

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie, Zentrum für Experimentelle Medizin unter der Leitung von

Professor Dr. med. Gabriele Rune

Doktorvater: Professor Dr. rer. nat. Lars Fester

Der Einfluss der endogenen 17β -Estradiolsynthese auf die Motilität von Podozyten der Ratte *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Martin-Páris Keller

geboren am 02. April 1986 in Helmstedt

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.12.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter Prof. Dr. Lars Fester

Meinen Eltern
Maria Keller-Pagiavli und Dr. Hans-Jürgen Keller
und
Johann Hektor; Du gibst zu den schönsten Hoffnungen Anlass

„Everything not saved will be lost“
- Nintendo „Quit Screen“ Message -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Anatomische Grundlagen	1
1.1.1	Glomerulus	2
1.1.2	Der Podozyt	3
1.1.3	Die Filtrationsbarriere	6
1.2	Molekulare Architektur der Fußfortsätze	7
1.2.1	Podozyten Fußfortsätze - Aktin und assoziierte Proteine	7
1.2.2	Aktinfilamente und Zielproteine	9
1.3	Synaptopodin	10
1.3.1	Cofilin	12
1.4	Epidemiologie – Geschlechtsabhängige Inzidenz und Progression chronischer Nierenerkrankungen	14
1.5	Geschlechterdimorphismus bei Kindern	18
1.6	Estrogen im Tierexperiment	19
1.7	Estrogensynthese	20
1.7.1	Die Funktion von Estrogenrezeptoren	22
1.7.2	Die Rolle der Aromatase im Podozyten	24
1.8	Letrozol	25
1.9	Fragestellung	26
1.9.1	Hypothese	27

2. Material und Methoden

2.1	Geräte	28
2.2	Chemikalien	32
2.2.1	Antikörper	34
2.2.2	Lösungen und Puffer	36
2.3	Methoden	41
2.3.1	Präparation der Nieren	41
2.3.2	Dispersionskultur	42
2.3.3	Behandlung	42
2.3.4	Aufbereitung der Proteine und Proteinbestimmung nach Bradford	43

2.3.5	Zellkultur Stimulation	44
2.4	Immunhistochemie für Synaptopodin, P-Cofilin, N-Cofilin	44
2.4.1	Synaptopodin, P-Cofilin, N-Cofilin	45
2.4.2	Konfokales Laserscanning-Mikroskop	46
2.4.3	<i>ImageJ</i>	47
2.5	Statistische Auswertung	47
2.6	SDS-Gelelektrophorese	48
2.6.1	Proteinmarker	49
2.6.2	Western Blot (Nassblot)	49
2.7	Abkürzungsverzeichnis	52

3. Ergebnisse

3.1	Der Nachweis von Estrogenrezeptoren in Podozyten von Wistar Ratten	55
3.1.2	Podozyten exprimieren Aromatase	56
3.1.3	Podozyten besitzen die Fähigkeit 17 β -Estradiol <i>de novo</i> zu synthetisieren	58
3.1.4	Der immunhistochemische Nachweis von Aromatase, ER α und ER β in Wistar Ratten <i>in vivo</i>	60
3.2	Immunhistochemie	61
3.2.1	Synaptopodin ♀ ♂ in der Laserscanning-Mikroskopie	62
3.2.2	Cofilin ♂ in der Laserscanning-Mikroskopie	64
3.2.3	Cofilin ♀ in der Laserscanning-Mikroskopie	66
3.3	Auswertung der Western Blot Analyse	67
3.3.1	Einfluss unterschiedlich langer Letrozolbehandlung auf die Proteine Synaptopodin, N- und P-Cofilin	67
3.3.2	Synaptopodin ♀ ♂ in der Western Blot Analyse	68
3.3.3	N-Cofilin und P-Cofilin ♂ in der Western Blot Analyse	70
3.3.4	N-Cofilin und P-Cofilin ♀ in der Western Blot Analyse	71
3.4	Synaptopodin-Doppelbande	72

4. Diskussion

4.1	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Nachweis von Estrogenrezeptoren in der Wistar Ratte	79
-----	--	----

4.2	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Nachweis von Aromatase in der Wistar Ratte und der Nachweis von 17 β -Estradiol in Podozyten	82
4.3	Der Einfluss von Kurz- und Langzeitbehandlung mit Letrozol auf die Aktin-Zytoskelett assoziierten Proteine in Podozyten der Ratte	82
4.4	Synaptopodin Doppelbande	88
4.5	Ausblick	90
5. Zusammenfassung		93
5. Abstract		94
6. Literaturverzeichnis		95
7. Danksagung		116
8. Curriculum Vitae		118
9. Eidesstattliche Versicherung		119

1. Einleitung

1.1 Anatomische Grundlagen

Podozyten spielen eine zentrale Rolle bei Aufrechterhaltung der Blut-Harn-Schranke, von ihrem dynamischen Zytoskelett hängt ihre physiologische Form und Funktion ab. Bereits Ende der 1920er Jahre von Karl Zimmermann und Wilhelm von Möllendorff beschrieben, rückt der Podozyt seit einigen Jahren, verstärkt in den Fokus der Wissenschaft, wobei noch nicht abschließend herausgearbeitet ist wie genau der Podozyt funktioniert und wodurch er in seiner Funktionalität beeinflusst wird (von Möllendorff 1927; Zimmermann 1929).

Podozyten sind ein wichtiger funktioneller Bestandteil in den Nieren von Säugern (*Mammalia*), in denen sich Millionen Funktionseinheiten befinden - die so genannten Nephrone. Diese bestehen aus einem Glomerulus mit Bowman-Kapsel und dem tubulären System, in dem der Primärharn als Ultrafiltrat des Blutplasmas gebildet wird. Damit das Blut zum Nephron fließen kann existiert ein zuführendes Gefäß, das *Vas afferens*, welches letztendlich aus der Nierenarterie stammt. Das *Vas afferens* führt in das Kapillarknäuel der Glomeruli, aus dem das Blut über das *Vas efferens* Kontakt zum Tubulussystem hat. Den Übergang zwischen *Vasa afferentia* und *Vasa efferentia* bildet der Juxtaglomeruläre Apparat, der chemosensitiv ist und endokrin über Renin, eingebunden ins Renin-Angiotensin-Aldosteron-System den Blutdruck reguliert. Weiterhin wird über diesen Mechanismus die Ausscheidung und Konzentration von Urin reguliert sowie über die tubuloglomeruläre Rückkopplung die Menge des ausgeschiedenen Urins autoreguliert.

Im Anschluss an die Glomeruli folgt das Tubulussystem, in dem mittels der Henle-Schleife und dem Antidiuretischen Hormon Wasser, Ionen und andere harnpflichtige Stoffe sekretiert oder resorbiert werden. Der Tubulus lässt sich in drei verschiedene Abschnitte einteilen: Dem Proximalen Tubulus, die Henle-Schleife und der distale Tubulus. Diese drei Tubulusabschnitte lassen sich mikroskopisch anhand ihrer Epithelhöhe und der luminalen Oberflächenbeschaffenheit unterscheiden. Der distale Tubulus mündet in das Sammelrohr, das die Flüssigkeit verschiedener Nephrone in das Nierenbecken leitet. Über die Blase wird der konzentrierte Endharn (Sekundärharn oder Urin) über den *Ureter* der Blase zugeleitet und über die *Urethra* ausgeschieden.

Pro Tag werden circa 180 Liter Primärharn gebildet wovon ungefähr 80 – 90% in den proximalen Tubuli rückresorbiert werden. Pro Minute passiert also circa ein Liter Blut das Nephron, wovon 120 ml Flüssigkeit filtriert werden. Dieser Vorgang wird auch als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet.

Die GFR ist ein Parameter, um die Nierenfunktion von Patienten zu beurteilen. Normale Werte sind 85 – 135 ml/min pro 1,73 m² und werden im Plasma bestimmt (Männer: ≈ 110 ml/min; Frauen ≈ 95 ml/min). Ab dem 30. Lebensjahr nimmt die GFR um circa 10 ml/min pro Dekade ab. Um die GFR zu berechnen, wird nach dem Fickschen Prinzip die Mengenbilanz eines frei filtrierten Indikators gemessen.

1.1.1 Glomerulus

Die Bowman-Kapsel, die das gesamte Glomerulum umschließt, untergliedert sich in zwei Epithelschichten - dem *viszeralem* und dem *parietalem* Blatt. Diese beiden Blätter begrenzen den Bowmanschen Raum, in dem der Primärharn fließt und welcher letztendlich in das Tubulussystem übergeht. Das *parietale* Blatt setzt sich zusammen aus einem flachen, einschichtigen Epithel, das auf einer Basalmembran aufliegt. Diese Basalmembran geht über in die glomeruläre Basalmembran (GBM), auf dem die Podozyten mit ihren Zellfortsätzen das *viszerale* Blatt der Bowman- Kapsel bilden und mit dem Endothel der Kapillaren der Glomeruli die Filtrationsbarriere formieren (Abbildung 1).

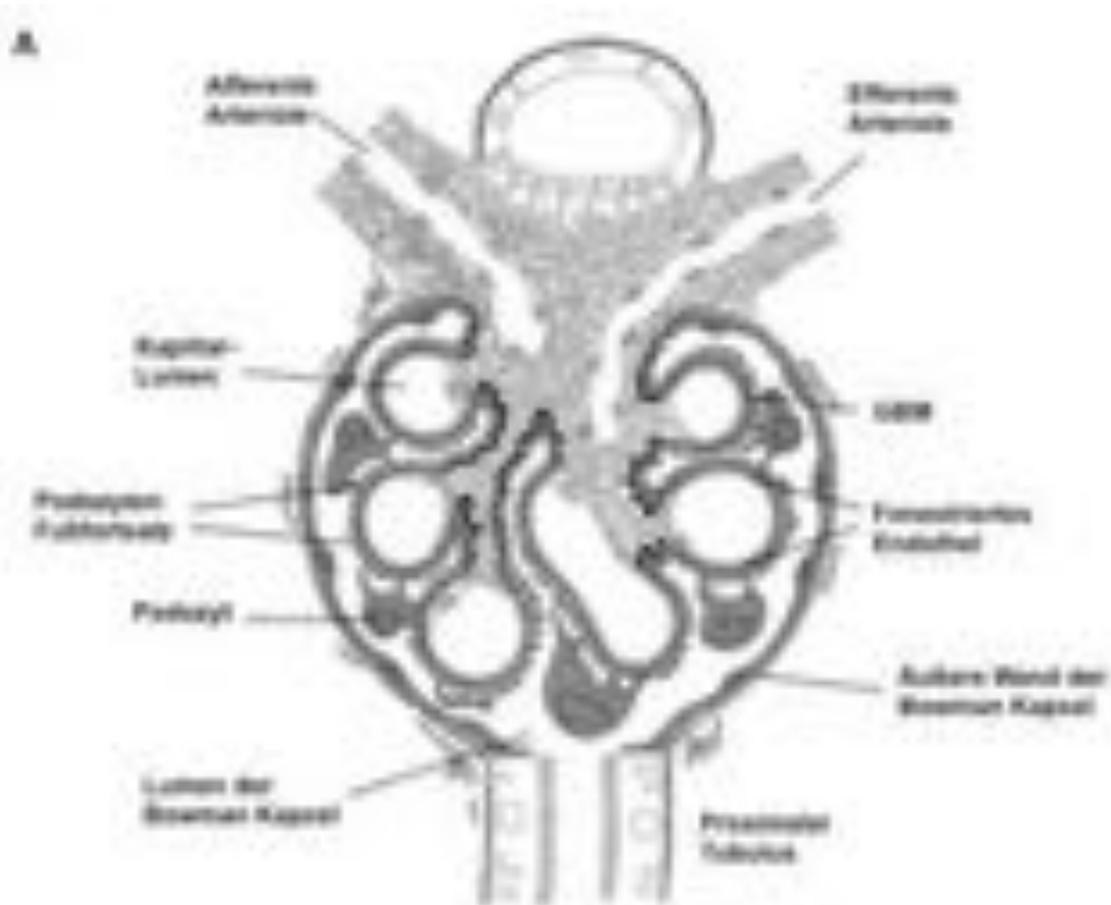


Abbildung 1: Aufbau eines Glomerulus. A: Schematische Darstellung der Struktur eines Glomerulus. In rot die äußere Wand des Glomerulus oder das parietale Blatt; in blau die Podozyten, die das viszerale Blatt bilden (modifiziert nach (Kriz et al. 1997)).

1.1.2 Der Podozyt

Podozyten bestehen aus drei Komponenten: Zellsoma, Primär- und Sekundärfußfortsätzen. Diese Fußfortsätze stehen in direktem Kontakt mit der GBM und dem Bowmanraum, in dem sich der Urin befindet.

Podozyten haben (*podos*, Griechisch: Fuß, Fuß-artig geformt = Füßchenzellen) fußartige Fortsätze, die wie zwei verschränkte Hände ineinandergreifen (interdigitierend) und dabei unterschiedlich große Schlitze bilden. Diese Fußfortsätze sind einzuteilen in große zytoplasmatische Projektionen, die als primäre Fußfortsätze und sekundäre Fußfortsätze (*Major-* und *Minorprocesses*) bezeichnet werden. (Abbildung 1 und 3). Die sekundären Fußfortsätze bilden mit benachbarten Podozytenausläufern ein dichtes Netzwerk mit einem 30 bis 40 nm breiten Spalt. (Barisoni und Mundel 2003; Wartiovaara et al. 2004) Zwischen diesen, durch Zell-Zell-Kontakte (siehe Punkt

1.2.1) interdigitierenden Fußfortsätzen, liegt die Schlitzmembran (Reiser et al. 2000), (Abbildung 1; 2; 3) die in ihrer physiologischen Funktion undurchlässig für Albumin ist und so die Ultrafiltration der Niere sicherstellt (Rodewald und Karnovsky 1974). Albumin ist das Protein mit der höchsten Konzentration im Blut und fähig, Anionen und Kationen reversibel zu binden sowie den kolloidosmotischen Druck zu beeinflussen. Die Podozytenausläufer bedecken das gesamte glomeruläre Kapillarknäuel und bilden die Filtrationsschlitz.

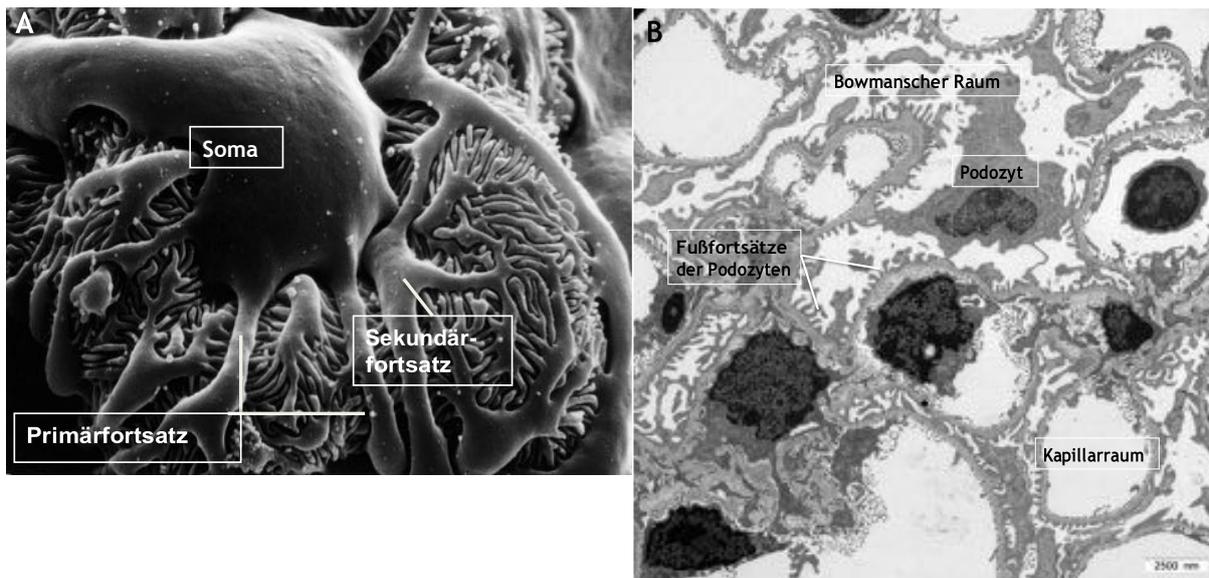


Abbildung 2: Morphologie eines Podozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahme (10.500-fache Vergrößerung) eines Podozyten aus dem Blickwinkel des Lumens der Bowman-Kapsel. Der Podozyt sitzt den Kapillarschlingen auf. Deutlich zu erkennen ist der Zellkörper, die dickeren Primärfortsätze sowie die sich daraus verzweigenden zarteren Sekundärfortsätze. Bei den interdigitierenden Sekundärfortsätzen benachbarter Podozyten sind die Filtrationsschlitz zu erkennen, an denen Plasma zur Urinproduktion gefiltert wird (modifiziert nach (Smoyer und Mundel 1998)). **B** Transmissionselektronenmikroskopisches Querschnittsbild der Filtrationseinheit mit Kapillaren und Bowman-Raum, bestehend aus Podozyten und ihren podozytären Fußfortsätzen. (Keller, M.-P. und Fester, L. 2018, Institut für Neuroanatomie UKE).

Die Adhäsion der sekundären Fußfortsätze an der GBM wird über die Verankerung der Podozyten in der GBM vorwiegend durch $\alpha3\beta1$ -Integrine (Kerjaschki et al. 1984) und Dystroglycan (Raats et al. 2000; Regele et al. 2000) vermittelt. Die Podozytären Zellkörper mit Zellkern befinden sich dabei frei flottierend im Lumen der Bowman-Kapsel.

Podozyten sind vielseitige Zellen. Podozyten synthetisieren extrazelluläre Matrixproteine für die GBM und sind somit beteiligt an der strukturellen Integrität des

glomerulären Gefäßkonvolutes (Kriz et al. 1996). Außerdem sind Podozyten durch die Bildung von Filtrationsschlitzen und der Schlitzmembran durch ihre Zellausläufer essenziell für die Ultrafiltration des Harns. Dazu weisen sie an ihrer apikalen Zelloberfläche, unter anderem durch Podocalyxin-Moleküle, eine negative Ladung auf (Kerjaschki et al. 1984). Diese Gegebenheiten führen hinsichtlich ihrer Ladungs- und Größenselektivität zu einer trennscharfen Filtrationsbarriere (Pavenstadt 1998).

Histologisch betrachtet sind Podozyten die einzigen postmitotischen Zellen des Glomerulus. Bei Podozyten *in vivo* konnten unter pathologischen Bedingungen bislang nur Kernteilungen, jedoch keine erneuten Zellteilungen beobachtet werden (Nagata et al. 1993; Nagata et al. 1995). Somit ist ihr einziger Adaptationsmechanismus die Hypertrophie und damit die Retraktion und Protraktion ihrer Fußfortsätze (Shirato et al. 1996). Nach endgültiger Ausdifferenzierung sind Podozyten nicht mehr zu mitotischer Zellteilung fähig (Kriz et al. 1996; Rennke 1994). Dies macht pathologische Veränderungen, oder den Ausfall dieses Zelltyps bei Erkrankungen der Nieren besonders dramatisch (Kriz 2002) (siehe Punkt.1.4).

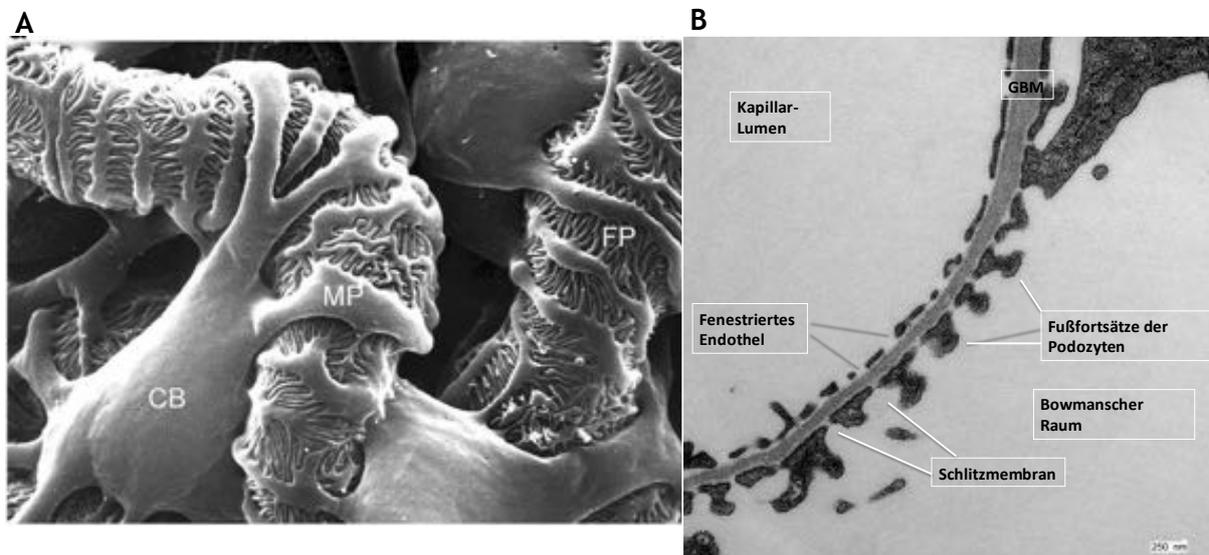


Abbildung 3: A: Podozyten via Elektronenmikroskop aus dem Lumen der Bowman Kapsel aufgenommen. MP = Primärfortsätze, CB = Soma, FP = Sekundärfortsätze, die mit benachbarten Podozyten interdigitieren und damit die Filtrationsschlitze bilden (modifiziert nach (Greka und Mundel 2012)).

B: Transmissionselektronenmikroskopisches Bild der Filtrationsbarriere, bestehend aus fenestriertem Endothel, Glomerulärer Basalmembran (GBM) und podozytären Fußfortsätzen, die von der Schlitzmembran bedeckt sind (Keller, M.-P. und Fester, L. 2018, Institut für Neuroanatomie UKE).

1.1.3 Die Filtrationsbarriere

Die Filtrationsbarriere verhindert den Übertritt von Proteinen die größer als Albumin sind. Albumin ist ein im Blutplasma gelöstes, monomeres 10 – 50 kDa großes Protein, das in etwa 50% der Proteine im Blut ausmacht und als Trägerprotein für Lipide, Schilddrüsenhormone und Steroidhormone dient. Marginale Veränderungen an der Schlitzmembran von Podozyten haben eine erhöhte Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere zur Folge. Dies verursacht eine selektive Ausscheidung von Albumin in den Urin (selektive Proteinurie). Bedeutendere Schädigungen der Filtrationsbarriere haben eine stärkere Umstrukturierung und somit eine unselektive Proteinurie (siehe Punkt 1.4) zur Folge. Diese ist mit dem Verlust von Makromolekülen assoziiert und führt letztendlich unbehandelt zum *Exitus* des Patienten.

Die Filtrationsbarriere ermöglicht, durch ihren molekularen Aufbau, eine Filtration des Blutes und seiner Bestandteile nach Größe und elektrischer Ladung. Niedermolekulare *Solute* und Wasser können so frei filtrierte werden, wohingegen Blutzellen und Makromoleküle bei physiologischer Funktion im Gefäß verbleiben.

Der effektive Filtrationsdruck ist die treibende Kraft des Filtrationsprozesses und wird neben dem Kapillardruck, dem onkotischen Druck des Plasmas und dem Druck im Tubulus von weiteren Faktoren wie der vasopressorischen Plasmakonzentrationen von Angiotensin II, Noradrenalin und auch der tubuloglomerulären Rückkopplung, also der NaCl-Hämöostase bestimmt.

Frei filtrierte werden Stoffe mit einer Molekülmasse kleiner als 6 – 15 kDa oder einem Molekülradius unter 1,6 – 1,8 nm. Unter physiologischen Umständen, also bei Molekülen über 80 kDa oder einem Radius von über 4,4 nm, ist der Filter dicht. Im Grenzbereich zwischen diesen Werten liegen Moleküle, die nur anteilig filtrierte werden: Myoglobin (17 kDa) zu 75% und Albumin zu circa 0,03%, oder auch kleinmolekulare Stoffe wie Ca^{2+} , die eine Proteinbindung eingehen. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Makromoleküle die ungeladen sind oder positive Ladungen aufweisen, stärker filtrierte werden. Die Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere - also bei einem Molekülradius zwischen 1,8 nm und 4,4 nm – ist ladungsabhängig. Dafür verantwortlich ist die anionische Glykokalix, die eine negative Ladung auf den Oberflächen der GBM und der Podozytenfortsätze aufweist.

Die Filtrationsbarriere der Glomeruli setzt sich zusammen aus den folgenden drei Komponenten: dem fenestrierten Endothel der Glomeruluskapillaren mit Poren von je etwa 50 – 100 nm Durchmesser, der glomerulären Basalmembran und den viszeralen glomerulären Epithelzellen (Podozyten). (Smoyer und Mundel 1998)

Lange war die molekulare Basis für Stabilität, Konversion oder *Effacement* der Podozyten unbekannt. Podozyten reagieren auf Pathologien stereotypisch. Sie retrahieren ihre Fußfortsätze zum Zellkörper - als ob sie ihre embryonale Entwicklung rückgängig machen wollten - um ein flaches Epithel zu formen. Ob es die Ursache oder die Folge der Schäden an dem glomerulären Filter ist, ist nicht bekannt. Zumindest für die Erkrankungen Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGN) (Punkt 1.4) scheint die podozytäre Schädigung die Hauptursache zu sein (Kerjaschki 2001).

1.2 Molekulare Architektur der Fußfortsätze

Die Fußfortsätze sind charakterisiert durch ein Podosom-artiges Netzwerk von kurzen und verzweigten Aktinfilamenten und strukturierten, parallel angeordneten, kontraktile Aktinfilament Bündeln, welche dafür zuständig sind, durch Änderungen der Fußfortsatz-Morphologie die Permeabilität der Filtrationsbarriere zu modulieren. Die Funktion von Podozyten basiert auf ihrer komplexen Zellarchitektur und damit vor allem - auf zytoskelettaler Ebene - der Aufrechterhaltung der parallelen Aktinfilament-Bündel. (Drenckhahn und Franke 1988; Greka und Mundel 2012)

1.2.1 Podozyten Fußfortsätze - Aktin und assoziierte Proteine

Podozyten können in drei strukturell und funktional unterschiedliche Segmente unterteilt werden: Zellkörper, Hauptfortsätze und Fußfortsätze – die Fußfortsätze interdigitieren mit benachbarten Zellen und bilden die Schlitzmembran an der Außenseite der Basalmembran. Sie bilden also die letzte Barriere, um Proteine zu halten. Dies erklärt, warum es bei Podozytenverletzungen typischerweise zur Proteinurie kommt. Die Veränderungen am Podozyten sind dabei uniform (Asanuma und Mundel 2003):

- a) Veränderungen der physiologischen Architektur an der Schlitzmembran und ihren „*lipid rafts*“ (Doppelmembran – „Flüssig-Mosaik-Modell“)
- b) Störungen am Aktin-Zytoskelett
- c) Störungen an der Basalmembran oder der Podozyten-Basalmembran-Interaktion
- d) Veränderungen an der negativ geladenen Oberfläche der Podozyten

Das Zytoskelett ist ein Netzwerk dynamisch miteinander agierender Proteine, die sich durch die Fähigkeit auszeichnen, sich „tretmühlenartig“ schnell auf- und abzubauen und damit auf Veränderungen oder neue Anforderungen flexibel zu reagieren (Pollard und Borisy 2003; Fass et al. 2004). Das so genannte und im fortlaufenden Text verwendete „*Treadmilling*“ beschreibt, die im Zytoplasma eukaryotischer Zellen stattfindende Polymerisation von Aktinfilamenten. Bei kontinuierlichem Aktinmonomerfluß, bei der gleichzeitig am Plusende auf- und am Minusende abgebaut wird, behält das Aktinfilament seine Länge bei. Die Elongation der Aktinfilamente geschieht nur am Plusende (Oosawa und Asakura 1975). Um diesen Vorgang zu beschleunigen, existiert das so genannte *severing* (Trennen) (Chen und Pollard 2011), bei dem Untereinheiten von Aktinfilamenten durch Auftrennen der Longitudinalstruktur gebildet werden. Dies wird durch Cofilin (Punkt 1.3.1) beeinflusst, den „Samurai“ der Aktinfilamente (Bamburg 1999; Wang et al. 2007; De La Cruz 2009; Bernstein und Bamburg 2010) (Abbildung 4E).

Die Dynamik des Zytoskeletts spielt also eine große Rolle bei Aufrechterhaltung der Normalfunktion, bei der physiologischen Filtrationsbarriere, der Motilität (Pollard und Borisy 2003) und bei der Pathogenese von Podozytenerkrankungen.

Die Komplexität dieses Vorgangs wird deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass hunderte Proteine am *Treadmilling* beteiligt sind und die Dynamik sowie die Struktur beeinflussen (Abbildung 4).

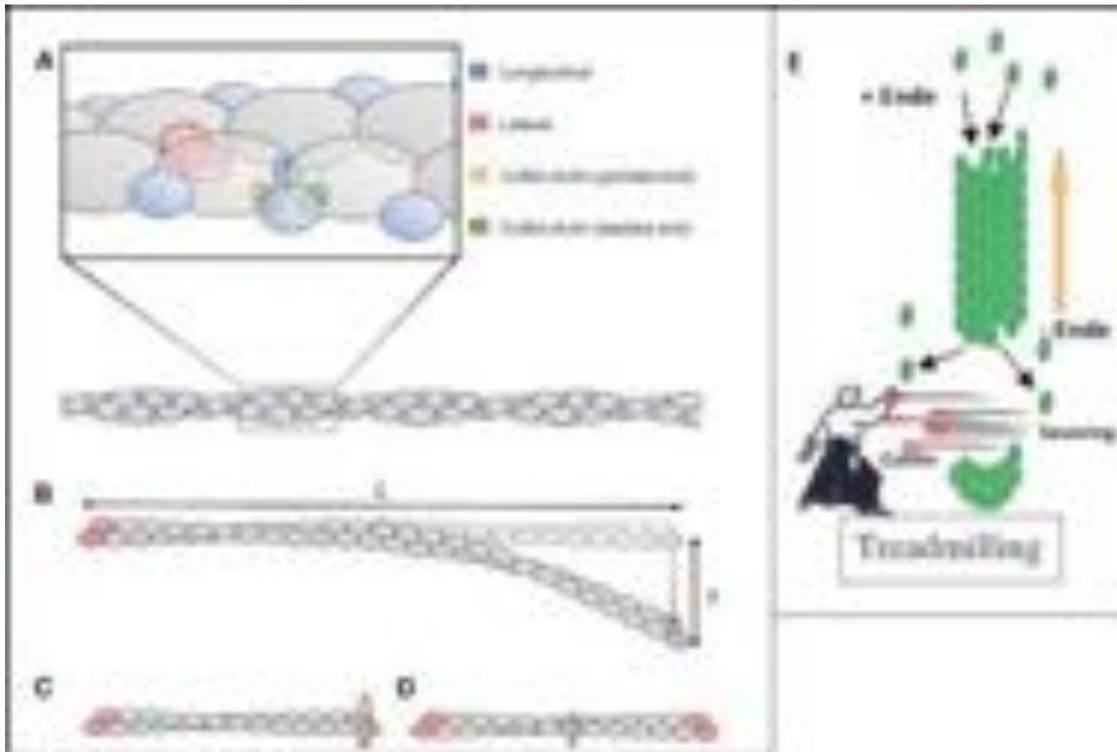


Abbildung 4: **A:** Aktin in grau, Cofilin in blau **B:** Mechanischer Stress induziert *severing* durch Cofilin und seine Biegeeigenschaft und reziproke Steifigkeit (*bending and twisting compliance*) **C** und **D:** zwei Untereinheiten. Bei **D** lagert sich bei wiederholtem mechanischem Stress, Cofilin medial an der Untereinheit an (modifiziert nach (Schramm et al. 2017)).

E: Treadmilling: Cofilin, der „Zelluläre Samurai“: eine neue Untereinheit des Aktinfilaments wird geschaffen, am Minus-Ende (– Ende) abgebaut und am Plus-Ende (+ Ende) aufgebaut. Der Samurai soll das Protein Cofilin darstellen, der Pfeil zeigt in die Konstruktions-Richtung (modifiziert nach (Quarby 2000)).

1.2.2 Aktinfilamente und Zielproteine

Es existieren am Zytoskelett eukaryonter Zellen drei Hauptkomponenten: Aktinfilamente (Aktin), Mikrotubuli (Tubulin) und Intermediärfilamente.

Für diese Arbeit ist Aktin, welches in G-Aktin (Monomer) und F-Aktin (Polymer = Filamentöses-Aktin) unterteilt wird, am wichtigsten. Podozyten sind hoch spezialisierte und dynamische Zellen, die durch ein wandelbares Aktin-Zytoskelett schnell und umfassend auf pathologische Veränderungen oder veränderten intraglomerulären Perfusionsdruck reagieren können. (Ashworth et al. 2010)

Folgende Proteine sind assoziiert mit *Treadmilling*, insbesondere mit Aktin und damit essenziell für diese Dissertation (Ashworth et al. 2010):

- Synaptopodin – aktinassoziiertes Protein.

- N-Cofilin (*non-muscle* Cofilin oder Cofilin-1) – Depolarisation an den Minusenden der Filamente.
- P-Cofilin (Phospho-Cofilin, Phosphoryliert am N-terminalem Serin-3) – verwandt mit *actin depolymerizing factor* (ADF) (Bamburg et al. 1980; Huang et al. 2006).

