

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

**β -Arrestin2 interagiert phosphorylierungsabhängig mit Nephrin:
Ein neues, dynamisch reguliertes Modell der glomerulären Schlitzmembran**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Tobias Vinke

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Royer-Pokora

Den Kindern dieser Welt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere	1
1.2 Proteine der glomerulären Schlitzmembran	2
1.2.1 Nephrin	2
1.2.2 Podocin	3
1.2.3 Die NEPH-Familie	4
1.3 β -Arrestin2	5
1.4 Fragestellung	6
2. Methoden	7
2.1 Materialien und Lösungen	7
2.1.1 Zellkultur	7
2.1.2 Transfektion	7
2.1.3 Vektoren/Plasmide	7
2.1.4 Inhibitoren	8
2.1.5 Detergenzien und Puffer	8
2.1.6 Co-Immunopräzipitation	8
2.1.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	8
2.1.8 DNA-Subklonierung	10
2.1.8.1 PCR	10
2.1.8.2 Ligation	10
2.1.8.3 Transformation/Amplifikation	11
2.1.8.4 Minikultur und Minipräparation	11
2.1.8.5 Maxikultur und Maxipräparation	11
2.1.9 Mäuse	12
2.2 Zellkultur	12
2.3 Transfektion	12
2.4 Zellernte	12
2.5 Co-Immunopräzipitation	13
2.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	13
2.7 DNA-Subklonierung	14
2.7.1 PCR	14

2.7.2	Quickchange-Mutagenese	15
2.7.3	Ligation	16
2.7.4	Transformation/Amplifikation	16
2.7.5	Minikultur und Minipräparation	17
2.7.6	Maxikultur und Maxipräparation	17
2.7.7	Sequenzierung	18
2.8	Injektion von PP2/DMSO an Mäusen	18
2.9	Gewinnung von Mäuseurin	19
2.10	Bestimmung von Albumin im Mäuseurin	19
3.	Ergebnisse	20
3.1	β -Arrestin2 wird in Podozyten exprimiert	20
3.2	Nephrin interagiert mit β -Arrestin2	21
3.2.1	Die Nephrin-Domänen 1112-1120 und 1177-1208 sind essentiell für die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung	22
3.3	Phosphorylierung reguliert die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung	26
3.3.1	Nephrin Y1193 als Regulationsstelle für die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung	29
3.4	Podocin interagiert mit Nephrin an der Regulationsstelle der Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung	30
3.4.1	Podocin als funktioneller Antagonist von β -Arrestin2	31
3.5	PP2 führt in vivo zu einer erhöhten Albuminurie	32
4.	Diskussion	35
5.	Zusammenfassung	39
6.	Abkürzungen	41
7.	Literaturverzeichnis	42
8.	Publikationsliste	51
9.	Lebenslauf	52

1. Einleitung

1.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Eine wesentliche Hauptfunktion der Niere besteht in der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen aus dem Blut. Diese Aufgabe wird von den Nephronen erfüllt, von denen jede Niere ca. eine Million besitzt. Nephronen bestehen aus einem kapillaren Gefäßknäuel, dem Glomerulus, welches von der Bowmanschen Kapsel umgeben ist und den proximalen Teil des Nephrons darstellt, sowie aus dem nachgeschalteten Tubulussystem.

Jeden Tag werden ca. 180 Liter eines fast eiweißfreien Primärharns in den Glomeruli abgepresst und im Tubulussystem zum größten Teil rückresorbiert, so dass die tägliche Harnausscheidung normalerweise nur 1-1,5 Liter beträgt.

Die Glomeruli sind der Ort der Ultrafiltration und aus drei Schichten aufgebaut: Dem fenestrierten glomerulären Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den interdigitierenden Fußfortsätzen der viszeralen Epithelzellen des Glomerulus, der Podozyten.

Die glomeruläre Basalmembran ist eine amorphe, 300-350 nm dicke extrazelluläre Schicht, und besteht hauptsächlich aus den Komponenten Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und den Proteoglykanen Agrin und Perlecan. Durch das Kollagen Typ IV bildet sich ein kreuzvernetztes Netzwerk, an dem die anderen Komponenten sich anheften und ein dichtes, stark vernetztes makromolekulares Maschenwerk entsteht (Caulfield et al., 1976; Hudson et al., 1993; Kanwar and Farquhar, 1979; Tryggvason et al., 1999; Yurchenco and O'Rear, 1994).

Podozyten sind viszerale Epithelzellen auf der Harnseite des Glomerulus. Sie bestehen aus einem Zellkörper und Primärfortsätzen, welche sich wiederum in Sekundärfortsätze verzweigen. Die Sekundärfortsätze umgreifen die glomerulären Kapillarschlingen, interdigitieren mit den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten und bilden so ein dichtes Netzwerk um die Kapillarschlingen des Glomerulus (Pavenstadt, 1998). Die einander angrenzenden Fußfortsätze werden durch eine dünne, elektronendichte Membran, der glomerulären Schlitzmembran, überbrückt, deren Schlitze eine Weite von 30-40 nm besitzen (Rodewald and Karnovsky, 1974). Sie unterteilt die podozytäre Zellmembran in einen basalen und einen luminalen Abschnitt. Die luminale Zellmembran ist von einer dicken Glykokalix überzogen, die in hoher Konzentration Sialoglykoproteine, insbesondere Podocalyxin und

Podoendin, enthält, welche für die anionische Oberflächenladung der Podozyten verantwortlich sind (Huang and Langlois, 1985; Kerjaschki et al., 1984; Michael et al., 1970; Sawada et al., 1986).

Bereits 1974 entwickelten Rodewald und Karnovsky mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen ein Modell der glomerulären Schlitzmembran, nach dem sich die Schlitzmembran aus einer reißverschlussartigen Anordnung von stabähnlichen Untereinheiten zusammensetzt, dessen Poren minimal kleiner sind als ein Albuminmolekül.

Auch wenn dieses Modell sicherlich als zu einfach angesehen werden kann, so geht man momentan davon aus, dass der Schlitzmembran die entscheidende Rolle bei der Größenselektivität zugeschrieben wird. Hingegen zeichnen sich für die Ladungselektivität, wodurch negativ geladene Proteine nur in geringen Mengen filtriert werden, sowohl Endothel, GBM als auch die Schlitzmembran verantwortlich (Daniels et al., 1993; Drumond and Deen, 1994).

So durchdringt das Ultrafiltrat zunächst das fenestrierte Kapillarendothel, daraufhin die GBM und schließlich die Schlitzmembran, um auf der Harnseite anzukommen.

1.2 Proteine der glomerulären Schlitzmembran

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die für die strukturelle Integrität der glomerulären Schlitzmembran wichtig zu sein scheinen.

Zu den ersten identifizierten Proteinen der glomerulären Schlitzmembran gehörte Nephrin, welches im *NPHS1*-Gen kodiert ist. Mutationen in diesem Gen führen zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ (Kestila et al., 1998). Basierend auf Größe und Struktur von Nephrin geht man seither davon aus, dass die glomeruläre Schlitzmembran durch Interaktion von Nephrin-Molekülen benachbarter Podozytenfußfortsätze gebildet wird (Tryggvason 1999). Der Entdeckung von Nephrin folgten weitere für die Schlitzmembran relevanten Proteine wie Podocin, NEPH1, NEPH2, CD2AP, ZO-1, FAT1 und P-Cadherin (Donoviel et al., 2001; Gerke et al., 2003; Inoue et al., 2001; Reiser et al., 2000; Roselli et al., 2002; Ruotsalainen et al., 1999; Schnabel et al., 1990; Shih et al., 2001).

1.2.1 Nephrin

Kestila et al. konnten 1998 durch Positionsklonierung das *NPHS1*-Gen identifizieren, welches für das Protein Nephrin kodiert und bei dem Krankheitsbild des kongenitalen nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ mutiert ist (Kestila et al., 1998). Diese Erkrankung wird

autosomal-rezessiv vererbt und führt bereits *in utero* zu einer massiven Proteinurie sowie unbehandelt postnatal rasch zu einer terminalen Niereninsuffizienz und Tod (Huttunen, 1976; Kestila et al., 1998).

Nephrin ist ein 180 kD schweres, transmembranäres Protein und gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Es besitzt einen N-terminalen extrazellulären Abschnitt, welcher acht Immunglobulin-ähnliche Domänen und eine Fibronectin-Typ-III-Domäne enthält, einen transmembranären Abschnitt und einen C-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt.

Die Domänenarchitektur von Nephrin weist darauf hin, dass dieses Protein ein Adhäsionsmolekül ist, welches Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt. Basierend auf dem Modell von Karnovsky und Ainsworth (Karnovsky and Ainsworth, 1972) und dem Nachweis von Nephrin an der glomerulären Schlitzmembran schlug Tryggvason bereits 1999 ein Modell vor, bei dem das Rückgrat der Schlitzmembran durch reißverschlussartige homophile Interaktionen von Nephrin gebildet wird, dessen acht N-terminale Immunglobulin-ähnlichen Motive der extrazellulären Domäne jeweils miteinander interagieren. Mehrere Untersuchungen konnten dies bestätigen (Gerke et al., 2003; Khoshnoodi et al., 2003; Tryggvason, 1999).

Der zytoplasmatische Abschnitt von Nephrin enthält neun Tyrosine mit z.T. hoher Phosphorylierungswahrscheinlichkeit, was für eine Signaltransduktion an der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin spricht (Holthofer et al., 1999; Holzman et al., 1999; Putaala et al., 2000; Ruotsalainen et al., 1999). So konnten Huber et al. 2001 zeigen, dass Nephrin über die MAP-Kinasen p38 und c-jun zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt (Huber et al., 2001).

Als eine wichtige Tyrosinkinase der zytoplasmatischen Nephrin-Phosphorylierung konnte die Src-Kinase Fyn nachgewiesen werden. Die Gendeletion von *Fyn* in Mäusen führt zu einer verminderten Nephrin-Phosphorylierung und ist assoziiert mit einer Verplumpung der podozytären Fußfortsätze und einer Proteinurie (Verma et al., 2003).

Die Expression von Nephrin erfolgt in der Niere ausschließlich in den Podozyten. Zusätzlich konnte eine Nephrin-Expression ebenfalls in den β -Zellen des Pankreas sowie in einigen Regionen des Gehirns nachgewiesen werden (Putaala et al., 2001).

1.2.2 Podocin

Mit Podocin wurde im Jahr 2000 ein weiteres wichtiges Protein der glomerulären Schlitzmembran identifiziert. Das 42 kD schwere Podocin ist im *NPHS2*-Gen kodiert, gehört der Familie der Stomatinproteine an und wird ausschließlich in Podozyten exprimiert.

Mutationen im *NPHS2* führen zu einem frühkindlichen Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom mit fokal segmentaler Glomerulosklerose und rasch fortschreitender Niereninsuffizienz (Boute et al., 2000).

Podocin besitzt eine kurze N-terminale Domäne, eine transmembranäre Domäne und eine zytosolische C-terminale Domäne. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit anderen Proteinen der Stomatinfamilie wird auch für Podocin angenommen, dass sowohl N- als auch C-terminale Domäne im Zytosol liegen, und somit eine Haarnadel-ähnliche Konfiguration vorliegt (Boute et al., 2000).

„Lipid rafts“ sind spezialisierte Mikrodomänen der Plasmamembran mit einer Anreicherung von Signaltransduktionskomponenten (Simons und Toomre, 2000). Von diesen Lipid rafts wird angenommen, dass sie eine Plattform für viele wichtige zelluläre Prozesse bildet, wie z.B. Signaltransduktion und die polarisierte Anordnung von Membranproteinen (Kurzchalia und Parton, 1999; Simons und Ikonen, 1997; Smart et al., 1999). Schwarz et al. konnten nachweisen, dass Podocin ein Lipid raft-assoziiertes Protein der Schlitzmembran ist (Schwarz et al., 2001). Nachdem gezeigt werden konnte, dass Podocin mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin interagiert und für die Nephrin-abhängige Signalübertragung eine wichtige Rolle spielt, gelang schließlich auch der Nachweis, dass Podocin für die Rekrutierung von Nephrin in die Lipid rafts verantwortlich ist (Huber et al., 2001; Huber et al., 2003).

1.2.3 Die NEPH-Familie

Die NEPH-Familie beinhaltet drei transmembranäre Proteine der Immunglobulin-Superfamilie: NEPH1, NEPH2 und NEPH3. Die Expression aller drei Proteine konnte in humanen Podozyten nachgewiesen werden (Sellin et al., 2003). Der extrazelluläre Abschnitt von NEPH1, welcher fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen enthält, interagiert mit Nephrin und bildet Heterodimere, wohingegen der intrazelluläre NEPH1-Abschnitt verantwortlich für eine Interaktion mit Podocin zeichnet. NEPH1-Moleküle interagieren auch miteinander mittels intrazellulärer und extrazellulärer Abschnitte und bilden Homodimere (Barletta et al., 2003; Gerke et al., 2003; Liu et al., 2003). Donoviel et al. zeigten, dass es bei *NEPH1* *-/-* Mäusen zu einer Proteinurie, Verlust der podozytären Fußfortsätze und hoher postnataler Letalität kommt (Donoviel et al., 2001). Daraus lässt sich eine wesentliche Funktion von NEPH1 für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran ableiten.

Ähnlich wie für NEPH1 konnte ebenfalls für NEPH2 sowohl die Bildung von Homodimeren mit anderen NEPH2-Molekülen als auch eine Interaktion von NEPH2 mit dem extrazellulären

Abschnitt von Nephrin nachgewiesen werden (Gerke et al., 2005). Die Rolle von NEPH3, welches auch als KIRREL2 bezeichnet wird, an der glomerulären Schlitzmembran ist bislang noch unklar.

