

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. L.C. Rump

## **Molekulare Signalkaskade der AngiotensinII - vermittelten Proteinurie**

### **Nephrin, $\beta$ -Arrestin2 Interaktion**

#### Dissertation

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

vorgelegt von  
Ulf Merlin Zierhut

(2019)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ralf Kubitz

## Publikationen

Koenigshausen, E., Ruetze, M., **Zierhut, U.**, Potthoff, S. A., Quack, I., Woznowski, M., Sellin, L. (2011). Molekularer Mechanismus der Angiotensin II bedingten Proteinurie. *Med. Review, Nr. 2*(12. Jahrgang).

Koenigshausen, E., **U. M. Zierhut**, M. Ruetze, S. A. Potthoff, J. Stegbauer, M. Woznowski, I. Quack, L. C. Rump and L. Sellin (2016). "Angiotensin II increases glomerular permeability by beta-arrestin mediated nephrin endocytosis." *Sci Rep* **6**: 39513.

## I. Zusammenfassung

Die Albuminurie ist ein früher klinischer Marker für einen Defekt des glomerulären Filters bei einer hypertensiven und diabetischen Nephropathie und korreliert mit dem kardiovaskulären Risiko. Die Albuminurie resultiert aus einem Defekt des glomerulären Filters. Die Behandlung mit Medikamenten, die in das Renin-Angiotensin-System eingreifen (ACE-Hemmer/Angiotensin-II-Rezeptor Blocker) ist weltweit in den Leitlinien vertreten. Der nephroprotektive Effekt lässt sich nicht allein durch die Reduktion des Blutdrucks erklären. Die Inhibition des Renin Angiotensin Aldosteron Systems vermag die Albuminurie weitaus stärker zu senken als es durch einen alleinigen antihypertensiven Effekt einer Vergleichsmedikation mit Ca-Antagonisten zu erklären ist. Ein Angiotensin II-abhängiger blutdruckunabhängiger Mechanismus wurde bereits seit langem postuliert. Ein wesentliches Strukturprotein des glomerulären Filters ist Nephrin, das die interdigitierenden podozytären Fußfortsätze verbindet und durch die Interaktion mit dem Adapterproteins  $\beta$ -Arrestin2 endozytiert wird. Die Endozytose führt zu einer Destabilisierung des glomerulären Filters und ermöglicht die Passage von Makromolekülen, wie z.B. Albumin. Die Stimulation mit Angiotensin II verstärkt die Nephrin  $\beta$ -Arrestin2 Interaktion und konsekutiv die Endozytose. Dieser Effekt wird über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt und kann durch eine medikamentöse Inhibition des Rezeptors aufgehoben werden. Das Galpha-q-Protein konnte in Mutationsstudien als essentiell für die Signaltransduktion des Angiotensin II Effekts identifiziert werden. Sowohl das Galpha-q Signal als auch die Phospholipase C sind für die Endozytose des Proteinkomplexes unabdingbar. Der RNA-Knockdown bzw. Inhibition des Enzyms führt zu einem Verlust der Endozytosefähigkeit. Das Nephrin-Tyrosin in Position Y<sub>1120</sub> und Y<sub>1125</sub> konnte als notwendiges Phosphorylierungsmotiv für die Bindung von  $\beta$ -Arrestin2 identifiziert werden. Der Knockdown des Doppelmotivs verhindert die Bindung des Adapterproteins  $\beta$ -Arrestin2. Ein Schlüsselmotiv zur Interaktion mit dem Zytoskelett und Bindung an Nck zur Stabilisierung von Nephrin konnte in Y<sub>1217</sub> identifiziert werden. Die Stimulation mit Angiotensin II schwächt die Bindung von Nephrin an nck2 ab. In Zusammenschau der Befunde liegt die Vermutung nahe, dass Angiotensin II die strukturelle Integrität des glomerulären Filters verändert i.S. einer Destabilisierung durch die reduzierte Bindung an das Zytoskelett i.F. von Nck2 und die Endozytose des Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Proteinkomplexes. Dies fördert die Ausbildung einer Albuminurie. Dieser neue Mechanismus wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Behandlung mit AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten bei bekannter diabetischer Nephropathie zu einer rückläufigen Albuminurie bei normotensiven Patienten führt.

## I. Summery

Albuminuria is an early clinical marker of a glomerular filter defect in hypertensive and diabetic nephropathy and correlates with cardiovascular risk. The albuminuria results from a defect of the glomerular filter. The treatment with drugs that interfere with the renin-angiotensin system (ACE-inhibitor / Angiotensin II receptor blocker) is represented worldwide in the guidelines. The nephroprotective effect can not be explained by the reduction of blood pressure alone. The inhibition of the renin angiotensin aldosterone system is able to reduce albuminuria much more than can be explained by a sole antihypertensive effect of a comparison medication with Ca-antagonists. An Angiotensin II dependent blood pressure independent mechanism has been postulated for a long time. An essential structural protein of the glomerular filter is Nephtrin, which connects the interdigitating podocytic foot processes and is  $\beta$ -Arrestin2-endocytosed by interaction with the adapter protein. Endocytosis leads to destabilization of the glomerular filter and allows the passage of macromolecules, e.g. Albumin. Stimulation with angiotensin II enhances Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2 interaction and consecutively endocytosis. This effect is mediated via the AT1 receptor and can be reversed by drug inhibition of the receptor. The Galpha-q protein could be identified in mutational studies as essential for the signal transduction of the Angiotensin II effect. Both the Galpha-q signal and the Phospholipase C are essential for the endocytosis of the protein complex. The RNA-knockdown or inhibition of this enzyme leads to a loss of endocytosecapability. The Nephtrin tyrosine in position Y<sub>1120</sub> and Y<sub>1125</sub> could be identified as a  $\beta$ -Arrestin2 necessary phosphorylation motif for the binding of  $\beta$ -Arrestin2. The knockdown of the double motif prevents the binding of the adapterprotein  $\beta$ -Arrestin2. A key motif for interaction with the cytoskeleton and binding to Nck for the stabilization of nephtrin was identified in Y<sub>1217</sub>. Angiotensin II stimulation weakens the binding of nephtrin to Nck2. In summary, the findings suggest that Angiotensin II alters the structural integrity of the glomerular filter for the purpose of destabilization by reduced binding to the cytoskeleton represented by Nck2 and the endocytosis of the Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2 protein complex. This promotes the formation of an albuminuria. This new mechanism is supported by the observation that treatment with AT1 receptor antagonists in known diabetic nephropathy leads to a decrease in albuminuria in normotensive patients.

