

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik und Poliklinik D

(Allg. Innere Medizin sowie Nieren- und Hochdruckkrankheiten und
Rheumatologie)

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt-

Der Einfluss von Vac14 auf die Vakuolisierung von Podozyten

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Krause, Carolin

aus Essen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Thomas Weide

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ursula Rescher

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Allg. Innere Medizin sowie Nieren- und Hochdruckkrankheiten und Rheumatologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt-

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Thomas Weide

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ursula Rescher

ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss von Vac14 auf die Vakuolisierung von Podozyten

Krause, Carolin

Vac14 ist zusammen mit der Lipidkinase Fab1 und der Lipidphosphatase Fig4 Teil eines Proteinkomplexes, der eine zentrale Rolle in der Regulation der Phosphatidylinositol-Phosphate PI(3)P und PI(3,5)P₂ spielt. Diese koordinieren u.a. endolysosomale und autophagozytäre Trafficking-Prozesse sowie die Ansäuerung von Lysosomen. Eine Störung in der Bildung dieses Komplexes führt zur Akkumulation zytoplasmatischer Vakuolen, welche z.B. in geschädigten Podozyten mit retrahierten Fußfortsätzen beobachtet werden konnten und deshalb zum Verständnis von vielen Nierenerkrankungen von besonderem Interesse sind.

Sowohl Deletionen der Komponenten des Vac14-Proteinkomplexes, als auch die Überexpression von Vac14 führt zur Bildung dieser Vakuolen, während eine alleinige Verminderung der Vac14-Expression keine Vakuolisierung der Zellen bewirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in zwei verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden, dass eine reduzierte Vac14-Expression allerdings zu einer erhöhten Anfälligkeit von Podozyten gegenüber Milieuänderungen führen kann.

Dafür wurden zwei stabile Podozytenzelllinien, eine mit konstitutiv verminderter Vac14-Expression sowie eine mit induzierbarem Vac14-Knockdown, mit der schwachen Base Ammoniumchlorid stimuliert. Die Podozyten mit reduziertem Vac14-Level zeigten früher, mehr und größere Vakuolen als Podozyten mit endogen unveränderter Vac14-Expression.

Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass der Vac14-Proteinkomplex essenziell für die Homöostase des endolysosomalen Systems ist und eine Störung der Zusammensetzung des Komplexes gravierende Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit von Podozyten hat.

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2016

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Der Einfluss von Vac14 auf die Vakuolisierung von Podozyten

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Molekulare Nephrologie

Medizinische Klinik D, Allg. Innere Medizin sowie

Nieren- und Hochdruckkrankheiten und Rheumatologie

unter der Anleitung von:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Thomas Weide

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 11.04.2016

Ort, Datum

Carolin Krause

Name

C. Krause

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bau und Funktionsweise der Niere	1
1.2 Der Glomerulus	1
1.3 Podozyten und Schlitzmembran	3
1.4 Podozytopathien	4
1.5 Der Vac14-Proteinkomplex	5
1.6 Phosphatidylinositol-Phosphate (PIPs)	7
1.7 Zielstellung	9
2. Material	10
2.1 Geräte	10
2.2 Allgemeine Chemikalien	11
2.3 Lösungen und Puffer	12
2.4 Laborbedarf und Kits	14
2.5 Kulturmedien	14
2.6 Organismen	15
2.7 Antikörper	15
2.8 Primer	15
3. Methoden	16
3.1 DNA-Sequenzierung	16
3.2 Mikrobiologische Methoden	16
3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	16

3.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	16
3.2.3 Transfektion von Zellkulturen	16
3.2.4 Herstellung von Zelllysat	17
3.2.5 Stimulation eukaryotischer Zellen	17
3.2.6 Das p-INDUCER-Zellsystem	18
3.3 Proteinbiochemische Methoden	18
3.3.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	18
3.3.2 Western Blot	19
3.4 Statistische Analysen	19
4. Ergebnisse	21
4.1 Stimulation von Podozyten mit Vac14-Knockdown mit Ammoniumchlorid	21
4.2 Vac14-Knockdown im pINDUCER-Zellsystem	26
5. Diskussion	35
5.1 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien	37
5.2 Offene Fragen für zukünftige Untersuchungen	38
6. Literaturverzeichnis	41
7. Lebenslauf	47
8. Danksagung	48
9. Anhang	49
9.1 Abbildungsverzeichnis	49
9.2 Tabellenverzeichnis	49

1. Einleitung

1.1 Bau und Funktionsweise der Niere

Die Niere ist ein lebenswichtiges Organ, dem vielfältige Aufgaben zukommen. Bei einer Durchblutung mit 20% des Herz-Zeit-Volumens stellt sie das am besten durchblutete Organ in Relation zu ihrer Masse dar, dabei beträgt ihre tägliche Filterleistung bis zu 180 Liter Primärharn. Durch ihre Eigenschaft als Filter ist sie verantwortlich für die Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushalts und damit des Blutdrucks. In der Niere wird das Enzym Renin produziert, welches über das *Renin-Angiotensin-Aldosteron-System* (RAAS) seine vasokonstriktorische Wirkung ausübt und durch die Engstellung der Gefäße eine zweite Möglichkeit zur Beeinflussung des Blutdrucks darstellt. Eine dritte Möglichkeit der Regulation findet sich in der Innervation der Nierenarterien durch den Sympathikus (1).

Durch die Niere wird das Blut von harnpflichtigen Substanzen wie Harnsäure oder Kreatinin gereinigt. Wichtige größere Blutbestandteile wie Albumin kann sie dank ihres selektiven Filters zurückhalten, während kleinere Moleküle, z.B. Aminosäuren oder Glukose, zwar filtriert, jedoch über aktive Prozesse im Tubulussystem rückresorbiert werden. Die Niere fungiert außerdem als Hormonproduzent: Erythropoetin stimuliert die Erythropoese im Knochenmark, während Calcitriol, der aktive Metabolit des Vitamin D, Einfluss auf Knochenumbauprozesse nimmt (1).

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, bestehend aus dem Glomerulus, auch Malpighi- oder Nierenkörperchen genannt, und dem Schleifenapparat, in dem Rückresorptions-, Sekretions- und Konzentrationsprozesse stattfinden. Jede Niere enthält ca. eine Million Nephrone, die in ihrer Gesamtheit den selektiven Filter der Niere darstellen (1).

1.2 Der Glomerulus

Die Glomeruli sind in der Nierenrinde lokalisiert und für die Filtration des Primärharns zuständig. Ein Glomerulus besteht aus einem Knäuel aus Kapillarschlingen, das in die sog. *Bowman-Kapsel* hineingestülpt ist. Das Blut tritt über das *Vas afferens* in das Kapillarknäuel ein; hier wird der Primärharn passiv durch den Blutdruck in den Kapillaren filtriert, anschließend tritt das Blut über das *Vas efferens* wieder aus (1).

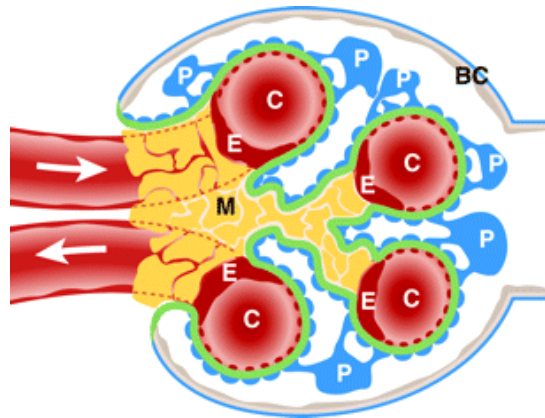


Abb. 1: Übersicht über einen Glomerulus. In den Kapillarschlingen (C) wird der Primärharn aus dem Blut filtriert; Proteine und andere Makromoleküle werden durch die glomeruläre Filtrationsbarriere, bestehend aus dem fenestrierten Kapillarendothel (E, rot), der glomerulären Basalmembran (grün) und der von Podozyten (P) ausgebildeten Schlitzmembran (blau), in den Arteriolen zurückgehalten. BC = Bowman Kapsel, M = Mesangium. Nach Quaggin und Kreidberg (2)

Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus drei Schichten: Durch das fenestrierte Endothel der Kapillaren werden zelluläre Bestandteile des Blutes zurückgehalten, die darunter aufliegende Basalmembran stellt als negativ geladene Schicht eine Anionenbarriere dar, während die Podozyten, das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel, durch ihre außerordentlich starke Verzahnung nur schmale Spalträume lassen und Moleküle mit einer Größe über 70kDa retinieren (1).

Ist dieser permselektive Filter geschädigt, entsteht eine Proteinurie. Hierbei können Proteine wie Albumin den Filter passieren und werden dann über den Urin ausgeschieden. Es werden verschiedene Ausprägungen von Proteinurien unterschieden. Bei einer Mikroalbuminurie werden bis zu 300 mg/d Protein ausgeschieden, sie gilt als frühes Zeichen einer diabetischen Nierenerkrankung. Eine isolierte asymptotische Proteinurie wird durch eine Eiweißausscheidung von bis zu 3 g/d definiert und kann durch entzündliche Prozesse hervorgerufen werden (3), während die symptomatische Proteinurie (mehr als 3 g/d Proteinausscheidung) zum nephrotischen Syndrom führt, welches außerdem durch Ödeme, Hyperlipidämie und Hypalbuminämie charakterisiert ist (4). Bei bis zu 80% aller Patienten mit nephrotischem Syndrom findet sich eine Schädigung der Podozyten (5).

1.3 Podozyten und Schlitzmembran

Podozyten sind hochdifferenzierte Zellen, die der glomerulären Basalmembran von außen innerhalb der Bowman-Kapsel aufsitzen und einen wichtigen Teil der Filtrationsbarriere darstellen (s. Abb. 2). Da sie ähnlich wie Neuronen postmitotische Zellen sind, ist eine ausgeprägte Adaptations- und Regenerationsfähigkeit für sie von besonderer Bedeutung (6). Vom Zellkörper gehen primäre mikrotubulireiche Fortsätze ab, die sich weiter zu aktinreichen, kontraktilen Fußfortsätzen verzweigen und mit den Fortsätzen benachbarter Podozyten ein dichtes, interdigitierendes Netzwerk bilden (7). Die Fußfortsätze bilden die sog. Schlitzmembran aus, die aufgrund ihrer 40 nm schmalen Schlitzze zwar wasserdurchlässig, für größere Proteine aber nicht permeabel ist (9).

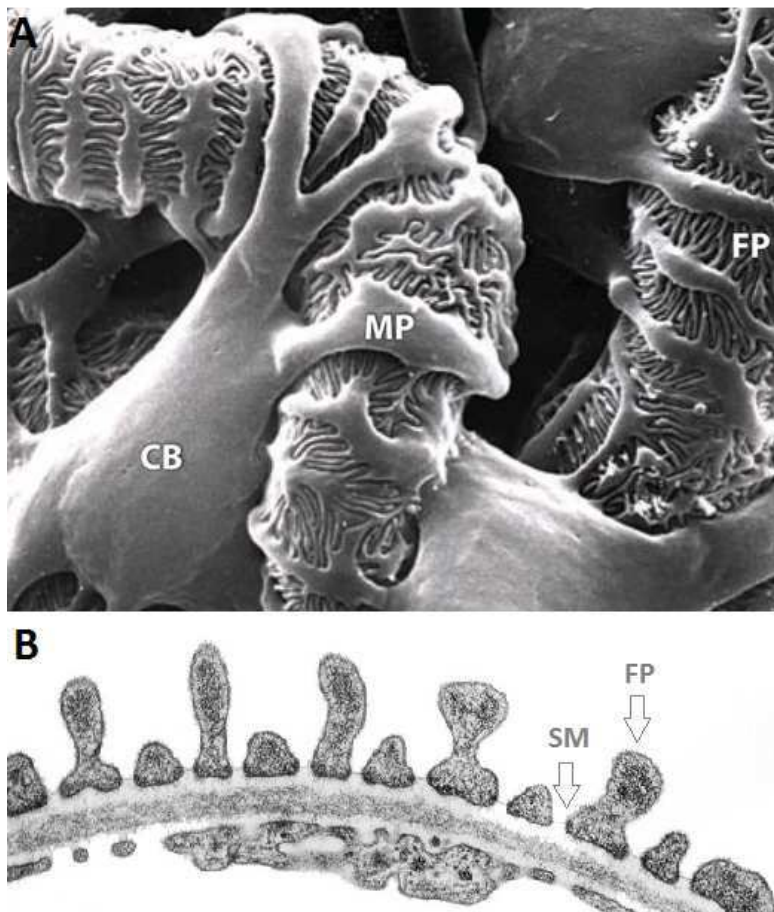


Abb. 2: Darstellung von Podozyten und der Schlitzmembran (A)

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozyten. Die Podozyten umgeben die Kapillarschlingen auf der apikalen, dem Primärharn zugewandten Seite. Die stark verzweigten Fußfortsätze bilden die Schlitzmembran aus.

CB= Zellkörper, MP= primäre Fortsätze, FP= Fußfortsätze
Nach Greka und Mundel (7)

(B) Darstellung der podozytären Fußfortsätze (FP) und der die Zwischenräume überspannende Schlitzmembran (SM).

Nach Pavenstädt, Kriz und Kretzler (8)

Die Schlitzmembran stellt einen einzigartigen, nur zwischen Podozyten vorkommenden Zell-Zell-Kontakt dar, über den die Podozyten miteinander kommunizieren können und besitzt sowohl Eigenschaften von *adherens junctions* als auch von *tight junctions* (10). Das von der Schlitzmembran exprimierte Nephrin ist eng mit dem Aktin-Zytoskelett der Fußfortsätze verbunden und besitzt eine zentrale Bedeutung für deren Plastizität (7). Weitere Proteine, die für die Funktion der Schlitzmembran essenziell sind, sind die Cadherine FAT1 und FAT2 sowie die Transmembranproteine Nephrin-1-3, die über Nephrin mit dem podozytären Zytoskelett kommunizieren, und Podocin, welches ebenfalls mit Nephrin interagiert und seine Funktion sicherstellt (11,12,13).

1.4 Podozytopathien

Bei den meisten glomerulären Erkrankungen liegt eine Schädigung oder der Verlust von Podozyten vor (14). Hierbei spielen sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle. Bei den sehr seltenen hereditären Podozytopathien finden sich Mutationen in Genen, die für Schlitzmembranproteine kodieren, welche das Aktin-Zytoskelett der Fußfortsätze aufbauen oder modulieren (15). So wurde beim kongenitalen nephrotischen Syndrom des finnischen Typs eine Mutation des NPHS1 Gens, welches für das Schlitzmembranprotein Nephrin kodiert, identifiziert (16). Dennoch ist für den überwiegenden Teil der Podozytopathien bisher nur sehr wenig über die Entstehung bekannt.