1.3 β -Arrestin2

Die Arrestine bilden eine kleine Genfamilie mit vier Mitgliedern. Während man Arrestin1 und Arrestin4 ausschließlich in den Zapfen und Stäbchen der Retina finden kann, werden Arrestin2 und -3, welche auch als β -Arrestin1 und -2 bezeichnet werden, praktisch in allen Geweben exprimiert (Luttrell and Lefkowitz, 2002).

β -Arrestine interagieren mit den meisten Typ-7-Transmembranrezeptoren nachdem diese von G-Protein-gekoppelten Kinasen (GRKs) phosphoryliert und aktiviert wurden (Shenoy and Lefkowitz, 2003).

Eine wesentliche Funktion der β -Arrestine besteht in einer Desensitivierung dieser Typ-7-Transmembranrezeptoren mittels sterischer Blockierung der Interaktion von Rezeptor und heterotrimeren G-Proteinen. Erstmals konnte dies am adrenergen β -2-Rezeptor gezeigt werden (Attramadal et al., 1992; Benovic et al., 1987; Lohse et al., 1990).

β -Arrestin1 und -2 spielen zudem eine zentrale Rolle zur Vermittlung der Clathrin-abhängigen Endozytose von Typ-7-Transmembranrezeptoren. Die β -Arrestine verhalten sich dabei wie ein Adapter, der Rezeptor und Endozytose-Maschinerie miteinander verbindet. Zu diesen Endozytose-Elementen gehören Clathrin, der Clathrin-Adapter AP2, das kleine G-Protein ARF6, ARNO und NSF (N-Ethyl-maleinimid sensitives Fusionsprotein) (Claing et al., 2001; Goodman et al., 1996; Laporte et al., 1999; McDonald et al., 1999).

In einer weiteren Funktion dienen die β -Arrestine als eine Art Gerüst um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit anderen Signal-vermittelnden Proteinen wie Kinasen der Src-Familie oder der MAP-Kaskade zu verbinden (Luttrell et al., 1999; Perry and Lefkowitz, 2002).

Alle diese Mechanismen regulieren Aspekte der Zellmotilität, Apoptose, Chemotaxis und Signaltransduktion (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Chen et al. konnten erstmals zeigen, dass diese Mechanismen auch für einen Typ-1-Transmembranrezeptor, den TGF- β -III-Rezeptor, zutreffen (Chen et al., 2003).

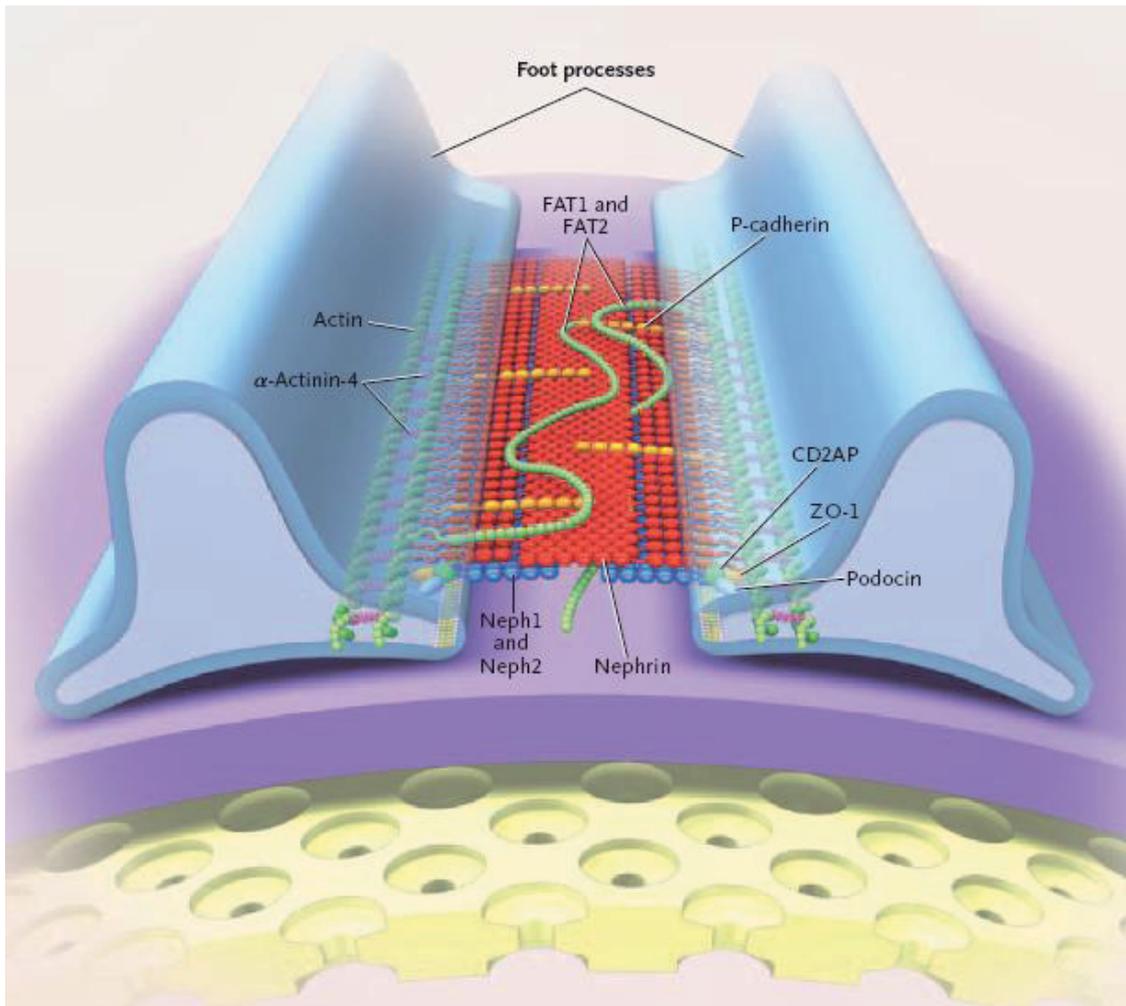


Abb. 1: Der Aufbau der glomerulären Schlitzmembran (Quelle: N Engl J Med 2006, Tryggvason et al.: Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria)

1.4 Fragestellung

Nephrin ist das zentrale Strukturmolekül, welches für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran steht. Bislang konnte noch kein Mechanismus dargelegt werden, der eine dynamische Regulation des Nephrin-Moleküls im Sinne einer Rezeptor-Desensitivierung hinreichend erklärt.

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit geklärt werden:

- 1) Findet eine Protein-Protein-Interaktion zwischen Nephrin und β -Arrestin2 statt?
- 2) Welche Domänen spielen eine Rolle für diese Interaktion und wie wird sie reguliert?
- 3) Was ist die Bedeutung der Interaktion für die glomeruläre Schlitzmembran *in vivo*?
- 4) Bestätigt sich die postulierte antagonistische Funktion von Podocin?

2. Methoden

2.1 Materialien und Lösungen

2.1.1 Zellkultur

HEK 293T-Zellen (Human embryonic kidney)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 4,5 g/l Glucose und mit L-Glutamin und Zusatz von 10 % Kälberserum und Eisen

Trypsin-EDTA mit HBSS ohne Magnesium und Calcium

PBS (Phosphate buffered saline):

136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄

2.1.2 Transfektion

Calciumchlorid 0,25 M

2x HEBS pH 7,05 (HEPES buffered saline):

41,9 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat); 273 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄*H₂O; 11,1 mM Dextrose

2.1.3 Vektoren/Plasmide

cdm.sIg.7 (Surface Immunglobulin Domäne + Transmembrandomäne CD7)

sIg.7.NEPH1

sIg.7.Nephrin

sIg.7.Nephrin 1087-1241

sIg.7.Nephrin 1158-1215

sIg.7.Nephrin 1087-1176

sIg.7.Nephrin 1087-1208

sIg.7.Nephrin 1158-1215

sIg.7.Nephrin 1087-1208

sIg.7.Nephrin 1121-1208

sIg.7.Nephrin 1112-1208

sIg.7.Nephrin 1104-1208

sIg.7.Nephrin 1096-1208

sIg.7.Nephrin 1115-1208

sIg.7.Nephrin 1118-1208

sIg.7.Nephrin 1087-1182

sIg.7.Nephrin Y1193A

sIg.7.Nephrin Y1193F

cdm0

cdm0.β-Arrestin2.F

cdm0.V5.podocin

cdm0.YES

cdm8

2.1.4 Inhibitoren

PP2 (Calbiochem)

2.1.5 Detergenzien und Puffer

2x Laemmli: 900 µl 2x stock (125 ml 1M Tris pH 6,8; 20 g SDS (Sodiumdodecylsulfate);
100 ml Glycerin; 5 mg Bromphenol Blau; 270 ml H₂O)

100 µl 1 M DTT

IP- Puffer: 1 % Triton X-100; 20 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 50 mM NaF; 15 mM
Na₄P₂O₇; 0,1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetylsäure); 2 mM Na₂VO₄;
0,25 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)

2.1.6 Co-Immunopräzipitation

Protein-G-Sepharose (Amersham)

2.1.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Polyacrylamidgelzusammensetzung:

	Trenngel	Sammelgel
Trenngelpuffer	12 ml	0 ml
Sammelgelpuffer	0 ml	5 ml
Acrylamid 30 %	6 ml	1,2 ml
Wasser	6 ml	3,8 ml
APS 10 % (Ammoniumperoxidisulfat)	240 µl	100 µl
TEMED (N, N, N', N'- Tetra- methylethylendiamid)	30 µl	15 µl

Trenngelpuffer pH 8,8: 360 mM Tris HCl; 1140 mM Tris Base; 14 mM SDS
 Sammelgelpuffer pH 6,8: 484 mM Tris HCl; 16 mM Tris Base; 14 mM SDS
 Laufpuffer: 191,8 mM Glycin; 3,5 mM SDS; 247,7 mM Tris Base
 Transferpuffer: 247,7 mM Tris Base; 3,5 mM SDS; 187,8 mM Glycin;
 15 Vol % Methanol
 Waschpuffer: 9 ml Tris pH 7,5; 18 ml 5 M NaCl; 0,9 ml Tween 20; 972 ml
 H₂O

BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma) 5 % in Waschpuffer

Membran: Nitrocellulose transfer membrane (Whatman Protran)

Antikörper:

Primärantikörper: -Anti-FLAG.M2, monoklonaler Antikörper (Sigma), Western
 Blot: Verdünnung 1:400
 -Anti-β-Arrestin2.H-9, monoklonaler Antikörper (Santa Cruz),
 Western Blot: Verdünnung 1:200
 -Anti-V5, monoklonaler Antikörper (Serotec), Western Blot:
 Verdünnung 1:2 500
 -Anti-human-Ig (Amersham), Western Blot: Verdünnung
 1:1 000
 -Anti-Nephrin, monoklonaler Antikörper (Progen), Western
 Blot: Verdünnung 1:200
 -Anti-Phosphotyrosine/4G10, monoklonaler Antikörper
 (Upstate), Western Blot: Verdünnung 1:1 000
 Sekundärantikörper: - gegen den Fc-Teil von Mausantikörpern gerichtete Ziegen-
 Immunglobuline (Dako), Western Blot: Verdünnung 1:10 000
 -gegen den Fc-Teil von Meerschweinchenantikörpern gerichtete
 Esel-Immunglobuline (Fitzgerald), Western Blot: Verdünnung
 1:10 000

ECL: Lösung A: H₂O; 100 mM Tris pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Coumarin

Lösung B: H₂O; 100 mM Tris pH 8,5; 1,5 % H₂O₂

Filme für Westernblotentwicklung: Fuji Medical X-Ray Film

2.1.8. DNA-Subklonierung

2.1.8.1 PCR

Eppendorf Mastercycler gradient

42 µl ddH₂O

5 µl 10x AccuPrime Puffer (Invitrogen)

0,5 µl Primer1 (50 pmol/µl)

0,5 µl Primer2 (50 pmol/µl)

1 µl DNA-Template (1-10 ng DNA)

1 µl AccuPrime Taq-Polymerase (Invitrogen)

Phenolextraktion:

40 µl PCR-Produkt

50 µl Phenol (pH 8)

2 µl Glycogenlösung

4 µl 3 M Natriumacetat

100 µl 100 % Ethanol

70 % Ethanol zum Waschen

Restriktionsenzymverdau:

26 µl ddH₂O

3 µl Reaktionspuffer (10x NEBuffer 2 bzw. 3; New England Biolabs Inc.)

0,3 µl (Restriktionsendonuklease 1)

0,3 µl (Restriktionsendonuklease 2)

0,4 µl 100x BSA (Bovines Serum Albumin; aufgereinigt; 10 mg/ml; New England Biolabs Inc.)

2.1.8.2 Ligation

1,5 % Low melting Agarose (Sigma)

Laufpuffer (1xE): 2 ml 50xTAE (242 g Tris Base; 57,1 g Essigsäure; 0,5 M EDTA)

98 ml H₂O

5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

15 µl (0,5 µg) Vektor-DNA nach Restriktionsenzymverdau

15 µl PCR-Produkt (Insert) nach Restriktionsenzymverdau

2 µl geschmolzener Vektoransatz (im Agarose Gel)
4 µl geschmolzener Insertansatz (im Agarose Gel)
5 µl 10x Ligationspuffer (MBI Fermentas)
35 µl ddH₂O
0,4 µl T4-DNA-Ligase (400 000 U/ml; MBI Fermentas)

2.1.8.3 Transformation / Amplifikation

25 µl bzw. 50 µl E. coli MC1061 (Ampicillin- und Tetracyclinresistenz)
0,25 µg zu amplifizierendes Plasmid bzw. 5 µl Ligationsprodukt

2.1.8.4 Minikultur und Minipräparation

Bakterienkolonien der Platten aus 2.1.8.3

Medium: 20 g LB-Broth-Base (Sigma) auf 1000 ml ddH₂O;

7 ml Ampicillin + 3 ml Tetracyclin (0,1 g/100 ml ddH₂O)

Minilösung 1 (10 mM EDTA pH 8,0; 50 mM TrisHCl pH 8,0; RNaseA 10 mg (Sigma))

Minilösung 2 (0,2 M NaOH/SDS)

Minilösung 3 (2 M Kaliumacetat)

100 % Isopropanol

70 % Ethanol zum Waschen

Restriktionsenzymverdau (siehe 2.1.1.1)

Agarosegel

1 % Agarose Type II Medium EEO (Sigma)

5 µl Lambda DNA-BstEII-Digest (New England Biolabs Inc.)