1.3 Synaptopodin

Das 1991 erstmals von Mundel *et alia* beschriebene Aktin-bindende Protein Synaptopodin (44 kDa), ist hoch exprimiert in dynamischen Kompartimenten motiler Zellen, wie derer im dendritischen *Spine*-Apparat und dem Axoninitialsegment von Neuronen sowie in den Fußfortsätzen von Podozyten. (Mundel et al. 1991; Mundel et al. 1997a; Mundel 1997b)

Synaptopodin existiert in drei bekannten Isoformen:

- *neuronal Synpo – Short* (685 Aminosäuren)
- *renal Synpo – Long* (903 Aminosäuren)
- *Synpo – T* (181 Aminosäuren)

Alle drei Isoformen binden an α -actinin und regulieren die Bindungsaffinität an Aktin sowie die Elongation α -actinin-4-induzierter Aktinfilamente. Synaptopodin bindet außerdem direkt an CD2AP und MAGI-1 - zwei Proteine, die die Zelloberflächenrezeptoren mit dem Zytoskelett der Schlitzmembran und der GBM verbinden. (Asanuma et al. 2005) (siehe Punkt 1.1.2)

Das Prolin-reiche Protein Synaptopodin ist grundlegend für die physiologische Funktionsweise des Aktin-Zytoskelett und für *Stress-Fasern* (*stress fibers*). Stress-Fasern sind kontraktile Aktin-Bündel in Zellen nicht-muskulären Ursprungs, die neben Synaptopodin und α -actinin über verschiedene Proteine Quervernetzungen in Zellen aufbauen und mittels Rho-GTPasen orchestriert werden. (Asanuma et al. 2006) Stress-Fasern sind relevant für die zelluläre Kontraktilität, die Adhäsion, Migration und Morphogenese von Zellen. Das Ausschalten der Gene (*Gene silencing*) von Synaptopodin in Podozyten verursacht den Verlust der Stress-Fasern (Asanuma et al. 2006), die substanzuell für Migration und Kontraktilität, Adhäsion und Morphologie der Podozyten sind und die Plastizität der Podozyten modulieren (Yanagida-Asanuma et al. 2007).

Im *Cerebrum* sowie der Niere *in vivo* und *in vitro*, ist die Expression von Synaptopodin von der Differenzierung der Zellen abhängig. Im Gehirn der Ratte wird - während der postnatalen Reifung - Synaptopodin erst ab Tag 15 im Western Blot detektiert. Die exklusive Synaptopodin-Synthese im *Telencephalon* wurde durch *in situ Hybridisierung* bestätigt. Dabei wurde Synaptopodin-mRNA nur in den Perikaryen des cerebralen Cortex, dem Olfaktorischen Bulbus, dem *Striatum* und dem *Hippocampus*, also an Orten mit hoher synaptischer Plastizität gefunden. (Mundel et al. 1997a; Mundlos et al. 1993)

Während der Nephrogenese wird in Podozyten-Vorläuferzellen noch kein Synaptopodin exprimiert. Erst wenn sie anfangen sich zu differenzieren und die für sie typische Fußfortsatz-Architektur entwickeln, ist Synaptopodin nachweisbar. (Mundel et al. 1991) Wie unter Punkt 1.3 beschrieben, ist Synaptopodin assoziiert mit Aktinfilamenten der Fußfortsätze. Im *Cerebrum* korreliert die verzögerte Erscheinung von Synaptopodin während der postnatalen Hirnentwicklung und der Reifung kultivierter hippocampaler Neuronen mit der Reifung Synaptischer Formation des dendritischen *Spine*-Apparates (Papa et al. 1995; Ziv und Smith 1996). In beiden Geweben korreliert die Formation von Zellfortsätzen mit der „Bühnenreife“ von Synaptopodin auf dem „Zellparkett“. In der Niere sind Podozyten mit ihren Fußfortsätzen zu Retraktion und Protraktion fähig (Shirato et al. 1996), in Formationen dendritischer *Spines* im *Telencephalon* (Wallace et al. 1991) sowie in hippocampalen Kulturen (Papa et al. 1995; Ziv und Smith 1996), reorganisieren sich Neurone und verändern ihre synaptische Plastizität.

Synaptopodin aus dem *Cerebrum* ist ein Protein mit einer kalkulierten Masse von 73,7 kDa (Mensch) / 74,0 kDa (Maus) und einem isoelektrischen Punkt von 9,38 (Mensch) / 9,27 (Maus). Die kalkulierte Masse und das tatsächliche molekulare Gewicht differieren in der Western Blot Analyse (100 kDa). Dies könnte am ehesten an posttranslationaler Modifikation oder dem hohen Prolingehalt in diesen Zellen liegen. Synaptopodin aus den Glomeruli der Niere hingegen hat eine leicht höhere Masse im Western Blot (110 kDa) als das gleiche Protein aus dem Gehirn. Der genaue Grund dafür ist unbekannt. Höchst wahrscheinlich ist auch hier eine postranslationale Modifikation oder eine anders geartete Phosphorylierung des „Nieren“-Synaptopodins ursächlich. (Mundel et al. 1997a)

Kemeny *et alia* konnten eine verminderte Expression von Synaptopodin in Nierenbiopsien von Patienten mit Fokal-Segmental-Glomerulärer-Sklerose

nachweisen (Kemeny et al. 1997). Srivastava *et alia* konnten bei Untersuchung des nephrotischen Syndroms sowie bei 13 Kindern mit FSGS, eine fehlende Synaptopodin-Expression in sklerosierten Bereichen und eine Verminderung von Synaptopodin in nicht-sklerosierten Bereichen nachweisen (Srivastava et al. 2001). Bei Synaptopodin handelt es sich um ein stark Estrogen-responsives Protein (Fester et al. 2009). Synaptopodin wird durch Ca^{2+} abhängige Phosphorylierung der Aromatase-Aktivität (in *Hippocampi* von Wistar Ratten und Knockout-Mäusen) reguliert (Fester et al. 2017).

1.3.1 Cofilin

Cofilin-1 (21 kDa) ist ein in Eukaryonten ubiquitär vorkommendes intrazelluläres Aktin-modulierendes Protein. Es stammt aus der Familie mehrerer Aktin-modulierender Proteine wie Cofilin-1 (Gen: CFL1), Cofilin-2 (Gen: CFL2) und Aktin depolarisierender Faktor (ADF) (Gen: DSTN) (NCBI). Aktin depolarisierender Faktor (Synonym: Destrin) (Hawkins et al. 1993) und Cofilin gehören zu einer Familie von Proteinen, die in Zellen von Eukaryonten für die Umsatzraten und das Depolarisieren von Aktinfilamenten *in vivo* verantwortlich sind. ADF und Cofilin arbeiten kooperativ bei der Regulation des Zytoskeletts. Gleichzeitig sind sie Isoproteine, die eine ähnliche Tertiärstruktur zeigen, aber auf unterschiedliche Weise das Gleiche bewirken. Beide sind phosphoryliert inaktiv und induzieren die Trennung von Aktinfilamenten (*severing*) und nukleäre Translokation bei Stress. (Hatanaka et al. 1996; OMIM)

Wenn in dieser Dissertation im fortlaufenden Text von Cofilin die Rede ist wird immer Cofilin-1 gemeint sein.

Cofilin wurde erstmals 1984 beschrieben und von Maekawa *et alia* aus Schweinegehirn extrahiert (Maekawa et al. 1984; Nishida et al. 1984a) sowie in der Niere nachgewiesen (Nishida et al. 1985). Es ist essenziell und verantwortlich für die hohen Umsatzraten von Aktinfilamenten *in vivo* und damit für die Organisation von Aktinfilamenten intrazellulär, die Motilität der Zelle, Zytokinese, Zellpolarität, für Neuronale Pfade und für die Stabilität in Organismen (Zigmond 1993; Rosenblatt et al. 1997; Carlier et al. 1997; Lappalainen et al. 1997). Dabei wurde Cofilin vor allem F-Aktin-gebunden beschrieben, in einem Verhältnis 1:1 mit Aktin-Untereinheiten (Nishida et al. 1984b). 1990 wurde Cofilin dann auch in der humanen Plazenta von

Ogawa *et alia* beschrieben (Ogawa et al. 1990).

Cofilin arbeitet auf zwei Weisen: es schneidet Aktinfilamente (*severing*) und erhöht die Rate der Neuorganisation am *Filament's point end* (Maciver und Hussey 2002) (Abbildung 4 und 5). Die Geschwindigkeit des *severings* und die Bindungsrate sind dabei pH-abhängig (bei pH-Werten unter 7 existieren hohe Bindungsraten und bei pH-Werten um 8 hohe *severing*- und Depolarisationsraten) (Hawkins et al. 1993; Frieden et al. 1998).

Cofilin liegt in zwei Formen vor: dem dephosphorylierten Cofilin (Cofilin-1 oder N-Cofilin) und dem phosphorylierten P-Cofilin (Bamburg 1999). Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts wird also durch Cofilin mitbestimmt. Phosphoryliertes und damit inaktiviertes (P-)Cofilin wird vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert und ist somit zum F-Aktin-Umbau nicht verfügbar (*Treadmilling*) (Teng et al. 2012; Ashworth et al. 2010; Huang et al. 2006) (Abbildung 5). Die F-Aktin-Bindung und die depolymerisierende Aktivität von Cofilin ist durch Phosphorylierung stark reduziert (Morgan et al. 1993).

Cofilin Fehlfunktion führt dazu, dass die Fußfortsätze der Podozyten diffus verkürzen und ausdünnen (dies wird im fortlaufenden Text *Effacement* genannt). Weiterhin kommt es zu Proteinurie im Zebrafisch und zu verminderter Migrationsfähigkeit der Podozyten beim Menschen. Bei glomerulären Erkrankungen wurde (P-)Cofilin im Zellkern phosphoryliert und inaktiviert gefunden, bei gesunden Probanden wurde dephosphoryliertes (N-)Cofilin dagegen in der ganzen Zelle beobachtet (Ashworth et al. 2010; Berger und Moeller 2011).

In Cofilin-Knockoutmäusen findet während der embryonalen Entwicklung keine Polarisation der Zelle statt und dort ist kein F-Aktin zu detektieren. ADF ist in diesen Zellen vermehrt exprimiert, kann die Rolle von Cofilin aber nur ungenügend einnehmen und ist kein Ersatz für Cofilin. (Gurniak 2005)

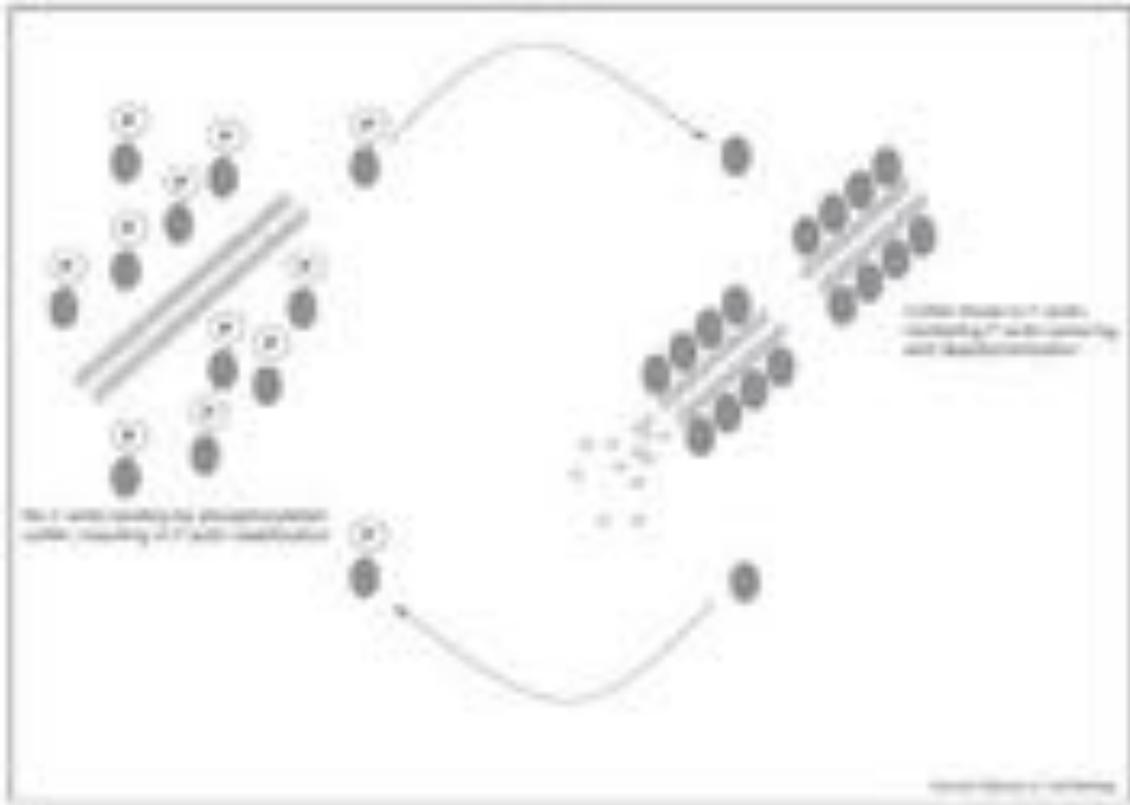


Abbildung 5: Phosphoregulatorischer Regelkreis Cofilins.

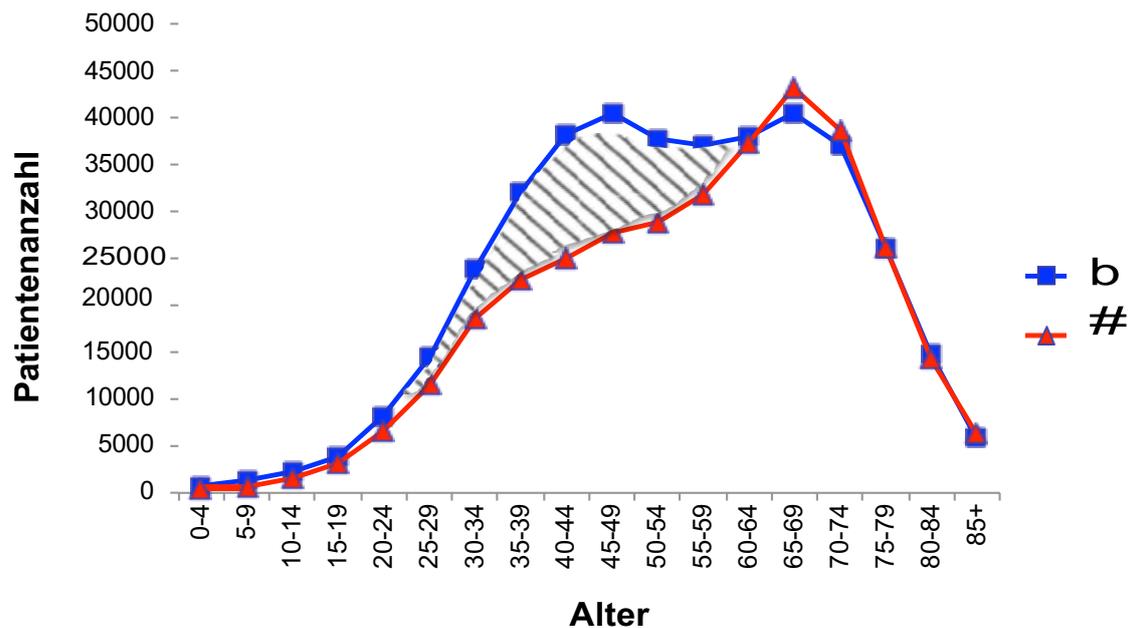
Die Phosphorylierung von Cofilin inhibiert die Bindung an F-Aktin und führt so zu einer Stabilisierung von F-Aktin. Dephosphorylierung hingegen führt zu Depolymerisation und *severing* von F-Aktin. *Severing* kann die Nukleation von Aktin stimulieren und damit die Reorganisation von Aktin und die damit einhergehende direktionale Motilität (modifiziert nach (Huang et al. 2006)).

1.4 Epidemiologie – Geschlechtsabhängige Inzidenz und Progression chronischer Nierenerkrankungen

Die Inzidenz von Nierenversagen (ESRD oder *end stage renal disease*) ist bei chronisch renal Erkrankten der männlichen Bevölkerung höher als bei der weiblichen. Diese geschlechtsabhängigen Unterschiede variieren mit unterschiedlichem Lebensalter: Die *Ratio* zwischen Männern und Frauen zeigt zwei Spitzen. Die erste Spitze tritt im Kleinkindalter auf und ist unter anderem auf kongenitale urologische Anomalien, die vor allem Jungen betreffen, zurückzuführen. Die zweite Spitze zeigt sich im vierten Lebensjahrzehnt, bei der die Aktivität der Sexualhormone der Frau durch Menarche und Menopause Änderungen unterliegen. Diese Geschlechtsspezifischen Unterschiede werden nach der Menopause geringer (Abbildung 6). (Berg 2006; Kummer et al. 2012) Aktuellere Ergebnisse bestätigen diese Daten. Aus den Berichten der *European Renal Association* (ERA) des Jahres

2015 und des *United States Renal Data System* des Jahres 2017 (Kramer et al. 2018; USRDS 2017) geht hervor, dass die Inzidenz von ESRD bei Frauen signifikant niedriger ist als bei Männern. Dies ist in allen Altersgruppen so und hat sich in den letzten Jahren nicht geändert. (Valdivielso 2019)

Geschlechtsabhängige Inzidenz bei Niereninsuffizienz



US Renal Data System, Annual Data Report, 2000

Abbildung 6: Prävalenz der ESRD in den USA, abhängig von Alter und Geschlecht. Bei Frauen ist zu beobachten, dass die Inzidenz der renalen Insuffizienz nach der Menopause zunimmt. Bei Männern hingegen erreicht die Inzidenz circa 30 Jahre vorher die Amplitude der Inzidenz der Frauen. (U.S. Renal Data System 2000, The National Institute of Health) (modifiziert nach Kummer et al. 2012).

Zwei Mechanismen könnten verantwortlich für diese Unterschiede zwischen den Geschlechtern sein (Abbildung 7):

A) Geschlechtsspezifische Unterschiede kongenitaler urologischer Anomalien, vor allem vor dem Hintergrund, dass Hormone der Mutter über die Plazenta im Embryo wirken und somit genetische Faktoren eine starke Rolle spielen. Diese Gruppe ist also weniger wichtig im Bezug auf hormonelle Unterschiede.

B) Der Einfluss geschlechtsspezifischer Hormone auf die Nierenfunktion und

Struktur. Dies geschieht entweder direkt an der Niere über Androgenrezeptoren, an den Nierenzellen oder aber indirekt z.B. über kardiovaskuläre Variablen.

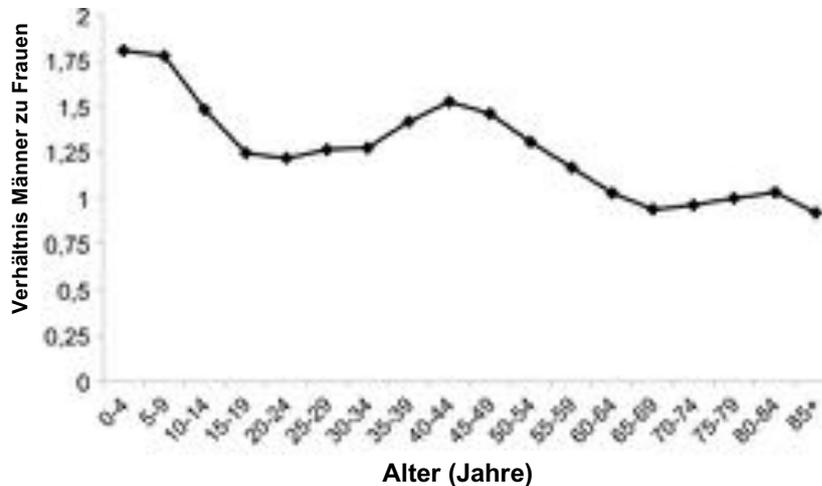


Abbildung 7: Verhältnis Mann zu Frau bei ESRD. Die erste Amplitude während der frühen Kindheit ist teilweise auf kongenitale Anomalien (Angeborene Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege) der Jungen zurückzuführen; der häufigste Grund für Nierenversagen in diesem Alter. Die zweite Amplitude markiert Menarche und Menopause, in denen sich die Hormonelle Situation der Frau umstellt (modifiziert aus Kummer et al. 2012, die Daten sind aus U.S. Renal Data System 2000 Annual Data Report. The National Institutes of Health, NIDDK, Bethesda, MD).

Berg *et alia* zeigten, dass Männer eine signifikante Abnahme der GFR zwischen dem 20. und dem 50. Lebensjahr entwickelten, die sich nicht bei Frauen zeigte. Frauen scheinen prä-menopausal durch Estrogene geschützt zu werden. Diese Ergebnisse konnten in Experimenten mit Ratten bestätigt werden. (Berg et al. 2006; Baylis und Corman 1998) In einer großen Metaanalyse mit 11.345 Patienten in 68 Studien (Neugarten et al. 2000) zeigte sich, dass Frauen mit polyzystischen Nierenerkrankungen, membranöser Glomerulonephritis und Nephropathien ungeklärter Genese, eine verbesserte Prognose aufwiesen als Männer. Cattran *et alia* zeigten in einer Studie mit 395 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis und 370 Patienten mit FSGS, einen signifikanten Vorteil des weiblichen Geschlechts bei Messungen der Kreatinin-Clearance sowie der generellen Nierenfunktion. Der negative Einfluss von Proteinurie war bei den Frauen weniger ausgeprägt. (Cattran et al. 2008)

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei systemischen Erkrankungen. Systemischer Lupus

Erythematodes (SLE), der häufiger beim weiblichen Geschlecht auftritt, hat bei Jungen öfter eine Nierenbeteiligung zur Folge, die sich außerdem ausgeprägter darstellt als bei Mädchen (Molina et al. 1996).

Eine weitere größere Metaanalyse mit über 27.000 Patienten mit Diabetes Mellitus Typ I, zeigte ein erhöhtes Risiko des männlichen Geschlechts, eine frühe diabetischen Nephropathie zu entwickeln (Raile et al. 2007). Seit langem ist bekannt, dass ein Transplantat der Niere bei Frauen als Empfängerinnen, eine bessere Prognose sowie ein besseres Überleben zeigt (Reed et al. 1992; Chen et al. 2013). Konträr zu diesen Ergebnissen haben Transplantate von weiblichen Spendern eine niedrigere Überlebensrate, als die von männlichen (Zeier et al. 2002). Dieser Effekt ist bei jüngeren Spendern ausgeprägter (16 - 45 Jahre) als bei älteren (> 45 Jahre). Als Grund hierfür wird vermutet, dass der plötzliche Verlust von prämenopausalem Estrogen das Überleben und die Prognose des Transplantats negativ beeinflussen. Ähnliche Prognosen konnten nach Herztransplantationen beobachtet werden. (Zeier et al. 2002)

Nicht nur die Niere scheint von Estrogen zu profitieren. Estrogen wirkt kardioprotektiv und die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse erhöht sich postmenopausal bei Frauen (Rosano et al. 2006). Es konnten positive kardiovaskuläre Effekte einer Niedrigdosistherapie mit Estrogen festgestellt werden - vor allem Lipide, Atherogenese und Vasodilatation betreffend (Simon 2001; Koledova und Khalil 2007). Der postmenopausale Estrogenmangel ist einer der wichtigsten pathogenetischen Faktoren der Osteoporose, bei Frauen ein klinisch bekanntes Problem des Gesundheitswesens und Gegenstand einiger Forschungsarbeiten (Khosla et al. 2017; Compston 2001). Selbst bei Männern konnte vermindertes Estrogen mit dem Verlust von Knochenmasse und Knochenstrukturveränderungen in Verbindung gebracht werden (Riggs et al. 1998).

Der höheren Inzidenz der Männer für ESRD gegenüber Frauen steht die höhere Inzidenz der Frauen für chronische Nierenerkrankungen gegenüber (Kramer et al. 2018; USRDS 2017). Klassischerweise ist der Grund für dieses Ungleichgewicht, zu Ungunsten der Männlichen Bevölkerung, die raschere Progression der chronischen Nierenerkrankung zur Terminalen Niereninsuffizienz (ERSD). Analog dazu wurde beschrieben, dass die Progression von ERSD bei Frauen oder im Tiermodell langsamer voranschritt als bei Männern (Neugarten 2000; Shin et al. 2016).

Gegensätzlich dazu wurde von Jafar et al. in einer Metaanalyse die Behauptung aufgestellt, dass die Progression von chronischen Nierenerkrankungen bei Frauen nicht langsamer, sondern rascher als bei Männern voranschritt (Jafar et al 2003). In dieser Studie mit ACE-Hemmern war allerdings die Mehrheit der Probandinnen Postmenopausal. Metaanalysen, die die gesamte Population einer Bevölkerung berücksichtigen kommen zu dem Ergebnis, dass Männer eine raschere Abnahme der Nierenfunktion zeigen als Frauen. (Carrero et al. 2018; Valdivielso 2019) Sexualhormone könnten eine wichtige Rolle spielen, Frauen vor rascher Progression chronischer Nierenerkrankungen zu schützen.

Ergänzend dazu wurde im Tiermodell der schädliche Einfluss von Testosteron beschrieben. Es wurde herausgefunden, dass Testosteron die Apoptose in Podozyten induziert, wohingegen Estrogene TGF- β 1 oder TNF- α induzierte Apoptose antagonisieren sollen. (Doublie et al. 2011) 17 β -Estradiol stellt sich im Tiermodell bei verschiedenen Formen glomerulärer und interstitieller Nierenerkrankungen als nephroprotektiv dar. (Maric et al. 2004; Elliot et al. 2003; Birch et al. 2004; Blush et al. 2004)

1.5 Geschlechterdimorphismus bei Kindern

Bei Kindern ist die Prävalenz glomerulärer Erkrankungen erhöht (Silbiger und Neugarten 1995). Bei Steroid-sensitiven nephrotischen Syndrom zeigen die Mädchen einen Trend verminderter post-pubertärer Rezidive gegenüber den Jungen (Fakhouri et al. 2003; Rüth et al. 2005). Kyrieleis *et alia* zeigten, dass nach Cyclophosphamid-Behandlung einer Steroid-sensitiven und wiederkehrenden MCGN von präpubertären Mädchen, diese Erkrankung im Vergleich zu den der Jungen öfter ausheilten. Diese Daten erreichten allerdings keine Signifikanz (Kyrieleis et al. 2007). Eine weitere Untersuchung, derselben Patienten nach der Pubertät aus der vorangegangenen Studie zeigte, dass von den 29% der Patienten die ein Rezidiv zeigten, neun männlich und nur drei weiblich waren (Kyrieleis et al. 2009). Bei einer Studie von Kwong *et alia* wurden 35 chinesische Kinder mit durch Biopsie gesicherter Diagnose der MCGN 18 Jahre nach Erkrankung beobachtet, bei denen 37% nach Maturation ein Rezidiv entwickelten. Das Geschlechterverhältnis war in dieser Studie 11:2 (♂:♀). (Kwong et al. 2013) Diese Daten legen nahe, dass das weibliche Geschlecht auch bei pädiatrischen glomerulären Erkrankungen einen

klinischen Vorteil haben könnte.

Bezogen auf renale Erkrankungen, zeigt die Summe dieser Ergebnisse, dass Menschen weiblichen Geschlechts bis zur Menopause einen Vorteil gegenüber Menschen männlichen Geschlechts haben könnten.

1.6 Estrogen im Tierexperiment

Vielfältige experimentelle Tierversuche konnten belegen, dass die Progression renaler Pathologien bei männlichen Tieren rascher voranschreitet als bei weiblichen Artgenossen. Schon 1975 konnte gezeigt werden, dass bei Männchen im fortgeschrittenen Alter spontan Glomerulosklerose und Proteinurie auftraten und die Weibchen weitestgehend resistent gegen diese Veränderungen blieben. (Elema und Arends 1975)

In einem anderen Experiment konnte bei Männchen durch *Orchidektomie* oder Estrogensubstitution (Hajdu und Rona 1971), die Progression der renalen Pathologie verlangsamt werden. Dies weist darauf hin, dass Estrogen einen protektiven Einfluss haben könnte und Androgene den gegenteiligen Effekt zur Folge haben. Passend dazu konnte bei kastrierten männlichen Ratten ein protektiver Effekt der Niere nachgewiesen werden, der bei ovariectomierten weiblichen Ratten, die daraufhin weniger Estrogen sezernierten, nicht reproduzierbar war (Lemos et al. 2005). In verschiedenen Studien und Tiermodellen konnte, nach experimenteller Nierenschädigung, durch Zugabe von Estrogen die Ausprägung von Glomerulosklerose und Proteinurie verringert werden (Neugarten 2002).

Weibliche Estrogenrezeptor-Knockout-Mäuse zeigen Glomerulosklerose nach neun Monaten Lebenszeit, weil dann eine exzessive Testosteronproduktion und Sekretion im Ovar einsetzt. Nach Ovariectomie war kein Schaden an den Podozyten dieser Knockout-Mäuse zu registrieren. Allerdings konnte Glomerulosklerose durch die exogene Testosterongabe induziert werden. Beim Wildtyp konnte durch Hinzugabe von Testosteron derselbe Effekt bei ovariectomierten Mäusen induziert werden. Testosteron und Estrogen beeinflussen den Schaden an Podozyten und deren Apoptose. (Doublier et al. 2011)

Das Geschlecht spielt bei renalen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Testosteron scheint einen destruktiven und Estrogen einen protektiven Effekt auf die Glomeruli zu haben (Silbiger und Neugarten 2003; Gross et al. 2004).

1.7 Estrogensynthese

17 β -Estradiol (oder Östradiol/E2/Estradiol; Griechisch: *Oistros* = Verve, Inspiration; Diol = Alkohol mit zwei Hydroxylgruppen (Abbildung 8)) ist ein Steroidhormon und das wichtigste Sexualhormon der Frau. Es wird vor der Menopause hauptsächlich im *Ovar* in *Follikeln* und im *corpus luteum* sowie während der *Gravidität* in der Plazenta und in geringen Mengen in der Nebennierenrinde synthetisiert. Männer bilden geringe Mengen im Hoden. Ein weiterer Produktionsort für 17 β -Estradiol ist das Fettgewebe sowie die endogene Produktion in den Zellen durch Aromatase aus Testosteron (Fester et al. 2015). 17 β -Estradiol als Medikament weist eine Bioverfügbarkeit von 98% auf. Im Blut liegt der Arzneistoff zu 95% an Plasmaproteinen wie Albumin gebunden vor. Die Metabolisierung von 17 β -Estradiol erfolgt hepatisch und es wird renal eliminiert. Die Plasmahalbwertszeit beträgt durchschnittlich 15 Stunden. 17 β -Estradiol zeigt im Vergleich mit anderen Metaboliten Estrogens (Estron (E1), Estradiol (E2), Estriol (E3), Estetrol (E4)) die höchste Affinität gegenüber Estrogenrezeptoren (ER) (Kuiper et al. 1997) (siehe Punkt 1.7.1 und folgend).

Vom *Hypothalamus* wird Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) pulsatil sezerniert, dass in der *Adenohypophyse* die Ausschüttung der glandotropen Hormone luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH) induziert. FSH und LH wirken auf die Gonaden und setzen dort die effektorischen Sexualhormone frei.

Bei der postpubertären, präklimakterischen Frau beträgt der Menstruationszyklus circa 28 Tage (zwischen 23 - 35 Tagen). Beginnend mit der *Mensis* wird in der *Hypophyse* FSH freigesetzt, das die Follikel zur vermehrten Estrogensynthese anregt. Bei ausreichend hohem Estrogenspiegel steigt das LH an und bringt den Follikel dazu, zu *ovulieren* und die reife Eizelle freizugeben. Das *Ovum* selbst setzt Progesteron und Estrogen frei und bewirkt somit einen zweiten Anstieg von Estrogen. Bei nicht stattgefundenener Befruchtung fallen Progesteron und Estrogenspiegel wieder und der Menstruationszyklus beginnt von vorn. Bei

Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium wird humanes Choriongonadotropin (β -hCG) freigesetzt, das wiederum die Eizelle dazu animiert, vermehrt Estrogen freizusetzen und die *Gravida* ermöglicht. Wird hier ein bestimmter Estrogenwert überschritten, setzt der negative Rückkopplungsmechanismus der Hypophysen-Hypothalamus-Achse aus und hat eine positive Rückkopplung zur Folge, die wiederum die Follikelreifung beschleunigt. Während des Klimakteriums (zwischen dem 4. und 5. Lebensjahrzehnt) nimmt die Estrogenproduktion in den Ovarien deutlich ab.

Beim Mann wird in den Leydig-Zwischenzellen im Hoden und in der *zona reticulosa* der Nebennierenrinde geringe Mengen Estrogen gebildet. Hier erfolgt eine pulsatile Ausschüttung. Das Serumniveau von Estradiol bei Männern liegt zwischen 12 und 34 pg/ml und ist mit dem Serumspiegel einer Frau in den Wechseljahren vergleichbar (< 30 pg/ml).

17β -Estradiol kann auch in der Zellkultur *in vitro*, endogen und somit in der Zelle selbst gebildet werden. Wichtig für diese Arbeit ist der Schritt der Umwandlung durch den Aromatase-Enzym-Komplex, der Testosteron in 17β -Estradiol mit seinen zwei Hydroxylgruppen umwandelt.

Im Ersten Schritt der Steroidsynthese wird Cholesterol durch das *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR-Protein) bereitgestellt und zur inneren Mitochondrienmembran transportiert. Dies ist gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidbiosynthese und somit von 17β -Estradiol. Die Synthese von StAR wiederum wird durch *Adrenocorticotrophes* Hormon (ACTH) aus der Nebennierenrinde und dem luteiniesierendem Hormon aus den Gonaden gesteuert. Cholesterol wird dann vom Cytochrom P450-Enzym *side chain cleavage* (scc) in Pregnenolon umgewandelt, welches wiederum durch das Enzym Cytochrom P450 C17 (17α -Hydrolase / c17,20-Lyase) in Androstendion überführt wird. Durch die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird es teilweise zu Testosteron hydroxyliert. Dieser Schritt ist irreversibel und nun kann die Aromatase oder Cytochrom P-450 aro die Methylgruppe C 19 abspalten und Ring A aromatisieren (Abbildung 8).