Ein wesentliches Merkmal geschädigter Podozyten ist das sog. *foot process effacement*. Man versteht hierunter ein Zurückziehen der sekundären Fußfortsätze als Reaktion auf Stress, wodurch die Maschen der Filtrationsbarriere dilatieren und somit Makromoleküle filtriert werden können (17). Interessanterweise gibt es ein weiteres zelluläres Schädigungsmerkmal, das bisher weniger Beachtung gefunden hat: In vielen geschädigten Podozyten sind große intrazelluläre Vakuolen zu beobachten, welche auf einen fehlerhaften Membran- und Vesikeltransport hindeuten (18). In der Tat konnte in Neuronen bereits gezeigt werden, dass diese Vakuolen nicht nur Begleiterscheinung, sondern ursächlich für Erkrankungen sein können, wie beim *Charcot-Marie-Tooth (CMT)*-Syndrom (19). Das CMT-Syndrom ist eine neurologische Erkrankung, bei der eine progrediente Denervation der Muskulatur auftritt. Eine Verdickung der Myelinscheiden führt zu einer Schädigung der Neurone und letztlich zur Atrophie der betroffenen Muskeln (20). Bei einigen Patienten ist außerdem eine

Nierenbeteiligung in Form einer Nephritis zu beobachten (21,22). Weiterhin wurde gezeigt, dass das CMT-Syndrom mit einer hereditären Form der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) vergesellschaftet sein kann, wobei beiden Erkrankungen eine Mutation des Aktin-regulierenden *INF2* zugrunde liegt (23).

Bislang sind bei CMT-Patienten Mutationen in ca. 20 verschiedenen Zielgenen identifiziert worden, die insbesondere für das endolysosomale System essenziell sind, u.a. im *FIG4* Gen bei der CMT Variante 4J (24). In Hefezellen ist die Phosphatase Fig4 Teil eines Proteinkomplexes, der für die Regulation von *Phosphatidylinositol-Phosphaten (PIPs)* verantwortlich ist. Die anderen Komponenten dieses Komplexes sind die Kinase Fab1 und Vac14 (25). Analog zu Fab1 existiert in eukaryoten Zellen die Kinase PIKfyve. Aus einer Deletion von Fig4 resultieren ähnliche Veränderungen wie bei einem Funktionsverlust von Vac14. Diese führen zu einer Störung autophagozytärer Prozesse und zur Akkumulation zytoplasmatischer Vakuolen in den Zellen (26,27), die mit einer Zellschädigung einhergehen und in Mäusen Neurodegeneration verursachen (28,29).

1.5 Der Vac14-Proteinkomplex

Vac14 ist ein Protein, welches größtenteils aus *HEAT repeats* (huntingtin, elongation factor 3, PR65/A, TOR) besteht und das Gerüst für den Proteinkomplex bildet (30). In Hefezellen befindet sich der Vac14-Proteinkomplex an der Vakuolenmembran, welche in Säugetierzellen dem Lysosom entspricht und dementsprechend an endosomalen und lysosomalen Membranen lokalisiert ist (31,32). Vac14, sowie das in Hefezellen vorkommende und mit Vac14 interagierende Vac7, fungieren als Aktivatoren von Fab1, welches als Kinase die Umwandlung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) zu Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PI(3,5)P₂) katalysiert. Inhibitor dieser enzymatischen Reaktion ist das ebenfalls mit Vac14 interagierende Atg18, ein Protein, das außerdem für die Autophagozytose wichtig ist (25). Fab1 steuert außerdem die Synthese von PI(5)P aus PI(3,5)P₂ (28). Fig4 auf der anderen Seite katalysiert als Phosphatase die Dephosphorylierung von PI(3,5)P₂ zurück zu PI(3)P (31,33).

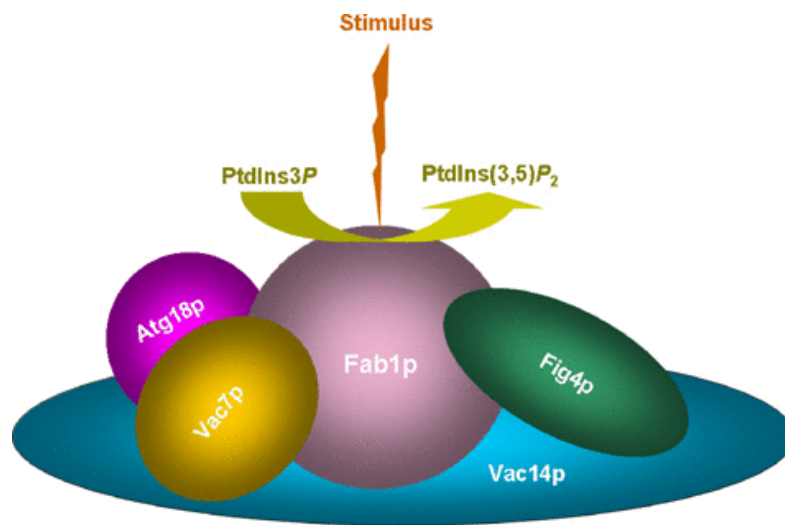


Abb. 3: Der Vac14-Proteinkomplex in der Hefezelle. Vac14 bildet das Grundgerüst für den Komplex, bestehend aus Fab1, Fig4 und Vac14, der die Synthese und den Abbau von PI(3,5)P₂ reguliert. Atg18 kann durch die Interaktion mit Vac14 inhibitorisch, Vac7 aktivierend auf Fab1 wirken. Nach Michell und Dove (35)

Vac14 ist abgesehen von seiner Funktion als Aktivator essenziell für die stabile Lokalisation der anderen Komplexkomponenten an den jeweiligen Membranen (24). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Vac14 mit sich selbst interagiert und seine intrazellulären Funktionen als Dimer ausführt, während eine monomere Variante funktionsuntüchtig bleibt (30).

Da der Proteinkomplex sowohl die Synthese als auch den Abbau von PI(3,5)P₂ engmaschig steuert, resultiert eine Deletion von Vac14 oder Fab1 in einer Abnahme des Lipids. Interessanterweise geht auch der Verlust der Phosphatase Fig4 mit einer Konzentrationsabnahme von PI(3,5)P₂ einher, da Fig4 die Interaktion zwischen Vac14 und Fab1 stabilisiert und trotz seiner entgegengesetzten Phosphatase-Funktion als Aktivator der Kinase Fab1 fungiert (33). Auch homozygote *ingls* (*infantile gliosis*) Mäuse, die eine *L156R*-Mutation des Vac14-Gens aufweisen, wodurch Vac14 nicht mehr an PIKfyve binden kann, zeigen erniedrigte PI(3,5)P₂-Level (25).

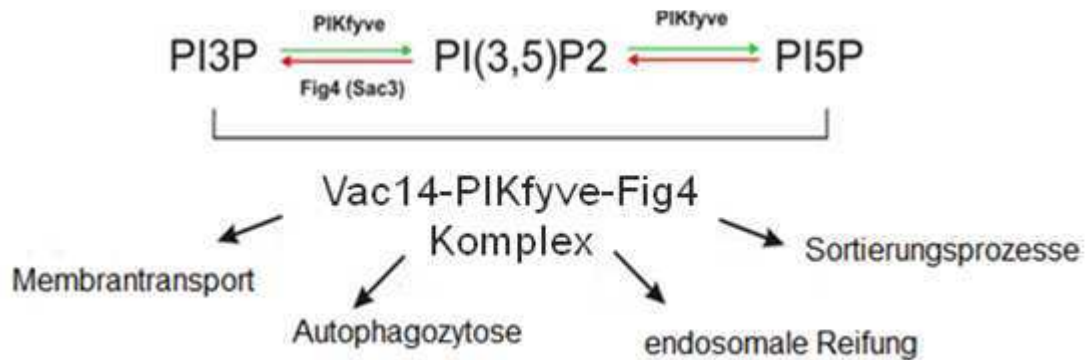


Abb. 4: Funktionen des Vac14-Proteinkomplexes. Vac14 fñgt sich mit der Kinase Fab1/PIKfyve und der Phosphatase Fig4/Sac3 zu einem Komplex zusammen, der für die Regulation von Phosphatidylinositol-Phosphaten (PIPs), insbesondere PI(3)P und PI(3,5)P₂, verantwortlich ist. Beide Phospholipide sind an endosomalen und autophagosomalen Prozessen beteiligt. PIKfyve kontrolliert außerdem die Synthese von PI(5)P (28). Vac14 dient als PIKfyve Aktivator; der Verlust eines der beiden Proteine resultiert in ähnlich erniedrigten PI(3,5)P₂ Level. Eine Deletion von Fig4 führt trotz seiner Phosphataseaktivität ebenfalls zu erniedrigten Konzentration von PI(3,5)P₂ (33). Ist dieser Komplex funktionsuntüchtig, entstehen wie beim *Charcot-Marie-Tooth-Syndrom* Vakuolen in den Zellen (27).

1.6 Phosphatidylinositol-Phosphate (PIPs)

An der Entstehung von Vakuolen sind, wie bereits erwähnt, Störungen des Membran- und Vesikeltransportes maßgeblich beteiligt. Die Regulation solcher Prozesse obliegt den Phosphatidylinositol-Phosphaten, was vermuten lässt, dass eine fehlgesteuerte Lipidhomöostase zur Vakuolisierung der Zellen führen könnte.

In der Zelle findet sich PI(3)P an frühen Endosomen. Hier rekrutiert es verschiedene Proteine, um Trafficking-Prozesse zu koordinieren (34). PI(3,5)P₂ ist hauptsächlich an späten Endosomen bzw. Endolysosomen lokalisiert. Von allen Phosphatidylinositol-Phosphaten kommt es zwar in der niedrigsten Konzentration vor, kann jedoch am dynamischsten auf Veränderungen in der Zelle, v.a. auf hyperosmotischen Stress, reagieren (35). PI(3,5)P₂ ist an vielen Prozessen beteiligt, u.a. der Ansäuerung von Endolysosomen, Autophagozytose oder der Kontrolle von Vesikel-, Membran- und Ionentransport (36). Letzteres geschieht beispielsweise durch die Regulation von Calcium. Intrazelluläres PI(3,5)P₂ bindet und aktiviert den Ca²⁺-permeablen Ionenkanal TRPML₁, der auf endolysosomalen Membranen lokalisiert ist, wodurch die Fusion von Lysosomen und anderen Kompartimenten sowie weitere Membrantransportprozesse getriggert werden (37,39). In Neuronen ist Calcium hauptverantwortlich für die synaptische Vesikelfusion (38).

In Hefezellen geht eine Erniedrigung der PI(3,5)P₂ mit einer Vergrößerung der Hefevakuole einher. In Säugetierzellen, in denen das endolysosomale System funktionell der Hefevakuole entspricht, resultiert eine PI(3,5)P₂-Defizienz in einer Bildung von großen, intrazellulären Vesikeln (27).

Die Bildung dieser Vakuolen erfolgt durch mangelhafte Prozessierung und gestörte Fusion oder Bildung von endosomalen und lysosomalen Membranen und Vesikeln (40). Sie enthalten LAMP2 auf der Oberfläche, einen Marker für späte Endosomen oder *multivesicular bodies* (MVB), sowie das Protein LC3-II, welches sich bei einer Fusionsblockade von Autophagosomen und Lysosomen anreichert und einen Marker für autophagozytäre Membranen darstellt (25,41). Ein *Knockout* des PI(3,5)P₂ Effektors Atg18/Svp1p, der für das Membranrecycling verantwortlich ist, verursacht ähnliche intrazelluläre Veränderungen (42).

Eine wichtige Funktion von PI(3,5)P₂ ist die Ansäuerung von Endolysosomen und Golgi Apparat. Dies geschieht in der Zelle durch die H⁺-Ionenpumpe V-ATPase, welche außerdem Fusions- und Fissionsprozesse der Hefevakuole reguliert (43). PI(3,5)P₂ stabilisiert die Interaktion der beiden ATPase-Domänen V₀ und V₁ und gewährleistet damit die Aktivität der Ionenpumpe. Eine Deletion von PIKfyve, einhergehend mit einer PI(3,5)P₂-Erniedrigung, resultiert in einer mangelhaften Ansäuerung der zytoplasmatischen Vakuolen (44,45).

Trotz vieler neuer Erkenntnisse in den letzten Jahren bleiben der genaue Mechanismus der Entstehung von Vakuolen sowie die Auswirkungen auf die Zelle und den gesamten Organismus unverstanden. Bei vielen podozytären Erkrankungen, wie der FSGS oder der membranösen Glomerulonephritis, wurde eine Vakuolisierung der Zellen, ähnlich dem CMT-Syndrom, beobachtet (46,47). Fraglich ist, inwieweit die Vakuolen Begleiterscheinung der Erkrankungen sind oder vielmehr ursächlich für die pathologischen Phänotypen.

1.7 Zielstellung

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Deletion einer der Vac14-Komplex-Komponenten, die ektope Überexpression der PIKfyve-bindungsdefizienten L156R Vac14-Mutante als auch die Überexpression von Wildtyp Vac14 zur Akkumulation zytoplasmatischer Vakuolen führen (48). HEK293 Zellen mit einer lediglich reduzierten Vac14-Expression entwickeln keine Vakuolen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass trotz stark eingeschränkter Vac14-Expression, und damit verminderter PIKfyve-Aktivität, die basale PI(3,5)P₂-Produktion nur geringfügig (um 30%) reduziert ist. Auf Milieuänderungen reagieren die Vac14-defizienten Zellen jedoch sensibler als Kontrollzellen und bilden Vakuolen aus (49).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine reduzierte Vac14-Expression in humanen Podozyten ebenso einen Einfluss auf die Anfälligkeit der Zellen gegenüber Milieuänderungen hat. Hierzu sollten zwei verschiedene Zelllinien eingesetzt werden, um eine höhere Validität der Ergebnisse zu erzielen: eine stabile Zelllinie mit einer konstant reduzierten Expression von Vac14 sowie eine weitere Zelllinie mit konstitutiver, durch die Zugabe von Doxzyklin induzierter Vac14-Defizienz. Diese Podozyten sollten mit Ammoniumchlorid stimuliert werden, einer schwachen Base, die als NH₃ in Lysosomen transportiert und dort protoniert wird, woraufhin NH₄⁺ das Zellkompartiment nicht mehr verlassen kann. Durch dieses *Ionentrapping* wird mit nachfolgendem Wasserinflux die Bildung von intrazellulären Vakuolen induziert (50,51).

Die beiden Podozytenzelllinien sollten in zwei unabhängigen Versuchen für 24 Stunden mit Ammoniumchlorid stimuliert werden, wobei das Vakuolisierungsverhalten von Zellen mit und ohne reduzierter Vac14-Expression zu analysieren war. Hierbei sollten insbesondere der zeitliche Verlauf der Vakuolisierung, der Gesamtanteil an vakuolisierten Zellen sowie Größe und Anzahl der intrazellulären Vakuolen berücksichtigt werden.