2.1.8.5 Maxikultur und Maxipräparation

200 µl Bakteriensuspension aus der Minikultur

200 ml LB-Medium (s. 2.1.8.4)

Solution E1-E6 aus Genomed Kit (Jetstar)

100 % Isopropanol

70 % Ethanol zum Waschen

0,5 ml ddH₂O

Photometer (F DU640 Firma Beckmann)

2.1.9 Mäuse

Balb/c-Mäuse, männlich, Alter: 6 Wochen (Janvier)

DMSO (Sigma)

PP2 (Calbiochem)

2.2 Zellkultur

Für die Versuche wurden HEK 293T-Zellen verwendet, die in 10 cm Schalen in DMEM-Medium (mit 10 % Kälberserum und Eisen) kultiviert und in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Für die Subkultivierung der konfluenten Zellen wurde eine Trypsinisierung und eine 1:6 Passage durchgeführt. Nach Absaugen des alten Mediums gefolgt von einem Waschschrift mit sterilem PBS wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und für ca. 2 min in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 11 ml DMEM-Medium aufgenommen und auf entsprechend viele 10 cm Schalen aufgeteilt.

2.3 Transfektion

Die am Vortag gesplitteten HEK 293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert (Chen und Okoyama, 1987). Bei dieser Methode nutzt man die Fähigkeit der Zellen aus, Calciumphosphatkristalle zu phagozytieren. Die Kristalle werden von der Zelloberfläche adsorbiert und durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen (Loyter et al., 1982). Auf diese Weise kann koprizipierte Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht werden. 10-20 µg DNA wurde in Eppendorf-Gefäße pipettiert und unter dem sterilen Abzug 500 µl 0,25 M Calciumchlorid hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 500 µl HEBS tropfenweise über dem Vortexer. Diese Transfektionslösung wurde dann gleichmäßig auf das Kulturmedium der Zellen verteilt. Nach 6-8 Stunden erfolgte der Stopp der Transfektion durch Wechseln des Kulturmediums und damit Entfernen der verbliebenen DNA/Calciumphosphatkristalle.

2.4 Zellernte

Nach Absaugen des alten Mediums wurde jede Schale mit gekühltem PBS (4°C) gewaschen und die Zellen durch wiederholten senkrechten PBS-Strahl abgelöst. Die nun in der PBS-

Lösung befindlichen Zellen wurden aufgesaugt und in Falcon-Röhrchen überführt, die 5 Minuten bei 1 500 rpm und 4°C zentrifugiert wurden. Das entstandene Pellet wurde in Lysier-Puffer (500 µl) resuspendiert und in Eppendorf-Gefäße überführt.

Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C. Der Überstand konnte nun für eine Co-Immunopräzipitation oder zur Lysat-Herstellung verwendet werden.

2.5 Co-Immunopräzipitation

Ziel einer Co-Immunopräzipitation ist es, eine Interaktion zwischen Proteinen nachzuweisen. Zuvor transfizierte HEK 293T-Zellen wurden in PBS geerntet und in 500 µl IP-Puffer lysiert. Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm (15 min, 4°C) wurde dem entstandenen Überstand 30 µl Lysat entnommen, während mit 450 µl Überstand die eigentliche Co-Immunopräzipitation vorgenommen wurde. Dazu wurden die 450 µl nun bei 4°C mit 30 µl (Konzentration ~ 2 mg Protein-G/ml) Protein-G-Sepharose für 60 Minuten auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die in diesen Versuchen verwendeten Konstrukte beinhalten ein sIg- Epitop, welches Immunglobulin-Domänen enthält, woran die Protein-G-Sepharose spezifisch binden kann. Protein-G ist ein bakterielles Zelloberflächenprotein aus Streptokokken mit einer spezifischen Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen der G-Klasse. Die Protein-G-Sepharose bindet an die sIg₇-markierten Proteine und bildet so einen Protein-Sepharose-Komplex. Dieser Komplex wurde durch Zentrifugation gesammelt (3000 rpm, 3 min) und mehrfach in Lysier-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift resuspendierte man den Protein-Sepharose-Komplex, wie auch die Lysate, in 30 µl 2x Laemmli. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert und im Western Blot weiterverwendet.

2.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Ziel dieser Methode ist die elektrophoretische Auftrennung der Proteine und eine dauerhafte Fixierung auf einer Membran. Durch spezifische Antikörpernachweisreaktionen können diese Proteine sichtbar gemacht werden (Towbin et al., 1979). Mit Hilfe der Western Blot-Analyse kann man Größe und relative Menge der exprimierten Proteine darstellen.

Die Zelllysate bzw. IP-Proben wurden mit 30 µl 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen.

Daraufhin folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfate) werden Proteine nicht nur solubilisiert, sondern erhalten auch eine negative Gesamtladung, so dass ihre elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Proteins abhängt. Nach Beladung der Proteine auf ein Gel wandern die Proteine zunächst im Sammelgel bei 70 Volt für 30 Minuten in Richtung Anode. Danach wurden die Proteine im Trenngel für 2 Stunden bei 20 mA voneinander getrennt. Nach der Auftrennung folgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine proteinbindende Membran nach dem „Semi-Dry“-Verfahren (Towbin et al., 1979). Hierbei werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung (12 Volt) für 45 Minuten aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Gultekin and Heermann, 1988) übertragen.

Anschließend ist eine Inkubation in BSA (5 % in Waschpuffer) für 1h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C erforderlich um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

Bei allen folgenden Inkubationsschritten wurde nun bei Raumtemperatur gearbeitet. Nach drei Waschsritten (jeweils 10 min) mit Waschpuffer wurde die Membran für 30 Minuten mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert (Konzentrationen der Antikörper siehe unter 2.1.7). Überschüssige Antikörper, welche keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen haben, wurden dann durch erneute Waschschrte entfernt.

Die anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte unter gleicher Vorgehensweise wie beim Erstantikörper. Dieser ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und zur Detektion an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt (Kricka, 1993).

Für die Sichtbarmachung der an die Proteine gebundenen Antikörper mit der Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran für zwei Minuten in einer Visualisierungslösung (ECL) inkubiert. In einer Dunkelkammer wurden nun die Lichtemissionen der Membran mittels Röntgenfilmen festgehalten.

2.7 DNA-Subklonierung

2.7.1 PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine enzymatische Methode zur exponentiellen Amplifizierung von spezifischen Nukleinsäurefragmenten *in vitro* (Mullis and Faloona, 1987).

Für die Versuche wurde ein Eppendorf Mastercycler benutzt. In den Thermo-Cycler wurde ein Ansatz aus ddH₂O, DNA-Template, 10xPuffer, Accuprime-Polymerase sowie die jeweiligen beiden Primer gegeben. Zunächst wurde der Ansatz bei 95°C für 1-3 Minuten

inkubiert. Darauf folgten 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen: Im ersten Schritt von 45 sec Dauer bei 95°C wurden die DNA-Doppelstränge des Templates gelöst (Melting), so dass diese nun als Einzelstränge vorlagen. Im darauf folgenden Schritt, dem so genannten Annealing, banden bei 55°C für eine Minute die beiden für das PCR-Produkt spezifischen Primer (15-20 Basen lange Oligonukleotide) an die jeweiligen Einzelstränge und dienten als Ausgangspunkte für die Synthese in 5'/3'-Richtung. Während des dritten Schrittes vervollständigte die Accuprime-Polymerase, eine hitzeresistente DNA-Polymerase, bei 68°C für 2 Minuten pro tausend Basenpaare die Einzelstränge zu Doppelsträngen (Extension/Synthese), so dass am Ende eines Zyklus die gewünschte DNA-Sequenz verdoppelt worden war. Im letzten Zyklus erfolgte nach dem dritten Schritt eine Inkubation des Produktes bei 68°C für 10 Minuten und anschließend bis zur Entnahme aus dem Thermo-Cycler eine Inkubation bei 4°C.

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurden 40 µl des Produkts mit 50 µl Phenol auf einem Vortexer vermischt und daraufhin 2 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der phenolfreie DNA enthaltende Überstand konnte dann mit 2 µl Glycogenlösung, 4 µl 3 M Natriumacetat und 100 µl 100 % Ethanol gemischt und für 15-30 min bei -20°C aufbewahrt werden. Es folgte eine Zentrifugation bei 13 000 rpm (4°C, 15 min) und zweimaliges Waschen des Bodensatzes mit 70 % Ethanol. Nach Trocknung wurde das Pellet in 26 µl H₂O resuspendiert. Anschließend erfolgte für den Verdau die Zugabe von 3 µl Reaktionspuffer und je 0,6 µl Restriktionsendonukleasen (entsprechend der durch die Primer festgelegten spezifischen Schnittstellen) zur Suspension und wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der PCR und des Verdau konnte mit einer Agarose-Gelelektrophorese und durch Sequenzierung des PCR-Produktes verifiziert werden.

2.7.2 Quickchange-Mutagenese

Zur Herstellung der beiden Mutationen Nephrlin Y1193A und Nephrlin 1193F wurde die Quickchange-Mutagenese verwendet. Dabei wird das komplette Plasmid mit zwei Oligonukleotiden amplifiziert, die jeweils die entsprechende Mutation und eine diagnostische Schnittstelle enthalten. Die Amplifikation erfolgt mit einer Polymerase (AccuPrime-Taq-Polymerase) in einer 50 µl Standardreaktion. Nach der DNA-Amplifikation wird die Reaktion auf einem 1 %igen Agarose-Gel überprüft. Im positiven Fall erfolgt ein Restriktionsverdau durch Zugabe des Enzyms *dpn1* (10 U/µl). Dieses schneidet DNA methylierungsabhängig, d.h. die in Bakterien hergestellte DNA (das nicht mutierte Originalkonstrukt), wird verdaut. Die durch die Amplifikation hergestellte DNA bleibt erhalten, da DNA-Methylierung nur

intrazellulär erfolgt. 5 µl dieser Reaktion wurden in kompetente Bakterien transformiert. Als Negativkontrolle wurde eine Reaktion ohne Zugabe von Pfu-Polymerase mitgeführt, bei der es nicht zum Wachstum von Kolonien kam.

2.7.3 Ligation

Die Methode der Ligation dient zum Einbau von Protein kodierender DNA-Abschnitte (Insert) in Expressionsvektoren (bakterielle Plasmide). In Bakterien und Zellkulturen können diese zur Expression von entsprechenden Proteinen genutzt werden.

Der als Insert verwendete DNA-Abschnitt sowie der Vektor wurden mit den gleichen Restriktionsendonukleasen für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Nach dem Verdau erfolgte auf 1%iger Low-melting-Agarose eine Gelelektrophorese für 30 Minuten bei 80 mV. Anschließend wurden Insert und Vektor aus dem Gel ausgeschnitten und bei 70°C geschmolzen. 1 µl des geschmolzenen Vektors, 4 µl des geschmolzenen Inserts, 2,5 µl 10x Ligasepuffer, 0,2 µl T4-DNA-Ligase und 17,5 µl H₂O ergaben den neuen Reaktionsansatz. Dieser wurde für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation war das Insert an den entsprechenden Restriktionsschnittstellen im Vektor integriert.

2.7.4 Transformation/Amplifikation

Transformation beschreibt die Aufnahme fremder DNA durch Bakterien aus ihrer Umgebung. In der Molekularbiologie werden sogenannte kompetente Bakterienstämme mit rekombinanten DNA-Plasmiden beimpft, wobei die Plasmide von den Mikroorganismen transformiert werden. Bei der Vermehrung der Bakterien werden diese Plasmide ebenfalls vermehrt und an die Tochterzellen weitergegeben. Auf diese Weise ist eine rasche Amplifikation von rekombinanter DNA möglich.

Für die Versuche wurden MC1061P3-Bakterienstämme (Ampicillin- und Tetracyclinresistenzinduktion) verwendet. 0,25 µg des zu amplifizierenden Plasmids bzw. 5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 25 µl bzw. 50 µl der Bakteriensuspension vermischt, zunächst für 15 min auf Eis, danach für 5 min bei 37°C inkubiert, und anschließend auf einer mit den entsprechenden Antibiotika behandelten Agaroseplatte ausgestrichen. Diese wurde über Nacht bei 37°C gelagert. Bei erfolgreicher Transformation erfolgte das Wachstum der Bakterienkolonien.

