

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

Untersuchung von PKC α als Schlüsselprotein
der β -Arrestin2 vermittelten
Nephrin-Endozytose

Dissertation

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

vorgelegt von
Romy Lilian Palmer
2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf, Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Quack

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Schott

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Quack, I.; Woznowski, M.; Potthoff, S. A.; Palmer, R.; Königshausen, E.; Sivritas, S.; Schiffer, M.; Stegbauer, J.; Vonend, O., Rump, L. C. and Sellin, L. (2011). PKC α Mediates β -Arrestin2-dependent Nephritin Endocytosis in Hyperglycemia. *Journal of Biological Chemistry* 286, 12959-12970.

Zusammenfassung

Studien zur Pathogenese der diabetischen Nephropathie konnten zeigen, dass das transmembranäre Protein Nephrin eine zentrale Rolle bei primären Veränderungen an der Schlitzmembran, welche zur Entwicklung von Mikroalbuminurie führen, einnimmt. Für ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Entstehung der diabetischen Nephropathie sind die Erforschung der beteiligten Proteine und deren Interaktoren entscheidend. Ziel der Arbeit ist es, die Rolle von Hyperglykämie für die Endozytose von Nephrin zu charakterisieren und Interaktionspartner zu identifizieren.

Dazu wurden Co-Immunopräzipitations-Experimente mit HEK 293T-Zellen, immortalisierten murinen Podozyten sowie Nierenlysat aus C57Bl/6-Mäusen durchgeführt. Nephrin interagiert mit dem zytosolischen Protein β -Arrestin2, welches die Endozytose von Nephrin einleitet und zur Internalisierung von Nephrin führt. Durch die Endozytose von Nephrin wird der glomeruläre Filter durchlässig, welches zur Entwicklung einer Albuminurie führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Interaktion von Nephrin mit β -Arrestin2 unter hohen Glukosespiegeln verstärkt wird. Dabei spielen PKC α und PICK1 eine entscheidende Rolle für die Endozytose von Nephrin und es konnte aufgezeigt werden, dass sie einen Komplex mit Nephrin und β -Arrestin2 bilden. PICK1 bindet dabei mit seiner PDZ-Domäne an die Nephrin-Domäne 1160-1176 und kann so als Adapter PKC α an den C-Terminus von Nephrin rekrutieren. Die Verwendung des PKC α -Inhibitors Safingol schwächt die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin nachweislich. Es konnte nachgewiesen werden, dass es unter hohen Glukosespiegeln unmittelbar zu einer Hochregulation von PKC α in Maus-Podozyten kommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Nephrin/PKC α /PICK1/ β -Arrestin2-Proteinkomplex auch *in vivo* eine entscheidende Rolle spielen könnte. Endogenes β -Arrestin2 präzipitiert endogenes Nephrin in konzentrationsabhängiger Weise. In PKC α -defizienten Maus-Podozyten konnte nur eine schwache Bindung von β -Arrestin2 festgestellt werden, welches die regulatorische Rolle von PKC α für die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung unterstreicht.

Zusammenfassend bieten die von uns identifizierten Signalwege ein molekulares Modell für die Hyperglykämie-induzierte Nephrin-Endozytose und daraus folgende Mikroalbuminurie.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere.....	1
1.2 Nephrin als Rückgrat der glomerulären Schlitzmembran.....	5
1.3 β -Arrestin2	9
1.4 Die Proteinkinase C α	10
1.5 Das Protein PICK1	12
1.6 Zielsetzung und Vorgehensweise der Arbeit	14
2. Materialien, Lösungen und Methoden	16
2.1 Materialien und Lösungen.....	16
2.1.1 Zellkultur	16
2.1.2 Transfektion.....	16
2.1.3 Eukaryonte Expressionsvektoren/Plasmide.....	17
2.1.4 Zellyse	17
2.1.5 Stimulanzen und Inhibitoren	18
2.1.6 Co-Immunopräzipitation	18
2.1.7 Biotinylierung.....	18
2.1.8 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	19
2.1.8.1 Puffer.....	19
2.1.8.2 Antikörper	19
2.1.8.3 Visualisierungslösung	20
2.1.9 DNA-Subklonierung	21
2.1.9.1 PCR	21
2.1.9.2 Ligation	21

2.1.9.3	Materialien für Transformation und Amplifikation	22
2.1.9.4	Materialien für Minikultur und Minipräparation	22
2.1.9.5	Materialien für Maxikultur und Maxipräparation	23
2.1.10	Mäuse	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.1.1	HEK 293T-Zellen.....	24
2.2.1.2	Konditionell immortalisierte Maus-Podozyten.....	24
2.2.2	Transfektion.....	25
2.2.3	Zellernte.....	25
2.2.4	Co-Immunopräzipitation	26
2.2.4.1	Co-Immunopräzipitation mit HEK 293T-Zellen und immortalisierten Maus-Podozyten.....	26
2.2.4.2	Co-Immunopräzipitation endogener Proteine aus Mäusenieren... ..	27
2.2.5	Biotinylierung.....	27
2.2.6	SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	28
2.2.7	DNA-Subklonierung	29
2.2.7.1	PCR	29
2.2.7.2	Ligation	30
2.2.7.3	Transformation und Amplifikation	31
2.2.7.4	Minikultur und Minipräparation	31
2.2.7.5	Maxikultur und Maxipräparation	32
2.2.8	Typ I Diabetesmodell an Mäusen.....	33
2.2.9	Statistik.....	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Einfluss von Hyperglykämie für die Endozytose von Neph rin	34
3.2	Bedeutung von β -Arrestin2 für die Endozytose von Neph rin bei Hyperglykämie.. ..	36
3.3	Die Rolle von PKC α	40
3.3.1	Einfluss von PKC α auf die Interaktion von β -Arrestin2 und Neph rin unter Hyperglykämie.....	40

3.3.2 Die Interaktion von PKC α mit Nephrin	43
3.3.3 Nachweis der Hochregulation von PKC α <i>in vivo</i>	44
3.4 PICK1 als Teil des Proteinkomplexes aus Nephrin, PKC α und β -Arrestin2.....	47
3.4.1 Einfluss des zytoplasmatischen Abschnitts von Nephrin auf die Interaktion mit PICK1	47
3.4.2 Bedeutung der PDZ-Domäne von PICK1 für die Interaktion mit Nephrin.....	48
3.4.3 Die Interaktion von PICK1 mit der Nephrin-Domäne 1160-1176....	50
3.4.4 Die Interaktion von β -Arrestin2-PKC α und PICK1-PKC α	51
3.4.5 Die Interaktion von PICK1 mit β -Arrestin2.....	51
3.5 Nephrin, PICK1, PKC α und β -Arrestin2 bilden einen Komplex <i>in vivo</i>	52
4. Diskussion	55
5. Literaturverzeichnis.....	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere	2
Abb. 2:	Schematische Darstellung des Aufbaus von Nephrin.....	7
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Schlitzmembran	7
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Aufbaus der drei PKC-Isotypen	11
Abb. 5:	Domänenstruktur von PICK1	13
Abb. 6:	Einfluss von hoher Glukosekonzentration auf die Oberflächenexpression von Nephrin	35
Abb. 7:	Statistische Auswertung mittels Student's t-Test	35
Abb. 8:	Einfluss steigender Glukosekonzentration	37
Abb. 9:	Densitometrische Analyse der Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion unter steigenden Glukosekonzentrationen	37
Abb. 10:	Zeitverlauf der Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion unter Hyperglykämie	38
Abb. 11:	Osmotische Kontrolle	39
Abb. 12:	Nachweis der endogenen Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 aus Nierenlysat.....	40
Abb. 13:	Einfluss von PMA auf die Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion.....	41
Abb. 14:	Densitometrische Analyse der Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 unter PMA	41
Abb. 15:	Einfluss von Calphostin C auf die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin unter Hyperglykämie	42
Abb. 16:	Die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin nach Zugabe des PKC α -Inhibitors Safingol	43
Abb. 17:	Nephrin präzipitiert PKC α	44
Abb. 18:	Expression von PKC α in Maus-Podozyten unter hoher Glukosekonzentration	45
Abb. 19:	Densitometrische Analyse der Expression von PKC α in Podozyten unter Hyperglykämie	45
Abb. 20:	Die Expression von PKC α in Nierenlysat diabetischer Mäuse unter Hyperglykämie	46
Abb. 21:	Interaktion von PICK1 und Nephrin	47
Abb. 22:	Interaktion von Nephrin und PICK1 unter Hyperglykämie	48
Abb. 23:	Nephrin präzipitiert PICK1 Wildtyp	49
Abb. 24:	PICK1 interagiert mit der Nephrin-Domäne 1160-1176.....	50
Abb. 25:	Die Interaktion von β -Arrestin2-PKC α und PICK1-PKC α	51
Abb. 26:	Die Interaktion von PICK1 und β -Arrestin2	52
Abb. 27:	Endogene Interaktion von Nephrin und PKC α aus Nierenlysat.....	53

Abb. 28: Endogene Immunopräzipitation PKC α -defizienter Podozyten (PKC α (-/-))
und des Wildtyps (PKC α (+/+)) 54

Abb. 29: Schematische Darstellung der verstärkten Endozytose von Nephrin unter
Hyperglykämie 59

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
As	Aminosäurereste
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
BSA	bovine serum albumine/Rinderserumalbumin
C	Konzentration
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
C-terminal	Carboxyl-terminal
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
DTT	Dithiothreitol
g	Erdbeschleunigung = 9,81 m/s ²
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ECL	Enhanced chemiluminescence
FCS	fetal calf serum/fetales Kälberserum
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GluR2	Glutamat-Rezeptor Typ 2
GRK	G-Protein-gekoppelte Kinasen
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton

HEK	human embryonic kidney
HRP	Meerrettichperoxidase
LQSAV	PDZ-Bindungsmotiv von PKC α mit den As Leucin, Glutamin, Serin, Alanin, Valin
mM	Millimol
N-terminal	Amino-terminal
nM	Nanomol
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PBSCM	Phosphate buffered saline mit Calcium- und Magnesiumchlorid
PDZ	PDS-95/Dlg/ZO-1 (PDS-95/Drosophila disc large/ZO-1 homology)
PICK1	Protein Interacting with C kinase alpha 1
PKC α	Proteinkinase C α
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STZ	Streptozotocin
TGF- β -III	Transforming Growth Factor- β -III
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
μ M	Mikromol

1. Einleitung

1.1 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die Niere ist ein komplexes Organ und hat neben exkretorischen auch endokrine und metabolische Funktionen zu erfüllen. Zu den Hauptaufgaben der Niere zählen die Harnproduktion mit der Exkretion harnpflichtiger Substanzen aus dem Blut und die Konzentrierung des Harns.

Die Mehrheit der Nierenerkrankungen, die zur terminalen Niereninsuffizienz führt, hat ihre Ursache im renalen Glomerulus, dem Ort der Ultrafiltration des Plasmas. Störungen der Filtrationsbarriere und der Übertritt von Albumin in den Urin, können zu Mikroalbuminurie (20-200 mg/l im Spontanurin oder 30-300 mg/24h), einem frühen Kennzeichen der diabetischen Nephropathie führen. Mikroalbuminurie korreliert mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko (Gerstein et al., 2001; Kalaitzidis und Bakris, 2009). Die Prävalenz der diabetischen Nephropathie steigt in industrialisierten Ländern seit Jahren stetig und ist in Deutschland die häufigste Ursache einer dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz (Frei und Schober-Halstenberg, 2008). Diabetische Nephropathie führt zu einem Verlust des Proteins Nephritin und einer dadurch bedingten Störung des glomerulären Filters, die in der Entwicklung einer Mikroalbuminurie mündet (Doublier et al., 2003). Ziel dieser Arbeit ist es, die zugrundeliegenden Zusammenhänge wie Hyperglykämie die Oberflächenexpression von Nephritin beeinflusst näher aufzuzeigen und zu untersuchen, ob akute Hyperglykämie unmittelbar zu einer vermehrten Internalisierung von Nephritin führt. Durch Nachweis der Interaktion der beteiligten Proteine können neue Erkenntnisse in die Pathogenese der diabetischen Nephropathie gewonnen werden, die als Schlüssel zur Entwicklung möglicher Therapieansätze dienen könnten.

Ausgangspunkt für die in der Arbeit vorgestellten pathophysiologischen Zusammenhänge ist das Nephron, von denen es in jeder Niere ca. 1 Million gibt. Das Nephron gilt als funktionelle und strukturelle Einheit der Niere. Dieses setzt sich aus einem Gefäßknäuel spezialisierter Kapillaren, dem Glomerulus, welches von der Bowman'schen Kapsel umschlossen wird, sowie dem nachgeschalteten Tubulussystem zusammen. Aus den Glomeruli wird der Primärharn in die Bowman'sche Kapsel

abgepresst, von der aus er weiter in das Tubulussystem fließt. Die Glomeruli sind Teil des glomerulären Filters, der verhindert, dass Plasmaproteine mit dem Urin verloren gehen. Durch die negative Ladung des glomerulären Filters wird negativ geladenen Molekülen, wie der Mehrzahl der Plasmaproteine, der Übertritt in den Primärharn erschwert.

Die Filtrationsbarriere für den Primärharn gliedert sich hierbei in drei Schichten: dem fenestrierten Kapillarendothel auf der Seite des Blutes, die glomeruläre Basalmembran (GBM) und die interdigitierenden Fußfortsätze der viszeralen Epithelzellen des Glomerulus, die Podozyten (Abb. 1). Letztere stellen mit ihren Fußfortsätzen Kontakt zur GBM her. Der glomeruläre Filter ist einem Sieb ähnlich, dessen Selektivität von Größe, Gewicht und Ladung der Moleküle abhängt. Der Raum innerhalb der GBM wird von den glomerulären Kapillaren und dem Mesangium ausgefüllt. Das Mesangium gilt als Stützstruktur des Glomerulus und besteht aus Extrazellulärmatrix, in die die Mesangiumzellen eingelagert sind.

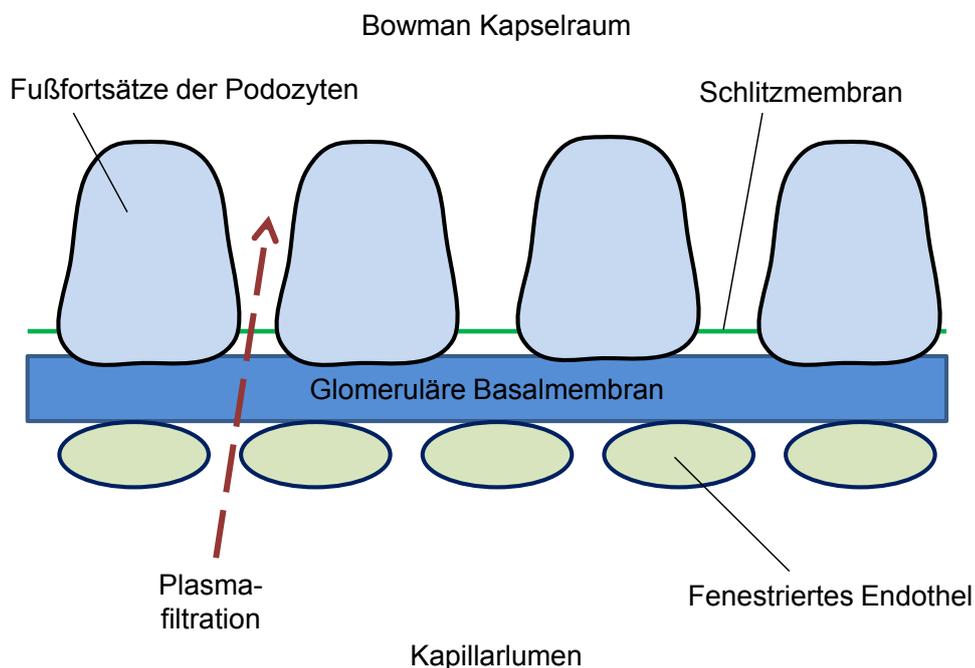


Abb. 1: Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere
Die Fußfortsätze der Podozyten sind durch die Schlitzmembran miteinander verbunden.

Das fenestrierte Kapillarendothel bildet zahlreiche Poren mit einem Durchmesser von 70-100 nm und ist an der luminalen Zellmembran mit einer Schicht aus Glykokalyx, bestehend aus negativ geladenen Sialoproteinen und Proteoglykanen, überzogen.

Die glomeruläre Basalmembran ist eine amorphe, 300-350 nm dicke extrazelluläre Schicht und besteht aus drei Schichten. Einer Kollagen Typ IV-reichen Lamina densa, die innen und außen von einer Lamina rara interna und externa begrenzt wird. Die Laminae rarae enthalten die Glykoproteine Laminin und Nidogen. Die GBM ist aufgrund von Heparansulfat-Seitenketten der Proteoglykane Agrin und Perlecan reich an negativen Ladungen und durch das Kollagen Typ IV entsteht ein kreuzvernetzendes Netzwerk, an das sich die anderen Komponenten anheften und ein dichtes Maschenwerk bilden, welches mechanische Stabilität verleiht (Hudson et al., 1993; Tryggvason, 1999).

Podozyten sind differenzierte viszerale Epithelzellen auf der Harnseite des Glomerulus, welche die Fähigkeit zur mitotischen Teilung verloren haben. Sie können sich durch Zellhypertrophie adaptieren und bestehen aus einem Zellkörper und Primärfortsätzen, die sich wiederum in Sekundärfortsätze verzweigen. Die Sekundärfortsätze, auch Fußfortsätze genannt, umschließen die glomerulären Kapillarschlingen und interdigitieren mit den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten, so dass sich ein dichtes Netzwerk um die Kapillarschlingen des Glomerulus bildet (Pavenstädt, 1998; Tryggvason und Wartiovaara, 2001). Die aneinander grenzenden Fußfortsätze werden durch einen etwa 30 bis 40 nm breiten Spalt getrennt. Dieser Filtrationsschlitz wird von einer elektronendichten Membran, der Schlitzmembran, überbrückt (Rodewald und Karnovsky, 1974; Pavenstädt et al., 2003). Die Schlitzmembran ist ein Zell-Zellkontakt, dessen Porengröße die Durchlässigkeit für Proteine bei etwa 70 kDa limitiert und der die Podozytenmembran in einen basalen und einen luminalen Abschnitt unterteilt. Die luminalen Zellmembran der Fußfortsätze ist wie beim Kapillarendothel von einer dicken negativ geladenen Glykokalyx überzogen, die in hoher Konzentration Sialoglykoproteine, insbesondere Podocalyxin und Podoendin enthält.

Basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde von Rodewald und Karnovsky ein Modell der Schlitzmembran entwickelt. Dabei besteht die Schlitzmembran aus stabförmigen Untereinheiten, die sich zwischen den Fußfortsätzen ausspannen und sich reißverschlussartig überlappen. Die implizierten Poren haben dabei ungefähr die Größe eines Albuminmoleküls (Rodewald und Karnovsky, 1974). Bisherige Analysen der Schlitzmembran mit einer hochauflösenden elektronentomographischen Methode legen nahe, dass Moleküle der Schlitzmembran diese reißverschlussartige Struktur mit einer konstanten Breite von etwa 40 nm formen

und konnten die vermutete Zusammensetzung der Schlitzmembran bestätigen (Wartiovaara et al., 2004; Tryggvason et al., 2006). Die Filtrationsbarriere ist größen- und ladungsselektiv; hierbei ist sie zum großen Teil durchlässig für Wasser und kleine Moleküle, wohingegen größere Moleküle wie Plasmaproteine im Blut zurückgehalten werden. Es wird angenommen, dass die Größenselektivität maßgeblich von der Schlitzmembran abhängt, wohingegen die geringe Durchlässigkeit für die mehrheitlich negativ geladenen Plasmaproteine sowohl von Endothel, GBM, als auch von der Schlitzmembran hervorgerufen wird (Daniels et al., 1993; Drumond und Deen, 1994; Tryggvason et al., 2006).

Die Relation zwischen Hyperglykämie und der Entwicklung mikrovaskulärer Komplikationen wurde schon vielfach beschrieben (Brownlee, 2001; Beckman, 2002). In den letzten Jahren wurden unterschiedliche zelluläre Mechanismen vorgeschlagen, wie Hyperglykämie mikrovaskuläre Veränderungen im Rahmen des Diabetes vermittelt. Metabolische Faktoren, wie zunehmende Bildung von fortgeschrittenen Glykolisierungsendprodukten (*advanced glycation endproducts*) und eine Verstärkung des Weges über die Bildung von Polyol, hämodynamische Faktoren und oxidativer Stress wurden identifiziert und diskutiert (Tan et al., 2002; Noh und King, 2007). An der Niere werden unter chronischer Hyperglykämie Veränderungen wie endotheliale Dysfunktion, Hypertrophie, Verlust negativer Ladungen in der GBM und Schädigung der Podozyten beobachtet (Ziyadeh und Wolf, 2008). Diabetische Nephropathie führt dabei zu glomerulären Schäden erst am Endothel, dann an der GBM und am Mesangium und zuletzt am Podozyten. Diese Veränderungen treten bei Patienten mit Diabetes bereits vor dem Nachweis einer Albuminurie auf. Es kommt zu einer Verdickung der GBM, zum einen durch vermehrte Ablagerung von Kollagen Typ IV und zusätzlich zu einer Abnahme der Expression der Heparansulfat-Seitenketten der Proteoglykane, welches den Verlust der negativen Ladungen bedingt (Nerlich und Schleicher, 1991; Wolf und Ziyadeh, 2007). Des Weiteren führt die diabetische Nephropathie früh zu morphologischen Veränderungen im Mesangium. Die Extrazellulärmatrix akkumuliert und es konnte gezeigt werden, dass unter Hyperglykämie die Synthese von Kollagen Typ IV und Fibronektin in den Mesangialzellen zunimmt, die daraufhin hypertrophieren (Wolf und Ziyadeh, 1999). An der Schlitzmembran zeigt sich eine verminderte Oberflächenverteilung des Proteins Nephrin, wodurch die Integrität des glomerulären

Filters gestört wird und dieser durchlässig für größere Moleküle wird, welches sich im Auftreten einer Albuminurie äußert (Doublie et al., 2003).