## II. Abkürzungsverzeichnis

<b>7-TMR</b>	7-Transmembranrezeptor	<b>MAP</b>	mitogen-activated-protein
<b>ACE</b>	Angiotensin-converting-enzyme	<b>MEK1</b>	Multienzymkomplex1
<b>ANG2</b>	Angiotensin II	<b>min</b>	Minuten
<b>AP-2</b>	B2-Adaptin	<b>Nck</b>	non-catalytic region of tyrosine kinase
<b>ARF6</b>	ADP-ribosylation factor 6	<b>Nedd4</b>	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
<b>ARNO</b>	ARF nucleotide exchange factor	<b>NHE 1/5</b>	Na/H <sup>+</sup> -Austauscher
<b>BCA</b>	Bicinchoninacid	<b>NOT</b>	Restriktionsendonuklease
<b>BSA</b>	Bovines serum albumin	<b>PBS</b>	Phosphat buffered saline
<b>CCD</b>	Charge Coupled Device	<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>CDM</b>	Chemically definierte medium	<b>pEGFP</b>	
<b>CIAP</b>	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	<b>PI3</b>	Phosphoinositid-3
<b>Da</b>	Dalton	<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>DAG</b>	Diacylglycerin	<b>PLA<sub>2</sub></b>	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>DDT</b>	1,4-Dithiothreitol	<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulphoxide	<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>dNTP</b>	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate	<b>PTX</b>	Pertussistoxin
<b>ERK</b>	Extracellular signal regulated kinases	<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>F.</b>	Flag.	<b>RAF1</b>	Rapidly accelerated fibrosarcoma1
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum	<b>RISC</b>	RNA-inducing silencing-complex
<b>GBM</b>	Glomeruläre Basalmembran	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>GRK</b>	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase	<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate	<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-thiansulfonat	<b>sIg</b>	Surface immunoglobulin domain
<b>HindI</b>	Restriktionsendonuklease	<b>siRNA</b>	small-interfering-RNA
<b>Ig</b>	Immunglobulin	<b>Src</b>	Sarcoma
<b>IP</b>	Immunpräzipitation	<b>U</b>	Unit
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-triphosphat	<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>ITS</b>	Insulin, Transferrin, Selenium	<b>USP20</b>	ubiquitin proteasome system desubiquitinase 20/33
<b>MAD</b>	Arterieller Mitteldruck	<b>VLE</b>	Very Low Endotoxin
		<b>WT</b>	Wild type
		<b>β<sub>2</sub>AR</b>	β <sub>2</sub> -Adrenorezeptors

## III. Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 Übersicht</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 <math>\beta</math>-Arrestin 2</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 Nephrin</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4 Angiotensin II</b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 AT<sub>1</sub>- Rezeptor</b> .....	<b>17</b>
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>20</b>
3.1.1 PCR.....	20
3.1.2 Ligation .....	20
3.1.3 Chemisch kompetente Bakterien .....	20
3.1.4 Antibiotika Stocklösungen und Konzentrationen .....	20
3.1.5 Transformation .....	21
3.1.6 Zellkultur .....	23
3.1.7 Co- Immunopräzipitation .....	25
3.1.8 Biotin-Assay.....	25
3.1.9 SDS-Page-Gelelektrophorese und Western Blot .....	26
3.1.10 Primär- und Sekundärantikörper .....	27
3.1.11 Enhanced Chemolumineszens Western Blot.....	28
3.1.12 RNA Knockdown.....	28
3.1.13 Tierexperiment: isolierte Perfusion muriner Nieren.....	29
3.1.14 Tierexperiment: Isolierte Glomeruli .....	29
3.1.15 Tierexperimentelle Hinweise .....	29
Erklärung über die Teilnahme an der Tierversuchskunde: .....	29
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.2.1 PCR.....	31
3.2.2 Site-directed Mutagenese .....	32
3.2.3 Ligation .....	32
3.2.4 Sequenzierung .....	33
3.2.5 Transformation/ Amplifikation .....	33
3.2.6 Minikultur .....	34