2.7.5 Minikultur und Minipräparation

Von den bei der Transformation gewonnenen Bakterienkolonien wurden zwei mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und jeweils in ein mit 3 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika (gemäß den bakteriellen Resistenzen Tetracyclin und/oder Ampicillin) gefülltes Röhrchen gegeben. Diese Röhrchen wurden für mindestens 6 h bei 37°C auf einem Rotor inkubiert, bis eine Trübung des Mediums auftrat, die ein ausreichendes Bakterienwachstum anzeigte. Zur Gewinnung der bakteriellen Plasmid-DNA (Minipräparation) wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension entnommen, für 2 min bei 13 000 rpm (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet dann mit 250 µl Lösung 1 resuspendiert. Die Zugabe von 250 µl der Lösung 2 führte zur Lyse der Zellen und DNA Freisetzung, 350 µl der Lösung 3 zur Neutralisation. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13 000 rpm (4°C, 30 min), um die Zellbestandteile zu entfernen. 800 µl der entstandenen klaren DNA-enhaltenden Lösung (Überstand) wurde mit 560 µl 100 % Isopropanol versetzt und kräftig geschüttelt um die DNA zu fällen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13 000 rpm (4°C, 15 min). Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach Resuspendierung der DNA mit Wasser konnte diese nach einem diagnostischen Restriktionsenzymverdau entsprechend der eingebauten Schnittstellen einer Gelelektrophorese in einem Agarosegel unterzogen werden, welche Auskunft über den Erfolg der Amplifikation gab.

2.7.6 Maxikultur und Maxipräparation

Zur weiteren Vervielfachung der bakteriellen Plasmid-DNA wurde nach erfolgreicher Amplifikation mit 200 µl Bakteriensuspension aus der Minikultur und 200 ml LB-Medium sowie den entsprechenden Antibiotika (gemäß den bakteriellen Resistenzen Tetracyclin und/oder Ampicillin) eine Maxikultur angelegt. Diese Kultur wurde für 12-24 h bei 37°C auf einem Rotor inkubiert. Nach Eintreten einer entsprechenden Trübung konnte die Maxipräparation erfolgen. Hierfür wurde die Kultur zunächst bei 4500 g (4°C, 15 min) zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Daraufhin erfolgte die weitere Verarbeitung des Bakterien-Pellets nach Protokoll des Genomed Kit der Firma Jetstar. Das dadurch gewonnene DNA-Pellet wurde in ddH₂O aufgenommen und die DNA-Konzentration in dieser Lösung bei 260 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren in Lösung) im Photometer bestimmt. Die Konzentration ergab sich dabei entsprechend dem Lambert-Eaton-Gesetz in µg/ml. Zur Kontrolle, ob das gewünschte Plasmid amplifiziert wurde, erfolgte ein Restriktionsenzymverdau der DNA. Hierbei wurde der Vektor mit Hilfe

der entsprechenden Restriktionsendonukleasen aufgeschnitten. Der Verdauansatz wurde bei 37°C für 3 Stunden inkubiert, und anschließend auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker diente der Lambda DNA-BstEII-Digest. Der Verdau wurde bei 100 V 40-60 min lang einer Gelelektrophorese unterzogen und das Gel dann unter UV-Licht betrachtet. Das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid macht die durch den Verdau entstandenen DNA-Stücke (das in den Vektor eingebaute Insert) fluoreszenzoptisch sichtbar und damit eine Kontrolle der Plasmid-Amplifikation möglich.

2.7.7 Sequenzierung

Zum Erkennen von Punktmutationen und sonstigen Fehlern in der subklonierten DNA erfolgte eine Sequenzierung. Hierfür wurden 50-250 ng (entsprechend der Größe des PCR-Produktes) der DNA in 10 mM TRIS/Cl pH 8,5 gelöst, 20 pmol eines entsprechenden Primers hinzu gegeben und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 7 ml aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde an das Sequence Laboratories Göttingen GmbH verschickt und dort analysiert.

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht auf der Didesoxymethode, welche auch Kettenabbruchsynthese genannt wird, nach Sanger (Sanger et al., 1977). Kern der Sequenzierung nach Sanger ist die Synthese eines DNA-Stranges, der zu einer einzelsträngigen Matrize komplementär ist. Im Verlauf der DNA Sequenzreaktion baut eine DNA-Polymerase an einen DNA-Primer zu einer Matrize, oder „Template“, komplementäre Basen ein, bis sie ein in der Reaktion vorhandenes Kettenabbruchmolekül, eine Didesoxyribonukleinsäure, eingebaut hat, das nicht mehr verlängert werden kann. Um die Sequenzprodukte detektieren zu können, müssen diese so markiert werden, dass eine Unterscheidung der jeweils eingebauten Abbruchmoleküle möglich ist. Im Wesentlichen gibt es zwei Möglichkeiten, die radioaktive oder fluoreszente Markierung in das Sequenzierprodukt einzubringen. Während in den Anfangstagen der Sequenzierung ausschließlich mit Radioaktivität markiert wurde, ist diese Markierung inzwischen vollständig von der Fluoreszenz-Markierung abgelöst worden.

2.8 Injektion von PP2/DMSO an Mäusen

30 männliche, 6 Wochen alte balb/c-Mäuse wurden zufällig in zwei Gruppen mit jeweils 15 Tieren aufgeteilt. Der ersten Gruppe wurde einmalig PP2 (5 mg/kg Körpergewicht), ein spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitor, gelöst in 0,125 ml 80 % DMSO intraperitoneal gespritzt. Die zweite Gruppe erhielt eine einmalige intraperitoneale Injektion mit 0,2 ml 50 % DMSO.

2.9 Gewinnung von Mäuseurin

Zur Gewinnung des Urins wurden die Mäuse jeweils 0, 3, 6, 9 und 12 Stunden nach der Injektion von PP2 bzw. DMSO einzeln in einen nackten Plastikgefäß gesetzt, worauf sie innerhalb von wenigen Minuten spontan Urin absetzten. Dieser wurde mittels einer Pipette aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

2.10 Bestimmung von Albumin im Mäuseurin

Die gewonnenen Mäuseurinproben wurden an das Zentrallabor des Marienhospital I Herne verschickt und dort die Albuminkonzentration im Urin mittels ELISA analysiert. Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), auch EIA (Enzyme-Immunoassay) genannt, ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit nachfolgender Farbreaktion basiert (Feldt-Rasmussen, B. et al. 1985). Hierbei werden spezielle Antikörper genutzt, die sich an die nachzuweisende Substanz (z.B. Albumin) binden. Bei vollständiger Antigen-Antikörper-Bindung wird dann eine Farbreaktion hervorgerufen, die durch ein Enzym vermittelt wird, das entweder an das Antigen selbst oder den Antikörper gebunden ist. Diese durch das Enzym katalysierte Reaktion dient dem Nachweis des Antigens in der Probe.

3. Ergebnisse

3.1 β -Arrestin2 wird in Podozyten exprimiert

Um zu untersuchen, ob zwischen Nephrin und β -Arrestin2 eine Interaktion besteht, die auch an der glomerulären Schlitzmembran eine Relevanz besitzt, ist unabdingbare Bedingung, dass beide Proteine in Podozyten exprimiert werden. Für Nephrin konnte dies bereits nachgewiesen werden (Kestila et al., 1998).

Für den Nachweis von β -Arrestin2 in Podozyten wurden zwei Ansätze verfolgt:

Zum einen wurde versucht das 211 bp große β -Arrestin2-RNA-Transkript zu detektieren. Dies erfolgte nach der Lysierung von unbehandelten humanen Podozyten mittels RT-PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Es zeigte sich, wie in der Abbildung 2 zu sehen, ein deutliches Signal bei ~ 200 bp als Korrelat für das β -Arrestin2-Transkript.

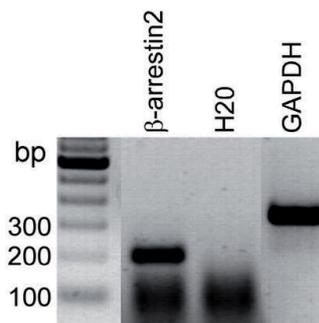


Abb. 2: Nachweis von β -Arrestin2-Expression in Mauspodozyten mittels RT-PCR. Es erfolgte jeweils ein PCR-Ansatz mit β -Arrestin2-Primern: Links mit dem Podozytenlysat, in der Mitte mit H_2O als Negativkontrolle, rechts mit GAPDH als Positivkontrolle der PCR.

Der zweite Ansatz verfolgte den Nachweis endogener Proteinexpression von β -Arrestin2 in Podozyten. Dafür wurden unbehandelte Podozyten zunächst lysiert und das Lysat anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Immunoblot (Western Blot) und Inkubation mit Anti- β -Arrestin2-Antikörper konnte β -Arrestin2 eindeutig nachgewiesen werden. Die Abbildung 3 zeigt ein deutliches Signal bei 46 kDa, wie es der Größe von β -Arrestin2 entspricht (Attramadal et al., 1992).

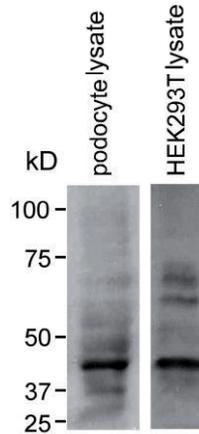


Abb. 3: Nachweis von endogenem β -Arrestin2 in Mauspodozyten (links) und HEK 293T-Zellen (rechts) im Western Blot. Podozyten- bzw. HEK 293T-Zellen-Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit β -Arrestin2-Antikörpern inkubiert.

3.2 Nephrin interagiert mit β -Arrestin2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Nephrin und β -Arrestin2 in Podozyten exprimiert werden, stellt sich die Frage, ob beide auch miteinander interagieren.

Um dies zu untersuchen wurden HEK 293T-Zellen mit C-terminal Flag-markiertem β -Arrestin2 (β -Arrestin2.F) und N-terminal sIg7-markiertem Nephrin (sIg7.Nephrin) bzw. im Kontrollansatz mit leerem sIg7-Vektor kotransfiziert. Zusätzlich wurde ein weiterer Ansatz mit C-terminal Flag-markiertem β -Arrestin2 (β -Arrestin2.F) und N-terminal sIg7-markiertem NEPH1 (sIg7.NEPH1) durchgeführt mit der Frage nach einer Interaktion zwischen NEPH1, einem weiteren wichtigen Protein der Schlitzmembran mit großer Homologie zu Nephrin, und β -Arrestin2. Nach Co-Immunopräzipitation (Co-IP) mit Protein-G-Sepharose wurden Lysate und IP-Proben der drei Ansätze mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Inkubation der Membran mit Anti-Flag-Antikörper zeigt deutlich, dass Nephrin mit β -Arrestin2 interagiert und dadurch in der IP kopräzipitiert wird bei gleicher Expression in den Lysaten. Für NEPH1 konnte hingegen keine solche Interaktion mit β -Arrestin2 nachgewiesen werden (Abb. 4).



Abb. 4: Nephrin interagiert mit β -Arrestin2. HEK 293T-Zellen wurden mit einem Leervektor (sIg.7), Nephrin, NEPH1 und β -arrestin2 kotransfiziert. Nephrin und NEPH1 wurden mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Flag-Antikörpern inkubiert. In der Mitte sieht man ein deutliches Signal im Western Blot als Zeichen einer Interaktion zwischen Nephrin und β -Arrestin2, wohingegen NEPH1 nicht mit β -Arrestin2 interagiert (rechts). Links die Negativkontrolle mit einem Leervektor. Unten befinden sich die Lysate zum Nachweis gleicher β -Arrestin2-Expression.

3.2.1 Die Nephrin-Domänen 1112-1120 und 1177-1208 sind essentiell für die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung

Die Tyrosin-Phosphorylierung ist bei vielen Bindungspartnern von β -Arrestin2 für deren Interaktion ein wichtiger Schritt (Spiegel, 2003). Es liegt die Vermutung nahe, dass Tyrosin-Phosphorylierung auch bei Nephrin und seiner Interaktion mit β -Arrestin2 eine Rolle spielt. Nephrin besitzt an der C-terminalen Seite sieben mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Um die relevanten Stellen für die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung herauszufinden, wurden zunächst Nephrin-Truncations generiert (sIg7.Nephrin 1087-1241 entspricht komplettem zytoplasmatischen Anteil, sIg7.Nephrin 1087-1208, sIg7.Nephrin 1087-1176, sIg7.Nephrin 1158-1208). Diese Nephrin-Truncations stellen verkürzte Formen des zytoplasmatischen Nephrinabschnittes dar (siehe Abb. 8). Die N-terminal sIg7-markierten Nephrin-Truncations wurden in separaten Ansätzen mit C-terminal Flag-markiertem β -Arrestin2 (β -Arrestin2.F) in HEK 293T-Zellen kotransfiziert. Nach Co-IP mittels Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Inkubation mit Anti-Flag-Antikörper zeigte sich eine Interaktion von Nephrin 1087-1208 und β -Arrestin2, während Nephrin 1087-1176 nicht mit β -Arrestin2 interagiert (Abb. 5). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die 32 Aminosäuren große Nephrin-Domäne 1177-1208 essentiell für die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung ist. Zum Nachweis der Expressierung dieser Nephrin-Truncations wurden die Zelllysate im Western Blot mit Anti-human-IgG-Antikörpern inkubiert.