Menne et al. konnten zeigen, dass Proteinkinase Ca ($\text{PKC}\alpha$)-defiziente Mäuse vor Proteinurie geschützt sind (Menne et al., 2004; Menne et al., 2006). Dies war ein entscheidender Schritt zum Verständnis der Rolle von PKC bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie. Sie konnten zeigen, dass diabetische $\text{PKC}\alpha$ -defiziente Knockout Mäuse keine Albuminurie entwickeln, und dass bei ihnen auch keine hyperglykämisch induzierte verminderte Expression der negativ geladenen Heparansulfat-Seitenketten des Proteoglykans Perlecan auftritt (Menne et al., 2004). Interessanterweise wurde die Hypertrophie der Glomeruli nicht durch die Deletion von $\text{PKC}\alpha$ beeinflusst (Menne et al., 2004). In einer weiteren Untersuchung konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass vermehrte Aktivität von $\text{PKC}\alpha$ zu einem Verlust des Schlitzmembranproteins Nephtrin führt (Menne et al., 2006). Die Ergebnisse beruhen auf einem chronischen diabetischen Modell mit langer Diabeteszeit und die Autoren führten diese auf Änderungen auf transkriptioneller Ebene zurück. Somit kann Aktivierung von $\text{PKC}\alpha$ ein wichtiger Mechanismus für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie sein. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass β -Arrestin2 die Endozytose von Nephtrin vermittelt (Quack et al., 2006). Die Internalisierung von Nephtrin führt zu „Löchern“ in der Schlitzmembran und zu einer vermehrten Durchlässigkeit für Proteine. Es ist bisher ungeklärt, ob akute Hyperglykämie einen direkten Effekt auf die Integrität der Schlitzmembran hat und wenn ja, ob $\text{PKC}\alpha$ hierbei eine regulatorische Rolle spielt.

1.2 Nephtrin als Rückgrat der glomerulären Schlitzmembran

Es konnte in den letzten Jahren eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die für die Integrität der Barrierefunktion der glomerulären Schlitzmembran eine wichtige Funktion übernehmen können.

Ausgangspunkt für die Entdeckung von Schlitzmembranproteinen waren Studien zur Ätiologie angeborener proteinurischer Erkrankungen, den kongenitalen nephrotischen Syndromen. Zu den ersten identifizierten Proteinen als essentieller Bestandteil der

Schlitzmembran gehörte Nephrin. Durch Positionsklonierung konnte das kodierende Gen, *NPHSI*, identifiziert werden, welches beim Krankheitsbild des kongenitalen nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ mutiert ist (Kestilä et al., 1998). Diese seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit einer Häufung in Finnland, führt bereits *in utero* zu einer massiven Proteinurie sowie unbehandelt postnatal zu einer terminalen Niereninsuffizienz. Einzige kurative Therapieoption ist die frühzeitige bilaterale Nephrektomie und Nierentransplantation. Allerdings zeigten Untersuchungen bei einem erheblichen Anteil der nierentransplantierten Patienten ein Wiederauftreten des nephrotischen Syndroms, was vermutlich mit zirkulierenden Antikörpern gegen Nephrin zusammenhängt (Wang et al., 2001).

Nephrin bildet einen entscheidenden strukturellen Baustein am Aufbau der glomerulären Schlitzmembran (Tryggvason, 1999). In der Niere wird Nephrin ausschließlich in Podozyten exprimiert und ist in der Schlitzmembran lokalisiert. Basierend auf Größe und Struktur von Nephrin geht man davon aus, dass die glomeruläre Schlitzmembran durch homophile Interaktionen von Nephrin-Molekülen benachbarter Podozytenfußfortsätzen gebildet wird, indem sie aus gegenüberliegenden Fußfortsätzen aufeinander zulaufen und aneinander binden (Tryggvason, 1999).

Humanes Nephrin besteht aus 1241 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 180 kDa und ist ein transmembranäres Adhäsionsprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welche die Fähigkeit haben, Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen zu vermitteln (Ruotsalainen et al., 1999). Die molekulare Struktur von Nephrin setzt sich aus einem N-terminalen extrazellulären Anteil, einem transmembranären Abschnitt und einer relativ kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne zusammen. Der extrazelluläre Abschnitt enthält acht Immunglobulin G-ähnliche Domänen und eine Fibronectin-Typ-III Domäne (Abb. 2).

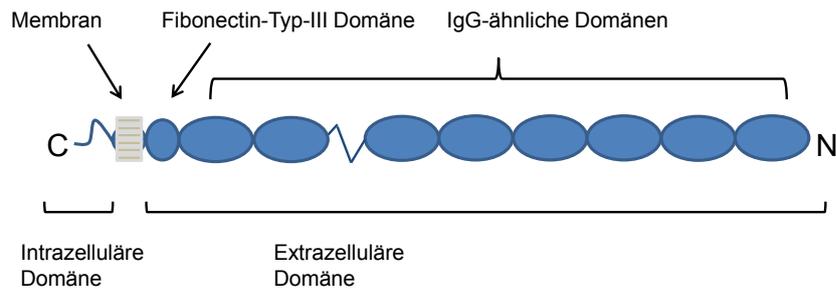


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von Nephrin

Nephrin enthält eine C-terminale (C) intrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Domäne und eine extrazelluläre Domäne mit einer Fibronectin-Typ-III Domäne und acht IgG-ähnlichen Domänen. Die Membran ist Teil der Fußfortsätze der Podozyten. N: N-terminal. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Patakka und Tryggvason, 2007) erstellt.

Basierend auf Rodewalds und Karnovskys Modell der Schlitzmembran wird angenommen, dass Nephrin die zentrale strukturelle Komponente der Schlitzmembran darstellt. Vor allem die Arbeitsgruppe um Tryggvason konnte das Modell weiterentwickeln, dass das Rückgrat der Schlitzmembran durch reißverschlussartige homophile Interaktionen von Nephrin gebildet wird, dessen acht N-terminale Immunglobulin G-ähnlichen Motive seiner extrazellulären Domäne jeweils miteinander interagieren (Abb. 3) (Rodewald und Karnovsky, 1974; Ruotsalainen et al., 1999; Tryggvason, 1999; Tryggvason und Wartiovaara, 2001). Weitere Studien konnten die homophile Interaktion von Nephrin bestätigen (Gerke et al., 2003).

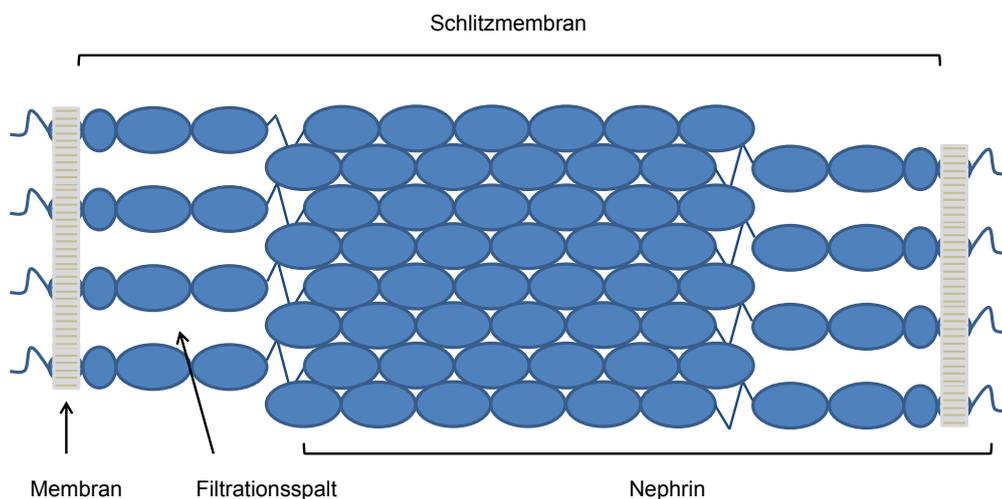


Abb. 3: Schematische Darstellung der Schlitzmembran

Homophile Interaktionen von Nephrin-Molekülen benachbarter Fußfortsätze der Podozyten gleiten reißverschlussartig ineinander und bilden den Filtrationsspalt der Schlitzmembran. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Patakka und Tryggvason, 2007) erstellt.

Die zytoplasmatische Domäne von Nephrin enthält neun Tyrosinreste, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Ligandenbindung phosphoryliert werden können (Kawachi et al., 2006). Somit scheint Nephrin nicht nur am strukturellen Aufbau der Schlitzmembran beteiligt, sondern auch eine Rolle in Signaltransduktionsprozessen zu spielen.

Für die Intaktheit der Schlitzmembran spielt Nephrin sowohl beim strukturellen Aufbau der Schlitzmembran als auch bei der Aktivierung von Signalkaskaden, die das Zellüberleben regulieren, eine entscheidende Rolle. Daher kann man annehmen, dass ein Verlust von Nephrin mit dem Verlust des glomerulären Filters korreliert. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass bei diabetischen Tieren und Menschen, die eine Albuminurie entwickelten, auch eine verminderte Verteilung und Expression von Nephrin festzustellen war (Doublier et al., 2003; Koop et al., 2003; Kim et al., 2007). Nephrin scheint demnach an Veränderungen der Permeabilität des glomerulären Filters unter diabetischer Stoffwechsellage beteiligt zu sein. Dennoch konnte bisher nicht genau erforscht werden, wie der Signalweg bei diabetischer Nephropathie auf pathophysiologischer Ebene im Detail funktioniert und über welche Effektormoleküle die Verteilung und Expression von Nephrin beeinflusst werden.

Zudem wurden weitere Proteine der Schlitzmembran entdeckt, deren Funktionsverlust mit hereditären und sporadischen Erkrankungen des glomerulären Filters in Zusammenhang stehen:

- Podocin (Boute et al., 2000),
- NEPH1-3 (Donoviel et al., 2001; Sellin et al., 2003),
- CD2AP (Shih et al., 1999; Li et al., 2000),
- FAT1 (Inoue et al., 2001),
- P-Cadherin (Reiser et al., 2000),
- Densin-180 (Ahola et al., 2003)
- Zonula occludens-1 (ZO-1) (Schnabel et al., 1990).

Die Proteine der Schlitzmembran bilden ein komplexes Netzwerk, dessen Zusammensetzung einer dynamischen Regulation unterliegt und welches in Signalwege eingebunden ist, die für die Funktionsfähigkeit der Podozyten essentiell sind, wie z.B.

Regulation im Umbau des Zytoskeletts, Endozytose, Zelldifferenzierung und Suppression von Zellproliferation (Benzing, 2004).

1.3 β -Arrestin2

In Vorarbeiten konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass β -Arrestin2 mit Nephrin interagiert und die Endozytose von Nephrin einleitet (Quack et al., 2006). Ursprünglich wurden die Arrestine als Regulatoren aktivierter und phosphorylierter G-Protein gekoppelter β_2 -adrenerger Rezeptoren (β_2 -AR) entdeckt (Benovic et al., 1987; Lohse et al., 1990). Zu den Arrestinen werden vier verschiedene Isoformen gezählt. Während die Arrestine1 und -4 ausschließlich in der Retina gefunden werden, werden die β -Arrestine1 und -2, welche auch als Arrestin2 und -3 bezeichnet werden, ubiquitär in allen Zellen exprimiert.

Eine wesentliche Funktion der β -Arrestine besteht in der Desensitivierung. Nach Aktivierung durch Bindung eines Agonisten wird der G-Protein-gekoppelte Rezeptor, auch Typ-7-Transmembranrezeptor genannt, am zytoplasmatischen Ende durch G-Protein-gekoppelte Kinasen (GRKs) phosphoryliert, wodurch der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt wird. GRKs phosphorylieren Serin- und Threoninreste. Diese Phosphatreste dienen als Erkennungsstruktur für die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor C-Terminus und Teile der intrazellulären Schleife (Luttrell und Lefkowitz, 2002). Es kommt zu einer sterischen Blockade der Interaktion des Rezeptors mit G-Proteinen, wodurch weitere G-Protein vermittelte Signale inhibiert werden (DeWire et al., 2007). Dieser Vorgang wird als Desensitivierung bezeichnet und ist ein wichtiger Regulationsmechanismus, um eine Abnahme der zellulären Rezeptorantwort zu erreichen.

Eine weitere wichtige Funktion von β -Arrestinen ist die Internalisierung von Rezeptoren. Es konnte eine Interaktion von β -Arrestinen mit Clathrin und dem Clathrin-Adapter AP2 nachgewiesen werden, die beide Bestandteile des Clathrin-Endozytosekomplexes sind. β -Arrestine dienen dabei als ein Adapter zwischen heptahelikale Transmembranrezeptoren und clathrinabhängiger Endozytose (Goodman et al., 1996). Hierzu bindet Clathrin an das β -Arrestin und bildet sogenannte Clathrin-Vesikel (*clathrin-coated pits*), welche den heptahelikalen Transmembranrezeptor

internalisieren. Internalisierung ist ein entscheidender Prozess, um Rezeptoren abzubauen oder an die Zelloberfläche zurückzubringen.

Mittlerweile ist bekannt, dass β -Arrestine auch mit anderen Rezeptortypen interagieren und unabhängig von G-Protein vermittelter Aktivierung Signalwege beeinflussen können (DeWire et al., 2007). Chen et al. konnten zeigen, dass β -Arrestin2 an den TGF- β -III-Rezeptor, einen Typ-I-Transmembranrezeptor bindet und diese Interaktion zu einer Internalisierung des Rezeptors und zu einer Abnahme des TGF- β -III-abhängigen Signals führt (Chen et al., 2003). Nephrin ist ebenfalls ein Typ-I-Transmembranrezeptor und unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass β -Arrestin2 mit Nephrin interagiert und dessen Endozytose vermittelt, wodurch die nephrinabhängige Signaltransduktion vermindert wird (Quack et al., 2006). In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass die Bindung von β -Arrestin2 durch den Phosphorylierungsstatus von Nephrin Y1193 reguliert wird, welches eine Schalterfunktion einnimmt. Ist das Tyrosin von Nephrin Y1193 dephosphoryliert, so bindet β -Arrestin2 an den C-Terminus von Nephrin. Genau umgekehrt verhält es sich mit der Bindung von Podocin zu Nephrin (Quack et al., 2006). Die Stärke der β -Arrestin2-Bindung hängt von der Phosphorylierung seiner Zielproteine an serin- oder threoninreichen Regionen ab (Shenoy und Lefkowitz, 2003).

1.4 Die Proteinkinase C α

Die Proteinkinase C (PKC) ist in Molekularmechanismen bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie beteiligt (Meier et al., 2009). Sie ist ein wichtiges intrazelluläres Messenger-System und spielt eine zentrale Rolle im Sinne eines Schlüsselregulators für Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und bei der Regulation von Gentranskription (Nishizuka, 1995; Dempsey et al., 2000; Musashi, 2000). Die PKC ist eine calcium- und phospholipidabhängige Serin/Threonin-Proteinkinase und es konnten zehn verschiedene Isoformen der Proteinkinase C identifiziert werden (Abb. 4). Die PKC-Familie zeichnet sich durch das Vorhandensein einer katalytischen Domäne und einer regulatorischen Untereinheit aus, die sich aus konservierten Regionen (C1-C4) und variablen Regionen (V1-V5) zusammensetzen (Kikkawa et al., 1987). Die PKC-Isoformen weisen eine relativ große Homologie im Aufbau der katalytischen Domäne auf. Diese enthält ein konserviertes ATP-(Adenosintriphosphat) Bindungsmotiv (C3), ein konserviertes aktives Zentrum mit

Substrat-Bindungsdomäne (C4) und die variablen Region V4 und V5 (Abb. 4). Die PKC-Isoformen unterscheiden sich strukturell und funktionell durch einen unterschiedlichen Aufbau in der regulatorischen Untereinheit und werden aus diesem Grund in drei Gruppen eingeteilt. Zum einen die der konventionellen PKCs oder cPKCs (α , β I, β II, γ), die der neuen PKCs oder nPKCs (δ , ϵ , η , θ) und die der atypischen PKCs oder aPKC (ζ , ι/λ).

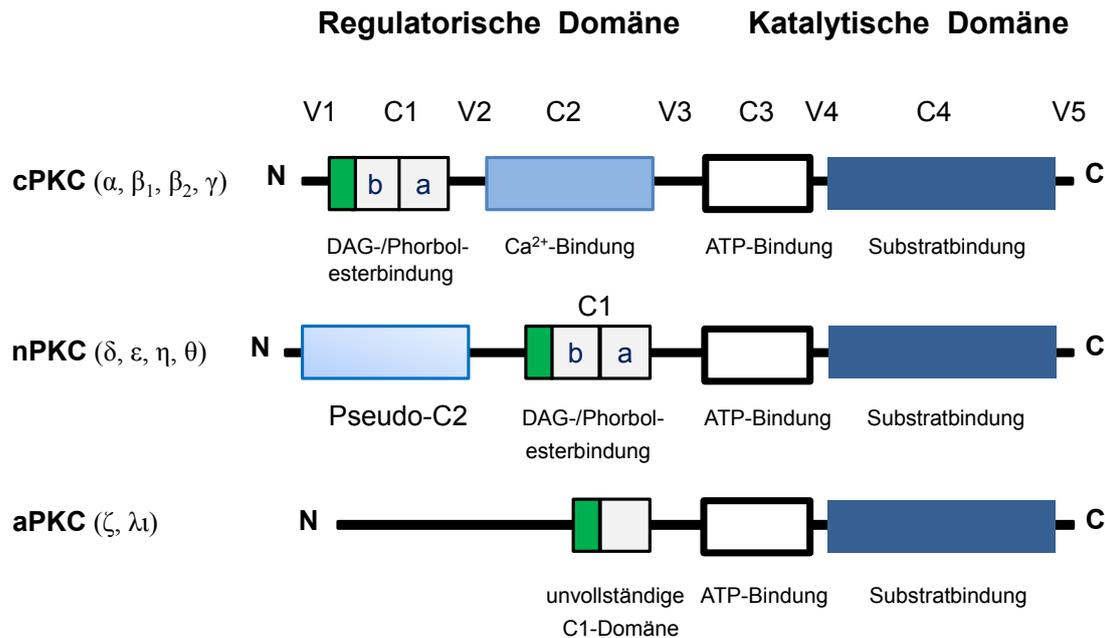


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus der drei PKC-Isotypen

Diese unterscheiden sich strukturell und funktionell durch den unterschiedlichen Aufbau der regulatorischen Untereinheit. Hellblau dargestellt ist die C2-Domäne der konventionellen PKC (cPKC), welche die Ca²⁺- und PS-Bindung (Phosphatidylserin) vermittelt. Die konventionellen und neuen PKC (nPKC) können durch DAG (Diacylglycerol) und Phorbol-ester aktiviert werden. Die atypischen PKC (aPKC) haben eine unvollständige C1-Region, weshalb sie kein DAG oder Phorbol-ester binden können. Die ATP-bindende C3-Region ist schwarz umrandet und die Substrat-bindende C4-Domäne der katalytischen Domäne ist in dunkelblau zu sehen. C: Carboxyl-terminal; ATP: Adenosin-triphosphat; N: Amino-terminal; Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Meier et al., 2009) erstellt.

Die konventionellen PKCs, zu denen auch die PKC α gehört, haben eine Calcium-bindende Region (C2-Region), die mit Phosphatidylserin (PS) interagiert, und zwei cysteinreiche Domänen (C1-Region), die Diacylglycerol (DAG) oder Phorbol-ester binden. Die neuen PKCs zeichnen sich dadurch aus, dass sie über die C1-Region durch DAG oder Phorbol-ester reguliert werden, wodurch sie auch in Abwesenheit von Calcium aktiviert werden können. Sie enthalten eine C2-ähnliche Domäne, der die Fähigkeit zur Calcium-Bindung fehlt (Newton, 2003).

Die Regulation der atypischen PKCs ist noch nicht vollständig geklärt. Sie können wiederum durch Phospholipide und Fettsäuren, aber nicht durch DAG, Phorbolster und Calcium aktiviert werden, da ihnen die C2-Region fehlt (Dekker und Parker, 1994). Die C1- und C2-Regionen liegen innerhalb der regulatorischen Untereinheit. Die C1-Region der klassischen PKC und neuen PKC umfasst zwei cysteinreiche Zinkfinger-Motive (C1a und C1b), welche die Bindung an DAG und Phorbolster vermitteln; die C1-Region der atypischen PKC hingegen enthält nur ein Zinkfinger-Motiv, welchem die Fähigkeit zur Bindung von DAG und Phorbolster fehlt (Li und Gobe, 2006).

1.5 Das Protein PICK1

Das Protein PICK1 (Protein interacting with C kinase α 1) wurde erstmals 1995 als Interaktionspartner der katalytischen Domäne der Proteinkinase C α (PKC α) beschrieben und konnte mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems identifiziert werden (Staudinger et al., 1995). PICK1 ist ein Protein der peripheren Zellmembran und ist vom Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans* bis zum Menschen hoch konserviert. Es existiert in vielen Spezies; in einzelligen Organismen und in Pflanzen konnte PICK1 hingegen bisher nicht nachgewiesen werden (Xu und Xia, 2006). In der Embryonalentwicklung der Ratte kann PICK1 ab dem 15. Tag nachgewiesen werden, die Expression steigt im Verlauf allmählich an und erreicht ein Plateau ca. zwei Wochen postnatal (Xia et al., 1999).

