenz**

Die Methode der RNA-Interferenz dient der selektiven Ausschaltung einzelner mRNAs in der Zellkultur. Mithilfe von spezifischer small interfering RNA (siRNA) kann auf posttranskriptioneller Ebene eine sequenzhomologe mRNA abgebaut werden, was zu einem temporären Knockdown führt [106]. In der Zelle bildet die doppelsträngige siRNA mit mehreren Proteinen einen RNA-induced silencing complex (RISC), im Anschluss wird der Doppelstrang einsträngig und kann nun komplementäre mRNA binden, was zu deren Abbau führt. Somit wird die Translation dieser mRNA unterbunden [107]. Dadurch kommt es zu einem temporären Knockdown, also einer Suppression des Zielproteins. Diese Form des Knockdowns steht somit im Gegensatz zu einem Gen-Knockout, bei dem durch Modifikation des Genoms eines Organismus das entsprechende Gen komplett ausgeschaltet wird [107].

Um einen ZNF580-Knockdown zu erreichen, wurden ausdifferenzierte Podozyten mit einer spezifischen Endoribonuclease-erstellten siRNA (esiRNA) gegen ZNF580 transfiziert (Sigma-Aldrich). Im Gegensatz zu chemisch synthetisierter siRNA, die typischerweise 21 Basenpaare lang ist, wird eine esiRNA aus einer zielgenspezifischen 300-600 Basenpaare langen doppelsträngigen RNA, die mithilfe einer Endoribonuclease (Ribonuclease III) in 18-25 Basenpaare lange Fragmente geschnitten wird, generiert. Dadurch entsteht ein heterogenes Gemisch von siRNAs, die allesamt gegen die gleiche DNA-Zielsequenz gerichtet sind [108]. Daraus resultiert ein hochspezifischer und effektiver Knockdown des Zielgens mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für Off-Target-Effekte als bei der Verwendung synthetisch hergestellter homogener siRNA [108]. Die esiRNA wurde mithilfe von Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo Scientific), welches die esiRNA in Liposomen einschließt, in die Zellen befördert [109].

24 h vor der Transfektion der Zellen mit der esiRNA wurden die ausdifferenzierten Podozyten ausgezählt und in RPMI-Medium mit FKS und Penicillin/Streptomycin auf eine 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät (150.000 Zellen pro Well). 6 h nach dem Aussäen der Zellen wurde ein Mediumwechsel zu RPMI-Medium mit FKS ohne Penicillin/Streptomycin durchgeführt, unmittelbar vor der Transfektion wurde ein erneuter Mediumwechsel zu 225 µL RPMI-Medium ohne FKS und ohne Penicillin/Streptomycin pro Well durchgeführt. 2,5 µL der esiRNA wurden in 10 µL RPMI-Medium ohne FKS und Penicillin/Streptomycin gelöst, parallel dazu wurden 1,7 µL Lipofectamine 2000 in 10,8 µL RPMI-Medium ohne FKS und Penicillin/Streptomycin gelöst. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die beiden Lösungen zusammengegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das esiRNA-Lipofectamine-Gemisch (25 µL) auf das entsprechende Well der Zellkulturplatte gegeben (finale esiRNA-Konzentration: 2 µg/mL). Als Negativkontrolle wurde eine Negativkontroll-siRNA (Sigma-Aldrich) verwendet. Nach 6 h wurde ein Mediumwechsel zu RPMI-Medium mit FKS und Penicillin/Streptomycin durchgeführt.

## **2.2.4 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)**

### **2.2.4.1 RNA-Extraktion**

Vor der Lyse der Zellen wurde der Zellmonolayer zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 400 µL RL-Puffer pro Well aus dem Universal RNA Purification Kit (EURx) auf den Zellmonolayer gegeben und die Zellen abgeschabt. Das gewonnene Zelllysate wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt.

Die Aufreinigung der in dem Zelllysate enthaltenen RNA erfolgte mit dem Universal RNA Purification Kit (EURx) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurde das Lysat zunächst durch die Membran einer Homogenisierungssäule zentrifugiert, anschließend das nun von Zelltrümmern gereinigte Filtrat mit 250 µL Ethanol versetzt und auf eine Säule mit einer RNA-bindenden Membran gegeben. Nach mehreren Zentrifugationsschritten mit verschiedenen Waschpuffern wurde die aufgereinigte, an die Membran gebundene RNA mit 25 µL RNase-freiem Wasser in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß eluiert. Die Konzentration der RNA im Eluat wurde photometrisch ermittelt.

### 2.2.4.2 Reverse Transkription

Die für die qPCR erforderliche cDNA wurde mithilfe des First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) durch die reverse Transkription der erhaltenen mRNA synthetisiert. Die cDNA-Synthese wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

Tab. 17: Reverse Transkription

Reagenz	Volumen
RNA	1 µg (x µL)
Oligo(dT) <sub>18</sub> -Primer (100 µmol/L)	1 µL
Nuklease-freies Wasser	ad 11 µL

Inkubation für 5 min bei 65 °C, anschließend Abkühlung auf Eis und Hinzugabe von:

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase-Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
dNTP-Mix (10 mmol/L)	2 µL
M-MuLV-Reverse Transkriptase	2 µL

Inkubation für 60 min bei 37 °C, anschließend Inkubation für 5 min bei 70 °C

### 2.2.4.3 qRT-PCR

Die Amplifikation der synthetisierten cDNA und relative Quantifizierung der mRNA-Konzentration erfolgte mithilfe der qRT-PCR. Es wurde ein GoTaq® qPCR Master Mix for Dye-Based Detection (Promega) verwendet, die qRT-PCR erfolgte im Rotor Gene 2000 cycler (LTF). Jede Probe wurde zweifach gemessen. Für jeden Lauf wurde eine Non-template Control (NTC) als Negativkontrolle mitgeführt, diese enthielt Nuklease-freies Wasser statt cDNA. Zusätzlich wurde eine Non-Reverse-Transcriptase Control (NRT), welche statt cDNA isolierte RNA enthielt, für jeden Lauf angesetzt, um eine DNA-Kontamination der isolierten RNA auszuschließen. Tabelle 18 zeigt die Zusammensetzung des jeweiligen Reaktionsansatzes, Tabelle 19 das Reaktionszeitprofil.

Tab. 18: PCR-Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen (10 µL)
cDNA (50 ng/µL)	1 µL

GoTaq® qPCR Master Mix for Dye-Based Detection	7 µL
Forward-Primer (10 µmol/L)	0,5 µL
Reverse-Primer (10 µmol/L)	0,5 µL
Nuklease-freies Wasser	1 µL

Tab. 19: Reaktionszeitprofil

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	300 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	
Primer-Annealing	56-66 °C	30 s	40
Elongation	72 °C	15 s	
Schmelzpunktbestimmung	55-95 °C in 1 °C-Schritten	5 s je Schritt	1

#### 2.2.4.4 Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung erfolgte mithilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode [110]. Dabei wird der  $C_T$ -Wert (cycle of threshold; PCR-Zyklus, bei dem das gemessene Fluoreszenz-Signal erstmalig die Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet) des Zielgens sowie des verwendeten Housekeeping-Gens (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)) in jeder Probe sowie der dazugehörigen unbehandelten Kontrolle ermittelt. Zunächst wird die Differenz der  $C_T$ -Werte von Zielgen und Housekeeping-Gen berechnet, im Anschluss wird die Differenz aus den jeweiligen Differenzen von Probe sowie Kontrolle gebildet und exponentiell dargestellt [110].

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{GAPDH})}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Probe})} - \Delta C_{T(\text{Kontrolle})}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{relativer Genexpressionsunterschied}$$

#### 2.2.5 Western Blot

##### 2.2.5.1 Zelllysate-Herstellung

Vor der Lyse der Zellen wurde der Zellmonolayer zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Herstellung von Zelllysaten für die Western-Blot-Untersuchung erfolgte durch Zugabe von 100 µL RIPA-Lysepuffer (Santa Cruz) pro Well auf den jeweiligen Zellmonolayer mit anschlie-

ßendem Abschaben der Zellen. Das Lysat wurde in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der proteinhaltende Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet wurde verworfen.

In einem Experiment zur Untersuchung der zytosolischen und nukleären Proteinfractionen wurden diese mithilfe des NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents-Kits (Thermo Scientific) voneinander getrennt. Dabei wurde der Zellmonolayer nicht mit RIPA-Lysepuffer lysiert, sondern nach Protokoll des Kits mittels Trypsin-EDTA-Lösung gelöst und anschließend fraktioniert.

### **2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Konzentration des Gesamtproteins in den Zelllysaten wurde photometrisch mithilfe des Coomassie Plus (Bradford) Assay Kits (Thermo Scientific) nach der Bradford-Methode ermittelt. Hierzu wurden jeweils 5 µL des Zelllysats in Triplikaten auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben, gefolgt von 250 µL der Gebrauchslösung des Kits pro Well. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Mit den Werten einer Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin wurde eine Standardkurve generiert, mit welcher im Anschluss die Konzentration des Gesamtproteins in den Proben errechnet werden konnte.

### **2.2.5.3 Aufkonzentration des Zellüberstandes**

Zur Untersuchung von sezernierten Proteinen wurde der Zellüberstand über dem Zellmonolayer mittels Western Blot untersucht. Vor der Zelllyse wurde hierbei zunächst der Zellüberstand in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der dazugehörige Zellmonolayer lysiert, die Proteinkonzentration des Zelllysats bestimmt und das untersuchte Volumen des jeweiligen Zellüberstandes mit RPMI-Medium entsprechend angepasst. Dadurch konnte eine Vergleichbarkeit der Konzentrationen verschiedener Zellüberstände in Bezug auf die jeweilige Zellzahl erreicht werden. Im Anschluss wurde der Überstand mit einer Vakuum-Zentrifuge etwa achtfach aufkonzentriert.

### **2.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

In der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt [111]. Die verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem daruntergelegenen 12 %-igen Trenngel. Äquivalente Mengen an Gesamtprotein wurden in einem Gesamtvolumen von 40 µL mit 5x Probenpuffer versehen und

für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach dem Aufbau der Gelelektrophoresekammer mit Einspannen der Polyacrylamidgele und Auffüllen der Kammer mit Elektrophoresepuffer wurden die Proben sowie ein Proteinstandard (Protein-Marker V, VWR Peqlab bzw. Precision Plus Protein Dual Standard, Bio-Rad) in die Taschen des Sammelgels gegeben und eine Spannung von 90 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Im Anschluss wurde die Spannung auf 120 V festgelegt, bis die Lauffront den Unterrand des Trenngels erreicht hatte.

#### **2.2.5.5 Elektroblothing**

Die auf dem Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Tank-Blotting auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Bio-Rad) übertragen. Hierfür wurde zunächst die PVDF-Membran kurz in Ethanol aktiviert, im Anschluss wurde die Western-Blot-Kammer wie folgt zusammengesetzt: Faservlies, Filterpapier, Polyacrylamidgel, aktivierte PVDF-Membran, Filterpapier, Faservlies. Die Kassette wurde daraufhin geschlossen und so in der mit Transferpuffer gefüllten Western-Blot-Kammer positioniert, dass die negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel in Richtung der positiv geladenen Anode auf die PVDF-Membran transferiert wurden. Der Transfer wurde bei 240 mA für 2 h durchgeführt, anschließend wurde die Membran für 3x5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen.

#### **2.2.5.6 Proteindetektion**

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Inkubationsschüttler mit einer 5 %-Magermilchpulverlösung (Magermilchpulver in PBS-Tween gelöst) inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Membran für 3x5 Minuten mit PBS-Tween wurde die Membran mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper bei 4 °C über Nacht auf dem Inkubationsschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran für 3x5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Inkubationsschüttler mit dem jeweiligen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Im Falle des HRP-gekoppelten Anti-GAPDH-Primärantikörpers wurde kein Sekundärantikörper benötigt. Nach einer weiteren Waschung für 3x5 Minuten mit PBS-Tween wurde die Membran nach dem Prinzip der Chemilumineszenz mittels eines ECL-Kits (Western Lightning® Plus-ECL, Perkin-Elmer bzw. SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) entwickelt und das Signal mit einem Chemilumineszenz-Imager (Biostep) ausgelesen. GAPDH wurde hierbei als Ladekontrolle betrachtet, die densitometrische Auswertung erfolgte mit der frei erhältlichen Software ImageJ.

## **2.2.6 Immunfluoreszenz**

### **2.2.6.1 Zellkultur**

Ausdifferenzierte Podozyten wurden ausgezählt und auf 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät (300.000 Zellen/Well). In die jeweiligen Wells wurde zuvor ein rundes Deckglas gelegt, sodass die Zellen auf dem Deckglas adhäreren konnten.

### **2.2.6.2 Fixierung und Antikörper-Inkubation**

Vor der Fixierung wurde der Zellmonolayer in dem jeweiligen Well mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µL 4 % Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem daraufhin folgenden Waschschrift mit PBS wurde die Zellschicht mit 500 µL 0,1 % Triton-X (Lösungsmittel: PBS) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurde die Zellschicht mit 500 µL 10 % FKS zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.

Im Anschluss wurde der Zellmonolayer erneut mit PBS gewaschen und der Primärantikörper (verdünnt in 10 % FKS) zur Inkubation über Nacht bei 4 °C auf das Deckglas mit den Zellen gegeben. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde der Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 594), welcher in 10 % FKS verdünnt wurde, auf den Zellmonolayer gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Zellmonolayer nach erneutem Waschen mit PBS mit DRAQ5™, einem DNA-bindenden Kernfarbstoff, für 20 Minuten bei Raumtemperatur gegengefärbt.

### **2.2.6.3 Anfertigen des Präparats**

Zunächst wurde auf einen Objektträger ein Tropfen 10 % Glycerin gegeben. Das Deckglas mit dem Zellmonolayer wurde vorsichtig aus der Zellkulturplatte genommen und mit den Zellen nach unten gerichtet luftblasenfrei auf den Objektträger aufgelegt. Zur Befestigung des Deckglases am Objektträger wurde handelsüblicher Nagellack verwendet. Bis zur Mikroskopie wurde der Objektträger bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

### **2.2.6.4 Mikroskopie**

Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte mithilfe eines für die Immunfluoreszenz geeigneten inversen Mikroskops (Leica DMI6000 B). Zur Speicherung der angefertigten Bilder wurde die Software Leica LAS AF Lite (Leica Camera, Wetzlar, D) verwendet. Um eine bessere Darstellung der Bilder zu gewährleisten, wurde mithilfe der frei verfügbaren Bildbearbeitungssoft-

ware GIMP (Version 2.8.22) die Helligkeit leicht erhöht, ohne jedoch den Kontrast, den Farbton oder die Farbsättigung zu beeinflussen.

## **2.2.7 Statistische Auswertung**

### **2.2.7.1 Deskriptive Statistik**

Die in den Diagrammen gezeigten Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel angegeben, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

### **2.2.7.2 Induktive Statistik**

Für die Bestimmung statistischer Signifikanz der Unterschiede zwischen den Stichproben wurde der Einstichproben-t-Test verwendet, p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angenommen. Es hierbei wurde stets zweiseitig getestet. Die Berechnung der statistischen Tests erfolgte mithilfe von Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA).

## **3 Ergebnisse**

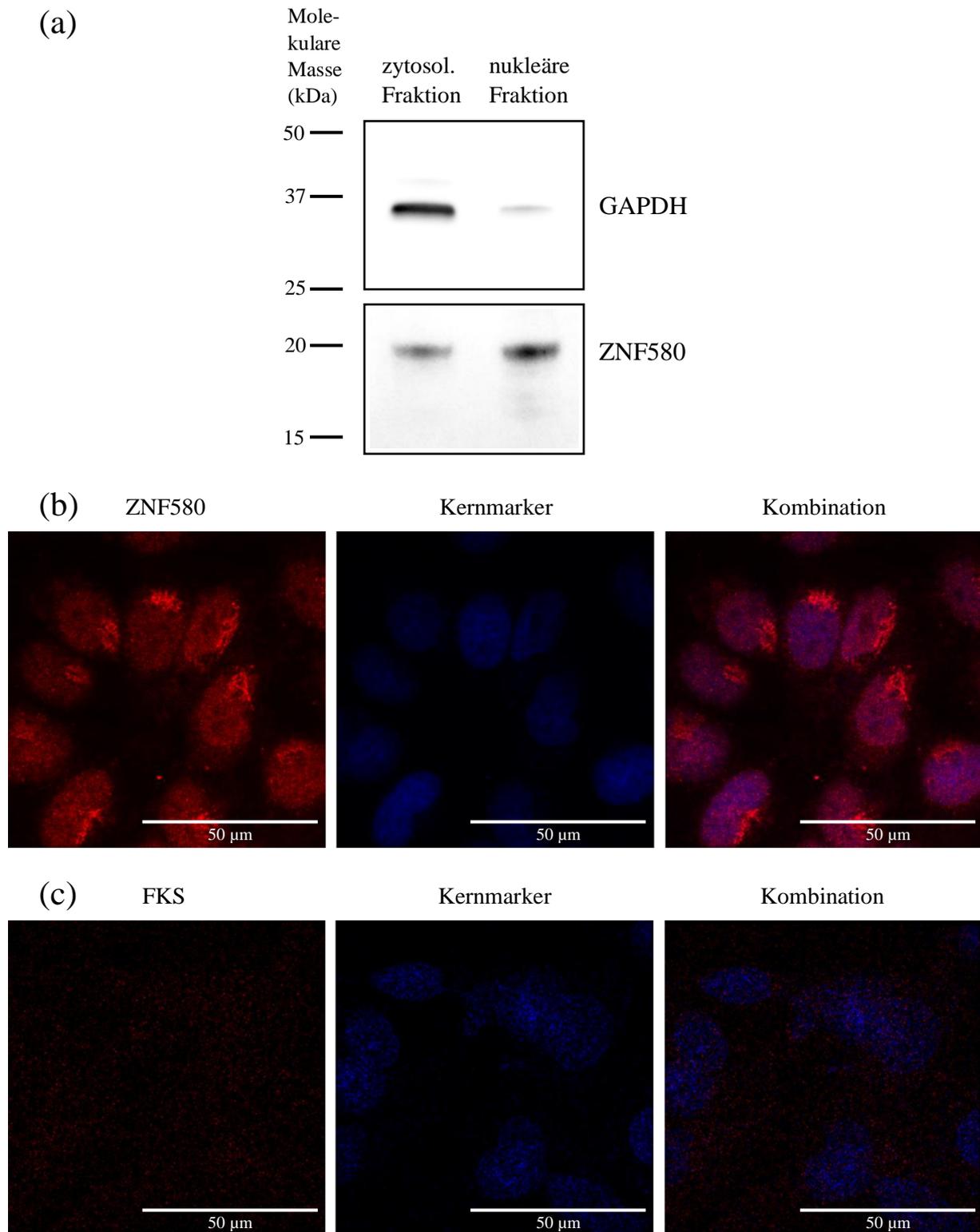
### **3.1 Lokalisation von ZNF580 in humanen Podozyten**

Um die Lokalisation von ZNF580 in humanen Podozyten zu untersuchen, wurden ausdifferenzierte Podozyten der verwendeten immortalisierten humanen Podozytenzelllinie lysiert und die Proteinfractionen des Zytosols und des Nukleus mittels eines Zellfraktionierungskits (Thermo Scientific) voneinander getrennt. Die beiden Proteinfractionen wurden im Anschluss mittels Anti-ZNF580-Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 3 (a) dargestellt, konnte ZNF580 sowohl im zytosolischen als auch im nukleären Proteinextrakt nachgewiesen werden, wobei das ZNF580-Signal in der nukleären Fraktion stärker war. Da GAPDH im Zytosol lokalisiert ist [112], wurde GAPDH in diesem Experiment nicht als Kontrolle der Beladung des Polyacrylamidgels mit äquivalenten Proteingesamtmenen verwendet, sondern als Qualitätskontrolle der Zellfraktionierung. Da nur ein sehr schwaches GAPDH-Signal in der nukleären Fraktion nachgewiesen werden konnte, wurde die Zellfraktionierung als erfolgreich betrachtet.