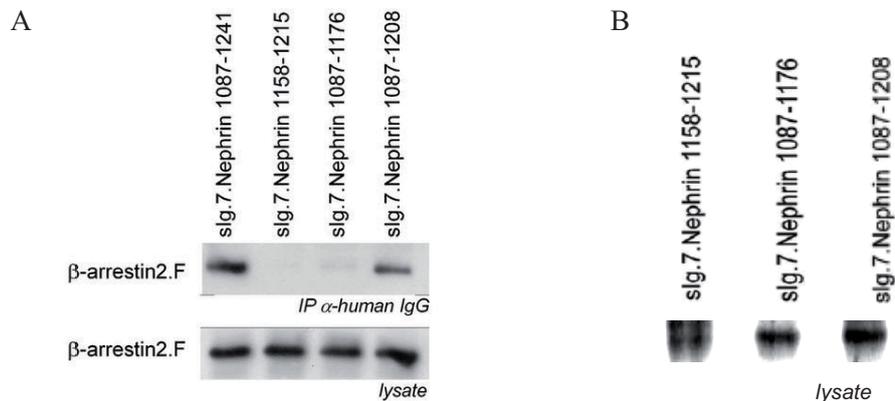


Abb. 5: Die Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktionstelle liegt im Nephrin-Abschnitt 1177-1208. (A) HEK 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Nephrin-Truncations und β -Arrestin2 kotransfiziert. Die Truncations wurden mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Flag-Antikörpern inkubiert. Nur der Nephrin-Abschnitt 1087-1208 zeigt im Western Blot ein Bandensignal als Zeichen einer Interaktion mit β -Arrestin2. Die Interaktionsstelle muss also im Abschnitt 1177-1208 liegen. Da Nephrin 1158-1215 keine Interaktion zeigt, muss eine weitere N-terminal gelegene Domäne für die Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 vorhanden sein. Links: Nephrin 1087-1241 als Positivkontrolle. Unten: Lysate zum Nachweis gleicher β -Arrestin2-Expression. (B) Zum Nachweis der Expression der Nephrin-Truncations wurden die Zelllysate aus dem Versuch in (A) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-human-IgG-Antikörpern inkubiert.

Überraschenderweise zeigt jedoch Nephrin 1158-1215 keine Interaktion mit β -Arrestin2, obwohl es die Nephrin-Domäne 1177-1208 enthält. Dies legt den Verdacht nahe, dass eine weitere N-terminal gelegene Domäne für die Interaktion benötigt wird.

Für diesen Nachweis wurden erneut Nephrin-Truncations generiert (sIg7.Nephrin 1096-1208, sIg7.Nephrin 1104-1208, sIg7.Nephrin 1112-1208, sIg7.Nephrin 1121-1208) und in separaten Ansätzen mit C-terminal Flag-markiertem β -Arrestin2 (β -Arrestin2.F) in HEK 293T-Zellen kotransfiziert. Es folgten Co-IP mittels Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließende Inkubation mit Anti-Flag-Antikörper.

Aus Abb. 6 ist ersichtlich, dass Nephrin 1112-1208 mit β -Arrestin2 interagiert, Nephrin 1121-1208 jedoch nicht und damit die relevante Nephrin-Domäne zwischen 1112 und 1120 liegen muss.

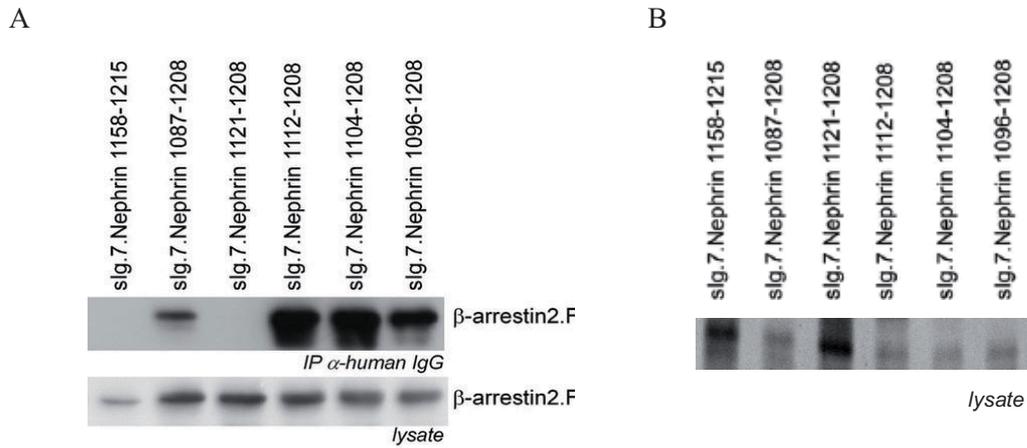


Abb. 6: Eingrenzung der N-terminalen Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktionsstelle auf den Nephrin-Abschnitt 1112-1120. (A) HEK 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Nephrin-Truncations und jeweils β -Arrestin2 kotransfiziert. Die Truncations wurden mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Flag-Antikörpern inkubiert. Während es bei Nephrin 1112-1208 ein starkes Signal im Western Blot gibt, lässt sich bei Nephrin 1121-1208 keine Interaktion nachweisen. Die relevante Nephrin-Domäne für die β -Arrestin2-Interaktion muss folgerichtig zwischen 1112 und 1120 liegen. Unten: Lysate zum Nachweis gleicher β -Arrestin2-Expression. (B) Zum Nachweis der Expression der Nephrin-Truncations wurden die Zelllysate aus dem Versuch in (A) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-human-IgG-Antikörpern inkubiert.

Zur genaueren Eingrenzung der Domäne wurde mit weiteren Nephrin-Truncations (sIg7.Nephrin 1121-1208, sIg7.Nephrin 1118-1208, sIg7.Nephrin 1115-1208) ein Versuch nach oben beschriebener Methode durchgeführt (Abb. 7). Hierdurch ergibt sich eine Annäherung der interagierenden Nephrin-Domäne auf 1118-1120.

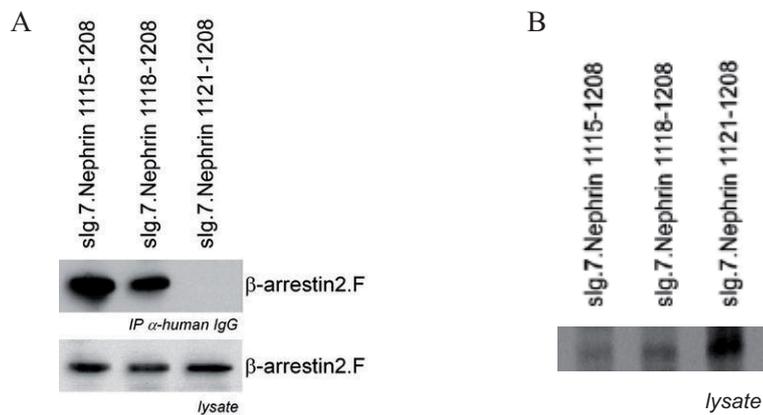


Abb. 7: Eingrenzung der N-terminal gelegenen Nephrin- β -Arrestin2-Interaktions-Domäne auf den Abschnitt 1118-1120 . (A) HEK 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Nephrin-Truncations und β -Arrestin2 kotransfiziert. Die Truncations wurden mit Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Flag-Antikörpern inkubiert. Nephrin 1118-1208 interagiert noch mit β -Arrestin2, während Nephrin 1121-1208 keine Interaktion zeigt. Die Interaktionsstelle liegt also bei 1118-1120. Unten: Lysate zum Nachweis gleicher β -Arrestin2-Expression. (B) Zum Nachweis der Expression der Nephrin-Truncations wurden die Zelllysate aus dem Versuch in (A) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-human-IgG-Antikörpern inkubiert.

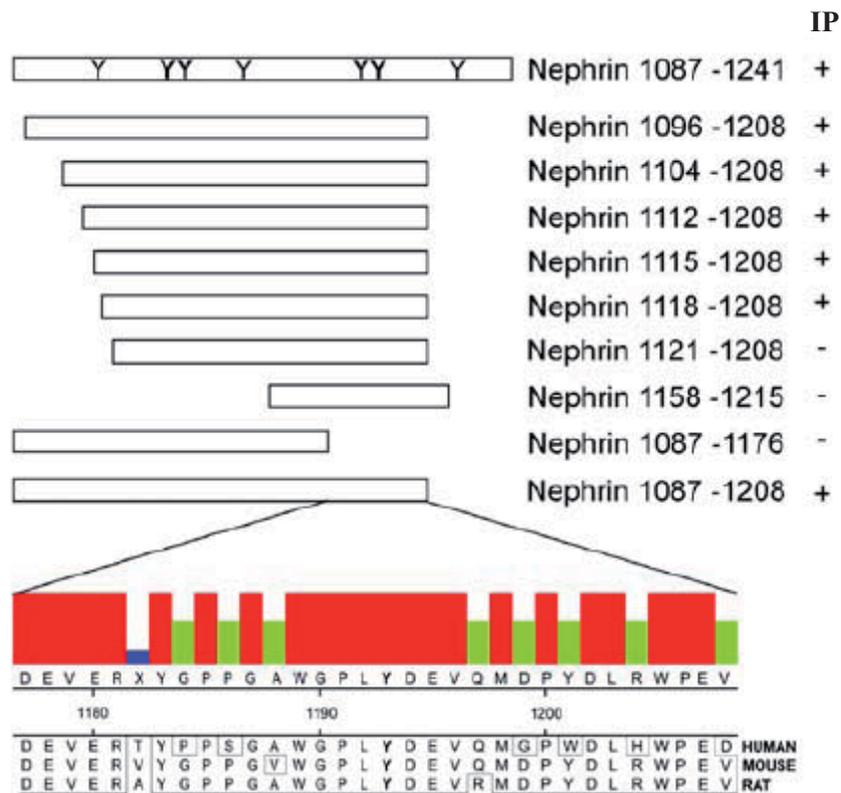


Abb. 8: Eine Übersicht des vollständigen Nephrin C-Terminus und den Tyrosinen (Y) als möglichen Phosphorylierungsstellen (oberste Zeile). Darunter sind die unterschiedlich verkürzten Nephrin-Truncations abgebildet. In der ganz rechten Spalte kann man erkennen, ob der jeweilige Nephrin-Abschnitt mit β -Arrestin2 in der Co-IP kopräzipitiert wurde. Der untere Bildabschnitt zeigt die Aminosäuresequenz des Abschnittes 1177-1208 von Mensch, Maus und Ratte. Die Farben signalisieren hierbei die Spezies-übergreifende Konservierung von bestimmten Domänen (von hoher nach niedriger Konservierung: Rot > grün > blau). Die Nephrin/ β -Arrestin2-Regulationsstelle Tyrosin 1193 liegt in einer hoch konservierten acht Aminosäuren großen Domäne.

3.3 Phosphorylierung reguliert die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung

Das Clustern von Nephrin-Molekülen führt zu einer Tyrosin-Phosphorylierung am Nephrin C-Terminus durch Src-Kinasen (Lahdenpera et al., 2003). Man kann vermuten, dass die extrazelluläre Zusammenlagerung von Nephrin zu Homodimeren zu einer intrazellulären Tyrosin-Phosphorylierung durch Src-Kinasen führt. Nephrin besitzt solch eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle am Nephrin Y1193 innerhalb der Nephrin-Domäne 1177-1208. Da diese Domäne, wie oben gezeigt, essentiell für die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung ist, liegt es nahe, dass der Phosphorylierungsstatus vom Nephrin Y1193 die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung beeinflusst. Es ist bekannt, dass die Src-Kinasen Fyn, Src und Yes in Podozyten exprimiert werden und Fyn Nephrin am C-Terminus Tyrosin-phosphoryliert (Verma et al.,

2003). Für Yes konnte dies noch nicht nachgewiesen werden. Um dies zu zeigen wurden HEK 293T-Zellen mit sIg7.Nephrin und Yes bzw. sIg7 als Negativkontrolle transfiziert. In einem Ansatz mit sIg7.Nephrin und Yes wurde eine Stunde vor Zellernte PP2, ein spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor, hinzugegeben (10 μ M). Nach Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot erfolgte die Inkubation mit Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpern.

In Abbildung 9 erkennt man deutlich, dass Yes Nephrin Tyrosin-phosphoryliert und der Tyrosinkinaseinhibitor PP2 diese Phosphorylierung vermindert.

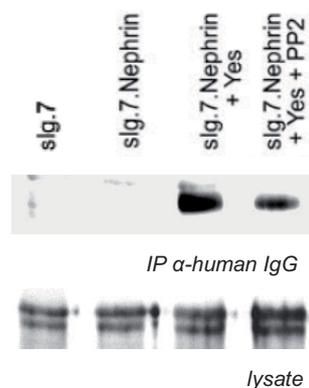


Abb. 9: Nephrin wird von Yes phosphoryliert. HEK 293T-Zellen wurden mit einem Leervektor, Nephrin und Yes kotransfiziert. In einem Ansatz erfolgte 1h vor Zellernte die Zugabe von 10 μ M PP2, einem Tyrosinkinaseinhibitor. Nephrin wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpern inkubiert. Im Western Blot zeigt sich im Ansatz mit Yes ein deutliches Signal im Vergleich zum Ansatz ohne Yes als Zeichen der Tyrosinphosphorylierung von Nephrin durch Yes. Unter PP2-Zugabe kommt es zu einer Verminderung der Tyrosinphosphorylierung (rechts). Unten: Lysate zum Nachweis gleicher Nephrin-Expression. Im Western-Blot zeigt sich nach Inkubation mit Anti-Nephrin-Antikörpern das typische doppelbandige Muster.

Um zu demonstrieren, dass der Phosphorylierungsstatus von Nephrin die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung beeinflusst, wurden HEK 293T-Zellen mit β -Arrestin2.F und sIg7.Nephrin bzw. sIg7 als Kontrollwert kotransfiziert. Zu einem Ansatz mit sIg7.Nephrin wurde zudem Yes kotransfiziert, einer Kinase aus der Familie der Src-Kinasen. Nach Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot erfolgte die Inkubation mit Anti-Flag-Antikörpern.

Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 unter Zugabe von Yes (Abb. 10).