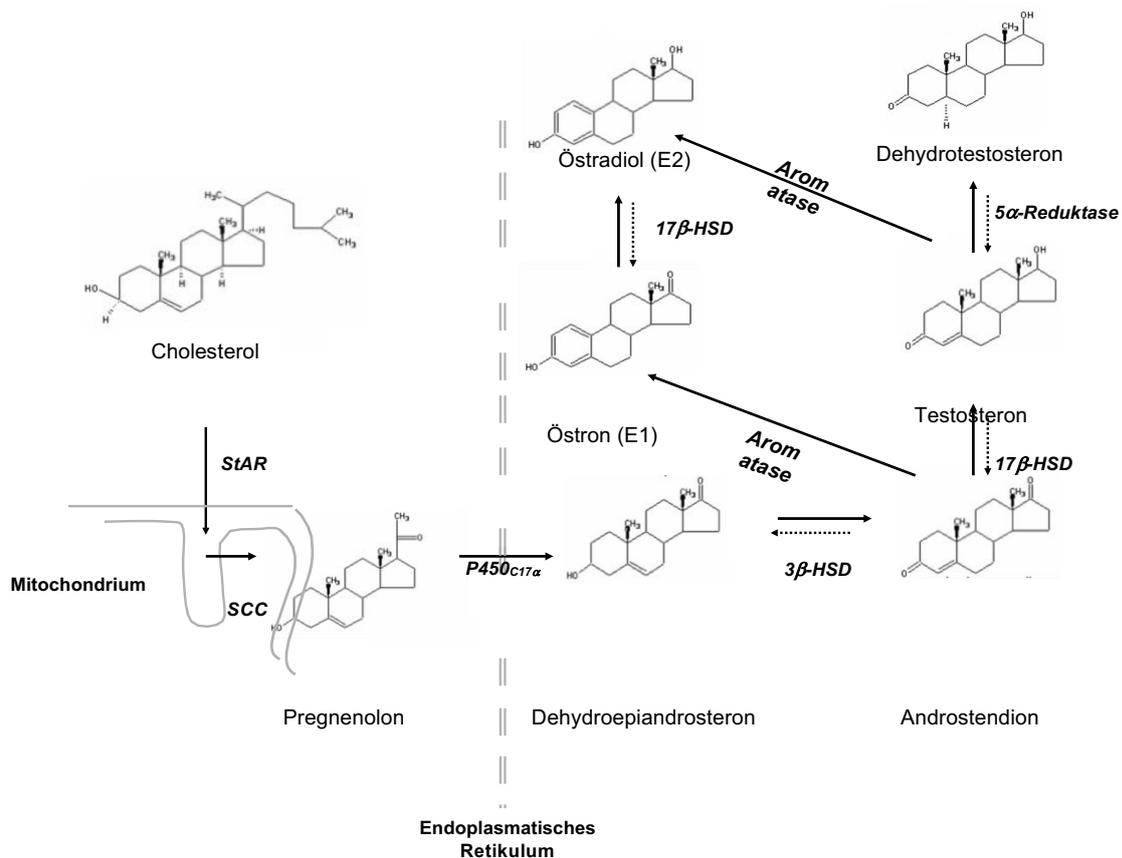


Abbildung 8: Estrogensynthese. Cholesterol wird, unter Mithilfe der StAR, durch die mitochondriale Membran transportiert. Anfangs findet die Estrogensynthese im Mitochondrium statt. Die endgültige Synthese ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die Aromatase ist verantwortlich für den irreversiblen Schritt von Testosteron zu 17β-Estradiol (*modifiziert Fester et al. 2006*).

1.7.1 Die Funktion von Estrogenrezeptoren

Die Effekte aller Hormone, wie auch von Steroiden wie 17β-Estradiol, sind vermittelt durch spezifische Rezeptoren die das Hormon erkennen, binden und die Information oder den Befehl an die Effektoren weitergeben. Bereits 1973 wurde durch Jensen und DeSombre der erste Estrogenrezeptor (ER und später ERα) in *Uteri* und *Vaginae* von Ratten durch spezifische Bindungsaktivität entdeckt (Jensen und DeSombre 1973). 1986 (Greene et al. 1986) gelang die Sequenzierung der DNA des ER und 1997 (Brzozowski et al. 1997) wurde die Kristallstruktur der Ligandenbindungsstelle des ER erstmals beschrieben. Die Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptors (ERβ) im Jahre 1996 (Kuiper et al. 1996), verkomplizierte initial das Verständnis bezüglich der Estrogenwirkung und der physiologischen Relevanz der beiden ER (Gustafsson 2003).

Es ist bekannt, dass der Estrogenrezeptor ein nukleärer, ligandengesteuerter Transkriptionsfaktor ist, also ein regulatorisches Protein, das modulierend auf die Transkription von Genen einwirkt. Die ER zählen zu den nukleären Hormonrezeptoren. (Martini und Katzenellenbogen 2003)

Nach Ligandenbindung an der hydrophoben Tasche des Rezeptors kommt es zu einer Änderung der Konformation des Rezeptorproteins. Durch die Abspaltung eines Hitzeschock-Proteins (hsp90), erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Dabei kann es sowohl zur Bildung eines Homodimers (ER α mit ER α), als auch eines Heterodimers (ER α mit ER β) kommen. (Hall und McDonnell 1999; Tremblay et al. 1999) Die alterierte Konformation dieser Komplexe lässt auf eine andere Gruppe von Ko-regulatoren und somit auf eine modulierende Hormonwirkung schließen. Obwohl diese beiden Rezeptoren sowohl ihre Liganden als auch die DNA in gleicher Form binden, weisen sie individuelle Funktionen in der Zellregulation auf und werden von unterschiedlichen Genloci kodiert (Enmark et al. 1997).

Obwohl beide ER relativ homolog sind, unterscheiden sie sich doch in ihrer transkriptionalen Domäne und in der Anordnung in unterschiedlichen Geweben (Dechering et al. 2000; Kuiper et al. 1997) (Abbildung 9). Dies wies auf funktionelle Differenzen hin, die sich in Versuchen mit Knockout-Mäusen bestätigten (Hewitt und Korach 2003) und so wurden die verschiedenen physiologischen Funktionen von Estrogen, den kombinierten Effekten von ER α und ER β zugeschrieben (Koehler et al. 2005). Trotz dieser Ergebnisse wurde beschrieben, dass Estrogen, neben den bereits genannten rezeptorvermittelten Effekten, in der Zelle Effekte über Bindungsdomänen verursacht, die nicht über die genannte rezeptorvermittelte Wirkung erklärt werden können (Ho und Liao 2002; Prossnitz et al. 2008). Dies liegt mutmaßlich am Zusammenspiel genomischer und nicht-genomischer Wirkmechanismen und es ergeben sich unterschiedliche Wirkspektren beim Wildtyp (Kuiper et al. 1997) und Varianten der Estrogenrezeptoren ER α und ER β . Vor allem wenn man die Diskrepanzen der relativen Potenz der Wirksamkeit in Abhängigkeit zu den spezifischen Liganden oder Promotoren vergleicht. (Paech et al. 1997, Kuiper et al. 1997, Pennie et al. 1998)



Abbildung 9: Domänen der humanen Estrogenrezeptoren ER α und ER β . Die beiden Rezeptor-Subtypen charakterisieren sich durch die spezifische Abfolge der Aminosäuren in der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (*Hormon-Binding-Domain*) des Rezeptorproteins und in der DNA-bindenden Domäne (DBD) (modifiziert nach Simerly et al. 1990).

1.7.2 Die Rolle der Aromatase im Podozyten

Aromatase, ein Cytochrom P-450 Enzym, ist im endoplasmatischem Retikulum der Zellen lokalisiert und findet sich in verschiedenen Geweben, wie z.B. der Mamma, im *Hippocampus* (Prange-Kiel et al. 2003; Hojo et al. 2004) und den Podozyten (Fester et al. 2015). Das Enzym Aromatase katalysiert irreversibel und spezifisch die Konversion von Testosteron zu 17 β -Estradiol (E2). In Nierengewebe und speziell in Synaptopodin-positiven Arealen der Podozyten von juvenilen und adulten Ratten, wurde die Immunreaktivität von Aromatase nachgewiesen.

Im Gehirn (Garcia-Segura et al. 2008) und dem *Hippocampus* (Prange-Kiel et al. 2003; Hojo et al. 2004) wurde bereits die extragonadale Synthese von Estradiol nachgewiesen.

Die Menge an synthetisiertem Estradiol in Mäusen ist dabei in Neuronen höher als im Serum beider Geschlechter (Hojo et al. 2004). Da die Synthese von 17 β -Estradiol in Podozyten höher ist als in Neuronen (Kretz et al. 2004), erlaubt dies den Schluss, dass die Menge an synthetisiertem Estradiol im Podozyten höher sein wird als im Serum. Als weiteren Schluss können wir, unter Berücksichtigung gleicher Aromatase-Expression beider Geschlechtern mutmaßen, dass die Unterschiede von

17 β -Estradiol im Serum weniger wahrscheinlich eine Rolle bei den Geschlechterunterschieden bei Glomerulonephritiden spielen, als das endogen produzierte Estradiol im Podozyten beider Geschlechter.

1.8 Letrozol

Letrozol ist ein nicht-steroidaler, kompetitiver Hemmer des Aromatase-Enzym-Systems (Abbildung 10). Es verhindert die Konversion von Androgenen zu Estrogenen (siehe Punkt 1.7), ohne dabei Wechselwirkungen mit Estrogenrezeptoren zu induzieren. Aromatase, ein Cytochrom P-450 19a1 Enzym, ist im Endoplasmatischem Retikulum der Zellen lokalisiert und findet sich in verschiedenen Geweben wie z.B. der Brust, im *Hippocampus* (Prange-Kiel et al. 2003; Hojo et al. 2004) und den Podozyten (Fester et al. 2015).

Letrozol wird üblicherweise bei postmenopausalen Frauen zur Therapie des Mamma-Karzinoms verwendet. Letrozol erwies sich, in malignen und nicht malignen Brustgewebe, potenter und spezifischer als andere verwendete Aromatasehemmer. Es zeigte sich eine Verminderung des endogenen Estrogens bis unter die Nachweisgrenze und eine anti-proliferative Wirkung in Estrogenrezeptor-positiven Tumoren. (Miller et al. 2002) Im Gegensatz zu den Alternativen wie z.B. Tamoxifen wird Letrozol besser vertragen und zeigt bessere Behandlungsergebnisse in frühen und späten Stadien des Mamma-Karzinoms (Simpson et al. 2004).

In Dispersionskulturen wurde beobachtet, dass die Estradiolsyntheseleistung ab einer Konzentration von 10⁻⁹ M Letrozol vollständig inhibiert wird (Prange-Kiel et al. 2003) und die Effekte auf verschiedene Proteine innerhalb von 32 Stunden reversibel sind (Prange-Kiel et al. 2006). Aufgrund dieser Erfahrungen eignet sich Letrozol, die Wirkung von 17 β -Estradiol indirekt zu untersuchen. (Puddefoot et al. 2002; Prange-Kiel et al. 2003)

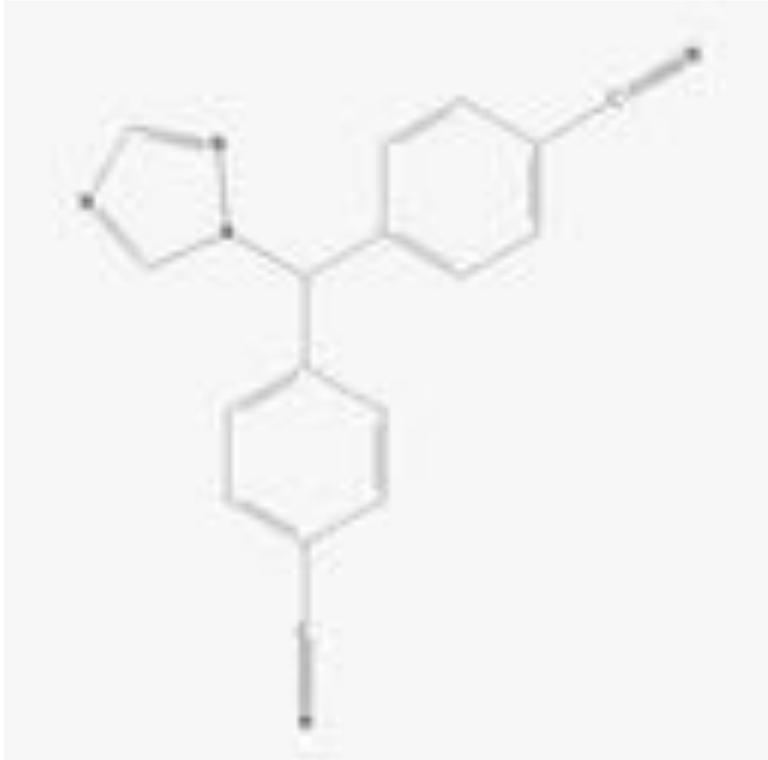


Abbildung 10: Letrozol – Chemische Struktur schematisch in 2D (NCBI PubChem).

1.9 Fragestellung

Kummer et al. 2012 konnten in ihrer Arbeit demonstrieren, dass die klinische Prognose chronisch renaler Erkrankungen bei Männern schlechter ist als bei Frauen. Die endgültigen Mechanismen bleiben weiterhin verborgen. Das Verwenden von hormonmodulierenden Therapien ist im klinischen Alltag Standard und spielt eine immer wichtigere Rolle bei der Behandlung von z.B. postmenopausaler Hormontherapie oder Estrogenrezeptor-Inhibition bei Mamma-Karzinomen. Ein besseres Verständnis der Interaktionen von Sexual-Hormonen mit der Progression renaler Erkrankungen ist von großer Bedeutung, da die Behandlung nicht-renaler Erkrankungen auch die Nierenfunktion und die Struktur beeinflusst und Hormonrezeptormodulation ein Behandlungsansatz renaler Erkrankungen sein könnte. Speziell im pädiatrischen Bereich ist die Datenlage unvollständig und für einen Erkenntnisgewinn muss auf experimentelle Modelle ausgewichen werden.

Wie bereits in der Einleitung dieser Forschungsarbeit beschrieben (siehe Punkt 1.1.2. bis 1.2.2 und 1.4), spielen Podozyten eine zentrale Rolle bei Aufrechterhaltung der Blut-Harn-Schranke und von ihrem dynamischen Zytoskelett hängen die physiologische Form und Funktion ab. Podozyten sind terminal differenziert und

besitzen empfindliche Primär- und Sekundärfortsätze, die durch eine Vielzahl von Proteinen gesteuert werden. An der Orchestrierung des Aktin-Zytoskeletts sind Proteine wie Cofilin und Synaptopodin beteiligt. Diese Proteine bedingen Veränderungen an den Fußfortsätzen und sie sind responsiv für Sexualhormone wie Estrogen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der endogenen Estrogensynthese in den Podozyten von *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* und dem Einfluss dieser Rezeptoren bei der Regulation podozytenspezifischer Proteine in beiden Geschlechtern.

1.9.1 Hypothese

Verschiedene Studien weisen auf eine prominente Rolle von Steroidhormonen bei glomerulären Erkrankungen hin. Eine Studie von Kummer et al. 2012 zeigt einen Geschlechterdimorphismus bezüglich der Prävalenz von Nierenerkrankungen. Dies könnte auf einen Unterschied der Responsivität auf Steroidhormone deuten.

Die aktuelle Datenlage ermöglicht es nicht, eine gültige Aussage diesbezüglich zu treffen.

Welchen Einfluss hat die Steroidbiosynthese und insbesondere 17β -Estradiol auf Podozytenspezifische Proteine, die für die Gestalt, die Funktion und die Motilität der Podozytenfüßchen verantwortlich sind?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte, Hardware und Software

Name	Hersteller	Seriennummer
„Rührer“ MR2002 No.5030400000	Heidolph	serial No 23169
„Schüttler“	Edmund Bühler Labortechnik	-
„Schüttler“ GFL 3015	-	-
„Short Plates“ Mini Protean 3 System Glass Plates	Biorad	Catalog No. 1653308
„Timer“ Model No. TR112	Roth	-
„Vortexer“ REAX 2000	Heidolph	serial No 54119
0,5 ml U-40 INSULIN Spritze	BD Micro-Fine	REF 324876
1,5 mm „Spacer“ Mini Protean 3 System Glass Plates	Biorad	CatalogNo 1653312
accu-jet pro	Brand	serial No 6113 DQ 00241
Axiovert 100 Laserscanning- Mikroskop	Zeiss	-
Bench: Hera safe und Lamin Air HVR 2472	Heraeus Instruments	-
bio-one Cell-Scraper, 28 cm length	Greiner	Cat.-No.: 541 070
BioPhotometer	eppendorf	serial No. 61631 03423
Buffer Dam	Biorad	
Cell Strainer 40 µm Nylon (Zellsieb)	BD Falcon	REF 352340
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner bio-one	CatNo: 188 271
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner bio-one	CatNo: 227 261
Cellulosepapiere/Blottingpapiere 580x600 mm Grade: BF4	Sartorius	OrderNr. FT-2-521- 580600 G
centrifuge 5415C	eppendorf	No. 5450B 61906
centrifuge 5417R	eppendorf	serial No. 5407 09693

Comb 10well 1.5 mm	Biorad	Catalog No. 1653355
Deckgläser 24x60 mm	Carl Roth Karlsruhe	H 878
Drucker: i-SENSYS LBP3460	Canon	-
Eispack	No name	-
Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	amersham pharmacia biotech	serial No. 01033028
epT.I.P.S. Standard/Bulk 2 – 200 µl	eppendorf	0030 000.870
epT.I.P.S. Standard/Bulk 50 – 1000 µl	eppendorf	0030 000.919
Fuji imageJ	National Institute of Health	-
FusionCapt Advance Solo 2 16.05 „Analysekamera für Western Blot“	Vilber	Serial# 11.630191
Gel releasers	Biorad	Catalog No. 1653320
Gel Saver II – Tips (Pipettenspitzen lang)	Kisker Biotech	GSII054R
Glassware Objektträger 50 pcs	Marienfeld Laboratory	REF 08 100 00
Graph Pad Prism 6	STATCON	-
Haltesystem für 1,5 mm Spacer	Biorad	-
Handzähler: BSI ISO9001 Certified	Upgreen Counters	FM40047
Immersol 518 F	Zeiss	990330
Inkubator 37° C und 5.0% CO2	Binder	-
Kamera	Vilber Lourmat	279435
Kosmetiktücher Super Soft 100	Tissue Facials	07730012
Kühlschrank	LIEBHERR	-

Profi line (4 C°)		
Premium (-22 C°)		
Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt	REF 67.740
Mac OS 10	Apple	-
MacBookAir 11"	Apple	-
Microsoft Excel	Microsoft	-
Microsoft Power Point	Microsoft	-
Microsoft Word	Microsoft	
Mini Protean 3 System Gaskets	Biorad	Catalog No. 1653305
Multimark 1513 permanent Marker F; Rot	Faber Castell	PP 4 005401 513216
Multimark 1513 permanent Marker F; Schwarz	Faber Castell	PP 4 005401 513995
Multiwellplatte 24 Well	Falcon	353047
Neubauer Zählkammer; tiefe 0,100 mm 0,0025 mm²	Marienfeld	-
Nitrile Powder Free Examination Gloves	Ansell	REF 700113
Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Life Sciences (Amersham)	CatNo 10600002
OHPen universal Permanent S; Grün	Stabilo	Art.No. 841/63
Pinzette gebogen anatomisch	FST	11052-10
Pipetten:		
eppendorf Research Plus	eppendorf	
5 ml		35643
10 ml		356551
25 ml		356525
Plan-APOCHROMAT 63x/1,40 Oil	Zeiss	44 07 60 03

PLASTIBRAND	Brand	Cat.No. 7806 05
Reaktionsgefäßständer		
Plastic Packaging Parafilm 4IN. x 125 FT	Pechiney	PM-996
Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia Electrophoresis Constant	CodeNo. 18-0500-01
PowerPac HC	Biorad	SerialNo 043BR52101
Primo Vert „Mikroskop“	Zeiss	-
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt	REF 72.690.001
Schere Spitz	FST	HCG 7/99
Serological Pipet	Falcon	
0,1 µl - 2,5 µl		Q27225C
0,5 µl - 10 µl		228837Z
2 µl - 20 µl		R11720C
10 µl - 100 µl		122728Z
20 µl - 200 µl		Q34029C
100 µl - 1000 µl		P31515C
SPSS	IBM	-
STEMI 2000-C (Präp. Mikro)	Zeiss	-
Schott KL 1500 LED		
Stickstoffbehälter WSN-2	Cryoson	SerialNo. 321
Thermomixer compact	eppendorf	No. 5350 00601
Tip, PP, Clear 0,5 -20 µl	TreffLab	96.11177.9.01
Tissue Culture Flask 25 cm² Yellow	Sarstedt	83.1810.302 PE Vented Cap
Tissue Culture Flask 75 cm² Yellow	Sarstedt	83.3911.302 PE Vented Cap
Tissue Culture Plate 6-Well, Flat Bottom Cell	Sarstedt	83.1839.300
Vilber PC	Vilber	SerienNr. 12555

Vortex Genie 2	Scientific Industries	-
Waage PN1210	Mettler	Fabr.Nr.:634316
Wasserbad, 37° C	Memmert	-
Windows 98	Microsoft	-
Windows XP Professional	Microsoft	-
Zentrifuge: Rotator SB3	Stuart	serial No R000103813

2.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller	Seriennummer
Alexa Fluor 488 Chicken anti-Rabbit IgG (H+L)	invitrogen Molecular Probes	A21441
Antibody Diluent with Background Reducing Components 50 ml	DAKO	REF S0809
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma	A3678-25G
Bio Magermilch Pulver 250 g	Heirler Cenovis GMBH	4 0 10 3 18 030305
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BIORAD	Cat.No 500-0006
Bovine Serum Albumine	Sigma	05479-10G
Bromphenol blue	Merck	1.08122.0005
cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack	ROCHE	REF 04 693 132 001
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Merck	124653
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Sigma-Aldrich	D5879-100ML
Ethanol absolut 99%, vergällt m. 1% Methylethylketon	Apotheke UKE	RW/ETV99/005000
Fluorescent Mounting Medium 15 ml	DAKO	REF S3023

Foetal Bovine Serum, sterile filtered, Origin: South America, Charcoal treated 500 ml	PAN BIOTECH GmbH	Cat. No: P30-2302
Glycin	Carl Roth	3908.2
Hanks Balanced Salt Solution 10x 500 ml	gibco by life Technologies	REF 14180-046
HEPES solution 1 M BioReagent 100 ml	SIGMA Life Science	H3537-100ml
Letrozol	Tocris	4382
Methanol	J.T. Baker	8045
N-Cofilin: Cofilin (FL-166) sc-33779, LOT F0407, Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc33779 LOT#IO51 LOT#B1213
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma Life Sciences	T9281-25ML
P-Cofilin: p-Cofilin 1 (mSer 3)-R sc-21867-R, Rabbit Polyclonal igG	Santa Cruz Biotechnology	sc21867-R LOT#G0714
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	#26619
Papain	Sigma-Aldrich	P4762
PBS Tablette	Gibco by life sciences	REF 18912-014
Penicillin und Streptomycin (100x)	gibco by life Technologies	REF 15140-122
PhosSTOP EASYpack Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	ROCHE	REF 04 906 837 001
Ponceau S solution	Sigma Life Science	P7170-1L
Protein Block 110 ml	DAKO	REF X0909
RotiBlue	Carl Roth	A152
Rotiphorese Gel 30 (37,6:1)	Carl Roth	Art.-Nr. 3029.1

(Acrylamidstammlösung)		
RPMI Medium 1640 (1x) 500 ml	gibco by life Technologies	REF 11835-063
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), ultra pure	Biomol	51430.500
Sodium Pyruvate 100 mM (100x) 100 ml	gibco by life Technologies	REF 11360-039
Triton X-100	Merck	1.12298.0101
Trizma base	Sigma	T1503-1KG
Tween 20 (Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat)	Merck	8.22184.0500
UN 1977 Stickstoff, tiefgekühlt, flüssig	Linde Gas	-
Wasser, steril, pyrogenfrei, hypotonisch 1l	Carl Roth	Art.-Nr. 3255.1

2.2.1 Antikörper:

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Art	Hersteller	Seriennummer
Anti-GAPDH,MAb 100 µg mouse	Ambion	AM4300 L/N 1305027
Anti-Synaptopodin:Rabbit Polyclonal Antiserum	Synaptic Systems	Cat. No. 163 002 LOT No. 163002/7
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore	CatNo. WBKLS0500
N-Cofilin (FL-166) Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc33779 LOT#IO51 LOT#B1213
P-Cofilin1 (mSer 3)-Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc21867-R LOT#G0714

Pierce Antibody Host:	Thermo Scientific	Prod# 31458
Donkey Anti-; Antigen:		LOT# OE1704872
Rabbit igG Label:		
Horseradish Peroxidase		
Pierce Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, HRP conjugate (0,8 mg/ml)	Thermo SCIENTIFIC	Prod#31458 LOT#QF2040541
Pierce ECL Western Blotting Substrate Detection Reagent	Thermo Scientific	Prod # 32106
Pierce Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, HRP conjugate (0,8 mg/ml)	Thermo SCIENTIFIC	Prod#31432 LOT#QF2039232
Synaptopodin Rabbit polyclonal antibody	Synaptic Systems	CatNo. 163 002 LOT#163002/8 LOT#163002/9
Tubulin Monoclonal Anti - Tubulin Antibody produced in Mouse	Sigma	T6074 -200UL LOT#023M4813
Western Blot	Hersteller und Verdünnung	Seriennummer
Tubulin Monoclonal anti - Tubulin Antibody produced in Mouse	Sigma 1:10.000	T6074 -200UL LOT#023M4813
Synaptopodin Rabbit polyclonal antibody	Synaptic Systems 1:2.000	CatNo. 163 002 LOT#163002/8 LOT#163002/9
N-Cofilin (FL-166) Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology 1:250	sc33779 LOT#IO51 LOT#B1213

P-Cofilin1 (mSer 3)-R Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology 1:250	sc21867-R LOT#G0714
Pierce Do anti-Rb IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, HRP conjugate (0,8 mg/ml)	Thermo SCIENTIFIC 1:2500	Prod#31458 LOT#QF2040541
Pierce Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, HRP conjugate (0,8 mg/ml)	Thermo SCIENTIFIC 1:2500	Prod#31432 LOT#QF2039232

2.2.2 Lösungen und Puffer:

8% dickes Gel 2x1,5 mm

Trenngel:

H₂O	9,3 ml
30% Acrylamid	5,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5,0 ml
10% SDS	200 µl
10% APS	200 µl
TEMED	12 µl

Sammelgel:

H₂O	5,5 ml
30% Acrylamid	1,7 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
BPB gesättigte Lösung	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl

15% dickes Gel 2x1,5 mm Dick(x2)

Trenngel:

H ₂ O	4,7 ml
30% Acrylamid	9,9 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5 ml
10% SDS	200 µl
APS	200 µl
TEMED	8 µl

Sammelgel:

H ₂ O	5,5 ml
Acrylamid	1,7 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
BPB	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl

Western Transferpuffer für Nassblots:

Glycin	2,9 g
TrisBase	5,8 g
10% SDS	3,7 ml
MeOH	200 ml
ad 1l H ₂ O	

RotiBlue Färbelösung:

H ₂ O	60 ml
MeOH	20 ml
RotiBlue 5xKonz.	20 ml

Waschlösung:

Methanol	25 ml
H ₂ O	75 ml

Miller Puffer:

10% NP40	2,5 ml
1 M Tris pH 7,4	2,5 ml
5 M NaCl	1,2 ml
ad 50 ml H ₂ O	
vor Verwendung Zugabe von:	
Proteaseinhibitor 1 Tablette in 2 ml RIPA lösen 1:25 in Gebrauchslösung verdünnen	
Phosphataseinhibitor 1 Tablette in 1 ml lösen 1:10 weiter verdünnen	

Milchpulver (für 100 ml) 5%

Bio Magermilch Pulver	5 g
PBS-Tween-20 0,3%	100 ml

PBS-Tween-20 0,3%

10xPBS	100 ml
10% Tween-20	30 ml
Aqua Dest.	870 ml

5 x Lämmli Probenpuffer

0,5 M DTT (Dithiothreitol)	
10% SDS	
0,4 M Tris-HCL, pH 6,8	
50% Glycerin	
Spatelspitze BPB	

10 x Lämmli Laufpuffer

Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O ad	1000 ml

10% APS (für SDS-Gele) Ammoniumperoxydsulfat (Merck)

1 g APS ad 10 ml H₂O

Präparationsmedium: HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)

Hanks Balanced Salt Solution 1x REF 14180-046 500 ml

Hepes (100x)

pH 7,30

Inkubationsmedium:

500 ml RPMI Medium 1640 (1x) (Roswell Park Memorial Institute)

HEPES (4-(2hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 1 M 2%

Penicillin/Streptomycin (100x) 1%

FBS Charcoal Stripped (Fetal Bovine Serum) 10%

Sodium Pyruvat (100x) 1%

PFA 4%: (Paraformaldehyd)

4 g Paraformaldehyd

50 ml H₂O, 15 min auf 60-65°C erhitzen

10 M NaOH (1Tropfen)

auf Eis abkühlen lassen

50 ml 2xPBS zugeben. pH 7,4 bei RT

Gewebefixierung mit zusätzlich 0,08% Glutardialdehyd

TBS (tris buffered saline): Für 1 L: 6,057 g Tris

8,766 g NaCl auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen pH 7,4 einstellen

TBS TX-100 0,2%: Für 100 mL: 2 mL 10% TX-100

auf 100 mL mit TBS auffüllen

PBS

500 ml Aqua dest.

1 PBS Tablette

Titration bis pH = 7,4 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l)

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation der Nieren

Alle für die Präparation verwendeten Wistar Ratten (*Rattus Norvegicus*) (Berkenhout 1769) stammen aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und wurden dort unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Nahrung sowie Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Das Leben der Tiere wurde entsprechend der Tierschutz-Richtlinien von einem versuchstierkundlichen Mitarbeiter beendet und der *Uterus duplex* mit den Embryonen (E18 = 18 Tage alte Embryonen) zur weiteren Präparation vom Muttertier entnommen. Der Embryo wurde *decapitiert* übergeben und es folgte ein Längsschnitt *ventral*, von *kaudal* nach *cranial* und ein Schnitt von *umbilical* nach *lateral* beidseits, um zuerst das Geschlecht zu ermitteln und weiterhin die Nieren beidseits, ohne Nebennieren zu explantieren. Zur Isolierung der Zellen wurden die Nieren geschlechtergetrennt in Reaktionsgefäße mit HBSS (Präparationsmedium) überführt. Anschließend wurde zu dem isolierten Gewebe 1 ml Papain gegeben und dieses im Wasserbad bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde das Gewebe mechanisch, mit behutsamen Pipettenbewegungen zerkleinert. Die enzymatische Zersetzung wurde durch Hinzugabe von RPMI 1640 Medium gestoppt. Zur Gewinnung von Einzelzellen wurde das behandelte Gewebe durch ein Zellsieb, mit einer Porengröße von 40 µm, gegeben. Nun wurde unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl ermittelt und die Zellen je nach Kultivierungsansatz wie folgt ausplattiert (Tabelle 4):

Tabelle 4: Zellzahl zur Kultivierung

24-Multiwellplatten:	125.000 Zellen	mit 1 ml Medium pro Kavität
6-Multiwellplatten:	450.000 Zellen	mit 3 ml Medium pro Kavität
Inkubationsflaschen 25 cm²:	2.500.000 Zellen	mit 5 ml Medium pro Flasche
Inkubationsflaschen 75 cm²:	6.000.000 Zellen	mit 30 ml Medium pro Flasche

Die Multiwellplatten dienen der Bereitstellung von Proben zur Immunhistochemie und der darauffolgenden konfokalen Laserscanning-Mikroskopie und die Inkubationsflaschen zur Proteingewinnung für Western Blots. Hierzu wurden die 24-Multiwellplatten mit Glasplättchen bestückt und über Nacht mit Natriumcitrat und Kollagen behandelt, um am nächsten Morgen vor der Präparation abgesaugt zu werden, damit sie trocknen. Die Kulturflaschen sowie die 6-Multiwellplatten können ohne Vorbehandlung verwendet werden. Die Kultivierung der Zellen wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

2.3.2 Dispersionskultur

Die gewonnenen Podozyten inkubierten zwei Wochen (Mundel et al. 1991) im Brutschrank, bei konstanten 37°C und 5,0% CO₂. Alle zwei Tage wurden das Medium gewechselt sowie regelmäßige mikroskopische Kontrollen durchgeführt, um den Fortschritt des Wachstums und das Überleben der Zellen zu kontrollieren und Kontaminationen auszuschließen. Dabei wurden, wenn nötig, Zelltrümmer aufgewirbelt und entfernt, um induzierte Apoptose zu verhindern.

Im *Cerebrum* sowie der Niere, *in vivo* und *in vitro* ist die Expression von Synaptopodin abhängig von der Differenzierung der Zellen. Während der postnatalen Reifung von Ratten wird Synaptopodin im Gehirn der Tiere erst ab Tag 15 im Western Blot detektiert und erreicht dann sein Maximum in der adulten Ratte. (Mundel et al. 1991; Mundlos et al. 1993; Mundel et al. 1997a)

2.3.3 Behandlung

Die kultivierten Podozyten wurden vier Tage mit Letrozol und die Kontrollgruppe mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 10⁻⁷ M behandelt, um die endogene 17β-Estradiol Synthese zu unterbinden.

Nach Abschluss der Behandlung wurden die Podozyten für die Immunhistochemie mit 4% PFA fixiert, mit Aquadest gespült und mit PBS pH 7,4 im Kühlschrank bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die weitere Verwendung im Western Blot wurden die Zellen zwei Stunden und vier Tage mit Letrozol und DMSO in Konzentration von 10⁻⁷ M behandelt, mit Miller Puffer lysiert und zur weiteren Verarbeitung in Reaktionsgefäße überführt.

2.3.4 Aufbereitung der Proteine und Proteinbestimmung nach Bradford

Zur weiteren Verwendung im Western Blot musste eine einheitliche Menge der Proteine eingesetzt werden. Hierzu wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) durchgeführt, bei dem sich das Absorptionsmaximum von *Coomassie brilliant blue G-250* verschiebt (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm gilt als Maß der Proteinkonzentration in der Probe.