Die Lokalisation von ZNF580 in der verwendeten humanen Podozytenzelllinie wurde zusätzlich mittels Anti-ZNF580-Immunfluoreszenz überprüft (Abb. 3 (b)). ZNF580 war vor allem im Nukleus der Podozyten lokalisiert, ein schwächeres Signal konnte allerdings auch im Zytosol festgestellt werden.

### **3.2 Auswirkung eines ZNF580-Knockdowns auf MMP/TIMP-mRNA**

Um den Einfluss und die Bedeutung von ZNF580 auf die mRNA-Konzentrationen von MMP und TIMP in humanen Podozyten untersuchen zu können, wurde ein ZNF580-Knockdown mittels einer ZNF580-spezifischen esiRNA in ausdifferenzierten Podozyten durchgeführt. Bei Verwendung einer esiRNA (siehe Kapitel 2.2.3) ist ein Gen-Knockdown von etwa 80 % des Ziel-mRNA-Transkriptes zu erwarten [108]. Der Gen-Knockdown ist laut Hersteller bereits 24 h nach Transfektion festzustellen und dauert in der Regel fünf bis sieben Tage [113]. Um die Effizienz des ZNF580-Knockdowns zu ermitteln, wurden mit der esiRNA transfizierte ausdifferenzierte Podozyten 48 h nach der Transfektion lysiert, eine RNA-Extraktion durchgeführt sowie im Anschluss aus der mRNA mithilfe der Methode der reversen Transkription cDNA generiert. Diese wurde im Rahmen einer qRT-PCR auf das relative ZNF580-mRNA-Niveau im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht (Abb. 4). Als Kontrolle wurde hierbei eine Kontroll-siRNA

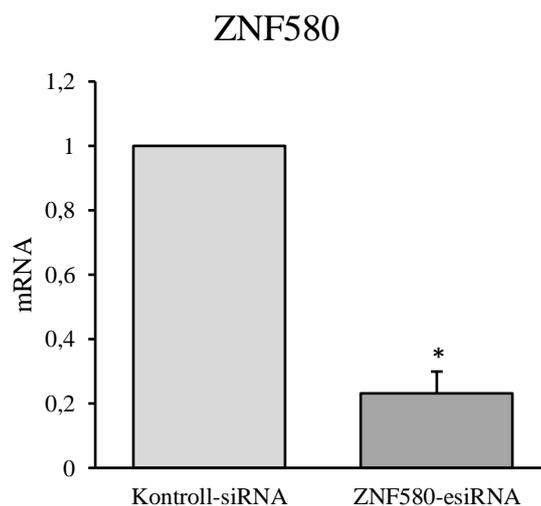


**Abb. 3: Lokalisation von ZNF580 in immortalisierter humaner Podozytenzelllinie.**

(a) Ausdifferenzierte Podozyten wurden lysiert, die zytosolischen (zytosol.) und nukleären Proteinfractionen getrennt und die zelluläre ZNF580-Lokalisation mittels Anti-ZNF580-Western Blot analysiert. Die PVDF-Membran wurde nach Proteintransfer auf Höhe von 25 kDa geschnitten. (b) Ausdifferenzierte Podozyten wurden fixiert, mit Anti-ZNF580 sowie DRAQ5™ (Kernmarker) inkubiert und die zelluläre ZNF580-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz analysiert. (c) Immunfluoreszenz-Negativkontrolle (FKS statt Anti-ZNF580). Vergrößerung 63fach.

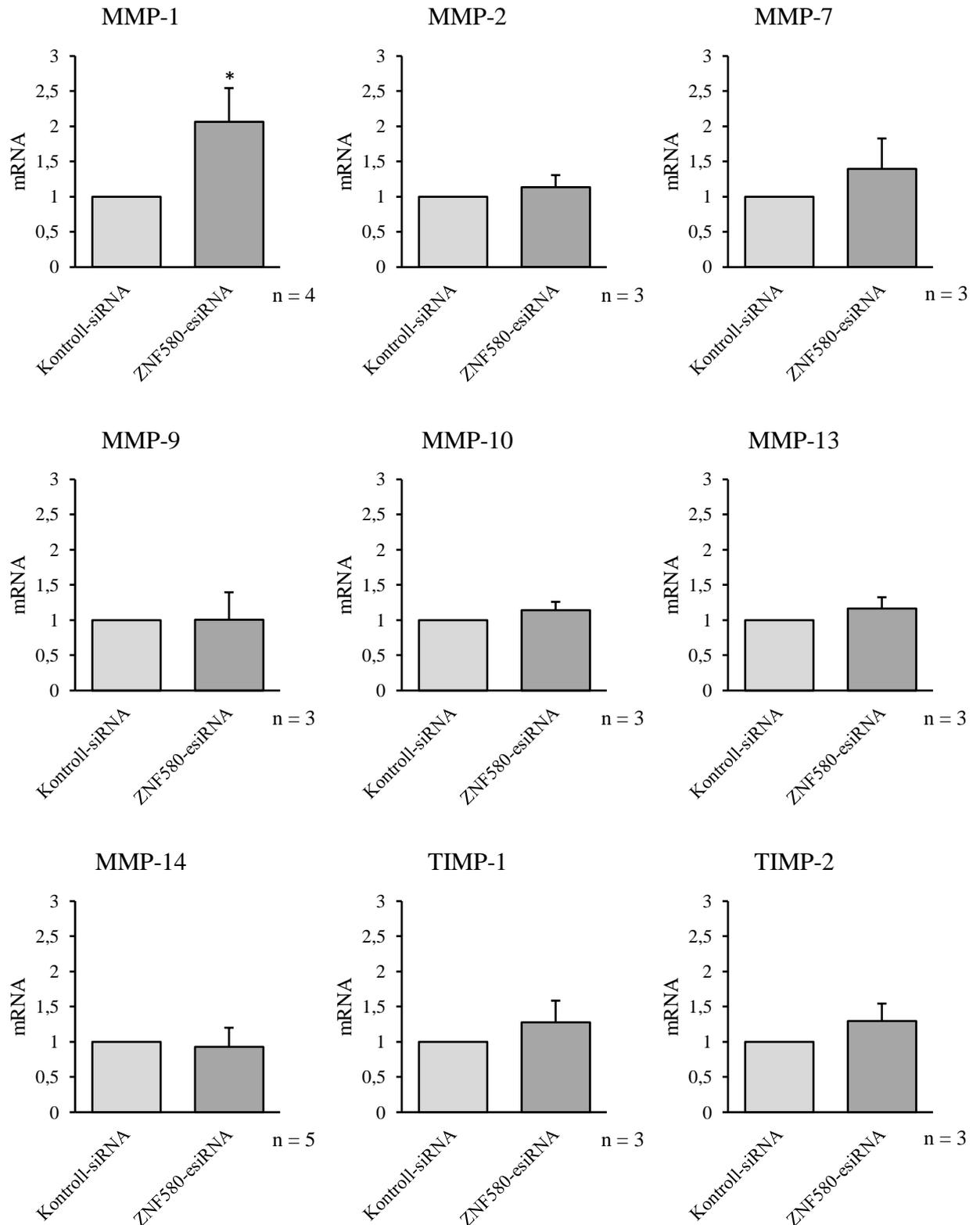
verwendet, um etwaige Effekte durch den Transfektionsprozess selbst oder die generelle Zellreaktion auf siRNA in der Messung zu eliminieren. Die Kontroll-siRNA besitzt keine Sequenzhomologie zu einer mRNA-Sequenz in humanen Zellen und bewirkt keine Immunantwort der Zelle [114]. Die ZNF580-mRNA-Konzentration war nach dem Gen-Knockdown statistisch signifikant auf das etwa 0,2-fache der ZNF580-mRNA-Konzentration der Kontrollgruppe herabgesetzt.

Die in dem beschriebenen Experiment erhaltene cDNA wurde im Anschluss auf mRNA-Konzentrationsunterschiede zwischen ZNF580-Knockdown-Podozyten und Kontroll-Podozyten für verschiedene MMP sowie TIMP mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 5). Dabei wurde darauf geachtet, dass alle in der Literatur bei Podozyten-assoziierten Pathologien erwähnten MMP sowie zumindest ein Vertreter aus jeder MMP-Klasse untersucht wurden, um ein möglichst systematisches Bild der Interaktion zwischen ZNF580 und MMP/TIMP in humanen Podozyten zu erhalten. Nach ZNF580-Knockdown war die MMP-1-mRNA-Konzentration statistisch signifikant auf das ungefähr 2,1-fache der Konzentration der Kontrollgruppe erhöht. Bei keiner anderen untersuchten MMP/TIMP konnte ein statistisch signifikanter mRNA-Konzentrationsunterschied zwischen den ZNF580-Knockdown-Podozyten sowie den Kontroll-Podozyten gefunden werden.



**Abb. 4: Suppression von ZNF580-mRNA durch spezifische esiRNA.**

Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit esiRNA gegen ZNF580 (2 µg/ml) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die relative ZNF580-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR analysiert. Mittelwert ± Standardabweichung, n = 4, \*: p ≤ 0,05.



**Abb. 5: Auswirkung des ZNF580-Knockdowns auf MMP/TIMP-mRNA.**

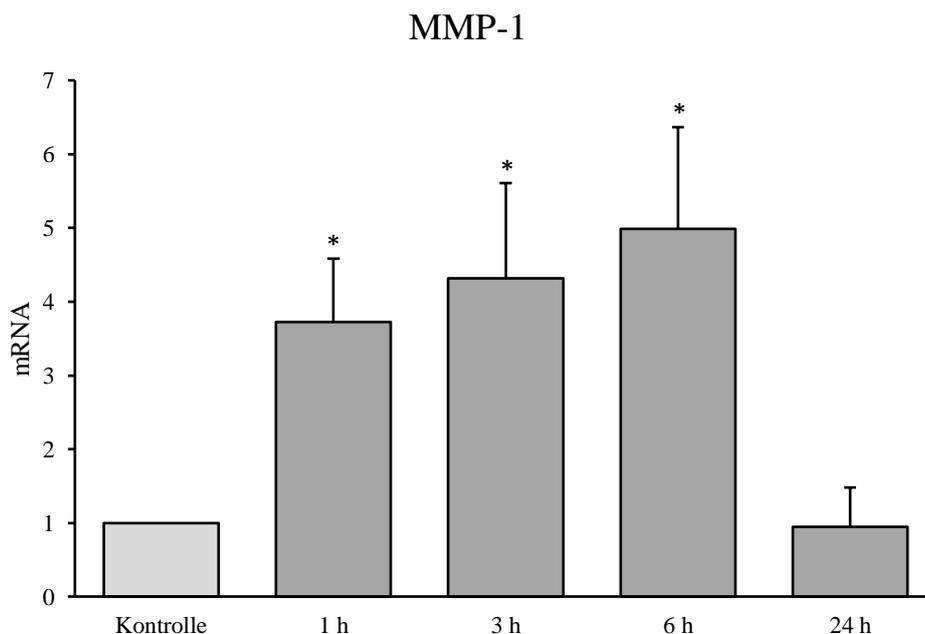
Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit esiRNA gegen ZNF580 (2 µg/ml) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die relative mRNA-Konzentration des jeweiligen Gens mittels qRT-PCR analysiert. Mittelwert ± Standardabweichung, \*:  $p \leq 0,05$ .

### 3.3 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression von MMP-1, ZNF580 und TIMP-1

#### 3.3.1 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die MMP-1-Expression

Um den Einfluss von ZNF580 auf MMP-1 genauer zu charakterisieren, wurde ein Stimulus der MMP-1-Expression verwendet. IL-1 $\beta$  führt in verschiedenen Zelllinien, beispielsweise in Fibroblasten oder Chondrozyten, zu einer Induktion der MMP-1-Expression [115–117]. Dieser Effekt wurde allerdings noch nicht in humanen Podozyten bestätigt. Es wurde eine IL-1 $\beta$ -Konzentration verwendet, die für Podozyten in der Literatur genutzt wurde [118].

In Abbildung 6 ist die relative MMP-1-mRNA-Konzentration nach Stimulation ausdifferenzierter humaner Podozyten mit IL-1 $\beta$  zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Nach der Behandlung der Zellen mit 5 ng/ml IL-1 $\beta$  war bereits nach 1 h die MMP-1-mRNA-Konzentration statistisch signifikant auf das etwa 3,7-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Nach 3 h bzw. 6 h war dieser Effekt etwas stärker ausgeprägt (jeweils signifikant auf das ungefähr 4,3-fache bzw. das 5,0-fache der Kontrollgruppe), die Unterschiede zwischen dem 1 h-, 3 h- bzw. 6 h-Zeitwert waren allerdings nicht statistisch signifikant. Nach 24 h andauernder Behandlung der Podozyten mit IL-1 $\beta$  konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr festgestellt werden.

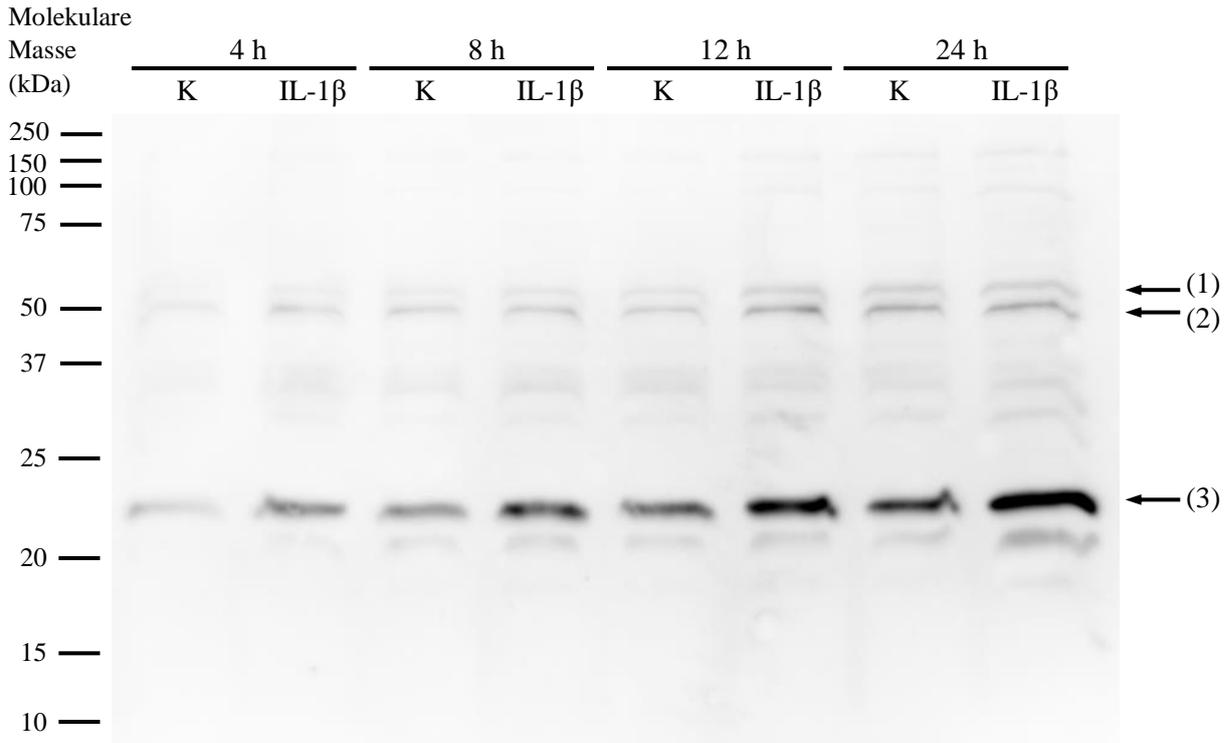


**Abb. 6: Erhöhung der MMP-1-mRNA-Konzentration durch Inkubation mit IL-1 $\beta$  im Zeitgang über 24 h.**

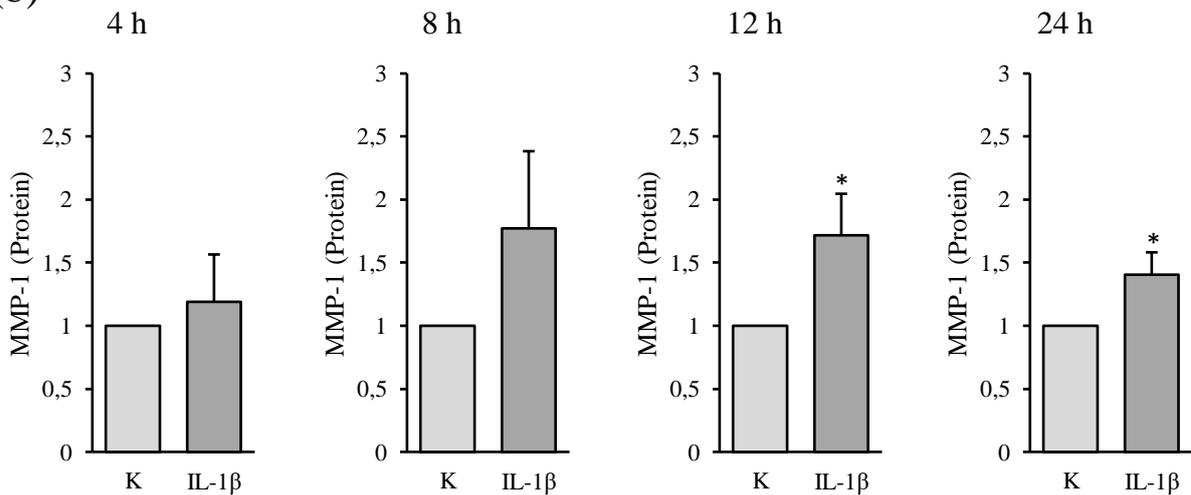
Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) inkubiert (Kontrolle: PBS). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellen lysiert und die relative MMP-1-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR analysiert. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3, \*: p  $\leq$  0,05.