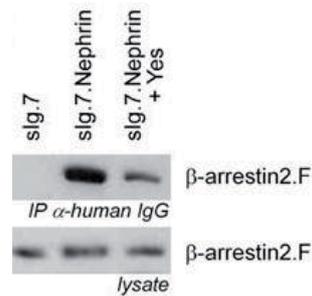


Abb. 10: Yes führt zu einer verminderten Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion. HEK 293T-Zellen wurden mit einem Leervektor, Nephrin, Yes und β -Arrestin2 kotransfiziert. Nephrin wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Flag-Antikörpern inkubiert. Nephrin wurde zum einen nur mit β -Arrestin2 kotransfiziert (Mitte), zum anderen unter Hinzugabe der Kinase Yes (rechts): Yes führt zu einer deutlichen Abnahme der Nephrin/ β -Arrestin2 Interaktion. Links: Negativkontrolle mit einem Leervektor. Unten: Die Lysate zum Nachweis gleicher β -Arrestin2-Expression.

Da die Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 im phosphorylierten Zustand abnimmt, ist anzunehmen, dass verminderte Phosphorylierung zu einer erhöhten Interaktion führt.

Hierfür wurden HEK 293T-Zellen mit β -Arrestin2.F und sIg7.Nephrin bzw. sIg7 als Kontrollwert kotransfiziert. Zu einem Ansatz mit sIg7.Nephrin erfolgte die Zugabe von 10 μ M PP2, einem spezifischen Tyrosin-Kinase-Inhibitor, eine Stunde vor der Zellernte. Die Hemmung von Tyrosin-Kinasen durch PP2 führt zu einer verminderten Phosphorylierung von Nephrin und damit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion. Die Co-IP mit anschließendem Western Blot demonstriert in der Abb. 11 wie erwartet eine Zunahme der Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion bei Hinzugabe von PP2.

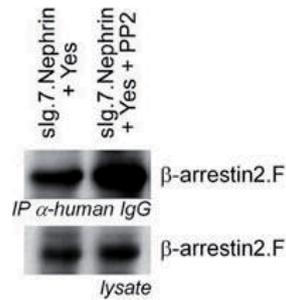


Abb. 11: PP2 verstärkt die Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion. HEK 293T-Zellen wurden mit Nephrin, Yes und β -Arrestin2 kotransfiziert. In einem Ansatz erfolgte 1h vor Zellernte die Zugabe von 10 μ M PP2, einem Tyrosinkinaseinhibitor. Nephrin wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Flag-Antikörpern inkubiert. Im Western Blot zeigt sich unter PP2-Zugabe (rechts) eine Zunahme der Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion. Unten: Lysate zum Nachweis gleicher β -Arrestin2-Expression.

Somit konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung zu einer Abnahme und Dephosphorylierung zu einer Zunahme der Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion führt.

3.3.1 Nephrin Y1193 als Regulationsstelle für die Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung

Um zu untersuchen, ob der Phosphorylierungsstatus am Nephrin Y1193 die entscheidende Regulation in der Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung darstellt, wurde das Tyrosin von Nephrin Y1193 durch Punktmutation von Alanin (Nephrin Y1193A) bzw. Phenylalanin (Nephrin Y1193F) ersetzt. Nephrin Y1193F simuliert hierbei ein ständig unphosphoryliertes Tyrosin, während Nephrin Y1193A als Negativkontrolle ein Alanin besitzt, welches keine strukturelle Ähnlichkeit mit Tyrosin aufweist und ebenfalls nicht phosphorylierbar ist.

HEK 293T-Zellen wurden mit β -Arrestin2.F sowie sIg7 als Negativkontrolle, sIg7.Nephrin WT als Positivkontrolle, sIg7.Nephrin Y1193A und sIg7.Nephrin Y1193F kotransfiziert. Es folgten Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese, Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran und Inkubation mit Anti-Flag-Antikörper.



Abb. 12: Der Phosphorylierungsstatus vom Tyrosin an Position 1193 des Nephrens ist entscheidend für die β -Arrestin2-Interaktion. HEK 293T-Zellen wurden mit Nephrin, den Nephrin-Mutanten Y1193A und 1193F sowie β -Arrestin2 kotransfiziert. Nephrin wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-Flag-Antikörpern inkubiert. Y1193A (Mitte), welches an der Position 1193 nicht phosphorylierbar ist und somit eine Negativkontrolle darstellt, führt zu einer schwächeren, wohingegen Y1193F (rechts), welches an der Position 1193 ein ständig unphosphoryliertes Tyrosin simuliert, zu einer stärkeren Interaktion mit β -Arrestin2 führt. Nephrin WT stellt die Positivkontrolle dar (links). Unten: Lysate zum Nachweis gleicher β -Arrestin2-Expression.

Die Ergebnisse in Abb. 12 zeigen, dass beim Nephrin Y1193A die Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion stark vermindert ist gegenüber dem Nephrin Wildtyp. Hingegen ist beim Nephrin Y1193F, dem ständig unphosphorylierten Nephrin, die Interaktion verstärkt.

3.4 Podocin interagiert mit Nephrin an der Regulationsstelle der Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung

Podocin ist ein 42 kD schweres transmembranäres Protein der glomerulären Schlitzmembran (Boute et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Podocin mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin interagiert und für die Nephrin-abhängige Signalübertragung eine wichtige Rolle spielt (Huber et al., 2001). Zudem führt Podocin zur Rekrutierung von Nephrin an die Schlitzmembran und trägt damit zu deren Stabilisierung bei (Huber et al., 2003).

3.4.1 Podocin als funktioneller Antagonist von β -Arrestin2

Da die Podocin/Nephrin-Interaktion zur Rekrutierung von Nephrin an die Schlitzmembran beiträgt, und die β -Arrestin2/Nephrin-Interaktion im Gegensatz dazu Nephrin von der Schlitzmembran wegtransportiert, ist anzunehmen, dass Podocin und β -Arrestin2 als funktionelle Antagonisten am Nephrin wirken.

Um dies zu überprüfen wurden N-terminal sIg7-markierte Nephrin-Truncations (sIg7.Nephrin 1087-1241, sIg7.Nephrin 1087-1208, sIg7.Nephrin 1087-1182) in separaten Ansätzen mit N-terminal V5-markiertem Podocin (V5.podocin) in HEK 293T-Zellen kotransfiziert. Nach Co-IP mittels Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Inkubation mit Anti-V5-Antikörper zeigte sich eine Interaktion von Podocin mit den Nephrin-Abschnitten 1087-1241 und 1087-1208, nicht jedoch mit dem Nephrin-Abschnitt 1087-1182 (Abb. 13).

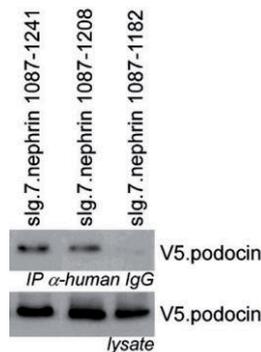


Abb. 13: Die Nephrin/Podocin-Interaktionsstelle liegt im Nephrin-Abschnitt 1183-1208. HEK 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Nephrin-Truncations und Podocin kotransfiziert. Nephrin wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-V5-Antikörpern inkubiert. Während Nephrin 1087-1208 noch kopräzipitiert wird, ist dies bei Nephrin 1087-1182 nicht der Fall. Die Nephrin/Podocin-Interaktionsstelle liegt also zwischen 1183 und 1208. Links: Die Positivkontrolle mit dem vollständigen Nephrin C-Terminus. Unten: Lysate zum Nachweis gleicher Podocin-Expression.

Somit muss die Nephrin/Podocin-Interaktionsstelle zwischen 1183-1208 liegen, also dieselbe Region in der die Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 reguliert wird. Man kann nun vermuten, dass durch Phosphorylierung vom Nephrin die Interaktion zwischen Podocin und Nephrin verstärkt wird. Im Gegensatz zum β -Arrestin2, wo durch Phosphorylierung des Tyrosins an Y1193 die Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion geschwächt wird (wie oben gezeigt).

Um dies zu zeigen wurden HEK 293T-Zellen mit V5.podocin sowie sIg7 als Negativkontrolle, sIg7.Nephrin WT als Positivkontrolle, sIg7.Nephrin Y1193A und sIg7.Nephrin Y1193F kotransfiziert. Es folgten Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese, Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran und Inkubation mit Anti-V5-Antikörper.

Hierbei zeigte sich wie vermutet eine starke Interaktion von Podocin mit der Nephrin Y1193A Mutation. Hingegen war zwischen Podocin und der Nephrin Y1193F Mutation, welche ein ständig unphosphoryliertes Tyrosin darstellt, keine Interaktion zu beobachten (Abb. 14). Somit besitzen Podocin und β -Arrestin2 genau entgegengesetzte Bindungseigenschaften, was den Phosphorylierungsstatus des Tyrosin Y1193 betrifft.

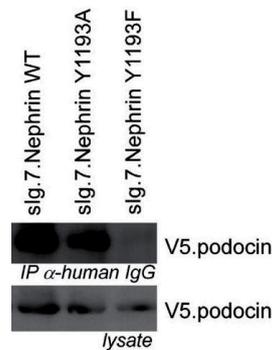


Abb. 14: Die Phosphorylierung am Nephrin Y1193 ist entscheidend für die Nephrin/Podocin-Interaktion. HEK 293T-Zellen wurden mit Nephrin Wildtyp, den Nephrin-Mutanten Y1193A und Y1193F sowie Podocin kotransfiziert. Nephrin wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert, die Immunkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Anti-V5-Antikörpern inkubiert. Im Western Blot ist eine deutliche Interaktion von Y1193A und Podocin nachweisbar, welche zwischen Y1193F und Podocin nicht besteht. Links: Positivkontrolle mit Nephrin WT. Unten: Lysate zum Nachweis gleicher Podocin-Expression.

3.5 PP2 führt in vivo zu einer erhöhten Albuminurie

Wie oben gezeigt, führt eine Dephosphorylierung des Tyrosin Y1193 von Nephrin zu einer verstärkten Interaktion mit β -Arrestin2. Unsere Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass *in vitro* die Interaktion von β -Arrestin2 mit Nephrin zur Endozytose und Entfernung von Nephrin von der Zelloberfläche führt. Wäre diese Interaktion auch an der glomerulären Schlitzmembran *in vivo* von Relevanz, bedeutete dies, dass eine vermehrte Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion zu einer gesteigerten Internalisierung von Nephrin von der podozytären

Zellmembran und damit zu einer erhöhten Löchrigkeit der Schlitzmembran führt. Daraus folgend käme es zu einer vermehrten Ausscheidung von Blutbestandteilen im Urin, die normalerweise aufgrund ihrer Größe nicht oder nur in geringen Mengen von der glomerulären Schlitzmembran filtriert werden, z.B. Albumin.

Um dies zu überprüfen wurden 30 männliche balb/c-Mäuse zufällig in zwei Gruppen mit jeweils 15 Tieren aufgeteilt. Die Verumgruppe erhielt einmalig zum Zeitpunkt 0 eine intraperitoneale Injektion mit PP2 (5 mg/kg Körpergewicht), einem spezifischen Tyrosin-Kinase-Inhibitor, gelöst in 0,125 ml 80 %igen DMSO. Die Kontrollgruppe erhielt eine einmalige intraperitoneale Injektion zum Zeitpunkt 0 nur mit 0,2 ml 50 %igen DMSO.

Anschließend wurde bei allen Tieren der beiden Gruppen zum Zeitpunkt 3, 6, 9 und 12 Stunden nach Injektion Spontanurin gewonnen. Die Urinproben wurden daraufhin auf ihre Albuminkonzentration analysiert.

Für jede Gruppe (Kontrolle vs. PP2) und Probenzeitpunkt (0, 3, 6, 9, 12 Stunden nach Injektion) wurde aus den gemessenen Albuminkonzentrationen ein Mittelwert errechnet und in ein Diagramm aufgetragen (Abb. 15).

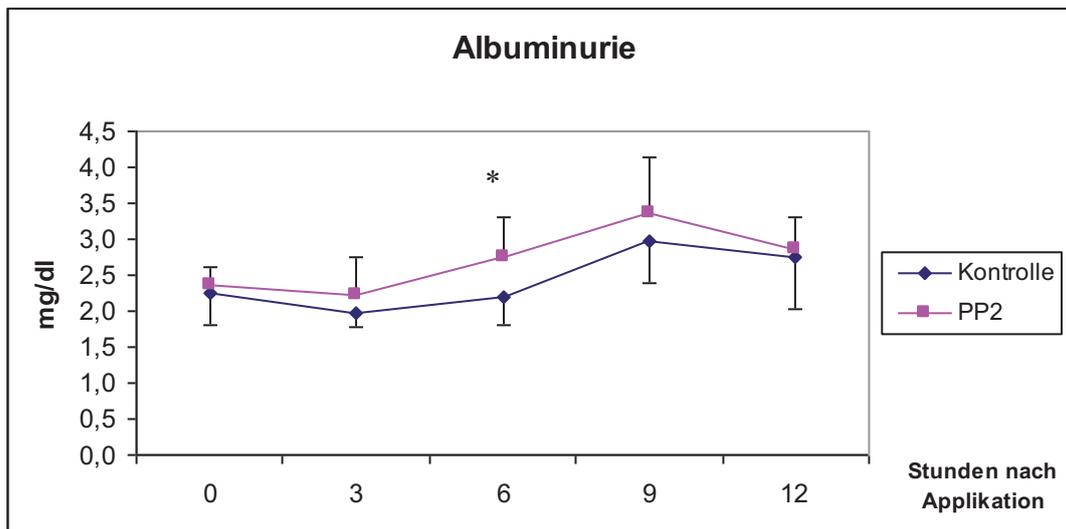


Abb. 15: Die Grafik zeigt die Albuminausscheidung bei balb/c-Mäusen im zeitlichen Verlauf nach einmaliger intraperitonealer PP2 bzw. DMSO-Injektion. Zu erkennen ist eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Zunahme der Albuminurie nach PP2-Injektion bis zum Zeitpunkt 6 h nach Injektion. Danach verschwindet dieser Unterschied wieder.