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH
Brutschränke Bakterien, Hefen	B5050	Heraeus
Brutschränke Zellkultur	Heracell 240	Heraeus
Elektrophoresekammern (Agarosegel)	Model B1	Peqlab Biotechnologie GmbH
Elektrophoresekammern (SDS-PAGE)	Novex X-cell Sure Lock™ Mini- Cell	Invitrogen
Entwickler	Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC Medizintechnik
Geldokumentationssysteme	Lumi-Imager F1 Fluor Chem® FC2	Roche Diagnostics Cell Biosciences
Mikroskop	Observer Z1, Apotome, HXP120, Axiocam MRm	Zeiss AG
PCR-Gerät	GeneAmp® PCRSystem 2700	Applied Biosystems
pH-Meter	Consort C864	Consort bvba
Photometer	Smart Spec™	BioRad
Rühr- / Heizplatte	Combimag RCT	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Scanner	HP Scanjet 5530	Hewlett-Packard GmbH
Schüttelinkubator Bakterien, Hefen	Certomat® IS	B. Braun Melsungen AG
Spannungsquellen	Power Pac HC™	BioRad
Thermostat	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Profuge™ 10K	Agilent Technologies Inc.
UV-Tisch (Transilluminator)	IL-200-M	H. Saur Laborbedarf
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries, Inc.N.Y.
Waagen	Scout™Pro Explorer®Pro	Ohaus
Wasserbad	Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Wasserdestillator	Ultra Clear	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Western-Blot-Apparatur	Semidry Transfercell	BioRad
Zentrifugen	Mikro 200 R Allegra™ X-22R Multifuge 3S-R Megafuge 1.0R	Hettich Beckman Heraeus Heraeus

2.2 Allgemeine Chemikalien

Substanz	Hersteller
Blue/Orange 6 x Loading Dye Solution	Promega
PAGE Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
2-Propanol	Roth
1 kb DNA ladder	Promega
100 bp DNA ladder	Promega
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid	Sigma
Bromphenolblau	BioRad
Calciumchlorid	Sigma
Coumaridinsäure	Sigma
Crystal Clear Mounting Medium	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithio-1,4-threitol (DTT)	Sigma
Doxyzyklin	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Omnilab
Glutathion Sepharose	Amersham Biosciences
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	Biochrom
Glycerin (Glycerol)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Aldrich
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
Lumi-Light Plus Western Blotting Substrate	Roche
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche
Methanol	Methanol
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Natriumchlorid	Natriumchlorid
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
PEG 4000	PEG 4000
Paraformaldehyd (PFA)	Paraformaldehyd (PFA)
Parafin	Parafin
Ponceau S Lösung	Ponceau S Lösung
Precision Plus Protein Dual Colour Standard	Precision Plus Protein Dual Colour Standard
Salzsäure (HCl) 37 %	Salzsäure (HCl) 37 %

2.3 Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
10x PBS	0,038 M NaH ₂ PO ₄ 0,162 M NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl ad H ₂ O pH 7,4
1 M Ammoniumchloridlösung	NH ₄ Cl Stammlösung in 1x PBS
1 M Tris/HCl	121.14 g Tris ad 1l H ₂ O pH-Werteinstellung mit konz. HCl pH 6,8-8,8
2x HEBS	1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 10 mM KCl 12 mM Glukose 50 mM HEPES 280 mM NaCl ad H ₂ O pH 7.05 bei -20°C lagern
IP-Puffer Stammlösung	1 % Triton X-100 15 mM EDTA 20 mM Tris/HCl pH 7.4 25 mM NaCl 50 mM NaF Ad H ₂ O
IP-Puffer Gebrauchslösung	IP-Puffer Stammlösung 0.25 mM PMSF (in Ethanol) 5 mM Na ₃ VO ₄
Laemmli-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris/HCl pH 6.8 0.2 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) β-ME 10 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol in H ₂ O Lagerung bei -20°C
Lysis Puffer	1 % (v/v) Triton X-100 1 mM EDTA 50 mM Tris 100 mM NaCl pH 7,4
Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % Essigsäure ad H ₂ O
Protein-Laufpuffer (1x) (1x Running buffer)	0,05 % (w/v) SDS 25 mM Tris 0,2 M Glycin

	ad H ₂ O
Stripping Puffer	1 g SDS 15 g Glycin 10 ml Tween 20 ad 1l H ₂ O pH 2,2
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	1 mM EDTA-Na ₂ -Salz 40 mM Tris-HCl 40 mM Essigsäure ad H ₂ O pH 8,2
TBS	50 mM Tris 150 mM NaCl ad 800 ml H ₂ O pH 7,5
TBS-T (Tris Buffered Saline + Tween)	0.05 % Tween 20 10 mM Tris pH 7.4 150 mM NaCl ad 1l H ₂ O
Transfer-Puffer (1x)	25 mM Tris (1M Stammlösung pH 8,3) 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol ad H ₂ O

2.4 Laborbedarf und Kits

Bezeichnung	Hersteller
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen
Bakterien Kulturröhrchen	Sarstedt
BCA™ Protein Assay Kit	Biorad
Blottingpapier	Schleicher & Schüll
Deckgläschen	Diagonal
DMEM	Invitrogen
ECL-Filme	FUJIFILM Super RX
Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom
Flexi-Strip Schaber	BiWeX
Glasperlen	Roth
Handschuhe	Hartmann AG
HEPES-Puffer	PAA Laboratories
Kanülen	Becton Dickinson
Lumi-Light/Lumi-LightPLUS	Roche Diagnostics
Objektträger	VWR
Page Ruler™ Plus Prestained Protein ladder	Thermo Scientifics
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PBS, 1x, steril	PAA Laboratories
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Petrischalen für die Mikrobiologie	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikwaren für die Zellkultur	Becton Dickinson
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich Chemie
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Roth
Sterilfilter	Millipore
Zentrifugenröhrchen	Zentrifugenröhrchen BD Falcon

2.5 Kulturmedien

2.5.1 Medien zur Kultivierung eukaryoter Zellen

Die Kultivierung von AB8 (immortalisierte humane Podozytenzellen) erfolgte in RPMI 1640 Medium + 10% FCS + 0,8% *supplements* +1% Penicillin/Streptomycin

2.6 Organismen

2.6.1 Eukaryotische Zellkulturen

Stamm	Beschreibung	Referenz	Medium	Kulturbedingugn
AB 8	Immortalisierte humane Podozyten; Proliferation: 33°C Ausdifferenzierung: 37°C	Saleem 2002 (53)	RPMI 1640 10% FCS 0,8% <i>supplements</i> 1% Penicillin/ Streptomycin	Proliferation: 33°C, 5% CO2 Ausdifferenzierung: 37°C, 5% CO2 für 10- 14d

2.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Vac 14	rabbit	Sigma
GAPDH	rabbit	Cell Signaling
β-Tubulin	mouse	Sigma
RFP	mouse	Clontech

2.8 Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
M13 fwd	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC
sh5 fwd	gatccGCAACAAGTTTGACCTGGTGATTCAAGAGATCACCAGGTCAAACCTTGTTGCTTTTT ACGCGTg
sh5 rev	aattcACGCGTAAAAAAGCAACAAGTTTGACCTGGTGATCTCTTGAATCACCAGGTCAAAC TTGTTGCg
sh6 fwd	gatccGACATTAACCTGCTGGATTACTTCAAGAGAGTAATCCAGCAGGTTAATGTCTTTTT ACGCGTg
sh6 rev	aattcACGCGTAAAAAAGACATTAACCTGCTGGATTACTCTTGAAGTAATCCAGCAGGT TAATGTCg
miRNA sh gegen Vac14	97mer_sh1: tgctgttgacagtgagcgccttcaactcccaccatgaattagtgaagccacagatgaattcatggaggagttgaa ggatgcctactgcctcgga

3. Methoden

3.1 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger im Zentrallabor des UKM. Die erhaltene Basensequenz wird mit Chromas geöffnet, bearbeitet und anschließend mit verschiedenen Datenbanken verglichen und analysiert.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellkulturen erfolgt in o.g. Medien, welche dreimal wöchentlich erneuert werden.

Hat sich ein konfluenter Zellrasen gebildet, so können die Zellen durch Passagieren auf neue Schalen verteilt werden. Zum Ablösen von der Schale werden die Zellen (mit Ausnahme der HEK293 Zellen) einmal mit 1xPBS gewaschen, anschließend mit 1 ml 10x Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Es folgt die Resuspension in Medium und die Überführung der gewünschten Konzentration auf neue Schalen.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zunächst erfolgt die Loslösung der Zellen von der Schale analog dem Passagieren. Nach Resuspension werden die Zellen bei 1000 xg für 5 min abzentrifugiert, anschließend in 1 ml Medium mit 10% DMSO resuspendiert und in einem Kryoröhrchen bei -20 °C über Nacht eingefroren. Das Röhrchen wird einige Stunden bei -80 °C gelagert und kann anschließend in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Für das Auftauen werden die Kryoröhrchen zunächst im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend bei 1000 xg für 5 min abzentrifugiert. Es folgt ein Waschschrift mit 10ml PBS und erneute Zentrifugation, bis die Zellen schließlich, in 10 ml Medium resuspendiert, auf Kulturschalen ausgesät werden können.

3.2.3 Transfektion von Zellkulturen

Transfektion bezeichnet analog zur Transformation bei Bakterien die Aufnahme freier DNA in eukaryotische Zellen. Bei der hier durchgeführten Ca_2PO_4 Methode müssen die Zellen 50-70% konfluent sein.

Zu 10 µg DNA werden 250 µl 2xHEBS Puffer zugefügt, gut vermischt und anschließend mit 250 µl CaCl₂ Stammlösung versetzt, welche unter vortexen tröpfchenweise hinzugegeben wird. Es folgt 20 min Inkubationszeit, in der ein Mediumwechsel der Zellen vollzogen wird.

Der Ansatz wird langsam unter Schwenken der Schale auf die Zellen gegeben und für 8 h inkubiert. Während der Inkubationszeit bildet die DNA (negativ geladen) einen Komplex mit Ca₂PO₄ (positiv geladen), welcher von den Zellen aufgenommen werden kann.

Es erfolgt ein weiterer Mediumwechsel und nachfolgende Kultivierung von 24 h im Brutschrank. Hiernach kann ein Zelllysate hergestellt werden.

3.2.4 Herstellung von Zelllysate

Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und nach dessen Entfernen schräg auf Eis gestellt, sodass PBS-Reste abgesaugt werden können. Die Zellen werden mit 350-500µl Lysispuffer versetzt, welcher einen Proteaseinhibitor zur Vermeidung von Proteinabbau enthält. Die Zellen werden mit einem Schaber von der Schale gekratzt, in ein auf Eis stehendes Eppi überführt und mittels einer s.c. Spritze durch Aufziehen homogenisiert. Es folgt eine zehnmütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 30 min bei 4°C und >14000xg. Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und bei -20°C eingefroren.

3.2.5 Stimulation eukaryotischer Zellen

Zur Analyse der Wirkung von Ammoniumchlorid (NH₄Cl) auf *Vac14-Knockdown* AB8 Zellen (short hairpin Konstrukte 5-8) wird dem Medium der AB8 Zellen 50 mM bzw 100 mM Ammoniumchloridlösung zugesetzt und daraufhin die Induzierbarkeit von Vakuolen in der Zelle untersucht. Für jeden Zelltyp (WT, sh5, sh6) wurden 10 Sichtfelder mit dem 20er Objektiv des Mikroskops festgehalten und ausgewertet, was einer Zellzahl von mindestens 150 Zellen entspricht.

Zur Quantifizierung von möglichen Unterschieden im Vakuolisierungsverhalten wurde zunächst eine prozentuale Bestimmung der vakuolisierten Zellen von allen Zellen je Sichtfeld durchgeführt, wobei eine Vakuole für die Zelle ausreichend war, um als „vakuolisiert“ eingestuft zu werden. Für die Analyse der Größenverteilung der Vakuolen wurde jede Zelle anhand des Durchmessers ihrer größten Vakuole drei Kategorien zugeordnet, wobei eine Vakuole pro Zelle ausreichend für die Einordnung in die entsprechend höhere Kategorie war (1. <3µm, 2. 3-5µm, 3. >5µm Durchmesser).

3.2.6 Das p-INDUCER-Zellsystem

Das von der Arbeitsgruppe Westbrook (Houston, Texas, USA) bereitgestellte pINDUCER-System ermöglicht es, selektiv eine Überexpression von Proteinen oder eine Inaktivierung von Zielgenen in Abhängigkeit von Doxyzyklin zu induzieren. Es handelt sich um eine Weiterentwicklung lentiviraler Systeme (52). Soll ein Protein runterreguliert werden, so wird über einen konstitutiv aktiven Ubiquitin Promotor (Ubc) ein Puromycin-Resistenz-Gen simultan mit dem Tetrazyklinaktivator (rTA3) exprimiert. rTA3 bindet in Abhängigkeit von Doxyzyklin an ein TRE2 Element, wodurch *short hairpin RNA* zusammen mit dem Reporter gen RFP (*red fluorescence protein*) von der Polymerase II abgelesen wird. Dadurch kann die Effizienz des Knockdowns visuell unmittelbar nachverfolgt werden (52).

Es wurden jeweils drei Ansätze mit und ohne Doxyzyklinzugabe erstellt und für fünf Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 150µM Ammoniumchlorid. Für die Analyse wurden für jedes der sechs Wells 10 Sichtfelder mit dem 20er Objektiv des Mikroskops festgehalten und ausgewertet. Auf diese Weise wurden pro Ansatz mindestens 115 Zellen für die statistischen Auswertungen berücksichtigt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Größe. Hierzu werden ein Trenngel und ein Sammelgel nach folgenden Mengenangaben hergestellt: (Angaben in ml)

Komponenten	Sammelgel 5%	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
H ₂ O	2.1	3,2	2,6
30 % Acryamidmix	0.5	2,7	3,2
1.0 M Tris pH 6.8	0.38	-	-
1.5 M Tris pH 8.8	-	2,0	2,0
10 % SDS	0.03	0,08	0,08
10 % APS	0.03	0,08	0,08
TEMED	0.003	0,005	0,003

Das in eine Gekassette eingefüllte Trenngel wird mit Isopropanol überschichtet, bis es vollständig auspolymerisiert ist. Nach Entfernung des Isopropanols wird das Sammelgel über das Trenngel gegeben und ein Kamm wird zur Taschenbildung eingesetzt. Die zu trennenden Proteine werden mit 4x Lämmli Puffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C gekocht, um eine Denaturierung zu erreichen, sodass die Proteine in ihrer Sekundärstruktur vorliegen.