Um den Effekt von IL-1 $\beta$  auf die von humanen Podozyten in den extrazellulären Raum sezernierte MMP-1 zu ermitteln, wurde der Zellkulturüberstand von mit IL-1 $\beta$  stimulierten Podozyten sowie Kontroll-Podozyten zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und mittels Anti-MMP-1-Western Blot analysiert. Da Proteine im Zellkulturüberstand im Gegensatz zu intrazellulären Proteinen nicht wesentlich abgebaut werden und somit über die Zeit sowohl in dem Zellüberstand der stimulierten als auch der Kontroll-Podozyten kumulativ anfallen, wurde für jeden Zeitwert eine eigene Kontrollgruppe mitgeführt. In der Literatur wird kein Protein beschrieben, welches nach Stimulation von Podozyten mit IL-1 $\beta$  stets unverändert sezerniert wird. Daher wurden als Ersatz eines Referenzproteins die auf das Polyacrylamidgel aufgetragenen Zellkulturüberstandsvolumina an die jeweilige Proteinkonzentration des dazugehörigen Zelllysats angepasst. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 7 gezeigt. In (a) ist ein repräsentativer Western Blot abgebildet, in jeder Probe sind drei spezifische Signale zu erkennen. Das liegt daran, dass zwei verschiedene Proenzyme der MMP-1 sezerniert werden: Das klassische Proenzym ist 52 kDa groß (in Abbildung 7 (a) als (2) gekennzeichnet), die glykosylierte Form hat eine molekulare Masse von 57 kDa (in Abbildung 7 (a) als (1) gekennzeichnet) [119]. Zusätzlich wird MMP-1 autolytisch abgebaut, es resultiert ein Fragment mit einer molekularen Masse von 22 kDa (in Abbildung 7 (a) als (3) gekennzeichnet) [120]. Es ist zu erkennen, dass diese drei Signale in jeder Probe in etwa im gleichen Verhältnis zueinander standen: So waren alle drei Signale in den 24 h-Gruppen augenscheinlich stärker als in den 4 h-Gruppen. Weiterhin ist bereits optisch wahrnehmbar, dass das MMP-1-Signal in den Kontrollgruppen mit jedem Zeitwert anstieg und dass in den IL-1 $\beta$ -stimulierten Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ein stärkeres Signal erkennbar war. Um den Unterschied zwischen den jeweiligen IL-1 $\beta$ -stimulierten Podozyten und Kontrollgruppen relativ zu quantifizieren, wurde eine densitometrische Auswertung der Summe der Signale (1) und (2) in den Western Blots durchgeführt. Nicht einbezogen in die Auswertung wurde (3), da die Kinetik der Autolyse von MMP-1 unbekannt war und somit eine äquivalente Akkumulation von (3) im Vergleich zu (1) und (2) nicht vorausgesetzt werden konnte. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 7 (b) dargestellt, es wurde für jeden Zeitwert ein eigenes Diagramm erstellt. Zu allen vier Zeitwerten lag der Mittelwert der relativen MMP-1-Proteinmenge im Zellüberstand der IL-1 $\beta$ -stimulierten Podozyten über dem Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe. Eine statistische Signifikanz zwischen stimulierten Zellen und der jeweiligen Kontrolle konnte allerdings nur nach 12 h (die MMP-1-Proteinmenge im Überstand lag hier etwa bei dem 1,7-fachen der Kontrolle) sowie nach 24 h IL-1 $\beta$ -Stimulation (die MMP-1-Proteinmenge im Überstand lag hier etwa bei dem 1,4-fachen der Kontrolle) nachgewiesen werden.

(a)



(b)



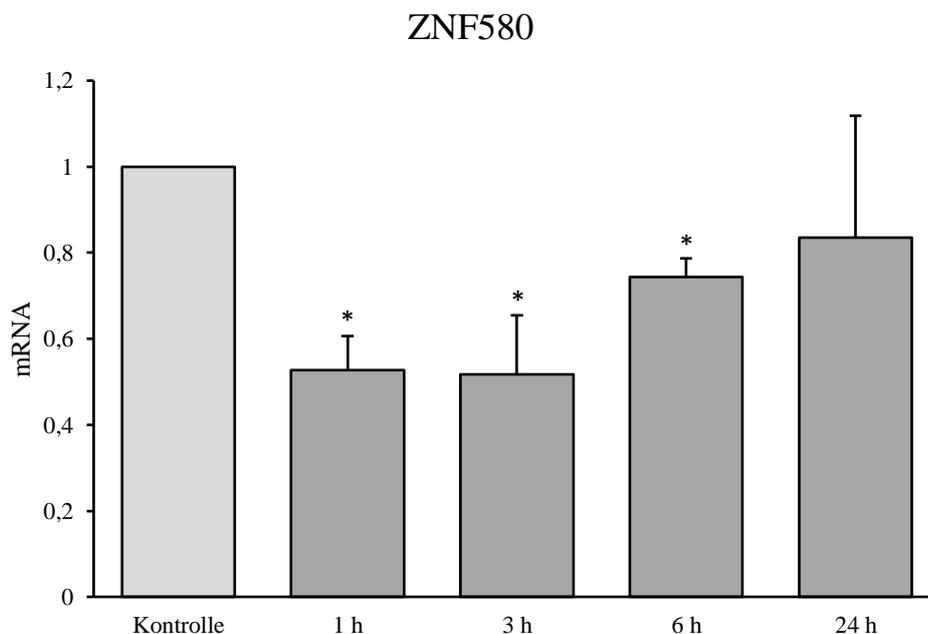
**Abb. 7: Erhöhung von MMP-1 (Protein) im Zellkulturüberstand durch Inkubation mit IL-1 $\beta$  im Zeitgang über 24 h.**

Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, mit einer Vakuumzentrifuge konzentriert und mittels Anti-MMP-1-Western Blot analysiert. (a) Exemplarischer Western Blot, (1) Pro-MMP-1, glykosylierte Form. (2) Pro-MMP-1, nicht-glykosylierte Form. (3) autolytisches Spaltprodukt von Pro-MMP-1. (b) Densitometrische Auswertung der Anti-MMP-1-Western Blots. In die Auswertung einbezogen wurden die Signale (1) und (2).

K: Kontrolle (PBS statt IL-1 $\beta$ ). Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 4, \*: p  $\leq$  0,05.

### 3.3.2 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die ZNF580-Expression

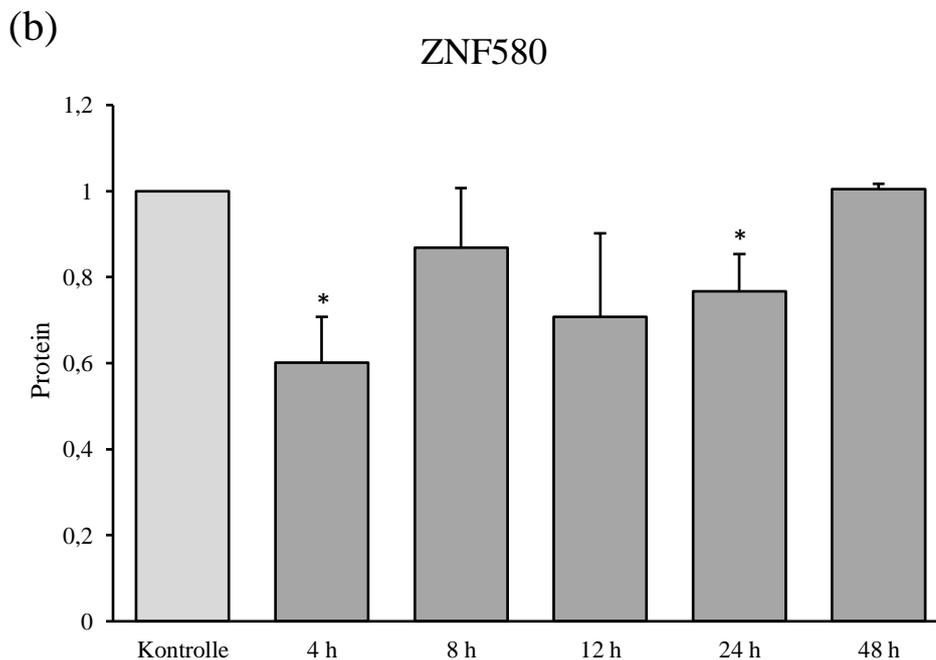
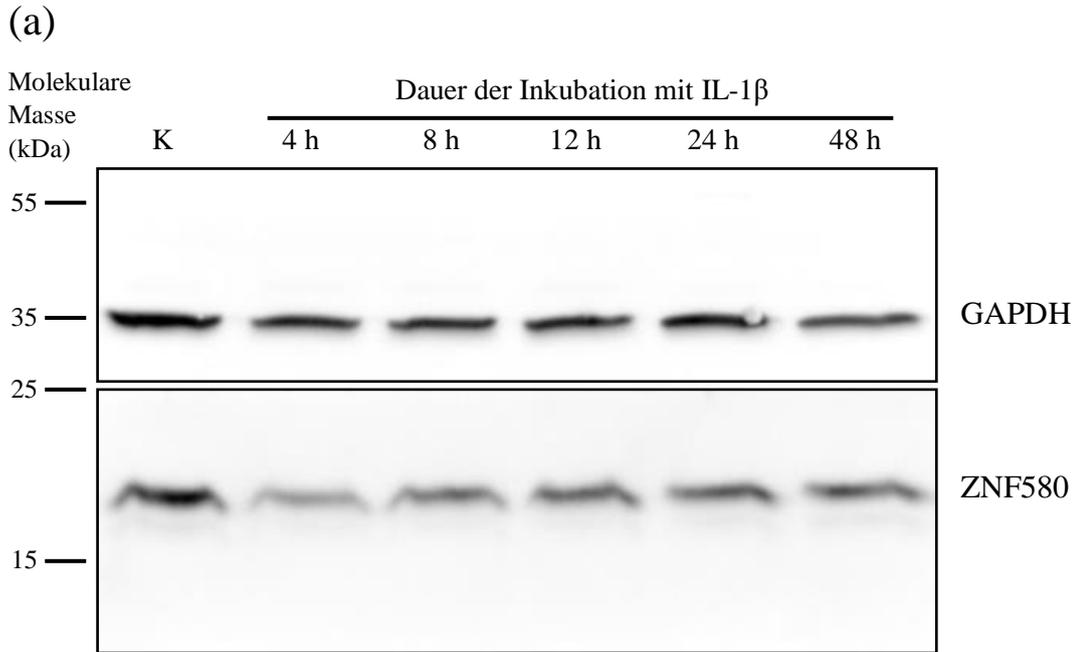
Um den Effekt von IL-1 $\beta$  auf ZNF580 darzustellen, wurden die für Abbildung 6 verwendeten cDNA-Proben mittels qRT-PCR auf die relative ZNF580-mRNA-Konzentration hin untersucht (Abb. 8). Bereits nach 1 h IL-1 $\beta$ -Stimulation der Podozyten kam es zu einer statistisch signifikanten Verringerung der relativen ZNF580-mRNA-Konzentration. Nach 3 h IL-1 $\beta$ -Stimulation war das ZNF580-mRNA-Niveau wie nach 1 h signifikant auf das etwa 0,5-fache der Kontrolle abgefallen. Nach 6 h war ebenfalls eine signifikante Reduktion der ZNF580-mRNA-Konzentration messbar, allerdings lag diese Reduktion bei dem ungefähr 0,7-fachen des Ausgangsniveaus. Nach 24 h IL-1 $\beta$ -Stimulation der Podozyten war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen stimulierten Zellen und Kontroll-Zellen mehr messbar.



**Abb. 8: Verringerung der ZNF580-mRNA-Konzentration durch Inkubation mit IL-1 $\beta$  im Zeitgang über 24 h.**

Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) inkubiert (Kontrolle: PBS). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellen lysiert und die relative ZNF580-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR analysiert. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3, \*: p  $\leq$  0,05.

Um den gemessenen Effekt von IL-1 $\beta$  auf die ZNF580-mRNA-Konzentration auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden IL-1 $\beta$ -stimulierte ausdifferenzierte Podozyten zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert und mittels Anti-ZNF580-Western Blot analysiert. Da im Gegensatz zu MMP-1 intrazelluläres Protein nachgewiesen werden sollte, wurde nicht wie bei MMP-1 der Zellüberstand, sondern das Zelllysate untersucht. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 9 dargestellt. In (a) ist ein Ausschnitt eines exemplarischen Western Blots abgebildet, der repräsentativ für alle im Rahmen dieses Experiments durchgeführten Versuche ist. Das ZNF580-Signal des 4 h-Zeitwerts war deutlich geringer als das Signal der Kontrolle, anschließend wurde es in den folgenden Zeitwerten allerdings wieder stärker. Um diese Beobachtung relativ quantifizieren und statistisch auswerten zu können, wurde eine densitometrische Auswertung durchgeführt. Hierbei wurde für jeden Zeitwert die ermittelte Stärke des ZNF580-Signals durch die Stärke des Referenzgen-Signals (GAPDH) dividiert. Das Ergebnis der densitometrischen Auswertung ist in Abbildung 9 (b) gezeigt. Die Mittelwerte der jeweiligen ZNF580-Proteinkonzentrationen nach IL-1 $\beta$ -Stimulation lagen bei allen Zeitwerten außer dem 48 h-Zeitwert unter dem Mittelwert der Kontrollgruppe, allerdings waren diese Beobachtungen nur im Falle des 4 h-Wertes (die ZNF580-Proteinkonzentration lag hier etwa bei dem 0,6-fachen der Kontrolle) und des 24 h-Wertes (die ZNF580-Proteinkonzentration lag hier ungefähr bei dem 0,8-fachen der Kontrolle) auch statistisch signifikant. Nach 48 h fortwährender IL-1 $\beta$ -Stimulation der Podozyten war kein Unterschied zur Kontrolle mehr feststellbar.



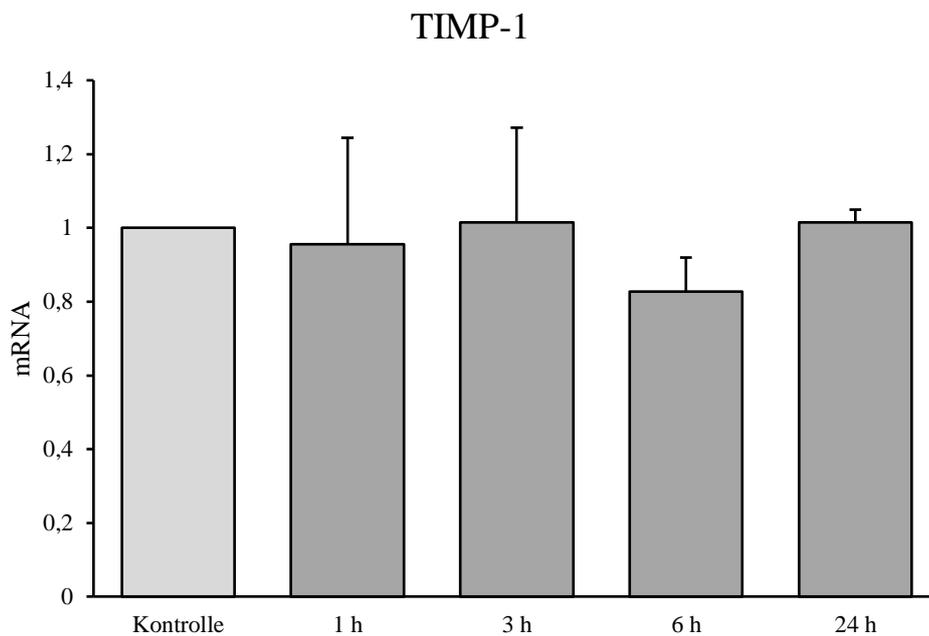
**Abb. 9: Verringerung von ZNF580 (Protein) nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  im Zeitgang über 48 h.**

Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellen lysiert und mittels Anti-ZNF580- sowie Anti-GAPDH-Western Blot analysiert. (a) Exemplarischer Western Blot (Ausschnitt). Die PVDF-Membran wurde nach Proteintransfer auf Höhe von 25 kDa geschnitten. (b) Densitometrische Auswertung der Anti-ZNF580-Western Blots. Die Stärke des ZNF580-Signals wurde jeweils mit der Stärke des Signals des Referenzgens (GAPDH) verrechnet.

K: Kontrolle (PBS statt IL-1 $\beta$ ). Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3, \*: p  $\leq$  0,05.

### 3.3.3 Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die TIMP-1-mRNA-Konzentration

TIMP-1 ist ein wichtiger endogener Inhibitor von MMP-1 in der extrazellulären Matrix [121]. Um den Effekt von IL-1 $\beta$  auf die relative TIMP-1-mRNA-Konzentration zu untersuchen, wurden die cDNA-Proben aus dem in Abbildung 6 beschriebenen Experiment für qRT-PCR mit TIMP-1-spezifischen Primern verwendet (Abb. 10). Zu keinem Zeitpunkt der Zeitreihe bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen IL-1 $\beta$ -stimulierten- und Kontroll-Podozyten im Hinblick auf die TIMP-1-mRNA-Konzentration.