Das humane PICK1 besteht aus 415 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Es wird in verschiedenen Geweben exprimiert, wobei durch Northernblotanalysen die höchste Expression im Gehirn, gefolgt von den Hoden sowie in abfallender Expressionsstärke in Skelettmuskulatur, Niere, Herz, Lunge, Leber und Milz festgestellt wurde (Staudinger et al., 1995; Xu und Xia, 2006). In den meisten Zellen liegt PICK1 diffus im Zytosol verteilt vor, wobei eine Anreicherung perinukleär zu finden ist. Im Unterschied dazu ist PICK1 in Neuronen hauptsächlich an den Synapsen lokalisiert (Xia et al., 1999; Xu und Xia, 2006).

Die molekulare Struktur von PICK1 beinhaltet zwei Domänen, die für Protein-Proteininteraktionen, sowie für direkte Interaktion mit Membranlipiden verantwortlich sind: Eine PDZ- (PSD-95/Dlg/ZO-1) Domäne in der Nähe des N-Terminus und eine

BAR- (Bin/Amphiphysin/Rvs) Domäne, die etwa die Hälfte des Proteins überspannt (Abb. 5). Die beiden Domänen werden durch drei Regionen des Proteins begrenzt. Zum einen eine mit sauren Aminosäureresten angereicherte, kurze N-terminale Region vor der PDZ-Domäne, zu anderen eine Verbindungsregion zwischen PDZ- und BAR-Domäne (eine sogenannte *Coiled-coil*-Domäne mit Dimerisierungsfunktion), und schließlich eine C-terminale Region, die ebenfalls einen Abschnitt mit sauren Aminosäureresten, ein sogenanntes *Acidic Cluster*, besitzt. Die beiden Domänen und drei Regionen sind in allen Spezies hoch konserviert, wobei sich die C-terminale Region in der Aminosäuresequenz am stärksten zwischen den verschiedenen Spezies unterscheidet. Die Struktur von PICK1 gilt als einzigartig, denn es ist bisher kein Protein bekannt, das sowohl eine PDZ- als auch eine BAR-Domäne aufweist (Xu und Xia, 2006).

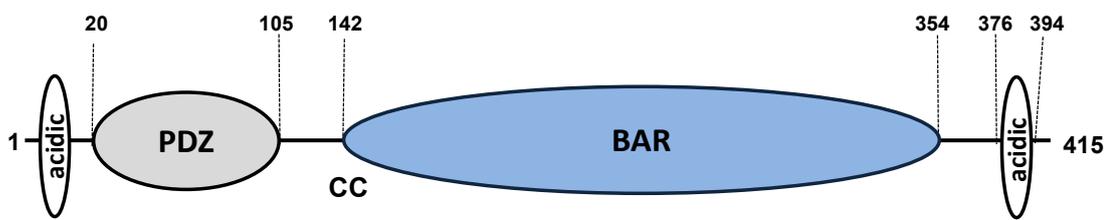


Abb. 5: Domänenstruktur von PICK1

Acidic: säurehaltiges Cluster; PDZ: PSD-95/Dlg/ZO-1-Domäne; CC: Coiled-coil-Domäne (Aminosäurereste (As) 139-166); BAR: Bin/Amphiphysin/Rvs-Domäne. Positionen der As sind durch Zahlen gekennzeichnet. Die Abbildung ist nach (Hanley, 2008) modifiziert.

PDZ-Domänen sind bekannte Proteininteraktionsdomänen, die mit Proteinen interagieren, welche ein PDZ-Bindungsmotiv aufweisen (Sheng und Sala, 2001). Die klassischen PDZ-Bindungsmotive sind kurze Peptide am äußersten C-terminalen Ende von Proteinen. PDZ-Domänen können außerdem Lipidmoleküle, wie Phosphoinositide binden (Zimmermann et al., 2002). PDZ-Domänen werden nach ihrer Selektivität für PDZ-Bindungsmotive in drei Klassen unterteilt (Sheng und Sala, 2001). Die PDZ-Domäne Typ I erkennt das PDZ-Bindungsmotiv $-T/S-X-\Phi$, Typ II der PDZ-Domänen erkennt $-\Phi-X-\Phi$ und Typ III erkennt $-D/E-X-\Phi$. Dabei steht X für beliebige Aminosäuren und Φ für hydrophobe Aminosäuren. Die Funktion von PDZ-Domänen besteht zum einen in der Regulation der subzellulären Lokalisation von Membranproteinen und zum anderen dienen sie als eine Art Gerüst zum Einbau multimerischer Proteinkomplexe.

PICK1 besitzt eine einzelne PDZ-Domäne, die aufgrund ihrer einzigartigen Struktur nicht in das beschriebene Schema passt und sowohl mit PDZ-Bindungsmotiven vom Typ I und Typ II interagieren kann (Xu and Xia, 2006). PKC α besitzt ein C-terminal gelegenes Typ I PDZ-Bindungsmotiv (-LQSAV), welches von PICK1 erkannt wird (Dev et al., 2004). Bis jetzt konnten über 40 Interaktionspartner von PICK1 identifiziert werden, bei denen es sich mehrheitlich um Membranproteine wie Rezeptoren, Transporter und Ionenkanäle handelt. In den meisten Fällen reguliert die Interaktion von PICK1 mit Membranproteinen dessen Transport an die Zellmembran oder eine Änderung der Expression an der Zelloberfläche (Xu und Xia, 2006). Es ist eine reizvolle Hypothese, dass PICK1 als Gerüst fungiert, um PKC α vermittelte Signalwege bei der diabetischen Nephropathie zu fördern.

Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen wird zunächst die Zielsetzung konkretisiert, um anschließend die relevanten Aspekte der Wirkungszusammenhänge der vorgestellten Proteine detailliert zu untersuchen.

1.6 Zielsetzung und Vorgehensweise der Arbeit

Wie aufgezeigt ist Nephrin der entscheidende strukturelle Baustein beim Aufbau der Schlitzmembran und Erhalt der Integrität des glomerulären Filters. Die Oberflächenexpression von Nephrin ist bei der diabetischen Nephropathie vermindert. Die Integrität des glomerulären Filters ist dadurch gestört und es resultiert eine Albuminurie. Bislang sind die Pathomechanismen, welche zu einer veränderten Expression von Nephrin bei diabetischer Nephropathie führen, noch größtenteils unverstanden. Nach unserer Hypothese vermindert Hyperglykämie die Expression von an der Schlitzmembran verankertem Nephrin. Für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Zusammenhänge sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Forschungsfragen geklärt werden:

- 1) Führen hohe Glukosespiegel zu einer vermehrten Internalisierung von Nephrin?
- 2) Wird die Internalisierung über die Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion vermittelt?
- 3) Ist PKC α die schrittmachende Kinase bei der Glukose vermittelten Endozytose/Internalisierung von Nephrin?
- 4) Fungiert PICK1 als Adaptermolekül für PKC α ?

Ziel der Arbeit ist es deshalb, die Auswirkung von Hyperglykämie auf die glomeruläre Schlitzmembran durch Untersuchung der Interaktion der genannten Proteine zu erforschen. Dabei soll wie folgt vorgegangen werden:

In Kapitel 2 werden die verwendeten Materialien, Lösungen und Methoden vorgestellt. Kapitel 3 zeigt die Ergebnisse der Arbeit. Dabei wird zunächst der Einfluss von Hyperglykämie für die Endozytose von Nephrin untersucht (3.1), um anschließend die Bedeutung von β -Arrestin2 für die Endozytose von Nephrin unter Hyperglykämie zu charakterisieren (3.2). Darauf aufbauend werden in einem nächsten Schritt die Rollen von PKC α (3.3.) und PICK1 (3.4.) näher analysiert.

Abschließend werden die Ergebnisse in Kapitel 4 diskutiert, um einen Forschungsbeitrag für eine detaillierte Darstellung der molekularen Mechanismen der Entstehung der diabetischen Nephropathie zu liefern.

2. Materialien, Lösungen und 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, L-Glutamin und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS), Biochrom AG
- 0.05% Trypsin-0,02% EDTA in PBS, Biochrom AG
- PBS (Phosphate buffered saline) Dulbecco:
- 136 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.1 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄, Biochrom AG
- 10 cm Schalen, Corning

Konditionell immortalisierte Maus-Podozyten (Dr. Peter Mundel, Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA)

- PKC α (+/+), PKC α (-/-) Podozyten
- RPMI 1640 mit L-Glutamin und Zusatz von 10 % Kälberserum, Biochrom AG
- Interferon- γ (10U/ml), Sigma/Roche
- Type I Kollagen, R&D
- Streptomycin 100mg/dl, Penicillin 100U/ml, Biochrom AG/Sigma
- 0.05% Trypsin, 0.02% EDTA in PBS, Biochrom AG
- PBS (Phosphate buffered saline):
- 136 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.1 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄, Biochrom AG
- Essigsäure (Eisessig)
- 6-well Platten, Corning
- T75 Zellkulturflaschen, Nunc

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); 273.0 mM NaCl; 10.0 mM KCl; 1.5 mM Na₂HPO₄*H₂O; 11.1 mM Dextrose

- Schüttler: Reax, Heidolph

2.1.3 Eukaryonte Expressionsvektoren/Plasmide

- cdm.sIg.7 (Surface Immunglobulin Domäne + Transmembrandomäne CD7) Ig.ctrl
- Ig.Nephrin (zytoplasmatischer Anteil von Nephrin der As 1087-1241)
- cdm.F.GFP
- cdm.Nephrin.F.WT (Dr. G. Walz, Universität Freiburg)
- cdm.sIg.7.Nephrin 1158-1241
- cdm.sIg.7.Nephrin 1087-1160
- cdm.sIg.7.Nephrin 1087-1176
- cdm.sIg.7.Nephrin 1087-1190
- β -Arrestin2.F (Dr. R. Lefkowitz, Duke University, Durham, NC, USA)
- PKC α (Dr. J.-W. Soh, Inha University, Incheon, Südkorea)
- PICK1.F (Dr. L. Hinck, Western Washington University, San Fransisco, CA, USA)
- PICK1 KDAA.F (Dr. L. Hinck, Western Washington University, San Fransisco, CA, USA)
- cdm-Vektor

2.1.4 Zellyse

PBS (Phosphate buffered saline):

- 136 mM NaCl, AppliChem; 2.7 mM KCl, Merck; 8.1 mM Na₂HPO₄·7H₂O, Merck; 1.5 mM KH₂PO₄, Merck

2x Laemmli stock solution:

- 100 mM Tris-HCl pH 6.8, Sigma-Aldrich; 4% SDS, Biomol; 20% Glycerol, Sigma-Aldrich; 1g Bromphenol Blau, Sigma-Aldrich; mit H₂O auf 500 ml auffüllen
- 2x Laemmli/DTT: 900 μ l 2x Laemmli stock solution; 100 μ l 1 M DTT (Dithiothreitol), Biomol

IP- Puffer:

- 1 % Triton X-100, Sigma-Aldrich; 20 mM Tris HCl pH 7.5, Sigma-Aldrich; 150 mM KCl; 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetylsäure), Sigma-Aldrich; 100 nM

Na₃VO₄, BioChemica; Complete Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten, Roche Diagnostics

- 0.25mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) kurz vor Einsatz dazugeben

CHAPS-Lysierpuffer:

- 20 mM Chaps, Sigma-Aldrich; 20 mM Tris HCl pH 7.5, Sigma-Aldrich; 50 mM NaCl, Sigma-Aldrich; 50 mM NaF, Sigma-Aldrich; 15 mM Na₄P₂O₇, Sigma-Aldrich; 0.1 mM EDTA; 2 mM Na₃VO₄; Complete Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten; 3 mM ATP
- 0.25mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) kurz vor Einsatz dazugeben

Geräte:

- Heraeus Multifuge 4 KR, Thermo Scientific
- Tischzentrifuge: Microcentrifuge 5417R, Eppendorf
- Tisch-Ultrazentrifuge: Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter
- Thermomixer comfort, Eppendorf

2.1.5 Stimulanzen und Inhibitoren

- D-(+)-Glucose monohydrate, Sigma-Aldrich
- Stimulans: PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), Calbiochem
- Inhibitoren: Safingol, Calbiochem; Calphostin C, Calbiochem
- Lösungsmittel: DMSO (Dimethyl Sulphoxide), Sigma-Aldrich

2.1.6 Co-Immunopräzipitation

- Anti-Flag M2-Kügelchen, Sigma-Aldrich
- Protein G-Sepharose-Kügelchen, GE Healthcare
- Protein A-Sepharose-Kügelchen, GE Healthcare

2.1.7 Biotinylierung

- PBSCM (Phosphate buffered saline: 136 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.1 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄) mit 0.1 mM CaCl₂, Merck, und 1 mM MgCl₂, Merck; pH 8.0; PBSCM mit 100 mM Glycin
- N-hydroxysulfosuccinimydyl-SS-Biotin (0.5 mg/ml), Pierce

2.1.8 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Für zwei Trenngele:

- Polyacrylamidgelzusammensetzung (10%)
- 3 ml Acrylamid (Rotiphorese) 30%, Roth
- 1.5 ml H₂O
- 4.5 ml Trenngelpuffer
- 90 µl APS 10% (Ammoniumperoxiddisulfat), Biomol
- 15 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid), Roth

Für zwei Sammelgele:

- Polyacrylamidgelzusammensetzung (10%)
- 535 µl Acrylamid (Rotiphorese) 30%, Roth
- 1.135 ml H₂O
- 1.665 ml Sammelgelpuffer
- 40 µl 10% APS
- 5 µl TEMED

2.1.8.1 Puffer

- Trenngelpuffer pH 8.8: 360 mM Tris HCl, Sigma-Aldrich; 1140 mM Tris Base, Roth; 14 mM SDS, Biomol; H₂O
- Sammelgelpuffer pH 6.8: 484 mM Tris HCl; 16 mM Tris Base; 14 mM SDS, H₂O
- Laufpuffer (10x): 191.8 mM Glycin, Appli Chem; 3.5 mM SDS; 247.7 mM Tris Base; 1:10 verdünnt eingesetzt
- Transferpuffer (10x): 247.7 mM Tris Base; 3.5 mM SDS; 187.8 mM Glycin; 20 Vol% Methanol, AppliChem; H₂O; 1:10 verdünnt eingesetzt
- Waschpuffer: 6.8 ml Tris HCl pH 7.5; 13.6 ml 5 M NaCl; 0.68 ml Tween 20, Roth; H₂O ad 1000 ml
- Blockpuffer: BSA (Bovines Serum Albumin) 5 % in Waschpuffer, VWR

2.1.8.2 Antikörper

Primärantikörper:

- Anti-Flag M2, monoklonaler Maus-Ak, Verdünnung: 1:400, Sigma-Aldrich

- Anti-Nephrin, polyklonaler Meerschweinchen-Ak, Verdünnung: 1:200, Progen
- Anti-Nephrin H300, polyklonaler Kaninchen-Ak, Verdünnung: 1:200, Santa Cruz
- Anti- β -Arrestin2, monoklonaler Kaninchen-Ak, Verdünnung: 1:500, Cell Signaling
- Anti-PKC α , monoklonaler Kaninchen-Ak, Verdünnung: 1:200, Santa Cruz
- Anti-PICK1, polyklonaler Schaf-Ak, Verdünnung: 1:200, Santa Cruz
- Anti-human IgG HRP vom Schaf, Verdünnung: 1:1000, Amersham
- Anti-Streptavidin HRP, Verdünnung: 1:500, Thermo Scientific
- Anti-GAPDH, Kaninchen-Ak, Verdünnung: 1:200, Santa Cruz
- Anti-Actin, Maus-Ak, Verdünnung: 1:5000, Sigma-Aldrich

Sekundärantikörper:

- gegen den Fc-Teil von Mausantikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline, Verdünnung: 1:10000, Dako
- gegen den Fc-Teil von Kaninchenantikörpern gerichtete Affen-Immunglobuline, Verdünnung: 1:7500, Amersham
- gegen den Fc-Teil von Meerschweinchenantikörpern gerichtete Esel-Immunglobuline, Verdünnung: 1:10000, Fitzgerald

2.1.8.3 Visualisierungslösung

- Selbst hergestelltes ECL: Unmittelbar vor Anwendung eine Mischung aus Lösung A und B 1:1 ansetzen
- Lösung A: 100 mM Tris Base pH 8.8; 2.5 mM Luminol, Fluka; 0.4 mM Coumarin, Sigma-Aldrich; H₂O
- Lösung B: 100 mM Tris Base pH 8.8; 1.5 % H₂O₂, Roth; H₂O
- Größenmarker: Prestained Protein Marker, New England Biolabs
- Membran: Nitrocellulose Transfermembran, Whatman Protan

Geräte

- Gießstation, Biorad
- Mini-PROTEAN Tetra cell, Biorad
- Semi dry Blot, Biorad
- Für Westernentwicklung: Imager Fluor Chem FC2, Biozym; mit Alpha Ease Software 6.0, Alpha Innotech

2.1.9 DNA-Subklonierung

2.1.9.1 PCR

Mastercycler Gradient, Eppendorf

- 42 µl ddH₂O
- 5 µl 10x AccuPrime Puffer, Invitrogen
- 0.5 µl Primer 1 (50 pmol/µl)
- 0.5 µl Primer 2 (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 8.0)
- 2 µl Glycogenlösung
- 4 µl 3 M Natriumacetat
- 100 µl 100 % Ethanol
- 70 % Ethanol zum Waschen

Restriktionsenzymverdau

- 5 µl DNA
- 2 µl Reaktionspuffer (10x NEBuffer 1-3), New England Biolabs Inc.
- 0.4 µl Restriktionsendonuklease 1, New England Biolabs Inc.
- 0.4 µl Restriktionsendonuklease 2, New England Biolabs Inc.
- 12 µl ddH₂O
- 0.2µl 100x BSA (Bovines Serum Albumin (C=10 mg/ml), aufgereinigt, New England Biolabs Inc.

2.1.9.2 Ligation

- 1,5 % Low melting Agarose, Sigma-Aldrich
- TAE-Puffer (1x): 2 ml 50x TAE (242 g Tris Base; 57.1 g Essigsäure; 100 ml 0.5 M EDTA pH 8 auf 100 ml H₂O); 98 ml H₂O
- 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml), Roth
- 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

2.1.9.3 Materialien für Transformation und Amplifikation

- 50 µl E. coli Bakterien MC 1061 mit oder ohne P3 (Ampicillin- bzw. Ampicillin- und Tetracyclinresistenz)
- 0.25-0.5 µg DNA des zu amplifizierenden Plasmids
- Agarplatten mit Ampicillin- oder Ampicillin-Tetracyclin-Resistenz

2.1.9.4 Materialien für Minikultur und Minipräparation

Bakterienkolonien der Platten aus 2.1.9.3

- Medium: 20 g LB-Broth-Base, Sigma-Aldrich, auf 1000 ml ddH₂O
- 10 mg Ampicillin (C=100 µg/ml) auf 100 ml LB-Medium
- 2.5 mg Ampicillin (C=25 µg/ml) und 0.75 mg Tetracyclin (C= 7.5µg/ml) auf 100 ml LB-Medium
- Minilösung 1 (10 mM EDTA pH 8.0; 50 mM TrisHCl pH 8.0; RNaseA 10 mg, Sigma-Aldrich)
- Minilösung 2 (0.2 M NaOH/SDS)
- Minilösung 3 (2 M Kaliumacetat)
- 100 % Isopropanol
- 70 % Ethanol zum Waschen

Restriktionsenzymverdau

- 5 µl DNA
- 2 µl Reaktionspuffer (10x NEBuffer 1-3), New England Biolabs Inc.
- 0.4 µl Restriktionsendonuklease 1, New England Biolabs Inc.
- 0.4 µl Restriktionsendonuklease 2, New England Biolabs Inc.
- 12 µl ddH₂O

- 0.2µl 100x BSA (Bovines Serum Albumin (C=10 mg/ml), aufgereinigt, New England Biolabs Inc.

Agarosegel

- Agarose, Roth
- TAE-Puffer (1x): 2 ml 50x TAE (242 g Tris Base; 57.1 g Essigsäure; 100 ml 0.5 M EDTA pH 8 auf 100 ml H₂O); 98 ml H₂O;
- Ethidiumbromid, Roth

Größenmarker

- 5 µl Lambda DNA-BstEII-Digest, New England Biolabs Inc.
- 5 µl 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb), New England Biolabs Inc.
- 5 µl 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs Inc.

2.1.9.5 Materialien für Maxikultur und Maxipräparation

- 200 µl Bakteriensuspension aus der Minikultur
- 200 ml LB-Medium (s. 2.1.9.4)
- Solution P1-3, QBT-Puffer, QC-Puffer, QF-Puffer des Quiagen Maxi-Kits
- 100% Isopropanol
- 70% Ethanol zum Waschen
- 0.5 ml ddH₂O
- Photometer: Bio Photometer, Eppendorf

2.1.10 Mäuse

- C57Bl/6-Mäuse, männlich, Alter 6 Wochen
- Streptozotocin, Sigma-Aldrich
- Blutzuckermessgerät, Bayer
- Glashomogenisator, Quiagen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 HEK 293T-Zellen

HEK 293T-Zellen (human embryonic kidney) wuchsen in 10 cm-Schalen und wurden in befeuchteten Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Als Nährmedium wurde DMEM mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) eingesetzt. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert, um eine Kontamination zu vermeiden. Zum Splitting wurden alle 2 Tage konfluente Zellen trypsinisiert. Nach Absaugen des alten Mediums mit einer Vakuumpumpe wurden die Zellen mit sterilem PBS (25%) kurz gewaschen und dann in 1ml Trypsin gelöst. Damit sich die Zellen besser ablösten, wurden die Schalen für 5 Minuten erneut in den Brutschrank gestellt und danach in 8-9 ml DMEM+FCS aufgenommen und je nach Splittungsverhältnis auf entsprechend viele vorbereitete Schalen verteilt.