Die Gekassette wird in der Gelkammer angebracht, welche mit 1X Proteinlaufpuffer befüllt wird. Die Proben werden zusammen mit einem Molekülgrößenmarker in die Taschen des Gels pipettiert und die Elektrophorese läuft bei 100V im Sammel- und 200V im Trenngel.

3.3.2 Western Blot

Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Bei dem hier verwandten *semi-dry* Verfahren werden die Proteine wegen ihrer Ladung transferiert. Zuvor wird die PVDF-Membran für eine Minute in Methanol aktiviert und 4 Whatman-Filterpapiere werden in Transferpuffer getränkt. Gel und Membran werden zwischen den Filterpapieren platziert, mit der Membran in Richtung der positiven Elektrode. Nach 2h bei einer Stromstärke von 1,5mA/cm² ist der Proteintransfer beendet und die Membran kann zur Inkubation verschiedener Antikörper mit einem Skalpell geschnitten werden.

Es folgt das Blocken der Membran mit 5% Trockenmilchpulver in TBS-T für eine Stunde, damit keine freien Proteinbindungsstellen mehr vorhanden sind.

Anschließend wird die Membran 3x 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, hiernach kann sie mit dem ersten Antikörper behandelt werden. Die Antikörper sind mit 5% Trockenmilchpulver in TBS-T verdünnt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt ein weiterer Waschschrift. Der Peroxidase-gekoppelte zweite Antikörper inkubiert mindestens eine halbe Stunde bei RT, es folgt abermals ein Waschschrift, an den sich die Behandlung mit einem Peroxidasereagenz anschließt. Das durch die Peroxidasereaktion freigewordene Licht wird mittels eines Röntgenfilms detektiert und die Proteinbanden werden durch Entwicklung des Films sichtbar gemacht.

3.4 Statistische Analysen

Für kategoriale Größen wurden der Chi-Quadrat-Test bzw. bei $n \leq 50$ Fishers-Exakter-Test angewandt. Quantitative Größen wurden mit dem t-Test oder t-Test für verbundene

Stichproben ausgewertet, bei begründeter Normalverteilungsannahme. Ohne die Annahme einer Normalverteilung wurden nicht-parametrische Tests wie der Wilcoxon-Test für verbundene bzw. der Mann-Whitney-Test für nicht-verbundene Werte eingesetzt. Ergebnisse mit p-Werten von $<0,05$ wurden als signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism*.

4. Ergebnisse

4.1 Stimulation von Podozyten mit Vac14-Knockdown mit Ammoniumchlorid

Wie bereits erwähnt, ist Vac14 essenziell für das Gleichgewicht zwischen den Phosphatidylinositol-Phosphaten PI(3)P und PI(3,5)P₂. Störungen dieser Balance können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Bildung großer intrazellulärer Vakuolen führen, so hervorgerufen durch den Verlust von Vac14 selbst oder eines seiner Interaktionspartner PIKfyve und Fig4. Ebenso führen mutierte, PIKfyve-bindungsdefiziente Vac14-Proteine in der *ingls* Maus zu erniedrigten PI(3,5)P₂-Spiegeln und damit einhergehend zu Vakuolen (25).

In vorangegangenen Arbeiten aus unserem Labor konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Verlust, sondern auch die Überexpression von Vac14 zu einer Bildung intrazellulärer Vakuolen führt, ähnlich den Vakuolen, die durch Deletion des Vac14-Gens hervorgerufen werden (48). Vermutlich lässt sich die Bildung der durch Beeinflussung des Vac14-Komplexes hervorgerufenen Vakuolen auf eine Störung endolysosomaler Reifungsprozesse zurückführen, da sie mit einer intrazellulären Akkumulation von typischen endolysosomalen (z.B. Lamp2, Rab7) und Autophagozytose-assoziierten Markerproteinen (wie p62 und LC3) einhergeht (48).

Podozyten mit lediglich reduzierter Vac14-Expression zeigen phänotypisch keine Vakuolen. Um zu überprüfen, ob sie wie HEK293 Zellen dennoch sensibler auf Änderungen ihres Milieus reagieren (49), wurden sie mit Ammoniumchlorid stimuliert. Ammoniumchlorid (NH₄Cl) ist eine schwache Base, die als NH₃ in Lysosomen transportiert und dort protoniert wird, woraufhin NH₄⁺ das Zellkompartiment nicht mehr verlassen kann. Durch dieses *Ionentrapping* wird mit resultierendem Wasserinflux die Bildung von intrazellulären Vakuolen induziert (50,51).

Im nachfolgenden Versuch wurden Podozyten stabil mit verschiedener Vac14-*short hairpin RNA* (sh) im pSIREN-RetroQ-Vektor (pQCXIP) transduziert, wodurch eine reduzierte Expression von Vac14 erreicht werden sollte. Dieser *Knockdown* wurde proteinbiochemisch nachgewiesen. Die short hairpin Sequenz sh6 erzeugt eine um 78% verringerte Expression von Vac14, während die RNA von sh5 keine Reduktion der Vac14-Expression bewirkt (s. Abb. 5).

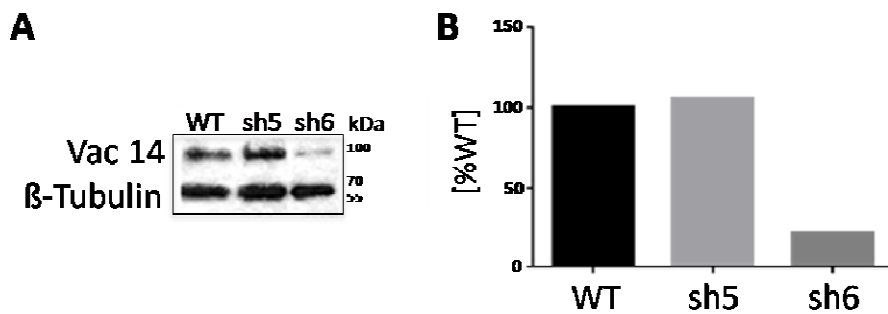


Abb. 5: Nachweis des Knockdowns von Vac14 bei sh6. (A) Der Western Blot zeigt eine deutlich reduzierte Expression von Vac14 bei sh6. **(B)** Die Expression von Vac14 ist bei sh6 um 78% reduziert.

Im weiteren Verlauf wurden folgende stabile Zelllinien generiert: Wildtyp Podozyten (WT), eine short hairpin Variante ohne Vac14-Knockdown (sh5) und Podozyten, in denen Vac14 defizient ist (sh6). Die stabilen Zellen wurden für 24 Stunden mit NH_4Cl mit einer Endkonzentration von $50\mu\text{M}$ behandelt. Dabei wurden die intrazellulären Veränderungen nach einer, nach vier und nach 24 Stunden kontrolliert.

Hierbei zeigte sich nach einer Stunde eine geringe und nach vier Stunden eine deutliche Vakuolisierung in allen drei Zelllinien. Nach 24 Stunden konnte eine weitgehende Regeneration der WT- und sh5-Zellen beobachtet werden, während die Vac14-defizienten Podozyten die stärkste Vakuolisierung im Vergleich zu allen vorigen Zeitpunkten aufwiesen. Der gleiche Versuch wurde auch mit einer NH_4Cl -Konzentration von $100\mu\text{M}$ durchgeführt, wobei alle drei Zelllinien nach kurzer Zeit sehr stark vakuolisiert waren, sodass Unterschiede nicht zu differenzieren waren (Daten hier nicht gezeigt). Um eine Unterscheidung hinsichtlich des Vakuolisierungs- und Regenerationsverhaltens zu ermöglichen, wurde deshalb im weiteren Verlauf mit einer für diesen Versuchsansatz optimalen NH_4Cl -Konzentration von $50\mu\text{M}$ gearbeitet. Des Weiteren waren nach vier Stunden die geringsten Unterschiede in Vakuolenzahl und -größe zu verzeichnen, sodass im Folgenden nur Analysen nach einer und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid dargestellt sind.

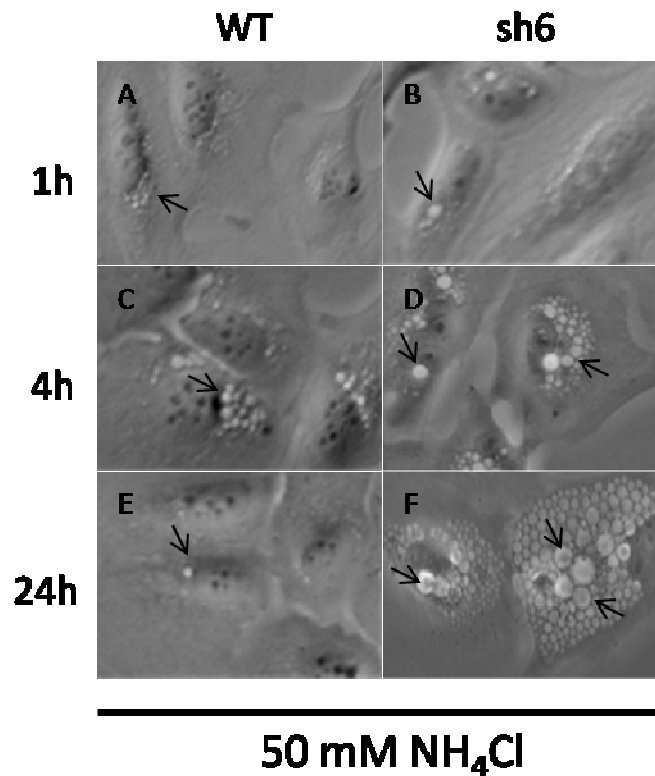


Abb. 6: Mikroskopie von Podozyten nach der Stimulation mit Ammoniumchlorid. (A,C,E): Podozyten mit unveränderter Vac14-Expression (WT) nach 1, 4 und 24 Stunden nach Zugabe von 50µM Ammoniumchlorid. Nach der ersten Stunde zeigen sich wenige, nach vier Stunden viele Vakuolen, während nach 24 Stunden nur noch vereinzelt Vakuolen auffindbar sind. (B,D,F): Podozyten mit Vac14-Knockdown (sh6) nach 1, 4 und 24 Stunden nach Zugabe von Ammoniumchlorid. Nach einer Stunde sind ebenfalls wenige, vereinzelte Vakuolen in den Zellen vorhanden, nach vier Stunden ist eine deutliche Akkumulation von Vakuolen zu beobachten. Nach 24 Stunden sind die Zellen massiv vakuolisiert.

Um die in Abb. 6 dargestellten Effekte von Ammoniumchlorid auf Podozyten mit unterschiedlicher Vac14-Expression quantifizieren zu können, wurden für jede der drei Zelllinien und beide Zeitpunkte (1h, 24h) mindestens 150 Zellen herangezogen und der Anteil an vakuolisierten Zellen ermittelt.

Es zeigt sich, dass der Anteil an vakuolisierten Zellen bei den sh6-Podozyten gegenüber den Wildtyp- bzw. sh5-Zellen sowohl nach einer, als auch nach 24 Stunden deutlich erhöht ist. Während der vakuolisierte Anteil bei den Vac14-defizienten Zellen nach 24 Stunden den höchsten Wert erreicht, ist der Anteil der vakuolisierten sh5-Podozyten relativ konstant, die WT-Zellen sind nach 24 Stunden sogar weniger vakuolisiert.

Somit entwickeln Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression mehr Vakuolen in kürzerer Zeit durch die Einwirkung von Ammoniumchlorid und können sich nicht regenerieren.

Tab. 1: Anteil an vakuolisierten Zellen.

Nach einer Stunde und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 50µM NH₄Cl wird in allen drei Zelllinien (WT, sh5 und Vac14-defiziente sh6-Podozyten) der Anteil an vakuolisierten Zellen in Prozent aller untersuchten Zellen bestimmt. Der p-Wert gibt die Signifikanz des gefundenen Ergebnisses wieder, wobei ein p<0,05 als signifikant, p-Werte ≥0,5 als nicht signifikant (n.s.) erachtet werden (Chi-Quadrat-Test).

	WT	sh5	sh6	p (sh6 zu WT)
1 h	63,4%	65,0%	80,1%	0,0009
24h	46,4%	67,5%	88,8%	<0,0001

Um herauszufinden, ob es außerdem Unterschiede in der Größe der Vakuolen gibt, wurden sie vermessen und die Podozyten entsprechend in Zellen mit kleinen (<3µm), mittelgroßen (3-5µm) und großen Vakuolen (>5µm) eingeteilt.

Nach einer Stunde Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid kann zunächst ein in allen drei Zelllinien ähnliches Verteilungsmuster hinsichtlich der Vakuolengröße festgestellt werden; die Vakuolen sind größtenteils klein, wobei sh6 einen größeren Anteil an mittelgroßen Vakuolen aufweist (s. Abb. 7 B und Tab. 2). Nach 24 Stunden hat der Hauptanteil der Kontroll- und sh5-Podozyten noch immer kleine Vakuolen, wobei der relative Anteil an mittelgroßen Vakuolen in beiden Zelllinien gestiegen ist. Bei den Podozyten mit sh6 hat sich die Verteilung innerhalb der Kategorien erheblich verändert; lediglich ein Viertel der Zellen haben kleine Vakuolen, während fast die Hälfte mittelgroße und ein knappes Drittel aller Zellen große Vakuolen aufweist (s. Abb. 7 C und Tab.3).

Somit bilden Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression schneller größere Vakuolen aus.

Tab. 2: Vakuolengröße nach einer und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid.

Die Podozyten der drei stabilen Zelllinien wurden mit 50µM NH₄Cl stimuliert. Nach einer und nach 24 Stunden erfolgte die Einteilung aller vakuolisierten Podozyten in Zellen mit kleinen, mittelgroßen und großen Vakuolen (<3µm, 3-5µm, >5µm). Der p-Wert gibt die Signifikanz des gefundenen Ergebnisses wieder, wobei ein p<0,05 als signifikant, p-Werte ≥0,5 als nicht signifikant (n.s.) erachtet werden (Chi-Quadrat-Test).

Vakuolen	WT		sh5		sh6		P (sh6 zu WT)	
	1h	24 h	1h	24 h	1h	24h	1h	24 h
kleine (<3µm)	85,1%	76,5%	84,5%	61,9%	75,2%	24,8%	n.s.	n.s.
mittelgroße (3-5µm)	14,5%	17,6%	13,6%	26,5%	22,4%	44,4%	n.s.	<0,0001
große (>5µm)	00,8%	05,9%	01,8%	11,6%	02,4%	30,7%	<0,05	<0,0001

In einem letzten Schritt wurde die durchschnittliche Anzahl an Vakuolen mit einem Durchmesser von über 5µm pro Zelle in allen Zellen mit großen Vakuolen bestimmt, um den Einfluss von Ammoniumchlorid auf Zellen mit normaler und reduzierter Vac14-Expression weiter differenzieren zu können. Hierbei zeigt sich, dass nach einer Stunde im Schnitt 1-2 Vakuolen dieser Größe in allen drei Zelltypen aufzufinden sind. Bei den Wildtypzellen und sh5 ist die Anzahl auch nach 24 Stunden nicht wesentlich verändert, während bei sh6 im Durchschnitt 5,5 Vakuolen pro Zelle von über 5µm im Durchmesser aufzufinden sind (s. Abb. 7 D).