**Abb. 10: TIMP-1-mRNA nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  im Zeitgang über 24 h.**

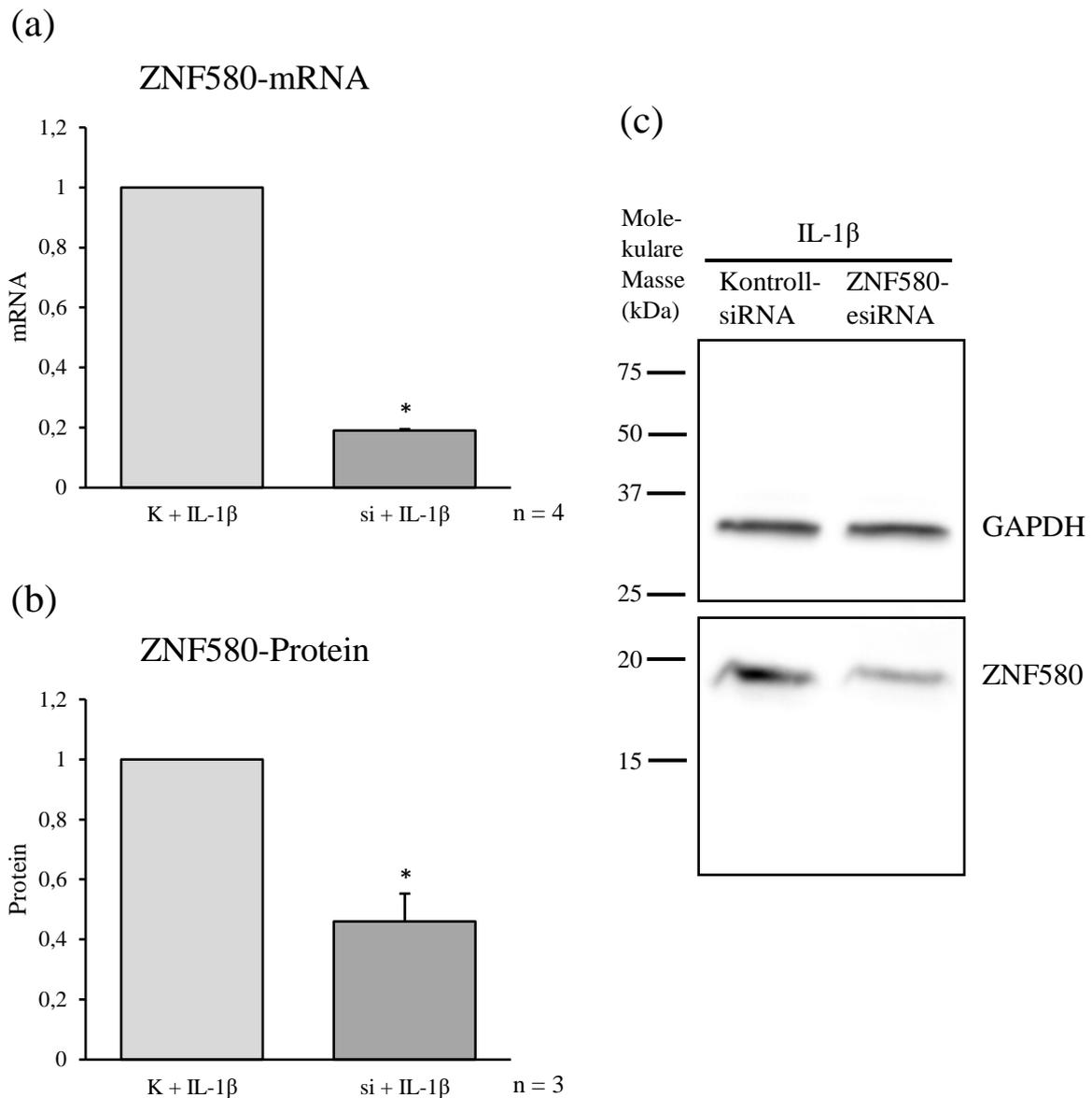
Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) inkubiert (Kontrolle: PBS). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellen lysiert und die relative TIMP-1-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR analysiert. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3, \*: p  $\leq$  0,05.

### **3.4 Expression von MMP-1 und ZNF580 nach ZNF580-Knockdown und IL-1 $\beta$ -Stimulation**

Um zu prüfen, ob die gemessenen und in Kapitel 3.2 beschriebenen Effekte des ZNF580-Knockdowns auf ZNF580 und MMP-1 auch in IL-1 $\beta$ -stimulierten Podozyten zu beobachten sind, wurden ausdifferenzierte Podozyten mit spezifischer ZNF580-esiRNA transfiziert und im Anschluss mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Auch die Kontroll-Podozyten, welche mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, wurden mit IL-1 $\beta$  stimuliert.

Die Ergebnisse dieses Experiments in Bezug auf ZNF580 sind in Abbildung 11 dargestellt. Die mRNA-Konzentration von ZNF580 war in für 3 h mit IL-1 $\beta$ -stimulierten Podozyten nach einem ZNF580-Knockdown statistisch signifikant ungefähr auf das 0,2-fache der Kontroll-Podozyten herabgesetzt (a). Auch auf Proteinebene bewirkte der ZNF580-Knockdown nach IL-1 $\beta$ -Stimulation eine signifikante Verringerung der ZNF580-Konzentration. In (c) ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Anti-ZNF580-Western Blots dieses Experiments gezeigt, die optisch erkennbare Verringerung des ZNF580-Signals wurde wie in (b) dargestellt densitometrisch ausgewertet.

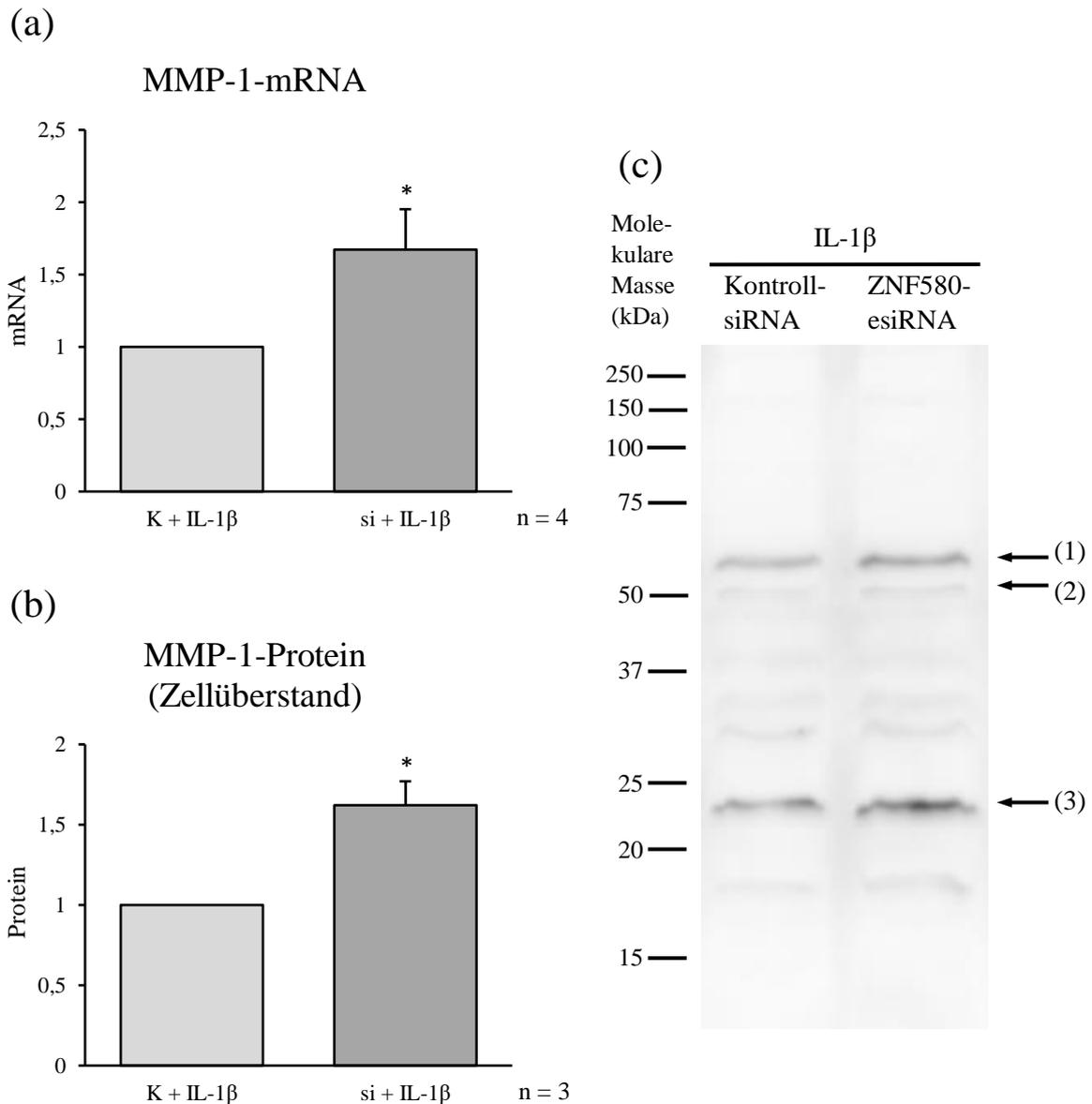
Die Veränderung der MMP-1-Expression der wie beschrieben behandelten Podozyten ist in Abbildung 12 gezeigt. Die MMP-1-mRNA-Konzentration in den ZNF580-Knockdown-Podozyten war statistisch signifikant auf das etwa 1,7-fache der Kontroll-Podozyten erhöht (a). Um den Effekt des Experiments auf die von den Zellen in den extrazellulären Raum sezernierte MMP-1 zu untersuchen, wurde im Gegensatz zu ZNF580 nicht Zelllysate, sondern der Zellüberstand mittels Anti-MMP-1-Western Blot untersucht. Ein exemplarischer Western Blot ist in (c) dargestellt. Als Ersatz eines Referenzproteins wurden (wie im in Abb. 7 dargestellten Experiment) die auf das Polyacrylamidgel aufgetragenen Zellkulturüberstandsvolumina an die jeweilige Proteinkonzentration des dazugehörigen Zelllysats angepasst. Die MMP-1-Proteinmenge im Zellüberstand der ZNF580-Knockdown-Podozyten war statistisch signifikant auf das ungefähr 1,6-fache der Kontroll-Podozyten erhöht (b). In die densitometrische Auswertung wurden die Signale (1) und (2) einbezogen, nicht aber (3), da einerseits die Kinetik der Autolyse von MMP-1 unbekannt war und andererseits für die Interpretation der Ergebnisse ausschließlich Veränderungen der Sekretion funktionell intakter MMP-1 von Interesse waren.



**Abb. 11: ZNF580-Knockdown unter IL-1 $\beta$ -Inkubation.**

Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit esiRNA gegen ZNF580 (2  $\mu$ g/ml) transfiziert. **(a)** Relative ZNF580-mRNA-Konzentration. 24 h nach Transfektion wurden alle Zellgruppen für 3 h mit IL-1 $\beta$  inkubiert (5 ng/ml), im Anschluss lysiert und die relative ZNF580-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR analysiert. n = 4. **(b)** Relative ZNF580-Proteinkonzentration. 24 h nach Transfektion wurden alle Zellgruppen für 24 h mit IL-1 $\beta$  inkubiert (5 ng/ml), im Anschluss lysiert und mittels Anti-ZNF580- sowie Anti-GAPDH-Western Blot analysiert. Gezeigt wird die densitometrische Auswertung der Anti-ZNF580-Western Blots. Die Stärke des ZNF580-Signals wurde jeweils mit der Stärke des Signals des Referenzgens (GAPDH) verrechnet. n = 3. **(c)** Exemplarischer Western Blot (Ausschnitt). Die PVDF-Membran wurde nach Proteintransfer auf Höhe von 25 kDa geschnitten.

K: Kontroll-siRNA, si: ZNF580-esiRNA. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*:  $p \leq 0,05$ .



**Abb. 12: Erhöhung von MMP-1 nach ZNF580-Knockdown unter IL-1 $\beta$ -Inkubation.**

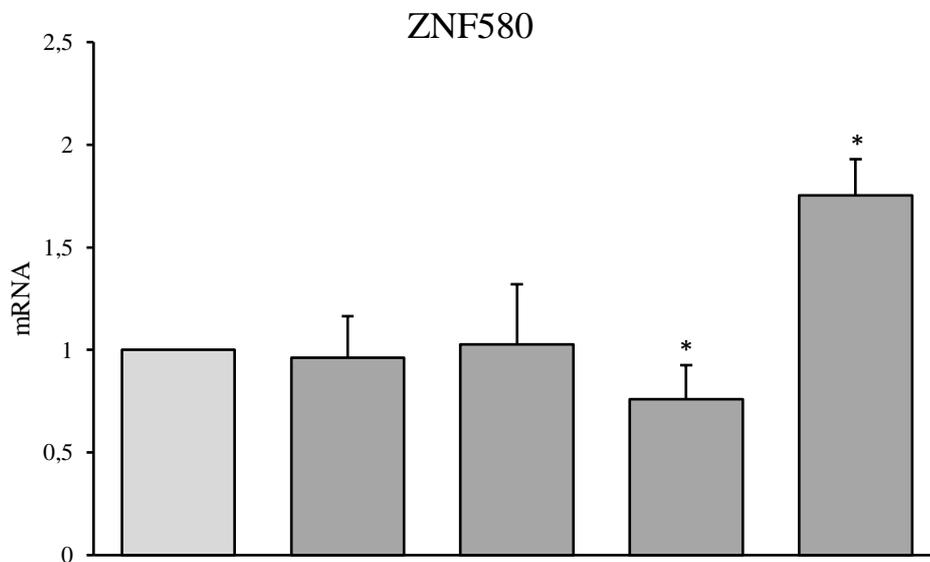
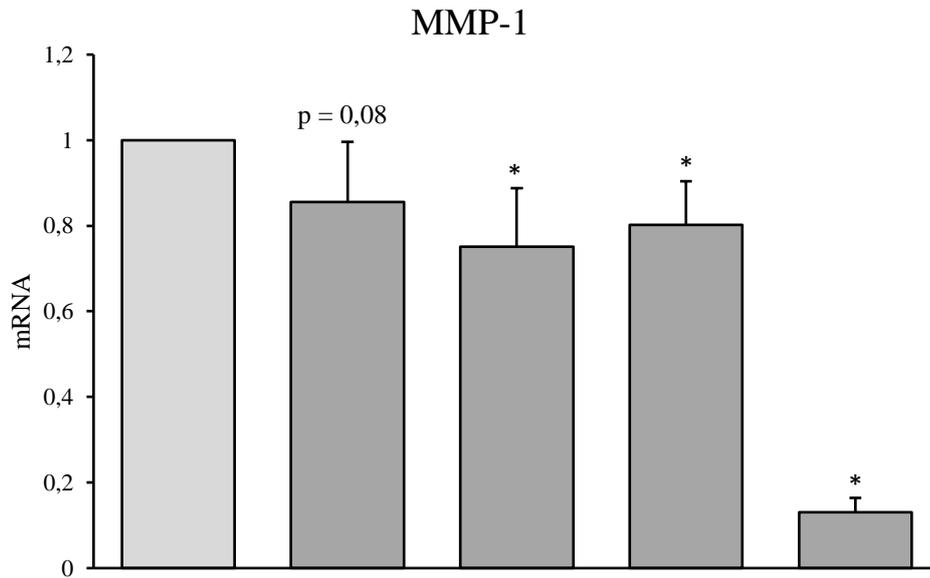
Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit esiRNA gegen ZNF580 (2  $\mu$ g/ml) transfiziert. (a) Relative MMP-1-mRNA-Konzentration. 24 h nach Transfektion wurden alle Zellgruppen für 3 h mit IL-1 $\beta$  inkubiert (5 ng/ml), im Anschluss lysiert und die relative MMP-1-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR analysiert. n = 4. (b) Relative MMP-1-Proteinmenge im Zellkulturüberstand. 24 h nach Transfektion wurden alle Zellgruppen für 24 h mit IL-1 $\beta$  inkubiert (5 ng/ml), im Anschluss wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, mit einer Vakuumzentrifuge konzentriert und mittels Anti-MMP-1-Western Blot analysiert. Gezeigt wird die densitometrische Auswertung der Anti-MMP-1-Western Blots. n = 3. (c) Exemplarischer Western Blot. (1) Pro-MMP-1, glykosylierte Form. (2) Pro-MMP-1, nicht-glykosylierte Form. (3) autolytisches Spaltprodukt von Pro-MMP-1. In die densitometrische Auswertung einbezogen wurden die Signale (1) und (2).

K: Kontroll-siRNA, si: ZNF580-esiRNA. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*:  $p \leq 0,05$ .

### **3.5 Beteiligung von MAPK an der erhöhten MMP-1-Expression durch IL-1 $\beta$ -Stimulation**

Um an der Erhöhung der MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation beteiligte Signaltransduktionskaskaden zu identifizieren, wurden ausdifferenzierte Podozyten zunächst für 1 h mit verschiedenen spezifischen MAPK-Inhibitoren inkubiert und im Anschluss für 3 h mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Um den Erfolg der IL-1 $\beta$ -Stimulation beurteilen zu können, wurde neben der regulären Kontrollgruppe, welche mit IL-1 $\beta$ , aber nicht mit MAPK-Inhibitoren inkubiert wurde (erste Säule in Abb. 13), eine zweite Kontrollgruppe ohne MAPK-Inhibitor und ohne IL-1 $\beta$  mitgeführt (fünfte Säule in Abb. 13). Abb. 13 zeigt die Ergebnisse dieses Experiments in Bezug auf die relative MMP-1- und ZNF580-mRNA-Konzentration. Die MMP-1-mRNA-Konzentration war in allen mit IL-1 $\beta$  stimulierten Gruppen höher als in der Kontrollgruppe ohne IL-1 $\beta$ . Die Inkubation der Podozyten mit SP600125 (einem spezifischen JNK-Inhibitor) beziehungsweise U0126 (einem spezifischen Inhibitor von MEK1/2, welcher zu einer verringerten Aktivität von ERK führt) bewirkte einen signifikant geringeren Anstieg der MMP-1-mRNA-Konzentration nach IL-1 $\beta$ -Stimulation als bei der dazugehörigen Kontrollgruppe. Bei Inkubation mit SB203580 (einem spezifischen p38-MAPK-Inhibitor) war dieser Effekt ebenfalls erkennbar, allerdings lag hier keine statistische Signifikanz vor ( $p = 0,08$ ).