Es zeigt sich, dass vor der PP2/DMSO-Injektion eine gleich hohe Albuminausscheidung beider Gruppen vorliegt. 6 Stunden nach Injektion kommt es dann zunächst zu einer signifikant erhöhten Exkretion von Albumin im Urin in der PP2-Gruppe (t-test, $P < 0,05$). Dieser Effekt verschwindet jedoch nach 12 Stunden, und die Konzentrationen der Albuminausscheidung beider Gruppen gleichen sich wieder an.

4. Diskussion

Der glomeruläre Filter, der Ort der Ultrafiltration des Plasmas, besteht aus drei Einheiten: Dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillarschlingen, der Basalmembran und schließlich der Schlitzmembran, die von den Fußfortsätzen der Podozyten gebildet wird (Pavenstadt et al., 2003).

Bis vor wenigen Jahren herrschte noch Unklarheit über den molekularen Aufbau der podozytären Schlitzmembran. Kestila et al. konnten zeigen, dass Mutationen im *NPHS1*-Gen, welches für Nephrin kodiert, zum kongenitalen nephrotischen Syndrom mit schwerer Proteinurie führen (Kestila et al., 1998). Diese Entdeckung führte zu einem völlig neuen Verständnis der glomerulären Schlitzmembran und warf ein neues Licht auf die Pathogenese von vielen Nierenerkrankungen mit Proteinurie wie Glomerulonephritis, diabetischer Nephropathie oder hypertensiver Nierenerkrankungen (Tryggvason et al., 2006). Bei diesen Erkrankungen ist der Grad der Proteinurie ein entscheidender prognostischer Faktor. Eine schwere Proteinurie führt zu einem schnelleren Verlust der Nierenfunktion und früher zur terminalen Niereninsuffizienz (Peterson et al., 1995).

Es wird diskutiert, dass eine veränderte Funktion von Nephrin oder anderen Molekülen der glomerulären Schlitzmembran wie CD2AP, Podocin, NEPH1 und NEPH2 eine entscheidende pathophysiologische Rolle bei proteinurischen Erkrankungen spielt (Shih et al., 1999; Boute et al., 2000; Sellin et al., 2003). Doublier et al. z.B. erbrachten den Nachweis für eine verminderte glomeruläre Expression von Nephrin als frühzeitiges Ereignis beim Diabetes mellitus (Doublier et al., 2003). Doch sind Mechanismen, an denen Veränderungen der Nephrinfunktion mit einer Proteinurie beteiligt sind, bisher größtenteils unbekannt.

Nephrin ist ein Typ-1-Transmembranrezeptor und bildet mit seinen homophilen Interaktionen das Rückgrat der Schlitzmembran (Gerke et al., 2003; Khoshnoodi et al., 2003). Huber et al. konnten zeigen, dass Nephrin nicht nur ein Strukturprotein darstellt, sondern auch Signaltransduktionsfunktion besitzt. Eine Interaktion mit Podocin verstärkt dabei die Signaltransduktion (Huber et al., 2001).

Am intrazellulären C-Terminus von Nephrin gibt es drei mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsstellen für Kinasen der Src-Familie (Li et al., 2004). Es ist bekannt, dass die Src-Kinasen Fyn, Src und Yes in Podozyten exprimiert werden und Nephrin am C-Terminus Tyrosin-phosphorylieren (Verma et al., 2003). Lahdenpera et al. konnten zeigen,

dass diese Phosphorylierung durch Clustern von Nephrin-Molekülen mittels extrazellulärer Antikörper induziert wird. (Lahdenpera et al., 2003).

Bislang konnte jedoch kein Mechanismus dargelegt werden, der eine Regulation des Nephrin-Moleküls im Sinne einer Rezeptor-Desensitivierung erklärt.

β -Arrestine sind 46 kD kleine Adapter-Proteine, welche u.a. Typ-1-Transmembranrezeptoren regulieren und zur Rezeptorinternalisierung führen (Chen et al., 2003; Spiegel 2003). Für Nephrin als Typ-1-Transmembranrezeptor war eine Interaktion mit β -Arrestin2 bisher nicht bekannt. Lahdenpera et al. präzipitierten 2003 bereits ein \sim 46 kD großes Tyrosinphosphoryliertes Molekül mit Nephrin, ohne jedoch zu wissen worum es sich dabei handelt (Lahdenpera et al., 2003).

Wir konnten hier zeigen, dass β -Arrestin2 in Podozyten exprimiert wird und mit Nephrin interagiert. Die Nephrin-Bindungsstelle für β -Arrestin2 liegt hierfür bei Nephrin 1118-1120. Bisher war β -Arrestin2 nur als Interaktionspartner für Typ-7-Transmembranrezeptoren bekannt. Wesentliche Funktionen von β -Arrestin2 sind dabei die Rezeptordesensitivierung, Clathrin-vermittelte Endozytose und Signaltransduktion (Attramadal et al., 1992; Benovic et al., 1987; Claing et al., 2001; Goodman et al., 1996; Laporte et al., 1999; Lohse et al., 1990; McDonald et al., 1999). Eine Interaktion von β -Arrestin2 mit Typ-1-Transmembranrezeptoren konnten bereits Chen et al. erstmals anhand des TGF- β -III-Rezeptors nachweisen. Die Bindungsstelle von β -Arrestin2 liegt am TGF- β -III-Rezeptor in einer Serin- und Threoninreichen Region (Chen et al., 2003). Auch bei vielen anderen Transmembranrezeptoren waren solche Serin/Threonin-Regionen an der β -Arrestin2-Interaktionsstelle nachzuweisen (Oakley et al., 2001). So ist es nicht überraschend, dass an der Nephrin-Bindungsstelle für β -Arrestin2 ebenfalls ein Threonin am Nephrin 1120 existiert.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Nephrin/ β -Arrestin2-Interaktion abhängig vom Phosphorylierungsstatus am Nephrin Y1193 ist. Ist Nephrin Y1193 dephosphoryliert kommt es zu einer Verstärkung, ist es phosphoryliert zu einer Abschwächung der Interaktion. Genau umgekehrt verhält es sich bei der Interaktion von Nephrin mit Podocin.

Die am meisten bekannte C-terminale Nephrin-Mutation R1160X reicht aus um den vollen klinischen Phänotyp des nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ herbeizuführen (Beltcheva et al. 2001; Patrakka et al., 2000). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der

Aminosäuren am Nephrin C-Terminus, welche die β -Arrestin2 und Podocin Regulationsstelle beinhalten.

In dieser Arbeit konnte nun ein völlig neues dynamisches Modell der glomerulären Schlitzmembran dargestellt werden. Verliert Nephrin den Kontakt zu seinem extrazellulärem Partner (Nephrin, NEPH1 oder NEPH2) in der glomerulären Schlitzmembran, führt dies zu einer verminderten intrazellulären Interaktion mit Podocin zugunsten einer verstärkten Nephrin/ β -Arrestin2-Bindung. In unserer Arbeitsgruppe konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Bindung zu einer Endozytose der an β -Arrestin2 gebundenen Nephrin-Moleküle führt und die Nephrin abhängige Signaltransduktion vermindert (Quack et al., 2006).

Dieses dynamische Modell passt zu der bisher vermuteten Funktion von Nephrin als strukturellen Sensor für die Intaktheit der glomerulären Schlitzmembran. Ist die Schlitzmembran kaputt und verliert Nephrin seinen normalen extrazellulären Kontakt oder befindet sich Nephrin an der falschen Stelle der Podozytenoberfläche, kommt es zu verminderter Tyrosin-Phosphorylierung am Nephrin C-Terminus und β -Arrestin2 bindet an das extrazellulär ungebundene Nephrin um dessen Endozytose einzuleiten. Die Nephrin abhängige Signaltransduktion wird dadurch beendet. Ist die Schlitzmembran hingegen intakt, wird Nephrin am Tyrosin 1193 phosphoryliert und β -Arrestin2 kann schlechter binden. Dafür sprechen auch die Beobachtungen von Jones et al., wonach bei Ratten mit einer intakten Nierenfunktion das Tyrosin 1193 stark phosphoryliert ist (Jones et al., 2009).

Dieses Modell erlaubt eine dynamische Regulation des Gleichgewichts zwischen Auf- und Abbau der Schlitzmembran, welche durch die Aktivität der Src-Kinasen kontrolliert wird.

Für die Relevanz dieses Modells *in vivo* sprechen eine Reihe von Studien an Tieren. So zeigten Mäuse mit einem Knockout für die Src-Kinasen Fyn/Yes einen glomerulären Schaden mit einer massiven Proteinurie (Verma et al., 2003; Stein et al., 1994). Hierbei war die Nephrin-Phosphorylierung der glomerulären Anteile in Yes-defizienten Mäusen erhöht, während die Nephrin-Phosphorylierung in Fyn-defizienten Mäusen erniedrigt war. Die Nephrin-Phosphorylierung nahm hingegen in Mäusen mit gleichzeitiger Yes- und Fyn-Defizienz nicht weiter ab. Dies spricht für eine dominante Rolle von Fyn bei der Phosphorylierung von Nephrin.

In Einklang hiermit konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass Mäuse nach intraperitonealer Injektion von PP2, einem spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor, eine vermehrte Albuminurie entwickelten. Diese vermehrte Albuminurie ist nach einmaliger Injektion jedoch nach

wenigen Stunden reversibel und unterstreicht die dynamische Regulation unseres Modells. Der albuminurische Effekt könnte jedoch auch unspezifischer Natur sein und kann nicht unmittelbar auf die Dephosphorylierung von Nephrin zurückgeführt werden. Dafür bedarf es weiterer Versuche, z.B. indem die Glomeruli der Versuchsmäuse nach PP2-Injektion gewonnen und der Phosphorylierungsstatus von Nephrin im entsprechenden Zelllysate beurteilt wird.

Aus dem klinischen Alltag ist bekannt, dass es bei Patienten unter der Therapie mit monoklonalen Anti-Vascular-Endothelial-Growth-Factor(VEGF)-Antikörpern vermehrt zu einer Proteinurie kommt (Zhu et al., 2007). Fan et al. konnten nun in einem Rattenmodell zeigen, dass durch eine Adriamycin induzierte Nephropathie die VEGF-Expression im renalen Kortex abnimmt und konsekutiv die Nephrin-Phosphorylierung vermindert ist. Umgekehrt erhöht sich die Nephrin-Phosphorylierung bei steigender VEGF-Expression (Fan et al., 2009).

Unsere Beobachtungen deuten somit auf eine dynamisch regulierte glomeruläre Schlitzmembran hin, in der Nephrin auf extrazelluläre Bedingungen reagieren kann und dem Podozyten die Integrität der Schlitzmembran vermittelt. Dies könnte ein Erklärungsansatz für das transiente Auftreten einer Proteinurie bei erworbenen glomerulären Erkrankungen sein. Die Phosphorylierung von Nephrin Y1193 durch Src-Kinasen scheint dabei eine entscheidende Rolle beim Wechsel zwischen der Interaktion von Nephrin mit Podocin und β -Arrestin2 zu spielen. Dieser Mechanismus kontrolliert vermutlich die Integrität der Schlitzmembran. Um diese Integrität der Schlitzmembran zu verbessern, wäre die pharmakologische Modulation des Phosphorylierungsstatus von Nephrin Y1193 eine mögliche Strategie bei Erkrankungen mit Proteinurie.

5. Zusammenfassung

Nephrin ist ein transmembranäres Protein der Immunglobulin-Superfamilie und bildet eine wesentliche strukturelle Komponente der glomerulären Schlitzmembran. Mutationen im *NPHS1-Gen*, welches für Nephrin kodiert, führen zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ mit schwerer Proteinurie. β -Arrestin2 ist ein ubiquitäres zytosolisches Protein, welches mit Transmembranrezeptoren interagiert und zu deren Internalisierung führt. In dieser Arbeit konnte ein neues, dynamisches Modell der glomerulären Schlitzmembran entwickelt werden, bei der erstmals gezeigt werden konnte, dass Nephrin mit β -Arrestin2 interagiert. Der Phosphorylierungsstatus von Nephrin Y1193 reflektiert hierbei die Intaktheit der Schlitzmembran. Ist das Tyrosin von Nephrin Y1193 dephosphoryliert bindet β -Arrestin2 an Nephrin, genauer gesagt am Nephrin-Abschnitt 1118-1120, und führt zur Endozytose von Nephrin und Beendigung der Nephrin-abhängigen Signaltransduktion. Yes, eine Kinase aus der Familie der Src-Kinasen, hemmt diese Interaktion durch Phosphorylierung am Nephrin Y1193 und begünstigt die Bindung von Podocin, einem zur Stabilisierung der Schlitzmembran beitragenden Protein, an Nephrin.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diesem Modell auch *in vivo* eine bedeutende Rolle zufallen könnte: PP2, ein spezifischer Tyrosin-Kinase-Inhibitor, führt bei *balb/c*-Mäusen zu einer temporär vermehrten Albuminurie, was die Wichtigkeit des Phosphorylierungsstatus von Nephrin Y1193 unterstreicht und die Schlitzmembran als ein dynamisch reguliertes Modell darstellt.