Demnach ist nach 24 Stunden die durchschnittliche Anzahl an großen Vakuolen in Podozyten mit erniedrigtem Vac14-Level gegenüber den Kontrollzelllinien (WT und sh5) signifikant erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression zu jedem Zeitpunkt mehr Vakuolen zeigen als die beiden Kontrollzelllinien WT und sh5. Der relative Anteil an vakuolisierten Zellen nimmt bei sh6 mit der Stimulationszeit mit Ammoniumchlorid weiter zu, während bei den Kontrollzellen eine Reduktion (WT) bzw. ein gleichbleibendes Level (sh5) zu beobachten ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Vakuolen von sh6-Podozyten größer sind und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid mehr dieser großen Vakuolen in den Zellen aufzufinden sind.

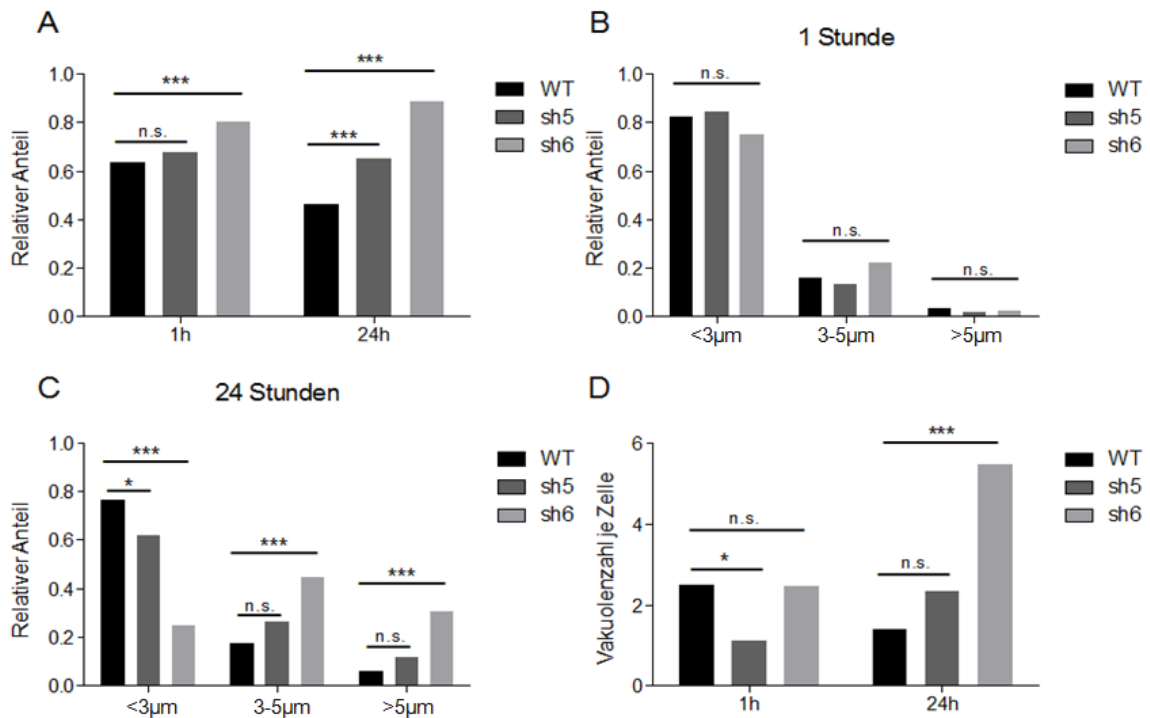


Abb. 7: Auswertung der mit Ammoniumchlorid stimulierten Podozyten. (A) Relativer Anteil an vakuolierten Zellen nach einer und nach 24 Stunden nach Zugabe von Ammoniumchlorid. (B) Einteilung der vakuolierten Podozyten in Zellen mit kleinen, mittelgroßen und großen Vakuolen (<3µm, 3-5µm, >5µm im Durchmesser) nach einer Stunde Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid. (C) Einteilung der vakuolierten Podozyten in Zellen mit kleinen, mittelgroßen und großen Vakuolen (<3µm, 3-5µm, >5µm im Durchmesser) nach 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid. (D) Durchschnittliche Anzahl an Vakuolen mit einem Durchmesser von über 5µm in allen Zellen mit Vakuolen dieser Größe. Chi-Quadrat-Test ***: p<0,001; *: p<0,05; n.s. p≥0,05

4.2 Vac14-Knockdown im pINDUCER-Zellsystem

Die in 4.1 dargestellten Ergebnisse sollten in einem unabhängigen Ansatz bestätigt werden. Dazu wurde ein induzierbares System eingesetzt, in dem in Podozyten über die Gabe von Doxzyklin eine verringerte Expression von Vac14 erzeugt werden kann (vgl. Abb. 8 A). Analog zu 4.1 wurden in diesem neuen, induzierbaren Zellsystem ebenfalls Podozyten mit Ammoniumchlorid stimuliert, um Unterschiede im Vakuolisierungsverhalten in Abhängigkeit vom Vac14-Expressionslevel nachzuweisen. Auch hier wurde untersucht, ob es Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung, sowie in Anzahl und Größe der Vakuolen gibt.

Zunächst wurde der Vac14-Knockdown der shRNA 1 proteinbiochemisch und visuell mithilfe des RFP bestätigt. Abb. 8 D-F zeigt Podozyten, deren Medium kein Doxyzyklin hinzugefügt wurde. Hier ist unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop keine Rotfärbung, also keine RFP Expression, zu beobachten. Abb. 8 G-I zeigt die seit fünf Tagen mit Doxyzyklin stimulierten Zellen, welche RFP exprimieren und dadurch rot angefärbt erscheinen. Der Western Blot bestätigt diese Beobachtung: Nur in den mit Doxyzyklin stimulierten Podozyten ist eine Expression von RFP (dsRed) nachzuweisen (s. Abb. 8 B). Hier ist Vac14 im Vergleich zu den unstimulierten Podozyten um durchschnittlich 52% runterreguliert (s. Abb. 8 C).

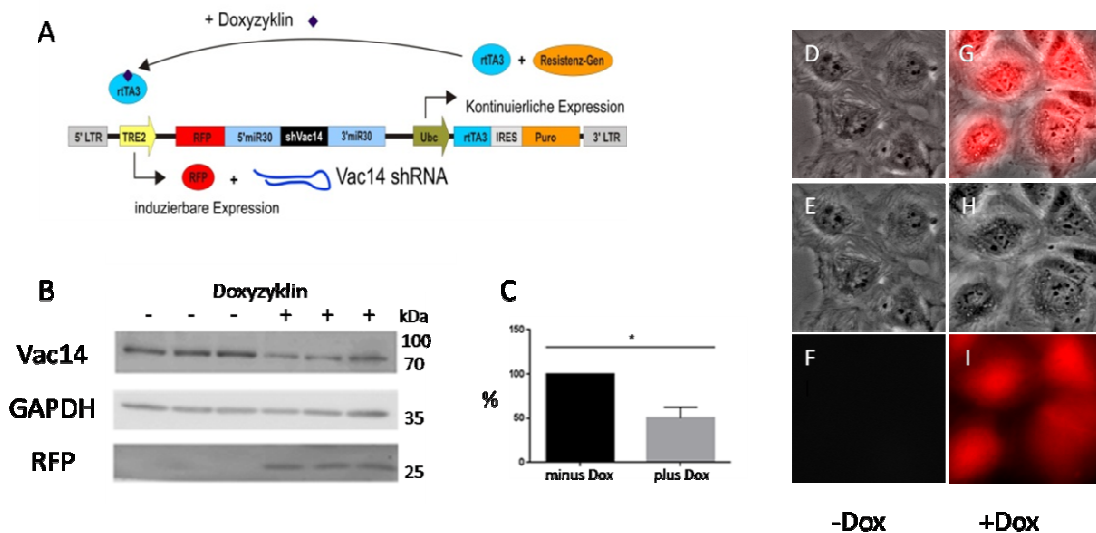


Abb. 8: Bestätigung des Vac14-Knockdowns im pINDUCER Systems. (A) Funktionsweise des pINDUCER Systems. Mithilfe des pINDUCER Systems lassen sich Proteine gezielt überexprimieren oder runterregulieren. Für den selektiven Vac14-Knockdown werden über den konstitutiv aktiven Ubiquitin Promoter (Ubc), gesteuert über eine *internal ribosomal entry site*, IRES, das Puromycin-Resistenz-Gen zusammen mit einer Weiterentwicklung des Tetracyclinaktivators (rtTA3) exprimiert. In Abhängigkeit von Doxyzyklin bindet rtTA3 an ein TRE2 Element, wodurch die Vac14 shRNA gemeinsam mit dem Reporter gen RFP (*red fluorescence protein*) abgelesen und exprimiert wird. Dieses ermöglicht die visuelle Überprüfung des Knockdowns. Nach Meerbrey et al. (52). **(B) Proteinbiochemische Bestätigung des Knockdowns.** Vac14 ist in den mit Doxyzyklin stimulierten Podozyten schwächer exprimiert. dsRed ist nur in Podozyten mit Vac14-Knockdown durch Doxyzyklin nachweisbar. **(C) Quantifizierung des Knockdowns.** Vac14 ist in den mit Doxyzyklin behandelten Podozyten um durchschnittlich 52% runterreguliert. **(D-F) Immunfluoreszenzmikroskopische Bestätigung des Knockdowns.** Wird dem Medium kein Doxyzyklin zugefügt, so exprimieren die Podozyten kein RFP und das Vac14-Level bleibt unbeeinflusst. **(G-I)** Nachdem die Podozyten fünf Tage mit Doxyzyklin stimuliert wurden, ist eine hohe Expression des Reporterproteins RFP zu beobachten. Gleichzeitig ist Vac14 in diesen Zellen runterreguliert. *: $p < 0,05$

Die Podozyten wurden in jeweils drei Ansätzen mit und ohne Doxzyklin für fünf Tage kultiviert, um einen Knockdown durch Doxzyklin zu gewährleisten. Wie im ersten Experiment (4.1) löst die reduzierte Vac14-Expression allein keine Vakuolisierung aus, da in keinem Well eine Vakuolisierung ohne die Zugabe von Ammoniumchlorid zu beobachten war (vgl. Abb. 8 E und H).

Im Anschluss wurden die Podozyten mit und ohne Knockdown mit Ammoniumchlorid stimuliert, wobei NH_4Cl erneut für 24 Stunden auf den Zellen belassen wurde. In Anlehnung an 4.1 musste auch hier zunächst eine optimale Konzentration von Ammoniumchlorid ermittelt werden. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von $150\mu\text{M}$ die größten Differenzen hinsichtlich des Vakuolisierungsverhaltens erzeugte (Daten hier nicht gezeigt). Nach einer, nach vier und nach 24 Stunden wurden die Zellen mikroskopiert, um den Verlauf der Veränderungen in den Zellen zeitlich nachverfolgen zu können (s. Tab. 3 für totale Zahlen).

Um zunächst einen Überblick über die Auswirkung von Ammoniumchlorid auf die Podozyten zu erhalten, wurde der Anteil an vakuolisierten Zellen von allen Zellenermittelt. Die Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression zeigen zu allen drei Zeitpunkten mehr vakuolisierte Zellen als jene mit endogen unverändertem Vac14-Level. Hierbei ist der deutlichste Unterschied nach einer Stunde zu erkennen; über einen Zeitraum von 24 Stunden gleichen sich die Anteile an vakuolisierten Zellen an (s. Abb. 9).

Podozyten, in denen Vac14 runterreguliert ist, vakuolisieren demnach schneller und mehr als ihre Pendanten mit endogenem Vac14-Level. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen des ersten Experiments (4.1), bei dem ebenfalls die Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression schneller und mehr Vakuolen bilden.

Tab. 3: Ergebnisse des Ammoniumchloridversuchs im pINDUCER-System.

Zu drei Zeitpunkten (1h, 4h, 24h nach Zugabe von 150µM NH₄Cl) wurden in jeweils drei Ansätzen für Podozyten ohne und mit Vac14-Knockdown (minus bzw. plus Dox) folgende Parameter ausgewertet: die gesamte Zellzahl (n), der Anteil an vakuolisierten Zellen (absolut und in Prozent der Gesamtzellzahl), und zusätzlich nach 24h die Vakuolengröße in Podozyten mit der Einteilung in kleine, mittelgroße und große Vakuolen (<3µm, 3-5µm, >5µm).

Inkubationszeit von NH ₄ Cl (150µM) und Dox	Zellzahl gesamt (n)	davon vakuolisiert		kleine Vakuolen	mittelgroße Vakuolen	große Vakuolen
		abs.	%			
1h minus Dox	115	61	58,1	-	-	-
	160	71	44,4			
	155	92	59,4			
gesamt	430	224	54,0			
1h plus Dox	238	148	62,2	-	-	-
	213	136	63,8			
	157	114	72,6			
gesamt	608	408	66,2			
4h minus Dox	187	129	69,0	-	-	-
	162	110	67,9			
	185	131	70,8			
gesamt	534	370	69,2			
4h plus Dox	263	208	78,4	-	-	-
	199	156	71,3			
	143	102	79,1			
gesamt	605	466	76,3			
24h minus Dox	164	161	98,8	92	57	12
	188	179	95,2	128	45	6
	201	195	97,0	120	62	13
gesamt	553	535	97,0	340	164	31
24h plus Dox	170	170	100	91	73	6
	169	163	96,4	55	86	22
	140	138	98,6	30	87	21
gesamt	479	471	98,3	176	246	49

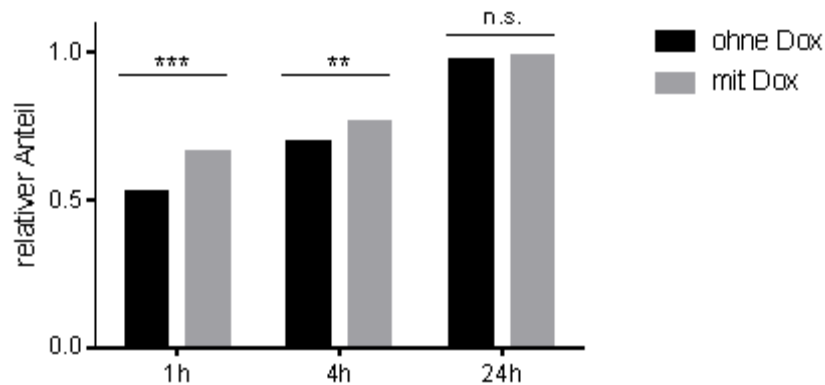


Abb. 9: Bestimmung des Anteils von vakuolisierten Zellen. Nach einer Stunde zeigen 52.3% der Podozyten ohne und 66.2% mit Vac14-Knockdown intrazelluläre Vakuolen. Die Differenz wird mit der Zeit geringer: nach vier Stunden sind 69,2% bzw. 76,3% vakuolisiert, nach 24 Stunden 97% und 98,3% (je angegeben für Podozyten ohne bzw. mit Doxyzyklin). Chi-Quadrat-Test ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; n.s.: $p \geq 0,05$

Um herauszufinden, ob es nicht nur Unterschiede im Anteil der vakuolisierten Zellen, sondern auch hinsichtlich der Vakuolengröße gibt, wurden die Vakuolen vermessen. Hierbei wurden nur die Zellen mit einer NH_4Cl Stimulation von 24 Stunden analysiert, da die Vakuolen der Zellen nach einer und nach vier Stunden überwiegend klein waren und keine Unterscheidung möglich machten. Jede Zelle wurde analog zu 4.1 drei Kategorien zugeordnet: Podozyten mit kleinen, mittelgroßen und großen Vakuolen (mit einem Durchmesser von 1. $< 3\mu\text{m}$, 2. $3-5\mu\text{m}$ und 3. $> 5\mu\text{m}$).