Neben MMP-1 wurde auch die relative Veränderung der ZNF580-mRNA-Konzentration der Proben des Experiments untersucht. Podozyten wiesen nach IL-1 $\beta$ -Stimulation eine signifikant verminderte ZNF580-mRNA-Konzentration auf. In den mit SB203580 sowie SP600125 inkubierten Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (nur IL-1 $\beta$ -Stimulation) festgestellt werden, während die Inkubation mit U0126 eine geringfügige, aber statistisch signifikante Verringerung der ZNF580-mRNA-Konzentration bewirkte.



<b>IL-1<math>\beta</math></b>	+	+	+	+	-
<b>p38 SB203580</b>	-	+	-	-	-
<b>JNK SP600125</b>	-	-	+	-	-
<b>ERK U0126</b>	-	-	-	+	-

**Abb. 13: MMP-1- und ZNF580-mRNA unter IL-1 $\beta$ -Inkubation und spezifischer Inhibition von verschiedenen MAPK.**

Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) für 3 h inkubiert (Kontrolle: PBS). 1 h vor der IL-1 $\beta$ -Inkubation wurde dem Zellkulturmedium SB203580 (p38-Inhibitor), SP600125 (JNK-Inhibitor) bzw. U0126 (ERK-Inhibitor) hinzugefügt (Kontrolle: DMSO). Nach Zellyse wurde die relative MMP-1- bzw. ZNF580-mRNA-Konzentration mittels qRT-PCR analysiert.

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 5, \*: p  $\leq$  0,05.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Hauptergebnisse und Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von ZNF580 auf die Expression von MMP in einer immortalisierten humanen Podozytenzelllinie untersucht. ZNF580 konnte im Zellkern von Podozyten lokalisiert werden, ZNF580-Knockdown führte zur Induktion der MMP-1-Expression. Nach Stimulation von Podozyten mit IL-1 $\beta$  wurde eine Induktion der MMP-1- sowie eine Suppression der ZNF580-Expression beobachtet. Die IL-1 $\beta$ -abhängige MMP-1-Induktion wird anscheinend durch die Suppression von ZNF580 verstärkt. Da die überschießende MMP-1-Sekretion von Podozyten im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen vermutlich über die Beeinträchtigung der Integrität der GBM zu Proteinurie führt, sollte ZNF580 als ein potenziell protektiver Faktor in der Pathophysiologie der Proteinurie berücksichtigt werden.

### **4.2 Diskussion der Hauptergebnisse**

#### **4.2.1 ZNF580 ist im Zellkern humaner Podozyten lokalisiert**

ZNF580 konnte mittels Immunfluoreszenz und Anti-ZNF580-Western Blot nach Trennung der zytosolischen und nukleären Proteinfractionen vor allem im Zellkern der humanen Podozytenzelllinie lokalisiert werden. Eine Kontamination der nukleären Fraktion mit zytosolischem Protein nach der Zellfraktionierung wurde durch ein kaum detektierbares GAPDH-Signal (zytosolisches Protein [112]) in der nukleären im Vergleich zur zytosolischen Fraktion ausgeschlossen (Abb. 3 (a)). Ein geringes ZNF580-Signal wurde allerdings auch im Zytosol der Podozyten nachgewiesen. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die Proteinbiosynthese im Zytosol stattfindet und sich somit auch von Proteinen des Zellkerns stets eine geringe Menge an neu synthetisiertem Protein im Zytosol befindet. Es ist jedoch auch denkbar, dass das schwache ZNF580-Signal im Zytosol durch unspezifische Bindungen des Antikörpers an Proteine des Zytosols hervorgerufen wird. Proteine der ZNF580-ähnlichen Sp/KLF-Zinkfingerprotein-Familie, welche als Transkriptionsfaktoren fungieren, befinden sich in der Regel hauptsächlich im Zellkern [122]. Die Lokalisation von ZNF580 im Zellkern der Podozyten stützt die Hypothese, dass ZNF580 in Podozyten als Transkriptionsfaktor agiert.

Diese Beobachtungen decken sich mit vorherigen Untersuchungen sowohl aus unserer Arbeitsgruppe als auch aus der Literatur. Hoffmann et al. konnten in ihren Experimenten die Lokalisati-

on von ZNF580 im Zellkern von HUVEC (primären Endothelzellen) nachweisen [95]. Luo et al. zeigten in zwei unterschiedlichen Publikationen jeweils die Lokalisation von ZNF580 im Zellkern der verwendeten EA.hy926-Zellen, einer endothelialen Zelllinie [91, 93]. Das Projekt „Human Protein Atlas“ (HPA) konnte die Lokalisation von ZNF580 im Zellkern von HEK293-Zellen, humanen Glioblastomzellen sowie humanen Osteosarkomzellen nachweisen [123]. Während Leppert et al. bereits die Expression von ZNF580 in humanen Podozyten zeigen konnten [99], wurde in dieser Arbeit erstmalig die Lokalisation von ZNF580 im Zellkern humaner Podozyten nachgewiesen. Daher erscheint die Hypothese, dass ZNF580 in Podozyten als Transkriptionsfaktor agiert, durchaus plausibel.

#### **4.2.2 ZNF580-Knockdown bewirkt eine MMP-1-Induktion in Podozyten**

Die Effizienz des ZNF580-Knockdowns in der humanen Podozytenzelllinie wurde in dieser Arbeit sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht (Abbildungen 4 und 11). Bei Verwendung einer esiRNA ist ein Gen-Knockdown auf mRNA-Ebene auf etwa 20 % der mRNA-Ausgangsmenge zu erwarten [108]. Es entsprach daher der Erwartung, dass die ZNF580-mRNA-Konzentration nach ZNF580-Knockdown auf das etwa 0,2-fache der ZNF580-mRNA-Konzentration der Kontrollgruppe reduziert war. Auf Proteinebene war nach ZNF580-Knockdown eine Verringerung der ZNF580-Konzentration auf das ungefähr 0,4-fache der Kontrollgruppe erkennbar. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der in dieser Arbeit durchgeführte ZNF580-Knockdown sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zufriedenstellend funktionierte und somit die Folgeergebnisse nach ZNF580-Knockdown als aussagekräftig interpretiert werden dürfen.

Ein ZNF580-Knockdown in der verwendeten Podozytenzelllinie führte zu einem statistisch signifikanten Anstieg der MMP-1-mRNA-Konzentration. Die dazugehörige Kontrollgruppe wurde mit einer Kontroll-siRNA transfiziert, welche keine Sequenzhomologie zu einer mRNA-Sequenz in humanen Zellen besitzt [114]. Daher kann ausgeschlossen werden, dass das beobachtete Ergebnis durch den Transfektionsprozess selbst oder durch eine generelle Zellreaktion auf siRNA ausgelöst wurde. Die Transfektion mittels Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo Scientific) dauert laut Hersteller 4-6 h [124]. Eventuell stattfindende Änderungen in der mRNA-Konzentration im Verlauf des Transfektionsprozesses können deshalb aus methodischen Gründen nicht beobachtet werden. Die Zellyse erfolgte in den Experimenten dieser Arbeit 48 h nach Beginn der Transfektion. In einem Kontrollversuch mit Zellyse nach 24 h waren sowohl der ZNF580-Knockdown als auch der Anstieg der MMP-1-mRNA-Konzentration auf dem gleichen

Niveau wie nach 48 h (Daten nicht gezeigt). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass im Zeitgang nach Erreichen der erhöhten MMP-1-mRNA-Konzentration nach Transfektion starke Schwankungen im MMP-1-mRNA-Niveau stattfinden, wenngleich diese im Verlauf des Transfektionsprozesses aus methodischen Gründen nicht ausgeschlossen werden können.

Der beobachtete Anstieg der MMP-1-mRNA-Konzentration lässt sich dahingehend deuten, dass ZNF580 anscheinend als Repressor der MMP-1-Expression agiert. Wird dieser Repressor mittels Knockdown ausgeschaltet, kommt es zu dem beobachteten Überschießen der MMP-1-Expression. Dieser Zusammenhang zwischen ZNF580 und MMP-1 wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben, weder in Podozyten noch in anderen Zelllinien.

Sun et al. konnten in ihren Experimenten zu ZNF580 zeigen, dass bei einer ZNF580-Überexpression in EA.hy926-Zellen auch die MMP-2-Expression anstieg [90]. In dem bereits in der Einleitung beschriebenen Microarray unserer Arbeitsgruppe wurde bei einem ZNF580-Knockdown in EA.hy926-Zellen eine verringerte MMP-1- und -10-mRNA-Konzentration beobachtet (Zakrzewicz et al., persönliche Mitteilung). Diese Daten deuten ebenso wie die Ergebnisse von Sun et al. auf eine Funktion von ZNF580 als Induktor der MMP-Expression hin. Somit liegt der in dieser Arbeit beobachtete Zusammenhang zwischen ZNF580 und der MMP-1-Expression nicht in der vorher zu vermutenden Richtung. Hoffmann et al. zeigten allerdings vergleichbar zu der vorliegenden Arbeit, dass ein ZNF580-Knockdown zu einer vermehrten Expression des Zielgens (in ihrem Fall IL-8) führte, was auf eine Repressorfunktion von ZNF580 hindeutet [95]. Stenzel et al. konnten in ihren Versuchen ZNF580 als Repressor der IL-6-Expression in Monozyten identifizieren [125]. Diese Unterschiede in der ZNF580-Funktion sind möglicherweise durch die unterschiedlichen verwendeten Zelllinien bedingt. Anscheinend wirkt ZNF580 in EA.hy926-Zellen eher als Aktivator der Genexpression, in allen anderen untersuchten Zelllinien dagegen als Repressor.

Neben MMP-1 wurde bei keiner weiteren untersuchten MMP ein statistisch signifikanter Unterschied in der relativen mRNA-Konzentration nach dem ZNF580-Knockdown gefunden. Bei der Auswahl der zu untersuchenden MMP wurde darauf geachtet, dass alle in der Literatur in Podozyten-assoziierten Pathologien erwähnten MMP sowie zumindest ein Vertreter aus jeder MMP-Klasse untersucht wurden. Die beobachtete selektive Erhöhung der MMP-1-mRNA-Konzentration bei gleichzeitiger Konstanz aller anderen MMP-mRNA-Konzentrationen nach ZNF580-Knockdown ist insofern interessant, als die einzelnen MMP-Gene ähnliche Promotorsequenzen besitzen und somit bei einem Stimulus in der Regel verschiedene MMP gruppenweise

induziert oder supprimiert werden [44]. Anscheinend können durch bestimmte Proteine wie ZNF580 einzelne MMP selektiv reguliert werden, ohne die Expression anderer MMP zu tangieren. Die Betrachtung der verschiedenen MMP als einheitlich regulierte Enzymklasse scheint damit überholt zu sein. Fanjul-Fernández et al. kommen in ihrem Review zu ähnlichen Schlussfolgerungen: Sie erläutern ein für die Regulation der Transkription unterschiedlicher MMP verantwortliches breites Netzwerk aus Signaltransduktionskaskaden, welches potenziell mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert und so die gewebsspezifische Regulation einzelner MMP gewährleisten kann [42]. ZNF580 scheint somit als selektiver MMP-1-Repressor in Podozyten zu agieren.

#### **4.2.3 Die IL-1 $\beta$ -abhängige MMP-1-Induktion in Podozyten**

Um den Einfluss von ZNF580 auf die MMP-1-Expression genauer zu untersuchen, wurden Podozyten mit IL-1 $\beta$  inkubiert. Eine Induktion der MMP-1-Expression in Podozyten nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  war aufgrund ähnlicher Ergebnisse in anderen Zelllinien wahrscheinlich [115, 117], wurde allerdings bislang noch nicht in der Literatur gezeigt. In dieser Arbeit konnte nach Inkubation von Podozyten mit 5 ng/mL IL-1 $\beta$  ein statistisch signifikanter Anstieg der MMP-1-Konzentration beobachtet werden, sowohl im mRNA-Niveau als auch im Zellkulturüberstand. Die Zellen der Kontrollgruppen wurden jeweils aus derselben Kulturflasche wie die Zellen für die IL-1 $\beta$ -Stimulation gewonnen. Die Kontrollgruppe wurde durch das Experiment hindurch parallel zur stimulierten Gruppe mitgeführt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die beobachteten Ergebnisse auf unspezifische Effekte durch beispielsweise verschiedene Zellpassagen oder unterschiedliche Temperaturen zurückzuführen sind. Die relative MMP-1-mRNA-Konzentration stieg nach IL-1 $\beta$ -Inkubation auf das etwa 3,7- bis 5,0-fache der Kontrollgruppe an. Dabei war zwischen dem 1 h- und 6 h-Zeitwert eine leicht ansteigende Tendenz erkennbar, welche jedoch statistisch nicht signifikant war. Nach 24 h war kein Unterschied zur Kontrolle mehr erkennbar. Die nach IL-1 $\beta$ -Stimulation von Podozyten in den Zellkulturüberstand sezernierte MMP-1-Menge war relativ zur jeweiligen Kontrolle nicht so stark erhöht wie die relative mRNA-Konzentration. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist ein unterschiedlicher zeitlicher Ablauf von Transkription und Translation. Die Transkription wird anscheinend durch die über die Bindung von IL-1 $\beta$  an den Rezeptor ausgelösten Signaltransduktionskaskaden vergleichsweise schnell und auf ein vergleichsweise hohes Niveau induziert, fällt allerdings auch schnell wieder ab. Die vermehrte Translation und Sekretion von MMP-1 erfolgt daraufhin eher konstant über einen längeren Zeitraum.

Der Anstieg der MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Zelllinien. In von Fan et al. untersuchten humanen Chondrozyten stieg die relative MMP-1-mRNA-Konzentration beispielsweise auf das etwa 80-fache an, während Murayama et al. in Zellen des Desmodonts nur einen Anstieg auf das ungefähr 10-fache der Kontrollgruppe beobachten konnten [117, 126]. Möglicherweise können diese Unterschiede durch verschiedene basale MMP-1-Expressionsraten in den jeweiligen Zelllinien erklärt werden. Untersuchungen dieser Art wurden jedoch noch nicht durchgeführt. Aufgrund der starken Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen erscheint die relative MMP-1-mRNA-Induktion auf das etwa 3- bis 5-fache der Kontrollgruppe in den in dieser Arbeit untersuchten Podozyten plausibel.

In dem in Abbildung 7 gezeigten Western Blot ist ein Signal in Höhe von etwa 22 kDa sichtbar, welches als autolytisches Spaltprodukt von MMP-1 interpretiert wurde [120]. Diese Hypothese wird dadurch gestärkt, dass das Signal die gleiche Regulation wie das MMP-1-Signal nach IL-1 $\beta$ -Stimulation zeigte. Bei der Autolyse von MMP-1 entsteht neben dem gezeigten 22 kDa-Fragment auch ein 27 kDa großes Fragment [120], welches jedoch in dem dargestellten Western Blot nicht ausgemacht werden kann. Diese Beobachtung lässt sich allerdings durch den gegen einen Abschnitt des N-Terminus von MMP-1 gerichteten Anti-MMP-1-Antikörper erklären, der für das Experiment verwendet wurde. Da das 27 kDa-Fragment den Überrest des C-Terminus von MMP-1 darstellt [120], kann der Antikörper dieses Fragment nicht binden. Folgerichtig ist das Fragment im Western Blot nicht als Signal erkennbar. Unklar bleibt, weshalb das 22 kDa-Fragment ein stärkeres als das Signal für MMP-1 erzeugt. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass in dem Experiment MMP-1 aus dem Zellkulturüberstand analysiert wurde. Die von Podozyten in den Überstand sezernierte MMP-1 befand sich also, je nach analysiertem Zeitwert, zwischen 4 und 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Ein autolytischer Abbau eines Großteils von MMP-1 in dieser Zeit ist daher naheliegend. Die danach über mehrere Stunden erfolgte Konzentration des Zellkulturüberstandes mittels einer Vakuumzentrifuge lief aus technischen Gründen bei Raumtemperatur ab, sodass auch hier weitere Autolyse von MMP-1 wahrscheinlich ist.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die von Podozyten *in vivo* sezernierte MMP-1 ebenfalls autolytisch gespalten wird. Da das 22 kDa-Fragment, welches den Überrest des N-Terminus von MMP-1 darstellt und damit auch die katalytische Domäne aufweist, katalytische Aktivität gegen Gelatin zeigte, ist eine biologische Relevanz dieses Fragments vorstellbar [120]. Weitere Untersuchungen in diese Richtung wurden allerdings bislang noch nicht durchgeführt.

Unklar bleibt, weshalb nach 24 h fortwährender IL-1 $\beta$ -Stimulation auf mRNA-Ebene kein und auf Proteinebene im Zellkulturüberstand nur ein geringer Unterschied der MMP-1-Konzentration mehr im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden konnte. In den vergleichbaren Arbeiten von Fan et al. und Murayama et al. wurde ein solcher Effekt nicht beschrieben, obwohl die IL-1 $\beta$ -Stimulation in ihren Versuchen 24 h beziehungsweise 48 h andauerte [117, 126]. Für diese Beobachtung existieren verschiedene Erklärungen.

Zum einen ist es möglich, dass IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand während fortschreitender Versuchsdauer abgebaut wurde und dadurch die Podozyten nicht mehr stimulieren konnte. Verschiedene MMP, darunter auch MMP-1, sind in der Lage, IL-1 $\beta$  proteolytisch zu spalten [127]. Daher liegt der Verdacht nahe, dass die von den Podozyten sezernierte MMP-1 den Abbau von IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand katalysierte. Allerdings lag zumindest MMP-1 in dem Versuch ausschließlich als inaktive Proform im Überstand der Zellkultur vor. Dies ist höchstwahrscheinlich darin begründet, dass keine MMP-1-aktivierende Protease im Zellkulturüberstand vorlag. Nach Aktivierung von MMP-1 durch Abspaltung der Prodomäne hat MMP-1 eine molekulare Masse von etwa 43 kDa [120], ein vergleichbares Signal kann in dem in Abbildung 7 gezeigten exemplarischen Anti-MMP-1-Western Blot nicht detektiert werden. Somit kann die Hypothese des IL-1 $\beta$ -Abbaus während des Versuchs im Zellkulturüberstand durch von Podozyten sezernierte MMP-1 als widerlegt angesehen werden. Eine Inaktivierung von IL-1 $\beta$  durch andere Proteine im Zellkulturüberstand kann gleichwohl nicht ausgeschlossen werden.