2.2.1.2 Konditionell immortalisierte Maus-Podozyten

Konditionell immortalisierte Maus-Podozyten sind transgene Zellen, die eine temperatursensitive Form des SV40-large-T-Antigens unter der Kontrolle eines Interferon-induzierbaren Promoters exprimieren (Mundel et al., 1997). Diese wachsen bei 33°C (5% CO₂) in Anwesenheit von Interferon- γ . Bei einer Temperatur von 37°C und in Abwesenheit von Interferon- γ kommt es zu einem Wachstumsstopp, und die Podozyten zeigen eine differenzierte, verzweigte Struktur. Der Anteil von Nephtrin-Protein ist bei diesen Zellen allerdings gering (Yan et al., 2002). Konditionell immortalisierte Maus-Podozyten, die von Dr. P. Mundel freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, wurden bei 33°C mit einem ekotropen Retrovirus, der die Nephtrin-cDNA und eine Neomycin-Kassette bzw. als Kontrolle einen Leervektor mit Neomycin-Kassette enthält, transduziert und unter Zugabe von Neomycin (initial 200 μ g/ml, zum Erhalt 100 μ g/ml) selektioniert. Inkubation bei 37°C in Abwesenheit von Interferon- γ induzierte die Differenzierung über 10 bis 14 Tage (Shankland et al., 2007). Die Zellen wurden auf mit 10 % Kollagen-A beschichteten 10 cm-Schalen kultiviert. Als Zellmedium wurde RPMI 1640 mit Glutamin und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum verwendet.

2.2.2 Transfektion

Transfektion ist eine Methode zum Einschleusen fremder DNA in Zellen. Bei der Calciumphosphat-Methode nutzt man die Fähigkeit der Zellen aus, Calciumphosphatkristalle zu phagozytieren (Chen und Okayama, 1987). Die Kristalle werden von der Zelloberfläche adsorbiert und durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen (Loyter et al. 1982). Auf diese Weise kann kopräzipitierte Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht werden. Am Vorabend gesplittete HEK 293T-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert. Hierfür wurde 10-15 µg DNA in Eppendorf-Gefäße vorgelegt und unter dem sterilen Abzug 500 µg 0.25 M Calciumchlorid zu der DNA gegeben. Anschließend wurde tropfenweise über dem Schüttler unter ständigem Mischen 500 µl 2× HEBS hinzu pipettiert. Dieser Ansatz wurde sofort gleichmäßig auf die Zellen getropft. Nach 6-8 Stunden wurde die Transfektion gestoppt, indem durch Mediumwechsel noch verbliebene DNA/CaPO₄-Präzipitate aus dem Medium entfernt wurden.

Die Effizienz der Transfektion wurde durch fluoreszierende Proteine überprüft. Dazu wurde eine Schale mit GFP (Green Fluorescent Protein) transfiziert und am nächsten Tag unter Fluoreszenzlicht ausgewertet.

2.2.3 Zellernte

Am Tag zuvor wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Konstrukten transfiziert (s. 2.2.2). Nach Absaugen des Mediums wurde jede Schale mit 6 ml kaltem PBS (4°C) gespült und die Zellen durch wiederholten senkrechten PBS-Strahl abgelöst. Die in der PBS Lösung befindlichen Zellen wurden in 15 ml Gefäße überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun abgesaugt und jedes Pellet in 500 µl Lysier-Puffer (1%-Triton) resuspendiert, mit einer 1 ml-Pipette gelöst und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Detergenzien lösten die Zellwand auf und Proteaseinhibitoren verhinderten, dass die Proteine abgebaut wurden. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine 15-minütige Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Der Überstand konnte nun für eine Immunopräzipitation und Lysat-Herstellung verwendet werden.

Konditionell immortalisierte Maus-Podozyten wurden in eiskaltem PBS mit einem Zellkratzer geerntet, das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen Ernten.

2.2.4 Co-Immunopräzipitation

2.2.4.1 Co-Immunopräzipitation mit HEK 293T-Zellen und immortalisierten Maus-Podozyten

Mittels Immunopräzipitation können Interaktionen zwischen Proteinen nachgewiesen werden. HEK 293T-Zellen wurden in PBS geerntet und in 500 µl Lysier-Puffer lysiert (s. 2.2.3). Dem Überstand wurden 30 µl Lysat entnommen und dieses mit 30 µl 2× Lämmli für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. 450 µl des Überstandes wurden für die nun folgende Co-Immunopräzipitation verwendet. Dazu wurden die 450 µl bei 4°C mit einem Antikörper (4 µl) gegen das zu präzipitierende Protein auf einem Überkopfschüttler für 60 Minuten inkubiert. Danach wurden 30 µl Protein G-Sepharose-Kügelchen hinzugefügt und es schloss sich eine weitere Inkubation (60 Minuten, 4°C) auf einem Überkopfschüttler an, in der die Protein G-Sepharose an den Antikörper bindet. Bei sIg.7-Konstrukten erfolgte nur eine 60 minütige Inkubation mit Protein G-Sepharose-Kügelchen auf einem Überkopfschüttler bei 4°C, da die Protein G-Sepharose direkt an die sIg.7-Konstrukte binden. Flag-markierte Konstrukte wurden für 60 Minuten mit M2-Kügelchen, bei denen Anti-Flag Antikörper kovalent an Sepharose gebunden sind, auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Komplexe aus Kügelchen, Antikörper und Proteinen durch Zentrifugation gesammelt und mehrfach intensiv in Triton-1%-Lysier-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift versetzte man die Kügelchen mit 30 µl 2× Lämmli und sie wurden für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Im Anschluss erfolgte eine Auftrennung durch SDS-Page sowie ein Westernblot.

Für die Co-Immunopräzipitation endogener Proteine aus konditionell immortalisierten Maus-Podozyten wurden die geernteten Zellen zunächst zentrifugiert (14000 rpm, 15 Minuten, 4°C), der Überstand nach einem Ultrazentrifugationsschritt (40000 rpm, 40 Minuten, 4°C) in ein Eppendorf-Gefäße überführt und mit 15 µl Protein A-Sepharose für eine Stunde auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die Suspension für eine Minute bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 4°C mit 5 µl Anti-

Nephrin-Antikörper inkubiert und anschließend 30 μ l Protein A-Sepharose hinzugegeben. Darin wurden die Zellen wiederum für eine Stunde auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach der Co-Immunopräzipitation von HEK 293T-Zellen.

2.2.4.2 Co-Immunopräzipitation endogener Proteine aus Mäusenieren

Die Entnahme der Nieren von Wildtyp-Mäusen der C57Bl/6-Linie wurde freundlicherweise von Dr. Potthoff aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Nieren von Mäusen wurden *in situ* mit eiskaltem PBS perfundiert, um Blutbestandteile in den Gefäßen zu entfernen. Die Nieren wurden präpariert und entfernt. Nach Entnahme wurden die Nieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren. Sofort nach dem Auftauen auf Eis wurden die gesamten Nieren in CHAPS-Puffer mit einem Glas-Homogenisator mechanisch lysiert. Es folgte eine Zentrifugation (15000g, 30 Minuten, 4°C), um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde zu einer gleichen Gesamtproteinmenge justiert. Die Lysate wurden über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert und anschließend 30 μ l Protein A-Sepharose hinzugegeben. Darin wurden die Zellen für 3 Stunden auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach der Co-Immunopräzipitation von HEK 293T-Zellen.

2.2.5 Biotinylierung

Das Prinzip der Biotinylierung beruht auf der Markierung von Proteinen mit Biotin. Aufgrund der geringen Größe von Biotin (244 Da) kann es mit vielen Proteinen konjugiert werden, ohne deren biologische Aktivität zu verändern. Biotinylierung kann zur Markierung von Proteinen an der Zelloberfläche verwendet werden, da das Biotin die Zellmembran kaum durchdringt. Dabei macht man sich die hohe Affinität von Biotin zu Streptavidin zu Nutze, um die biotinylierten Proteine zu detektieren.

Am Tag zuvor transfizierte HEK 293T-Zellen wurden pro Schale mit 5 ml kalten PBSCM (4°C) kurz gespült und die Zellen durch wiederholten senkrechten PBSCM-Strahl abgelöst. Die in der Lösung gelösten Zellen wurden in 15 ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und jedes Pellet erneut in 5 ml kalten PBSCM (4°C) gelöst. Es folgte ein weiterer

Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C. Das Medium wurde dann wiederum abgesaugt und das Pellet nun mit 5 ml PBSCM mit Biotin (0.5 mg/ml) resuspendiert und die Zellen mit einer 1 ml-Pipette gelöst. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf einem Überkopfschüttler bei 4°C. Daraufhin wurden die Zellen für 3 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand konnte erneut abgesaugt werden und die Zellen wurden in 5 ml PBSCM mit 100 mM Glycin resuspendiert und für 20 Minuten auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert, um überschüssiges, ungebundenes Biotin zu entfernen. Es folgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 1500 rpm und 4°C. Im Anschluss wurde dieser Waschschrift wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und jedes Pellet in 500 µl Triton-1%-Lysier-Puffer resuspendiert, mit einer 1 ml-Pipette aufgelöst und in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Der Überstand wurde nun für eine Immunopräzipitation und Lysat-Herstellung verwendet. Zur Lysat-Herstellung wurden 30 µl des Überstandes mit 30 µl 2x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Für die Immunopräzipitation wurden 450 µl des Überstandes mit 30 µl Anti-Flag M2-Kügelchen für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, danach zentrifugiert und mehrfach in Triton-1%-Lysier-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Kügelchen mit 30 µl 2x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Im Anschluss konnte eine Auftrennung durch SDS-Page und ein Westernblot durchgeführt werden.

2.2.6 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Mit dieser Methode kann man Proteine elektrophoretisch trennen und dauerhaft auf einer Membran fixieren. Durch spezifische Antikörpernachweisreaktionen können die Proteine sichtbar gemacht werden (Towbin et al., 1979).

Mittels Westernblotanalyse können Größe und relative Menge der exprimierten Proteine bestimmt werden. Zelllysate und IP-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 2x-Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Das Reduktionsmittel DTT spaltet vorhandene Disulfidbrücken, so dass Proteine aufgefalteter werden. Im Folgenden wurden die Proteine mittels SDS-

Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Durch das Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird erreicht, dass Proteine nicht nur solubilisiert werden, sondern auch eine negative Gesamtladung erhalten, so dass ihre elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Proteins abhängt. Als Größenmarker diente der Prestained Protein Marker. Nach Ladung der Proben auf ein Gel, wanderten die Proteine im Sammelgel bei 70 Volt für 30 Minuten zunächst in Richtung Anode. Danach wurden sie im Trenngel bei 20 mA für 90 Minuten 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 wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung von 12 Volt für 45 Minuten aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Gültekin und Heermann, 1988). Danach erfolgte eine Inkubation in BSA (5% in Waschpuffer) für 60 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei 4°C, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

Bei allen folgenden Inkubationsschritten wurde nun bei Raumtemperatur gearbeitet. Nach drei fünfminütigen Waschsritten in Waschpuffer wurde die Membran für 60 Minuten mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte, um überschüssige Antikörper, die keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen waren, zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die 60minütige Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper. Dieser ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und zur Detektion an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, was nach Zugabe von der Visualisierungslösung (ECL) zu einer enzymatisch induzierten Lichtemission führte (Kricka, 1993). Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers schlossen sich erneut drei Waschschrte an. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran für eine Minute in der Visualisierungslösung inkubiert. Es folgte die Entwicklung mittels Imager Flour Chem FC2 von Biozym.

2.2.7 DNA-Subklonierung

2.2.7.1 PCR

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

Für die Versuche wurde ein Mastercycler von Eppendorf benutzt. In den Thermo-Cycler wurde ein Ansatz aus DNA-Template, Puffer, Taq-Polymerase, ddH₂O sowie den jeweiligen beiden Primern gegeben. Zunächst wurde der Ansatz bei 95°C für 1-3 Minuten inkubiert. Darauf folgten 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen: Im ersten Schritt bei 95°C für 45 Sekunden wurden die DNA-Doppelstränge des Templates gelöst, 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 nächsten Schrittes vervollständigte die Taq-Polymerase, eine hitzeresistente DNA-Polymerase, bei 68°C für 2 Minuten pro tausend Basenpaare die Einzelstränge zu Doppelsträngen, so dass am Ende eines Zyklus die gewünschte DNA-Sequenz verdoppelt worden war. Im letzten Zyklus erfolgte 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 Schüttler 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 werden. Es folgte eine Zentrifugation bei 13 000 rpm bei 4°C für 15 Minuten 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). Die Suspension 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.

2.2.7.2 Ligation

Die Methode der Ligation dient zum Einbau 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 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.

2.2.7.3 Transformation und Amplifikation

Zahlreiche Bakterien können Fremd-DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. In der Molekularbiologie werden kompetente Bakterienstämme mit rekombinanten DNA-Plasmiden beimpft, die von den Mikroorganismen aufgenommen werden. Bei jeder Zellteilung werden die Plasmide ebenfalls vermehrt und an die Tochterzellen weitergegeben. Diesen Ablauf beschreibt die Amplifikation. Auf diese Weise ist eine rasche und effektive Vervielfältigung rekombinanter DNA möglich.

Es wurden E.coli MC1061P3- (Ampicillin- und Tetracyclinresistenzinduktion) und MC1061- (Ampicillinresistenzinduktion) Bakterienstämme verwendet. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert und auf Eis aufgetaut. 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.

2.2.7.4 Minikultur und Minipräparation

Von den bei der Transformation gewachsenen Bakterienkolonien wurden zwei mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und jeweils in ein 15 ml Röhrchen gegeben, in das schon 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum vorgelegt wurden. Diese Röhrchen wurden für mindestens 6 Stunden bei 37°C und 220 U/min auf einem Rotor inkubiert, bis eine Trübung des Mediums ein Bakterienwachstum anzeigte (Minikultur).

Mit einer im Anschluss durchgeführten Minipräparation unter Verwendung eines 1 ml der Bakteriensuspension, konnte die Plasmid-DNA der Bakterien gewonnen werden. Hierzu wurden die Bakterien zunächst durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 13000 rpm und 4°C pelletiert, 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 Zentrifugation für 30 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C, um die Zellbestandteile zu entfernen. Von der entstandenen klaren DNA-enthaltende Lösung wurden 800 µl des Überstandes mit 560 µl 100 % Isopropanol versetzt und kräftig geschüttelt, um die DNA zu fällen. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C. 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, die Auskunft über den Erfolg der Amplifikation gab.

2.2.7.5 Maxikultur und Maxipräparation

Die Maxikultur dient der weiteren Vervielfachung der Plasmid-DNA in Bakterien. Hierfür wurde nach erfolgreicher Amplifikation mit 200 µl Bakteriensuspension aus der Minikultur und 200 ml LB-Medium inklusive der entsprechenden Antibiotika eine Maxikultur angelegt. Die Bakterienkultur wurde unter ständigem Schütteln für 12-24 Stunden bei 37°C und 220U/min auf einem Rotor vermehrt. Nach Eintreten der gewünschten Trübung konnte die Maxipräparation erfolgen.

Zunächst wurde die Suspension für 15 Minuten bei 4400 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und der bakterienhaltige Bodensatz wurde nun nach dem Protokoll des Maxi-Kits der Firma Quiagen lysiert und weiterbehandelt. Zur Ausfällung der gewonnenen DNA wurde 100% Isopropanol im Verhältnis 1:1 dazugeben und erneut für 60 Minuten bei 4400 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Isopropanol wurde abgossen und das Pellet mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, um Salze von der DNA zu lösen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (60 Minuten, 4400 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet seiner Größe entsprechend in 200-500 µl ddH₂O

gelöst. Im Anschluss wurde die Konzentration der gewonnenen DNA bei 260 nm Wellenlänge bestimmt, welches dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren in Lösungen entspricht. Die Konzentration ergab sich dabei entsprechend des Lambert-Beerschen-Gesetzes in $\mu\text{g/ml}$.

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 60 Minuten inkubiert und anschließend auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen. Der Verdau wurde für 60 Minuten bei 100 Volt 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 ermöglicht somit eine Kontrolle der Plasmid-Amplifikation.

2.2.8 Typ I Diabetesmodell an Mäusen

Die Durchführung der Versuche an Mäusen wurde freundlicherweise von Dr. Potthoff aus unserer Arbeitsgruppe übernommen. Für einen induzierten Diabetes wurden 6 Wochen alte Wildtyp-Mäuse der C57Bl/6-Linie intraperitoneal mit einer hohen Dosis Streptozotocin (200 mg/kg/KG) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Für eine anhaltende Hyperglykämie wurde den Mäusen intraperitoneal Glukose ($6\mu\text{g/g/KG}$) 24 Stunden, 34 Stunden und 44 Stunden nach der letzten Injektion von Streptozotocin verabreicht. Die Blutglukose wurde mittels eines Blutzuckermessgerätes der Firma Bayer gemessen. Nach über 24 Stunden mit erhöhten Glukosewerten wurden die Glomeruli isoliert und konnten im Anschluss für eine Immunpräzipitation weiterwendet werden.

2.2.9 Statistik

Die im Ergebnisteil (Kapitel 3) dargestellten Daten sind als \pm Standardabweichung von n Experimenten zu verstehen. Die statistische Evaluation wurde mittels Student's t-Test durchgeführt, gefolgt von einem Bonferroni-Test (SigmaPlot). Werte von $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Hyperglykämie für die Endozytose von Nephrin

Die molekularen Mechanismen, wie Hyperglykämie zur Entwicklung einer Mikroalbuminurie führt, sind bis jetzt nur unvollständig untersucht und verstanden. In unserer Hypothese vermindert Hyperglykämie die Expression von an der Schlitzmembran verankertem Nephrin. Die verminderte Expression von Nephrin führt damit zu Störungen des glomerulären Filters und zu einer Albuminurie. Demzufolge wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob sich unter Hyperglykämie die Verteilung von Nephrin an der Zelloberfläche verändert. Hierzu wurden HEK 293T-Zellen mit C-terminal Flag-markiertem vollständigem Nephrin (Nephrin.F) transfiziert und für 24 Stunden einem Medium mit entweder niedriger oder hoher Glukose ausgesetzt. Die Glukosekonzentrationen wurden nach physiologischen Aspekten ausgewählt und gleichen Normoglykämie (5.5 mM ~ 99 mg/dl) und schwerer Hyperglykämie (40 mM ~ 721 mg/dl). Mit Hilfe eines Biotinylierungs-Assays konnte die Oberflächenexpression von Nephrin gemessen werden. Die geernteten Proteine wurden biotinyliert und mit Anti-Flag M2-Sepharose-Kügelchen präzipitiert. Im Anschluss erfolgten die Auftrennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und der Transfer mittels Westernblot. Die Inkubation der Membran mit Anti-Streptavidin-Antikörper zeigt deutlich, dass unter hoher Glukose eine signifikante Abnahme von Nephrin an der Zelloberfläche zu beobachten ist (Abb. 6).

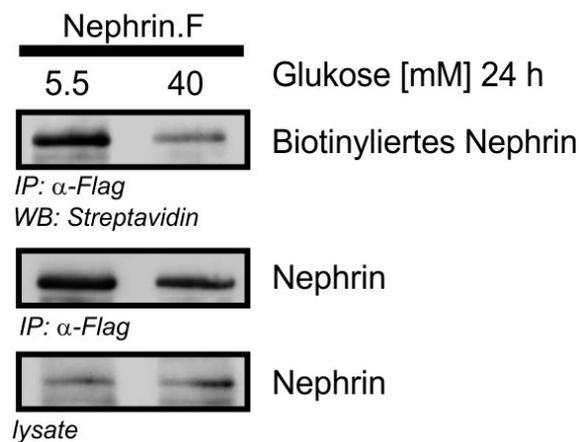


Abb. 6: Einfluss von hoher Glukosekonzentration auf die Oberflächenexpression von Nephrin
HEK 293T-Zellen wurden mit Flag-markiertem Nephrin (Nephrin.F) vorübergehend überexprimiert. Die Immunopräzipitation (IP) erfolgte mit Anti-Flag M2-Sepharose-Kügelchen (α -Flag) und der Nachweis von Nephrin mit Anti-Flag M2 Antikörper. Die Oberflächenexpression von Nephrin wurde durch Erkennung des biotinylierten Nephrinanteils mittels Streptavidin ermittelt. Der Nachweis von Nephrin in den Lysaten und der IP diente der Expressionskontrolle. mM: Millimol; WB: Westernblot, h: Stunde.

Dieses Ergebnis weist auf einen hohen Grad der Internalisierung bzw. der Endozytose von Nephrin unter Hyperglykämie hin. Der Nachweis von Nephrin in den Lysaten und der IP diente der Expressionskontrolle. Abbildung 7 zeigt die statistische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten und bestätigt die Ergebnisse der Westernblotanalyse.

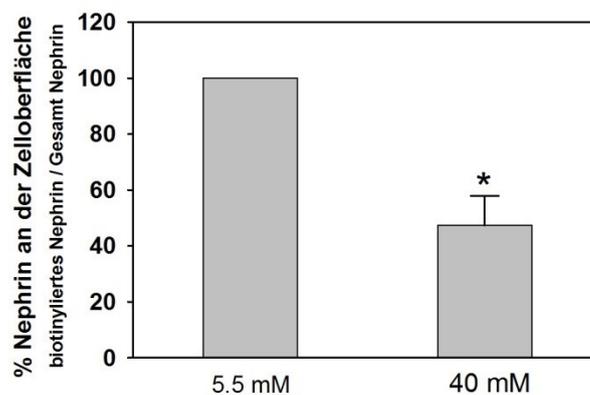


Abb. 7: Statistische Auswertung mittels Student's t-Test
Graphische Darstellung der Oberflächenverteilung von Nephrin. * $p < 0.001$; mM: Millimol.