Es zeigte sich, dass Podozyten mit endogen unveränderter Vac14-Expression nach 24 Stunden Inkubationszeit mit NH_4Cl signifikant mehr kleine Vakuolen als Podozyten mit reduzierter Expression bilden. Die Podozyten mit Vac14-Knockdown wiederum entwickeln fast doppelt so viele mittelgroße und große Vakuolen. Demnach haben Vac14-defiziente Podozyten größere Vakuolen (s. Abb. 10 A).

Weiterhin wurde die durchschnittliche Anzahl an mittelgroßen und großen Vakuolen in einer Zelle ermittelt. In den Podozyten ohne Doxyzyklin-Stimulus sind im Schnitt 1,6 mittelgroße und 1,4 große Vakuolen aufzufinden. Podozyten mit Vac14-Knockdown weisen durchschnittlich 2,3 mittelgroße und 1,3 große Vakuolen auf. Die Vac14-defizienten Zellen zeigen also geringfügig weniger große Vakuolen von über $5\mu\text{m}$ im Durchmesser, aber wesentlich mehr mittelgroße Vakuolen mit einem Durchmesser von $3-5\mu\text{m}$ (s. Abb. 10 B).

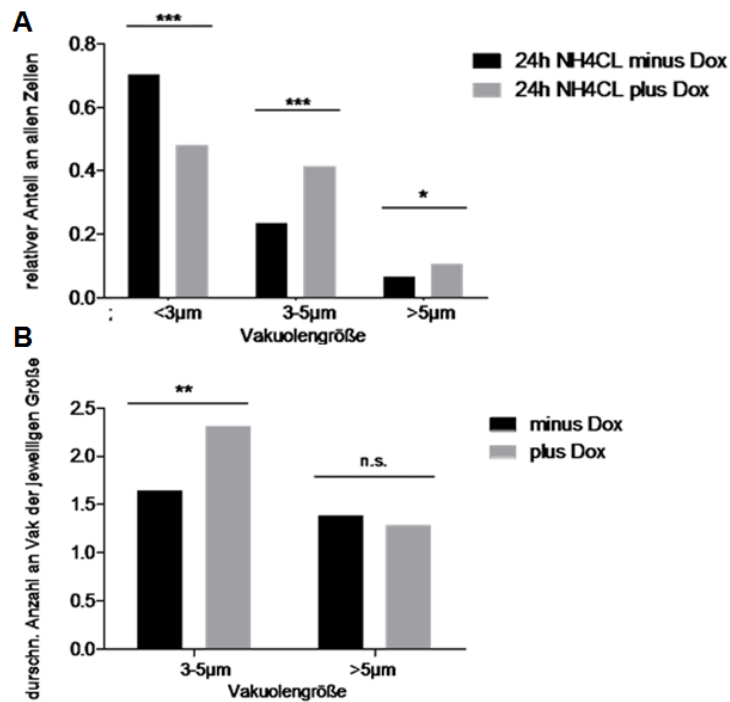


Abb. 10: Statistische Auswertung von Vakuolengröße und Anzahl (mittel)großer Vakuolen. (A) Einteilung der vakuolisierten Zellen in Zellen mit kleinen, mittelgroßen und großen Vakuolen (1. <3µm 2. 3-5µm, 3. >5µm im Durchmesser) nach 24 Stunden Stimulation mit NH₄Cl. (B) Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl an (mittel)großen Vakuolen in den Zellen mit Vakuolen diesen Durchmessers. Chi-Quadrat-Test bzw. t-Test ***: p<0,001; **: p<0,01; *: p<0,05; n.s.: p≥0,05

In einem letzten Schritt wurde die Anzahl an Vakuolen innerhalb jeder Zelle zu allen drei Zeitpunkten bestimmt. Hierzu wurde jede Zelle anhand ihrer Vakuolenanzahl einer von vier Kategorien zugeordnet: 1. keine Vakuolen, 2. wenige (1-4) Vakuolen, 3. viele (5-9) oder 4. sehr viele (≥10) Vakuolen in einer Zelle.

Tab. 4: Vakuolenanzahl nach einer, vier und 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid.

Zu den drei Zeitpunkten (1, 4 und 24 Stunden nach Zugabe von 150µM NH₄Cl) wurde die Anzahl an Vakuolen pro Zelle in den verschiedenen Podozytenlinien (ohne und mit Vac14-Knockdown) bestimmt. Dabei wurde in vier Kategorien unterschieden: 1. Keine Vakuolen, 2. 1-4 Vakuolen pro Zelle (wenige Vakuolen), 3. 5-9 Vakuolen pro Zelle (viele Vakuolen), und Kategorie 4: 10 oder mehr Vakuolen pro Zelle (sehr viele Vakuolen).

Vakuolen pro Zelle	1 Stunde		4 Stunden		24 Stunden	
	- Dox	+ Dox	- Dox	+ Dox	- Dox	+ Dox
0	47,7%	33,8%	30,8%	23,7%	3,0%	1,7%
1-4	40,1%	44,6%	42,0%	37,2%	29,8%	13,7%
5-9	10,5%	14,9%	18,2%	21,0%	37,2%	36,0%
≥10	1,7%	6,7%	9,1%	18,1%	30,0%	48,7%

Nach einer Stunde Inkubationszeit mit NH_4Cl zeigen sich signifikant mehr Podozyten mit unveränderter Vac14-Expression ohne Vakuolen als Podozyten mit Knockdown (s. Abb. 11 A). Unter allen vakuolisierten Zellen hat die Mehrheit beider Ansätze nur wenige Vakuolen. Sehr viele Vakuolen lassen sich in den Podozyten mit Vac14-Knockdown wesentlich häufiger finden.

Beide Ansätze reagieren also nach einer Stunde auf die Zugabe von Ammoniumchlorid mit der Bildung intrazellulärer Vakuolen; die Zellen mit reduzierter Vac14-Expression weisen dabei mehr Vakuolen je Zelle auf (vgl. Tab. 4, 2. Spalte bzw. Abb. 11 A).

Nach insgesamt vier Stunden sind in Podozyten beider Vac14-Level im Vergleich zu einer Stunde wesentlich mehr Vakuolen zu finden, wobei auch hier die Vac14-defizienten Podozyten stärker vakuolisiert sind. So zeigen doppelt so viele Podozyten mit reduzierter Expression von Vac14 sehr viele Vakuolen. Fast ein Drittel der Zellen ohne Doxyzyklin hat gar keine Vakuolen, während weniger als ein Viertel der mit Doxyzyklin stimulierten Podozyten keine Vakuolisierung aufweist.

Nach vier Stunden hat der Anteil an vakuolisierten Podozyten folglich in beiden Ansätzen zugenommen, wobei die Zellen mit Vac14-Knockdown vermehrt sehr viele Vakuolen bilden (vgl. Tab. 4, 3. Spalte bzw. Abb. 11 B).

Nach 24 Stunden sind fast alle Podozyten beider Vac14-Level vakuolisiert. Die Mehrheit der Zellen hat nun viele oder sehr viele Vakuolen ausgebildet, wobei die Podozyten mit reduzierter Vac14- Expression signifikant häufiger sehr stark vakuolisiert sind als jene mit unverändertem Vac14-Level. Die Podozyten ohne Doxyzyklin-Stimulation wiederum weisen mehr als doppelt so viele Zellen mit wenigen Vakuolen auf (vgl. Tab. 4, 4. Spalte bzw. Abb.11 C).

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass Podozyten beider Vac14-Expressionslevel umso mehr Vakuolen entwickeln, je länger sie mit Ammoniumchlorid behandelt werden. Die Podozyten mit einer reduzierten Expression von Vac14 sind dabei stets stärker vakuolisiert als die Kontrollzellen.

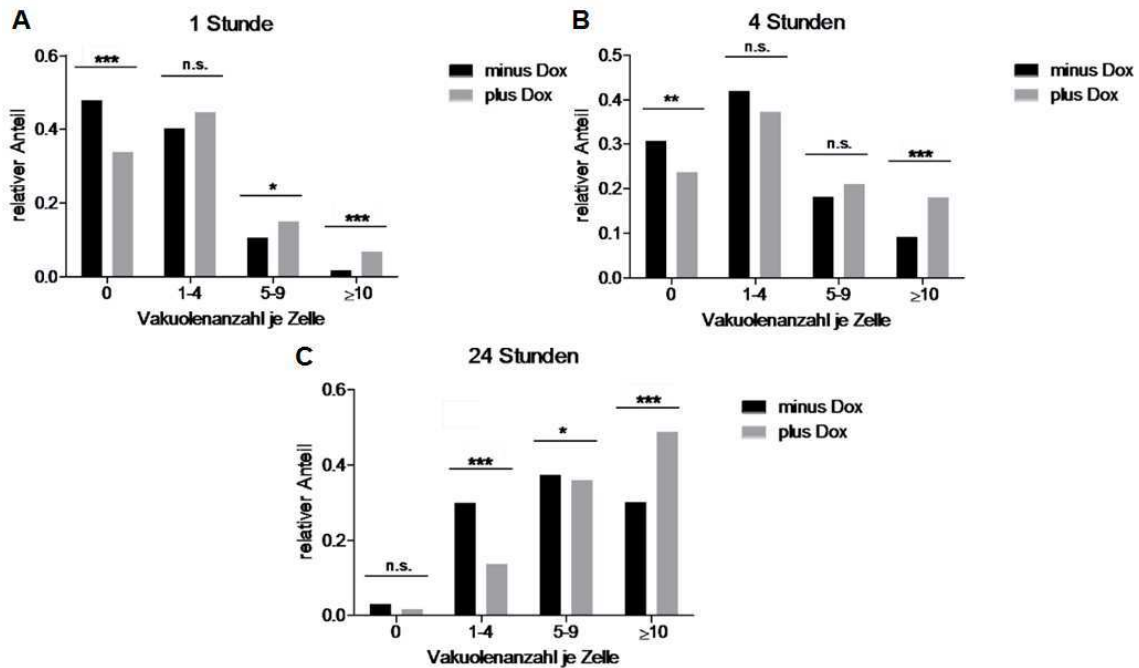


Abb. 11: Statistische Auswertung der Vakuolenanzahl je Zelle zu drei Zeitpunkten. (A) Einteilung aller Podozyten in vier Kategorien anhand der Vakuolenanzahl je Zelle nach einer Stunde Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid. **(B)** Einteilung aller Podozyten in vier Kategorien anhand der Vakuolenanzahl je Zelle, 4 Stunden nach der Zugabe von Ammoniumchlorid. **(C)** Einteilung aller Podozyten in vier Kategorien anhand der Vakuolenanzahl je Zelle, 24 Stunden nach der Zugabe von Ammoniumchlorid. Chi-Quadrat-Test ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; n.s.: $p \geq 0,05$

In diesem Versuch der 24-stündigen Stimulation von Podozyten mit und ohne Vac14-Knockdown mit Ammoniumchlorid konnte beobachtet werden, dass beide Zelltypen zunehmend Vakuolen entwickeln. Die Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression zeigen schneller Vakuolen; nach einer Stunde Inkubationszeit mit NH_4Cl ist die Differenz zwischen beiden Zelltypen am größten, nach 24 Stunden sind vergleichbare Anteile an vakuolisierten Zellen zu finden.

Des Weiteren entwickeln Vac14-defiziente Podozyten signifikant größere Vakuolen nach 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid. Die durchschnittliche Anzahl an mittelgroßen Vakuolen in einer Zelle ist bei den Podozyten mit Vac14-Knockdown ebenfalls erhöht. Kein wesentlicher Unterschied ist bei der durchschnittlichen Anzahl an Vakuolen mit einem Durchmesser von mehr als $5\mu\text{m}$ festzustellen. Betrachtet man die Anzahl an Vakuolen in einer Zelle, so findet sich eine stärkere Vakuolisierung in den Podozyten mit herabgesetzter Vac14-Expression. Hier werden die Differenzen mit der Zeit deutlicher. Nach vier Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid zeigen sich fast doppelt so viele Zellen mit Vac14-

Knockdown mit mindestens 10 Vakuolen pro Zelle. Dieser Unterschied verdeutlicht sich nach 24 Stunden: Mit fast der Hälfte aller Zellen haben signifikant mehr Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression sehr viele Vakuolen gebildet, während mehr als doppelt so viele Zellen ohne Knockdown nur wenige Vakuolen pro Zelle zeigen (vgl. Tab. 4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Vac14-defiziente Podozyten früher, mehr und größere Vakuolen entwickeln.

5. Diskussion

Wie eingangs erwähnt, führt die vollständige Deletion von Fig4 oder Vac14 in Mausmodellen aufgrund einer massiven Vakuolisierung zu einer ausgeprägten Degeneration des neuronalen Systems (28,33). Ebenso zeigen *ingls* Mäuse, bei denen Vac14 durch eine L156R-Mutation PIKfyve nicht mehr binden kann, Vakuolen und Neurodegeneration (25). Diesen Modellen ist gemein, dass die Mäuse aufgrund der neurologischen Defizite nach wenigen Wochen versterben, weshalb die Auswirkung der Deletionen oder Mutationen auf Podozyten in vivo nur begrenzt analysiert werden kann (27). Da Podozyten verschiedene Eigenschaften mit Neuronen teilen und bei einigen Nierenerkrankungen ebenfalls Vakuolen in Podozyten gefunden werden konnten, ist die Vakuolisierung zum Verständnis der Genese bestimmter Nierenerkrankungen von besonderem Interesse (18,53). Auch konnte mit dem INF2 Gen ein Targetgen sowohl für das neurologische CMT-Syndrom als auch für die renale FSGS identifiziert werden (23).