3.2.7	Maxikultur, Maxipräparation und Restriktionsenzymverdau .....	34
3.2.8	Zellkultur .....	35
3.2.9	Transfektion .....	35
3.2.10	Zellstimulation.....	36
3.2.11	Zellernte.....	36
3.2.12	Co- Immunopräzipitation .....	36
3.2.13	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	37
3.2.14	Biotin-Assay.....	38
3.2.15	RNA Knockdown.....	39
3.2.16	Tierexperiment: isolierte Perfusion muriner Nieren.....	40
3.2.17	Tierexperiment: Isolierte Glomeruli .....	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Angiotensin-II-induzierte Verstärkung der Nephrin-<math>\beta</math>-Arrestin2-Interaktion.</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Signaltransduktion des Angiotensin-II-Effekts.....</b>	<b>43</b>
4.2.1	Die heterotrimeren G-Proteine sind für die Signaltransduktion der Angiotensin II vermittelten Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktionsverstärkung entscheidend.....	43
4.2.2	Das Galpha q Protein ist für die Signaltransduktion des Angiotensin-II-Effekts verantwortlich. ....	44
4.2.3	Der RNA-Knockdown des Galpha-q-Proteins verhindert die Angiotensin- II-Signaltransduktion auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion. ....	45
4.2.4	Die Phospholipase C reguliert die Angiotensin II vermittelte Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Bindungsstärke.....	48
4.2.5	Die Inhibition der Phospholipase C vermindert die Nephrinendozytose nach Angiotensin II Stimulation.....	49
4.2.6	Mek1 reguliert die Angiotensin-II-abhängige Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion.	51
<b>4.3</b>	<b>Die posttranslationale Modifikation von Nephrin.....</b>	<b>52</b>
4.3.1	Die posttranslationale Modifikation von Nephrin an Position 1120 und 1125 ist relevant für die Wirkung von Angiotensin II.....	52
4.3.2	Die posttranslationale Modifikation von Nephrin am Threonin <sub>1120</sub> hat keinen Einfluss auf den Angiotensin-II-Effekt.....	54
4.3.3	Die Nephrin-Domäne 1215-1221 ist essentiell für die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion. ....	56



4.3.4	Der Phosphorylierungszustand des Tyrosin <sub>1217</sub> reguliert den Angiotensin II-Effekt auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion. ....	58
4.3.5	Die spezifische Inhibition von Proteintyrosinkinasen beeinflusst den Angiotensin-II-Effekt nicht. ....	59
<b>4.4</b>	<b>Das zytoskelettale Adapterprotein Nck2 interagiert mit Nephrin am Phosphorylierungsmotiv Tyrosin<sub>1217</sub>.....</b>	<b>61</b>
<b>4.5</b>	<b>Untersuchung des Angiotensin-II-Effekts in murinen Podozyten.....</b>	<b>62</b>
4.5.1	Angiotensin II induziert die Endozytose von Nephrin in murinen Podozyten. .	62
4.5.2	Angiotensin II verstärkt die Nephrin- $\beta$ -Arrestin-II-Interaktion in isolierten murinen Glomeruli.....	64
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>78</b>

## IV. Abbildungen

ABBILDUNG 1: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DES GLOMERULÄREN FILTERS.....	12
ABBILDUNG 2: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME GLOMERULÄRER KAPILLEN UND INTERDIGITIERENDEN FUßFORTSÄTZEN. P: SOMA EINES PODOZYTEN. [7]. .....	13
ABBILDUNG 3: MODELL DER GLOMERULÄREN SCHLITZMEMBRAN NACH TRYGGVASON ET AL., 2006 [51]. .....	16
ABBILDUNG 4: ANGIOTENSIN II VERSTÄRKT DIE NEPHRIN- $\beta$ -ARRESTIN2-INTERAKTION ZEITABHÄNGIG. ....	42
ABBILDUNG 5: DIE C-TERMINALE RESTRIKTION DES AT <sub>1</sub> -REZEPTORS AUF DAS SIGNAL DER HETEROTRIMERN-G- PROTEINE HAT KEINEN EINFLUSS AUF DEN ANGIOTENSIN-II-EFFEKT. ....	44
ABBILDUNG 6: DER siRNA KNOCKDOWN DES GALPHA-Q-PROTEINS INHIBIERT DEN ANGIOTENSIN-II-EFFEKT AUF DIE INTERAKTION VON NEPHRIN MIT $\beta$ -ARRESTIN2.....	47
ABBILDUNG 7: DIE INHIBITION DER PLC FÜHRT ZUM VERLUST DES ANGIOTENSIN-II-EFFEKTS.....	49
ABBILDUNG 8: ANGIOTENSIN II BEWIRKT EINE ENDOZYTULOSE DES AN DER ZELLOBERFLÄCHE EXPRIMIERTEN NEPHRIN, DIE INHIBITION DER PHOSPHOLIPASE C NEGIERT DIE ENDOZYTULOSE.....	50
ABBILDUNG 9: DIE INHIBITION VON MEK1 MIT O0126 FÜHRT ZUM VERLUST DES ANGIOTENSIN-II-EFFEKTS. ....	52
ABBILDUNG 10: DER VERLUST DES PHOSPHORYLIERUNGSMOTIV NEPHRIN <sup>THR1120</sup> /THR1125 VERHINDERT DIE BINDUNG VON $\beta$ -ARRESTIN2. ....	54
ABBILDUNG 11: DIE AUSSCHALTUNG DES PHOSPHORYLIERUNGSMOTIVS NEPHRIN <sup>THR1120</sup> HAT KEINEN EINFLUSS AUF DAS BINDUNGSVERHALTEN VON $\beta$ -ARRESTIN2 ODER DEN ANGIOTENSIN-II-EFFEKT. ....	55
ABBILDUNG 12: DER C-TERMINALE ABSCHNITT NEPHRIN <sup>1215-1221</sup> REGULIERT DIE ANGIOTENSIN II INDUZIERT INTERAKTIONSVERSTÄRKUNG VON NEPHRIN AN $\beta$ -ARRRESTIN2. ....	57
ABBILDUNG 13: DIE PHOSPHORYLIERUNG VON NEPHRIN AM TYROSIN <sup>1217</sup> FÜHRT ZUM VERLUST DES ANGIOTENSIN-II-EFFEKTS UND ZU EINER WEITEREN REDUKTION DER PRÄZIPITATION VON $\beta$ -ARRESTIN2 AN NEPHRIN. ....	59
ABBILDUNG 14: EINE SPEZIFISCHE INHIBITION DER PROTEINTYROSINKINASEN HAT KEINEN EINFLUSS AUF DEN ANGIOTENSIN-II-EFFEKT. ....	60
ABBILDUNG 15: ANGIOTENSIN II INDUZIERT EINEN SIGNIFIKANTEN BINDUNGSVERLUST ZWISCHEN NEPHRIN UND DEM ZYTOSKELETALEN ACTIN-ADAPTERPROTEIN NCK.....	62
ABBILDUNG 16: ANGIOTENSIN II INDUZIERT DIE ENDOZYTULOSE VON NEPHRIN IN MURINEN PODOZYTEN. ....	63
ABBILDUNG 17: DIE STIMULATION ISOLIERTER MURINER GLOMERULI MIT ANGIOTENSIN II VERSTÄRKT DIE PRÄZIPITATION VON $\beta$ -ARRESTIN2 AN NEPHRIN. ....	65
ABBILDUNG 18: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SIGNALTRANSDUKTION UND DER VERWENDETEN .....	67
ABBILDUNG 19: ÜBERSICHT ÜBER DIE DYNAMISCHE REGULATION VON NEPHRIN IN DER GLOMERULÄREN SCHLITZMEMBRAN. ....	70