Zum anderen ist es denkbar, dass sich die mit IL-1 $\beta$  inkubierten Podozyten auf den gleichbleibenden Stimulus rasch adaptieren und die MMP-1-Induktion nachlässt. Nagata schlussfolgert in seinem Review, dass Podozyten ein ausgeprägtes Adaptationssystem besitzen, um adäquat auf verschiedene Stimuli reagieren zu können, ohne die Integrität der GFB zu gefährden [128]. Somit erscheint die Hypothese der raschen Adaptation von Podozyten auf einen gleichbleibenden IL-1 $\beta$ -Stimulus durchaus realistisch.

Zusammengefasst führt IL-1 $\beta$  wie erwartet auch in Podozyten zur MMP-1-Induktion, welche allerdings nur von kurzer Dauer ist, was als eine rasche Adaptation von Podozyten auf den gleichbleibenden IL-1 $\beta$ -Stimulus interpretiert werden kann.

#### **4.2.4 Die IL-1 $\beta$ -abhängige ZNF580-Suppression in Podozyten**

Die Inkubation von Podozyten mit IL-1 $\beta$  bewirkte neben der Induktion der MMP-1-Expression auch die Suppression der ZNF580-Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Dieses Phänomen wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Die Kinetik dieser Re-

gulation zeigt deutlich erkennbare Ähnlichkeiten zu der vorher gezeigten Regulation der MMP-1-Expression. Nach 24 h fortwährender IL-1 $\beta$ -Stimulation kann kein Unterschied bezüglich der relativen ZNF580-mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Auf Proteinebene scheint die Regulation langsamer abzulaufen als auf mRNA-Ebene. Nach 24 h andauernder IL-1 $\beta$ -Stimulation wurde noch eine statistisch signifikante Suppression von ZNF580 beobachtet, nach 48 h war der Effekt allerdings nicht mehr messbar. Die möglichen Ursachen entsprechen den im letzten Kapitel im Rahmen der MMP-1-Induktion nach IL-1 $\beta$ -Stimulation beschriebenen Erklärungsmodellen des vorzeitigen IL-1 $\beta$ -Abbaus im Zellkulturüberstand während des Experiments beziehungsweise der raschen Adaptationsfähigkeit von Podozyten. Durch den 24 h-Wert für ZNF580 auf Proteinebene wird das Modell des vorzeitigen Abbaus von IL-1 $\beta$  während des Versuches im Zellkulturüberstand allerdings unwahrscheinlicher. Da das ZNF580-Signal für diesen Zeitwert statistisch signifikant unter dem der Kontrolle lag, scheint IL-1 $\beta$  zu diesem Zeitpunkt noch aktiv auf die Podozyten eingewirkt zu haben. Die nur kurz andauernde ZNF580-Suppression nach Stimulation von Podozyten mit IL-1 $\beta$  scheint also eher durch eine ausgeprägte Adaptationsfähigkeit von Podozyten auf den gleichbleibenden IL-1 $\beta$ -Stimulus bedingt zu sein.

#### **4.2.5 IL-1 $\beta$ hat keinen Einfluss auf die Regulation von TIMP-1**

TIMP-1 ist ein bedeutsamer endogener Inhibitor von MMP-1 [121]. Um zu prüfen, ob IL-1 $\beta$  neben der beobachteten MMP-1-Induktion auch sekundär die MMP-1-Aktivität in der EZM über Induktion oder Suppression von TIMP-1 beeinflusst, wurde der Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die TIMP-1-mRNA-Konzentration in Podozyten im Zeitgang untersucht. Mit IL-1 $\beta$  stimulierte Podozyten zeigten im zeitlichen Verlauf von 3 h bis 24 h keine Änderung der relativen TIMP-1-mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Auch ein ZNF580-Knockdown hatte keinen Einfluss auf die TIMP-1-mRNA-Konzentration (Abb. 5). Es scheint also plausibel, dass die durch IL-1 $\beta$  von Podozyten vermehrt sezernierte MMP-1 nicht durch ebenfalls induziertes TIMP-1 „gekontert“ wird. Diese Interpretation kann allerdings nicht bedingungslos auf die Situation *in vivo* übertragen werden, da hierfür eine systematische Untersuchung aller MMP und Inhibitoren von MMP durchgeführt werden müsste. Die Regulation der TIMP-1-Expression nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  wurde bereits in anderen Zelllinien untersucht, die Ergebnisse in der Literatur sind jedoch nicht eindeutig. So wurde in einer Arbeit von Fields et al. beispielsweise eine Induktion von TIMP-1 in humanen Astrozyten nach IL-1 $\beta$ -Stimulation beobachtet [129], in den Versuchen von Huang et al. in Stromazellen aus humanem Endometrium allerdings eine Suppression [130]. Caliskan et al. konnten in einer humanen Chondrosarkomzelllinie keinen signifi-

kanten Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die TIMP-1-Expression feststellen [131]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Regulation der TIMP-1-Expression auf einen Stimulus hin zelltypspezifisch unterschiedlich erfolgt. Da der Effekt von IL-1 $\beta$  auf die TIMP-1-Expression in Podozyten vor dieser Arbeit noch nicht beschrieben wurde und die Literatur bezüglich anderer Zelllinien uneinheitlich ist, sind die Beobachtungen dieser Arbeit durchaus plausibel.

#### **4.2.6 IL-1 $\beta$ bewirkt durch Suppression von ZNF580 eine verstärkte MMP-1-Expression in Podozyten**

Die bisher in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse führen zu folgender Hypothese: In der verwendeten Podozytenzelllinie führt eine Inkubation mit IL-1 $\beta$  zu einer Suppression von ZNF580, durch das ausgeschaltete ZNF580 kommt es zu einem Anstieg der relativen MMP-1-Expression. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden in einem Experiment in Podozyten sowohl ein ZNF580-Knockdown als auch eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  durchgeführt. Trotz der aufgrund der Inkubation mit IL-1 $\beta$  erhöhten relativen MMP-1-mRNA-Konzentration konnte bei einem zusätzlichen ZNF580-Knockdown eine weitere Erhöhung der MMP-1-mRNA-Konzentration beobachtet werden. Dadurch ist nachgewiesen, dass ein Ausschalten von ZNF580 auch bei IL-1 $\beta$ -Stimulation einen relevanten Effekt auf die MMP-1-Expression hat.

Nach der Stimulation von Podozyten mit IL-1 $\beta$  konnte die höchste MMP-1-mRNA-Konzentration nach 6 h gemessen werden, der niedrigste Wert der relativen ZNF580-mRNA-Konzentration allerdings bereits nach 3 h. Anscheinend erfolgt die Suppression von ZNF580 also vor der Induktion von MMP-1. Diese Beobachtung stärkt zusammen mit der ermittelten ZNF580-Lokalisation im Zellkern der Podozyten die Hypothese, dass ZNF580 als Transkriptionsfaktor (Repressor) der MMP-1-Expression agiert.

Hoffmann et al. konnten in ihren Versuchen in HUVEC eine ähnliche Funktion von ZNF580 feststellen: Ein in Patienten mit Atherosklerose vorkommendes hohes oxLDL/LDL-Verhältnis korrelierte mit einer erhöhten IL-8-Konzentration im Serum dieser Patienten. Nach Inkubation von HUVEC mit LDL mit hohem oxLDL/LDL-Quotienten wurde eine Induktion der IL-8-Expression sowie eine Suppression der ZNF580-Expression beobachtet. Ein ZNF580-Knockdown mittels spezifischer siRNA führte ebenfalls zu einem Anstieg der IL-8-Expression [95].

Auch Stenzel et al. schlussfolgerten aus ihren Versuchen in einer Monozytenzelllinie eine ähnliche Funktion von ZNF580 als Repressor. Stimulation von Monozyten mit Lipopolysaccharid

(LPS) resultierte zunächst in der Induktion, im weiteren zeitlichen Verlauf in der Suppression von ZNF580; ein ZNF580-Knockdown führte zu einer Induktion der IL-6-Expression [125].

Die Ergebnisse der Arbeiten von DangLi et al. stehen jedoch diesen Schlussfolgerungen entgegen. In ihren Versuchen konnten sie eine Induktion der ZNF580- sowie der IL-8-Expression nach Inkubation von EA.hy926-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachten. Eine Überexpression von ZNF580 bewirkte ebenfalls eine Induktion der IL-8-Expression. Es wurde daher eine eher proinflammatorische Rolle von ZNF580 geschlussfolgert [94]. Diese Unterschiede in der ZNF580-Funktion sind allerdings womöglich, wie bereits in Kapitel 4.2.2 diskutiert, durch die von DangLi et al. verwendete Zelllinie (EA.hy926) bedingt.

ZNF580 scheint in unterschiedlichen Zellen als Repressor der Transkription verschiedener Proteine, welche durch inflammatorische Stimuli induziert werden können, zu agieren. Bei Einwirkung des jeweiligen inflammatorischen Stimulus kommt es zu einer Suppression der ZNF580-Expression, sodass die „Bremse“ der Expression des Zielgens entfernt wird. Dadurch kommt es zu der beobachteten überschießenden Zielgen-Expression. Diese Hypothese der Funktion von ZNF580 wird sowohl durch die Ergebnisse von Hoffmann et al. und Stenzel et al. als auch von der vorliegenden Arbeit untermauert.

#### **4.2.7 Die Rolle von MAPK und NF- $\kappa$ B in der Induktion der MMP-1-Expression**

Die in dieser Arbeit beobachtete Induktion von MMP-1 durch IL-1 $\beta$  wird allerdings nicht ausschließlich über eine Suppression von ZNF580 verursacht. Nach ZNF580-Knockdown mittels esiRNA in Podozyten wurde ein Anstieg der relativen MMP-1-mRNA-Konzentration auf etwa das Doppelte der Kontrollgruppe beobachtet. Nach IL-1 $\beta$ -Stimulation, welche die ZNF580-mRNA-Konzentration nicht so stark supprimierte wie der ZNF580-Knockdown, konnte jedoch eine Induktion der MMP-1-mRNA-Konzentration auf das etwa 4- bis 5-fache beobachtet werden. Offensichtlich spielen also weitere Faktoren außer ZNF580 eine Rolle in der Regulation der MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation in Podozyten.

Die dafür verantwortlichen Signalkaskaden wurden in anderen Zelllinien bereits ausführlich untersucht. Barchowsky et al. konnten in ihren Versuchen an synovialen Kaninchen-Fibroblasten feststellen, dass für die Induktion der MMP-1-Expression durch IL-1 $\beta$  eine Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern erforderlich war [115]. Weiterhin führte IL-1 $\beta$  zu einer Phosphorylierung von p38-MAPK sowie ERK1/2, eine Inkubation der Zellen mit spezifischen p38-MAPK- und ERK1/2-Inhibitoren verhinderte den Anstieg der MMP-1-Expression. JNK, welche die dritte bedeutsame MAPK-Gruppe darstellen, spielten im Gegensatz dazu keine bedeutsame Rolle in

der Induktion der MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation [115]. Fan et al. konnten diese Beobachtungen an Chondrozyten aus humanen Kniegelenken bestätigen. Eine Inhibition von p38-MAPK, ERK1/2 oder NF- $\kappa$ B führte zu einer verringerten Induktion der MMP-1-Expression nach Stimulation der Chondrozyten mit IL-1 $\beta$ , während dieser Effekt nicht nach Inhibition von JNK beobachtet werden konnte [117]. Mengshol et al. zeigten in ihrer Arbeit eine unterschiedliche Beteiligung der verschiedenen MAPK in der Induktion von MMP-1 nach IL-1 $\beta$ -Stimulation in verschiedenen Zelllinien. Während in humanen Chondrosarkomzellen die Inhibition von ERK die Induktion der MMP-1-Expression verringerte, konnte dieser Effekt in Chondrozyten aus Kaninchen nicht bestätigt werden [132]. Murayama et al. wiederum beobachteten in Zellen des Desmodonts die Beteiligung sowohl von NF- $\kappa$ B als auch von p38-MAPK, ERK und JNK in der Regulation von MMP-1 durch IL-1 $\beta$  [126].

Zusammengefasst scheint ein extrazelluläres IL-1 $\beta$ -Signal in unterschiedlichen Zelllinien stets über p38-MAPK und NF- $\kappa$ B vermittelt in einer vermehrten MMP-1-Expression zu resultieren, die Beteiligung von ERK1/2 sowie JNK erfolgt womöglich zelltypspezifisch.

Um an der Erhöhung der MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation in Podozyten beteiligte Signaltransduktionskaskaden zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit in einem Experiment Podozyten vor IL-1 $\beta$ -Stimulation mit verschiedenen spezifischen MAPK-Inhibitoren inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde mit dem Vehikel der MAPK-Inhibitoren (DMSO) und anschließend mit IL-1 $\beta$  inkubiert. Mit IL-1 $\beta$  stimulierte Podozyten zeigten eine höhere MMP-1- und eine geringere ZNF580-mRNA-Konzentration als die Kontrollgruppe ohne IL-1 $\beta$  (fünfte Säule in Abb. 13). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Abbildungen 6 und 8 und weist somit auf eine mit den vorherigen Versuchen vergleichbare IL-1 $\beta$ -Stimulation der Zellen hin.

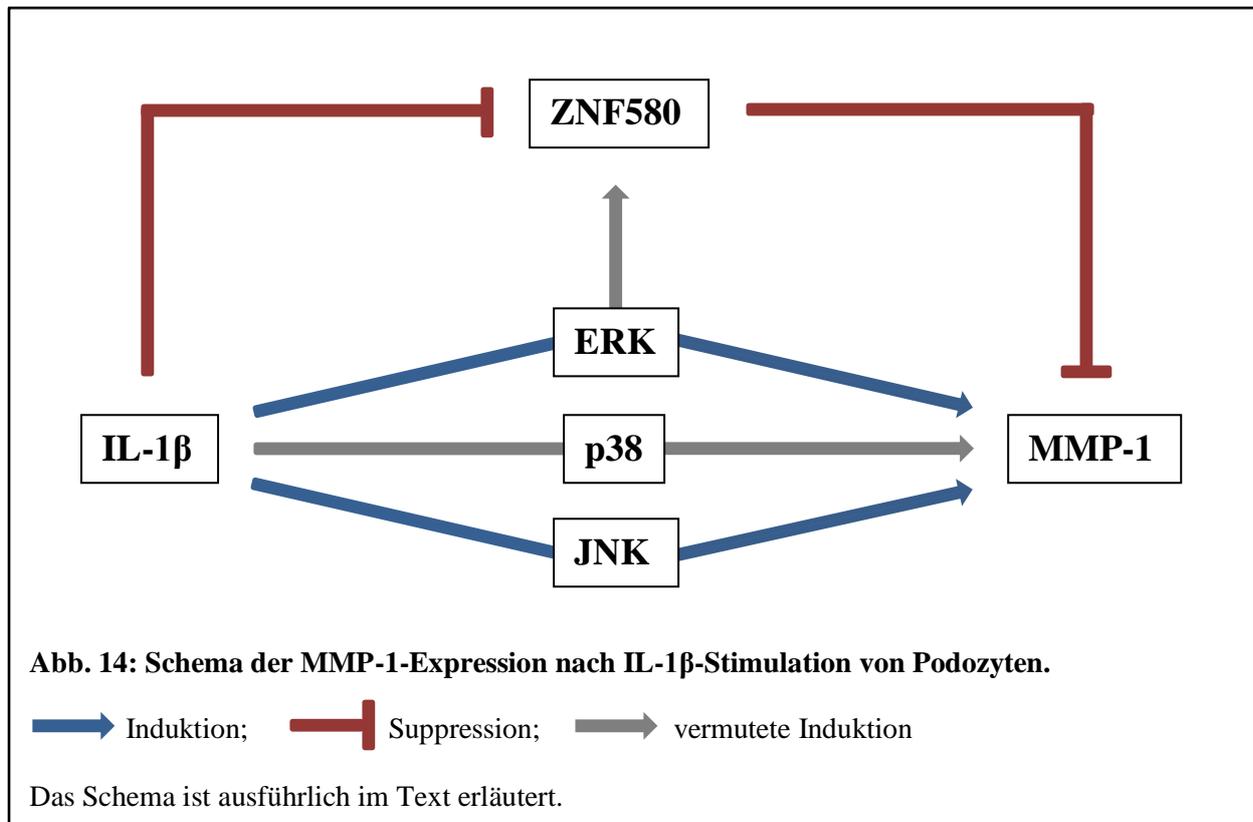
Unter Inhibition von JNK beziehungsweise ERK wurde die Erhöhung des MMP-1-mRNA-Niveaus nach IL-1 $\beta$ -Stimulation der Zellen leicht, aber statistisch signifikant abgeschwächt. Da auch die Kontrollgruppe mit DMSO inkubiert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung durch die Reaktion der Zellen auf DMSO verursacht wurde. Das Ergebnis dieses Experiments lässt sich dahingehend interpretieren, dass diese MAPK an der Signaltransduktion von IL-1 $\beta$  zur MMP-1-Expression beteiligt sind. Bei Ausschalten der entsprechenden MAPK kann das IL-1 $\beta$ -Signal nicht mehr vollständig weitergeleitet werden, wodurch der beobachtete Effekt auf die MMP-1-Expression erklärt werden kann. Auch bei Inhibition von p38-MAPK konnte ein ähnlicher Effekt festgestellt werden, welcher allerdings keine statistische Signifikanz aufwies ( $p=0,08$ ). Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass auch p38-MAPK in der Signaltrans-

duktion von IL-1 $\beta$  zu MMP-1 eine Rolle spielt. Zum einen liegt der Mittelwert der entsprechenden Proben ungefähr im Bereich der mit JNK- beziehungsweise ERK-Inhibitoren behandelten Proben, zum anderen wurde wie bereits erläutert in anderen Zelllinien stets eine Beteiligung von p38-MAPK in diesem Signalweg bestätigt [115, 117, 126]. Trotz Inhibition von einzelnen MAPK verringerte sich die MMP-1-mRNA-Konzentration nach IL-1 $\beta$ -Stimulation nur vergleichsweise leicht. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch kompensatorische Effekte über andere MAPK oder NF- $\kappa$ B erklären.