3.2 Bedeutung von β -Arrestin2 für die Endozytose von Nephtrin bei Hyperglykämie

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass die Bindung von β -Arrestin2 an Nephtrin zu der Endozytose von Nephtrin führt (Quack et al., 2006). Darauf aufbauend wollten wir feststellen, welchen Einfluss Hyperglykämie auf die Interaktion von Nephtrin mit β -Arrestin2 hat. Wir erwarteten, dass hohe Glukose einen direkten Effekt auf die Protein-Proteininteraktion von Nephtrin und β -Arrestin2 ausüben würde. Der zytoplasmatische Abschnitt von Nephtrin ist mit 156 Aminosäuren relativ kurz. Um ein Membran-gebundenes Fusionsprotein des C-terminalen zytoplasmatischen Abschnitts von Nephtrin zu erhalten, wurde eine pCDM8 Kasette genutzt, in welcher der C-terminale zytoplasmatische Anteil von Nephtrin mit den CH2- und CH3-Domänen von humanem IgG₁ fusioniert wurde. Nach dieser Sequenz folgte der transmembranäre Abschnitt von CD7 (Sellin et al., 2003). Es wurden HEK 293T-Zellen mit Flag-markierten β -Arrestin2 (β -arrestin2.F) und C-terminal Ig-markierten Nephtrin (Ig.Nephtrin) oder im Kontrollansatz ein Fusionsprotein ohne den C-terminalen Anteil von Nephtrin (Ig.ctrl) transfiziert und für 24 Stunden mit steigender Glukosekonzentration inkubiert. Die Glukosekonzentrationen gleichen Normoglykämie (5.5 mM ~ 99 mg/dl), mäßiger (25 mM ~ 450 mg/dl) und schwerer Hyperglykämie (40 mM ~ 721 mg/dl). Die geernteten Proteine wurden mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen (α -human IgG), die an die Fc-Region von IgG binden, präzipitiert. Nach Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wurden die Proben der Co-IP und der gewonnenen Lysate durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und die Membran mit Anti-Flag-Antikörper inkubiert. Die Inkubation der Membran mit Anti-Flag-Antikörper zeigt, dass eine Interaktion zwischen Nephtrin und β -Arrestin2 bei niedriger Glukosekonzentration nachweisbar ist und diese mit steigender Konzentration signifikant verstärkt wird (Abb. 8).

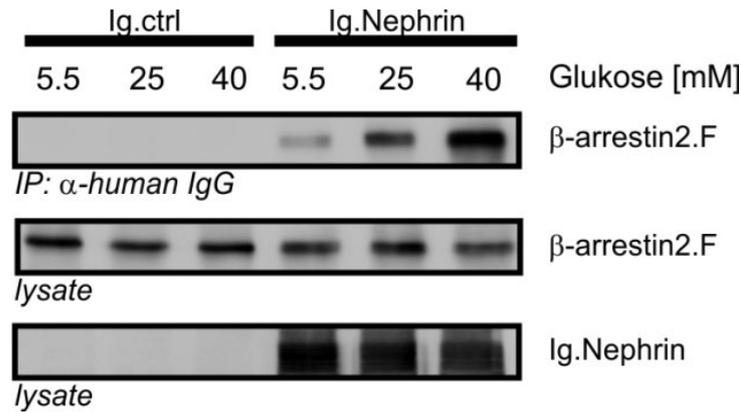


Abb. 8: Einfluss steigender Glukosekonzentration

Die Interaktion wurde durch die Färbung von β -Arrestin2 nachgewiesen und nimmt unter steigender Glukosekonzentration zu. Die Membran mit den Zelllysaten wurde zum Expressionsnachweis von β -Arrestin2 mit Anti-Flag-Antikörper, zum Expressionsnachweis von Nephrin mit Anti-humanem IgG-Antikörper gefärbt. IP: Immunopräzipitation; mM: Millimol.

Die Lysate zeigen die gleichmäßige Expression von Nephrin und β -Arrestin2. Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten wurden durch Densitometrie quantifiziert und graphisch dargestellt (Abb. 9).

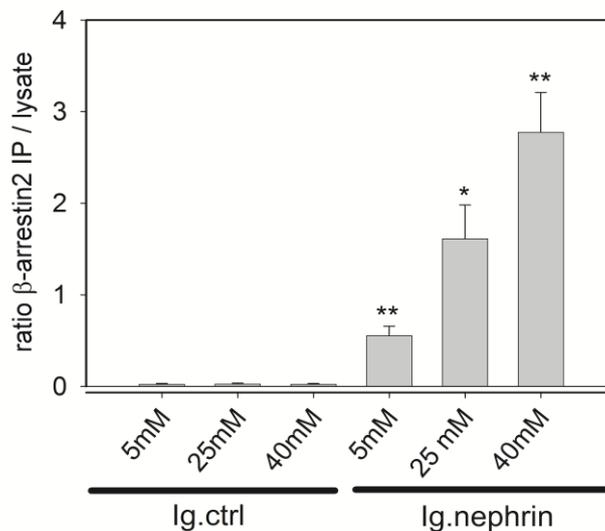


Abb. 9: Densitometrische Analyse der Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion unter steigenden Glukosekonzentrationen

Es sind die Ergebnisse mehrerer Experimente als Ratio der β -Arrestin2 Immunopräzipitation-Signalstärke zur Lysat-Signalstärke (ratio β -Arrestin2 IP/lysate) abgebildet. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; mM: Millimol.

Zudem war natürlich von Interesse, welchen Einfluss der zeitliche Verlauf auf die Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 unter Hyperglykämie hat. Für diesen Versuch wurden HEK 293T-Zellen transient mit Flag-markiertem β -Arrestin2 und C-terminal Ig-markiertem Nephrin kotransfiziert. Die Zellen wurden entweder in niedriger Glukose

(5.5 mM ~ 99 mg/dl) für 24 Stunden oder in hoher Glukose (40 mM ~ 721 mg/dl) für 1 bis maximal 24 Stunden inkubiert. Nach der Co-Immunopräzipitation mit Protein G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese und Westernblot folgte die Inkubation der Membran mit Anti-Flag-Antikörper zur Detektion der Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2. Abbildung 10 zeigt, dass die Gabe hoher Glukose zu einer Zunahme der β -Arrestin2-Nephrin-Bindung führt. Dieser Effekt kann drei Stunden nach Gabe der Glukose festgestellt werden und ist im weiteren zeitlichen Verlauf zunehmend. In den Lysaten zeigt sich eine stabile Expression von Nephrin und β -Arrestin2. Unter niedriger Glukose ist die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin schwächer ausgeprägt.

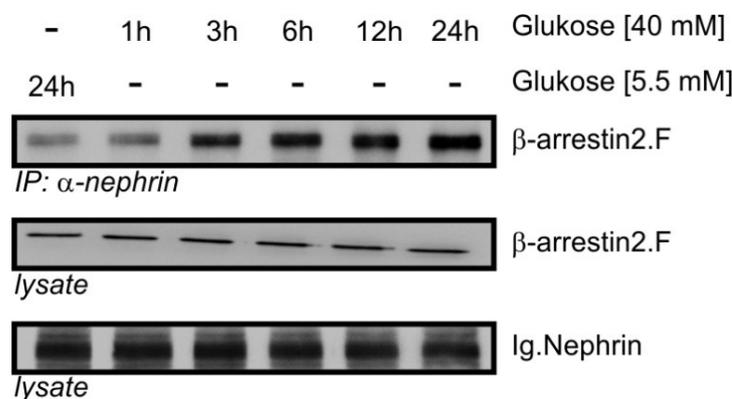
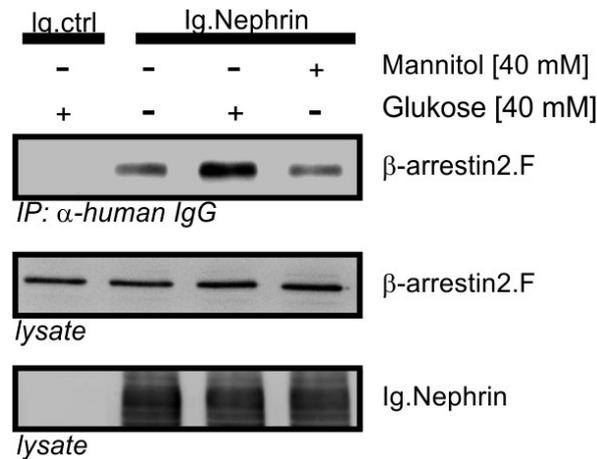


Abb. 10: Zeitverlauf der Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion unter Hyperglykämie

Nach 3 Stunden ist eine Zunahme der β -Arrestin2-Nephrin-Bindung festzustellen, welche nach 24 Stunden noch eindeutig nachweisbar ist. Die Interaktion wurde durch die Färbung von β -Arrestin2 ermittelt. Die Zelllysate zeigen die gleichmäßige Expression von Nephrin und β -Arrestin2. IP: Immunopräzipitation; mM: Millimol; h: Stunde.

Um einen falsch-positiven Effekt auf die Proteininteraktion durch eine osmotische Wirkung der Glukose und ein Anschwellen der Zellen auszuschließen, wurde eine osmotische Kontrolle mit Mannitol durchgeführt. Hierfür wurden C-terminal Ig-markiertes Nephrin (Ig.Nephrin) und Flag-markiertes β -Arrestin2 (β -arrestin2.F) in HEK 293T-Zellen transient überexprimiert. Als Negativkontrolle wurde entsprechend Ig.ctrl (Ig.ctrl) eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden in 40 mM Glukose oder 40 mM Mannitol inkubiert und in der anschließenden Immunopräzipitation wurde das kopräzipitierte β -Arrestin2 durch Inkubation mit Anti-Flag Antikörper detektiert. Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass unter maximaler Konzentration von Mannitol die Stärke der Interaktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht geändert wird.

**Abb. 11: Osmotische Kontrolle**

Nach Transfektion wurden die Zellen in Glukose (40 mM) oder Mannitol (40 mM) für 24 Stunden inkubiert. Co-Immunopräzipitation (IP) und Nachweis der Interaktion durch Färben von β -Arrestin2. Die Zellysate zeigen die gleichmäßige Expression von β -Arrestin2 und Nephrin. mM: Millimol.

Abgeleitet von den Ergebnissen der Interaktion von β -Arrestin2 und Nephrin im Überexpressions-System, wurde in einem nächsten Schritt die Interaktion endogener Proteine untersucht. Wäre diese Interaktion auch an der glomerulären Schlitzmembran *in vivo* von Relevanz, bedeute dies, dass bei Hyperglykämie eine vermehrte Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion zu einer gesteigerten Endozytose von Nephrin und damit zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Schlitzmembran führen würde. Glomeruli von C57Bl/6-Mäusen wurden isoliert und für 24 Stunden niedrigen (5.5 mM \sim 99 mg/dl) bzw. hohen (40 mM \sim 721 mg/dl) Glukosekonzentrationen ausgesetzt. Die Glomeruli aus Mäusenieren wurden lysiert, es folgte eine IP mit Anti- β -Arrestin2-Antikörper, eine SDS-Gelelektrophorese und eine Detektion der endogenen Proteine im Westernblot. Abbildung 12 zeigt, dass endogenes β -Arrestin2 endogenes Nephrin präzipitiert. Endogenes Nephrin und β -Arrestin2 in den Lysaten wurde mit einem Nephrin-spezifischen bzw. β -Arrestin2-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Unter hohen Glukosespiegeln wird auch die Interaktion endogener Proteine verstärkt.

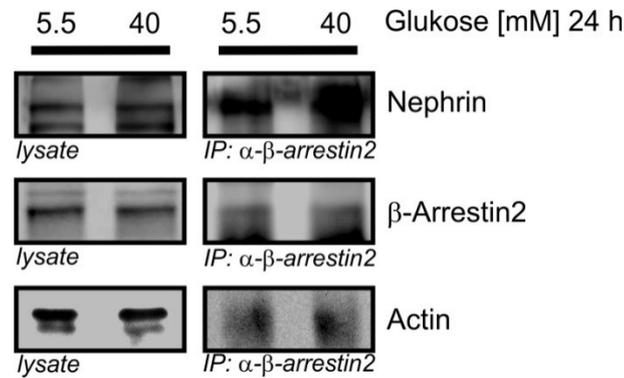


Abb. 12: Nachweis der endogenen Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 aus Nierenlysat
 Glomeruli von C57Bl/6-Mäusen wurden isoliert und für 24 Stunden in Glukose (5.5 oder 40 mM) inkubiert. Es wurde β -Arrestin2 immunopräzipitiert (IP) und die Interaktion durch Färbung von Nephrin nachgewiesen. Färbung der IP und Lysate von β -Arrestin2 und der Lysate von Nephrin mit spezifischen Antikörpern dienten der internen Kontrolle. mM: Millimol; h: Stunde.

3.3 Die Rolle von PKC α

Es konnte bis jetzt noch keine Kinase identifiziert werden, die die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin vermittelt. Es ist bekannt, dass die Regulation der β -Arrestin2-Bindung durch Serin-/Threonin-Phosphorylierung der Zielproteine vermittelt wird (Xiang et al., 2001; Lorenz et al., 2007; DeWire et al., 2007). Eine Sequenzanalyse des C-Terminus von Nephrin zeigt ein Motiv, dass durch PKC phosphoryliert werden kann (S/T-X-X-K/R). Dies befindet sich innerhalb des β -Arrestin2 Interaktionsmotives (S/TX₄₋₅S/T) (Pearson und Kemp, 1991). Kinasen aus der PKC-Familie schienen demnach ein vielversprechender Kandidat bei der Modulation der Nephrin- β -Arrestin2-Bindung.

3.3.1 Einfluss von PKC α auf die Interaktion von β -Arrestin2 und Nephrin unter Hyperglykämie

Für den Nachweis eines Effektes der Aktivität von PKC auf die Bindung von β -Arrestin2 wurden HEK 293T-Zellen mit Flag-markierten β -Arrestin2 (β -arrestin2.F) und C-terminal Ig-markierten Nephrin (Ig.Nephrin) oder im Kontrollansatz ein Fusionsprotein ohne den C-terminalen Anteil von Nephrin (Ig.ctrl) transfiziert und mit dem PKC-Aktivator PMA (500 nM) für 10 bzw. 20 Minuten stimuliert. PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) bindet an PKC und wirkt ähnlich wie Diacylglycerol (DAG) (Castagna et al., 1982). Nach der Co-Immunopräzipitation mit Protein G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese und Westernblot folgte die Inkubation der Membran mit Anti-

Flag-Antikörper zur Detektion der Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2. Nach Zugabe von PMA zeigte sich eine Zunahme der Interaktion nach 10 bzw. 20 Minuten (Abb. 13).

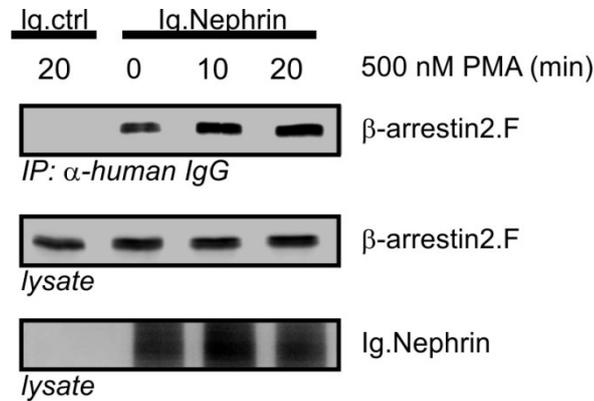


Abb. 13: Einfluss von PMA auf die Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion

Der PKC-Aktivator PMA wurde für 10 bzw. 20 Minuten vor der Ernte hinzugegeben. Die Interaktion wurde durch die Färbung gegen β -Arrestin2 nachgewiesen. Die Zelllysate zeigen die gleichmäßige Expression von Nephrin und β -Arrestin2. IP: Immunopräzipitation; nM: Nanomol; min: Minute; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat.

Diese Ergebnisse weisen auf eine regulatorische Rolle von PKC für die Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 hin. Zur Quantifizierung wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt, welche die Ergebnisse der Westernblotanalyse bestätigt (Abb. 14).

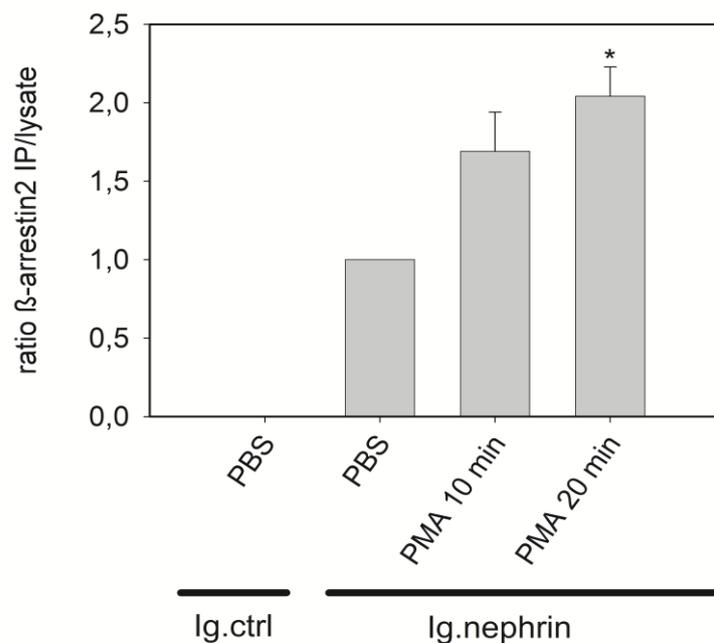


Abb. 14: Densitometrische Analyse der Interaktion von Nephrin und β -Arrestin2 unter PMA

Statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten mittels Student's t-Test. * $p < 0.05$; min: Minute; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat.

In einem nächsten Schritt wollten wir untersuchen, ob PKC die verstärkte Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin unter hoher Glukose vermittelt. Für das Folgeexperiment wurden HEK 293T-Zellen mit Flag-markierten β -Arrestin2 (β -arrestin2.F) und Ig.Nephrin (Ig.Nephrin) oder im Kontrollansatz ein Ig-markiertes Protein ohne den C-terminalen Anteil von Nephrin (Ig.ctrl) überexprimiert. Es folgte die Verwendung von niedriger (5.5 mM \sim 99 mg/dl) oder hoher Glukosekonzentration (40 mM \sim 721 mg/dl) und Behandlung der Zellen mit Calphostin C (1 μ M) oder DMSO als Lösungsmittel für 12 Stunden. Calphostin C ist ein allgemeiner Inhibitor der PKC (Kobayashi et al., 1989). Die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin wird durch Calphostin C auch unter hoher Glukose vollständig aufgehoben (Abb. 15).

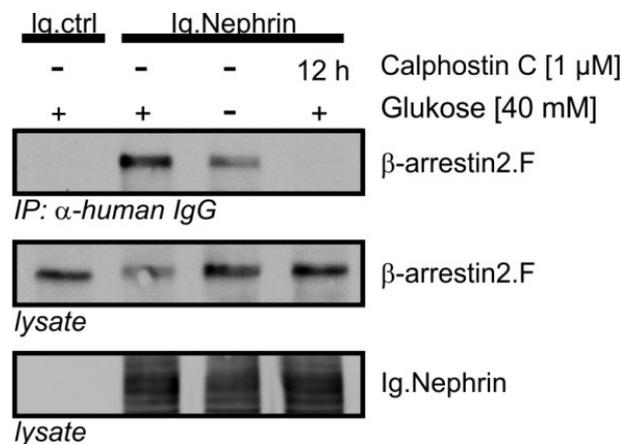


Abb. 15: Einfluss von Calphostin C auf die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin unter Hyperglykämie

HEK 293T-Zellen wurden nach Transfektion und Zugabe von niedriger (5.5 mM) oder hoher Glukose für 12 Stunden mit Calphostin C oder einem Lösungsmittel behandelt. Es folgte eine Co-Immunopräzipitation (IP) von Ig.Nephrin oder dem Kontrollvektor Ig.ctrl und Nachweis der Interaktion durch Färben von β -arrestin2.F. Färbung der Lysate von Nephrin und β -Arrestin2 diente der internen Kontrolle. mM: Millimol; μ M: Mikromol; h: Stunde.

Aufgrund der verschiedenen Isoformen der PKC-Familie setzten wir einen spezifischeren Inhibitor der PKC ein, um die entscheidende Isoform zu identifizieren. Die Zellen wurden entweder mit einem Lösungsmittel (DMSO) oder einem PKC α Inhibitor, Safingol (20 μ M), für 30 Minuten vorbehandelt. Unter Behandlung mit Safingol kann eine Abnahme der β -Arrestin2-Bindung nachgewiesen werden (Abb. 16).