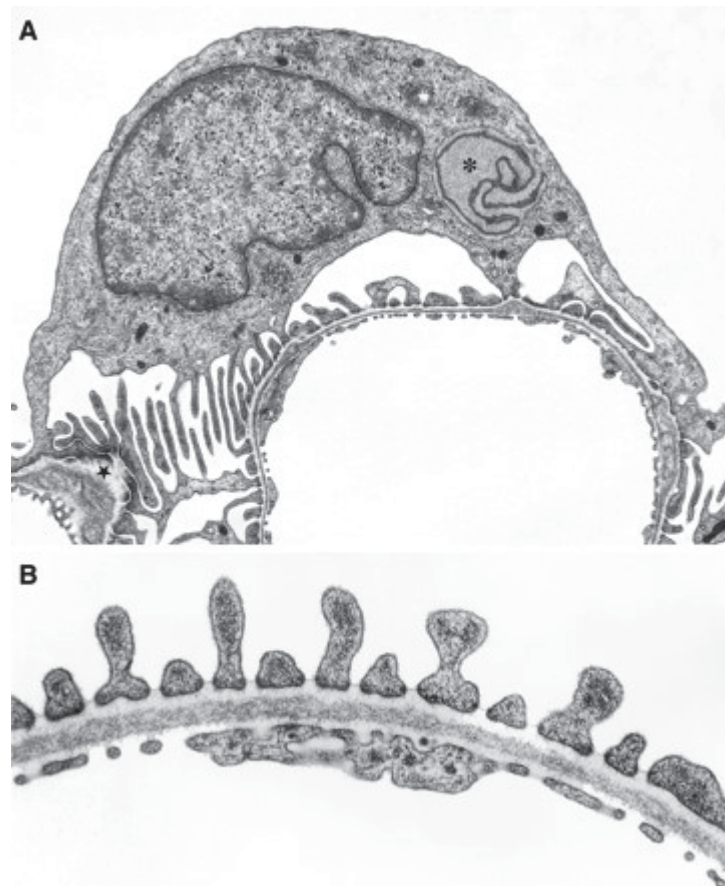
# 1. Einleitung

## 1.1 Übersicht

Die Kontrolle des Wasser-, Elektrolythaushaltes und die Entgiftung harnpflichtiger Substanzen sind wesentliche Funktionen der Niere. Ca. 1 Millionen Funktionseinheiten, die sog. Nephrone gewährleisten diese Funktionen. Diese bestehen aus einem proximalen Gefäßknäuel, dem sog. Glomerulum und einem distalen Tubulussystem. Der im Glomerulum ultrafiltrierte Primärharn wird im weiteren Verlauf konzentriert und hinsichtlich des Inhaltes reguliert, sodass täglich ca. 1-1,5 L Sekundärharn ausgeschieden werden.

Die glomeruläre Ultrafiltrationseinheit zwischen Blut und Harn besteht aus drei Hauptschichten: dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und der auf der Harnseite lokalisierten Schlitzmembran zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen der Podozyten, die der glomerulären Basalmembran von innen aufliegen. Das Ultrafiltrat wird hier hinsichtlich der Größe, Ladung und physikalischer Beschaffenheit selektiert. Niedermolekulare Solute und Wasser passieren die glomeruläre Ultrafiltrationseinheit ungehindert, Makromoleküle wie Plasmaproteine und lösliche Zellstrukturen werden zurückgehalten.