Proteinaufbereitung: Nach der Lyse, unter Verwendung des Miller-Puffers, wurden die Proteinproben bei 4°C für 30 Minuten bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 13.000 RCF (*relative centrifugal force*) pro Minute zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Bradford: Die Extinktionswerte wurden im Photometer unter Zuhilfenahme folgender Eichreihe ermittelt (Tabelle 5):

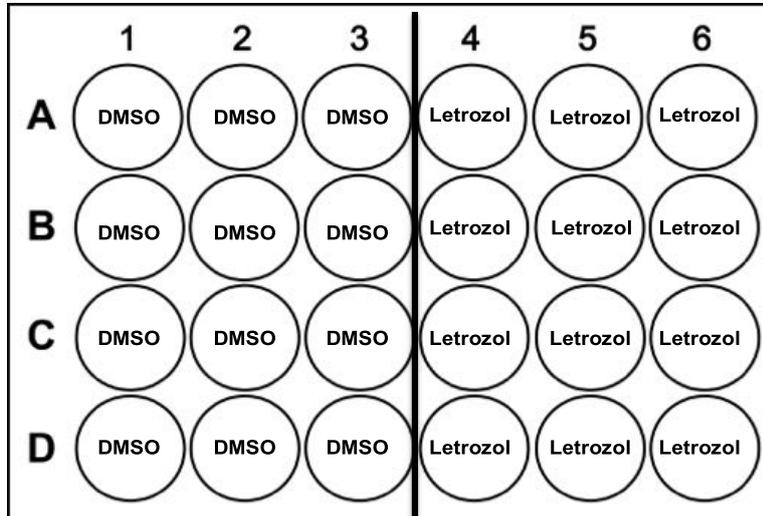
Tabelle 5: Eichreihe Bradford

H₂O µl	20	17,5	15	10	5	0
BSA µl (0,5 mg/ml)	0	2,5	5	10	15	20
Miller Puffer µl	2	2	2	2	2	2

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der unterschiedlich behandelten Podozyten, wurden je 2 µl der Probe zu 18 µl *Aqua destillata* gegeben und 1.000 µl 1:5 verdünntes *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* hinzugegeben. Für jede Probe wurden zwei Ansätze genommen und daraus der Mittelwert der Proteinkonzentration bestimmt. Aus den Ergebnissen wurde errechnet welche Probenvolumina eingesetzt werden mussten, um jeweils 60 µg Protein für den Western Blot einzusetzen.

2.3.5 Zellkultur Stimulation

Tabelle 6: Beispiel einer 24-Multiwellplatte. (Modifiziert nach: Quelle: <http://www.cellsignet.com/media/plates/24.jpg> (07. August 2017)).



Die 24-Multiwellplatten wurden jeweils pro Platte für 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden und vier Tage mit Letrozol und DMSO - als Kontrollgruppe - in der Konzentration 10^{-7} M behandelt. Kultur-Flaschen oder 6-Multiwellplatten, die für die Proteine für den Western Blot eingesetzt wurden, behandelten wir zwei Stunden oder vier Tage in der Konzentration 10^{-7} M mit Letrozol oder DMSO (Tabelle 6; Tabelle 7).

Tabelle 7: Schema der Letrozolbehandlung der Zellkulturen

Letrozol Schema:
• 2 Stunden
• 4 Tage
In der Konzentration 10^{-7} M
Kontrollgruppe mit DMSO 10^{-7} M

2.4 Immunhistochemie für Synaptopodin, P-Cofilin, N-Cofilin

Die Podozyten aus der Dispersionskultur wurden im Rahmen einer Immunhistochemie bearbeitet, um die Zielproteine der Zellen mittels Antikörperfärbung sichtbar zu machen und so Unterschiede in ihrer Expression festzustellen (Brandtzaeg 1998).

Die Immunhistochemie wurde nach internem Protokoll durchgeführt. Zu Beginn wurden die Zellkulturen in den 24-Multiwellplatten drei mal fünf Minuten mit 1 ml PBS pH 7,4, pro Kavität gespült, um sie von Unreinheiten zu befreien. Um proteolytische Enzyme und somit die Autolyse der Zellen zu stoppen, wurde bei Raumtemperatur 500 µl absolutes Methanol pro Kavität für zehn Minuten zugegeben und im Anschluss nochmals gespült. Es folgte die Behandlung mit TBS+Triton X 100% für fünf Minuten sowie, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermindern, die Zugabe dreier Tropfen *DAKO Protein Block* pro Kavität für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden drei Glasplättchen auf einen Objektträger umgesetzt und mit je 40 µl des Primärantikörpers in einer 1:100 Verdünnung mit *DAKO Antibody Diluent* aufgetragen und in einer „feuchten Kammer“ über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurden die 24-Multiwellplatten wieder bestückt, gespült und nochmals 20 Minuten mit *DAKO Protein Block* behandelt. Nun wurde 300 µl des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung 1:500 mit *DAKO Antibody Diluent* in jede Kavität gegeben und in Dunkelheit für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach wiederholtem Spülen wurden 500 µl DAPI (1:100.000 in PBS) für drei Minuten hinzugefügt, um die Zellkerne anzufärben und sie somit zu identifizieren. Nach Spülung mit PBS wurden die Glasplättchen in Aquadest eingetaucht und auf die Objektträger umgesetzt, um diese dann mit je zwei Tropfen *DAKO Mounting Medium* zu fixieren.

2.4.1 Synaptopodin, P-Cofilin, N-Cofilin

Nach vorheriger Testreihe mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern haben sich folgende Kombinationen als suffizienteste ergeben:

Tabelle 8: Primär- und Sekundärantikörper der immunhistochemischen Experimente für das LSM

Synaptopodin	
Primärantikörper:	Synaptic Systems anti-Synaptopodin Rabbit 1:100
Sekundärantikörper:	Alexa 488 anti-Rabbit 1:500

P-Cofilin:**Primärantikörper:** Santa Cruz Rabbit anti-P-Cofilin 1:200**Sekundärantikörper:** Alexa 488 anti-Rabbit 1:500**N-Cofilin:****Primärantikörper:** Santa Cruz Rabbit anti-N-Cofilin 1:200**Sekundärantikörper:** Alexa 488 anti-Rabbit 1:500**2.4.2 Konfokales Laserscanning-Mikroskop**

Das konfokal arbeitende Mikroskop wird charakterisiert durch seine Eignung relativ dicke Proben gut abzubilden, da es Licht aus einem kleinen Bereich sammelt ($<1 \mu\text{m}$) und als Fotografie digitalisiert abbildet. Ein weiterer Vorteil ist die Minimierung des *Photo-Bleaching Effektes*, da umliegendes, nicht belichtetes Gewebe wenig bis gar nicht beleuchtet wird. Bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie war darauf zu achten, dass jeder Bereich aus diesem Grund nur einmal aufgenommen wurde.

Von den behandelten Zellen wurden, von jedem Glasplättchen, je 20 Bilder von Einzelzellen gemacht. Zuerst wurden Zellkerne anhand der DAPI-Färbung detektiert und die jeweiligen Zellen dann fotografiert und mit dem Programm *ImageJ* hinsichtlich ihrer Dichteunterschiede miteinander verglichen.

Da jedes Zielprotein Unterschiede in den Farbeinstellungen aufwies, mussten vorher einmalig die Werte für Kontrast, Helligkeit und Blende eingestellt werden, die innerhalb der Aufnahmen eines Proteins nicht mehr verändert wurden. Folgende Werte wurden verwendet:

Tabelle 9: LSM-Einstellungen

	Synaptopodin	N-Cofilin	P-Cofilin
Kontrast	320	260	371
Helligkeit	9,800	9,800	9,800
Blende	40	30	30

2.4.3 ImageJ

ImageJ ist ein vom *National Institute of Health* in den USA entwickeltes *open source* (= frei zugänglicher Entwicklungscode = höhere Transparenz und Nachvollziehbarkeit) Bildverarbeitungs- und Analyseprogramm. In dieser Arbeit wurde es zur Auswertung der Immunhistochemie und der Western Blots benutzt.

Bei den Bildern, die mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop gemacht wurden, maß das Programm die durchschnittlichen Graustufen und damit die *Integrated Density* (IntDen) - also die Dichte bei jedem Bild. So ließen sich Unterschiede in der Ausprägung von den durch die Antikörper markierten Proteine Synaptopodin, N- und P-Cofilin in den fotografierten Zellen messen. Der IntDen-Wert entspricht dabei der Expression des Zielproteins.

Beim Western Blot wird im Prinzip dasselbe getan: In dieser Arbeit wurden die jeweiligen Banden je nach Intensität in unterschiedlich großen Amplituden auf der Y-Achse dargestellt, die dann untereinander verglichen wurden. Auch hier wurde der IntDen-Wert ermittelt, der die jeweilige Bande mit dem Protein Tubulin als Referenzwert vergleicht. (Gassmann et al. 2009, Tan und Ng 2008)

2.5 Statistische Auswertung

Die Summe der *Integrated Density* jeweils einer Behandlung wurde mit SPSS auf Normalverteilung aller Werte eines Experiments untersucht. Liegt diese nicht vor wurden die Werte logarithmiert und die Signifikanz mit dem Schwellenwert auf $p \leq 0,05$ angegeben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Prozent angegeben und als mittlere Differenz der Mittelwerte der *Integrated Density* \pm SEM (*standard error of mean* = Standardfehler) angegeben. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ ($p < 0,05$) galten als statistisch signifikant und wurden mit einem Stern gekennzeichnet (*).

Alle Daten resultieren aus der Immunreaktivität von den Proteinen Synaptopodin, N-Cofilin und P-Cofilin. Der T-Test wurde angewandt um, Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu detektieren. Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA durchgeführt. Die Daten wurden in Prozent angegeben und die statistische Analyse wurde mit SPSS (20.0.0) durchgeführt. Die Statistische Analyse der Western Blot Ergebnisse wurde mittels *Prism Graph Pad 6 und Column Statistics* durchgeführt.

2.6 SDS-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese bilden sich negativ geladene SDS-Proteinkomplexe mit konstanten Ladungs-Masse-Verhältnissen, die durch Denaturierung Protein-Protein Wechselwirkungen minimieren und sich so fast nur noch durch ihre Größe unterscheiden. Diese Komplexe wandern dann im elektrischen Feld Richtung positiv geladenem Pol und trennen sich nach ihrem Molekulargewicht auf. Große Teile wandern hierbei weniger weit zum Pluspol als kleinere Teile. Die Gelelektrophorese wurde nach hiesigem Protokoll in einer modifizierten Version nach Lämmli durchgeführt (Lämmli 1970).

Die Proben für das 10% Gel sollten 30 µg Protein pro Tasche enthalten, die 15% Gele wurden mit 60 µg Protein beladen. Hierzu wurde ausgerechnet, welches Volumen an Probe benötigt wird, um dann die Probe mit H₂O auf 40 µl aufzufüllen und letztendlich 10 µl 5xLämmli-Probenpuffer zuzugeben, um als Summe 50 µl zu erhalten.

Es wurde ein Trenn- und ein Sammelgel gegossen (siehe Protokoll). Die ersten Versuche wurden mit 10% Acrylamidgelen gemacht und mit dem Zielprotein Synaptopodin waren sehr gute Ergebnisse zu erzielen. Allerdings waren N- und P-Cofilin mit diesem Gel nur ungenügend oder unzuverlässig darstellbar, so dass der Wechsel auf 15% Gele erfolgte, die eine bessere Darstellung von N- und P-Cofilin sicherstellten.

Das Trenngel wurde in Kammern gegossen und härtete dort 60 Minuten mit H₂O aus. Nun wurde das Sammelgel von oben auf das Trenngel pipettiert und der Kamm für die Kammern aufgesteckt und 30-40 Minuten ausgehärtet. Die Gele wurden in „feuchten Tüchern“ bei 4°C maximal für drei Tage gelagert.

Die fertigen Proben wurden bei 95°C für fünf Minuten denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und herunterzentrifugiert, um danach das Gel mit jeweils einer Probe pro Tasche zu beladen. Hierzu wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1xLämmli-Laufpuffer befüllt. Um die Geltaschen von Luftresiduen zu befreien, wurde mit einer Kanüle jede Tasche durchspült. Das Einsetzen der Proben und Marker wurde dokumentiert. Der Deckel mit der Verkabelung wurde den Polaritäten entsprechend korrekt aufgesetzt und mit dem *Power-Supply* bei 80 Volt begonnen, bis der Marker (*PageRulerPlus*) und die Proben ins Sammelgel hineingelaufen waren. Nach circa zehn Minuten wurde eine höhere Voltzahl von 120

Volt eingestellt. Die vollständige Auftrennung dauerte circa anderthalb Stunden. Regelmäßige visuelle Kontrollen des Marker- und Probenlaufes waren obligat.

2.6.1 Proteinmarker

Als Proteinmarker für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, 10 to 250 kDa von *Thermo Scientific* verwendet (Abb. 11).

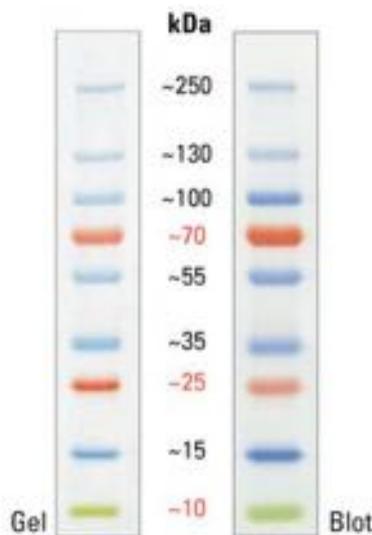


Abbildung 11: *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, 10 to 250 kDa

Quelle: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26619> (07. August 2017 -10:00Uhr).

2.6.2 Western Blot (Nassblot)

Dann wurden die Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin et al. 1979). Hierzu wurden pro Gel zwei Schwämme, einmal Nitrozellulosemembran sowie je zweimal Filterpapier benötigt, die in Nassblotpuffer getränkt wurden, um spätere Blasenbildung zu minimieren. Nach dem „Sandwich-Prinzip“ wurde nun auf die Halterung ein Schwamm, zweimal Filterpapier, das Gel und die Nitrozellulosemembran gelegt. Es folgten wieder zweimal Filterpapier und nochmals ein Schwamm. Das Bestücken erfolgte im Nassblotpuffer und unter höchster Sorgfalt zur Vermeidung von Blasenbildung. Nach dem Schließen der Halterung wurde nun alles in den Blot-Tank eingesetzt und Nassblotpuffer, ein „Rührfisch“ und eine Kühleinheit eingesetzt. Die gesamte Kammer wurde mithilfe von

Eis gekühlt und an der Stromquelle („*Electrophoresis Power Supply*“) für 02:15 Stunden bei 100 Volt „geblottet“.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und mit Ponceau-Rot circa eine Minute angefärbt. Das Ponceau-Rot bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen auf der Nitrozellulosemembran und diente der Überprüfung der Proteinübertragung. Farbüberschüsse wurden mit Aquadest gespült und die Nitrozellulosemembran beschriftet. Es wurde dann in PBS-Tween- 20, 0,3% mit Milchpulver 5% für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem „Schüttler“ geblockt, um unspezifische Bindungen zu verringern. (Blatteiger et al. 1982; Spinola und Cannon 1985)

Der in Milchpulver gelöste Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C schüttelnd und drehend inkubiert. (Primärantikörper gelöst in PBS-Tween-20, 0,3% mit Milchpulver 5%) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verdünnung der Primärantikörper auf Nitrozellulosepapier im Western Blot

Synaptic Systems	anti-Synaptopodin	1:2.000
Santa Cruz Biotech.	anti-N-Cofilin	1:250
Santa Cruz Biotech.	anti-P-Cofilin	1:250
Sigma	anti- α Tubulin	1:10.000

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit PBS-Tween-20 0,3% für zehn Minuten gewaschen und in PBS-Tween-20 0,3% mit Milchpulver 5% gelöster Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (Tabelle 11).

Sekundärantikörper:

Tabelle 11: Sekundärantikörper für das Nitrozellulosepapier im Western Blot

anti-Rabbit HRP (versus Synaptopodin, N- und P-Cofilin)	1:2500
anti-Mouse HRP (versus Tubulin)	1:2500

Dann wurde die Membran für drei mal zehn Minuten mit PBS-Tween 0,3% gewaschen. Nun wurde nach Bedarf ECL/Millipore-Kit benutzt und zwei Minuten bei ECL und fünf Minuten mit Millipore inkubiert. Das Filterpapier wurde in Klarsichtfolie

gelegt, in der Chemilumineszenz Analysekamera positioniert und im Modus „Autoexposition“ entwickelt.

Standardexposition: Modus: Inkrementiell; Anzahl der Bilder 5; Gammawert 1,00.

Tabelle 12: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper im Western Blot

WB (Definitiv)	Hersteller und Verdünnung	Seriennummer
N-Cofilin (FL-166) Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology 1:250	sc33779 LOT#IO51 LOT#B1213
P-Cofilin1 (mSer 3)-Rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology 1:250	sc21867-R LOT#G0714
Pierce Do anti-Rb IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, HRP conjugate (0,8 mg/ml)	Thermo SCIENTIFIC 1:2500	Prod#31458 LOT#QF2040541
Pierce Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, HRP conjugate (0,8 mg/ml)	Thermo SCIENTIFIC 1:2500	Prod#31432 LOT#QF2039232
Synaptopodin Rabbit polyclonal antibody	Synaptic Systems 1:2.000	CatNo. 163 002 LOT#163002/8 LOT#163002/9
Tubulin Monoclonal anti - Tubulin Antibody produced in Mouse	Sigma 1:10.000	T6074 -200UL LOT#023M4813

2.7 Abkürzungsverzeichnis

♀	Weiblich
♂	Männlich
°C	Grad Celsius
µl/g	mikroliter/gramm
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ADF	Aktin depolarisierender Faktor
AK	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumperoxydsulfat
AP-1	alternative response elements
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
cAmp	zyklisches Adenosin-Monophosphat
d	Tage (days)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E18	18 Tage alte Embryonen, rattus norvegicus
ER	Estrogenrezeptor
ERA	the european renal association
ERE	Estrogen Responsive Elemente
ESRD	end stage renal disease
et al.	et alii (Maskulinum); et aliae (Femininum); et alia (Neutrum)
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GF	growth factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
HBSS	hanks balanced salt solution

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	horse reddish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
KO	knockout
LH	Luteinisierendes Hormon
LSM	(Konfokales) Laserscanning Mikroskop
MCGN	Minimal-Change-Glomerulonephritis
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
N	Größe der Grundgesamtheit
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
no; #	number
Nr	Nummer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pg	pikogramm
pH	potentia Hydrogenii
RCF	relative centrifugal force
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Memorial Park Institute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of mean
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SPSS	statistical package for the social sciences/superior performing software system
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine

TGF	transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

3 Ergebnisse

3.1 Der Nachweis von Estrogenrezeptoren in Podozyten von Wistar Ratten

Estrogenrezeptor α und Estrogenrezeptor β werden u.a. verantwortlich gemacht für 17β -Estradiol-induzierte Signalwege. Wir konnten mittels immunhistochemischer Nachweise zeigen, dass beide Rezeptorsubtypen in Podozyten vorhanden sind. Wir konnten die Proteinexpression von ER α und ER β sowohl in adulten Tieren beider Geschlechter (Punkt 3.1.4; Abb. 6), als auch in Dispersionskulturen von Podozyten (E18) weiblicher und männlicher Tiere nachweisen (Abb. 12).

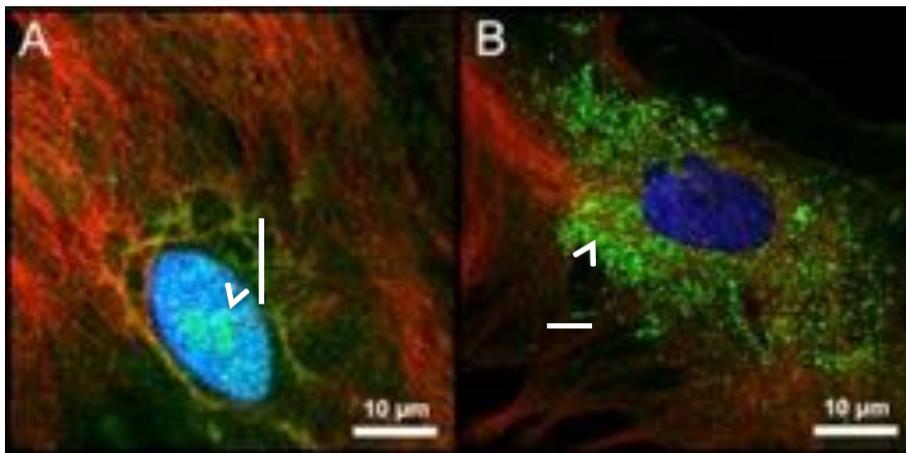


Abbildung 12: Immunhistochemie. Keyence BZ9000 Fluoreszenzmikroskop A) ER α (Pfeil) in grün konzentriert im Kern (blau) und B) ER β (Pfeil) fokal, granuliert um den Kern und wurde in primären Podozytenkulturen in männlichen und weiblichen Ratten gefunden. Synaptopodin in A und B rot dargestellte Stressfasern (mit freundlicher Unterstützung von Lars Fester).

In Abbildung 12 **A** und **B** sind Podozyten zu sehen, die mittels eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen wurden; der Zellkern ist mit DAPI blau gefärbt, in rot stellt sich Synaptopodin mit den für dieses Protein typischen Stress- Fasern dar. In Abbildung 12 **A** ist ER α grün angefärbt, der über den klassischen genomischen Weg der rezeptorvermittelnden Genexpression wirkt und dazu passend und typisch im Kern Immunreaktivität zeigt. In Abbildung 12 **B** ist ER β zu sehen, wie er sich in granulierter Gestalt fokal konzentriert grün angefärbt um den Kern darstellt. Die Koexpression mit dem spezifisch in Podozyten detektierbaren Marker Synaptopodin (rot) bestätigt die Expression von ER α und ER β in Podozyten.

3.1.2 Podozyten exprimieren Aromatase

Aromatase, ein Cytochrom P-450 Enzym ist in der Plasmamembran des Endoplasmatischen Retikulum der Zellen lokalisiert und findet sich in verschiedenen Geweben, wie z.B. der *Mamma* oder im *Hippocampus* wieder. Es katalysiert irreversibel und hoch spezifisch die Konversion von Testosteron zu Estradiol. Im Gewebe von Nieren konnten wir die Immunreaktivität von Aromatase in Podozyten bereits in der frühen embryonalen Phase (Tag 18) nachweisen (siehe Abb. 13 Bild 2). Koexpression mit dem spezifisch in Podozyten detektierbaren Marker Synaptopodin bestätigt die Expression von Aromatase in Podozyten (Abb. 13 Bild 1- 3).

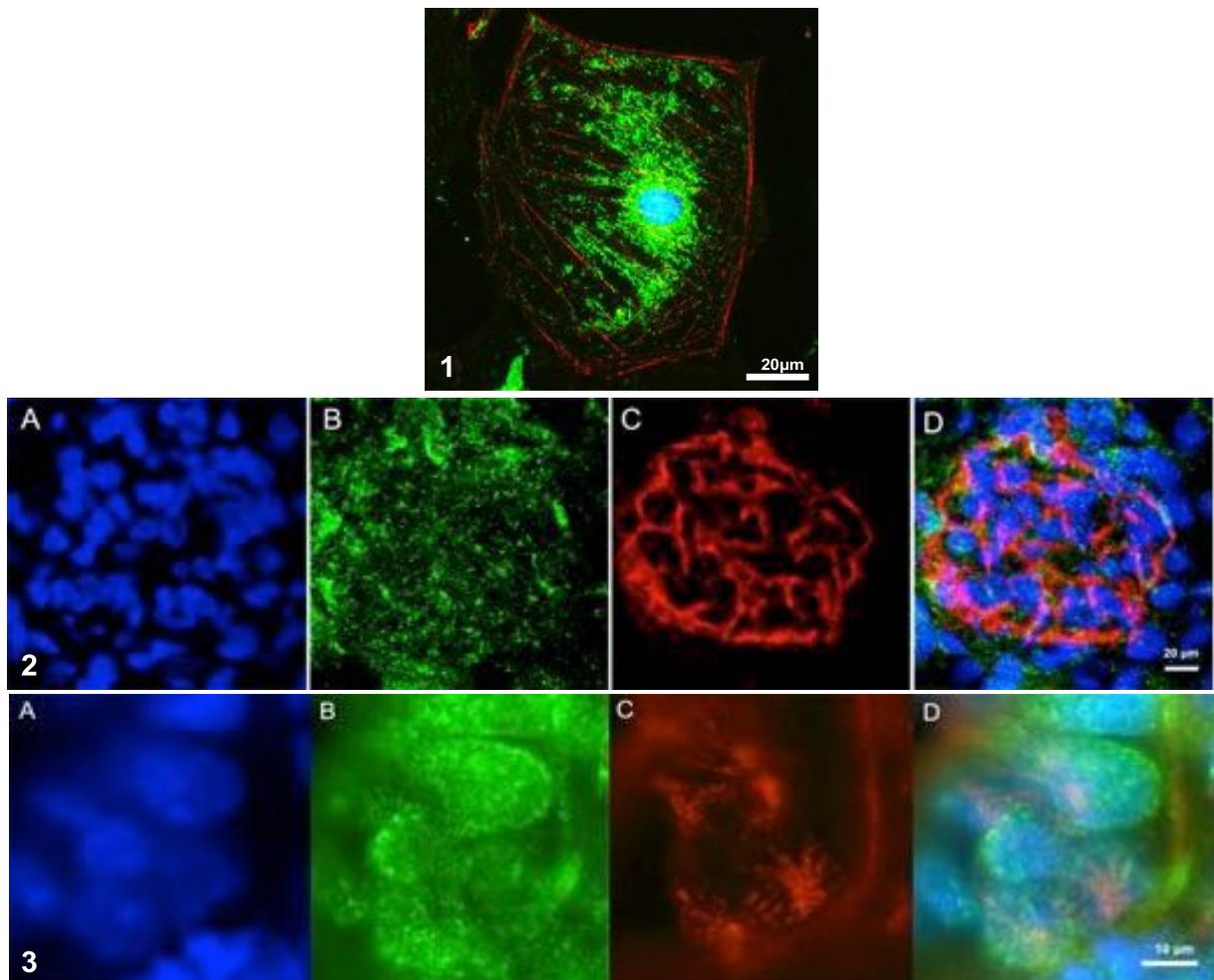


Abbildung 13: Aromatasenachweis in Podozyten. Alle Bilder mit dem LSM aufgenommen.

1 Podozyt: Immunzytochemie von Aromatase im Podozyten. Zentral in blau der Kern. Um den Kern verstärkt exprimiert in grün die Aromatase, vereinzelt in der ganzen Zelle und in rot Synaptopodin, Zytoskelett-assoziiert quer durch die Zelle und an den Zellgrenzen (mit freundlicher Unterstützung von Lars Fester).

2 Glomerulus: Aromatase Immunreaktivität im solitären Glomerulum einer adulten weiblichen Ratte. A: Nuclei sind mit DAPI blau gefärbt **B:** Immunreaktivität der Aromatase **C:** Immunreaktivität Synaptopodins **D:** Überlappungsaufnahme **A-C.** Die Überlappungsaufnahme eines Glomerulus zeigt die Aromatase, mit Synaptopodin-Immunreaktion als Indikator für Podozyten (mit freundlicher Unterstützung von Lars Fester).

3 Glomerulus: Aromatase Immunreaktivität im solitären Glomerulum einer E18 Ratte LSM A: Nuclei sind mit DAPI blau gefärbt **B:** Immunreaktivität der Aromatase granuliert in grün **C:** Immunreaktivität Synaptopodins in rot, die „spinnenartige“ Gestalt und das parietale Blatt der Bowman-Kapsel ist zu erkennen **D:** Überlappungsaufnahme **A-C.** Die Überlappungsaufnahme eines Glomerulus zeigt die Aromatase, mit Synaptopodin-Immunreaktion als Indikator für Podozyten (mit freundlicher Unterstützung von Lars Fester).

Abbildung 13 Bild 1 zeigt einen Podozyten mit zentraler Kernfärbung mit DAPI in blau, Aromatase-Expression im gesamten Podozyten mit erhöhter Konzentration um den Kern. Synaptopodin (rot) ummantelt die Zellgrenzen des Podozyten und zeigt innerhalb der Zelle Querverbindungen. Fokale, granuliert angeordnete Anfärbung als Zeichen der Aromatase-Immunreaktivität, die in Synaptopodin-positiven Arealen zu detektieren ist (Abb. 13).

Abbildung 13 Bild 2 zeigt den Glomerulus einer adulten Ratte, aufgenommen mit dem LSM. In Bild A werden die mit DAPI angefärbten Zellkerne dargestellt, in Bild B konnten wir zeigen, dass Aromatase im Glomerulus exprimiert ist. Bild C zeigt in rot Synaptopodin und die für Glomeruli typische ums Gefäßkonvolut angeordnete Struktur der Podozyten. Die Überlappungsaufnahme in Bild D zeigt die Expression der Aromatase in und um den Glomerulus.

In der immunhistochemischen Färbung des Podozyten sehen wir die Nuclei in Bild A des Bildes 3 mit DAPI blau angefärbt, Bild B grün gefärbt ist der Nachweis der Aromatase zu sehen, die fokale größtenteils um den Kern (im Endoplasmatischen Retikulum) lokalisiert ist. In Bild C ist Synaptopodin rot gefärbt und zeigt die typische digitierende, hier auch spinnenartige Gestalt der Podozyten. Zu erkennen ist das parietale Blatt der Bowman-Kapsel. Die Überlappungsaufnahme in Bild D zeigt die Kombination aller vorherigen Bilder und verdeutlicht die Struktur der Podozyten und die genaue Position der Aromatase.

Wir konnten zeigen, dass Podozyten auch unter *in vitro*-Bedingungen in der Lage sind 17β -Estradiol zu synthetisieren, da die Aromatase in der Zellkultur erhalten bleibt (Ivanova und Beyer 2000).

In gemischten Podozytenkulturen weiblichen und männlichen Geschlechts konnte

eine ähnliche Aromatase-Expression mithilfe von Western Blot Analysen nachgewiesen werden (Fester et al. unveröffentlicht).

3.1.3 Podozyten besitzen die Fähigkeit 17 β -Estradiol *de novo* zu synthetisieren

Die Ergebnisse von Punkt 3.1.2 führten dazu, dass Embryonale (E18) primäre Podozyten-Dispersionskulturen von Ratten darauf hin untersucht wurden, ob sie fähig zur Synthese und zur Sekretion von 17 β -Estradiol sind.

Wir konnten zeigen, dass Podozyten auch unter *in vitro*-Bedingungen in der Lage sind 17 β -Estradiol zu synthetisieren, da die Aromatase in der Zellkultur erhalten bleibt. In gemischten Podozytenkulturen weiblichen und männlichen Geschlechts konnten wir ähnliche Aromatase-Expression nachweisen (Fester et alia unveröffentlicht) und so wurde 17 β -Estradiol über *Radioimmunassay* in Podozyten nachgewiesen (Abb. 14).

Um die endogene Estradiolsynthese der Podozyten weitergehend zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Aromatasehemmer Letrozol behandelt. Letrozol ist ein nicht-steroidaler, kompetitiver Hemmer des Aromatase-Enzym-Systems. Es verhindert die Konversion von Androgenen zu Estrogenen, ohne dabei Wechselwirkungen mit Estrogenrezeptoren zu induzieren. In Dispersionskulturen wurde beobachtet, dass die Estradiol-Syntheseleistung ab einer Konzentration von 10⁻⁹ M Letrozol vollständig inhibiert wird. Die Erfahrung hat gezeigt, dass sich Letrozol eignet, die Wirkung von 17 β -Estradiol indirekt zu untersuchen. Es zeigte sich, dass durch die Hemmung der Aromatase eine Reduktion des Estradiol-Spiegels um 40% erreicht werden konnte (Abb. 14) (Fester et al. unveröffentlicht).

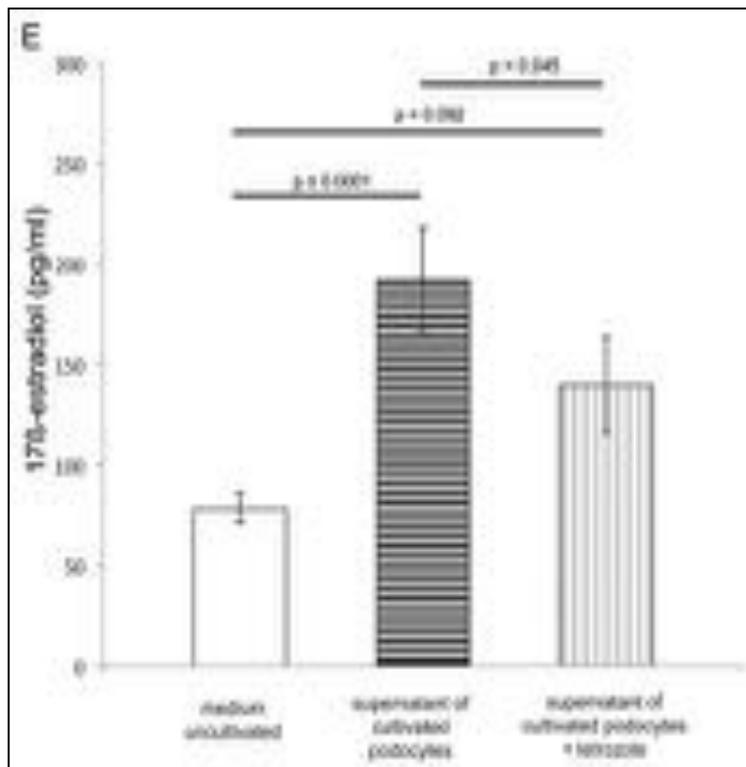


Abbildung 14: 17β-Estradiolnachweis durch Radioimmunassay (RIA) in primären Podozytenkulturen. Nach 14 Tagen *in vitro* wurden beträchtliche Mengen 17β-Estradiols mittels RIA im Überstand festgestellt. Die Hinzugabe von Letrozol resultierte in der Abnahme vom 17β-Estradiol-Spiegel im Medium (N=3) (Fester et. al unveröffentlicht, mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Hubertus Jarry, Universität Göttingen).

1) Kein Muster: In Kulturen verwendetes Medium mit Reduktion von Hormonen (*Charcoal stripped FCS*) (78,30 pg/ml).

2) Querstriche: Überstand von primären Podozyten-Kulturen unbehandelt mit hohem 17β-Estradiol-Spiegel (192,11 pg/ml).

3) Längsstriche: Nach Letrozol-Behandlung = Reduktion von 17β-Estradiol-Spiegel (139,72 pg/ml).