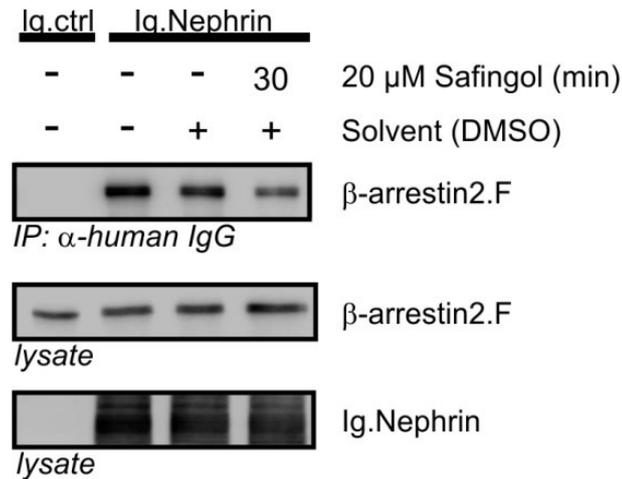
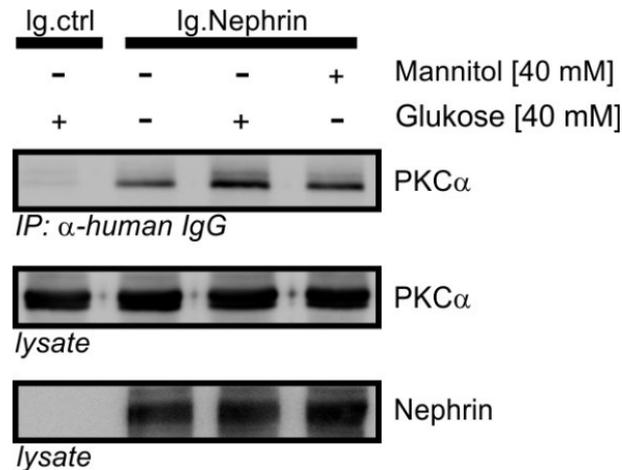


Abb. 16: Die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin nach Zugabe des PKC α -Inhibitors Safingol

Vor der Ernte wurde ein Teil der Zellen für 30 Minuten in einem Lösungsmittel oder in Safingol inkubiert. Es folgte eine Co-Immunopräzipitation (IP) von Ig.Nephrin oder dem Kontrollvektor Ig.ctrl und Nachweis der Interaktion durch Färben von β -arrestin2.F. Die Zelllysate zeigen die gleichmäßige Expression von β -Arrestin2 und Nephrin. DMSO: Dimethyl Sulphoxide; min: Minute.

3.3.2 Die Interaktion von PKC α mit Nephrin

Nachdem die Versuche mit PKC-Inhibitoren nahelegten, dass PKC α die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin vermittelt, wurde darauf aufbauend untersucht, ob PKC α direkt mit Nephrin interagiert. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit unmarkierten PKC α (PKC α), mit C-terminal Ig-markiertem Nephrin (Ig.Nephrin) oder im Kontrollansatz ein Ig-markiertes Protein ohne den C-terminalen Anteil von Nephrin (Ig.ctrl) transient transfiziert und die Zellen für 24 Stunden entweder in niedriger (5.5 mM \sim 99 mg/dl), hoher Glukose (40 mM \sim 721 mg/dl) oder Mannitol (40 mM) als osmotische Kontrolle inkubiert. Nach der Immunopräzipitation mit Protein G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese und Westernblot folgte die Inkubation der Membran mit Anti-Flag-Antikörper zur Detektion der Interaktion von Nephrin und PKC α . Abbildung 17 zeigt, dass Nephrin PKC α auch ohne Zugabe von Glukose präzipitiert (obere Reihe, zweite Spur) und diese Interaktion unter hoher Konzentration von Glukose verstärkt wird.

**Abb. 17: Nephrin präzipitiert PKC α**

Nach Transfektion wurden die Zellen in Glukose (5.5 mM bzw. 40 mM) oder Mannitol (40 mM) für 24 Stunden inkubiert. Co-Immunopräzipitation (IP) und Nachweis der Interaktion durch Färben von PKC α . Die Lysate zeigen die gleichmäßige Expression von PKC α und Nephrin. mM: Millimol.

3.3.3 Nachweis der Hochregulation von PKC α *in vivo*

Aufgrund des Ergebnisses, dass PKC α höchstwahrscheinlich den Effekt von hoher Glukose auf die verstärkte Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin vermittelt, war nun von Interesse, wie sich die Expression von PKC α in Podozyten unter hoher Glukose verhalten würde. Es war unsere Vermutung, dass hohe Glukose zu einer Hochregulierung von PKC α führen würde. Für den endogenen Proteinnachweis wurden immortalisierte murine Podozyten in 40 mM Glukose für definierte Zeitpunkte inkubiert. Eine osmotische Kontrolle wurde mit 25 mM Mannitol für 24 Stunden durchgeführt. Die Maus-Podozyten wurden lysiert, das Lysat mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, woran sich ein Westernblot und eine Inkubation der Membran mit Anti-PKC α -Antikörper anschloss, um PKC α zu detektieren. Die Spur links in Abbildung 18 zeigt den Nachweis von PKC α vor der Zugabe von Glukose.

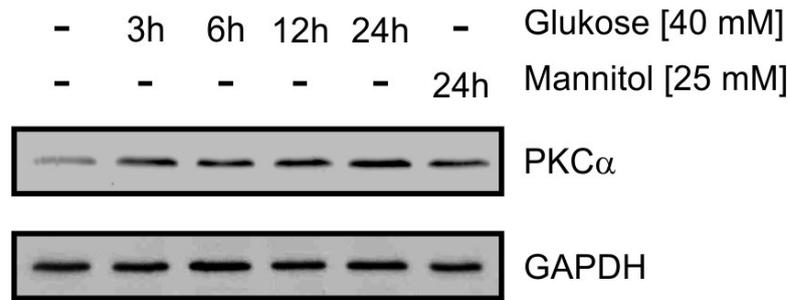


Abb. 18: Expression von PKC α in Maus-Podozyten unter hoher Glukosekonzentration

Die obere Reihe zeigt die Expression von PKC α unter Zugabe von 40 mM Glukose zu den angegebenen Zeiten. Die Gabe von Mannitol zeigt die osmotische Kontrolle. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente der internen Kontrolle. mM: Millimol; h: Stunde.

Die Proteinexpression von PKC α wird nach drei Stunden hyperglykämischer Bedingungen deutlich verstärkt und nimmt nach 24 Stunden noch signifikant zu. Die osmotische Kontrolle mit Mannitol zeigt, dass darunter die Expression von PKC α nicht verändert wird. Zur Quantifizierung dieses Effektes erfolgte eine densitometrische Auswertung und graphische Darstellung als Ratio von PKC α Signalstärke im Verhältnis zur GAPDH Signalstärke (Ratio PKC α /GAPDH). Wie in Abbildung 19 zu sehen bestätigte diese die Ergebnisse der Westernblotanalyse.

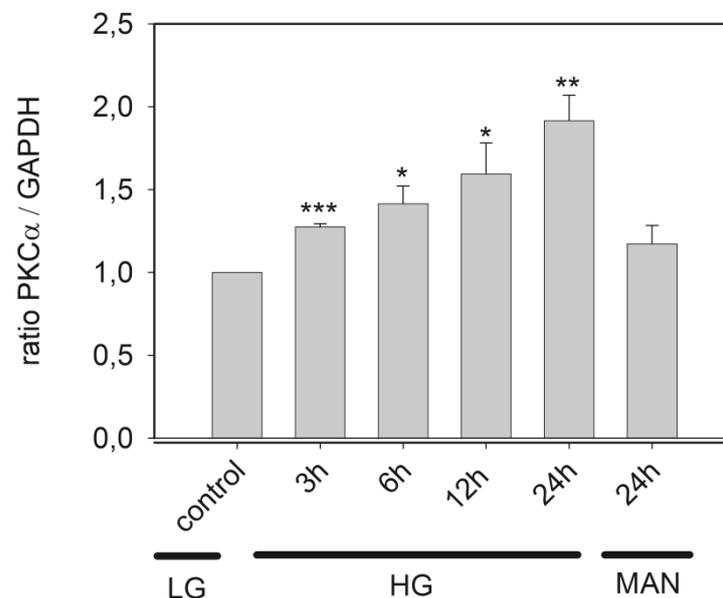


Abb. 19: Densitometrische Analyse der Expression von PKC α in Podozyten unter Hyperglykämie

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; LG: Keine Glukose; HG: hohe Glukosekonzentration; MAN: Mannitol; h: Stunde. Statistische Auswertung mittels Student's t-Test. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Darauf aufbauend, dass unter Hyperglykämie eine Hochregulation der PKC α in Maus-Podozyten beobachtet werden konnte, wollten wir konsequenterweise in einem nächsten Schritt die Expression von PKC α in einem etablierten Modell des Typ I Diabetes untersuchen. Hierfür wurde in C57Bl/6-Mäusen mit Streptozotocin (STZ) die Entwicklung eines Diabetes induziert. Es erfolgten zwei intraperitoneale Gaben von STZ (200 mg/kgKG) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Mäuse wurden für 24 Stunden Glukosekonzentrationen im Blut >33 mmol/l ausgesetzt, beginnend mit der ersten Glukosegabe 24 Stunden nach der letzten Gabe von Streptozotocin. Die Nieren wurden danach präpariert, die Glomeruli isoliert, geerntet und lysiert. Nach SDS-Gelelektrophorese folgte ein Westernblot zur Detektion von PKC α . Es ist ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression von PKC α in den Glomeruli diabetischer Mäuse (DM) im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollgruppe (WT) nachweisbar (Abb. 20). Der Nachweis der GAPDH diente der internen Kontrolle.

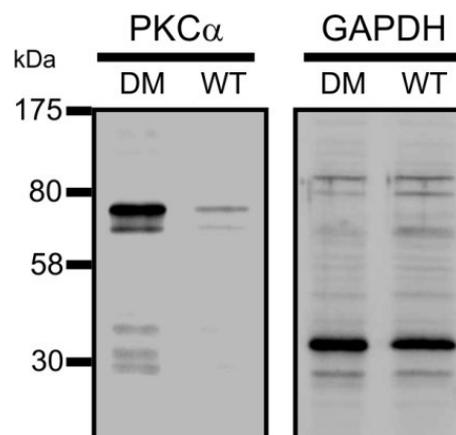


Abb. 20: Die Expression von PKC α in Nierenlysaten diabetischer Mäuse unter Hyperglykämie

Mittels Injektion von Streptozotocin wurde in C57Bl/6-Mäusen Diabetes Typ I induziert. Die Glomeruli wurden nach 24 Stunden Hyperglykämie (>33 mmol/l) isoliert, geerntet und lysiert. Die Proteinexpression von PKC α wurde im Westernblot gemessen und ist bei den diabetischen Mäusen (DM) im Vergleich zum Wildtyp (WT) deutlich erhöht. Der Nachweis der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente der internen Kontrolle. kDa: Kilodalton.

3.4 PICK1 als Teil des Proteinkomplexes aus Nephrin, PKC α und β -Arrestin2

3.4.1 Einfluss des zytoplasmatischen Abschnitts von Nephrin auf die Interaktion mit PICK1

Es ist bekannt, dass PICK1 als ein Gerüstmolekül fungiert, welches PKC α in unmittelbarer Nähe seiner Zielproteine bringt (Xu und Xia, 2006; Hanley, 2008). Es stellte sich die Frage, ob diese Funktion von PICK1 auch auf eine Interaktion mit Nephrin zutreffen könnte, und demnach PICK1 in einem Komplex mit Nephrin PKC α rekrutiert. Um zu untersuchen, ob der zytoplasmatische Anteil von Nephrin und PICK1 interagieren, wurden HEK 293T-Zellen mit C-terminal Ig-markiertem Nephrin (Ig.Nephrin) bzw. im Kontrollansatz mit einem Fusionsprotein ohne den C-terminalen Anteil von Nephrin (Ig.ctrl) und jeweils C-terminal Flag-markiertes PICK1 (PICK1.F) kotransfiziert. Ein Teil der HEK 293T-Zellen wurden 15 Minuten vor der Ernte mit PMA (1 μ M) stimuliert. Nach Co-Immunopräzipitation mit Protein G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese und Westernblot, folgte die Inkubation der Membran mit Anti-Flag-Antikörper. Abbildung 21 zeigt eine Interaktion von Nephrin mit PICK1 in der Co-IP. Die Zugabe von PMA beeinflusst die Interaktion nicht. Die Negativkontrolle Ig.ctrl interagiert nicht mit PICK1.F.

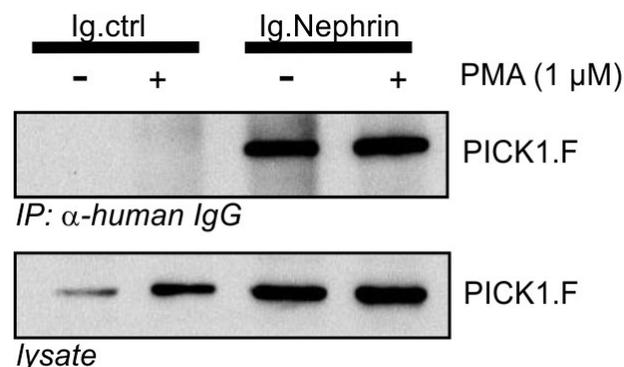


Abb. 21: Interaktion von PICK1 und Nephrin

Inkubation eines Teils der Zellen in PMA für 15 Minuten. Es folgte eine Co-Immunopräzipitation (IP) von Ig.Nephrin oder dem Kontrollvektor Ig.ctrl mit α -humanem IgG und Nachweis der Interaktion durch Färben von PICK1.F. Die Zellysate zeigen die Expression von PICK1. PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; μ M: Mikromol.

Abgeleitet von der nachgewiesenen Interaktion zwischen PICK1 und Nephrin, war nun von Interesse, wie sich die Interaktion unter Hyperglykämie verhalten würde. HEK 293T-Zellen wurden wiederum transient mit Ig-markiertem Nephrin (Ig.Nephrin), als

Negativkontrolle mit einem Fusionsprotein ohne den C-terminalen Anteil von Nephrin (Ig.ctrl) und jeweils Flag-markiertem PICK1 (PICK1.F) kotransfiziert. Der Folgeversuch wurde unter niedriger (5.5 mM ~ 99 mg/dl) und hoher Glukosezugabe (40 mM ~ 721 mg/dl) für 24 Stunden durchgeführt. Der Westernblot mit Anti-Flag-Antikörper detektiert kopräzipitiertes PICK1, wobei die Bindung an Nephrin unabhängig von der Glukosekonzentration auf einem ähnlichen Niveau blieb (Abb. 22). Die Zelllysate zeigen die Expressionskontrolle von PICK1 und Nephrin.

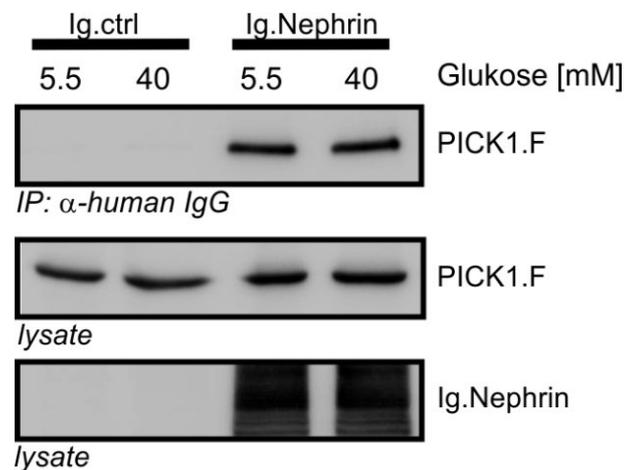


Abb. 22: Interaktion von Nephrin und PICK1 unter Hyperglykämie

Nach Inkubation der transfizierten Zellen in 5.5 oder 40 mM Glukose, erfolgte eine IP mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen (α -human IgG). Die obere Reihe zeigt kopräzipitiertes PICK1. Die Lysate wurden zur Expressionskontrolle von PICK1 mit Anti-Flag-Antikörper und zur Expressionskontrolle von Nephrin mit Anti-humanIgG-Antikörper gefärbt. mM: Millimol.

3.4.2 Bedeutung der PDZ-Domäne von PICK1 für die Interaktion mit Nephrin

Eine Mehrzahl der Protein-Proteininteraktionen von PICK1 mit Interaktionspartnern, die ein PDZ-Bindungsmotiv aufweisen, wird durch die PDZ-Domäne von PICK1 vermittelt (Xu und Xia, 2006). Es liegt die Vermutung nahe, dass PICK1 mit der PDZ-Domäne auch an Nephrin bindet. Staudinger et al. konnten zeigen, dass die PDZ-Domäne von PICK1 mit dem COOH-Terminus von PKC α interagiert, welches ein PDZ-Bindungsmotiv (QSAV) enthält (Staudinger et al., 1997).

Um zu untersuchen, ob die PDZ-Domäne von PICK1 die Bindung an Nephrin vermittelt, wurde der Versuch um ein Flag-gebundenes PICK1 KDAA (PICK1.F KDAA) erweitert. Diese Mutante von PICK1 hat eine veränderte PDZ-Domäne, in der an der Position 27

Lysin und an der Position 28 Asparagin jeweils durch Alanin ausgetauscht wurde. Durch den Austausch der Aminosäuren ist die Bindungsfähigkeit der PDZ-Domäne von PICK1 aufgehoben. PICK1 KDAA (PICK1.F KDAA) und PICK1.F wurden jeweils mit C-terminal Ig-markiertem Nephrin (Ig.Nephrin) und als Kontrolle mit dem Fusionsprotein ohne den C-terminalen Anteil von Nephrin (Ig.ctrl) kotransfiziert. Nach Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen, SDS-Gelelektrophorese und Westernblot folgte eine Inkubation der Membran mit Anti-Flag-Antikörper und anschließend zur Expressionskontrolle eine Inkubation mit Anti-humanen-IgG-Antikörper (α -human IgG). Abbildung 23 zeigt, dass Ig.Nephrin den PICK1 Wildtyp präzipitiert.

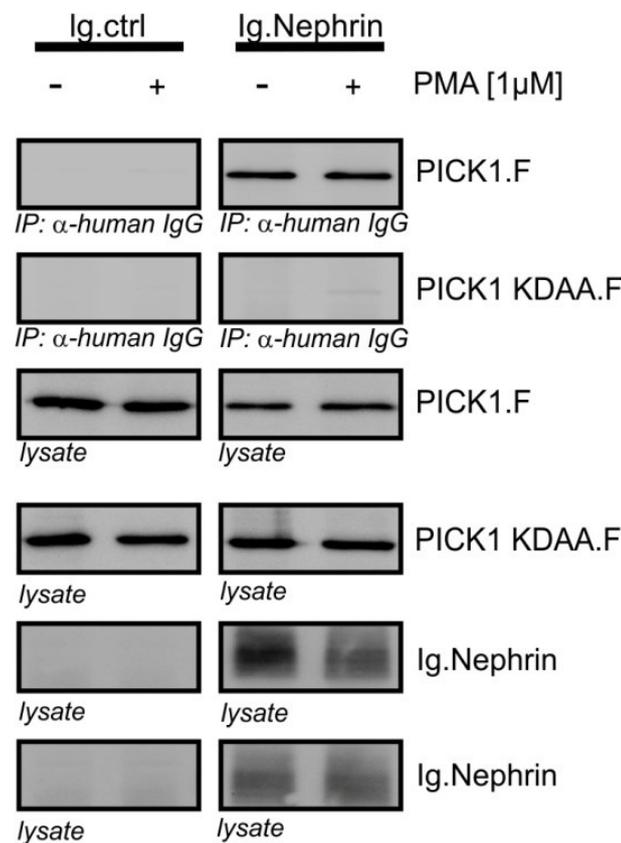


Abb. 23: Nephrin präzipitiert PICK1 Wildtyp

Vor der Ernte wurde ein Teil der Zellen für 15 Minuten in PMA inkubiert. Es folgte eine Co-Immunopräzipitation (IP) mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen. Die obere Reihe zeigt präzipitiertes PICK1 Wildtyp (PICK1.F). Die Lysate zeigen die Expression von PICK1, PICK1 KDAA und Nephrin. PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; μM : Mikromol.

3.4.3 Die Interaktion von PICK1 mit der Nephtrin-Domäne 1160-1176

In einem weiteren Schritt wurde versucht, die Interaktion zwischen Nephtrin und PICK1 näher zu charakterisieren. Dabei interessierte uns die Frage an welche Aminosäuren von Nephtrin PICK1 mit seiner PDZ-Domäne bindet und ob diese Domäne von Nephtrin ein PDZ-Bindungsmotiv enthält. Hierzu wurden verkürzte Nephtrin-Proteine, sogenannte Truncations, generiert, um die relevanten Aminosäuren von Nephtrin einzugrenzen. Nephtrin-Truncations sind verkürzte Formen des zytoplasmatischen Abschnittes von Nephtrin, wobei die Aminosäuren 1087-1241 dem gesamten zytoplasmatischen Anteil entsprechen. In HEK 293T-Zellen wurden die C-terminal Ig-markierten Nephtrin-Truncations Ig.Nephtrin 1087-1160, Ig.Nephtrin 1087-1176 und Ig.Nephtrin 1158-1241 in getrennten Ansätzen mit Flag-markiertem PICK1 (PICK1.F) kotransfiziert. Nach Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese, Transfer auf die Membran und Inkubation mit Anti-Flag-Antikörper zeigte sich, dass Nephtrin 1087-1176 und Nephtrin 1158-1241 PICK1.F präzipitieren, wohingegen PICK1.F und Nephtrin 1087-1160 nicht miteinander interagieren (Abb. 24). Die Zugabe von PMA (1 μ M) 15 Minuten vor der Ernte beeinflusste die Stärke der Bindung nicht. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass die Interaktion von Nephtrin und PICK1 die Nephtrin-Domäne 1160-1176 involviert.