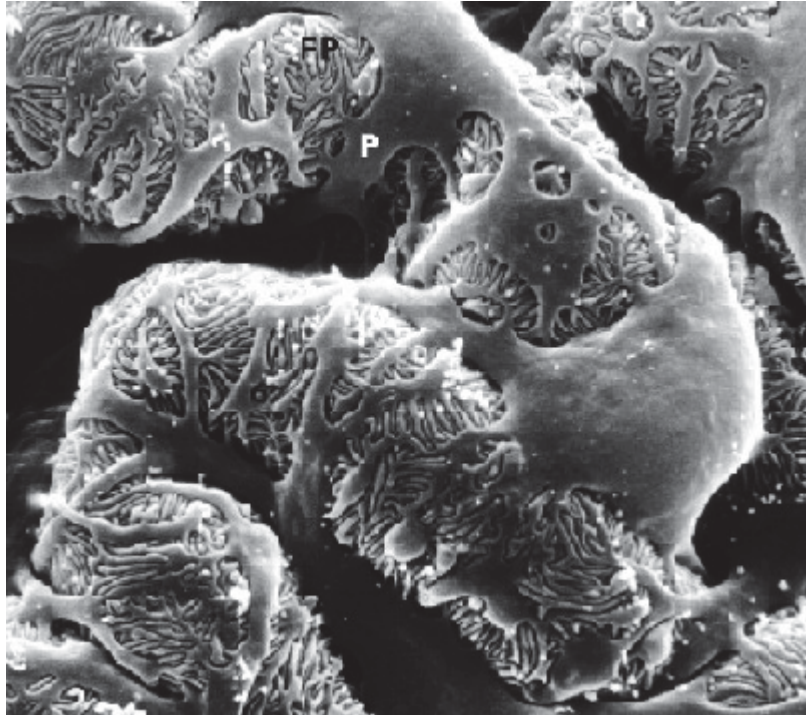
Das glomeruläre fenestrierte Kapillarendothel, bestehend aus der eigentlichen Zellmatrix mit 60-80nm großen transzellulären Fenestrierungen und der ca. 500nm breiten Glycokalix, liegt der glomerulären Basalmembran auf der Blutseite auf. In der Vergangenheit wurde der - aus Glycoprotein und Proteoglykan aufgebauten- Glycokalix und dem fenestrierten Endothel v.a. eine Relevanz hinsichtlich der Größen- und Ladungsselektion beigemessen. In aktuelleren Untersuchungen stellt sich vermehrt das Bild eines dynamischen Modells dar mit essentiellen interzellulären Funktionen zwischen dem Endothel und den Podozyten innerhalb der gesamten glomerulären Ultrafiltrationseinheit [1] [2] [3] [4]. Die glomeruläre Basalmembran ist eine ca. 300nm breite dreischichtige amorphe extrazelluläre Gerüstmatrix (Lamina rara externa, Lamina densa, Lamina rara interna), die v.a. aus Kollagen IV, Laminin, Entactin, Nidogen und Proteoglykanen besteht [5]. Den sulfatierten Glycoaminoglykangruppen der Proteoglykanen, bestehend aus Heparansulfaten und Chondroitinsulfaten wird aufgrund der hohen Elektonegativität, wie der Glycokalix des fenestrierten Kapillarendothels, eine Ladungsselektion des Ultrafiltrats zugesprochen [6].



**Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des glomerulären Filters.**

**A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozyten und der interdigitierenden Fußfortsätze von Podozyten. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme des glomerulären Filters bestehend aus dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran und der glomerulären Schlitzmemebran zwischen den Podozytenfußfortsätzen. [7].**

Podozyten sind viszerale Epithelzellen von deren Soma Primärfußfortsätze ausgehen. Von den Primärfortsätzen verlaufen, die Kapillare und die aufliegende glomeruläre Basalmembran umschlingend, interdigitierende Sekundärfortsätze [8]. Über jene Primär- und Sekundärfortsätze wird die Adhäsion, des im Lumen der Bowman-Kapsel frei flottierenden Somas, an der Basalmembran über Integrine [9] und Dystroglykane [10, 11] gewährleistet.



**Abbildung 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme glomerulärer Kapillen und interdigitierenden Fußfortsätzen. P: Soma eines Podozyten. [7].

Eine erhöhte kardiovaskulären Mortalität und die Progression einer Niereninsuffizienz konnte in der Vergangenheit für das Auftreten einer Albuminurie in Assoziation mit der diabetischen Nephropathie und nicht-diabetischen Nephropathien nachgewiesen werden [12]. Die Albuminurie resultiert aus einem Defekt des glomerulären Filters. In der Gesamtbevölkerung ist die Albuminurie ein unabhängiger Prädiktor für die kardiovaskuläre Mortalität [13] [14]. Unabhängig von der geschätzten Glomerulären Filtrationsrate (GFR) konnte eine erhöhte Gesamtmortalität und ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko unter einer bestehenden Albuminurie aufgezeigt werden [15].

## 1.2 $\beta$ -Arrestin 2

Die Gruppe der Arrestine umfasst vier bekannte Moleküle die, mit der Ausnahme der retinal lokalisierten Arrestine 1 und 4 [16], ubiquitär exprimiert werden [17] [18] [19]. Zu den nicht-retinal exprimierten Arrestinen gehören  $\beta$ -Arrestin 1 und 2 (Syn.: Arrestin 2 und Arrestin 3). Alle funktionellen Mitglieder dieser Genfamilie können mit Typ-7-Transmembranrezeptoren (7-TMR) interagieren, welche durch Licht oder Liganden aktiviert werden. Das Phosphorylierungsmuster des C-Terminus durch G-Protein-gekoppelte Kinasen (GRK) [20] beeinflusst die Affinität der einzelnen Arrestine zum Rezeptor. Relevante Folge ist die Dämpfung des Rezeptorsignals durch sterische Hinderung der Interaktion zwischen heterotrimeren G-Protein und

dem Rezeptor [18, 21] [22]. Die  $\beta$ -Arrestin vermittelte Desensitivierung eines Rezeptorsignals und die Clathrin abhängige Endozytose, sowie die folgende Sequestrierung in Form von Degradation oder Wiederverwertung von Typ-7-Transmembranrezeptoren konnten experimentell nachgewiesen werden [23] [24]. Neben der direkten Fähigkeit zur Interaktion mit Clathrin über  $\beta$ 2-Adaptin [25] [26] können  $\beta$ -Arrestine ebenso als Adapterprotein für das kleine G-Protein ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) in einer Bindungskaskade von AP-2 ( $\beta$ 2-Adaptin), Dynamin und ARNO (ARF nucleotide exchange factor) dienen. Erstmals wurde dies am  $\beta$ 2-Adrenorezeptor 2001 durch Claing et al dargestellt [27].