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit in vitro untersucht, ob modifizierte Vac14-Expressionslevel die Anfälligkeit für eine Vakuolisierung von Podozyten erhöhen. Hierfür wurde eine für zellbiologische Fragestellungen etablierte humane Podozytenzelllinie (AB8-Zellen) eingesetzt, in der die endogene Vac14-Expression über zwei verschiedene Knockdownsysteme herunterreguliert wurde (54). Da die Podozyten mit herkömmlichen transienten Expressionssystemen äußerst schwer genetisch zu modifizieren sind, wurden für beide Systeme stabile Zelllinien generiert.

Das pQCXIP-System hat den Vorteil eines stabilen Knockdowns durch die konstitutive Expression von short hairpin RNA, was allerdings eine zweite Zelllinie als Kontrolle erforderlich macht.

Im pINDUCER-Zellsystem kann der Knockdown über modifizierte mikro RNA (miRNA) durch die Zugabe von Doxyzyklin induziert werden. Dies hat den Vorteil, dass die Kontrollzelllinie derselben Population entstammt. Zusätzlich wird das Markerprotein RFP exprimiert, wodurch eine visuelle Bestätigung des Knockdowns möglich ist.

In beiden Ansätzen konnte die Expression von Vac14 signifikant reduziert werden. Diese Reduktion führte jedoch in keinem der Ansätze *per se* zu einer Vakuolisierung der Zellen. Um zu überprüfen, ob die verringerte Vac14-Expression dennoch zu einer erhöhten Anfälligkeit

gegenüber Stress mit der Folge der Bildung von Vakuolen führt, wurden beide Ansätze für 24 Stunden mit Ammoniumchlorid behandelt und die Dynamik der Vakuolisierung analysiert. Hierdurch konnte in den Ansätzen sowohl in den jeweiligen Kontrollzellen mit endogen unveränderter Vac14-Expression als auch in den Vac14-defizienten Podozyten eine Vakuolisierung durch die Zugabe von NH_4Cl beobachtet werden.

Interessanterweise entwickelten die Podozyten mit reduzierter Vac14-Expression hierbei in beiden Zellsystemen schneller, größere und mehr Vakuolen im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollzellen.

Im pQCXIP-Zellsystem war die Expression von Vac14 um bis zu 78% reduziert. Hier war eine NH_4Cl -Konzentration von $50\mu\text{M}$ ausreichend, um Vakuolen zu induzieren. Der Anteil an vakuolisierten Podozyten mit konstitutiv verringerter Vac14-Expression (sh6) war zu jeder Zeit höher als jener der Kontrollzellen und stieg im Verlauf des Versuchs weiter an, während in den Kontrollzellen keine weitere Zunahme an vakuolisierten Zellen (sh5) bzw. sogar eine Regeneration der Zellen (WT) mit einem Rückgang der Vakuolen beobachtet werden konnte. Nach 24 Stunden zeigten die Vac14-defizienten Podozyten außerdem wesentlich größere und signifikant mehr dieser großen Vakuolen als die Kontrollzellen.

Im pINDUCER-Zellsystem musste eine höhere Konzentration von Ammoniumchlorid ($150\mu\text{M}$) gewählt werden, um Vakuolen zu induzieren. Hier war die Vac14-Expression nach der Zugabe von Doxzyklin um durchschnittlich 52% reduziert. Auch in diesem zweiten Zellsystem waren stets mehr Vac14-defiziente Podozyten vakuolisiert als die Kontrollzellen ohne Doxzyklinstimulus. Hierbei waren die Podozyten mit verringerter Vac14-Expression wesentlich schneller vakuolisiert, die Differenz verringerte sich im Verlauf des Versuches. Die Vakuolen waren ebenfalls größer, wenn die Podozyten eine erniedrigte Vac14-Expression aufwiesen, obwohl der Unterschied nicht so deutlich wie im anderen Ansatz war. Aus diesem Grund wurde hier in einem letzten Schritt die Anzahl an Vakuolen in jeder Zelle bestimmt, wobei die Vac14-defizienten Podozyten signifikant mehr Vakuolen je Zelle zeigten.

Die Ergebnisse in beiden Zellsystemen deuten darauf hin, dass das Expressionslevel von Vac14 die Anfälligkeit der Podozyten gegenüber Milieuänderungen beeinflusst. Diese Überlegung deckt sich mit den Ergebnissen von Shisheva et al. (49), die gezeigt haben, dass HEK293-Zellen mit einem Vac14-Knockdown ebenfalls empfindlicher auf schwache Basen wie Ammoniumchlorid reagieren und Vakuolen ausbilden. Hier konnte festgestellt werden, dass

eine gravierende Reduktion der Vac14-Expression zu einer vergleichsweise geringen Reduktion der PI(3,5)P₂-Level führt, die eine mögliche Ursache für den zunächst unauffälligen Phänotyp der Zellen darstellt.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass nicht nur das Vac14-Level von Bedeutung für die Genese von Vakuolen ist, sondern auch die regelrechte Synthese von PI(3,5)P₂ sowie andere Proteine, deren Funktionen über den Vac14-Komplex und PI(3,5)P₂ reguliert werden.

5.1 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien

In diesem Zusammenhang ist die H⁺-Ionenpumpe V-ATPase von besonderem Interesse, die u.a. für die Ansäuerung der Endolysosomen zuständig ist. So konnte bereits, wie eingangs erwähnt, von Li et al. (43) gezeigt werden, dass PI(3,5)P₂ die Interaktion der beiden Domänen (V_o und V₁) stabilisiert und die Funktion der ATPase sicherstellt. Eine Deletion von Fig4 oder Vac14, mit der daraus resultierenden Depletion von PI(3,5)P₂, bewirkt damit eine verminderte Aktivität der H⁺-Ionenpumpe und zeigt sich in mangelhaft angesäuerten Vakuolen. Zudem konnten Schulze et al. zeigen, dass Vac14 mit der V₁-Untereinheit der V-ATPase direkt interagiert (48). In Zukunft wäre daher eine genauere Analyse der Interaktion zwischen der V-ATPase und Vac14 bzw. PI(3,5)P₂ im Hinblick auf die Vakuolenentstehung und -morphologie von Bedeutung.

Oshima et al. (55) konnten bereits zeigen, dass der V-ATPase für die Morphologie und Integrität der Podozyten eine große Bedeutung zukommt. Der Knockout des Prorenin-Rezeptors führt in Mausmodellen in wenigen Wochen zu letalem, massiv proteinurischem Nierenversagen. Die Podozyten zeigen *foot process effacement* und eine verringerte Expression von Schlitzmembranproteinen. Ursächlich hierfür ist unter anderem eine mangelhafte Expression der V-ATPase Untereinheit V_o, was zu Störungen des intrazellulären Vesikeltransports und mangelhaft angesäuerten Vakuolen führt.

Interessanterweise konnte außerdem gezeigt werden, dass verschiedene Amine, z.B. das Lokalanästhetikum Lidocain, das Antiarrhythmikum Procainamid oder das Antimalariamittel Chloroquin, die wie Ammoniumchlorid als schwache Basen fungieren, ebenfalls Vakuolen induzieren und in diesen Vakuolen akkumulieren. Die Vakuolisierung kann durch die Zugabe des V-ATPase-Inhibitors Bafilomycin A1 gehemmt werden. Somit ist ein Angriffspunkt dieser Medikamente in der Zelle ebenfalls die H⁺-Ionenpumpe V-ATPase (56,57). Viele dieser

Medikamente werden renal eliminiert, wodurch insbesondere die Niere den Einflüssen der Medikamente ausgesetzt ist (58). Fraglich ist, ob der Durchsatz solcher Medikamente die Funktionen der Podozyten oder anderer Zellpopulationen in der Niere beeinträchtigt. Ein genaueres Verständnis über die Bedeutung der V-ATPase für die Vakuolisierung könnte möglicherweise auch die Kenntnisse über bestimmte Nierenerkrankungen erweitern.

Das Vac14-Expressionslevel war im ersten Ansatz auf weniger als ein Viertel reduziert (vgl. 4.1), während fast die Hälfte des endogenen Vac14-Levels im zweiten Ansatz erreicht wurde (vgl. 4.2). Die Ergebnisse der Podozyten mit einem stabilen Vac14-Knockdown waren trotz geringerer NH_4Cl -Konzentrationen ausgeprägter als die der induzierbaren Podozyten. Die Höhe des verbliebenen Expressionslevels von Vac14 könnte demnach zusätzlich zur ohnehin durch den Knockdown erhöhten Anfälligkeit gegenüber Milieuänderungen beitragen.

5.2 Offene Fragen für zukünftige Untersuchungen

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Generierung weiterer Zelllinien mit verschiedenen Vac14-Expressionslevel, um Aufschluss darüber zu erlangen, wie verschiedene Expressionslevel welche Veränderungen der Zellmorphologie bewirken. So könnte erarbeitet werden, ab welcher Reduktion es überhaupt zu einer Vakuolisierung der Zellen kommt und um wieviel die Vac14-Expression vermindert werden muss, um denselben Phänotyp wie bei einer Deletion von Vac14 zu erhalten (also eine Vakuolisierung ohne die Zugabe von Ammoniumchlorid oder ähnlichen Substanzen).

In diesem Rahmen wäre außerdem wichtig zu untersuchen, inwieweit die $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ -Konzentration eine Rolle in der durch Ammoniumchlorid induzierten Vakuolisierung von Vac14-defizienten Podozyten spielt, um eine direkte Kausalität herzustellen oder andere, bislang unbekannte Faktoren zu identifizieren. Diese Überlegungen schließen die Analyse von Expressionsänderungen der Komponenten des Vac14-Komplexes, v.a. PIKfyve und Fig4, mit ein. So ist bereits bekannt, dass *Vac14*^{-/-} Mäuse ebenfalls ein erniedrigtes Level von Fig4 aufweisen (59). Fraglich ist, ob auch eine Vac14-Defizienz zu einer verringerten Expression der Komplexpartner führt oder ob es eine Störung in der Zusammenlagerung des Komplexes gibt.

Der Vac14-Komplex ist, wie bereits erwähnt, über seine Regulation des $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ -Levels für endolysosomale und Autophagozytose-assoziierte Reifungsprozesse essenziell (36,40). Durch

die Deletion oder Inaktivierung eines der Komplexkomponenten kann das Gleichgewicht der Phosphatidylinositol-Phosphate nicht aufrechterhalten werden. So konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der 3-Kinase *Vacuolar protein sorting 34* (mVps34) in Podozyten nicht nur zu einem Substratmangel der 5-Kinase PIKfyve führt, sondern auch irreversibel ihre Funktion hemmt (60). Damit einher gehen Störungen der lysosomalen und autophagozytären Trafficking-Prozesse mit Vakuolisierung, was in Mausmodellen in wenigen Wochen zu Proteinurie, *foot process effacement* und letztlich zu letaler Glomerulosklerose führt (61,62).

Kürzlich ist die Bedeutung von Fig4 im Rahmen einer lysosomalen Speichererkrankung diskutiert worden. Eine Deletion der Phosphatase resultiert, wie bereits erwähnt, in der neurologischen Erkrankung Charcot-Marie-Tooth Syndrom 4J. Neue Erkenntnisse zeigen, dass außerdem große Mengen an Lipiden und Proteinen in Lysosomen von Gliazellen und Motoneuronen aufgrund gestörter Trafficking-Prozesse gespeichert werden (63). Ein möglicher Grund hierfür könnte eine mangelnde Aktivierung der TRPML₁-Calciumkanäle sein, wodurch Fissionsvorgänge inhibiert werden könnten (64). Interessant wäre in diesem Rahmen eine genauere Analyse der zellulären Vorgänge, die zu der lysosomalen Speicherstörung führen sowie der Auswirkung einer solchen Störung der Lysosomen auf Podozyten.

Bei Nierenerkrankungen wie der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) konnten ebenfalls große intrazelluläre Vakuolen in Podozyten beobachtet werden (65). Hier ist es sicherlich von großem Interesse, tiefergehende Studien in Podozyten durchzuführen, um diese Vakuolen zu klassifizieren und eventuelle Verbindungen zum Vac14-Proteinkomplex aufzudecken.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in zwei unabhängigen Systemen gezeigt werden, dass ein Knockdown von Vac14 in Podozyten zwar keine Vakuolen induziert, jedoch zu einer erhöhten Anfälligkeit für Vakuolisierung unter Stress führt. Dies zeigt sich in der Behandlung mit einer schwachen Base wie Ammoniumchlorid, wodurch die Vac14-defizienten Zellen früher auftretende, mehr und größere Vakuolen entwickeln als die jeweiligen Kontrollen.

Es konnten bereits einige Mechanismen gefunden werden, die bei einer Störung der Homöostase des Vac14-Komplexes zu einer intrazellulären Vakuolisierung führen. So ist die Funktion der H⁺-Ionenpumpe V-ATPase direkt abhängig von der Stabilisierung der Untereinheiten durch PI(3,5)P₂, dem Substrat des Vac14-Komplexes. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie für die Ansäuerung der Kompartimente essenziell ist. Kommt es zu einem

Funktionsverlust durch die Deletion oder Mutation eines der Komplexkomponenten Vac14, Fig4 oder PIKfyve, so akkumulieren mangelhaft angesäuerte Vakuolen in der Zelle, die auf eine Störung der endolysosomalen und autophagozytären Trafficking-Prozesse zurückzuführen sind. Wird die Expression einer der Untereinheiten inhibiert, wie durch die Deletion des Proreninrezeptors, so entwickeln Mäuse nach kurzer Zeit ein letales Nierenversagen mit *foot process effacement* der Podozyten. Auch eine Deletion der 3-Kinase mVps34 führt zur Vakuolisierung und in Mäusen in wenigen Wochen zu Nierenversagen mit letalem Ausgang.

Weitere Studien werden nötig sein, um einen tieferen Einblick in die zellulären Vorgänge zu erhalten und damit das Verständnis der Genese von Nierenerkrankungen sowie von möglichen Therapieoptionen zu erweitern.