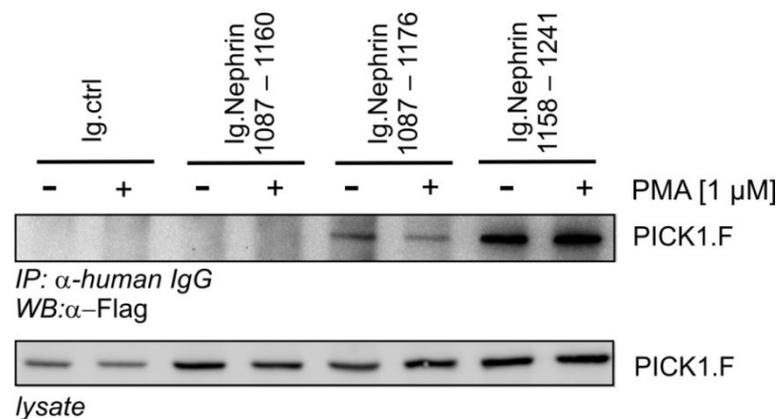


Abb. 24: PICK1 interagiert mit der Nephtrin-Domäne 1160-1176

Vor der Ernte wurde ein Teil der Zellen für 15 Minuten in PMA inkubiert. Es folgte eine Co-Immunopräzipitation (IP) mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen. Inkubation mit Anti-Flag-Antikörper zeigt eine Interaktion von PICK1.F mit Nephtrin 1087-1176 und Nephtrin 1158-1241. Die Lysate dienen der Expressionskontrolle. mM: Mikromol; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; WB: Westernblot.

3.4.4 Die Interaktion von β -Arrestin2-PKC α und PICK1-PKC α

Aus Studien an neuronalen Zellen ist bekannt, dass PICK1 mit PKC α interagiert (Dev et al., 2000; Perez et al., 2001). Um zu überprüfen, ob eine Bindung von β -Arrestin2 und PKC α nachzuweisen ist, wurden HEK 293T-Zellen transient mit β -Arrestin2.F sowie unmarkierten PKC α (PKC α) und PICK1.F sowie unmarkierten PKC α (PKC α) kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente der cdm-Vektor (Vektor). Nach Zugabe von niedriger (5.5 mM \sim 99 mg/dl) und hoher (40 mM \sim 721 mg/dl) Glukose für 24 Stunden, folgten Co-Immunopräzipitation mit Anti-Flag M2-Sepharose-Kügelchen (α -Flag), SDS-Gelelektrophorese, Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran und Inkubation mit Anti-Flag-Antikörper und Anti-PKC α -Antikörper. Die Ergebnisse der Immunopräzipitation in Abbildung 25 zeigen, dass sowohl β -Arrestin2 als auch PICK1 an PKC α binden. Die Bindung von β -Arrestin2 und PKC α ist unter hoher Glukose unverändert, wohingegen die Interaktion von PICK1 und PKC α verstärkt wird.

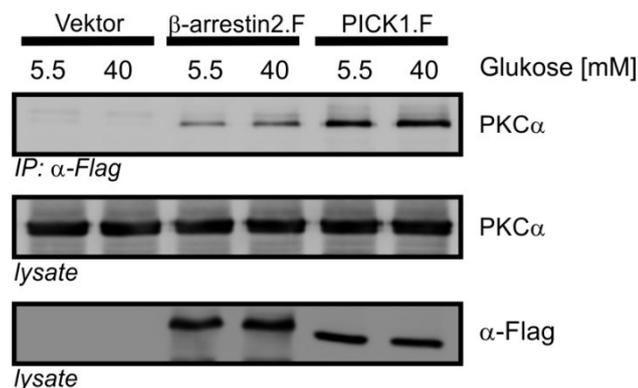


Abb. 25: Die Interaktion von β -Arrestin2-PKC α und PICK1-PKC α

Nach der Transfektion wurden HEK 293T-Zellen mit 5.5 oder 40 mM Glukose im Medium für 24 Stunden inkubiert. Es folgte eine Immunopräzipitation (IP) mit Anti-Flag M2-Sepharose-Kügelchen (α -Flag) und ein Nachweis der Interaktion durch Färbung mit einem spezifischen Anti-PKC α -Antikörper. Die Zellysate zeigen die gleichmäßige Expression von PKC α , β -Arrestin2 und PICK1. mM: Millimol.

3.4.5 Die Interaktion von PICK1 mit β -Arrestin2

Nun galt es noch nachzuweisen, ob zwischen PICK1 und β -Arrestin2 eine Interaktion besteht. HEK 293T-Zellen wurden mit β -Arrestin2.F, dem cdm-Vektor (Vektor) als Negativkontrolle und PICK1.F als Positivkontrolle kotransfiziert und wiederum niedriger sowie hoher Glukosekonzentration ausgesetzt. Abbildung 26 zeigt, dass β -Arrestin2 mit PICK1 interagiert und in der Immunopräzipitation kopräzipitiert wird bei gleicher Expression in den Lysaten. Die Interaktion zeigt unabhängig von der

zugegebenen Glukose eine vergleichbare Stärke. Die Inkubation der Membran mit Anti-Flag-Antikörper diente der Expressionskontrolle von PICK1.

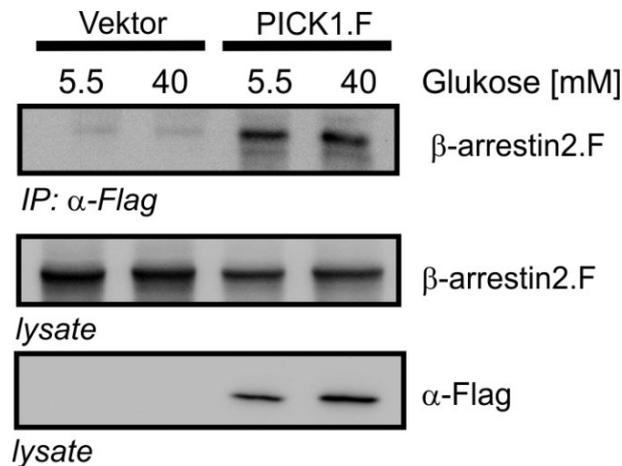


Abb. 26: Die Interaktion von PICK1 und β -Arrestin2

Nach Inkubation der transfizierten Zellen in 5.5 oder 40 mM Glukose, erfolgte eine IP mit Anti-M2 (α -Flag). Die obere Reihe zeigt kopräzipitiertes β -Arrestin2. Die Zelllysate zeigen die Expression von β -Arrestin2 und PICK1. mM: Millimol.

3.5 Nephrin, PICK1, PKC α und β -Arrestin2 bilden einen Komplex *in vivo*

Um zu untersuchen, ob unsere neuen Erkenntnisse auch *in vivo* anzuwenden sind, wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen konnte schon nachgewiesen werden, dass endogenes β -Arrestin2 endogenes Nephrin aus Mäusenlysaten präzipitiert (Abb. 12). In einem weiteren Ansatz sollte untersucht werden, ob sich die Interaktion von Nephrin und PKC α auch *in vivo* bestätigen lässt. Hierfür verglichen wir nicht-diabetische mit diabetischen C57Bl/6-Mäusen. Der Diabetes wurde durch Streptozotocin-Injektion induziert. Nach kontinuierlich hohen Blutglukosespiegeln (>33 mmol/l) über 24 Stunden konnten die Nieren isoliert und lysiert werden. Es schlossen sich eine Immunpräzipitation mit Anti-Nephrin, SDS-Gelelektrophorese und Westernblot an, um die Interaktion durch Färbung von PKC α zu detektieren. Nephrin präzipitiert PKC α sowohl in diabetischen als auch in nicht-diabetischen Mäusen (Abb. 27). Die Bindung von PKC α kann bei den diabetischen Tieren als stärker angesehen werden und auch die Expression von PKC α nimmt bei diesen Tieren unter Hyperglykämie zu.

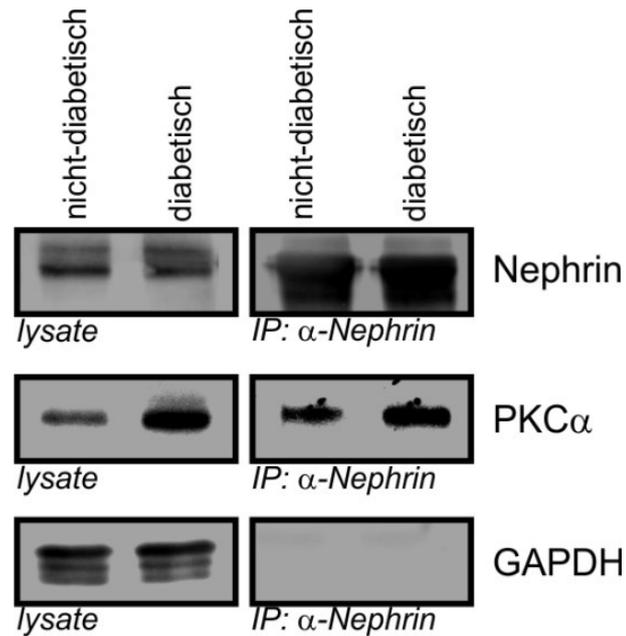


Abb. 27: Endogene Interaktion von Nephrin und PKC α aus Nierenlysat

Nephrin wurde immunopräzipitiert und die Interaktion durch Färbung von PKC α nachgewiesen. Färbung der IP mit Nephrin und Färbung der Zellysate mit GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) dienten der Expressionskontrolle.

Abschließend wurde in einem dritten Versuchsansatz die endogenen Proteine PKC α -defizienter Maus-Podozyten (PKC α (-/-)) mit dem übereinstimmenden Wildtyp (PKC α (+/+)) als Kontrolle verglichen. Die Podozyten wurden lysiert und eine endogene Immunopräzipitation mit Anti-Nephrin-Antikörper (α -Nephrin) durchgeführt. Nach SDS-Gelelektrophorese wurde im Westernblot eine Interaktion von Nephrin mit PKC α , PICK1 und β -Arrestin2 durch Färbung der entsprechenden spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 28). Eine Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin konnte im Wildtyp nachgewiesen werden, wohingegen bei den PKC α -defizienten Podozyten nur eine schwache Bindung von β -Arrestin2 beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung bestätigt die vermutete regulatorische Rolle von PKC α für die Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion. Die Interaktion von PICK1 mit Nephrin ist sowohl in PKC α (-/-) als auch in PKC α (+/+) Podozyten in vergleichbarer Stärke zu erkennen. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Hyperglykämie zu einer Hochregulierung von PKC α führt und die Bildung eines Nephrin/PKC α /PICK1/ β -Arrestin2-Komplexes induziert.

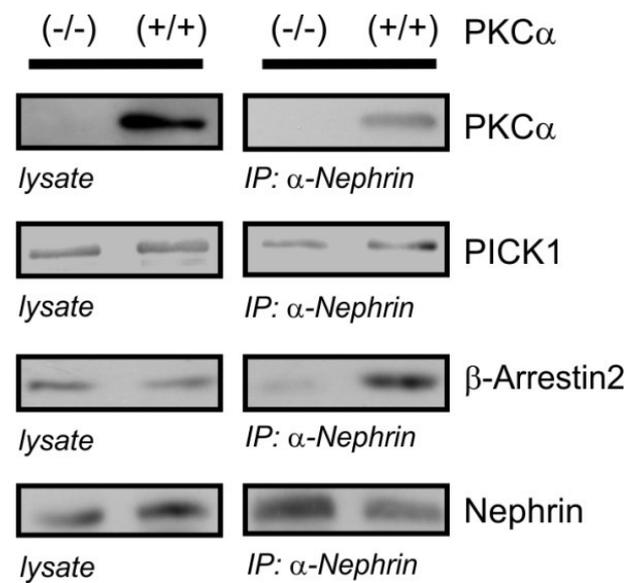


Abb. 28: Endogene Immunopräzipitation PKC α -defizienter Podozyten (PKC α (-/-)) und des Wildtyps (PKC α (+/+))

Nach Lyse der Podozyten, folgte eine endogene Immunopräzipitation (IP) mit Anti-Nephrin-Antikörper (α -Nephrin). Die Zelllysate zeigen eine gleichmäßige Expression von PICK1, β -Arrestin2 und Nephrin.

4. Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits eine kurze Dauer von Hyperglykämie zu Störungen des glomerulären Filters und daraus folgend der Entwicklung einer Albuminurie führen kann. Dies unterstützt die Hypothese, dass Hyperglykämie die Durchlässigkeit des glomerulären Filters durch eine verstärkte Endozytose von Nephrin erhöht. Zusammenfassend sind die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit:

- 1) Hyperglykämie verstärkt die Endozytose von Nephrin durch Modulation der Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion.
- 2) PKC α und PICK1 nehmen dabei eine Schlüsselrolle für die Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion und die daraus folgende Endozytose von Nephrin *in vitro* und *in vivo* ein.

Unter den Transmembranproteinen des Proteinkomplexes an der glomerulären Schlitzmembran nimmt Nephrin eine zentrale Rolle am Aufbau und Erhalt der Integrität der Schlitzmembran ein. Bei diabetischer Nephropathie kann man eine veränderte Struktur von Nephrin im Sinne einer Abnahme der Oberflächenexpression hin zu einer vermehrten zytoplasmatischen Verteilung feststellen, welches die Vermutung einer gesteigerten Endozytose von Nephrin naheliegend erscheinen lässt (Aaltonen et al., 2001). Daraus folgt, dass weniger Nephrin an der Schlitzmembran vorhanden ist, was in der Konsequenz den Verlust eines intakten glomerulären Filters und die Entwicklung einer Albuminurie bedeutet. Albuminurie kann ein erstes Zeichen für das Vorliegen einer diabetischen Nephropathie sein. Der molekulare Mechanismus, der zum Verlust von Nephrin an der Schlitzmembran führt, konnte dabei bislang noch nicht vollständig aufgedeckt werden.

In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosekonzentrationen zu einer verstärkten Endozytose von Nephrin führen. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die herausfanden, dass bei diabetischen Menschen und Tieren mit Albuminurie eine verminderte Verteilung und Expression von Nephrin beobachtet wurde (Doublrier et al., 2003; Koop et al., 2003; Kim et al., 2007).

Des Weiteren beeinflusst Nephrin intrazelluläre Signalwege, indem es als Gerüst mit anderen Proteinen agiert, welche an den C-Terminus von Nephrin binden können. Dies gilt u.a. für die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, die Tyrosinkinase Fyn der Src-Familie und die Phospholipase C γ 1 (Verma et al., 2003; Harita et al., 2009; Welsh und Saleem, 2010). Unsere Arbeitsgruppe konnte 2006 nachweisen, dass auch β -Arrestin2 an den C-Terminus von Nephrin bindet und dadurch die Endozytose von Nephrin einleitet, wodurch weitere Signalwege von Nephrin abgeschwächt werden (Quack et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun, dass unter Zugabe ansteigender Glukosekonzentrationen die Endozytose von Nephrin in dosisabhängiger Weise verstärkt wird. Dies geschieht über die Regulierung der Interaktion zwischen Nephrin und β -Arrestin2. Diese Schlussfolgerung beruht auf der Beobachtung, dass hohe Glukosespiegel einen verstärkenden Einfluss auf die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin sowohl *in vitro* und *in vivo* ausüben. Auch in Mäusenieren konnte eine Zunahme der Interaktion zwischen endogenem Nephrin und β -Arrestin2 unter hoher Glukose beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Nephrin und β -Arrestin2 einen Komplex *in vivo* bilden und β -Arrestin2 an der Einleitung der Endozytose von Nephrin auch unter Hyperglykämie beteiligt ist.

Es konnte bis jetzt noch keine Kinase ermittelt werden, welche die Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion vermittelt. PKC ist in Molekularmechanismen bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie beteiligt und es konnten zuletzt drei Isoformen ermittelt werden, welche zu Schädigungen an der Niere durch Diabetes beitragen (Meier et al., 2009). Menne et al. haben erforscht, dass PKC α -defiziente Knockout Mäuse mit durch Streptozotocin- (STZ) Injektion induzierten Diabetes ein besseres Outcome zeigten, d.h. weniger Proteinurie und erhaltene Nephrin-Expression im Vergleich zu Kontrollgruppen (Menne et al., 2004; Menne et al., 2006). Die PKC α -defizienten Knockout Mäuse zeigten auch geringe Veränderungen der GBM infolge der Hyperglykämie. Die Autoren folgerten, dass die abnehmende Nephrin-Expression bei PKC α WT Mäusen durch eine veränderte Regulation auf Transkriptionsebene hervorgerufen wird. Chronische Hyperglykämie führt zu einer Daueraktivierung von PKC bedingt durch eine anhaltende Erhöhung von DAG (Noh und King, 2007). PKC scheint daher ein wichtiger Mediator der Hyperglykämie-induzierten Schäden am glomerulären Filter zu sein, welche zur Entwicklung von Albuminurie führen. Dennoch ist die Rolle von PKC bei der Genese

von Albuminurie nicht eindeutig definiert und vor allem über die Auswirkung von PKC-Aktivierung auf die Podozyten ist noch wenig bekannt (Noh und King, 2007). Eine Sequenzanalyse des C-Terminus von Nephrin zeigt ein Motiv, das durch PKC phosphoryliert werden kann ((S/T)XX(K/R)) und sich innerhalb des β -Arrestin2 Interaktionsmotives ((S/T) X_{4-5} (S/T)) befindet (Pearson und Kemp, 1991). Mit den vorliegenden Hinweisen einer Beteiligung von PKC α an den Signalwegen bei Diabetes und der Voraussage eines PKC Phosphorylierungs- und Bindungsmotivs in unmittelbarer Nähe zum β -Arrestin2 Bindungsmotiv von Nephrin, wurde unsere Hypothese, dass Hyperglykämie die Nephrin-Endozytose durch die Aktivität von PKC beeinflusst, unterstützt. PKC α schien demnach ein vielversprechender Kandidat bei der Modulation der Nephrin- β -Arrestin2-Bindung. Es ist festzuhalten, dass die Mehrzahl der durchgeführten Studien auf chronischen Modellen von Diabetes aufgebaut wurde und daher eher die Langzeitwirkung der Hyperglykämie aufzeigen. Basierend auf dem dynamisch regulierten Modell der glomerulären Schlitzmembran stellte sich die Frage, ob erhöhte Glukosekonzentrationen nicht zu einem unmittelbaren Effekt am molekularen Aufbau der Schlitzmembran führen könnten. Diese Annahme wurde durch Ergebnisse einer Studie von Axelsson et al. gestützt, welche *in vivo* darlegen konnten, dass akut induzierte Hyperglykämie bei zuvor normoglykämischen Ratten die glomeruläre selektive Permeabilität schädigt (Axelsson et al., 2010).

Um den zugrunde-liegenden regulatorischen Mechanismus aufzuklären, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob der Effekt von hoher Glukose auf die verstärkte Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin durch PKC α vermittelt wird. Diese Vermutung ließ sich in Versuchen mit HEK 293T-Zellen mittels Westernblot bestätigen. Suppression der Aktivität von PKC α durch den PKC α -Inhibitor Safingol wiederum vermindert den Effekt von hoher Glukosekonzentration und verhindert den Verlust der Oberflächenexpression von Nephrin nahezu vollständig. Es konnte in den Experimenten keine Zunahme der Interaktion zwischen Nephrin und β -Arrestin2 mehr festgestellt werden, weshalb wir schlussfolgerten, dass weniger Nephrin internalisiert wird und der stabilisierende Effekt von Nephrin für die Integrität der Schlitzmembran erhalten bleibt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Ergebnissen einer weiteren Arbeitsgruppe, welche kürzlich zeigen konnten, dass die Behandlung mit dem PKC α -Inhibitor Gö6976 bei STZ-induzierten diabetischen Mäusen den Verlust an Nephrin reduziert und die Proteinurie vermindert (Tossidou et al., 2010).

Um diese Wirkungszusammenhänge näher zu analysieren, wurde konsequenterweise untersucht, ob PKC α direkt mit dem Transmembranrezeptor-Typ-I zugehörigen Nephrin interagiert. Eine Interaktion von PKC α mit Typ-I-Transmembranrezeptoren wurde durch Tossidou et al. untersucht, die zeigen konnten, dass PKC α mit dem TGF- β -Typ-I-Rezeptor, interagiert und die Endozytose des Rezeptors einleitet. Diese Interaktion wird durch TGF- β induziert. In PKC α -defizienten Podozyten wird der TGF- β -Typ-I-Rezeptor weniger internalisiert (Tossidou et al., 2009). Die Vermutung einer Interaktion von PKC α mit Nephrin wurde in Versuchen mit HEK 293T-Zellen bestätigt. Diese ergaben, dass transfiziertes Nephrin PKC α präzipitiert. Unter Zugabe hoher Glukose wurde der Grad der Interaktion deutlich verstärkt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PKC α höchstwahrscheinlich den Effekt von hoher Glukose auf die verstärkte Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin vermittelt, war nun von Interesse, wie sich die Expression von PKC α in Podozyten unter hoher Glukose verhalten würde. Unsere Vermutung, dass hohe Glukose zu einer Hochregulierung von PKC α führen würde, wurde bestätigt. Tossidou et al. konnten nachweisen, dass in PKC α WT Mäusen mit durch STZ-induzierten Diabetes nach vier Wochen eine Hochregulierung der PKC α in den Podozyten zu beobachten ist (Tossidou et al., 2010). Es konnte nun gezeigt werden, dass Hyperglykämie unmittelbar zu einer vermehrten Expression von PKC α in den Glomeruli diabetischer Mäuse führt. Mit den hier vorliegenden Ergebnissen aus Versuchen mit PKC α -defizienten Maus-Podozyten und dem übereinstimmenden Wildtyp konnte gezeigt werden, dass beim Wildtyp eine Bindung von β -Arrestin2 und PICK1 an Nephrin nachzuweisen ist. Diese Beobachtung bestätigt die vermutete regulatorische Rolle von PKC α bei der Bildung eines Nephrin/PKC α /PICK1/ β -Arrestin2 Komplexes *in vivo*.