Abbildung 14 zeigt die in der *Radioimmunassay* gemessene Konzentration von 17β-Estradiol in primären Podozytenkulturen nach 14 Tagen Zellkultur *in vitro*. Der **erste** Balken zeigt einen 17β-Estradiol-Spiegel von 78,30 pg/ml im verwendeten unkultivierten Medium. Leichte Residuen von Hormonen sind bei „steroidfreien“ Seren bekannt und bei einer so sensitiven Messung erwartbar. Der **zweite** Balken zeigt den Überstand aus kultivierten Podozytenkulturen ohne Behandlung mit 17β-Estradiol-Spiegeln von 192,11 pg/ml. Der **dritte** Balken zeigt die Konzentration von 17β-Estradiol in Podozytenkulturen, die mit dem Aromatasehemmer Letrozol (3 x 2 Tage (6 ml)) behandelt wurden und mit 139,72 pg/ml signifikant verringerte Spiegel von 17β-Estradiol aufweisen.

Da das in der Zellkultur verwendete Medium kein Serum oder Vorstufen der Estradiol-Synthese beinhaltet, lässt sich folgern, dass Podozyten die Fähigkeit besitzen 17β -Estradiol *de novo* aus Cholesterol zu synthetisieren.

Dieses Experiment (*Radioimmunoassay* nach Prange-Kiel et al. 2008) wurde extern mit unserem Überstand aus den kultivierten Podozytenkulturen durchgeführt und freundlicherweise von Hubertus Jarry (Institut für Experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Der immunhistochemische Nachweis von Aromatase, ER α und ER β in Wistar Ratten *in vivo*

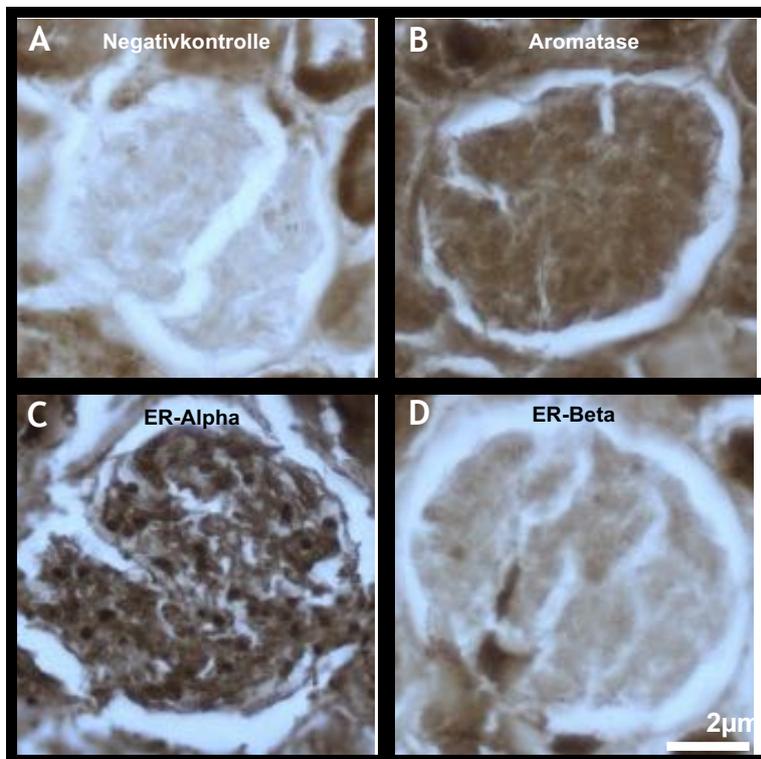


Abbildung 15: Immunhistochemische Diaminobenzidin-Färbung (DAB) mit Schnitten aus der Niere von Versuchstieren (*Rattus Norvegicus*), Vergrößerung: 40x + 2,5 Zoom im Fluoreszenzmikroskop

Bild A: Glomerulus im Fokus: Hier zu sehen ist die Negativkontrolle ohne immunhistochemische Anfärbung spezifischer Proteine oder Rezeptoren. **B:** Zeigt den Glomerulus im Fokus und die, im Vergleich zur NK, Anfärbung des gesamten Glomerulus in seiner Fläche. **C:** ER α im Glomerulus angefärbt mit Konzentration in den Zellkernen. **D:** ER β , dezentere Anfärbung des Glomerulus als z.B. bei der Aromatase in Bild B - dennoch ist der Unterschied zur NK klar zu erkennen - (mit freundlicher Unterstützung von Lars Fester).

Abbildung 15 Bild A zeigt einen Glomerulus nach immunhistochemischer Diaminobenzidin-Färbung. Zu sehen ist die Negativkontrolle ohne

immunhistochemische Anfärbung spezifischer Proteine oder Rezeptoren. Das Gefäßkonvolut im Zentrum sowie der Raum der Bowmanschen Kapsel, ist anatomisch gut zu erkennen (siehe Punkt 1.1.1 Abb. 1). **B** zeigt den Glomerulus im Fokus und die im Vergleich zur Negativkontrolle erfolgte Anfärbung des gesamten Glomerulus in seiner Fläche. Estrogenrezeptor- α in **C** im Glomerulus angefärbt mit Konzentration in den Zellkernen. Bild **D** zeigt ER β mit dezenterer Anfärbung des Glomerulus als z.B. bei der Aromatase in Bild **B**, dennoch ist der Unterschied zur NK klar zu erkennen. Im Vergleich zu **C** wird der Unterschied der Lage von ER α in den Kernen noch deutlicher.

3.2 Immunhistochemie

In der an Podozyten durchgeführten Immunhistochemie sollte gezeigt werden, dass bei Letrozolbehandlung ein Unterschied innerhalb der Expression der jeweiligen Zielproteine Synaptopodin, N- und P-Cofilin ist.

Bei den Aufnahmen, die mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) gemacht wurden, maß das Programm die durchschnittlichen Graustufen und damit die *Integrated Density* (IntDen), also die Dichte bei jeder Bildinformation. So ließen sich Unterschiede in der Ausprägung von den durch die Antikörper markierten Proteinen Synaptopodin, N- und P-Cofilin in den fotografierten Zellen messen. Der IntDen-Wert entspricht dabei der Expression des Zielproteins.

Um die Ergebnisse darzustellen, wurden zwei Behandlungszeitpunkte in Beziehung zu den ohne Aromatasehemmer, mit DMSO (Kontrolle) behandelten Zellen gesetzt. Dazu wurden die Werte der beiden Behandlungszeitpunkte auf die Kontrolle normalisiert. Die Summe der *Integrated Density* jeweils einer Behandlung, wurde mit dem Statistikprogramm SPSS berechnet und die Signifikanz mit dem Wert auf $p \leq 0,05$ angegeben. Die Werte sind in Prozent und als mittlere Differenz der Mittelwerte der *Integrated Density* \pm SEM (*standard error of mean* = Standardfehler) angegeben. N = 60 (3 Glasplättchen gleicher Behandlung mit je 20 Bildern), Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Hierzu wurde eine Varianzanalyse (ANOVA = *analysis of variance*) durchgeführt.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde bei Synaptopodin mit einem anti-Synaptopodin-Antikörper, bei P-Cofilin mit einem anti-P-Cofilin-Antikörper und bei N-Cofilin mit einem anti-N-Cofilin-Antikörper durchgeführt. Alle drei Antikörper sind aus dem

Kaninchen extrahiert und wurden mit dem Sekundärantikörper *Alexa 488 anti-Rabbit*, gerichtet gegen Kaninchen detektiert. Als Negativkontrolle wurde bei der Behandlung der Zellen der Primärantikörper weggelassen.

3.2.1 Synaptopodin ♀ ♂ in der Laserscanning-Mikroskopie

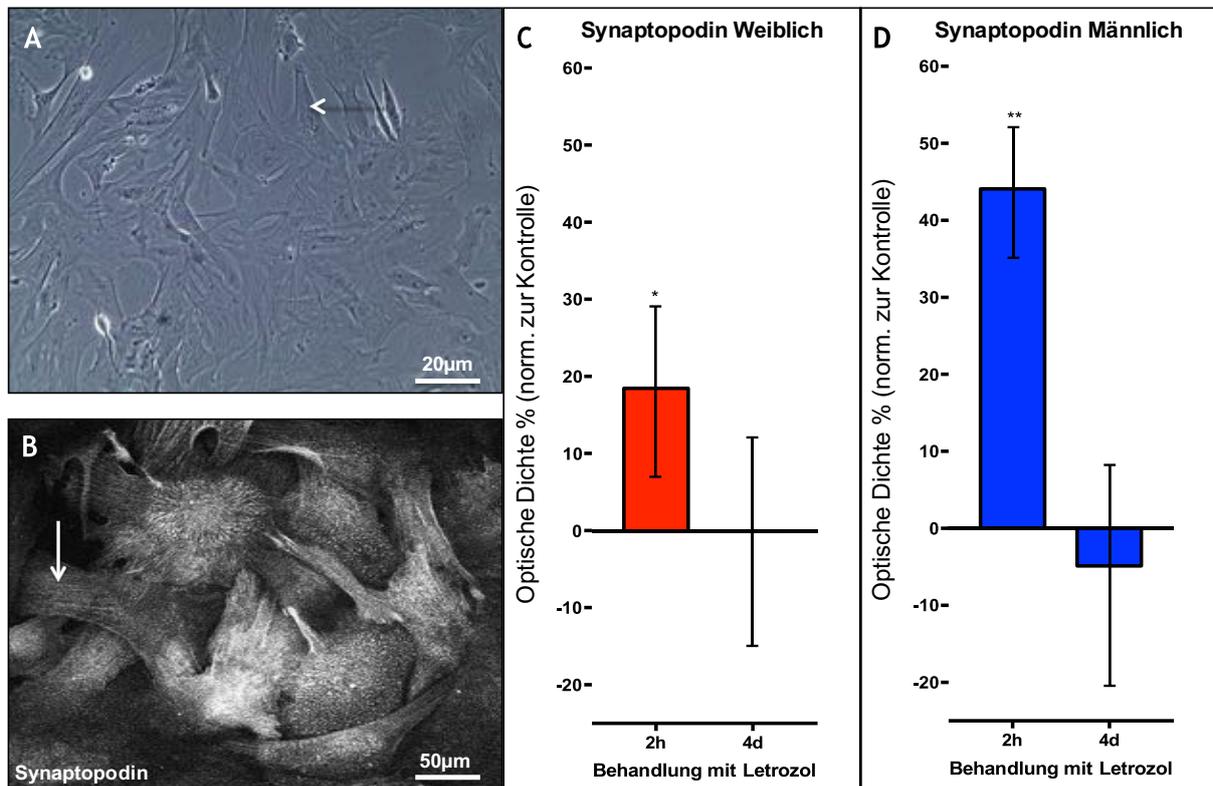


Abbildung 16: Zellkultur primäre Podozyten-Dispersionskultur, Synaptopodin IHC und LSM-Auswertung

A: Primäre Podozyten-Dispersionskultur auf *Tissue Culture Flask* 10x vergrößert nach 14d. **Pfeil** = Podozyt/Kern (Keller, M.-P. und Fester, L. 2014, Institut für Neuroanatomie UKE) (h=Stunden; d= Tage)).

B: Synaptopodin Schwarz/Weiß-Aufnahme LSM. Synaptopodin ♀ 2 Stunden Letrozol. **Pfeil** = Fasern (Stressfasern) (Keller, M.-P und Fester, L. 2014, Institut für Neuroanatomie UKE).

C: Bei Kurzzeitbehandlung (2h) der weiblichen primären Podozytenkulturen ist Synaptopodin im Vergleich zur Kontrolle höher exprimiert, nach Langzeitbehandlung (4d) ist keine Änderung der Synaptopodin-Expression zu erkennen. Beide Behandlungen zeigen eine große Varianz. **D:** Bei den männlichen primären Podozytenkulturen ist nach Kurzzeitbehandlung (2h) Synaptopodin im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher exprimiert. Die Synaptopodin-Expression ist nach Langzeitbehandlung (4d) vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Hier zeigt sich im Vergleich der beiden Behandlungen eine Abnahme der Expression des Zielproteins.

Zielprotein Synaptopodin, Letrozolbehandlung: 2 Stunden und 4 Tage; N = 60, Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Abbildung 16 **A** zeigt eine primäre Podozyten-Dispersionskultur nach 14 Tagen kultiviert in einer Flasche mit Medium in zehnfacher Vergrößerung. Zu beobachten ist die für Podozyten typische Gestalt der Zelle mit ihren Ausläufern.

Abbildung 16 **B** zeigt das immunhistochemisch untersuchte Protein Synaptopodin nach Letrozolbehandlung unter dem LSM. Diese Bilder waren mit einem N = 60 die Grundlage der densitometrischen Untersuchung.

Synaptopodin ♀ Abbildung 16 **C**:

Bei den nachfolgenden Versuchen, die mittels LSM gemacht wurden, ist der Unterschied immer im Bezug zur Behandlung mit DMSO herzustellen und beträgt dann die aufgetragene mittlere Differenz (Punkt 3.3.1 bis 3.3.3).

Nach Kurzzeitbehandlung (2h) mit Letrozol ist Synaptopodin in der primären Podozytenkultur der weiblichen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO signifikant um 18% höher exprimiert (18,7793%; $p = 0,003$; SEM = 0,812207).

Nach Langzeitbehandlung (4d) ist keine Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe nach vier Tagen Aromatasehemmung zu detektieren (-0,2887%; $p = 0,967$; SEM = 1,002887).

Im Vergleich der Kurzzeitbehandlung mit der Langzeitbehandlung zeigt sich, dass nur nach zwei Stunden eine vermehrte Expression von Synaptopodin stattfindet. Nach vier Tagen ist dies nicht der Fall. Bei beiden Ergebnissen ist die Varianz der Resultate zu hoch für einen signifikanten Unterschied, dennoch lässt sich ein Trend erkennen.

Zu Synaptopodin ♂ Abbildung 16 **D**:

In der primären Podozytenkultur der männlichen Tiere ist nach Kurzzeitbehandlung (2h) Synaptopodin mit 44% signifikant höher exprimiert als im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO (44,3451%; $p = 0,00000000000011$; SEM = 0,556549).

Nach vier Tagen Aromatasehemmung ist eine Änderung von -5% im Vergleich zur Kontrollgruppe zu detektieren (-5,16835%; $p = 0,469$; SEM = 1,051685).

Im Vergleich zur Langzeitbehandlung zeigt nur die Kurzzeitbehandlung eine signifikant vermehrte Expression von Synaptopodin.

3.2.2 Cofilin ♂ in der Laserscanning-Mikroskopie

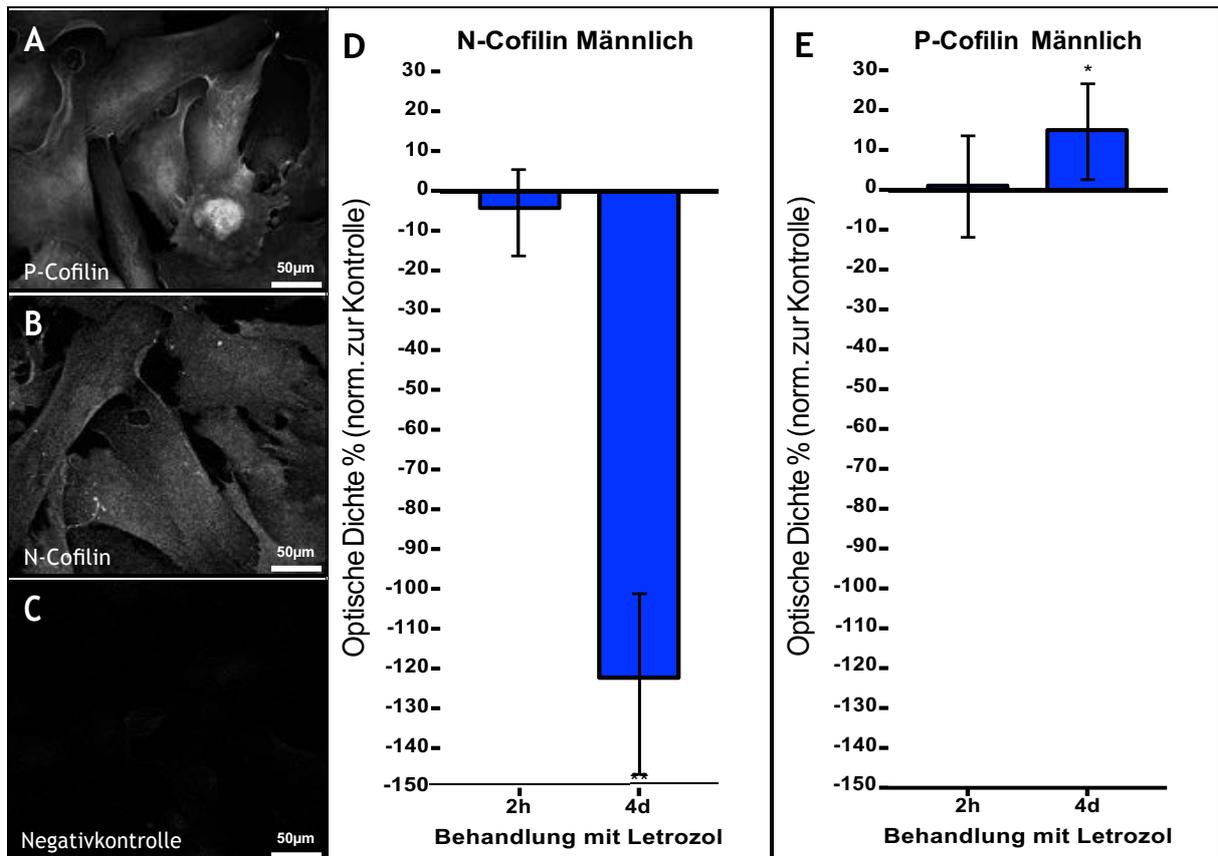


Abbildung 17: Schwarz/Weiß-Aufnahme LSM. **A:** P-Cofilin ♀ 4 Tage Letrozol; **B:** N-Cofilin; **C:** Negativkontrolle ♀ nur Sekundärantikörper (Keller, M.-P. und Fester, L. 2014, Institut für Neuroanatomie UKE).

D: Bei Kurzzeitbehandlung (2h) der männlichen primären Podozytenkulturen ist N-Cofilin im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert, nach Langzeitbehandlung (4d) ist eine signifikante Änderung der Expression von N-Cofilin zu erkennen. **E:** Bei den männlichen primären Podozytenkulturen ist nach Kurzzeitbehandlung (2h) P-Cofilin im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die Expression von P-Cofilin ist nach Langzeitbehandlung (4d) zunehmend. Hier zeigt sich, im Vergleich der beiden Behandlungen eine Abnahme der Expression von N-Cofilin und eine Zunahme der Expression von P-Cofilin.

Zielprotein N-Cofilin und P-Cofilin, männliche primäre Podozytenkultur Letrozolbehandlung: 2 Stunden und 4 Tage; N = 60, Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < .$, ** $p < .$

Abb. 17 **A-C** zeigt die untersuchten immunhistochemisch markierten Proteine P- und N-Cofilin nach Letrozolbehandlung unter dem LSM sowie die Negativkontrolle. Diese Bilder waren mit einem N = 60 die Grundlage der densitometrischen Untersuchung.

Zu N-Cofilin ♂ (17 **D**)

N-Cofilin zeigt nach Kurzzeitbehandlung (2h) (-4,8875%; $p = 0,360$; SEM = 1,048875) nur eine leicht verminderte Expression und nach Langzeitbehandlung (4d) (-122,78%; $p \leq 0.0001$; SEM = 2,227768) eine signifikante und starke Reprimierung

um 122% in männlichen primären Podozytenkulturen.

Zu P-Cofilin ♂ (17 E)

Nach Kurzzeitbehandlung (2h) zeigt sich bei großer Varianz keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollbehandlung (1,593539%; $p = 0,807$; SEM = 0,984065).

Nach Langzeitbehandlung (4d) der männlichen primären Podozyten zeigt sich eine signifikante, um 15% vermehrte Expression von P-Cofilin (15,54911%; $p = 0,022$; SEM = 0,844509).

Gegensätzlich zu N-Cofilin findet innerhalb des männlichen Geschlechts eine vermehrte Expression von P-Cofilin statt.

3.2.3 Cofilin ♀ in der Laserscanning-Mikroskopie

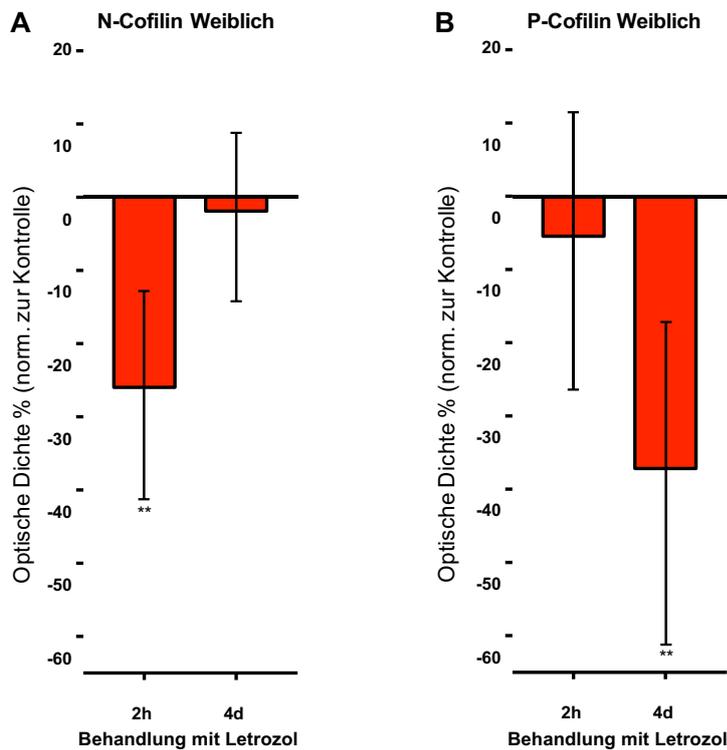


Abb. 18 A: Bei Kurzzeitbehandlung (2h) der weiblichen primären Podozytenkulturen ist N-Cofilin im Vergleich zur Kontrolle vermindert exprimiert, nach Langzeitbehandlung (4d) ist keine Änderung der Expression von N-Cofilin zu erkennen.

B: Bei den weiblichen primären Podozytenkulturen ist nach Kurzzeitbehandlung (2h) P-Cofilin im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die Expression von P-Cofilin ist nach Langzeitbehandlung (4d) abnehmend. Hier zeigt sich, im Vergleich der beiden Behandlungen eine Tendenz zur Zunahme der Expression von N-Cofilin und eine Abnahme der Expression von P-Cofilin.

Zielprotein N-Cofilin und P-Cofilin, weibliche primäre Podozytenkultur Letrozolbehandlung: 2 Stunden und 4 Tage; N = 60, Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Zu N-Cofilin ♀ Abbildung 18 A

Nach Kurzzeitbehandlung (2h) geht die Expression von N-Cofilin im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO gleichen Zeitraumes signifikant um 26% herunter (-26,2381%; $p = 0,000053$; SEM = 1,262381). Nach Langzeitbehandlung (4d) ist keine Änderung der Expression zu beobachten (-2,14874%; $p = 0,710$; SEM = 1,021487).

Zu P-Cofilin ♀ Abbildung 18 B

Bei P-Cofilin ist in den weiblichen Zellkulturen kein Kurzeiteffekt (2h) zu beobachten (-5,7859%; $p = 0,535$; SEM = 1,057859). Bei Langzeitbehandlung (4d) zeigt sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Reprimierung von P-Cofilin um circa

37% (-37,438%; $p = 0,000101$; SEM = 1,374376).

3.3 Auswertung der Western Blot Analyse

3.3.1 Einfluss unterschiedlich langer Letrozolbehandlung auf die Proteine Synaptopodin, N- und P-Cofilin

Zur Untersuchung des Einflusses von veränderten 17β -Estradiol-Spiegeln durch Letrozol und somit der Aromatasehemmung auf die Proteine Synaptopodin, N- und P-Cofilin wurden primäre Podozyten aus der Niere von Ratten-Embryonen (E18) isoliert. Die Zellen wurden über eine Dauer von zwei Wochen kultiviert, damit Synaptopodin exprimiert wurde. Hierbei wurde nach Geschlecht der Embryonen unterschieden und diese jeweils getrennt in Kultur genommen. Nachdem die Zellen ausdifferenziert waren, wurden sie für zwei Stunden oder für vier Tage mit Letrozol in einer Konzentration von 10^{-7} M behandelt. Die Zelllysate wurden über ein denaturierendes SDS-Gel aufgetrennt und die entscheidenden Proteine im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern detektiert (Abb. 19). Als Ladekontrolle der Proteinmenge diente Tubulin. Beim Western Blot wird die jeweilige Bande je nach Intensität in unterschiedlich großen Amplituden auf der Y-Achse dargestellt, die dann untereinander verglichen wurden. Auch hier wird der IntDen-Wert ermittelt, der die jeweilige Bande mit dem Protein Tubulin als Referenzwert vergleicht. So ließen sich Unterschiede in der Ausprägung von den durch die Antikörper markierten Proteine Synaptopodin, N- und P-Cofilin in den kultivierten Zellen messen. Der IntDen-Wert entspricht dabei der Expression des Zielproteins. Um die Ergebnisse darzustellen, wurden zwei Behandlungszeitpunkte in Beziehung zu den ohne Aromatasehemmer, mit DMSO (Kontrolle) behandelten Zellen gesetzt. Dazu wurden die Werte der beiden Behandlungszeitpunkte auf die Kontrolle normalisiert.

Die Summe der *Integrated Density* jeweils einer Behandlung bei den LSM Bildern wurde mit SPSS auf Normalverteilung aller Werte eines Experiments untersucht, liegt diese nicht vor wurden die Werte logarithmiert und die Signifikanz mit dem Schwellenwert auf $p \leq 0,05$ angegeben. Die Werte sind in Prozent und als mittlere Differenz der Mittelwerte der *Integrated Density* \pm SEM (*standard error of mean* = Standardfehler) angegeben. N = 11; Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Alle Werte wurden mit *Column Statistics* in *Graph Pad Prism 6* berechnet.

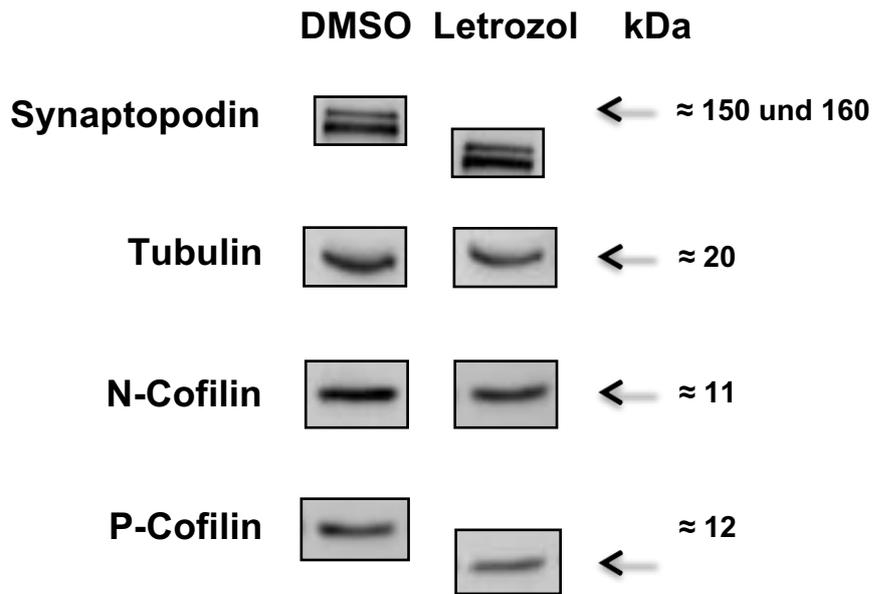


Abbildung 19: Beispiel der Western Blot Analyse. Die Proteine Synaptopodin, N- und P-Cofilin sowie Tubulin als Referenz im Western Blot. Die Proteine wurden aus primären Podozytenkulturen gewonnen und mit - der Kontrollsubstanz - DMSO und Letrozol behandelt (in diesem Falle alle Proteine für 4 Tage) (Keller, M.-P. und Fester, L. 2017, Institut für Neuroanatomie UKE).

3.3.2 Synaptopodin ♀ ♂ in der Western Blot Analyse

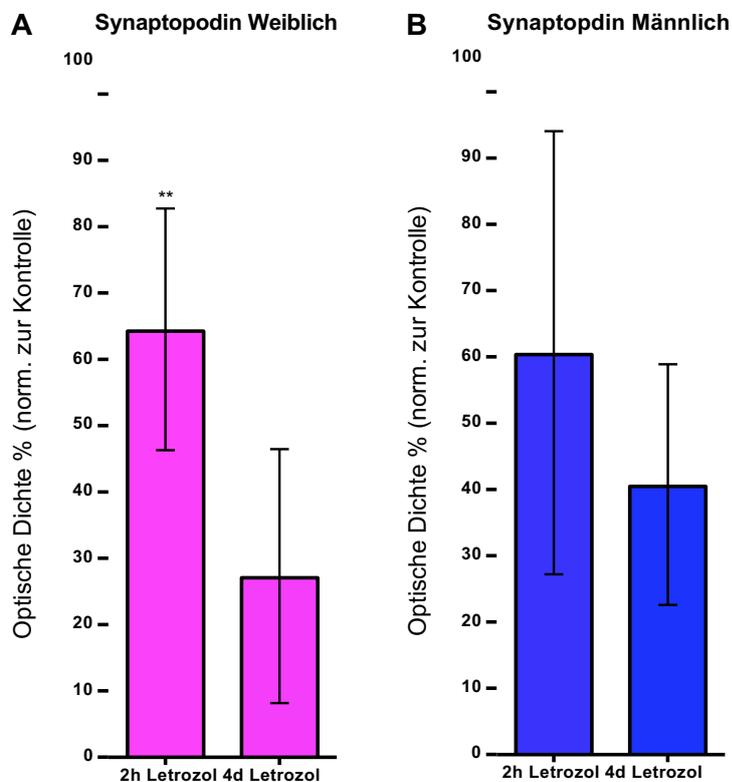


Abbildung 20: A: Bei Kurzzeitbehandlung (2h) der weiblichen primären Podozytenkulturen ist Synaptopodin im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher exprimiert, nach Langzeitbehandlung (4d) ist eine geringe Änderung der Synaptopodin-Expression zu erkennen. Die Langzeitbehandlung zeigt eine große Varianz.

B: Bei den männlichen primären Podozytenkulturen, ist nach Kurzzeitbehandlung (2h), Synaptopodin im Vergleich zur Kontrolle höher exprimiert. Die Synaptopodin-Expression ist, nach Langzeitbehandlung (4d), im

Vergleich mit der Kontrollgruppe leicht erhöht. Beide Behandlungen zeigen eine große Varianz. Hier zeigt sich im Vergleich der beiden Behandlungen eine Abnahme der Expression des Zielproteins.

Zielprotein Synaptopodin, Letrozolbehandlung: 2 Stunden und 4 Tage; N = 11, Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Abb. 20 **A** Synaptopodin ♀

In der primären Podozytenkultur der weiblichen Tiere ist nach Kurzzeitbehandlung (2h) mit Letrozol das Protein Synaptopodin signifikant hoch exprimiert (64,5391%; $p = 0,0045$; SEM = 18,23).

Nach vier Tagen Aromatasehemmung ist eine um 27% erhöhte Expression von Synaptopodin der Weibchen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu detektieren, die nicht signifikant ist (27,3354%; $p = 0,9004$; SEM = 19,13).

Abb. 20 **B** Synaptopodin ♂

Bei den männlichen Tieren ist die Kurzzeitbehandlung (2h) um 60% erhöht und die Langzeitbehandlung (4d) zeigt eine um 40% vermehrte Expression von Synaptopodin. Beide Ergebnisse sind nicht signifikant. 2h männlich (60,6575%; $p = 0,1218$; SEM = 33,43); 4d männlich (40,7635%; $p = 0,1360$; SEM = 18,16).

3.3.3 N-Cofilin und P-Cofilin ♂ in der Western Blot Analyse

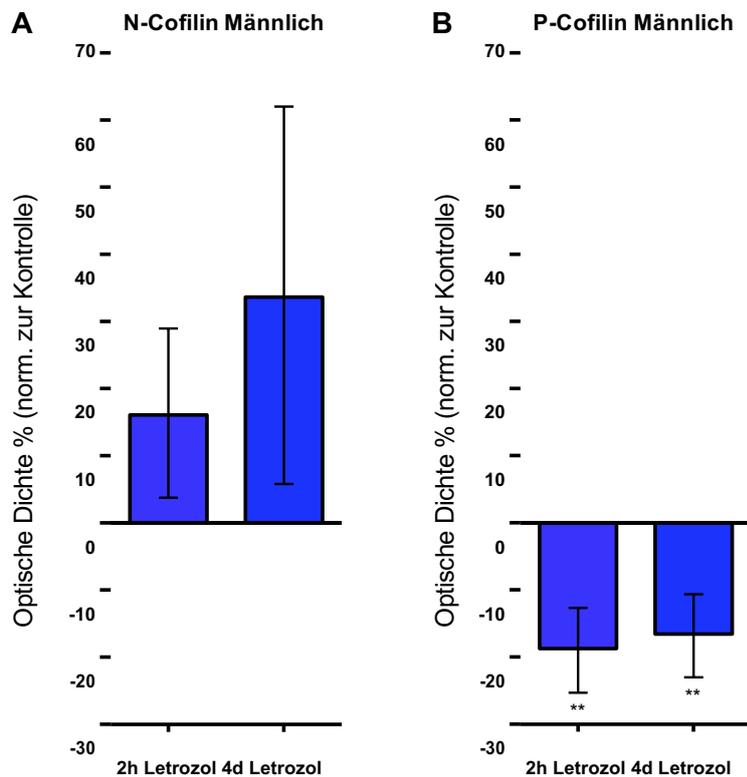


Abbildung 21: A: Bei Kurzzeitbehandlung (2h) der männlichen primären Podozytenkulturen ist N-Cofilin im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Nach Langzeitbehandlung (4d) ist keine signifikante Änderung der Expression von N-Cofilin zu erkennen.

B: Bei den männlichen primären Podozytenkulturen ist P-Cofilin nach Kurzzeitbehandlung (2h) und Langzeitbehandlung (4d) im Vergleich zur Kontrolle vermindert.