$\beta$ -Arrestin2 kann darüber hinaus als Adapterprotein in der postrationalen Modifikation innerhalb des Ubiquitin-Systems dienen. Die Notwendigkeit der  $\beta$ -Arrestin2-Expression zur Bindung der E3-ubiquitin-Ligase Nedd4 und somit die erfolgreiche Ubiquitinierung des  $\beta$ 2-Adrenorezeptors ( $\beta$ 2AR) und folgende lysosomale Degradation konnte durch Shenoy et al nachgewiesen werden [28] [29]. Für ein potentielles Recycling des  $\beta$ 2AR durch eine Deubiquitinierung wird  $\beta$ -Arrestin2 als Adapterprotein für die Deubiquitinasen USP20 und USP33 benötigt [30].

Die  $\beta$ -Arrestin abhängige Endozytose beschränkt sich nicht nur auf Typ-7-Transmembranrezeptoren, sondern konnte ebenso an Na/H<sup>+</sup>-Austauscher NHE1 und NHE5 [31], an kardialen spannungsabhängigen Ca-Kanälen [32] und an liganden-aktivierten nicotinergen Acetylcholinrezeptoren [33] nachgewiesen werden.

Eine relevante Bindungs- und Regulationsstruktur für  $\beta$ -Arrestin 1 und 2 wurde in Typ-1-Transmembranrezeptoren in Form von transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -III-Rezeptoren identifiziert [34].

Die für die glomeruläre Ultrafiltrationseinheit relevante Interaktion zwischen  $\beta$ -Arrestin2 und dem Typ-1-Transmembranrezeptor Nephrin wurde 2006 erstmalig beschrieben. Die Dephosphorylierung des Tyrosins in Position 1193 führt zu einer verstärkten Bindung von  $\beta$ -Arrestin2 und der folgenden Endozytose des Proteinkomplexes [35].

### 1.3 Nephrin

Das humane Nephrin, ein aus 1241 Aminosäuren bestehendes Genprodukt des NPHS1-Gens, wurde erstmalig durch Positionsklonierung i.R. der Identifizierung der Pathogenese des kongenitalen Nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ beschrieben [36]. Dieses autosomal-dominante vererbte Erkrankungsbild ist durch eine bereits in utero ausgeprägte Proteinurie und eine postnatal rasch progrediente Nephropathie gekennzeichnet und wird durch lokore-

gional und familiär unterschiedliche Mutationen im NPHS1-Gen hervorgerufen [37].

Elektronenmikroskopisch und immunologisch konnten nachgewiesen werden, dass Nephrin während der Embryonalentwicklung spezifisch durch Podozyten in der glomerulären Schlitzmembran exprimiert wird [38] [39] [40] [41]. Murine Knockout-Modelle für das NPHS1 Gen zeichnen sich durch eine massive Proteinurie und einen raschen Tod, meist in den ersten 24 Lebensstunden aus. Eine glomeruläre Schlitzmembran kann nicht nachgewiesen werden, die podozytären Fußfortsätze verschmelzen und die Tubuli, sowie der Bowman'sche Kapselraum der Glomeruli sind massiv dilatiert [42].

Als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und Typ-1-Transmembranrezeptor weist das 180 kD schwere Nephrin im N-terminalen extrazellulären Abschnitt eine Fibronectin Typ-3-ähnliche Domäne und acht Immunglobulin-Motive auf, die in eine singuläre Transmembran-Domäne übergehen [36]. Im zytosolischen Abschnitt liegen insgesamt acht mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsdomänen vor [43].

Extrazelluläre Adhäsionsfähigkeiten wurden u.a. in der Heterodimerisierung mit Nephrin/2 und Homodimerisierung mit Nephrin nachgewiesen [44] [45]. Nephrin wird als integraler Bestandteil der glomerulären Schlitzmembran durch die Yes-abhängige Phosphorylierung an Position T1193 durch Podocin intrazellulär verankert und dient als möglicher Sensor für die korrekte Positionierung des Strukturproteins innerhalb der glomerulären Schlitzmembran [35]. Die Phosphorylierung von c-terminalen YDxV Motiven an Position 1176, 1193 und 1217 des humanen Nephrin durch die Src-Kinasen Fyn und Yes ermöglicht die Bindung von Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase). Nck dient als Adapterprotein für die Interaktion mit dem Actin-Zytoskelett [46]. Mit zunehmenden Kenntnissen über die biochemischen Prozesse in Podozyten wird Nephrin nicht nur als Adhäsionsprotein von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten angesehen, sondern nimmt eine Rolle als wichtiges Regulationsprotein für die Signaltransduktion, Funktionserhaltung und Struktur der glomerulären Schlitzmembran ein [47] [48]. Der C-Terminus unterliegt einer hoch dynamischen Regulation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von verschiedenen Tyrosinmotiven u.a. durch die Src-Kinasen Fyn und Yes [49] [50]. Auf der Basis des molekularen Aufbaus und elektronenmikroskopischer Bildgebung durch Rodewald und Karnovsky im Jahr 1974 entwickelte Tryggvason 1999 erstmals ein dynamisches Modell zum molekularen Aufbau der glomerulären Schlitzmembran (Abb. 3).