Um eine Beteiligung von ZNF580 an den verschiedenen MAPK-Signaltransduktionskaskaden nachzuweisen, wurden die Proben aus diesem Experiment auch auf Veränderungen im ZNF580-mRNA-Niveau untersucht. Dabei konnte im Falle von JNK- sowie p38-Inhibition kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf die Kontrollgruppe festgestellt werden, bei Inhibition von ERK wurde allerdings eine signifikant verringerte ZNF580-mRNA-Konzentration gemessen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass über ERK eine Induktion von ZNF580 stattfindet, was im Vorfeld dieses Experiments nicht zu erwarten war. Da IL-1 $\beta$  zu einer Suppression von ZNF580 führt, wäre bei einer hypothetischen Nachschaltung dieser Suppression an ERK bei einer Inhibition von ERK eher mit einem Angleichen von ZNF580 an das Niveau von nicht mit IL-1 $\beta$  stimulierten Podozyten zu rechnen gewesen, also einer Induktion. Somit scheint ERK1/2 eine ambivalente Rolle in der MMP-1-Regulation einzunehmen. Einerseits wird über diese MAPK MMP-1 induziert, andererseits wird aber anscheinend über eine Induktion von ZNF580, welches wohl als MMP-1-Repressor agiert, eine überschießende MMP-1-Induktion verhindert. Diese Beobachtungen lassen erahnen, dass die tatsächlich ablaufenden Signaltransduktionskaskaden in Podozyten deutlich komplexer sind, als sie häufig dargestellt werden. Eine Übersicht über Signaltransduktionskaskaden und ihre Wirkung auf die ZNF580- und MMP-1-Expression, wie sie mit den vorliegenden Daten vereinbar ist, ist in Abb. 14 (Seite 61) dargestellt.

Da in der Literatur in anderen Zelllinien wie beschrieben neben MAPK auch NF- $\kappa$ B an der vermehrten MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation beteiligt war, wurde auch in dieser Arbeit ein NF- $\kappa$ B-Inhibitor (PDTC, siehe Kapitel 2.2.2) analog zu den verschiedenen verwendeten MAPK-Inhibitoren verwendet. Allerdings zeigten mit PDTC inkubierte Podozyten lichtmikroskopisch eine vermehrte Zellabrundung, zusätzlich waren im Zellkulturmedium vor der Zellyse zahlreiche Zelltrümmer sichtbar. Daher wurden die Ergebnisse dieser Proben (Daten nicht gezeigt) als nicht aussagekräftig betrachtet. Als Ursache der Reaktion der Podozyten auf PDTC erscheint am ehesten eine Kontamination der PDTC-Stammlösung plausibel, da die eingesetzte Konzentration (100  $\mu$ mol/L) bereits an dieser Zelllinie in einer anderen Arbeitsgruppe verwendet

wurde [133]. Weiterhin wurde in einem Vorversuch zur Etablierung der Versuchsbedingungen bereits dieselbe PDTC-Konzentration eingesetzt, ohne dass ein vermehrtes Absterben der Zellen beobachtet werden konnte. Somit ist es unwahrscheinlich, dass das Absterben der Zellen aufgrund einer zu hohen PDTC-Konzentration erfolgte. Die Beteiligung von NF- $\kappa$ B an der Induktion der MMP-1-Expression nach IL-1 $\beta$ -Stimulation von Podozyten kann daher nicht beurteilt werden. Aus diesem Grund ist NF- $\kappa$ B auch nicht in Abb. 14 dargestellt, obwohl eine Mitwirkung von NF- $\kappa$ B in den abgebildeten Signaltransduktionskaskaden nicht ausgeschlossen werden kann.



### 4.3 Bedeutung der Ergebnisse für das Verständnis der Pathophysiologie chronischer Nierenerkrankungen

Die Bedeutung einer veränderten MMP-1-Expression in Podozyten wurde bislang kaum untersucht. Han et al. konnten eine erhöhte Proteinexpression von MMP-1 in Nieren von Ratten mit Selenmangel beobachten. Der Mangel an Selen war mit einer Verdickung der GBM sowie der Fusion von Podozytenfußfortsätzen vergesellschaftet [134]. Aoyama et al. injizierten Mäusen ein MMP-1-Gen-enthaltendes Plasmid, im Anschluss wurde mittels Streptozocin die Entwicklung eines Diabetes mellitus in den Versuchstieren induziert. In der Versuchsgruppe konnten Aoyama et al. eine geringere Entwicklung von nierenfibrotischen Prozessen als in der Kontrollgruppe

feststellen, was auf eine eher positive Wirkung von MMP-1 in der Entwicklung von Nierenfibrose hindeutet [135]. Cornish et al. beobachteten immunhistochemisch eine geringere Färbung für MMP-1 in Nierenbiopsien von Patienten mit Diabetes mellitus [136]. Alle beschriebenen Arbeiten untersuchten jedoch nicht die MMP-1-Expression von Podozyten, sondern die MMP-1-Expression in der gesamten Niere.

In den meisten Studien, welche die MMP-Expression in Podozyten erforschten, wurden MMP-2 und -9 untersucht [68, 137, 138]. Diese Enzyme, beide zu der Gruppe der Gelatinasen gehörend, können Kollagen Typ IV proteolytisch spalten [36]. Kollagen Typ IV stellt einen Hauptbestandteil der GBM dar [139], ein vermehrter Kollagen Typ IV-Abbau führt mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt zu Proteinurie [68, 137]. Daher scheinen MMP-2 und -9 besonders relevante MMP in Podozyten darzustellen. Allerdings wurden in diesen Arbeiten nicht alle MMP systematisch untersucht, sondern lediglich MMP-2 und -9 aufgrund ihrer vermuteten besonderen Bedeutung betrachtet [68, 137, 138]. Aus diesem Grund kann von Podozyten sezernierte MMP-1 nicht als irrelevant betrachtet werden, es handelt sich hierbei vielmehr um ein bislang mangelhaft erforschtes Feld.

MMP-1 kann neben Bestandteilen der GBM wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen Typ I [36], jedoch nicht Kollagen Typ IV [140], auch die Proenzyme von MMP-2 und -9 proteolytisch spalten, wodurch es zu einer Aktivierung dieser beiden Enzyme kommt [36, 141, 142]. Somit könnte eine vermehrte MMP-1-Sekretion von Podozyten indirekt über eine verstärkte Aktivierung der Kollagen Typ IV-spaltenden MMP-2 und -9 zu einem proteolytischen Abbau von Kollagen Typ IV der GBM und damit zu Proteinurie führen. Aus diesem Grund sollten in weiteren Untersuchungen zur MMP-Expression von Podozyten stets alle MMP systematisch untersucht werden, da bei einer isolierten Untersuchung von MMP-2 und -9 das Netzwerk von MMP untereinander ignoriert wird. Allerdings wurde die Aktivierung von MMP-2 und -9 durch MMP-1 bislang nur *in vitro* gezeigt [141, 142]. Es bleibt somit unklar, inwiefern diese Aktivierungen tatsächlich *in vivo* ablaufen und welche Relevanz sie besitzen.

Falls eine erhöhte MMP-1-Sekretion von Podozyten tatsächlich *in vivo* zu einer vermehrten Aktivierung von MMP-2 und -9 führen sollte, wäre ZNF580 als ein protektiver Faktor in der Pathophysiologie chronischer Nierenerkrankungen und der sie begleitenden Proteinurie zu betrachten, da das Zinkfingerprotein wahrscheinlich als Repressor der MMP-1-Expression agiert. Aufgrund dieser Wirkung könnte ZNF580 als ein neues potenzielles pharmakologisches Ziel in der kausalen Therapie chronischer Nierenerkrankungen gewertet werden.

#### 4.4 Limitationen dieser Arbeit

Idealerweise sollten pathophysiologische Mechanismen chronischer Nierenerkrankungen an Patienten mit den jeweiligen Erkrankungen aufgeklärt werden. Die dafür erforderlichen experimentellen Untersuchungen wären allerdings häufig ethisch nicht vertretbar, sodass stattdessen experimentelle Modelle verwendet werden. Um grundlegende Signalwege in Podozyten zu erforschen, ist ein wie in dieser Arbeit verwendetes Zellkulturmodell erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Versuche an einer von Saleem et al. etablierten immortalisierten humanen Podozytenzelllinie durchgeführt. Um die Immortalisierung der Zellen zu erreichen, wurde, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, ein SV40-LT-Genkonstrukt in das Genom der Zellen eingeführt [100]. Aufgrund dieser Veränderung im Erbgut der Podozyten können die verwendeten Zellen nicht eins zu eins mit humanen Podozyten *in vivo* gleichgesetzt werden. Da die verwendete Zelllinie allerdings wichtige podozytenspezifische Proteine wie Nephrin oder Podocin exprimiert, wird sie dennoch als repräsentativ für Podozyten *in vivo* betrachtet [100].

Eine weitaus größere Limitation der verwendeten Zellkultur stellt der generelle Unterschied zwischen einer Zellkultur und der Situation *in vivo* dar. Podozyten sind normalerweise nur über ihre Fußfortsätze an der GBM verankert, die restlichen Anteile der Zelle bewegen sich frei im Kapselraum der Bowman-Kapsel [8]. Die Situation von Podozyten in einer 12-Well-Zellkulturplatte unterscheidet sich davon fundamental. Da der Boden jedes Wells glatt und gerade ist, kann hier die gesamte Zelle adhären. Das verwendete RPMI-Zellkulturmedium entspricht ebenfalls nicht dem durch die Zellfortsätze *in vivo* fließenden Ultrafiltrat. Da auch die mit der Ultrafiltration einhergehenden auf die Podozyten wirkenden mechanischen Kräfte fehlen, sind in der Zellkultur lebende Podozyten völlig anderen Bedingungen als *in vivo* ausgesetzt. Aus diesem Grund dürfen rein aus Zellkulturexperimenten stammende Ergebnisse wie in dieser Arbeit nur unter Vorbehalt direkt auf die Situation *in vivo* übertragen werden.

Eine weitere Limitation stellt die verwendete IL-1 $\beta$ -Konzentration von 5 ng/mL in den durchgeführten Versuchen dar. Das liegt daran, dass die *in vivo* auf Podozyten tatsächlich einwirkende IL-1 $\beta$ -Konzentration nicht bekannt ist. Die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Serum liegt physiologisch bei etwa 0,3 bis 0,5 pg/mL, teilweise sogar unter der Nachweisgrenze, kann aber in pathologischen Situationen auf über 2000 pg/mL ansteigen [143–145]. Jedoch kann daraus nicht geschlossen werden, dass genau diese IL-1 $\beta$ -Konzentrationen auch auf Podozyten einwirken. Da beispielsweise der subpodozytäre Raum bislang nur wenig untersucht wurde, sind die dort wirkenden Verhältnisse völlig unbekannt. Zudem gelten Podozyten als Hauptproduzent von IL-

1 $\beta$  in verschiedenen Glomerulonephritiden [146]; eine lokal höhere IL-1 $\beta$ -Konzentration als im Serum erscheint daher möglich.

Um ein systematisches Bild der Regulation der MMP-Expression von Podozyten in inflammatorischen Situationen zu erhalten, müssten die Auswirkungen weiterer inflammatorischer Stimuli neben IL-1 $\beta$  auf die MMP-Expression in der humanen Podozytenzelllinie getestet werden. Weiterhin wäre eine Kombination verschiedener inflammatorischer Stimuli sinnvoll, da die Einwirkung ausschließlich eines einzelnen Zytokins auf Podozyten *in vivo* extrem unwahrscheinlich ist.

Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit zwar potenzielle Signaltransduktionskaskaden in Podozyten nach Einwirkung von IL-1 $\beta$ , es ist jedoch unklar, ob diese Situation tatsächlich genauso *in vivo* vorkommt. Dieses Problem betrifft jedoch nahezu jede Untersuchung in der Grundlagenforschung, bei der eine Zellkultur als zentrales Modell genutzt wird. Die in dieser Arbeit verwendete IL-1 $\beta$ -Konzentration (5 ng/mL) entspricht den üblicherweise in vergleichbaren Untersuchungen an Podozyten eingesetzten Konzentrationen, welche in der Regel 5-10 ng/mL betragen [118, 147, 148]. Dadurch ist eine Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit der Literatur gegeben.

## 4.5 Ausblick

Chronische Nierenerkrankungen wie beispielsweise die DN gehen häufig mit Veränderungen der GBM und daraus resultierender Proteinurie einher [66]. Als besonders relevant für die Entwicklung von Proteinurie infolge einer Beschädigung der GBM wird in der Literatur die Dysregulation von MMP-2 und -9 beschrieben, da diese Gelatinasen Kollagen Typ IV, einen Hauptbestandteil der GBM, proteolytisch spalten können [36, 68, 137]. MMP-1 kann neben Bestandteilen der GBM wie Laminin oder Fibronectin potenziell auch Pro-MMP-2 und -9 spalten und so zu einer Aktivierung dieser MMP führen [36, 141, 142]. Eine überschießende MMP-1-Sekretion von Podozyten führt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Beeinträchtigung der Integrität der GBM zu Proteinurie. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine Funktion von ZNF580 als Repressor der MMP-1-Expression in Podozyten hin. Somit scheint ZNF580 in Podozyten als protektiver Faktor der Entwicklung einer Proteinurie entgegenzuwirken.

Um die Bedeutung von ZNF580 in Podozyten weiter zu erforschen, müsste in nachfolgenden Arbeiten der Schritt von Zellkulturexperimenten hin zu einem Tiermodell gegangen werden. Die Etablierung einer ZNF580-Knockout-Maus wäre dabei als entscheidender Schritt zu betrachten, um die in dieser Arbeit diskutierten Auswirkungen eines ZNF580-Knockdowns *in vivo* zu über-

prüfen. Die tatsächlichen Auswirkungen einer vermehrten MMP-1-Sekretion von Podozyten auf den Organismus sollten ebenfalls in Organmodellen untersucht werden.

Letztendlich ist es bis zu potenziellen neuen therapeutischen Ansätzen, die über eine Beeinflussung von ZNF580 in die pathophysiologischen Mechanismen chronischer Nierenerkrankungen eingreifen, ein weiter Weg. Diese Arbeit stellt dabei lediglich den ersten Schritt dar.

## Literaturverzeichnis

1. Ortiz A, Covic A, Fliser D, Fouque D, Goldsmith D, Kanbay M, Mallamaci F, Massy ZA, Rossignol P, Vanholder R, Wiecek A, Zoccali C, London GM. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet*. 2014;383:1831–43.
2. CKD Evaluation and Management | KDIGO. <https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/>. Accessed 13 Jun 2018.
3. Qualitätssicherungs-Richtlinie Dialyse: Veröffentlichung des Jahresberichts 2016 zur Qualität in der Dialyse - Gemeinsamer Bundesausschuss. <https://www.g-ba.de/informationen/beschluesse/3024/>. Accessed 30 Sep 2017.
4. Stichwort Niereninsuffizienz - Krankheitskosten in Mio. EUR für Deutschland. 30.09.2017. [http://www.gbe-bund.de/oowa921-in-stall/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=3&p\\_aid=33948740&nummer=63&p\\_sprache=D&p\\_indsp=55013&p\\_aid=33960907](http://www.gbe-bund.de/oowa921-in-stall/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=33948740&nummer=63&p_sprache=D&p_indsp=55013&p_aid=33960907). Accessed 30 Sep 2017.
5. Rodriguez-Puyol D. The aging kidney. *Kidney International*. 1998;54:2247–65.
6. Rosner M, Abdel-Rahman E, Williams ME. Geriatric nephrology: Responding to a growing challenge. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:936–42.
7. Mittal SK, Ahern L, Flaster E, Maesaka JK, Fishbane S. Self-assessed physical and mental function of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:1387–94.
8. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: The enigma of foot process effacement. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2013;304:F333-F347.
9. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003;83:253–307.
10. Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int*. 1998;54:687–97.
11. Lopez JI, Larrinaga G, Kuroda N, Angulo JC. The normal and pathologic renal medulla: A comprehensive overview. *Pathol Res Pract*. 2015;211:271–80.
12. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015;209:199–210.
13. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol*. 2016;117:31–64.

14. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: The sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9:1461–9.
15. Bell PD, Lapointe JY, Peti-Peterdi J. Macula densa cell signaling. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:481–500.
16. Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9:587–98.
17. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*. 1974;60:423–33.
18. Grahammer F, Wigge C, Schell C, Kretz O, Patrakka J, Schneider S, Klose M, Kind J, 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*.
19. Conti S, Perico L, Grahammer F, Huber TB. The long journey through renal filtration: New pieces in the puzzle of slit diaphragm architecture. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26:148–53.
20. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. *Physiol Rev*. 2008;88:451–87.
21. Endlich N, Endlich K. Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol*. 2006;85:229–34.
22. Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K. Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2006;291:F856-F865.
23. Endlich N, KRESS KRAI, Reiser J, UTTENWEILER D, Kriz W, Mundel P, Endlich K. Podocytes Respond to Mechanical Stress In Vitro. *JASN*. 2001;12:413–22.
24. Li C, Siragy HM. High Glucose Induces Podocyte Injury via Enhanced (Pro)renin Receptor-Wnt- $\beta$ -Catenin-Snail Signaling Pathway. *PLoS One* 2014.
25. Anderberg RJ, Meek RL, Hudkins KL, Cooney SK, Alpers CE, Leboeuf RC, Tuttle KR. Serum amyloid A and inflammation in diabetic kidney disease and podocytes. *Lab Invest*. 2015;95:250–62.
26. Takano Y, Yamauchi K, Hayakawa K, Hiramatsu N, Kasai A, Okamura M, Yokouchi M, Shitamura A, Yao J, Kitamura M. Transcriptional suppression of nephrin in podocytes by macrophages: Roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway. *FEBS Lett*. 2007;581:421–6.