Zielprotein N-Cofilin und P-Cofilin, männliche primäre Podozytenkultur Letrozolbehandlung: 2 Stunden und 4 Tage; N = 11, Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Abb. 21 A N-Cofilin ♂

N-Cofilin ist im Podozyten der männlichen Ratte im Western Blot nach 2h Behandlung um 16% erhöht (16,375%; $p = 0,2231$; SEM = 12,61) und nach 4d Behandlung mit Aromatasehemmern um 33% mehr exprimiert (33,9101%; $p = 0,2556$; SEM = 28,12).

Abb. 21 B P-Cofilin ♂

Bei P-Cofilin zeigt sich eine signifikant verminderte Expression beider Behandlungsmodi 2h (-18,9792%; $p = 0,0133$; SEM = 6,322) und 4d (-16,8234%; $p = 0,0216$; SEM = 6,190) im männlichen Tier.

3.3.4 N-Cofilin und P-Cofilin ♀ in der Western Blot Analyse

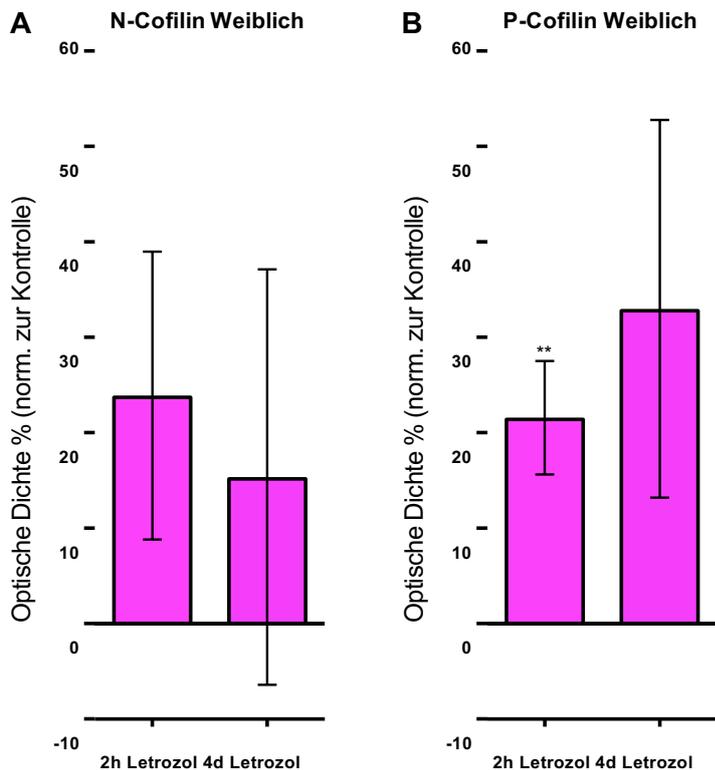


Abbildung 22: A: Bei Kurzzeitbehandlung (2h) und Langzeitbehandlung (4d) der weiblichen primären Podozytenkulturen ist bei N-Cofilin im Vergleich zur Kontrolle keine Änderung der Expression zu erkennen. Es existiert eine große Varianz.

B: Bei den weiblichen primären Podozytenkulturen ist nach Kurzzeitbehandlung (2h) P-Cofilin im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher exprimiert. Die Expression von P-Cofilin ist nach Langzeitbehandlung (4d) tendenziell zunehmend, wenn auch die Varianz der Ergebnisse groß ist.

Zielprotein N-Cofilin und P-Cofilin, weibliche primäre Podozytenkultur Letrozolbehandlung: 2 Stunden und 4 Tage; N = 11, Fehlerbalken repräsentieren \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Abb. 22 A N-Cofilin ♀

Bei N-Cofilin der weiblichen Ratte zeigt sich im Western Blot eine Änderung der Zielprotein-Expression bei beiden Behandlungszeiträumen. 2h um 23% (23,8897%; $p = 0,1446$; SEM = 15,09) und 4d um 15% (15,3624%; $p = 0,4965$; SEM = 21,77).

Abb. 22 B P-Cofilin ♀

Nach Kurzzeitbehandlung (2h) der weiblichen primären Podozyten zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression von P-Cofilin (21,5854%; $p = 0,0046$; SEM = 5,948). Nach Langzeitbehandlung (4d) zeigt sich bei großer Varianz eine Veränderung der P-Cofilin-Expression um 32% im Vergleich zur Kontrollbehandlung (32,9854%; $p = 0,1264$; SEM = 19,78).

3.4 Synaptopodin-Doppelbände

Zu Beginn der Western Blot Analyse stellte sich unerwartet, an der Stelle an der sich die singuläre Bande von Synaptopodin befinden sollte, eine Doppelbände auf dem Nitrozellulosepapier dar (Abb. 19; Abb. 23 A). Nach einer Sequenzierung, die wir in einem externen Laboratorium, an der Massenspektrometrie in der *Core Facility* der klinischen Chemie am Campus Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durch Sönke Harder durchführen ließen, stellte sich heraus, dass sich das juvenile Synaptopodin bei E18 Ratten mit einer Doppelbände im Western Blot darstellt (siehe Tabelle 13). Ursprünglich erwartet hatten wir jedoch eine singuläre Bande, ungefähr auf Höhe 110 kDa.

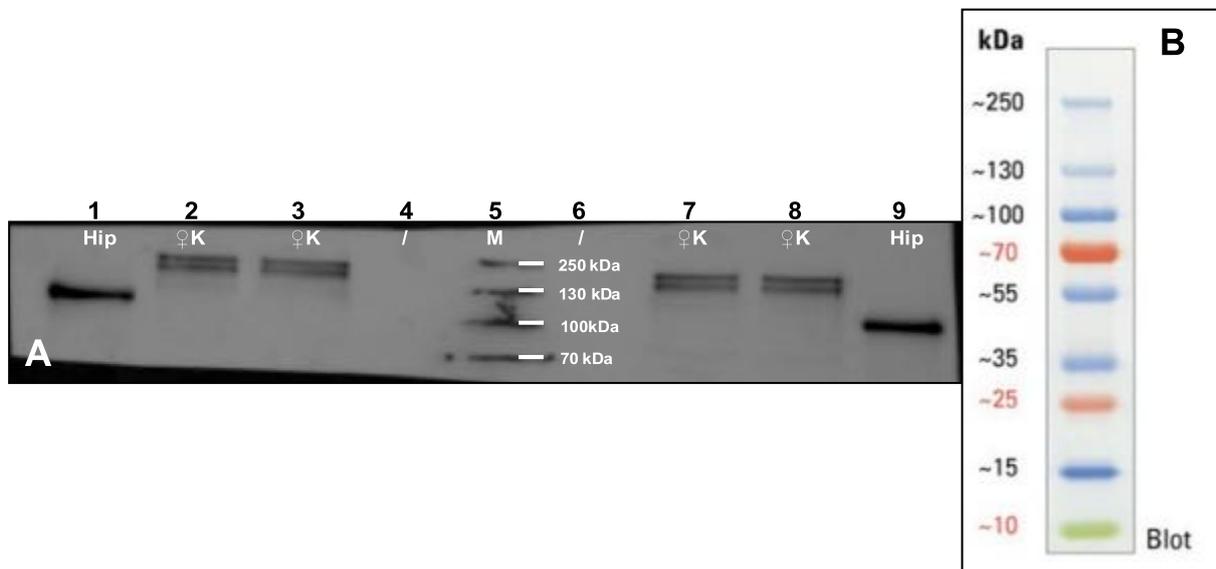


Abbildung 23 A: Western Blot Synaptopodin-Doppelbände an Position 2,3,7,8. Hip = *Hippocampus*; ♀ K = Synaptopodin weiblich Kontrolle; / = leere Tasche; M = Marker (Keller, M.-P. 2014, Neuroanatomie UKE).

B: Synaptopodin-Doppelbände (Pfeil) auf *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, 10 to 250 kDa von *Thermo Scientific* verwendet (Quelle: Internetpräsenz von Thermo Fisher, Juni 2016 URL: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26619>).

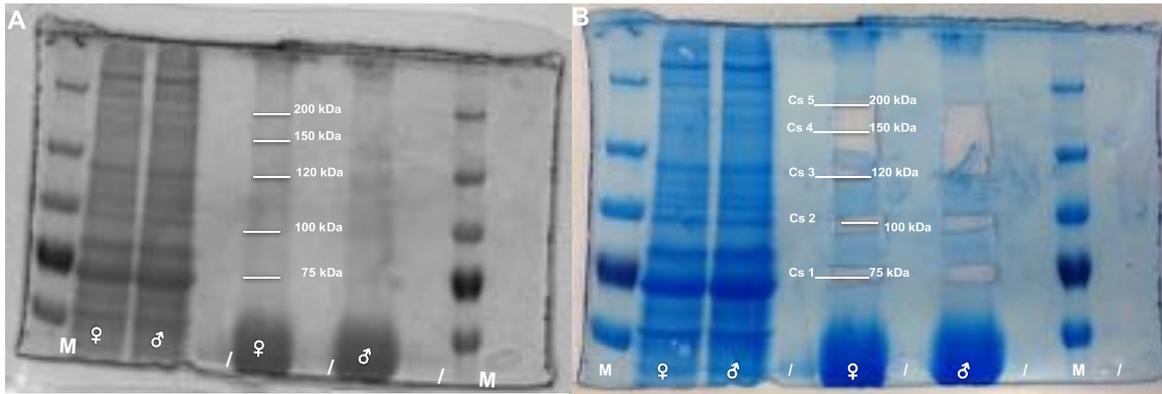


Abbildung 24: Gel nach Immunpräzipitation (A), sowie Probenentnahme (B) und Input aus Podozyten männlichen und weiblichen Geschlechts aus einer unbehandelten Zellkultur. Synaptopodin in 200 kDa und 150 kDa (cs 5 und cs 4)

Tabelle13: Proteinsequenzierung vom unbekanntem Protein im Western Blot mit freundlicher Unterstützung des Institutes der klinischen Chemie am UKE durch Sönke Harder.

Nachfolgend: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI/RGD) Referenz und Vergleich der Proteinsequenzen.

Protein	Masse M/Z	Proteinsequenz
Synaptopodin	8528036	1) K.VASEEEEEVPLVVYLK.E
	934.8036	2) K.VTPNPDLLDLVQTADK.R
Synaptopodin	721.7036	3) R.IAAQLTTPSSNSR.G
	637.8036	4) K.VSAPPSAASPFSR.E

1. KVAEEEEVPLVVYLKE

Alignment of Sequence_1: [Protein Sequence Window #1] with Sequence_2: [Protein Sequence Window #2]
 Similarity : 17/17 (100,00 %)

```

Seq_1  1  -----KVAEEEEVPLVVYLKE----- 17
                |||
Seq_2  1  MEGYSEASLLRHLEKVAEEEEVPLVVYLKENAALLTANGLHLSQNRETQQSSPNPPET 60

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  61  EEVPSPAADINQNPSSPNATLTTAASNHHNQPTADVNQNPATITPVQQNSSETQCSPN 120

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  121  GTLDSKPNTPSADDGQRPVPAEEVRSSILLIDKVSAPPSAASPFSREATPLSSSGPPAAD 180

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  181  LMSSSLIGMQPSTLVASAEQEVSGHAAVTPTKVYSEVHLTLAKPASVVNRTARPFMQ 240

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  241  SPGTTSQIEQSPMMGRRHFGEKAWAPPASSMADRSPPQQRHIMARSPMVERRLVGQRSPV 300

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  301  VERRPLGNFTPPPTYAETLSTAPVASQVRSPPSYSTLYPSSDPKPPHLKGQVVPANKTGI 360

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  361  LEESMARRGSRKSMFTFVEKPKVTPNPDLLDLVQTADEKRRQRDQGEVGMEDPFALGAE 420

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  421  ASNFQQEPIARDRSGPAAAEETVPEWASCLKSPRIQAKPKPKPNQNLSEASGKGAELYAR 480

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  481  RQSRMEKYVIESSGHAELARCPSPTMSLPSWKYTTNAPGGFRVASLSPARTPPASLYHG 540

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  541  YLPENGLRPEPTKQPHQMRPSLYALSVPKEPAKISSRATSSRASSRTVSPRAASPAKP 600

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  601  SSLDLVPNLPRAGLPPSPALPRPSRSSGLYNAPVQDSLQPTAVSPTYSSDISPVSPSRA 660

Seq_1  18  ----- 17
Seq_2  661  WSPRAKQAPRPSFSTRNAGIEAQVWKPSFCFK 692
  
```

Abbildung 25: Übereinstimmung mit Proteinsequenz 1) KVAEEEEVPLVVYLKE Rattus Norvegicus Synaptopodin (mRNA) in der NCBI Datenbank.

2. K.VTPNPDLLDLVQTAD EK.R

Alignment of Sequence_1: [Protein Sequence Window #1] with Sequence_2: [Protein Sequence Window #2]
 Similarity : 19/19 (100,00 %)

```

Seq_1 1 .....0
Seq_2 1 MEGYSEEASLLRHLEKVASEEEEEVPLVVYLKENAALLTANGLHLSQNRETQQSSPNPPET 60

Seq_1 1 .....0
Seq_2 61 EEVSPAADINQNPSSPNATLTTAASNHHNQPTADVNQNPATITPVQNSSETQCSPN 120

Seq_1 1 .....0
Seq_2 121 GTLDSKFNTPSADDGQRPVPAEEVRSSILLIDKVSAPPSAASPFREATPLSSSGPPAAD 180

Seq_1 1 .....0
Seq_2 181 LMSSSLIGMQPSTLVASAEQEVSGHAAVTTPTKVYSEVHLTLAKPASVVNRTARPFMQ 240

Seq_1 1 .....0
Seq_2 241 SPGTTSQIEQSPMMGRRHFGEKAWAPPASSMADRSFPQQRHIMARSPMVERRLVGQRSPV 300

Seq_1 1 .....0
Seq_2 301 VERRPLGNFTPPPTYAETLSTAPVASQVRSPPSYSTLYPSSDPKPPHLKGGQVVPANKTGI 360

Seq_1 1 -----KVTNPDLLDLVQTAD EK R -----19
                |||
Seq_2 361 LEESMARRGSRKSMFTFVEKPKVTPNPDLLDLVQTAD EKRRQRDQGEVGMEDEPFALGAE 420

Seq_1 20 .....19
Seq_2 421 ASNFQQEPIARDRSGPAAAEETVPEWASCLKSPRIQAKPKPKPNQNLSEASGKGAELYAR 480

Seq_1 20 .....19
Seq_2 481 RQSRMEKYVIESSGHAELARCPSPMSLPSSWKYTTNAPGGFRVASLSPARTPPASLYHG 540

Seq_1 20 .....19
Seq_2 541 YLPENGLRPEPTKQQPHQMRPSLYALSPVKEPAKISSRATSSRASSRTVSPRAASPAKP 600

Seq_1 20 .....19
Seq_2 601 SSLDLVPNLPRAGLPPSPALPRPSRSSPGLYNAPVQDSLQPTAVSPTYSSDISPVSPSRA 660

Seq_1 20 .....19
Seq_2 661 WSPRAKQAPRPSFSTRNAGIEAQVWKPSFCFK 692
  
```

Abbildung 26: Übereinstimmung mit Proteinsequenz 2) K.VTPNPDLLDLVQTAD EK.R Rattus Norvegicus Synaptopodin (mRNA) in der NCBI Datenbank.

3. R.IAAQLTTPSSNSR.G

Alignment of Sequence_1: [Protein Sequence Window #1] with Sequence_2: [Protein Sequence Window #3]
 Similarity : 16/16 (100,00 %)

```

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1 mlgthfpppplgpsegraapctfqipdgsyrclaleaeesssedglqgevrldleeegt 60

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 61 sksrvnhtppplsrapaiiqpssccrearggfqhsdkpsrewdvvqarkvmtasvssspv 120

Seq_1 1 -----RIAAQLTTPSSNSRG----- 16
                |||
Seq_2 121 prvaqkpalgrstsftekdlkeakersqriaaqltppssnsrgvqlfnrrrqrveftl 180

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 181 esrgqrspklsqealqtghpsspighapglsvnptspkpgspkhsssqpsrgvpghim 240

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 241 egyseeasllrhlekvaseeeevplvvyllkenaalltanglhlsqretqqsppnpete 300

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 301 evpspaadingnpsnatltaasnshhnqptadvnqnpptitpvqnssetqcspng 360

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 361 tldskpntpsaddgqrpvpaeevrssillidkvsappsaaaspsfsreatplsssgppaadl 420

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 421 msssliligmpstlvasaeqevsghaavtptkvysevhltlakpasvvnrtarpfgmq 480

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 481 pgttsqieqspmmgrrhfgekawappassmadrspqqrhimarspmverrlvgqrsppv 540

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 541 errrlgnftppptyaetlstapvasqvrspysstlypsdpkphlkgqvvpanktgil 600

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 601 eesmarrgsrksmftfvekpvtvpndlldlvqtadekrrqrdqgevmedepfalga 660

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 661 snfqqepiadrsgpaaaeetvpewasclkspriqakpkpknqnlseasgkgaelyarr 720

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 721 qsrmekeyviessghaelarcpsptmlpsswkyttnapggfrvaslspartppaslyhgy 780

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 781 lpengvlrpeptkqqphqmrpslyalspvkepakissratssrassrtvspraaspakps 840

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 841 sldlvnlpraglpsspaprpsrsspglvnapvqdsdqptavspstyssdispvpsraw 900

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 901 sprakqaprpsfstrnagieaqdrpeslptspwtpgasrppssldgwsppgwelgrgs 960

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 961 smgspplppppmpswsersvplrseaearppsrqlqallarniinaarrksasprp 1020

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 1021 apaetlrpfspqgpppppprmrspqparpagnfrgaafspiprslpvqpssectspr 1080

Seq_1 17 ----- 16
Seq_2 1081 spqaapsrpfpyrrsptdsdvsldsedglskspgilgynicprgwnslrlkrslptea 1140

Seq_1 17 ---- 16
  
```

Abbildung 27: Übereinstimmung mit Proteinsequenz 3) R.IAAQLTTPSSNSR.G Rattus Norvegicus Synaptopodin (mRNA) in der NCBI Datenbank.

4. K.VSAPPSAASPF.SR.E

```

Alignment of Sequence_1: [Protein Sequence Window #1] with Sequence_2: [Protein Sequence Window #2]
Similarity : 15/15 (100,00 %)

Seq_1 1 .....0
Seq_2 1 MEGYSEEASLLRHLEKVASEEEEEVPLVVYLKENAALLTANGLHLSQNRETQQSSPNPPET 60

Seq_1 1 .....0
Seq_2 61 EEVPSPAADINQNPSSPNATLTTAASNHHNQPTADVQNQPPATITPVQQNSSETQCSPN 120

Seq_1 1 -----KVSAPPSAASPF.SR.E-----15
                |||
Seq_2 121 GTLDSKPNTPSADDGQRVPVPAEEVRSSILLIDKVSAPPSAASPF.SR.EATPLSSSGPPAAD 180

Seq_1 16 .....15
Seq_2 181 LMSSSLIGMQPSTLVASAEQEVSGHAAVTTPTKVYSEVHLTLAKPASVVNRTARPFQM 240

Seq_1 16 .....15
Seq_2 241 SPGTTSQIEQSPMMGRRHFGEKAWAPPASSMADRSPQQRHIMARSPMVERRLVGQRSPV 300

Seq_1 16 .....15
Seq_2 301 VERRPLGNFTPPPTYAETLSTAPVASQVRSPPSYSTLYPSSDKPPHLKGQVVPANKTGI 360

Seq_1 16 .....15
Seq_2 361 LEESMARRGSRKSMFTFVEKPKVTPNPDLLDLVQTADEKRRQRDQGEVGMEDPFALGAE 420

Seq_1 16 .....15
Seq_2 421 ASNFQQEPIARDRSGPAAAEETVPEWASCLKSPRIQAKPKPKPNQNLSEASGKGAELYAR 480

Seq_1 16 .....15
Seq_2 481 RQSRMEKYVIESSGHAELARCPSPTMSLPSSWKYTTNAPGGFRVASLSPARTPPASLYHG 540

Seq_1 16 .....15
Seq_2 541 YLPENGVL RPEPTKQPHQMRPSLYALSPVKEPAKISSRATSSRASSRTVSPRAASPAKP 600

Seq_1 16 .....15
Seq_2 601 SSLDLVPNLPRAGLPPSPALPRPSRSSPGLYNAPQDSLQPTAVSPTYSSDISPVSPSRA 660

Seq_1 16 .....15
Seq_2 661 WSPRAKQAPRPSFSTRNAGIEAQVWKPSFCFK 692

```

Abbildung 28: Übereinstimmung mit Proteinsequenz 4) K.VSAPPSAASPF.SR.E *Rattus Norvegicus* Synaptopodin (mRNA) in der NCBI Datenbank.

Alignment of Sequence_1: [Protein Sequence Window #2] with Sequence_2: [Protein Sequence Window #3]

Similarity : 691/691 (100,00 %)

```
Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1 mlgthfppplgpsegraapctfqipdgsyrclaleaeesssedglqgevrlvdleeegt 60

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 61 sksrvnhtgtpplsrapaiiqpssccrearggfqhsdkpsrewdvvqarkvmtasvssspv 120

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 121 prvaqkpalgrstsftekdleakersqriaaqltppssnsvrgvqlfnrrrqrvneftl 180

Seq_1 1 -----M 1
Seq_2 181 esrgqrspklsqealqtghpsspighapglsvnptspkpgspkhsssqspvrgvpghim 240

Seq_1 2 EGYSEEASLLRHLEKVASAEVEEVLVYVYLKENAALLTANGLHLSQNRETQQSSPNPPETE 61
Seq_2 241 |egyseasllrhlekvaseeeevplvvylyknaalltanglhlsqnretqqsspnppete 300

Seq_1 62 EVPSPAADINQNPSSPNATLTTAASNHHNQPTADVQNPPATITPVQNSSETQCSPNG 121
Seq_2 301 |evpspaadinqnpsspnatlttaasnshhnqptadvnqnpapatitpvqnssetqcspng 360

Seq_1 122 TLDSKPNTPSADDQRPVPAEEVRSILLIDKVSAPPSAASPFSREATPLSSSGPPAADL 181
Seq_2 361 |tldskpntpsaddqrpvpaeevrstillidkvsappsaspsfsreatplsssgppaadl 420

Seq_1 182 MSSSLLIGMQPSTLVASAEQEVSGHAAVTTPTKVYSEVHLTLAKPASVVNRTARPPFGMQS 241
Seq_2 421 |msslligmpstlvasaeqevsghaavttptkvysevhltlakpasvvnrtarppfgmqs 480

Seq_1 242 PGTTSQIEQSPMMGRRHFGEKAWAPPASSMADRSPQQRHIMARSPMVERRLVGQRSPVV 301
Seq_2 481 |pgttsqieqspmmgrrhfgekawappassmadrspqqrhimarspmverrlvgqrspvv 540

Seq_1 302 ERRPLGNFTPPPTYAETLSTAPVASQVRSPPSYSTLYPSSDPKPPHLKGQVVPANKTGIL 361
Seq_2 541 |errplgnftppptyaetlstapvasqvrspssystlypssdpkpphlkgqvvpanktgil 600

Seq_1 362 EESMARGRSRKSMTFFVEKPKVTPNPDLDDLVTQADEKRRQRDQGEVGMEDPFALGAEA 421
Seq_2 601 |eesmargrsrksmftfvekpkvtpnpdlddlvtqadekrrqrdqgevmedepfalgaea 660

Seq_1 422 SNFQQEPIARDRSGPAAAEETVPEWASCLKSPRIQAKPKPKPNQNLSEASGKGAELYARR 481
Seq_2 661 |snfqqepiadrsgpaaaeetvpewasclkspriqakpkpkpnqnlseasgkgaelyarr 720

Seq_1 482 QSRMEKYVISSGHAELARCPSTMSLPSSWKYTTNAPGGFRVASLSPARTPPASLYHGY 541
Seq_2 721 |qsrmekyviessghaelarcpstmslpsswkyttnapggfrvaslspartppaslyhgy 780

Seq_1 542 LPENGLRPEPTKQPHQMRPSLYALSPVKEPAKISSRATSSRASRTVSPRAASPAKPS 601
Seq_2 781 |lpenglvrpeptkqphqmrpslyalspvkepakissratssrasrtvspraaspakps 840

Seq_1 602 SLDLVPNLPRAGLPPSPALPRPSRSPGLYNAPVQDSLQPTAVSPTYSSDISPVSPSRAW 661
Seq_2 841 |sldlvnlpraglppspalprpsrspglynapvqdslqptavsptyssdispvpsraw 900

Seq_1 662 SPRAKQAPRPSFSTRNAGIEAQ -----683
Seq_2 901 |sprakqaprpssfstrnagieaqdrpeslptspwtpgasrppslgdgwwspgpwelgrgs 960

Seq_1 684 ----- 683
Seq_2 961 smgspplpppppmspswersvsplrseaeearppsrqlqallarniinaarrksasprp 1020

Seq_1 684 -----VWKPSFCFK- 692
Seq_2 1021 |apaetlrpfsppqpppppprmrspqparpagnfrgaafspiprsplpv-gpssctsp 1079

Seq_1 693 ----- 692
Seq_2 1080 rspqaaprrpfpyprrsptdsdvsldsedsglkspgilgynicprgwnslrlkrslpte 1139

Seq_1 693 ----- 692
```

Abbildung 29: Übereinstimmung mit Proteinsequenz (K.VSAPPSAASPFSR.E) Rattus Norvegicus Synaptopodin-Isoform (mRNA) in der NCBI Datenbank.

4. Diskussion

In dieser Dissertation wurde die endogene 17β -Estradiolsynthese in Podozyten der Wistar Ratte und ihre Auswirkungen auf das Aktin-Zytoskelett untersucht. Wir haben nachgewiesen, dass Aromatase in Podozyten *in vivo* und *in vitro* vorhanden ist und dafür sorgt, dass in dieser hoch spezialisierten Zelle selbst, *in vitro* endogenes 17β -Estradiol gebildet wird. Damit 17β -Estradiol in der Zelle wirken kann müssen Estrogenrezeptoren vorhanden sein, die wir in Gestalt von ER α und ER β in den Podozyten nachweisen konnten. Den Einfluss von 17β -Estradiol auf die Struktur der Podozyten haben wir durch Untersuchung des Auf- und Abbaus des Aktin-Zytoskeletts analysiert. Dies geschah mithilfe der untersuchten Zielproteine: Synaptopodin und Cofilin, die das Aktin-Zytoskelett regulieren. Im Folgenden werden unsere Ergebnisse bewertet und besprochen.

4.1 *In vitro* und *in vivo* Nachweis von Estrogenrezeptoren in der Wistar Ratte

Unter Punkt 3.1 *in vitro* und 3.1.4 *in vivo* wird der Nachweis von Estrogenrezeptor α und Estrogenrezeptor β im Podozyten durch Immunhistochemie gezeigt. ER α und ER β sind verantwortlich für durch 17β -Estradiol induzierte genomische Signalwege. Wir konnten mittels Immunhistochemie zeigen, dass beide Rezeptorsubtypen in Podozyten von Wistar Ratten vorhanden sind. Wir konnten die Expression sowohl in adulten Tieren beider Geschlechter (Punkt 3.1.4; Abb. 6), als auch in Dispersionskulturen von Podozyten weiblicher und männlicher Tiere nachweisen (Abb. 12).

Estrogenrezeptoren wurden bereits in verschiedenen Geweben und Spezies nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Estrogenrezeptor-Subtypen ER α und ER β im Zentralen-Nerven-System, im Uterus, im Ovar, an den Gefäßwänden und in der Niere exprimiert wird. (Nilsson und Gustafsson 2002; Nilsson et al. 1998; Asanuma und Mundel 2003; Karl et al. 2006) Außerdem wurde in Mäusen die Expression von ER α in Podozyten, in Mesangiumzellen, im Endothel, im Zytosol und im Kern beschrieben (Irsik et al. 2013). Es gelang der Nachweis der Expression von ER α in Podozyten *in vivo* und *in vitro*, sowie in humaner Nierenbiopsie in den Glomeruli (Kummer et al. 2011), sowie von ER β in Mäusen (Catanuto 2012) und Menschen.

17β -Estradiol ist ein spezifischer Bindungspartner für ER und aktiviert diese wie unter

Punkt 3.1 beschrieben. Um fortführend zu untersuchen ob das Aktin-Zytoskelett auf unterschiedliche 17β -Estradiol-Spiegel verändert reagiert, musste als Prämisse nachgewiesen werden, dass Estrogenrezeptoren in Podozyten exprimiert werden.

Es existieren Unterschiede zwischen den Geschlechtern. ER α ist in männlichen Nieren um 150% höher exprimiert als in weiblichen (Lu et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass 17β -Estradiol die Expression von ER β erhöht während die ER α -Expression unverändert blieb (Catanuto et al. 2009). Catanuto et al fragten sich, da der „weibliche Vorteil“ nach der Menopause oder bei Frauen mit Diabetes nicht mehr vorhanden ist, ob die ER Ratio der Grund dafür sein könnte. Sie zeigten, dass Resveratrol (Estrogen-ähnliche Fähigkeiten/Agonist) womöglich die gleichen Signalwege wie 17β -Estradiol affiziert: und konnten zeigen, dass sich das Verhältnis von ER α und ER β zugunsten von ER β ändert, dieser ER also vermehrt exprimiert wird. In ER α -Knockout Mäusen konnten sie denselben Effekt auf verschiedene Kinasen, Proteasen oder IGF zeigen, die letztendlich das Zytoskelett der Podozyten modulieren. (Catanuto et al.2017)

Eine andere Studie von Rogers et al zeigte, dass niedrige 17β -Estradiol-Spiegel ER α reprimieren, wobei die Expression von ER β unverändert blieb. Dieser Effekt konnte für ER α nach hoher Estradiol-Substitution umgekehrt werden (150% Anstieg von ER α). (Rogers et al. 2007) Weitergehend muss untersucht werden ob das Geschlecht eine Rolle spielt und -falls ja- welcher der beiden Estrogenrezeptoren welchen Effekt generiert. ER α und ER β könnten dabei in den verschiedenen Geschlechtern spezifische und differente Effekte haben. Ein Grund hierfür könnten unterschiedliche Methoden sein. Die Quantifizierung durch mRNA oder Western Blot lässt keine Rückschlüsse auf präzise zelluläre Lokalisation der ER in den verschiedenen Zelltypen der Niere zu.

In hippocampalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass eine Geschlechterabhängige Expression von Estrogenrezeptoren stattfindet: die Inhibition der Estrogensynthese durch Letrozol induziert eine signifikante Verminderung der ER α Expression und eine vermehrte Expression von ER β . Als Kontrolle wurde 17β -Estradiol ins Medium gegeben, was dazu führte, dass ER α vermehrt und ER β vermindert exprimiert wurde. Andererseits könnte die Ausprägung von ER beim männlichen und weiblichen Podozyten unterschiedlich sein und so die Geschlechter ungleich sensitiv auf 17β -Estradiol reagieren lassen. (Prange-Kiel et al. 2003) Weibliche Podozyten könnten also sensibler auf Änderungen der 17β -

Estradiolspiegel reagieren, indem ER α und ER β hoch- oder herunterreguliert werden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass 17 β -Estradiol autokrin in der Zelle wirkt und dies auch durch Änderung der Expression von Estrogenrezeptoren induziert sein könnte.

Die biologischen Effekte von Estradiol werden durch verschiedene Signalwege vermittelt. (Hall et al. 2001; Gonzalez et al. 2017):

- den klassischen Ligandenabhängigen Weg, bei dem E2-ER Komplexe an freie Estrogen-Responsive-Elemente (ERE) binden die wiederum Promotorregionen im Gen dazu veranlassen, Gentranskription zu fördern oder zu verringern und eine anschließende Gewebereaktion auslösen.
- Ligandenunabhängige Wachstumsfaktoren (GF) oder zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAmp) aktivieren intrazelluläre Kinase-Signalwege, die zu Phosphorylierung und Aktivierung von ER und ERE-abhängiger Promotormodulation führen.
- ERE-unabhängig durch Estradiol-ER Komplexe, die die Transkription von Genen verändern und alternative *Response*-Elemente verwenden (AP-1) (Kushner et al. 2000) welche die aktivierten ER zur DNA bringt und eine Heraufregulation von Genen verursachen.
- Nicht genomische Signalwege an der Zellmembran bei der Estradiol eine Membranassoziierte Bindungsstelle besetzt die wiederum eine rasche Reaktion des Gewebes zur Folge hat.

Zusätzlich wurden rasche Effekte (*rapid effects*) von 17 β -Estradiol beobachtet die Sekunden oder Minuten nach 17 β -Estradiol Zugabe auftraten (Song und Santen 2006; Song et al. 2005; Warner und Gustafsson 2006; Simoncini et al. 2004). Diese raschen Effekte beinhalten die Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen und verstärken den Ionen-Fluss durch die Membran. Die genaue Funktionsweise bleibt noch unbekannt. Diese Estrogeneffekte werden als „*rapid effects*“ bezeichnet. (Revankar et al. 2005) Wenn beide ER Subtypen in Zellen koexprimiert sind kann ER β ER α -abhängige Transkription inhibieren (Hall und McDonnell 1999; Matthews und Gustafsson 2003; Matthews et al. 2006). Die genauen molekularen Umstände, die dazu führen müssen noch erforscht werden. Ob diese facettenreichen Mechanismen der Estradiol- und Estrogenrezeptor-Signalwege eine Rolle bei unseren Experimenten spielten ist nicht auszuschließen.

Mortensen et al. konnten zeigen, dass DMSO unter anderem die Expression der Gene von ER α und ER β erhöhte. Die PCR Analyse zeigte einen Anstieg der Isoformen der ER im Lachs. (Mortensen et al. 2006) Bei unseren Versuchen konnten wir dieses Ergebnis nicht nachvollziehen. Wir benutzten Säugetiere und keine Fische und bei unseren Versuchen konnten wir in den Geschlechtern Unterschiede finden, die der von Mortensen und Kollegen aufgestellten These widersprechen.