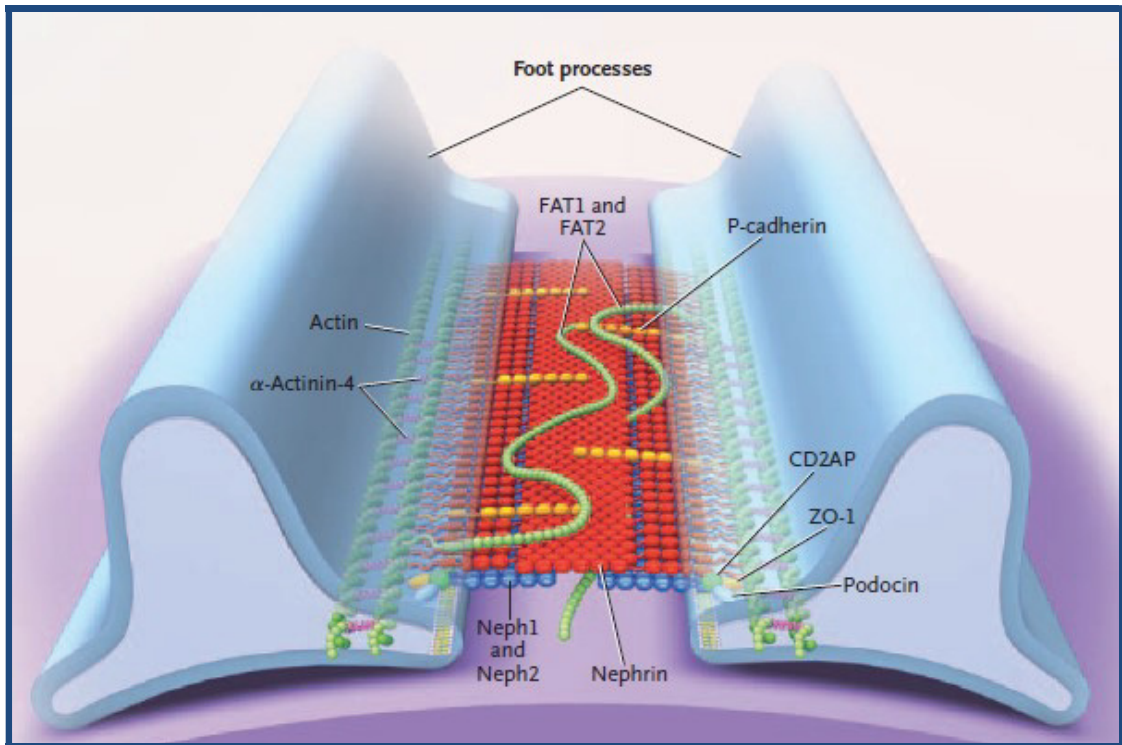


Abbildung 3: Modell der glomerulären Schlitzmembran nach Tryggvason et al., 2006 [51].

Weitere bekannte Expressionsgewebe sind die Insulinvesikel der  $\beta$ -Zellen des humanen Pankreas und murine Skelettmuskulatur. In den  $\beta$ -Zellen fördert Nephrin nach ersten Erkenntnissen die Exozytose von Insulin nach Stimulation mit Glucose [52]. In muriner Skelettmuskulatur konnte Nephrin als notwendiges Protein zur Myoblastenfusion und mögliches Regulationsprotein in der Signaltransduktion von MAPK/ERK in der myogenen Differenzierung identifiziert werden [53].

## 1.4 Angiotensin II

Das Plasma-Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird nach heutigem Kenntnisstand als akuter neuronaler und endokriner Regulator des kardiovaskulären Systems zur Kontrolle des Blutdrucks, des Wasser-, Elektrolythaushaltes und somit auch der Nierenfunktion angesehen. Die in juxtaglomerulären Zellen synthetisierte Protease Renin katalysiert die Hydrolyse des hepatisch synthetisierten Angiotensinogen an Position 10Leu/11Val der Aminosäurekette und generiert in Folge Angiotensin I ( $\text{H}_2\text{N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-COOH}$ ). Angiotensin I wird durch das pulmonale Angiotensin-converting-Enzyme (ACE) oder die endothelial exprimierte Chymase an Position 8Phe/9His hydrolysiert und zu Angiotensin II (Ang II) konvertiert. [54] [55]. Die lokale Angiotensinkonzentration innerhalb des Nierenparenchyms können die systemischen Konzentrationen um den Faktor 1000 über-



steigen [56] [57]. Angiotensin II, ein 1046 Da großes Octapeptid, stellt als Effektor-Molekül die biologisch aktive Form zur Interaktion mit den Angiotensin-II-Rezeptor Subtypen dar. Die wesentlichen Effekte umfassen v.a. die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-assoziierte und G-Protein-induzierte Vasokonstriktion in Myozyten, die Freisetzung von Aldosteron und die konsekutive tubuläre Natrium- und Wasserretention. Unabhängig von der Blutdruckregulation konnte Angiotensin II als Wachstumsfaktor zur Regulation der Zellproliferation, -hypertrophie, Inflammation und Migration von Podozyten identifiziert werden [58]. Neben systemischen Effekten des Plasma-Renin-Angiotensin-Systems auf das Zirkulationssystem konnten auch lokale Renin-Angiotensin-Systeme in der Niere [59], Gehirn [60], Herz [61], Haut [62] und Pankreas [63] identifiziert werden, die teilweise unabhängig von der Plasma-Angiotensin-II-Konzentration sind. Diesen Gewebe-assoziierten Renin-Angiotensin-Systemen wird das Potential einer subakut oder chronischen lokalen Modulationsfähigkeit des Gewebes zugeschrieben im Vergleich zu akuten Effekten durch das Plasma-Renin-Angiotensin-System. [64]. Die Darstellung aller bisher erworbenen Erkenntnisse über Angiotensin II übersteigt den Rahmen dieser Arbeit, so dass nur ausgewählte Informationen wiedergegeben werden.