27. Bhathena DB. Glomerular basement membrane length to podocyte ratio in human nephron-  
openia: Implications for focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis.*  
2003;41:1179–88.
28. Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK, Wharram BL, Shedden KA, Misek DE, Kuick RD, Wig-  
gins RC. Podocyte Hypertrophy, “Adaptation,” and “Decompensation” Associated with  
Glomerular Enlargement and Glomerulosclerosis in the Aging Rat: Prevention by Calorie  
Restriction. *JASN.* 2005;16:2953–66.
29. Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P, Lamerdin J, Gribouval O, Niaudet PM, Antignac C  
K, Kashtan CE, Homberg C, Olsen A, Kestila M, Tryggvason K. Structure of the gene for  
congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of muta-  
tions. *Am J Hum Genet.* 1999;64:51–61.
30. Reiser J, Sever S. Podocyte Biology and Pathogenesis of Kidney Disease. *Annu Rev Med.*  
2013;64:357–66.
31. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999;274:21491–4.
32. GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture as-  
say. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;48:1014–22.
33. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and  
TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69:562–73.
34. Tan RJ, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol*  
*Renal Physiol.* 2012;302:F1351-61.
35. Sternlicht MD, Werb Z. HOW MATRIX METALLOPROTEINASES REGULATE CELL  
BEHAVIOR. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463–516.
36. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases:  
Structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827–39.
37. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He  
CS, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells  
(TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane colla-  
gen. *J Biol Chem.* 1988;263:6579–87.
38. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of  
gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J.* 1995;309  
(Pt 1):299–306.
39. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymo-  
gen. *Nature.* 1995;375:244–7.

40. van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *PNAS*. 1990;87:5578–82.
41. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 Is Required for Efficient Activation of proMMP-2 in Vivo. *J. Biol. Chem.* 2000;275:26411–5.
42. Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803:3–19.
43. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: Can MMPs be good for you? *J Cell Physiol*. 2007;213:355–64.
44. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007;211:19–26.
45. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:501–7.
46. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*. 1995;92:1393–8.
47. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol*. 2002;160:1089–95.
48. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:402–6.
49. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: In vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1653–61.
50. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*. 1996;97:2011–9.
51. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: Role in arthritis. *Front Biosci*. 2006;11:529–43.

52. Houghton AM. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease. *Matrix Biol.* 2015;44-46:167–74.
53. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for Macrophage Elastase for Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Science.* 1997;277:2002–4.
54. Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodriguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, Paquet AC, Erle DJ. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1383–92.
55. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature Reviews Nephrology.* 2011;7:684–96.
56. Xu X, Jackson PL, Tanner S, Hardison MT, Roda MA, Blalock JE, Gaggar A. A Self-Propagating Matrix Metalloprotease-9 (MMP-9) Dependent Cycle of Chronic Neutrophilic Inflammation. *PLOS ONE.* 2011;6:e15781.
57. Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Peripheral blood level alterations of MMP-2 and MMP-9 in patients with chronic kidney disease on conservative treatment and on hemodialysis. *Clin Biochem.* 2011;44:838–43.
58. Tarín C, Gomez M, Calvo E, López JA, Zaragoza C. Endothelial Nitric Oxide Deficiency Reduces MMP-13–Mediated Cleavage of ICAM-1 in Vascular Endothelium: A Role in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2009;29:27–32.
59. Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: A unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J.* 2006;20:1898–900.
60. Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A (MMP-2) Is Necessary and Sufficient for Renal Tubular Cell Epithelial-Mesenchymal Transformation. *Am J Pathol.* 2003;162:1937–49.
61. Liu Y. New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *JASN.* 2010;21:212–22.
62. Jahresberichte. 2014. <http://www.bundesverband-niere.de/bundesverband/quasi-niere/jahresberichte.html>. Accessed 21 Sep 2017.
63. Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Nationale VersorgungsLeitlinie Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter – Langfassung, 1. Auflage. Version 6.
64. Østerby R, Gundersen HJG. Glomerular size and structure in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1975;11:225–9.

65. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplton NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99:342–8.
66. Marshall CB. Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: Adaptive or pathogenic? *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311:F831-F843.
67. La Iglesias-de Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S. Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int.* 2002;62:901–13.
68. Bai Y, Wang L, Li Y, Liu S, Li J, Wang H, Huang H. High Ambient Glucose Levels Modulates the Production of MMP-9 and  $\alpha 5(\text{IV})$  Collagen by Cultured Podocytes. *CPB.* 2006;17:57–68.
69. McLennan SV, Kelly DJ, Cox AJ, Cao Z, Lyons JG, Yue DK, Gilbert RE. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: Effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia.* 2002;45:268–75.
70. Thraillkill KM, Clay Bunn R, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: Their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine.* 2009;35:1–10.
71. Rodriguez WE, Tyagi N, Joshua IG, Passmore JC, Fleming JT, Falcone JC, Tyagi SC. Pioglitazone mitigates renal glomerular vascular changes in high-fat, high-calorie-induced type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2006;291:F694-F701.
72. Yao X-M, Ye S-D, Zai Z, Chen Y, Li X-C, Yang G-W, Wang Y-X, Chen K. Simvastatin protects diabetic rats against kidney injury through the suppression of renal matrix metalloproteinase-9 expression. *J Endocrinol Invest.* 2010;33:292–6.
73. van der Zijl NJ, Hanemaaijer R, Tushuizen ME, Schindhelm RK, Boerop J, Rustemeijer C, Bilo HJ, Verheijen JH, Diamant M. Urinary matrix metalloproteinase-8 and -9 activities in type 2 diabetic subjects: A marker of incipient diabetic nephropathy? *Clin Biochem.* 2010;43:635–9.
74. Williams JM, Zhang J, North P, Lacy S, Yakes M, Dahly-Vernon A, Roman RJ. Evaluation of metalloprotease inhibitors on hypertension and diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2011;300:F983-F998.
75. Takamiya Y, Fukami K, Yamagishi S-i, Kaida Y, Nakayama Y, Obara N, Iwatani R, Ando R, Koike K, Matsui T, Nishino Y, Ueda S, Cooper ME, Okuda S. Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:55–62.

76. Basile DP, Fredrich K, Weihrauch D, Hattan N, Chilian WM. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2004;286:F893-F902.
77. Novak KB, Le HD, Christison-Lagay ER, Nose V, Doiron RJ, Moses MA, Puder M. Effects of Metalloproteinase Inhibition in a Murine Model of Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Pediatric Research*. 2010;67:257–62.
78. Zhang W-C, Chen B, Zeng W. Cloning and tissue expression of a novel gene down-regulated by low density lipoprotein. *Basic Med. Sci. Clin.* 2003;23:279–82.
79. ZNF580 - Zinc finger protein 580 - Homo sapiens (Human) - ZNF580 gene & protein. 30.08.2017. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UK33>. Accessed 6 Sep 2017.
80. Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:213–31.
81. Razin SV, Borunova VV, Maksimenko OG, Kantidze OL. Cys2His2 zinc finger protein family: Classification, functions, and major members. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;77:217–26.
82. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 1991;252:809–17.
83. Brayer KJ, Kulshreshtha S, Segal DJ. The Protein-Binding Potential of C2H2 Zinc Finger Domains. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2008;51:9–19.
84. Brown RS. Zinc finger proteins: Getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15:94–8.
85. Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, Déneraud N, Bucher P, Trono D. KRAB-Zinc Finger Proteins and KAP1 Can Mediate Long-Range Transcriptional Repression through Heterochromatin Spreading. *PLOS Genetics*. 2010;6:e1000869.
86. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*. 2003;4:206.
87. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Krüppel-Like Factors in Health and Diseases. *Physiol Rev*. 2010;90:1337–81.
88. Hodge D, Coghill E, Keys J, Maguire T, Hartmann B, McDowall A, Weiss M, Grimmond S, Perkins A. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood*. 2006;107:3359–70.
89. Sun R, Chen X, Yang VW. Intestinal-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 5) is a positive regulator of cellular proliferation. *J Biol Chem*. 2001;276:6897–900.

90. Sun H-Y, Wei S-P, Xu R-C, Xu P-X, Zhang W-C. Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription factor ZNF580: Novel insights into angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395:361–6.
91. Luo Y, Hu W, Xu R, Hou B, Zhang L, Zhang W. ZNF580, a novel C2H2 zinc-finger transcription factor, interacts with the TGF- $\beta$  signal molecule Smad2. *Cell Biology International.* 2011;35:1153–7.
92. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005;19:2783–810.
93. Luo Y, Zhao Y, Li X, Zhao J, Zhang W. ZNF580 mediates eNOS expression and endothelial cell migration/proliferation via the TGF-beta1/ALK5/Smad2 pathway. *Mol Cell Biochem.* 2014;393:199–207.
94. DangLi R, HeKong W, JiQin L, MingHua Z, WenCheng Z. ROS-induced ZNF580 expression: A key role for H2O2/NF- $\kappa$ B signaling pathway in vascular endothelial inflammation. *Mol Cell Biochem.* 2012;359:183–91.
95. Hoffmann CJ, Hohberg M, Chlench S, Maroski J, Drab M, Siegel G, Pries AR, Zakrzewicz A. Suppression of zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. *Atherosclerosis.* 2011;216:103–8.
96. Shi C, Yao F, Li Q, Khan M, Ren X, Feng Y, Huang J, Zhang W. Regulation of the endothelialization by human vascular endothelial cells by ZNF580 gene complexed with biodegradable microparticles. *Biomaterials.* 2014;35:7133–45.
97. Feng Y, Guo M, Liu W, Hao X, Lu W, Ren X, Shi C, Zhang W. Co-self-assembly of cationic microparticles to deliver pEGFP-ZNF580 for promoting the transfection and migration of endothelial cells. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:137–49.
98. Lv J, Hao X, Li Q, Akpanyung M, Nejjari A, Neve AL, Ren X, Feng Y, Shi C, Zhang W. Star-shaped copolymer grafted PEI and REDV as a gene carrier to improve migration of endothelial cells. *Biomater Sci.* 2017;5:511–22.
99. Leppert U, Gillespie A, Orphal M, Bohme K, Plum C, Nagorsen K, Berkholtz J, Kreutz R, Eisenreich A. The impact of alpha-Lipoic acid on cell viability and expression of nephrin and ZNF580 in normal human podocytes. *Eur J Pharmacol.* 2017;810:1–8.
100. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:630–8.
101. Ahuja D, Saenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene.* 2005;24:7729–45.

102. Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:825–31.
103. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13681–6.
104. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 1998;273:18623–32.
105. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med.* 1992;175:1181–94.
106. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411:494–8.
107. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:657–85.
108. Kittler R, Surendranath V, Heninger A-K, Slabicki M, Theis M, Putz G, Franke K, Caldarelli A, Grabner H, Kozak K, Wagner J, Rees E, Korn B, Frenzel C, Sachse C, Sonnichsen B, Guo J, Schelter J, Burchard J, Linsley PS, Jackson AL, Habermann B, Buchholz F. Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat Methods.* 2007;4:337–44.
109. How Cationic Lipid Mediated Transfection Works. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html>. Accessed 5 Sep 2017.
110. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402–8.
111. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
112. Cell atlas - GAPDH - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111640-GAPDH/cell>. Accessed 15 Oct 2017.

113. siRNA Frequently Asked Questions for Experimental Design. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/sirna/learning-center/mission-sup-reg0/experimental-design0.html>. Accessed 5 Sep 2017.
114. MISSION® siRNA Universal Negative Controls - MISSION siRNA | Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/molecular-biology-products.html?TablePage=101258984>. Accessed 5 Sep 2017.
115. Barchowsky A, Frleta D, Vincenti MP. Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: Divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*. 2000;12:1469–79.
116. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: Evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res*. 1989;24:207–13.
117. Fan Z, Yang H, Bau B, Soder S, Aigner T. Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int*. 2006;26:900–3.
118. Zhang Y, Ma KL, Liu J, Wu Y, Hu ZB, Liu L, Lu J, Zhang XL, Liu BC. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation and podocyte injuries in diabetic nephropathy. *Acta Diabetol*. 2015;52:1045–56.
119. Wilhelm SM, Eisen AZ, Teter M, Clark SD, Kronberger A, Goldberg G. Human fibroblast collagenase: Glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:3756–60.
120. Clark IM, Cawston TE. Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J*. 1989;263:201–6.
121. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*. 2010;20:161–8.
122. Cell atlas - Search: klf AND transcription factors - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/search/klf+AND+transcription+factors>. Accessed 15 Oct 2017.
123. Cell atlas - ZNF580 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000213015-ZNF580/cell>. Accessed 15 Oct 2017.

124. Lipofectamine® 2000 | Thermo Fisher Scientific.  
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-culture/transfection-protocol/lipofectamine-2000.html>. Accessed 4 Mar 2018.
125. Stenzel, Philipp. Untersuchungen zum Einfluss von Zinkfinger-Protein 580 auf die LPS-induzierte Interleukin-6-Produktion in Monozyten. 16.06.2018. <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/4242>. Accessed 15 Aug 2018.
126. Murayama R, Kobayashi M, Takeshita A, Yasui T, Yamamoto M. MAPKs, activator protein-1 and nuclear factor- $\kappa$ B mediate production of interleukin-1 $\beta$ -stimulated cytokines, prostaglandin E2 and MMP-1 in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2011;46:568–75.
127. Woessner F, Nagase H. Matrix metalloproteinases. Oxford: Oxford University Press; 2000.
128. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int.* 2016;89:1221–30.
129. Fields J, Cisneros IE, Borgmann K, Ghorpade A. Extracellular regulated kinase 1/2 signaling is a critical regulator of interleukin-1 $\beta$ -mediated astrocyte tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression. *PLoS One.* 2013;8:e56891.
130. Huang H-Y, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong Y-K, Polan ML. Cytokine-Mediated Regulation of 92-Kilodalton Type IV Collagenase, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1721–9.
131. Caliskan SG, Bilgin MD, Kozaci LD. Effect of pulsed electromagnetic field on MMP-9 and TIMP-1 levels in chondrosarcoma cells stimulated with IL-1 $\beta$ . *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:2701–5.
132. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: Differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000;43:801–11.
133. Narita I, Shimada M, Yamabe H, Kinjo T, Tanno T, Nishizaki K, Kawai M, Nakamura M, Murakami R, Nakamura N, Tomita H, Saleem MA, Mathieson PW, Okumura K. NF- $\kappa$ B-dependent increase in tissue factor expression is responsible for hypoxic podocyte injury. *Clin Exp Nephrol.* 2016;20:679–88.
134. Han J, Liang H, Yi J, Tan W, He S, Wu X, Shi X, Ma J, Guo X. Selenium deficiency induced damages and altered expressions of metalloproteinases and their inhibitors (MMP1/3, TIMP1/3) in the kidneys of growing rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2016;34:1–9.

135. Aoyama T, Yamamoto S, Kanematsu A, Ogawa O, Tabata Y. Local delivery of matrix metalloproteinase gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tissue Eng.* 2003;9:1289–99.
136. Cornish TC, Bagnasco SM, Macgregor AM, Lu J, Selvin E, Halushka MK. Glomerular Protein Levels of Matrix Metalloproteinase-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Are Lower in Diabetic Subjects. *J Histochem Cytochem.* 2009;57:995–1001.
137. Fang Z, He F, Chen S, Sun X, Zhu Z, Zhang C. Albumin modulates the production of matrix metalloproteinases-2 and -9 in podocytes. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2009;29:710–4.
138. Liu S, Liang Y, Huang H, Wang L, Li Y, Li J, Li X, Wang H. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2005;16:207–16.
139. Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, Knight D, Brenchley PE, Zent R, Humphries MJ. Global Analysis Reveals the Complexity of the Human Glomerular Extracellular Matrix. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:939–51.
140. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ. The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *J Biol Chem.* 1981;256:9511–5.
141. Sang QA, Bodden MK, Windsor LJ. Activation of human progelatinase A by collagenase and matrilysin: Activation of procollagenase by matrilysin. *J Protein Chem.* 1996;15:243–53.
142. Sang QX, Birkedal-Hansen H, van Wart HE. Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1251:99–108.
143. Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin-1 beta in patients with coronary artery disease. *Heart.* 1996;76:24–8.
144. Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G. Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. *Mediators of Inflammation* 2013.
145. Kabir S, Daar GA. Serum levels of interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in patients with gastric carcinoma. *Cancer Lett.* 1995;95:207–12.
146. Niemir ZI, Stein H, Dworacki G, Mundel P, Koehl N, Koch B, Autschbach F, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R, Otto HF. Podocytes are the major source of IL-1 alpha and IL-1 beta in human glomerulonephritides. *Kidney Int.* 1997;52:393–403.

147. Brähler S, Ising C, Hagmann H, Rasmus M, Hoehne M, Kurschat C, Kisner T, Goebel H, Shankland S, Addicks K, Thaiss F, Schermer B, Pasparakis M, Benzing T, Brinkkoetter PT. Intrinsic proinflammatory signaling in podocytes contributes to podocyte damage and prolonged proteinuria. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2012;303:F1473-F1485.
148. Pawluczyk IZA, Yang B, Patel SR, Saleem MA, Topham PS. Low-level C-reactive protein levels exert cytoprotective actions on human podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:2465–75.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Matthias Spree, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Zinkfingerprotein 580 (ZNF580) auf Matrixmetalloprotease-1 (MMP-1) in humanen Podozyten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen  
Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationen

Baum O, Aaldijk D, Engeli AL, **Spree M**, Summermatter S, Handschin C, Zakrzewicz A. Relation of nNOS isoforms to mitochondrial density and PGC-1alpha expression in striated muscles of mice. *Nitric Oxide*. 2018;77:35-43.

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler für die Bereitstellung des Themas sowie die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin anzufertigen, herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Zakrzewicz für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, sowie die kritische und sorgfältige Korrektur meines Manuskripts. Insbesondere für seine Denkanstöße, auch aus nicht-medizinischen Gebieten, bin ich sehr dankbar.

Bei Frau Dr. Ulrike Leppert möchte ich mich sehr herzlich für die sorgfältige Einarbeitung in die Laborarbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der ersten Experimente bedanken.

Frau Dr. Janine Berkholz bin ich sehr dankbar für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenzmikroskopie und für die Hilfsbereitschaft bei allen Problemen im Labor.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zakrzewicz für die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für die Unterstützung meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung während meiner Promotion und für die Aufmunterungen, wenn ein Versuch wieder einmal nicht funktionierte, von Herzen bedanken.