4.2 *In vitro* und *in vivo* Nachweis von Aromatase in der Wistar Ratte und der Nachweis von 17 β -Estradiol in Podozyten

In dieser Arbeit konnte der Beweis erbracht werden, dass Podozyten der Wistar Ratte Aromatase exprimieren und damit fähig sind, aktiv den entscheidenden Schritt zur endogenen 17 β -Estradiolsynthese zu vollziehen (Punkt 3.1.2). Das Enzym Aromatase katalysiert irreversibel und spezifisch die Umwandlung von Androgenen zu 17 β -Estradiol. Unter Punkt 3.1.3. und Abbildung 14 zeigen wir in dieser Arbeit den 17 β -Estradiolnachweis durch *Radioimmunassay* in primären Podozytenkulturen und damit die Funktionsfähigkeit der Aromatase im Podozyten. Die Aromatase ist durch den Aromatasehemmer Letrozol manipulierbar.

In Nierengewebe und speziell in Synaptopodin-positiven Arealen der Podozyten von juvenilen und adulten Ratten wurde die Immunreaktivität der Aromatase nachgewiesen (siehe Punkt 3.1.2). Die extragonadale Synthese von Estradiol wurde bereits in anderen Organen nachgewiesen, wie z.B. im Gehirn (Garcia-Segura et al. 2008) und dem *Hippocampus* (Prange-Kiel et al. 2003; Hojo et al. 2004). Die lokal gebildete Menge an synthetisiertem Estradiol ist dabei im ZNS höher als im Serum beider Geschlechter in Mäusen (Hojo et al. 2004). Die Niere ist kein primär endokrinologisches Organ und scheint durch endogene Estradiolsynthese die Form und Funktion ihrer der Podozyten zu modulieren.

4.3 Der Einfluss von Kurz- und Langzeitbehandlung mit Letrozol auf die Aktin-Zytoskelett assoziierten Proteine in Podozyten der Ratte (im LSM und WB): Gegenüberstellung der Ergebnisse LSM und WB

Die gezeigten Ergebnisse beziehen sich auf die nicht mit Letrozol behandelte Kontrolle (DMSO) und geht von dieser als Basislinie, oder aufgetragener mittlerer Differenz aus und zeigen letztendlich die Exprimierung, oder Reprimierung von

Proteinen (Punkt 3.2 und 3.3).

Tabelle 14: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blot Analyse für ♀ = weiblich, ♂ = männlich; ↑ - gestiegene Expression; ↓ - gefallene Expression; = - gleich geblieben; * p < 0.05, ** p < 0.01.

Western Blot	♀		♂	
Synaptopodin:	2h ↑**	4d ↑	2h ↑	4d ↑
N-Cofilin:	2h ↑	4d ↑	2h ↑	4d ↑
P-Cofilin:	2h ↑**	4d ↑	2h ↓**	4d ↓**

Tabelle 15: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie für ♀ = weiblich, ♂ = männlich; ↑ - gestiegene Expression; ↓ - gefallene Expression; ↔ - gleich geblieben; * p < 0.05, ** p < 0.01.

Laserscanning-Mikroskopie	♀		♂	
Synaptopodin:	2h ↑*	4d ↔	2h ↑**	4d ↔
N-Cofilin:	2h ↓**	4d ↔	2h ↔	4d ↓**
P-Cofilin:	2h ↔	4d ↓**	2h ↔	4d ↑*

Der häufigste Grund für die terminale Niereninsuffizienz ist das Versagen der glomerulären Filtrationsbarriere. Podozyten sind Teil der glomerulären Filtrationsbarriere. Die gemeinsame Charakteristik von Glomerulopathien mit Proteinurie ist das *Effacement* (retrahieren/abflachen) der Fußfortsätze und damit die Alteration des Aktin-Zytoskeletts, das den Verlust von Eiweißen bedingt. (Greka und Mundel 2012; Oh et al. 2011)

Das Aktin-bindende Protein Synaptopodin ist hoch exprimiert in dynamischen Kompartimenten exklusiver motiler Zellen wie dem dendritischen *Spine*-Apparat von Neuronen im Zentralen-Nerven-System und Fußfortsätzen von Podozyten der Niere (Mundel et al. 1991; Mundel et al. 1997a; Deller et al. 2003). Synaptopodin ist

essentiell für das Aktin-Zytoskelett und für Stress-Fasern (*stress fibers*). Stress-Fasern sind kontraktile Aktin-Bündel in Zellen nicht muskulären Ursprungs, die neben Synaptopodin über verschiedene Proteine Quervernetzungen in Zellen verursachen und mittels Rho-GTPasen orchestriert werden. (Asanuma et al. 2006) Gen-*silencing* von Synaptopodin in Podozyten verursacht den Verlust der Stress-Fasern (Asanuma et al. 2006) die essentiell für Migration und Kontraktilität, Adhäsion und Morphologie der Podozyten sind und die Plastizität der Podozyten modulieren (Yanagida- Asanuma et al. 2007). Mundel und Kollegen (Greka und Mundel 2012) konnten zeigen, dass Synaptopodin ein wichtiger Regulator der Rho-GTPasen in Podozyten ist. Diese Rho-GTPasen wiederum sind die Hauptregulatoren des Zytoskeletts. (Etienne-Manneville and Hall 2002; Aspenström et al. 2004) Synaptopodin verhindert die Ubiquitinierung und die proteasomale Degradation von RhoA und vermittelt Signalwege im Podozyten (Faul et al. 2008; Asanuma et al. 2006). In Podozyten ohne Synaptopodin, mit ubiquiniertem RhoA, ist das Gefüge von Stress-Fasern reduziert und es wurden ungerichtete zytoplasmatische Projektionen beobachtet (Asanuma et al. 2005). Dies macht den Umstand wahrscheinlich, dass Synaptopodin in Podozyten die glomeruläre Filtrationsbarriere stabilisiert, indem es RhoA fördert und dabei verhindert, dass die Fußfortsätze in einen motileren Zustand übergehen (Faul et al. 2008). Offensichtlich bewirkt die Phosphorylierung von Synaptopodin und Cofilin eine Stabilisation des podozytären Zytoskeletts. Allerdings existieren, das Symptom Proteinurie betreffend, differierende Ergebnisse ob die Stabilisation der Fußfortsätze die Proteinurie verstärkt. (Teng et al. 2012) oder verhindert (Greka und Mundel 2012) In Neuronen konnte gezeigt werden, dass Synaptopodin und Cofilin stark auf Estradiol reagieren (Fester et al. 2009; 2013; Kramár et al. 2009; Vierk et al. 2012).

Im Vergleich zur Langzeitbehandlung (4d), zeigt nur die Kurzzeitbehandlung beim männlichen Podozyten mit Letrozol (2h) eine signifikant vermehrte Expression von Synaptopodin. Beim weiblichen Podozyten sind die Ergebnisse nicht signifikant. Allerdings ist bei Kurzzeitbehandlung der Trend der vermehrten Expression Synaptopodins wie bei den männlichen Podozyten zu beobachten. Beide Geschlechter reagieren also ähnlich, es ist kein Unterschied zu detektieren.

Eine Langzeitbehandlung mit Letrozol scheint keinen Effekt auf Synaptopodin zu haben. Hier könnte eine Adaptation des Aktin-Zytoskeletts oder Synaptopodins dahingehend stattgefunden haben, dass die Zelle sich an die veränderten 17β -

Estradiol-Spiegel angepasst hat. Hingegen zeigt eine kurzfristige Aromatasehemmung einen Effekt vermehrter Synaptopodin-Expression. Dies könnte an Zellstress und kurzfristiger Änderung des hormonellen Gleichgewichtes liegen, bei dem die Zelle durch vermehrte Stress-Fasern Stabilität oder Motilität erreichen will.

Für weiterführende Forschung dürfte interessant sein herauszufinden, wie Podozyten die bereits eine Glomerulopathie (*Effacement*) entwickelt haben, auf verminderte 17 β -Estradiol-Spiegel reagieren. Reagieren sie nach Kurzzeitbehandlung auch mit Stress und besteht nach Langzeitbehandlung ein Adaptationsmechanismus?

Letrozol wird als adjuvante, neoadjuvante und *First Line* Therapie bei den verschiedenen Formen den Hormonrezeptorpositiven Mamma-Ca bei Frauen eingesetzt (Fachinformation: Letrozol). Die Beobachtung der Langzeitbehandlung könnte Einflüsse auf die Nierenfunktion sichtbar machen. Wenn das endogene 17 β -Estradiol der Podozyten durch das systemisch gegebene Letrozol vermindert wird, könnte sich dies klinisch und anatomisch auswirken und beweisen lassen. In der Arbeit von Fester et al. 2017 wurde nachgewiesen, dass Synaptopodin in weiblichen *Hippocampi* stärker exprimiert ist, als in männlichen (Fester et al. 2017). Dies könnte auch für Podozyten gelten. Dabei stellt sich die Frage, ob es geschlechtsabhängige Regulationen und Ausprägungen von Synaptopodin gibt.

Kwon und Kollegen konnten zeigen, dass bei fortgeschrittenen Glomerulopathien die Synaptopodin-Exkretion im Urin eine Korrelation zu erhöhten Serumkreatininspiegeln aufwies. Somit könnte es möglich sein, Synaptopodin oder eventuell Cofilin als Marker zu verwenden, um Glomerulopathien frühzeitig zu erkennen zu können. In dieser Studie wurden allerdings wenig Probanden (N = 33) untersucht und die Laborchemischen Tests sind noch nicht standardisiert und im klinischen Alltag etabliert. (Kwon et al. 2016)

Cofilin ist essentiell und verantwortlich für die hohen Umsatzraten von Aktin-Filamenten *in vivo* und damit für die Organisation von Aktin-Filamenten intrazellulär, die Motilität der Zelle, Zytokinese, Zellpolarität, für neuronale Pfade und die Stabilität in Organismen (Zigmond 1993; Rosenblatt et al. 1997; Carlier et al. 1997; Lappalainen et al. 1997). In Neuronen ist es wie Synaptopodin stark Estrogen-sensitiv (Fester et al. 2009 und 2013; Kramár et al. 2009; Vierk et al. 2012).

In einer *in vivo* Studie in der Mäuse mit Diabetes Mellitus Typ II untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass Estradiol die Mäuse vor Schaden am Podozyten

schützt, da es Aktin-Umbau und Apoptose verhindert. (Catanuto et al. 2012) Eine gestörte zytoskelettale Dynamik ist der Hauptgrund für Podozyten-Verletzungen. Aktin-Umbau ist essentiell für die Nierenfunktion und die Instandhaltung der Filtrationsbarriere (Faul et al. 2007). Cofilin spielt hier eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer Proteinurie (Teng et al. 2012). Mutierte Mäuse mit spezifisch in Podozyten stattgehabter Deletion im Gen für Cofilin (kein Knockout), zeigen Veränderungen der Fußfortsätze, die zu massiver Proteinurie führen. Die Aktivität Cofilins reguliert den Auf- und Abbau F-Aktins. Nach Phosphorylierung an Ser3 ist die Cofilin-Aktivität vermindert, dies wiederum verhindert den Ab- oder Umbau von F- Aktin und stabilisiert unter anderem dendritische *Spines*. (Bramham et al. 2008) Bei glomerulären Erkrankungen wird immer wieder ein *Effacement* der Podozyten vorgefunden wenn Cofilin phosphoryliert wird. Somit ist Proteinurie assoziiert mit einem Anstieg von (P-)Cofilin. Auf dieser Grundlage vermuteten wir, dass die Stabilisierung der podozytären Fußfortsätze durch phosphoryliertes Cofilin eine reduzierte Adaptationsfähigkeit der Podozyten auf sich ändernde glomeruläre Drücke zur Folge hat. Der Druck im Gefäßkonvolut der Glomeruli ändert sich mit dem systemischen Blutdruck und sehr stabile, weniger dynamische Fußfortsätze könnten unfähig sein, sich auf ständig wechselnde Drücke und somit alternierende Gefäßwanddehnungen einzustellen. Um ein funktionierendes Netzwerk von Filtrationsschlitzten aufrechtzuerhalten, müssen Podozyten adaptionsfähig bleiben. (Teng et al 2012)

Es konnte belegt werden, dass Cofilin eine verminderte Affinität für Aktin hat, wenn es *in vitro* getestet wurde (Agnew et al. 1995; Ressayre et al. 1998; Smertenko et al. 1998). Da es in den Experimenten um relative Werte ging, ist diese Tatsache zu vernachlässigen, denn die Expression oder Reprimierung der Zielproteine bezog sich immer auf die Kontrolle mit DMSO in Beziehung zur Aromatasehemmung in Podozyten. Nach Frieden *et alia* scheint der pH-Wert, in dem sich die Zelle befindet, ein weiterer Faktor zu sein (Frieden et al. 1998). Durch eine standardisierte Form der Kultivierung, können wir Einflüsse durch pH-Wertänderungen ausschließen. Die Untersuchung des pH-Wertes stand nicht im Fokus in dieser Arbeit.

Es existieren andere Komponenten der Regulation die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren: zum Beispiel Interleukin 6 vermittelte Podozytenverletzungen (He et al. 2018) oder protektive Effekte von Estrogenen bei nierenschädigenden Signalwegen

wie der Kollagensynthese (Negulescu et al. 2002), dem Renin-Angiotensin-System (Komukai et al. 2010) oder dem Einfluss freier Radikale (Neugarten 2007) um nur einige Beispiele zu nennen.

Geschlechterdimorphismus

In dieser Arbeit konnte die 17 β -Estradiol-Sensitivität von Synaptopodin und Cofilin in Podozyten bestätigt werden: Die Reduktion der 17 β -Estradiolsynthese durch Aromatasehemmung induziert nach unseren Ergebnissen gegensätzliche Effekte in weiblichen und männlichen Podozyten.

Unsere Ergebnisse liefern Hinweise, dass es bei Synaptopodin keinen Geschlechterdimorphismus gibt. Hier wird bei beiden Geschlechtern Synaptopodin nur nach Kurzzeitbehandlung heraufreguliert.

Unsere Experimente zeigen, dass die Reduktion der endogenen 17 β -Estradiolsynthese durch Aromatasehemmung unterschiedliche Effekte auf Cofilin in weiblichen und männlichen Podozyten induziert. Männliche Podozyten reagieren auf eine Verminderung des 17 β -Estradiolspiegels mit verstärkter Phosphorylierung von Cofilin (mehr P-Cofilin), während weibliche Podozyten Cofilin dephosphorylieren und damit aktivieren. In Bezug auf das Protein Cofilin scheint bei verminderten 17 β -Estradiolspiegeln ein Geschlechterdimorphismus zu existieren. Männliche Podozyten werden stabiler oder weniger motil, während weibliche Podozyten beweglicher oder aktiver werden, nachdem sie mit dem Aromatasehemmer Letrozol behandelt wurden. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Motilität der Podozyten unter Stress, den Vorteil der Weibchen gegenüber dem der Männchen erklärt. Motilität - nicht Stabilität – könnte dazu führen die Proteinurie zu minimieren oder zu verhindern. Mit der Tatsache im Geiste, dass Frauen ein verbessertes Krankheitsergebnis bei Glomerulopathien haben als Männer, ließe sich in Zusammenschau mit unseren gesammelten Daten schließen, dass eine größere Motilität des podozytären Zytoskeletts eher vor Proteinurie schützt, als vermindert bewegliche Fußfortsätze.

In der Western Blot-Analyse verwendeten wir Tubulin als Bezugspunkt für die Zielproteine Synaptopodin und Cofilin. Wir untersuchten den Einfluss von 17 β -Estradiol auf das Aktin-Zytoskelett. Tubulin ist auch Aktin-Zytoskelett-assoziiert und

die Frage, die sich aufdrängt ist, ob sich durch Aromatasehemmung Tubulin analog zu den Zielproteinen verändert und somit die Ergebnisse verfälscht. Eine Variabilität ist bei Ausprägung von Proteinen immer vorhanden, im speziellen Fall ist allerdings Tubulin weniger variabel als z.B. GAPDH (Biologische Variabilität: 18,7% für β -actin und 41,1% für GAPDH, speziell bei renalen Erkrankungen bei Gelelektrophorese). (Ferguson et al. 2005) Eine Alternative zum Western Blot wäre das *total protein staining*.

Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-60 kDa lassen sich eher in 15% Trenngelen darstellen und Proteine mit 30-120 kDa eher in 10% Gelen. Da die Zielproteine dieser Arbeit in einer Spanne von 10 kDa (N-, P-Cofilin) über 55 kDa (Tubulin) bis zu < als 130 kDa (Synaptopodin-Doppelbande) bewegen, stellte sich die Darstellung im Western Blot als schwierig dar. In Vorversuchen wurde ein 10% Gel benutzt, dass sich sehr gut für Synaptopodin eignete. N- und P-Cofilin wurden nicht oder ungenügend abgebildet und somit wurde später ein 15% Gel verwendet, dass N- und P-Cofilin besser darstellte. Für die Auswertung nach den Vorversuchen wurden bei unserer Untersuchung ausschließlich 15% Gele verwendet.

Dass phosphoryliertes (P-)Cofilin in den Kern migriert ist eine Tatsache, die in der Western Blot Analyse schwer darzustellen ist, da die Kernfraktion nach dem Zentrifugieren mit dem Überstand nicht mit entnommen wurde. So lässt sich das Ergebnis von P-Cofilin im Western Blot sehr konklusiv erklären. Dort ist P-Cofilin, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, beim männlichen Podozyten in Kurz- und Langzeitbehandlung reprimiert. Dies legt eine Migration von P-Cofilin in den Kern nahe, was auch durch andere Forschungsarbeiten bestätigt wurde (siehe Punkt 1.3.1). Um jedoch eine Aussage über die Expression von P-Cofilin zu treffen, hätten wir alle Fraktionen entnehmen müssen, da P-Cofilin wie andere Proteine nicht im Kern exprimiert wird, sondern dorthin wandert.

4.4 Synaptopodin Doppelbande

Synaptopodin aus dem *Cerebrum* ist ein Protein mit einer kalkulierten Masse von 73,7 kDa (Mensch) / 74,0 kDa (Maus) (Progen Datasheet Synaptopodin #65194). Die kalkulierte Masse und das tatsächliche molekulare Gewicht differieren in der Western Blot Analyse (100 kDa), was am ehesten an posttranslationaler Modifikation oder dem hohen Prolingehalt liegen könnte. Synaptopodin aus den Glomeruli der Niere

hingegen hat, im Gegensatz zum entsprechenden Protein im Gehirn, eine leicht erhöhte Masse im Western Blot (110 kDa). Der genaue Grund dafür ist unbekannt. Wahrscheinlich ist auch hier postrtranslationale Modifikation oder eine anders geartete Phosphorylierung des „Nieren“-Synaptopodins als Ursache zu nennen. (Mundel et al. 1997a; Asanuma et al. 2005)

In der Western Blot Analyse von Synaptopodin zeigte sich an der Stelle, an der sich die singuläre Bande von Synaptopodin befinden sollte, eine Doppelbande auf dem Nitrozellulosepapier (Punkt 3.4 Abb. 23). Nach einer Protein-Sequenzierung, die wir freundlicherweise im Institut der klinischen Chemie am UKE durch Sönke Harder durchführen ließen stellte sich heraus, dass sich das pränatale Synaptopodin bei E18 Ratten mit Doppelbande (≈ 150 kDa) im Western Blot darstellt.

Im *Cerebrum* sowie der Niere, *in vivo* und *in vitro*, ist die Expression Synaptopodins abhängig von der Differenzierung der Zellen. Während der *Nephrogenese* wird in Podozyten-Vorläuferzellen noch kein Synaptopodin exprimiert. Erst wenn Podozyten anfangen sich zu differenzieren und die für sie typische Fußfortsatz-Architektur entwickeln, ist Synaptopodin nachweisbar (Mundel et al. 1991). Während der postnatalen Reifung von Ratten wird Synaptopodin im Gehirn der Tiere erst ab Tag 15 im Western Blot detektiert und erreicht sein Maximum in der adulten Ratte.

Die exklusive Synaptopodin-Synthese im *Telencephalon* wurde durch *in situ* Hybridisierung bestätigt, wo Synaptopodin-mRNA nur in den *Perikaryen* des cerebralen *Cortex*, dem Olfaktorischen *Bulbus*, dem *Striatum* und dem *Hippocampus*, also an Orten mit hoher synaptischer Plastizität gefunden wurde. (Mundel et al. 1997a; Mundlos et al. 1993) Möglicherweise befindet sich Synaptopodin hier in einem transitorischen Status, oder in einer Entwicklungsstufe alternierender Phosphorylierung, die die Doppelbande verursacht, oder es findet, wie bereits beschrieben, eine alternative posttranslationale Modifikation oder *splicing* statt. Zusätzlich hat Synaptopodin mehr Masse als angenommen und stellte sich im Western Blot bei über 130 kDa dar (siehe Punkt 3.3).

Dieses Ergebnis sollte in Form einer weiteren massenspektrometrischen Untersuchung und einer dahingehend ausgearbeiteten Veröffentlichung, z.B. in einem „Methodikpaper“ evaluiert werden.

Basierend auf dem Ergebnis der Synaptopodin-Doppelbande könnte auch eine Hypothese zur Pathogenese glomerulärer Erkrankungen entstehen: die Doppelbande, also dass mutmaßlich alternierte oder noch nicht maturierte Protein

Synaptopodin, könnte eine andere Funktion haben als die reifere Variante. Das Protein Synaptopodin könnte sich während der Reifung verändern und somit auch die Funktion des Proteins.

4.5 Ausblick

In den vergangenen Dekaden wurde der Podozyt als zentrale Zelle identifiziert, die bei Funktionsverlust für das nephrotische Syndrom und Nierenschädigung verantwortlich ist.

Die Funktion von Membranrezeptoren, Ionenkanälen (Ashcroft 2006) und anderen Signalmolekülen ist der *Ariadnefaden* der verfolgt werden muss, um aus dem Wirren dieses „Molekül-Labyrinths“ zu entkommen und ein umfassendes Verständnis dieses besonderen Zelltyps zu erlangen. Obwohl es zu diesem Thema bereits zahlreiche Forschungsergebnisse gibt, bleiben weiterhin viele zentrale Fragen offen:

Wie arbeiten die bereits identifizierten molekularen Komponenten der Podozyten unter physiologischen Bedingungen unisono zusammen und was passiert in diesem System bei Schädigung durch Noxen? Ein weiterer wichtiger Punkt sind die zytoskelettalen Dynamiken die in dieser Arbeit untersucht wurden und einen zentralen Mechanismus der podozytären Schädigung darstellen. Wie die molekularen Pfade tatsächlich verlaufen, wird ein wichtiges Thema zukünftiger Forschung sein, denn die genauen Mechanismen bleiben im Verborgenen. Ist beispielsweise das *Effacement* die Ursache des Albuminverlustes oder versucht der Podozyt durch das *Effacement* den Proteinverlust zu mindern, geht dem Ablösen von Podozyten der Zelltod voraus oder ist es umgekehrt? Ein Grund für eine Glomerulopathie könnte die fehlerhafte Differenzierung vom pränatalen, zum gereiften Protein sein. Dieser Schritt könnte genauso nach der Menopause durch veränderte Estrogenspiegel gegenläufig ablaufen und ein Erklärungsansatz für glomeruläre Erkrankungen sein. Die Forschung am Tiermodell wird zukünftig eine zentrale Rolle spielen, um Krankheitsprogression besser verstehen zu können.

Es gibt Hinweise, dass Podozyten direkte Ziele vieler klassischer Anti-Proteinuretischer Medikamente sind. Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, ein Calcineurininhibitor, werden genutzt, um Nierenerkrankungen mit nephrotischen Syndrom zu behandeln. Im *in vivo* und *in vitro* Modell (in Maus und Ratte) konnte nach PAN-induzierten (Puromycin-Aminonukleosid) Podozyten-Schädigungen gezeigt werden, dass Cyclosporin A das Zytoskelett von Podozyten vor Apoptose

schützt und in Teilen das ungeordnete F-Aktin-Arrangement retten oder wiederherstellen konnte (Li et al. 2015).

Die Änderung der Motilität könnte ein wichtiger Faktor sein, der den weiblichen Podozyten widerstandsfähiger macht. Was genau bewirkt den Unterschied, bei dem Podozyten der Weibchen beweglicher und die der Männchen stabiler werden und ist das wirklich von Vorteil?

Kriz *et alia* stellt heraus, dass das Abflachen der Podozyten unklarer Genese sei. Das Abflachen könnte ein Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Blut-Harn-Schranke sein und könnte die Proteinurie vermindern. Ist dementsprechend *Effacement* der Podozyten eine Folge von der Proteinurie oder die Ursache des Albuminverlustes? Dies bezeichnet Kriz als die „Enigma der Fußfortsätze“, bei der die Suche nach einem *Alan Turing*, der diesen Mechanismus zu Dechiffrieren vermag, noch nicht abgeschlossen ist. (Kriz et al. 2012)

Im zentralen Interesse steht auch die Frage nach dem Verhalten der Podozyten unter vermehrtem Stress und der Pathophysiologie im entzündeten Podozyten. Ist hier die endogene 17β -Estradiolsynthese verändert und kann man einen Geschlechterdimorphismus nachweisen?

Ein weiteres Thema einer wissenschaftlichen Untersuchung könnte eine Makroskopische Analyse der podozytären Fußfortsätze sein, ob die in dieser Arbeit untersuchten Aktin-Zytoskelett assoziierten Proteine auch die Morphologie des Podozyten beeinflussen. Hier könnten mittels Elektronenmikroskopie ultrastrukturelle Veränderungen der Fußfortsatzbreite, z.B. mit Aromatase-Knockout-Tieren und dem mit Aromatasehemmer und DMSO behandelten Wildtyp untersucht werden. Auf diese Weise könnte das systemische Wirken von Estradiol untersucht werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass zytoplasmatisches „actinin-4“ wahrscheinlich an der Regulation des Zytoskeletts und der Zellmotilität beteiligt ist (Honda et al. 1998). Bei jungen Mäusen zeigten sich Regionen mit Fußfortsatz-*Effacement* und global veränderte Podozyten-Morphologie in adulten Mäusen im Tierersuch bei homozygoten α -actinin-4 Knockout-Mäusen. Nach einigen Monaten waren Proteinurie, glomeruläre Pathologien und der Exitus zu beobachten. Anders lokalisierte Pathologien wurden trotz eigentlich ubiquitären Vorkommens von α -actinin-4 nur in den Nieren der KO-Versuchstiere gezeigt. Der gezogene Schluss ist also, dass α -actinin-4 für eine normale glomeruläre Funktion benötigt wird. (Kos et al. 2003) Dies muss im Rahmen des Zusammenspiels der Zytoskelett-assoziierten

Moleküle weiter exploriert werden.

Unveröffentlichte Erkenntnisse von Fester *et alia* konnten zeigen, dass ER α im Podozyten der weiblichen - nicht der männlichen Ratte - heraufreguliert wird. Dies könnte ein Rettungsversuch der Zelle sein, um sie vor Apoptose oder Zelltod zu schützen. Ob das weibliche Geschlecht abhängiger von Estrogenrezeptor α ist, oder ein anderer Rezeptor die Rolle von ER α und ER β übernehmen kann wäre ein Ansatz. Existiert also eine multifaktorielle Estrogenresponsivität oder ist die ER Expression different in beiden Geschlechtern (siehe Punkt 1.7.1)? Um diese Fragen zu untersuchen, könnten Experimente mit proteinurischen Mausmodellen durchgeführt werden, bei denen die Rezeptorausprägung und Veränderungen auch nach Estrogeninhibition oder -gabe untersucht wird.

Es ist schwierig Experimente aus humanen Nierenzelllinien auf die *in vivo* Situation zu beziehen. Die Ausgangskriterien - beispielsweise bei Frauen mit Mamma- Karzinom - , die eine Therapie mit Letrozol bekommen, haben aufgrund der Chemotherapie keinen physiologischen Zustand und somit ist die Niere nicht unter normalen Bedingungen untersuchbar. Eine klinische Estradiol-Therapie von Kindern mit MCGN würde eine verfrühte *Maturation* oder Feminisierung verursachen und ist unter ethischen Gesichtspunkten abzulehnen. Stattdessen könnte man die Hormonspiegel von Estradiol und Testosteron bei Kindern untersuchen. Bestenfalls vor Auftreten der MCGN, sowie während und nach der Erkrankung, um so besser verstehen zu können, ob und welche Rolle die Sexualhormone im Krankheitsgeschehen spielen.

Nur weil wir einzelne Instrumente des Orchesters (er-)kennen, wissen wir noch lange nicht wie die Sinfonie klingt. Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, sowie die Sicherstellung der Filtrationsbarriere ist ein komplexes und multifaktoriell-abhängiges Geschehen, dass nicht vollständig verstanden ist. Es sind noch nicht einmal alle Proteine und sonstigen Mitspieler identifiziert, geschweige denn ihre Funktionsweise und genaue Aufgabe bekannt. So kann nur sehr vorsichtig interpretiert werden und diese Arbeit kann ein Mosaiksteinchen sein, die Funktionsweise der Podozyten und der Filtrationsbarriere besser zu ergründen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Studien liefern Hinweise darauf, dass Geschlechtshormone einen Einfluss auf Nierenerkrankungen haben könnten. Kummer et al. (2012) konnten in ihrer Arbeit demonstrieren, dass die klinische Prognose chronisch renaler Erkrankungen bei Männern schlechter ist als bei Frauen. In der Niere spielen Podozyten eine zentrale Rolle bei Aufrechterhaltung der Blut-Harn-Schranke und von ihrem dynamischen Zytoskelett hängen die physiologische Form und Funktion ab. Pathologien an der Filtrationsbarriere manifestieren sich zellulär an den Podozyten durch eine nicht mehr intakte Filtrationsbarriere. Für die physiologische Funktion der Podozyten sind die Fußfortsätze maßgeblich. Sie organisieren sich durch das Aktin-Zytoskelett. An der Orchestrierung des Zytoskeletts sind Proteine wie Cofilin und Synaptopodin beteiligt. Diese Proteine bedingen Veränderungen an den Fußfortsätzen und sie sind responsiv für Sexualhormone wie Estrogen. Ein besseres Verständnis für den Einfluss von Sexual-Hormonen auf die Progression renaler Erkrankungen ist von großer Bedeutung, da die Behandlung nicht- renaler Erkrankungen auch die Nierenfunktion und die Struktur beeinflusst und Hormonrezeptormodulation ein Behandlungsansatz renaler Erkrankungen sein könnten. Die genaue Rolle der Geschlechtshormone in der Niere ist bisher unzureichend erforscht. In dieser Arbeit wurde die Rolle von Geschlechtshormonen innerhalb der Niere und auf ihre Funktionen untersucht. Dazu wurde im Tiermodell an Podozyten der Ratte die Bildung von 17β -Estradiol und die Ausbildung spezifischer Estrogenrezeptoren analysiert. Außerdem wurde die Anpassung des Zellgerüsts der Podozyten auf das Vorhandensein und die Reduktion von 17β -Estradiol in männlichen und weiblichen Zellkulturen untersucht. Die dafür verantwortlichen, spezifischen Proteine Synaptopodin und Cofilin wurden mittels Laser- Scanning-Mikroskopie und Western-Blot-Technik untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell mit Podozyten der Ratte nachgewiesen, dass 17β -Estradiol im Podozyten *de novo* gebildet wird und spezifische Rezeptoren (ERalpha und ERbeta) in den Zellen für dieses Hormon vorhanden sind. 17β -Estradiol im Podozyten kontrolliert das Aktin- Zytoskelett: Inhibition der 17β -Estradiol-Synthese resultiert in Hochregulation von Synaptopodin und vermehrter Phosphorylierung von Cofilin in männlichen Podozyten der Ratte, aber in verminderter Expression von Synaptopodin und verringerter Phosphorylierung von Cofilin in weiblichen Ratten-Podozyten. Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass die Motilität der männlichen, jedoch nicht der weiblichen Podozyten herabgesetzt wird. Meine Daten zeigen, dass das Aktin-Zytoskelett von Podozyten durch 17β -Estradiolspiegel geschlechtsspezifisch reguliert werden könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die Rolle der Sexualhormone in der Niere besser zu verstehen und neue, geschlechterspezifische Therapien bei Erkrankungen der Niere zu entwickeln.

5 Abstract

Background: Numerous studies support the conclusion that sexual steroids are able to influence glomerular diseases. Kummer et al. (2012) were able to show that the clinical outcome of chronic renal diseases favor women over men.

Podocytes play an essential role in pathologies of the kidney and alterations of the actin cytoskeleton affects form and function of the glomerular filtration barrier. Pathologies of the filtration barrier manifest in podocytes. The physiological morphology is formed by the foot processes of the podocytes which are maintained by the actin cytoskeleton. Responsible for the orchestration of the cytoskeleton are proteins like synaptopodin and cofilin which are responsive to sexual steroids like estrogen. A more comprehensive insight of the interactions of sexual steroids and the progression of renal pathologies is of great interest since the treatment of non-renal diseases may affect renal function or in contrast could be another possibility for specific treatment. The significance of sexual steroids in the kidney needs to be resolved. In this study we aim to unravel the role of sexual steroids and their function in the kidney.

Methods: Therefore we used cultivated podocytes of male and female animals to investigate the genesis of 17β -estradiol and the existence of associated estrogen receptors. Additionally we wanted to assess the adaption of the cytoskeleton in relation to the reduction of 17β -estradiol in male and female podocyte cultures. The alterations in expression of those accountable proteins: synaptopodin and cofilin were investigated by electron microscopy and western blot technique.

Results: In this study we were able to confirm the expression of aromatase (final enzyme of estradiol synthesis), the genesis of 17β -estradiol and the presence of specific estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) in male and female podocytes. 17β - estradiol controls the actin cytoskeleton. Inhibition results in upregulation of synaptopodin and enhanced phosphorylation of cofilin of male animals, but not in female animals. The motility of male podocytes, not female podocytes is reduced.

Conclusion: My Data shows that altered levels of 17β -estradiol regulates the actin skeleton in podocytes sex-dependently. The findings of this study contribute the comprehension of the role of sexual steroids and are proposing new sex specific treatment in glomerular diseases.