6. Literaturverzeichnis

1. Klinker R, Pape H-C, Silbernagl S. Physiologie. 6. Auflage ed. Thieme, 2009, 944 p
2. Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development* 2008, 135: 609-20
3. Siegenthaler W, Blum H. Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage ed. Thieme, 2006, 1232 p
4. el Bakkali L, Pereira R, Kuik D, Ket J, van Wijk J. Nephrotic syndrome in the Netherlands: a population-based cohort study and a review of the literature. *Pediatr Nephrol.* 2011, 26(8): 1241-6
5. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 2007, 71, 1205-14
6. Weide T, Huber T. Signaling at the Slit: Podocytes Chat by Synaptic Transmission. *J Am Soc Nephrol.* 2009, 20: 1862-4
7. Greka A, Mundel P. Cell Biology and Pathology of Podocytes. *Annu Rev Physiol.* 2012, 74: 299-323
8. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003, 83: 253-307
9. Jefferson JA, Alpers C, Shankland S. Podocyte Biology for the Bedside. *Am J Kidney Dis.* 2011, 58(5): 835-45
10. Lee DB, Huang E, Ward HJ. Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006, 290(1):20-34
11. Menzel S, Moeller MJ. Role of the podocyte in proteinuria. *Pediatr Nephrol.* 2011, 26(10): 1775-80
12. Jaffer AT, Ahmed WU, Raju DS, Jahan P. Foothold of NPHS2 mutations in primary nephrotic syndrome. *J Postgrad Med.* 2011, 57(4):314-20
13. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol.* 2015, 209(2):199-210
14. Saleem MA. 100 ways to kill a podocyte. *Nephrol Dial Transplant* 2015 pii: gfu363
15. Cheng H, Harris RC. The glomerulus- a view from the outside- the podocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010, 42(9): 1380-7
16. Yu ZH, Wang DJ, Meng DC, Huang J, Nie XJ. Mutations in NPHS1 in a Chinese child with congenital nephrotic syndrome. *Genet Mol Res.* 2012, 18;11(2):1460-4

17. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2013, 304(4): 333-47
18. Wada Y. Vacuoles in mammals: a subcellular structure indispensable for early embryogenesis. *Bioarchitecture* 2013, 3:13-9
19. Berciano J, Calleja J, Combarros O. Charcot-Marie-Tooth disease, *Neurology* 1994, 44:1985-6
20. Juarez P, Palau F. Neural and Molecular Features on Charcot-Marie-Tooth Disease Plasticity and Therapy. *Neural Plast.* 2012, 171636 doi: 10.1155/2012/171636
21. Nadal MA, Lago NR, Olivieri LE, de Rosa G, Pierri T. Fibrillary glomerulonephritis and Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Kidney Dis.* 1998, 32(5)
22. Baloch UT, Kiani IG, Butt GU, Masroor I, Khan SJ, Badshah M. Nephritis and Charcot-Marie-Tooth disease: an unusual association. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2012, 22(4):255-7
23. Boyer O, Nevo F, Plaisier E, Funalot B, Gribouval O, Benoit G, Huynh Cong E, Arrondel C, Tête MJ, Montjean R, Richard L, Karras A, Pouteil-Noble C, Balafrej L, Bonnardeaux A, Canaud G, Charasse C, Dantal J, Deschenes G, Deteix P, Dubourg O, Petiot P, Pouthier D, Leguern E, Guiochon-Mantel A, Broutin I, Gubler MC, Saunier S, Ronco P, Vallat JM, Alonso MA, Antignac C, Mollet G. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med.* 2011, 365(25):2377-88
24. Lenk GM, Ferguson CJ, Chow CY, Jin N, Jones JM. Pathogenic Mechanism of the FIG4 Mutation Responsible for Charcot-Marie-Tooth Disease CMT4J. *PLoS Genet* 2011, 7(6)
25. Jin N, Chow CY, Liu L, Zolov SN, Bronson R, Davisson M, Petersen JL, Zhang Y, Park S, Duex J, Goldowitz D, Meisler MH, Weisman LS. VAC14 nucleates a protein complex essential for the acute interconversion of PI3P and PI(3,5)P2 in yeast and mouse. *The EMBO Journal* 2008, 27: 3221-34
26. Ferguson CJ, Lenk GM, Meisler MH. Defective autophagy in neurons and astrocytes from mice deficient in PI(3,5)P2. *Hum Mol Genet* 2009, 18: 4868-78
27. Ferguson CJ, Lenk GM, Meisler MH. PtdIns(3,5)P2 and autophagy in mouse models of neurodegeneration. *Autophagy* 2010, 6(1):170-1
28. Zolov SN, Bridges D, Zhang Y, Lee WW, Riehle E, Verma R, Lenk GM, Converso-Baran K, Weide T, Albin RL, Saltiel AR, Meisler MH, Russell MW, Weisman LS. In vivo, Pikfyve generates PI(3,5)P2, which serves as both a signaling lipid and the major precursor for PI5P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012, 109(43):17472-7

29. Lenk GM, Meisler MH. Mouse models of PI(3,5)P₂ deficiency with impaired lysosome function. *Methods Enzymol.* 2014, 534:245-60
30. Alghamdi TA, Ho CY, Mrakovic A, Taylor D, Mao D, Botelho RJ. Vac14 Protein Multimerization Is a Prerequisite Step for Fab1 Protein Complex Assembly and Function. *J Biol Chem.* 2013, 288(13):9363-72
31. Sbrissa D, Ikononov OC, Fenner H, Shisheva A. ArPIKfyve homomeric and heteromeric interactions scaffold PIKfyve and Sac3 in a complex to promote PIKfyve activity and functionality. *J Mol Biol* 2008, 384: 766-79
32. Dove SK, Dong K, Kobayashi T, Williams FK, Michell RH. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and Fab1p/PIKfyve under PPI_n endolysosome function. *Biochem J* 2009, 419: 1-13
33. Zhang Y, McCartney AJ, Zolov SN, Ferguson CJ, Meisler MH, Sutton MA, Weisman LS. Modulation of synaptic function by VAC14, a protein that regulates the phosphoinositides PI(3,5)P₂ and PI(5)P. *The EMBO Journal* 2012, 31: 3442-56
34. Lartigue J, Polson H, Feldman M, Shokat K, Tooze SA, Urbe S, Clague MJ. PIKfyve Regulation of Endosome-Linked Pathways. *Traffic* 2009, 10: 883-93
35. Michell RH, Dove SK. A protein complex that regulates PtdIns(3,5)P₂ levels. *The EMBO Journal* 2009, 28: 86-7
36. Ho CY, Alghamdi TA, Botelho RJ. Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphate: No Longer the Poor PIP₂. *Traffic* 2008, 13: 1-8:21165-70
37. Li X, Wang X, Zhang X, Zhao M, Tsang WL, Zhang Y, Yau RG, Weisman LS, Xu H. Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110(52): 21165-70
38. Hay JC. Calcium: a fundamental regulator of intracellular membrane fusion? *EMBO Rep.* 2007, 8(3):236-40
39. Dong XP, Shen D, Wang X, Dawson T, Li X, Zhang Q, Cheng X, Zhang Y, Weisman LS, Delling M, Xu H. PI(3,5)P₂ controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nat Commun.*, 2010, 1:38
40. Chen J, Chen MX, Fogo AB, Harris RC, Chen JK. mVps34 deletion in podocytes causes glomerulosclerosis by disrupting intracellular vesicle trafficking. *J Am Soc Nephrol.* 2013, 24:198-207

41. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007, 17:428-37
42. Dove SK, Piper RC, McEwen RK, Yu JW, King MC, Hughes DC, Thuring J, Holmes AB, Cooke FT, Michell RH, Parker PJ, Lemmon MA. Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. *EMBO J.* 2004, 23(9):1922-33
43. Dove SK, Dong K, Kobayashi T, Williams FK, Michell RH. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and Fab1p/PIKfyve under PPI_n endolysosome function. *Biochem J.* 2009, 419(1):1-13
44. Baars TL, Petri S, Peters C, Mayer A. Role of the V-ATPase in regulation of the vacuolar fission-fusion equilibrium. *Mol Biol Cell.* 2007, 18(10):3873-82
45. Li SC, Diakov TT, Xu T, Tarsio T, Zhu W, Couoh-Cardel S, Weisman LS, Kane PM. The signaling lipid PI(3,5)P₂ stabilizes V₁-V(o) sector interactions and activates the V-ATPase. *Mol Biol Cell.* 2014, 25(8):1251-62
46. Toth T, Takebayashi S. Glomerular podocyte vacuolation in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Nephron* 1992, 61:16-20
47. Yoshikawa N, Ito H, Akamatsu R. Glomerular podocyte vacuolation in focal segmental glomerulosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1986, 110:394-8
48. Schulze U, Vollenbröcker B, Braun DA, Van Le T, Granado D, Kremerskothen J, Fränzel B, Klosowski R, Barth J, Fufezan C, Wolters DA, Pavenstädt H, Weide T. The Vac14-interaction network is linked to regulators of the endolysosomal and autophagic pathway. *Mol Cell Proteomics* 2014, 13(6):1397-411
49. Sbrissa D, Ikononov OC, Strakova J, Dondapati R, Mlak K, Deeb R, Silver R, Shisheva A. A mammalian ortholog of *Saccharomyces cerevisiae* Vac14 that associates with and up-regulates PIKfyvephosphoinositide 5-kinase activity. *Mol Cell Biol.* 2004, 23:10437-47
50. Wu MM, Llopis J, Adams S, McCaffery JM, Kulomaa MS, Machen TE, Moore HP, Tsien RY. Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem. Biol.* 2000, 7:197-209
51. Sobota JA, Ferraro F, Back N, Eipper BA, Mains RE. Not all secretory granules are created equal: partitioning of soluble content proteins. *Mol. Biol. Cell* 2006, 17: 5038-52
52. Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, Roarty K, Li MZ, Fang JE, Herschkowitz JI, Burrows AE, Ciccia A, Sun T, Schmitt EM, Bernardi RJ, Fu X, Bland CS, Cooper TA, Schiff R, Rosen JM,

- Westbrook TF, Elledge SJ. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, 108: 3665-70
53. Kobayashi N. Mechanism of the process formation; podocytes vs. neurons. *Microsc Res Tech.* 2002, 57(4):217-23
 54. Duning K, Schurek EM, Schlüter M, Bayer M, Reinhardt HC, Schwab A, Schaefer L, Benzing T, Schermer B, Saleem MA, Huber TB, Bachmann S, Kremerskothen J, Weide T, Pavenstädt H. KIBRA Modulates Directional Migration of Podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2008, 19(10):1891-903
 55. Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Bokuda A, Narita T, Kurosawa H, Sun-Wada K, Wada Y, Yamada T, Takemoto M, Saleem MA, Quaggin SE, Itoh H. Prorenin Receptor Is Essential for Normal Podocyte Structure and Function. *J Am Soc Nephrol* 2012, 22: 2203-12
 56. Marceau F, Bawolak MT, Lodge R, Bouthillier J, Gagné-Henley A, Gaudreault RC, Morissette G. Cation trapping by cellular acidic compartments: beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012, 259(1):1-12
 57. Morissette G, Moreau E, C-Gaudreault R, Marceau F. Massive cell vacuolization induced by organic amines such as procainamide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002, 310(1):395-406
 58. Aktories K, Förstermann U, Hoffmann FB, Starke S. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 11. Auflage, ed. Elsevier, 2013, 1216p
 59. McCartney A J, Zhang Y, Weisman LS. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance. *Bioessays.* 2014, 36(1): 52-64
 60. Ikonov OC, Sbrissa D, Venkatareddy M, Tisdale E, Garg P, Shisheva A. Class III PI 3-kinase is the main source of PtdIns3P substrate and membrane recruitment signal for PIKfyve constitutive function in podocyte endomembrane homeostasis. *Prog Neurobiol.* 2013, 101-102: 35-45
 61. Chen J, Chen MX, Fogo AB, Harris RC, Chen JK. mVps34 Deletion in Podocytes Causes Glomerulosclerosis by Disrupting Intracellular Vesicle Trafficking. *J Am Soc Nephrol* 2013, 24: 198-207
 62. Bechtel W, Helmstädter M, Balica J, Hartleben B, Kiefer B, Hrnjic F, Schell C, Kretz O, Liu S, Geist F, Kerjaschki D, Walz G, Huber TB. Vps34 Deficiency Reveals the Importance of Endocytosis for Podocyte Homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2013, 24: 727-43
 63. Martyn C, Li J. Fig4 Deficiency: A Newly Emerged Lysosomal Storage Disorder? *Prog Neurobiol.* 2013, 101-102: 35-45

64. Dove SK, Dong K, Kobayashi T, Williams FK, Michell RH. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and Fab1p/PIKfyve under PPI in endo-lysosome function. *Biochem. J.* 2009, 419:1-13
65. Nitschke R, Henger A, Ricken S, Muller V, Kottgen M, Bek M, Pavenstädt H. Acetylcholine increases the free intracellular calcium concentration in podocytes in intact rat glomeruli via muscarinic M(5) receptors. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12:678-87

7. Lebenslauf

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Pavenstädt für die Vergabe der Dissertation bedanken. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Thomas Weide, der als Betreuer dieser Arbeit sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch beim Verfassen der Dissertation zu jeder Zeit mit vielen Anregungen eine große Unterstützung darstellte. Auch Dr. Ulf Schulze möchte ich für die ständige Hilfe bei der Arbeit im Labor danken. Des Weiteren möchte ich dem gesamten Team der AG Pavenstädt meinen herzlichen Dank für die nette Aufnahme, die stete Hilfsbereitschaft und für die tolle Zusammenarbeit aussprechen.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Arbeit und meines gesamten Studiums immer unterstützt haben.

9. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über einen Glomerulus	2
Abb. 2: Darstellung von Podozyten und der Schlitzmembran	3
Abb. 3: Der Vac14-Proteinkomplex in der Hefezelle	6
Abb. 4: Funktionen des Vac14-Proteinkomplexes	7
Abb. 5: Nachweis des Knockdowns von Vac14 bei sh6	22
Abb. 6: Mikroskopie von Podozyten nach der Stimulation mit Ammoniumchlorid	23
Abb. 7: Auswertung der mit Ammoniumchlorid stimulierten Podozyten	26
Abb. 8: Bestätigung des Vac14-Knockdowns im pINDUCER Systems	27
Abb. 9: Bestimmung des Anteils von vakuolisierten Zellen	29
Abb. 10: Statistische Auswertung von Vakuolengröße und Anzahl (mittel)großer Vakuolen	31
Abb. 11: Statistische Auswertung der Vakuolenanzahl je Zelle zu drei Zeitpunkten	33

Tabellenverzeichnis

Tab. 3: Anteil an vakuolisierten Zellen	24
Tab. 4: Vakuolengröße nach einer und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid	25
Tab. 3: Ergebnisse des Ammoniumchloridversuchs im pINDUCER-System	29
Tab. 4: Vakuolenanzahl nach einer, vier und 24 Stunden Inkubationszeit mit Ammoniumchlorid	31