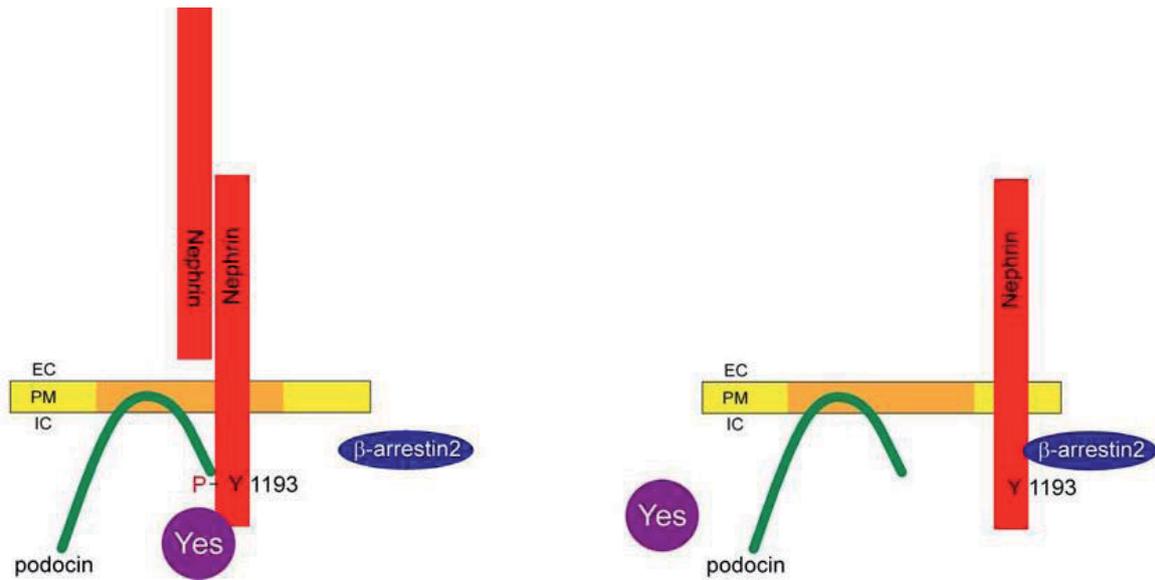


Abb. 16: Die Podocin- und β -Arrestin2-Interaktion mit Nephrin in Abhängigkeit vom Nephrin Y1193-Phosphorylierungsstatus. Links: Die Schlitzmembran ist intakt. Nephrin interagiert mit seinem extrazellulären Partner, wird phosphoryliert und β -Arrestin2 kann nicht binden, wohingegen Podocin mit Nephrin interagiert. Rechts: Nephrin hat den Kontakt zu seinem extrazellulären Partner verloren. Daraus folgt eine Dephosphorylierung und β -Arrestin2 bindet an Nephrin, wobei die Bindung von Nephrin zu Podocin beendet wird.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
C-terminal	Carboxyl-terminal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GRK	G-Protein-gekoppelte Kinase
HEBS	HEPES buffered saline
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992). β -Arrestin2, a novel member of the Arrestin/ β -Arrestin gene family. *J Biol Chem.* 267, 17882-17890.

Barletta, G. M., Kovari, I. A., Verma, R. K., Kerjaschki, D., and Holzman, L. B. (2003). Nephric and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem* 278, 19266-19271.

Beltcheva O, Martin P, Lenkkeri U, Tryggvason K (2001). Mutation spectrum in the nephric gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome. *Hum Mutat.* 17, 368-373.

Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987). Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein Arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 8879-8882.

Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M. C., Niaudet, P., and Antignac, C. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24, 349-354.

Caulfield, J. P., Reid, J. J., and Farquhar, M. G. (1976). Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Lab Invest* 34, 43-59.

Chen W, Kirkbride KC, How T, Nelson CD, Mo J, Frederick JP, Wang XF, Lefkowitz RJ, Blobel GC (2003). β -Arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- β receptor and down-regulation of its signaling. *Science.* 301, 1394-1397.

Clain A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT, Lefkowitz RJ (2001). β -Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and β 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem.* 276, 42509-42513.

Daniels, B. S., Deen, W. M., Mayer, G., Meyer, T., and Hostetter, T. H. (1993). Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest* 92, 929-936.

Donoviel, D. B., Freed, D. D., Vogel, H., Potter, D. G., Hawkins, E., Barrish, J. P., Mathur, B. N., Turner, C. A., Geske, R., Montgomery, C. A., et al. (2001). Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 21, 4829-4836.

Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, Camussi G (2003). Nephlin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes*. 52, 1023-1030.

Drumond, M. C., and Deen, W. M. (1994). Structural determinants of glomerular hydraulic permeability. *Am J Physiol* 266, F1-12.

Fan Q, Xing Y, Ding J, Guan N (2009). Reduction in VEGF protein and phosphorylated nephrin associated with proteinuria in adriamycin nephropathy rats. *Nephron Exp Nephrol*. 111, e92-e102.

Feldt-Rasmussen B, Dinesen B, Deckert M (1985). Enzyme immunoassay: an improved determination of urinary albumin in diabetics with incipient nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest*. 45, 539-544.

Gerke, P., Huber, T. B., Sellin, L., Benzing, T., and Walz, G. (2003). Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 14, 918-926.

Gerke P, Sellin L, Kretz O, Petraschka D, Zentgraf H, Benzing T, Walz G. (2005). NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol*.16, 1693-1702.

Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL (1996). β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature*. 383, 447-50.

Gultekin, H., and Heermann, K. H. (1988). The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 172, 320-329.

Holthofer, H., Ahola, H., Solin, M. L., Wang, S., Palmén, T., Luimula, P., Miettinen, A., Kerjaschki, D. (1999). Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol* 155, 1681-1687.

Holzman, L. B., St John, P. L., Kovari, I. A., Verma, R., Holthofer, H., and Abrahamson, DR. (1999). Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 56, 1481-1491.

Huang, T. W., and Langlois, J. C. (1985). Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *J Exp Med* 162, 245-267.

Huber, T. B., Kottgen, M., Schilling, B., Walz, G., and Benzing, T. (2001). Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 276, 41543-41546.

Huber, T. B., Simons, M., Hartleben, B., Sernetz, L., Schmidts, M., Gundlach, E., Saleem, M. A., Walz, G., and Benzing, T. (2003). Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet* 12, 3397-3405.

Hudson, B. G., Reeders, S. T., and Tryggvason, K. (1993). Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268, 26033-26036.

Huttunen, N. P. (1976). Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients. *Arch Dis Child* 51, 344-348.

Inoue, T., Yaoita, E., Kurihara, H., Shimizu, F., Sakai, T., Kobayashi, T., Ohshiro, K., Kawachi, H., Okada, H., Suzuki, H., et al. (2001). FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 59, 1003-1012.

Jones N, New LA, Fortino MA, Eremina V, Ruston J, Blasutig IM, Aoudjit L, Zou Y, Liu X, Yu GL, Takano T, Quaggin SE, Pawson T. (2009). Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier. *JASN*

Kanwar, Y. S., and Farquhar, M. G. (1979). Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1303-1307.

Karnovsky MJ, Ainsworth SK. (1972). The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 2, 35-60.

Kerjaschki, D. (2001). Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 108, 1583-1587.

Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., et al. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1, 575-582.

Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, Skoglund U, Obrink B, Wartiovaara J, Tryggvason K (2003). Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol.* 163(6), 2337-2346.

Kricka, L. J. (1993). Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clin Biochem* 26, 325-331.

Kurzchalia TV, Parton RG (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11, 424-431

Lahdenpera J, Kilpeläinen P, Liu XL, Pikkarainen T, Reponen P, Ruotsalainen V, Tryggvason K (2003). Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases. *Kidney Int.* 64, 404-413.

Li H, Lemay S, Aoudjit L, Kawachi H, Takano T (2004). SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin. *J Am Soc Nephrol.* 15, 3006-3015.

Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS (2003). NEPH1 an nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of the glomerular permeability. *J Clin Invest.* 112, 209-221.

Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990). β -Arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science.* 248, 1547-1550.

Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 177-183.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002). The role of β -Arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 115, 455-465.

McDonald PH, Cote NL, Lin FT, Premont RT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1999). Identification of NSF as a β -Arrestin1-binding protein. Implications for β 2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem.* 274, 10677-10680.

Michael, A. F., Blau, E., and Vernier, R. L. (1970). Glomerular polyanion. Alteration in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 23, 649-657.

Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999). Association of β -Arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 274, 32248-32257.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G-protein-coupled receptor- β -Arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem.* 276, 19452-60.

Patrakka J, Kestilä M, Wartiovaara J, Ruotsalainen V, Tissari P, Lenkkeri U, Männikkö M, Visapää I, Holmberg C, Rapola J, Tryggvason K, Jalanko H (2000). Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int* 58, 972-980.

Pavenstadt, H. (1998). The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes. *Exp Nephrol* 6, 98-103.

Pavenstadt, H., Kriz, W., and Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83, 253-307.

Perry SJ, Lefkowitz RJ (2002). Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol.* 12, 130-138.

Peterson JC, Adler S, Burkart JM, Greene T, Hebert LA, Hunsicker LG, King AJ, Klahr S, Massry SG, Seifter JL (1995). Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Ann Intern Med.* 123, 754-762.

Putaala, H., Soininen, R., Kilpelainen, P., Wartiovaara, J., and Tryggvason, K. (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 10, 1-8.

Quack I, Rump LC, Gerke P, Walther I, Vinke T, Vonend O, Grunwald T, Sellin L (2006). β -Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 14110-14115.

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.

Rodewald, R., and Karnovsky, M. J. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60, 423-433.

Roselli, S., Gribouval, O., Boute, N., Sich, M., Benessy, F., Attie, T., Gubler, M. C., and Antignac, C. (2002). Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 160, 131-139.

Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkeri, U., Kestila, M., Jalanko, H., Holmberg, C., and Tryggvason, K. (1999). Nephricin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7962-7967.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74, 5463-5467.

Sawada, H., Stukenbrok, H., Kerjaschki, D., and Farquhar, M. G. (1986). Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am J Pathol* 125, 309-318.

Schnabel, E., Anderson, J. M., and Farquhar, M. G. (1990). The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 111, 1255-1263.

Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M. A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A. S., Holzman, L. B., and Mundel, P. (2001). Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108, 1621-1629.

Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstädt H, Walz G (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J*. 17, 115-117

Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003). Multifaceted roles of β -Arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*. 375, 503-515.

Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2005). Receptor regulation: β -Arrestin moves up a notch. *Nat Cell Biol*. 7, 1159-1161.

Shih, N. Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M. L., Kanagawa, O., Miner, J. H., and Shaw, A. S. (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286, 312-315.

Shih, N. Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J. H., and Shaw, A. S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159, 2303-2308.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19, 7289-7304

Spiegel A (2003). Cell signaling. β -Arrestin--not just for G protein-coupled receptors. *Science*. 301, 1338-1339.

Stein PL, Vogel H, Soriano P (1994). Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev.* 8, 1999-2007.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

Tryggvason, K. (1999). Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10, 2440-2445.

Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med.* 354, 1387-1401.

Verma, R., Wharram, B., Kovari, I., Kunkel, R., Nihalani, D., Wary, K. K., Wiggins, R. C., Killen, P., and Holzman, L. B. (2003). Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem* 278, 20716-20723.

Yurchenco, P. D., and O'Rear, J. J. (1994). Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 6, 674-681.

8. Publikationsliste

Quack I, Rump LC, Gerke P, Walther I, **Vinke T**, Vonend O, Grunwald T, Sellin L (2006). β -Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103, 14110-14115.

Sitek B, Potthoff S, Schulenburg T, Stegbauer J, **Vinke T**, Rump LC, Meyer HE, Vonend O, Stühler K (2006). Novel approaches to analyse glomerular proteins from smallest scale murine and human samples using DIGE saturation labelling. **Proteomics** 6, 4337-4345.

9. Lebenslauf

Tobias Vinke

Persönliche Daten

Anschrift: Eppelheimer Straße 67
69123 Heidelberg

Geburtsdatum: 25.06.1982

Geburtsort: Minden

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1988-1992 Grundschule Friedewalde

1992-2001 Städtisches Gymnasium Petershagen

2001 Abitur

Zivildienst

07/2001-05/2002 Klinikum Minden, Innere Medizin Station Med. IV

Studium

10/2002-09/2004 Vorklinische Medizin an der Ruhr-Universität Bochum

09/2004 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2004-07/2007 Klinische Medizin an der Ruhr-Universität Bochum

08/2007-07/2008 Praktisches Jahr am St. Josefs Hospital Bochum

11/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

Beruf

Seit 01/2009 Assistenzarzt der Kinderklinik I am Universitätsklinikum
Heidelberg

Famulaturen, Praktika, Forschung

03/2005 Molekularbiologisches Praktikum in der Experimentellen
Nephrologie des Zentrum für klinische Forschung Ruhr-
Universität Bochum

04/2005-12/2007 Forschung im molekularbiologischen Labor der Experimentellen
Nephrologie von Prof. Rump:
Signaltransduktion an der glomerulären Schlitzmembran

09/2005 Famulatur Allgemeinpädiatrie Klinikum Minden

08/2006 Famulatur Gastroenterologie Klinikum Minden

09/2006 Famulatur Unfallchirurgische Notfallaufnahme Bergmannsheil
Bochum

03/2007 Famulatur Nephrologie Marienhospital Herne

07/2007 Famulatur Pädiatrische Hämato-/Onkologie
Universitätsklinikum Freiburg

10. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Lars Christian Rump für die Überlassung dieses spannenden und interessanten Themas.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Lorenz Sellin und Herrn Dr. Ivo Quack für die exzellente Betreuung vor, während und nach den Experimenten, sowie für das zügige und dennoch kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bettina Priesch und Blanka Duvnjak danke ich für die wertvolle Unterstützung bei technischen Fragen.

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Oliver Vonend, durch den ich erst an diese Arbeit gekommen bin.

Auch bei allen anderen Ärzten, MTAs, Doktoranden und sonstigen Kollegen bedanke ich mich für die tollen 2 ½ Jahre in unserem Labor.

Meinem Bruder Daniel danke ich für die geduldige Hilfe bei jedweden Hard- und Softwareproblemen.

Ein Extra-Danke geht an den Subway in Bochum, der mir stets die für diese Arbeit notwendige kalorische Energie bereitgestellt hat.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich zu jeder Zeit bei meinen Vorhaben unterstützt hat.