6 Literaturverzeichnis

1. Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, Reiser J, Mundel P (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1188-98. Epub 2005 Apr 1.
2. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signaling. *Nat. Cell Biol.* 8:485-491.
3. Asanuma, K., Mundel, P. (2003) The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin. Exp. Nephrol.* 2003 Dec;7(4):255-9.
4. Ashcroft FM (2006) From molecule to malady. *Nature* 440:440–47.
5. Ashworth, S., Teng, B., Kaufeld, J., Miller, E., Tossidou, I., Englert, C., Bollig, F., Staggs, L., Roberts, Ian S.D., Park, J.-K., Haller, H., Schiffer, M. (2010) Cofilin-1 Inactivation Leads to Proteinuria - Studies in Zebrafish, Mice and Humans. *PLoS One.* 2010 Sep. 8. (Internet, zitiert am 19. November 2015 URL: 10.1371/journal.pone.0012626).
6. Aspenström P, Fransson A, Saras J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 2004 Jan 15;377(Pt 2):327-37.
7. Bamberg J. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15, (1999), 185– 230.
8. Bamberg, J.R., Harris, H.E., Weeds, A.G. (1980) Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Letters* Vol. 121, Issue 1, 1980; 178-182.
9. Barisoni, L. and Mundel, P. (2003) Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 23, 353-60.
10. Baylis C, Corman B. (1998) The aging kidney: insights from experimental studies. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 699–709.

11. Berg, U.B. (2006) Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006 Sep;21(9):2577-82.
12. Berger, K., Moeller, M.J. (2011) Cofilin-1 in the podocyte: a molecular switch for actin dynamics. *Int. Urol. Nephrol.* 2011 Mar;43(1):273-5. 10.1007/s11255-010-9898-1.
13. Bernstein B, Bamberg J (2010) ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.*, 20, (2010), 187– 195.
14. Birch NC, Krag S, Osterby R, Flyvbjerg A, Nyengaard J, Forman A, Wogensen L (2004) Transforming growth factor beta1-induced glomerulopathy is prevented by 17beta-estradiol supplementation. *Virchows Arch.* 2004;444:561–566.
15. Blatteiger, B., Newhall, WJ. 5th., Jones, RB. (1982): The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. immunol. Methods* 55, 297-307.
16. Blush J, Lei J, Ju W, Silbiger S, Pullman J, Neugarten J (2004) Estradiol reverses renal injury in Alb/TGF-beta1 transgenic mice. *Kidney Int.* 2004;66:2148–2154.
17. Bradford, M (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
18. Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The Immediate Early Gene *Arc/Arg3.1*: Regulation, Mechanisms, and Function. *Journal of Neuroscience* 12 November 2008, 28 (46) 11760 11767; DOI:10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008
19. Brandtzaeg, P. (1998) The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. *J. Immunol. Methods* 216(1-2):49-67.
20. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997) Molecular basis of

agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389:753–758.

21. Carlier M-F, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, et al. (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136: 1307– 22.
22. Carrero JJ, Hecking M, Chesnaye NC, Jager KJ. (2018) Sex and gender disparities in the epidemiology and outcomes of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2018; 14:151 – 164.
23. Catanuto P, Doublie S, Lupia E, Fornoni A, Berho M, Karl M, Striker GE, Xia X, Elliot S (2009) 17 beta-estradiol and tamoxifen upregulate estrogen receptor beta expression and control podocyte signaling pathways in a model of type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2009 Jun;75(11):1194-201. doi: 10.1038/ki.2009.69. Epub 2009 Mar 11.
24. Catanuto P, Fornoni A, Pereira-Simon S, Wu F, Burnstein KL, Xia X, Conti F, Lenzi A, Elliot S (2012) In Vivo 17 β -Estradiol Treatment Contributes to Podocyte Actin Stabilization in Female db/db Mice. *Endocrinology*, Volume 153, Issue 12, 1 December 2012, Pages 5888–5895, <https://doi.org/10.1210/en.2012-1637>.
25. Catanuto, P, Xia, X, Pereira-Simon, S, & Elliot, S (2017). Estrogen receptor subtype ratio change protects against podocyte damage. *Current trends in endocrinology*, 9, 19–29.
26. Cattran, D.C., Reich, H.N., Beanlands, H.J., Miller, J.A., Scholey, J.W., Troyanov, S.; Genes, Gender and Glomerulonephritis Group. (2008) The impact of sex in primary glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008 Jul;23(7):2247-53.
27. Chen PD, Tsai MK, Lee CY, Yang CY, Hu RH, Lee PH, Lai HS (2013) Gender differences in renal transplant graft survival. *J Formos Med Assoc.* 2013 Dec;112(12):783-8. doi: 10.1016/j.jfma.2013.10.011. Epub 2013 Nov 15.
28. Chen Q, Pollard TD (2011) Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring. *J. Cell Biol.*, 195 (2011), pp. 485–498.

29. Compston JE1 (2001) Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):419-447.
30. De La Cruz E. (2009) How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.*, 1, (2009), 51– 59.
31. Dechering K, Boersma C, Mosselman S (2000) Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem.* 2000;7:561–576.
32. Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P (2003) Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10494–10499.
33. Doublier, S., Lupia, E., Catanuto, P., Periera-Simon, S., Xia, X., Korach, K., Berho, M., Elliot, S.J., Karl, M. (2011) Testosterone and 17 β -estradiol have opposite effects on podocyte apoptosis that precedes glomerulosclerosis in female estrogen receptor knockout mice. *Kidney Int.* 2011 Feb;79(4):404-13.
34. Drenckhahn D, Franke RP (1988) Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab. Investig.* 59:673–82.
35. Elema, J.D., Arends, A. (1975) Focal and segmental glomerular hyalinosis and sclerosis in the rat. *Lab Invest.* 1975 Nov;33(5):554-61.
36. Elliot SJ, Karl M, Berho M, Potier M, Zheng F, LeClercq B, Striker GE, Striker L (2003) Estrogen deficiency accelerates progression of glomerulosclerosis in susceptible mice. *Am J Pathol.* 2003;162:1441–1448.
37. Enmark E, Pelto-Huikko M, et al. (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1997;82:4258-65.
38. Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002 Dec 12;420(6916):629-35.
39. Fachinformation Letrozol. (Internet, zitiert am 06. Juni 2020 URL: <https://www.accord-healthcare.de/sites/default/files/2019->

01/FI_Letrozol_Stand%20022018_bh_as_bhso_clean_1.pdf.

40. Fakhouri F, Bocquet N, Taupin P, Presne C, Gagnadoux MF, Landais P, Lesavre P, Chauveau D, Knebelmann B, Broyer M, Grunfeld JP, Niaudet P (2003) Steroid-sensitive nephrotic syndrome: from childhood to adulthood. *Am J Kidney Dis* 41:550–557.
41. Fass J, Gehler S, Sarmiere P, Letourneau P, Bamberg J, (2004) Regulating filopodial dynamics through actin-depolymerizing factor/cofilin. *Anat. Sci. Int.*, 79, (2004), 173– 183.
42. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. (2007) Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2007 Sep;17(9):428-37. Epub 2007 Sep 4.
43. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P (2008) The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med.* 2008 Sep;14(9):931-8. doi: 10.1038/nm.1857.
44. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE (2005) Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics.* 2005 Feb;5(2):566-71.
45. Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, Lossow von R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19:692–705.
46. Fester L, Zhou L, Ossig C, Labitzke J, Bläute C, Bader M, Vollmer G, Jarry H, Rune GM (2017) Synaptopodin is regulated by aromatase activity. *J Neurochem.* 2017 Jan;140(1):126-139. doi: 10.1111/jnc.13889. Epub 2016 Dec 12.
47. Fester L, Rune GM (2015) Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Res.* 2015 Sep 24; 1621:162-9. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.033. Epub 2014 Oct 28.
48. Frieden C und Du J (1998) Kinetic Studies on the Effect of Yeast Cofilin on Yeast

Actin Polymerization. *Biochemistry*, 1998, 37 (38), pp 13276–13284.

49. Garcia-Segura LM, Lorenz B, DonCarlos LL (2008) The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction*. 2008 Apr;135(4):419-29. doi: 10.1530/REP-07-0540.
50. Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B. and Vogel, J. (2009) Quantifying western Blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 30, 1845-1855.
51. George LM and Kin A. (2017) Mitochondria: Structure, Function and Clinical Relevance. *Austin J Pharmacol Ther*. 2017; 5(2).1094.
52. Gonzalez de Valdivia E, Broselid S, Kahn R, Olde B, Leeb-Lundberg LMF (2017) G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30 increases ERK1/2 activity through PDZ motif-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 2017 Jun 16;292(24):9932-9943. doi: 10.1074/jbc.M116.765875. Epub 2017 Apr 27.
53. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986;231:1150–1154.
54. Greka, Anna, and Peter Mundel. (2012) "Cell biology and pathology of podocytes." *Annual review of physiology* 74 (2012): 299-323.
55. Gross, M.L., Adamczak, M., Rabe, T., Harbi, N.A., Krtil, J., Hamar, P., Amann, K., Ritz, E. (2004) Beneficial Effects of Estrogens on Indices of Renal Damage in Uninephrectomized SHRsp Rats. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2004 Feb;15(2):348-58.
56. Gurniak CB, Perlas E, Witke W (2005) The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev Biol*. 2005 Feb 1;278(1):231-41.
57. Gustafsson JA (2003) What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:479–485.
58. Hajdu A, Rona G (1971) The protective effect of estrogens against

spontaneous pancreatic islet and renal changes in aging male rats. *Experientia* 27:956–957.

59. Hall JM, Couse JF, Korach KS. (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276: 36869–36872, 2001.
60. Hall, J. M. and McDonnell, D. P. (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-5578.
61. Hatanaka H1, Ogura K, Moriyama K, Ichikawa S, Yahara I, Inagaki F (1996) Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1047-55.
62. Hawkins M, Pope B, Maciver SK, Weeds AG (1993) Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry*. 1993 Sep 28;32(38):9985-93.
63. He, F. F., Bao, D., Su, H., Wang, Y. M., Lei, C. T., Zhang, C. Y., Ye, C., Tang, H., Wan, C., You, C. Q., Zhang, J., Xiong, J., & Zhang, C. (2018). IL-6 increases podocyte motility via MLC-mediated focal adhesion impairment and cytoskeleton disassembly. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 7173–7181 doi: 10.1002/jcp.26546. Epub 2018 Mar 25.
64. Hewitt SC, Korach KS (2003) Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction*. 2003;125:143–149.
65. Ho KJ, Liao JK (2002) Nonnuclear actions of estrogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1952–1961.
66. Hojo, Y., Hattori, T., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H., Mukai, H., Morrison, J.H., Janssen, W.G.M., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T., Kawato., S. (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 2004 Jan 20; 101(3): 865-870.

67. Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H., Hirohashi, S. (1998) Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol.* 1998 Oct 5;143(1):following 276.
68. Huang, T.Y., DerMardirossian, C., Bokoch, G.M. (2006) Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Cell Biology* 2006, 18:26-31.
69. Irsik, D.L., Carmines, P.K., Lane, P.H. (2013) Classical Estrogen Receptors and ER α Splice Variants in the Mouse. *PLOS/ONE* 10.1371/journal.pone.0070926.
70. Ivanova T1, Beyer C. (2000) Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2000 May;300(2):231-7.
71. Jafar TH, Schmid CH, Stark PC, et al. (2003) The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:2047 – 2053.
72. Jensen EV, DeSombre ER. (1973) Estrogen-receptor interaction. *Science.* 1973;182:126–134.
73. Karl M, Berho M, Pignac-Kobinger J, Striker GE, Elliot SJ (2006) Differential Effects of Continuous and Intermittent 17 β -Estradiol Replacement and Tamoxifen Therapy on the Prevention of Glomerulosclerosis Modulation of the Mesangial Cell Phenotype *in Vivo*. *Am J Pathol.* 2006 Aug; 169(2): 351–361.
74. Kemeny, E., Durmuller, U., Nickeleit, V., Gudat, F., Mihatsch, M.J. (1997) Distribution of podocyte protein (44 KD) in different types of glomerular disease. *Virchows Arch* 431:425-430.
75. Kerjaschki, D. (2001) Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 108, 1583-7.
76. Kerjaschki, D., Sharkey, D. J. and Farquhar, M. G. (1984) Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 98, 1591-6.

77. Khosla S, Monroe DG (2017) Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Jul 14. pii: a031211. doi: 10.1101/cshperspect.a031211. [Epub ahead of print].
78. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev.* 2005;26:465–478.
79. Koledova VV, Khalil RA (2007) Sex hormone replacement therapy and modulation of vascular function in cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007 Jul;5(4):777-89.
80. Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. (2010) Gender and the renin – angiotensin – aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol* 2010; 24:687 – 698.
81. Kos, C.H., Le, T.C., Sinah, S., Henderson, J.M., Kim, S.H., Sugimoto, H., Kalluri, R., Gerszten, R.E. Pollak, M.R. (2003) Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. *J. Clin. Invest.* 111:1683 - 1690 (2003).
82. Kramár EA, Chen LY, Rex CS, Gall CM, Lynch G (2009) Estrogen's Place in the Family of Synaptic Modulators. *Mol Cell Pharmacol.* 2009;1(5):258-62.
83. Kramer A, Pippias M, Noordzij M, et al. (2018) The European Renal Association— European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015: a summary. *Clin Kidney J* 2018; 11:108 – 122.
84. Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24:5913–5921.
85. Kriz, W. (2002) Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc Res Tech* 57, 189-95.
86. Kriz, W. and Zeller, R. (1997). Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236, 248-58.

87. Kriz, W., Kretzler, M., Provoost, A. P. and Shirato, I. (1996) Stability and leakiness: opposing challenges to the glomerulus. *Kidney Int* 49, 1570-4.
88. Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., LeHir, M., Lemley, K.V. (2012) The podocyte`s response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am. Journal of Physiology - Renal Physiology* 2013 Vol. 304 no .4,F333-F347.
89. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863–870.
90. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:5925–5930.
91. Kummer, S., Jeruschke, S., Wegerich, L.V., Peters, A., Lehmann, P., Seibt, A., Mueller, F., Koleganova, N., Halbenz, E., Schmitt, C.P., Bettendorf, M., Mayatepek, E., Gross-Weissmann, M.L., Oh, J. (2011) Estrogen receptor alpha expression in podocytes mediates protection against apoptosis in-vitro and in-vivo. (Online WWW) *PLoS One.* 2011 e27457. (Internet, zitiert am 18. November 2015 URL: journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027457).
92. Kummer, S., von Gersdorff, G., Kemper, M.J., Oh, J. (2012) The influence of gender and sexual hormones on incidence and outcome of chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, August 2012, Vol 27, Issue 8, 1213-1219.
93. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiao AK, Uht RM, Webb P. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 311–317, 2000.
94. Kwon SK, Kim SJ, Kim HY. (2016) Urine synaptopodin excretion is an important marker of glomerular disease progression. *Korean J Intern Med.* 31:938–43. 10.3904/kjim.2015.226.
95. Kwong VW, Kwan B, Leung CB, Li PKT, Szeto CC (2013) Long-term outcome of biopsy-proven minimal-change nephrotic syndrome in Chinese children. *Hong*

96. Kyrieleis HA, Lowik MM, Pronk I, Cruysberg HR, Kremer JA, Oyen WJ, van den Heuvel BL, Wetzels JF, Levtchenko EN (2009) Long-term outcome of biopsy-proven, frequently relapsing minimal-change nephrotic syndrome in children. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:1593–1600.
97. Kyrieleis, H.A., Levtchenko, E.N., Wetzels, J.F. (2007) Long-term outcome after cyclophosphamide treatment in children with steroid-dependent and frequently relapsing minimal change nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 49:592-597.
98. Lämmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
99. Lappalainen P, Fedorov EV, Fedorov AA, Almo SC, Drubin DG. (1997) Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin by systematic mutagenesis. *EMBO J.* 16: 5520– 30.
100. Lemos CC, Mandarim-de-Lacerda CA, Dorigo D, Coimbra TM, Bregman R (2005) Chronic renal failure in male and female rats. *J Nephrol* 18:368–373.
101. Li X, Ding F, Wang S, Li B, Ding J (2015) Cyclosporine A protects podocytes by regulating WAVE1 phosphorylation. *Sci Rep.* 2015 Dec 4;5:17694. doi: 10.1038/srep17694.
102. Lu H, Lei X and Klaassen C (2006) Gender differences in renal nuclear receptors and aryl hydrocarbon receptor in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Intern.* Dec 1, 2006 Volume 70, Issue 11, Pages 1920–1928.
103. Maciver, S.K., Hussey, P.J. (2002) The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* 2002;3(5) reviews 3007.
104. Maekawa S, Nishida E, Ohta Y, Sakai H. (1984) Isolation of low molecular weight actin-binding proteins from porcine brain. *J. Biochem. (Tokyo)* 95: 377– 85.

105. Maric C, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C (2004) Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1546–1556.
106. Martini, P. G. und Katzenellenbogen, B. S. (2003) Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 117-122.
107. Matthews J, Gustafsson JA. (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Intervent* 3: 281–292, 2003.
108. Matthews J, Wihlen B, Tujague M, Wan J, Strom A, Gustafsson JÅ. (2006) Estrogen receptor (ER) beta modulates ER-alpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol* 20: 534–543, 2006.
109. Miller, Luke (2004-2015) Analyzing gels and western blots with imagej (Internet, zitiert am 11. November 2015 URL: <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-imagej/>).
110. Miller, W.R., Anderson, T.J., Dixon, J.M. (2002) Anti-tumor effects of letrozole. *Cancer Invest.* 20 Suppl 2. 15-21.
111. Molina JF, Drenkard C, Molina J, Cardiel MH, Uribe O, Anaya JM, Gomez LJ, Felipe O, Ramirez LA, Alarcon-Segovia D (1996) Systemic lupus erythematosus in males. A study of 107 Latin American patients. *Medicine* 75:124–130.
112. Möllendorf, Wilhelm von (1927) Einige Beobachtungen über den Aufbau des Nierenglomerulus. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. Oktober 1927, Volume 6, Issue 3, pp 441–450.
113. Morgan TE, Lockerbie RO, Minamide LS, Browning MD, Bamburg JR (1993) Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 122: 623– 33.
114. Mortensen, A. S., & Arukwe, A. (2006). Dimethyl sulfoxide is a potent

modulator of estrogen receptor isoforms and xenoestrogen biomarker responses in primary culture of salmon hepatocytes. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 79(1), 99–103.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.05.009>.

115. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W (1997a) Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *JCB* 139:193–204.
116. Mundel, P. (1997b) Synaptopodin: an actin-associated protein of telencephalic dendrites and of podocytes in the kidney glomerulus. *Ann. Anat.* 180:391-392.
117. Mundel, P., Gilbert, P. and Kriz, W. (1991) Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 KD protein. *J Histochem Cytochem* 39, 1047-56.
118. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. (1993) Nuclear localization of the protein encoded by the Wims' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development.* 1993;119:1329–1341.
119. Nagata, M., Yamaguchi, Y. and Ito, K. (1993) Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys. *Anat Embryol (Berl)* 187, 275-9.
120. Nagata, M., Yamaguchi, Y., Komatsu, Y. and Ito, K. (1995) Mitosis and the presence of binucleate cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys. *Nephron* 70, 68-71.
121. National Center for Biotechnology Information (NCBI) National Library of Medicine (NLM) at the National Institutes of Health (NIH) USA. (Internet, zitiert am 06. Juni 2019 URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/mission/>).
122. NCBI = National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. (Internet, zitiert am 06. Juni 2019 URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1072>).
Abbildung 10: National Institute of Health USA: PubCHEM Database (Internet, zitiert am 12. Dezember 2017; URL:

[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=3902&width=500&h
eight=500](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=3902&width=500&height=500)).

123. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005 Mar 11; 307(5715):1625-30.
124. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. (2004) Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69: 537–542, 2004.
125. Song RX, Santen RJ. (2006) Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol Reprod* 75: 9–16, 2006.
126. Song RX, Zhang Z, Santen RJ. (2005) Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab* 16: 347–353, 2005.
127. Warner M, Gustafsson JA. (2006) Nongenomic effects of estrogen: why all the uncertainty? *Steroids* 71: 91–95, 2006.
128. Negulescu O, Bogнар I, Lei J, et al. (2002) Estradiol reverses TGF-beta1-induced mesangial cell apoptosis by a casein kinase 2-dependent mechanism. *Kidney Int* 2002; 62:1989 – 1998.
129. Neugarten J. (2007) Estrogen and oxidative stress. *Gend Med* 2007; 4:31 – 32. 86. Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, et al. Endothelin, sex and hypertension. *Clin Sci (London)* 2008; 114:85 – 97.
130. Neugarten J (2002) Gender and the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13:2807–2809.
131. Neugarten, J., Acharya, A., Silbiger, S.R. (2000) Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000 Feb;11(2):319-29.
132. Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (2002) Estrogen receptor action. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2002;12(4):237-57.
133. Nilsson, S., Kuiper, G., Gustafsson, J.A. (1998) ER- β a Novel Estrogen

Receptor Offers the Potential for New Drug Development. Cell Press 1998
Vol. 9 Issue 10:387-395.

134. Nishida E, Maekawa S, Muneyuki E, Sakai H. (1984a) Action of a 19K protein from porcine brain on actin polymerization: a new functional class of actin-binding protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 95: 387– 98.
135. Nishida E, Maekawa S and Sakai E (1984b) Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* 1984 23 (22), 5307-5313. DOI: 10.1021/bi00317a032.
136. Nishida E, Muneyuki E, Maekawa S, Ohta Y, Sakai S. (1985) An actin-depolymerizing protein (destrin) from porcine kidney. Its action on F-actin containing or lacking tropomyosin. *Biochemistry* 24: 6624– 30.
137. Ogawa Y, Tashima M, Yumoto Y, Okuda T, Sawada H, et al. (1990) Coding sequence of human placenta cofilin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 18: 7169.
138. Oh J, Beckmann J, Bloch J, Hettgen V, Mueller J, Li L, Hoemme M, Gross ML, Penzel R, Mundel P, Schaefer F, Schmitt CP (2011) Stimulation of the calcium-sensing receptor stabilizes the podocyte cytoskeleton, improves cell survival, and reduces toxin-induced glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2011 Sep;80(5):483-92. doi: 10.1038/ki.2011.105. Epub 2011 Apr 20.
139. Online Mendelian Inheritance (OMIM) in Man® An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders - McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore USA, under the direction of Dr. Ada Hamosh. (Internet, zitiert am 18. September 2019 URL: <https://www.omim.org/entry/601442>).
140. Oosawa F, Asakura S (1975) Thermodynamics of the Polymerization of Protein. (1975), Academic Press. 1975 pp. 194.
141. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 1997 Sep 5;277(5331):1508-10.

142. Papa M, Bundman MC, Greenberger V, Segal M. (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1995 Jan; 15(1 Pt 1):1-11.
143. Pavenstadt, H. (1998) The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes. *Exp Nephrol* 6, 98-103.
144. Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN (1998) Differential activation by xenoestrogens of ER alpha and ER beta when linked to different response elements. *J Endocrinol.* 1998 Sep;158(3):R11-4.
145. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112 (2003), pp. 453–465.
146. Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune GM (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16:464–471.
147. Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM (2008) Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *JCB* 180:417–426.
148. Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13:226–234.
149. Progen Biotechnik GmbH Heidelberg, Deutschland. Progen Data Sheet Synaptopodin (Internet, zitiert am 06. Juni 2019 URL: <https://www.progen.com/anti-synaptopodin-mouse-monoclonal-g1d4-supernatant.html>).
150. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA (2008) GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* Author manuscript; available in PMC 2008 Feb 26. Published in final edited form as: *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Feb; 265-266: 138–142. Published online 2007 Jan 11. doi: 10.1016/j.mce.2006.12.010.

151. Puddefoot, J.R., Barker, S., Glover, H.R., Malouitre, S.D., Vinson, G.P. (2002) Non-competitive steroid inhibition of oestrogen receptor functions. *Int. J. Cancer* 101819:17-22.
152. Quarmby, L (2000) Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J Cell Sci* 2000 113: 2821-2827.
153. Raats, C. J., van den Born, J., Bakker, M. A., Oppers-Walgreen, B., Pisa, B. J., Dijkman, H. B., Assmann, K. J. and Berden, J. H. (2000) Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 156, 1749-65.
154. Raile K, Galler A, Hofer S, Herbst A, Dunstheimer D, Busch P, Holl RW (2007) Diabetic nephropathy in 27,805 children, adolescents, and adults with type 1 diabetes: effect of diabetes duration, A1C, hypertension, dyslipidemia, diabetes onset, and sex. *Diabetes Care* 30:2523–2528.
155. Reed E, Cohen DJ, Barr ML, Ho E, Reemtsma K, Rose EA, Hardy M, Suci-Foca N (1992) Effect of recipient gender and race on heart and kidney allograft survival. *Transplant Proc* 24:2670–2671.
156. Regele, H. M., Fillipovic, E., Langer, B., Poczewki, H., Kraxberger, I., Bittner, R. E. and Kerjaschki, D. (2000) Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11, 403-12.
157. Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M. and Mundel, P. (2000) The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 11, 1-8.
158. Rennke, H. G. (1994) How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int Suppl* 45, S58-63.
159. Ressad F, Didry D, Xia G-X, Hong Y, Chua N-H, et al. (1998) Kinetic analysis of the interactions of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins. *J. Biol. Chem.* 273: 20894– 902.
160. RGD ID 620668, Rat Genome Database Web Site, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin. (Internet, zitiert am 06. Juni 2019 URL:

<http://rgd.mcw.edu/>).

161. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. (1998) A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.* 1998 May;13(5):763-73.
162. Rodewald, R., Karnovsky, M.J. (1974) Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in rat and mouse. *J Cell Biol.* 1974 Feb;60(2):423-33.
163. Rogers JL1, Mitchell AR, Maric C, Sandberg K, Myers A, Mulroney SE (2007) Effect of sex hormones on renal estrogen and angiotensin type 1 receptors in female and male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Feb;292(2):R794-9. Epub 2006 Sep 21.
164. Rosano GM, Vitale C, Fini M (2006) Hormone replacement therapy and cardioprotection: what is good and what is bad for the cardiovascular system? *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1092:341-8.
165. Rosenblatt J, Agnew BJ, Abe H, Bamburg JR, Mitchison T. (1997) Xenopus actin depolymerizing protein/cofilin (XAC) is responsible for the turnover of actin filaments in *Listeria monocytogenes* tails. *J. Cell Biol.* 136: 1323– 32.
166. R uth E.M., Kemper M.J., Leumann E.P., Laube G.F, Neuhaus T.J. (2005) Children with steroid-sensitive nephrotic syndrome come of age: long term outcome. *J Pediatr*, 147 (2005), pp. 202-207.
167. Schramm AC, Hocky GM, Voth GA, Blanchoin L, Martiel JL, De La Cruz EM. (2017) Actin Filament Strain Promotes Severing and Cofilin Dissociation. *Biophys J.* 2017 Jun 20;112(12):2624-2633. doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.016.
168. Shin H-Y, Kang H-T. (2016) Recent trends in the prevalence of chronic kidney disease in Korean adults: Korean National Health and Nutrition Examination Survey from 1998 to 2013. *J Nephrol* 2016; 29:799 – 807.
169. Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W (1996) Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi

- nephritis. *Am J Pathol.* 1996;148:1283–1296.
170. Silbiger, S.R., Neugarten, J. (1995) The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 1995 Apr; 25(4):515-33.
171. Silbiger, S.R., Neugarten, J. (2003) The role of gender in the progression of renal disease. *Adv. Ren. Replace Ther.* 2003 Jan; 10(1):3-14.
172. Simerly, R. B., Swanson, L. W., Chang, C., & Muramatsu, M. (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 294(1), 76–95. doi:10.1002/cne.902940107.
173. Simon JA (2001) Safety of estrogen/androgen regimens. *J Reprod Med.* 2001 Mar;46 (3 Suppl):281-90.
174. Simpson, D., Curran, M.P., Perry, C.M. (2004) Letrozole: a review of its use in postmenopausal women with breast cancer. *Drugs*; 64(11): 1213-30.
175. Smertenko AP, Jiang C-J, Simmons NJ, Weeds AG, Davies DR, Hussey PJ (1998) Ser6 in the maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, is phosphorylated by a calcium-stimulated protein kinase and is essential for control of functional activity. *Plant J.* 14: 187– 93.
176. Smoyer, W. E. and Mundel, P. (1998) Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med* 76, 172-83.
177. Spinola, SM., Cannon, JG., (1985) Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose. *J. immunol. Methods* 81, 161-5.
178. Srivastava, T., Garola, R.E., Whiting, J.M., Alon, U.S. (2001) Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int.* 59:118-125.
179. Tan, H. Y. and Ng, T. W. (2008). Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels. *Optics Communications* 281, 3013-3017.

180. Teng, B., Lukasz, A., Schiffer, M. (2012) The ADF/Cofilin-Pathway and Actin Dynamics in Podocyte Injury. *Int. J. Cell Biol.* 2012;2012:320531.
181. Towbin, H. et al. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
182. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguère V (1999) Ligand-Independent Recruitment of SRC-1 to Estrogen Receptor β through Phosphorylation of Activation Function AF-1. *Molecular Cell*, Vol. 3, 513–519, April, 1999.
183. U.S. Renal Data System, 2000 Annual Data Report. The National Institutes of Health, NIDDK, (Kevin Abbott, MD, MPH, and Kevin Chan, MD) (Internet, zitiert am 07. November 2019 URL: <https://www.usrds.org/adr.aspx>).
184. U.S. Renal Data System USRDS 2017 Annual Data Report. The National Institutes of Health (2017) <https://www.usrds.org/2017/view/Default.aspx>. [Internet, Mai 2020].
185. Valdivielso, JM, Jacobs-Cachá, C, & Soler, MJ (2019). Sex hormones and their influence on chronic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 28(1), 1–9. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000463>.
186. Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM (2012) Aromatase Inhibition Abolishes LTP Generation in Female But Not in Male Mice. *J Neurosci* 32:8116–8126.
187. Wallace, C., N. Hawrylak, and W.T. Greenough (1991) Studies of synaptic structural modifications after long-term potentiation and kindling: context for a molecular morphology. In *Long-Term Potentiation: A Debate of Current Issues*. M. Baudry and J.L. Davis, editors. MIT Press, Cambridge, MA. 189–232.
188. Wang W, Eddy R, Condeelis J (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 7, (2007), 429– 440.

189. Wartiovaara, J., Ofverstedt, L. G., Khoshnoodi, J., Zhang, J., Makela, E., Sandin, S., Ruotsalainen, V., Cheng, R. H., Jalanko, H., Skoglund, U. et al. (2004) Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 114, 1475-83.
190. Yanagida-Asanuma, E., Asanuma, K., Kim, K., Donnelly, M., Choi, H.Y., Chang, J.H., Suetsugu, S., Tomino, Y., Takenawa, T., Faul, C., Mundel, P. (2007) Synaptopodin Protects Against Proteinuria by Disrupting Cdc42:IRSp53:Mena Signaling Complexes in Kidney Podocytes. *The Am. J. of Pathology*, Vol171, Issue 2, Aug 2007, 415-427.
191. Zeier M, Dohler B, Opelz G, Ritz E (2002) The effect of donor gender on graft survival. *J Am Soc Nephrol* 13:2570–2576 ; Kasiske BL, Umen AJ (1986) The influence of age, sex, race, and body habitus on kidney weight in humans. *Arch Pathol Lab Med* 110:55–60.
192. Zigmond SH. (1993) Recent quantitative studies of actin filament turnover during cell locomotion. *Cell Motil Cytoskelet.* 25: 309 – 16.
193. Zimmermann, K (1929) Über den Bau des Glomerulus der menschlichen Niere. *Z Mikr Anat Forsch*, 18: p. 520-552.
194. Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron.* 1996 Jul; 17(1):91-102.

7 Danksagung

Ich danke Frau Professor Dr. Gabriele Rune für die Möglichkeit und die Unterstützung, die ich durch sie und die Ressourcen des Institutes für Neuroanatomie nutzen konnte. Besonderer Dank gilt Professor Dr. Lars Fester, der es mir ermöglichte an dem Thema dieser Dissertation zu arbeiten und mir stets bei fachlichen Problemen und bei allen Hürden zur Seite stand. Seine Geduld und sein positives Wesen waren beispiellos und sein Einsatz und offenes Ohr eine große Stütze, sowie Vorbild für meinen zukünftigen beruflichen Werdegang.

Ebenfalls danken möchte ich den MTAs. Hervorzuheben sind hier Helga Herbort, die mir mit den Zellkulturen half, (*Cowgirl*) Christiane Schröder-Birkner die mich mit ihrer optimistischen Art, Fachkompetenz und viel Hoffnung bei den Western Blots unterstützte und Herdis Hamann, die nicht nur als Kollegin mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern auch emotional immer eine besondere Stütze war.

Ich danke außerdem dem ganzen Institut für Neuroanatomie und bitte mir nachzusehen, wenn ich nicht alle großartigen, sympathischen und kompetenten Mitarbeiter, die meinen Weg kreuzten an dieser Stelle nennen konnte.

Vielen Dank an Hubertus Jarry vom Institut für Experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen und Sönke Harder vom Campus Forschung für Ihre Unterstützung, sowie der statistischen Beratung des Institutes für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Des Weiteren danke ich meinen lieben Kollegen Bay, Bittorf und Löffler, die die Zeit im Labor und Doktorandenzimmer hell erleuchteten und beinahe jedes Feuer mit Schokolade, Memes oder „Pilzsuppen“ löschen konnten („Ich rollte mit meim` Besten“). Ich danke *Scihub* und (George et al. 2017).

Ich danke meinen lieben Eltern, die mich während meines Studiums immer unterstützt haben und ohne die diese Arbeit und mein Werdegang so nicht möglich gewesen wären. Ihre Zuversicht und Liebe waren mir stets eine essentielle Stütze.

Victoria-Luisa und Alexander Keller danke ich für den motivierenden Wiederhall und die „letzte Ölung“ dieser Arbeit.

Aus tiefstem Herzensgrund danke ich meiner wunderbaren Christina, nicht nur für ihre fachliche Expertise, sondern besonders für die Liebe und Nachsicht die sie mir

immer wieder hat zukommen lassen. Karin für ihre Unterstützung, die Ruhe, das Kümmern, die Snacks und ihre liebevolle Art.

Schlussendlich möchte ich mich bei Mutter Natur für ihre Schöpfung bedanken. Für diese Arbeit wurden Lebewesen auf dem Altar der Wissenschaft für einen Erkenntnisgewinn im Sinne der pathoinklusiven Tierethik geopfert.

8 Curriculum Vitae

„Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.“

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg den

Martin-Páris Keller