Die Forschung konzentriert sich stark auf die Beteiligung von PICK1 an neuronalen Funktionen. Bereits gut charakterisiert ist die Interaktion von PICK1 mit der Glutamaterezeptorfamilie. Wie gezeigt werden konnte, bindet PICK1 in unmittelbarer Nähe an die PKC α übereinstimmende Seite von Nephrin und könnte als Adapter PKC α an den C-Terminus von Nephrin rekrutieren. Diese Funktion von PICK1 wurde für den AMPA-Rezeptor ausführlich beschrieben (Hanley, 2008). PICK1 interagiert durch die PDZ-Domäne mit der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR2 und rekrutiert PKC α an den Rezeptorkomplex, wodurch GluR2 am Serin⁸⁸⁰ phosphoryliert und internalisiert wird

(Perez et al., 2001; Dev et al., 2004). Experimente mit der Mutante PICK1 KDA, welche eine mutierte PZD-Domäne besitzt, hebt die Bindung an Nephrin vollständig wieder auf. Daher scheint es als sehr wahrscheinlich, dass PICK1 mit seiner PDZ-Domäne an Nephrin bindet. Versuche mit verkürzten Nephrinproteinen zeigten, dass die Aminosäuren 1160-1176 des C-Terminus von Nephrin für die Interaktion mit PICK1 benötigt werden. Die Aminosäuren 1168-1170 von Nephrin enthalten ein klassisches PDZ-Typ-III-Bindungsmotiv (DMA).

Ausschlaggebend für die Nephrin-Endozytose und Interaktion zwischen Nephrin und β -Arrestin2 sind daher PKC α und PICK1. In Übereinstimmung mit den vorgestellten Ergebnissen ist es durchaus denkbar, dass akute Hyperglykämie Albuminurie hervorruft. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosekonzentrationen zu einer Zunahme der β -Arrestin2-vermittelten Endozytose des Schlitzmembranproteins Nephrin in PKC α - und PICK1-abhängiger Weise führen (Abb. 29).

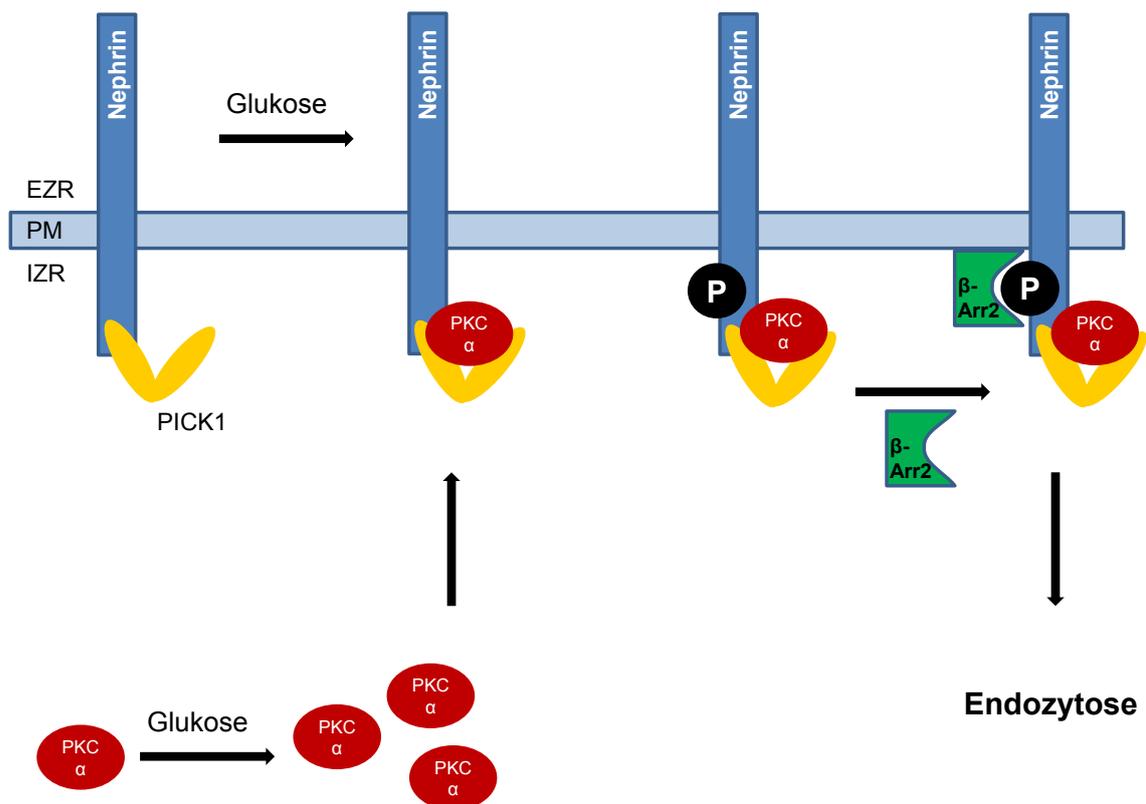


Abb. 29: Schematische Darstellung der verstärkten Endozytose von Nephrin unter Hyperglykämie
 Unter Hyperglykämie kommt es zu einer Hochregulation von PKC α und einer Bindung von PKC α an den C-Terminus von Nephrin durch das Adapterprotein PICK1. Phosphorylierung von Nephrin ermöglicht die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin. Daraufhin wird die Endozytose von Nephrin eingeleitet und der Proteinkomplex internalisiert. EZR: Extrazellularraum; PM: Plasmamembran; IZR: Intrazellularraum; β -Arr2: β -Arrestin2; P: Phosphorylierung.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass der Proteinkomplex der Schlitzmembran eine hochdynamische Komposition darstellt und bieten ein neues Verständnis für die molekularen Mechanismen bei der Entwicklung von Albuminurie unter diabetischen Bedingungen. Es ist durchaus vorstellbar, dass akute Ereignisse wie vermehrte Nephrin-Endozytose als Auslöser für chronisch veränderte Signaltransduktion an der Schlitzmembran bei langjähriger Hyperglykämie im Rahmen des Diabetes dienen.

Ziel der Arbeit war es, durch Aufklärung der Interaktion der genannten Proteine zu einer detaillierteren Darstellung der molekularen Zusammenhänge bei der Auswirkung von Hyperglykämie auf die glomeruläre Schlitzmembran beizutragen. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass Hyperglykämie die β -Arrestin2 vermittelte Internalisierung von Nephrin verstärkt. Des Weiteren konnten PKC α und PICK1 als wichtige Interaktionspartner für die Nephrin- β -Arrestin2-Interaktion und die daraus folgende Endozytose von Nephrin identifiziert werden.

Mit diesen Ergebnissen konnten neue Erkenntnisse in die Pathogenese der diabetischen Nephropathie gewonnen werden, die als Schlüssel zur Entwicklung möglicher Therapieansätze dienen könnten. Zukünftiger Forschungsbedarf bestehe Wege zu finden, die Internalisierung von Nephrin zu verhindern, um der daraus folgenden vermehrten Durchlässigkeit des glomerulären Filters und dem Auftreten einer Mikroalbuminurie entgegenzuwirken. Als viel versprechende Angriffspunkte könnten sich dabei PKC α und PICK1 erweisen.

5. Literaturverzeichnis

- Aaltonen, P.; Luimula, P.; Aström, E.; Palmén, T.; Grönhölm, T.; Palojoki, E.; Jaakkola, I.; Ahola, H.; Tikkanen, I. and Holthöfer, H. (2001). Changes in the Expression of Nephric Gene and Protein in Experimental Diabetic Nephropathy. *Lab Invest* 81, 1185-1190.
- Ahola, H.; Heikkilä, E.; Astrom, E.; Inagaki, M.; Izawa, I.; Pavenstädt, H.; Kerjaschki, D. and Holthöfer, H. (2003). A Novel Protein, Densin, Expressed by Glomerular Podocytes. *J Am Soc Nephrol* 14, 1731-1737.
- Axelsson, J.; Rippe, A. and Rippe, B. (2010). Acute hyperglycemia induces rapid, reversible increases in glomerular permeability in nondiabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F1306-1312.
- Beckman, J. A. (2002). Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 287, 2570–2581.
- Benovic, J. L.; Kühn, H.; Weyand, I.; Codina, J.; Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (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). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 8879-8882.
- Benzing, T. (2004). Signaling at the Slit Diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 15, 1382-1391.
- 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. *J Am Soc Nephrol* 24, 349.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
- Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry* 257, 7847-7851.
- Chen, W.; Kirkbride, K. C.; How, T.; Nelson, C. D.; Mo, J.; Frederick, J. P.; Wang, X.-F.; Lefkowitz, R. J. and Blobel, G. C. (2003). β -Arrestin 2 Mediates Endocytosis of Type III TGF- β Receptor and Down-Regulation of Its Signaling. *Science* 301, 1394-1397.
- Daniels, B. S.; Deen, W. M.; Mayer, G. and Hostetter T. H. (1993). Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *Journal of Clinical Investigation* 92, 929-936.
- Dekker, L. V. and Parker, P. J. (1994). Protein kinase C - a question of specificity. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 73-77.

- Dempsey, E. C.; Newton, A. C.; Mochly-Rosen, D.; Fields, A. P.; Reyland, M. E.; Insel, P. A. and Messing, R. O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, 429-438.
- Dev, K. K.; Nakajima, Y.; Kitano, J.; Braithwaite, S. P.; Henley, J. M. and Nakanishi, S. (2000). PICK1 Interacts with and Regulates PKC Phosphorylation of mGLUR7. *The Journal of Neuroscience* 20, 7252-7257.
- Dev, K. K.; Nakanishi, S. and Henley, J. M. (2004). The PDZ Domain of PICK1 Differentially Accepts Protein Kinase C- α and GluR2 as Interacting Ligands. *Journal of Biological Chemistry* 279, 41393-41397.
- DeWire, S. M.; Ahn, S.; Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2007). β -Arrestins and Cell Signaling. *Annual Review of Physiology* 69, 483-510.
- Donoviel, D. B.; Freed, D. D.; Vogel, H.; Potter, D. G.; Hawkins, E.; Barrish, J. P.; Mathur, B. N.; Turner, C. A.; Geske, R. and 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. and Camussi, G. (2003). Nephron Expression Is Reduced in Human Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 52, 1023-1030.
- Drumond, M. C. and Deen, W. M. (1994). Structural determinants of glomerular hydraulic permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 266, F1-12.
- Frei, U. and Schober-Halstenberg, H.-J. (2008). Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere.
- Gerke, P.; Huber, T. B.; Sellin, L.; Benzing, T. and Walz, G. (2003). Homodimerization and Heterodimerization of the Glomerular Podocyte Proteins Nephron and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 14, 918-926.
- Gerstein, H. C.; Mann, J. F. E.; Yi, Q.; Zinman, B.; Dinneen, S. F.; Hoogwerf, B.; Hallé, J. P.; Young, J.; Rashkow, A. and Joyce, C. et al. (2001). Albuminuria and Risk of Cardiovascular Events, Death, and Heart Failure in Diabetic and Nondiabetic Individuals. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 286, 421-426.
- Goodman, O. B.; Krupnick, J. G.; Santini, F.; Gurevich, V. V.; Penn, R. B.; Gagnon, A. W.; Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996). β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.
- Gültekin, H. and Heermann, K. H. (1988). The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Analytical Biochemistry* 172, 320-329.
- Hanley, J. G. (2008). PICK1: A multi-talented modulator of AMPA receptor trafficking. *Pharmacology & Therapeutics* 118, 152-160.
- Harita, Y.; Kurihara, H.; Kosako, H.; Tezuka, T.; Sekine, T.; Igarashi, T.; Ohsawa, I.; Ohta, S. and Hattori, S. (2009). Phosphorylation of Nephron Triggers Ca^{2+}

- Signaling by Recruitment and Activation of Phospholipase C- γ 1. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8951-8962.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 268, 26033-26036.
- Inoue, T.; Yaoita, E.; Kurihara, H.; Shimizu, F.; Sakai, T.; Kobayashi, T.; Ohshiro, K.; Kawachi, H.; Okada, H. and Suzuki, H. et al. (2001). FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 59, 1003-1012.
- Kalaitzidis, R. and Bakris, G. (2009). Pathogenesis and treatment of microalbuminuria in patients with diabetes: the road ahead. *J Clin Hypertens* 11, 636-643.
- Kawachi, H.; Miyauchi, N.; Suzuki, K.; Han, G. D.; Orikasa, M. and Shimizu, F. (2006). Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier (Review Article). *Nephrology* 11, 274-281.
- Kestilä, M.; Lenkkeri, U.; Männikkö, M.; Lamerdin, J.; McCready, P.; Putaala, H.; Ruotsalainen, V.; Morita, T.; Nissinen, M. and Herva, R. et al. (1998). Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein--Nephrin--Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. *Molecular Cell* 1, 575-582.
- Kikkawa, U.; Ogita, K.; Ono, Y.; Asaoka, Y.; Shearman, M. S.; Fujii, T.; Ase, K.; Sekiguchi, K.; Igarashi, K. and Nishizuka, Y. (1987). The common structure and activities of four subspecies of rat brain protein kinase C family. *FEBS Letters* 223, 212-216.
- Kim, J.-J.; Li, J. J.; Jung, D.-S.; Kwak, S.-J.; Ryu, D.-R.; Yoo, T.-H.; Han, S. H.; Choi, H. Y.; Kim, H. J. and Han, D. S. et al. (2007). Differential Expression of Nephrin According to Glomerular Size in Early Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 18, 2303-2310.
- Kobayashi, E.; Nakano, H.; Morimoto, M. and Tamaoki, T. (1989). Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 159, 548-553.
- Koop, K.; Eikmans, M.; Baelde, H. J.; Kawachi, H.; Heer, E. de; Paul, L. C. and Bruijn, J. A. (2003). Expression of Podocyte-Associated Molecules in Acquired Human Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol* 14, 2063-2071.
- Kricka, L. J. (1993). Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clinical Biochemistry* 26, 325-331.
- Li, C.; Ruotsalainen, V.; Tryggvason, K.; Shaw, A. S. and Miner, J. H. (2000). CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, 785-792.
- Li, J. and Gobe, G. (2006). Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology* 11, 428-434.

- Lohse, M. J.; Benovic, J. L.; Codina, J.; Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.
- Lorenz, S.; Frenzel, R.; Paschke, R.; Breitwieser, G. E. and Miedlich, S. U. (2007). Functional Desensitization of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor Is Regulated via Distinct Mechanisms: Role of G Protein-Coupled Receptor Kinases, Protein Kinase C and β -Arrestins. *Endocrinology* 148, 2398-2404.
- Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002). The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465.
- Meier, M.; Menne, J. and Haller, H. (2009). Targeting the protein kinase C family in the diabetic kidney: lessons from analysis of mutant mice. *Diabetologia* 52, 765-775.
- Menne, J.; Meier, M.; Park, J.-K.; Boehne, M.; Kirsch, T.; Lindschau, C.; Ociepka, R.; Leitges, M.; Rinta-Valkama, J. and Holthöfer, H. et al. (2006). Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in-vivo. *Kidney Int* 70, 1456-1462.
- Menne, J.; Park, J.-K.; Boehne, M.; Elger, M.; Lindschau, C.; Kirsch, T.; Meier, M.; Gueler, F.; Fiebeler, A. and Bahlmann, F. H. et al. (2004). Diminished Loss of Proteoglycans and Lack of Albuminuria in Protein Kinase C-alpha Deficient Diabetic Mice. *Diabetes* 53, 2101-2109.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction 155, 335-350.
- Mundel, P.; Reiser, J.; Borja, A. Z. M.; Pavenstädt, H.; Davidson, G. R.; Kriz, W. and Zeller, R. (1997). Rearrangements of the Cytoskeleton and Cell Contacts Induce Process Formation during Differentiation of Conditionally Immortalized Mouse Podocyte Cell Lines. *Experimental Cell Research* 236, 248-258.
- Musashi, M. (2000). The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *International journal of hematology* 72, 12.
- Nerlich, A. and Schleicher, E. (1991). Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *The American Journal of Pathology* 139, 889-899.
- Newton, A. C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J* 370, 361-371.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.
- Noh, H. and King, G. L. (2007). The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 72, 49-53.
- Patrakka, J. and Tryggvason, K. (2007). Nephrin - a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med (Trends in molecular medicine)* 13, 396-403.

- Pavenstädt, H. (1998). The Charge for Going by Foot: Modifying the Surface of Podocytes. *Exp Nephrol* 6, 98-103.
- Pavenstädt, H.; Kriz, W. and Kretzler, M. (2003). Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol. Rev.* 83, 253-307.
- Pearson, R. B. and Kemp, B. E. (1991). [3] Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: Tabulations, in: Tony Hunter, Bartholomew M. Sefton (Hrsg.): *Methods in Enzymology: Protein Phosphorylation Part A: Protein Kinases: Assays, Purification, Antibodies, Functional Analysis, Cloning, and Expression* 200, 62-81.
- Perez, J. L.; Khatri, L.; Chang, C.; Srivastava, S.; Osten, P. and Ziff, E. B. (2001). PICK1 Targets Activated Protein Kinase C α to AMPA Receptor Clusters in Spines of Hippocampal Neurons and Reduces Surface Levels of the AMPA-Type Glutamate Receptor Subunit 2. *J. Neurosci.* 21, 5417-5428.
- Quack, I.; Rump, L. C.; Gerke, P.; Walther, I.; Vinke, T.; Vonend, O.; Grunwald, T. and Sellin, L. (2006). β -Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 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. *The Journal of Cell Biology* 60, 423-433.
- Ruotsalainen, V.; Ljungberg, P.; Wartiovaara, J.; Lenkkeri, U.; Kestilä, M.; Jalanko, H.; Holmberg, C. and Tryggvason, K. (1999). Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7962-7967.
- 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. *The Journal of Cell Biology* 111, 1255-1263.
- Sellin, L.; Huber, T. B.; Gerke, P.; Quack, I.; Pavenstädt, H. and Walz, G. (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin-interacting proteins. *FASEB J.* 17, 115-117.
- Shankland, S. J.; Pippin, J. W.; Reiser, J. and Mundel, P. (2007). Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int* 72, 26-36.
- Sheng, M. and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organisation of supramolecular complexes. *Annual Review of Neuroscience* 24, 1-29.
- Shenoy, S. K. and Lefkowitz, R. J. (2003). Multifaceted roles of β -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *The Biochemical journal* 375, 503-515.
- 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.

- Staudinger, J.; Lu, J. and Olson, E. N. (1997). Specific Interaction of the PDZ Domain Protein PICK1 with the COOH Terminus of Protein Kinase C- α . *Journal of Biological Chemistry* 272, 32019-32024.
- Staudinger, J.; Zhou, J.; Burgess, R.; Elledge, S. J. and Olson, E. N. (1995). PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *The Journal of Cell Biology* 128, 263-271.
- Tan, K. C.B; Chow, W.-S; Ai, V. H.G; Metz, C.; Bucala, R. and Lam, K. S. L. (2002). Advanced Glycation End Products and Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 25, 1055-1059.
- Tossidou, I.; Starker, G.; Krüger, J.; Meier, M.; Leitges, M.; Haller, H. and Schiffer, M. (2009). PKC- α modulates TGF- β signaling and impairs podocyte survival. *Cellular physiology and biochemistry* 24, 627-634.
- Tossidou, I.; Teng, B.; Menne, J.; Shushakova, N.; Park, J.-K.; Becker, J. U.; Modde, F.; Leitges, M.; Haller, H. and Schiffer, M. (2010). Podocytic PKC- α Is Regulated in Murine and Human Diabetes and Mediates Nephrin Endocytosis. *PLoS ONE* 5, e10185.
- Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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. and Wartiovaara, J. (2006). Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *New England Journal of Medicine* 354, 1387-1401.
- Tryggvason, K. and Wartiovaara, J. (2001). Molecular basis of glomerular permselectivity. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 10, 543-549.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20716-20723.
- Wang, S. X.; Ahola, H.; Palmen, T.; Solin, M. L.; Luimula, P. and Holthöfer, H. (2001). Recurrence of Nephrotic Syndrome after Transplantation in CNF Is due to Autoantibodies to Nephrin. *Exp Nephrol* 9, 327-331.
- Wartiovaara, J.; Öfverstedt, L.-G.; Khoshnoodi, J.; Zhang, J.; Mäkelä, E.; Sandin, S.; Ruotsalainen, V.; Cheng, R. H.; Jalanko, H. and Skoglund, U. et al. (2004). Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *The Journal of Clinical Investigation* 114, 1475-1483.
- Welsh, G. I. and Saleem, M. A. (2010). Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J. Pathol.* 220, 328-337.

- Wolf, G. and Ziyadeh, F. N. (1999). Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 56, 393-405.
- Wolf, G. and Ziyadeh, F. N. (2007). Cellular and Molecular Mechanisms of Proteinuria in Diabetic Nephropathy. *Nephron Physiol* 106, p26-31.
- Xia, J.; Zhang, X.; Staudinger, J. and Huganir, R. L. (1999). Clustering of AMPA Receptors by the Synaptic PDZ Domain-Containing Protein PICK1. *Neuron* 22, 179-187.
- Xiang, B.; Yu, G.-H.; Guo, J.; Chen, L.; Hu, W.; Pei, G. and Ma, L. (2001). Heterologous Activation of Protein Kinase C Stimulates Phosphorylation of Delta-Opioid Receptor at Serine 344, Resulting in β -Arrestin- and Clathrin-mediated Receptor Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4709-4716.
- Xu, J. and Xia, J. (2006). Structure and Function of PICK1. *Neuro-Signals* 15, 190-201.
- Yan, K.; Khoshnoodi, J.; Ruotsalainen, V. and Tryggvason, K. (2002). N-Linked Glycosylation Is Critical for the Plasma Membrane Localization of Nephrin. *J Am Soc Nephrol* 13, 1385-1389.
- Zimmermann, P.; Meerschaert, K.; Reekmans, G.; Leenaerts, I.; Small, J. V.; Vandekerckhove, J.; David, G. and Gettemans, J. (2002). PIP2-PDZ Domain Binding Controls the Association of Syntenin with the Plasma Membrane. *Molecular Cell* 9, 1215-1225.
- Ziyadeh, F. N. and Wolf, G. (2008). Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Current diabetes reviews* 4, 39-45.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum

Romy Palmer