## 1.5 AT<sub>1</sub>- Rezeptor

Zwei unterschiedliche humane Subtypen des zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren gehörenden Ang-II-Rezeptors konnten bisher unter selektiver Inhibition mit Losartan (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) und P123319 (AT<sub>2</sub>-Rezeptor) identifiziert werden [65]. Zwei weitere Subtypen des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (AT<sub>1A</sub>-Rezeptor/AT<sub>1B</sub>-Rezeptor) wurden in verschiedenem murinen Gewebe nachgewiesen. In dieser Arbeit wird die Bedeutung des AT<sub>1</sub> – Rezeptors untersucht.

Der 359 Aminosäuren umfassende und 41 kDa große transmembranäre AT<sub>1A</sub>-Rezeptor besteht aus einem extrazellulären NH<sub>2</sub>-Terminus und sieben  $\alpha$ -helicalen Transmembran-Domänen, die über jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der cytoplasmatische C-Terminus beinhaltet insgesamt vier Tyrosin-Motive (Tyr303/313/320/340) drei potentielle PKC-Phosphorylierungsdomänen (Ser332/339/349) und drei weitere Regulationsmotive (NPXXY, STL, YIPP), welche für die Rezeptorendozytose und Interaktion mit JAK-Kinasen notwendig sind [66]. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor wird auf dem Chromosom 3 codiert. Eine vaskuläre, hepatische, renale, suprarenale, cerebrale, pulmonale und kardiale Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors ist beschrieben [67, 68]. Homozygote AT<sub>1A</sub>-Rezeptor-defiziente Knockout-Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion des mittleren arteriellen Drucks (MAD) in euvolämen Zustand und einen signifikanten Anstieg des MAD unter

Volumenexpansion im Vergleich zum Wildtyp [69].

Die über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten kardiovaskulären Effekte reichen von der Blutdruck- und Vasoregulation über Zellproliferation und Hypertrophie z.B. von Kardiomyozyten [70, 71] [72]. Die hervorgerufenen Effekte werden mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität z.B arterieller Hypertonie und Atherosklerose assoziiert.

Die Regulation des Flüssigkeits- und Natriumhaushaltes sind weitere wesentliche Effekte, die über eine AT<sub>1</sub>-Rezeptor induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und konsekutive Aldosteronsynthese und -freisetzung hervorgerufen werden [73].

Die Angiotensin-II-vermittelte Signaltransduktion am AT<sub>1</sub>A-Rezeptor findet über mehrere verschiedene und gut untersuchte Singalkaskaden statt. Die fünf klassischen Mechanismen zur Signaltransduktion sind die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, Phospholipase D, Phospholipase C, Inhibition der Adenylatcyclase und Aktivierung von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen. Die Aktivierung der ersten vier Mechanismen wird durch die G-Proteine vermittelt [74].

Für diese Arbeit wurde das G-Protein-Signal, die Aktivierung Phospholipase C und die konsekutive Aktivierung von MAP-Kinasen, sowie die Relevanz der Phosphatidylinositol-3-Kinase für den Angiotensin II Effekt untersucht. Abbildung 18 zeigt eine schematische Übersicht über die untersuchte Signaltransduktion. Aufgrund der weitreichenden Informationen zu diesen Signalwegen bleibt es lediglich bei einer Benennung dieser. Eine ausführlichere Erklärung erfolgt im Fließtext und den folgend dargestellten Ergebnissen.

## 2. Fragestellung

„Molekulare Signalkaskade der Angiotensin-II-vermittelten Proteinurie“

Chronische Nierenerkrankungen können heute u.a. mit zwei großen Gruppen von Erkrankungen assoziiert werden – kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus.

Die Proteinurie in Form von Mikro- und Makroalbuminurie stellt für beide Gruppen einen wichtigen prognostischen Faktor dar. Die Verminderung einer Progression der Nierenerkrankung und der Proteinurie kann durch den therapeutischen Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) erzielt werden; ein ursächlicher Faktor ist in der Angiotensin II-Wirkung zu vermuten. Als Zielstrukturen von Angiotensin II sind v.a. der AT1-Rezeptor und AT2-Rezeptor zu nennen. Eine Schädigung des glomerulären Filters, bestehend aus fenestriertem Endothel, Basalmembran und der zwischen den Podozyten befindlichen Schlitzmembran, äußert sich symptomatisch als Proteinurie.

Das Strukturprotein Nephrin der glomerulären Schlitzmembran und das spezifische Expressionsverhalten sorgen u.a. für die strukturelle Integrität bzw. Permeabilität des glomerulären Filters. Nephrin interagiert unter bestimmten Bedingungen mit dem im Podozyten exprimierten Protein  $\beta$ -Arrestin-2. Dies führt zu einer Internalisierung von Nephrin führt und erhöht die Permeabilität des glomerulären Filters.

### **Hypothese / Fragestellung:**

Kann die Nephrin- $\beta$ -Arrestin-2-Interaktion durch die Angiotensin-II-Wirkung verstärkt werden?

Welche intrazelluläre Signalkaskade liegt zugrunde?

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 PCR**

Accu Prime 10x PCR Puffer II, 500 $\mu$ l (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

Accu Prime Taq DNA Polymerase System

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) 10.000 U/ml (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)

Glycogen (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Phenol Solution (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)

#### **3.1.2 Ligation**

Agarose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

T4-DNA-Ligase 400 U/ $\mu$ l (New England Biolabs GmbH)

#### **3.1.3 Chemisch kompetente Bakterien**

Chemisch kompetente Bakterien in TfbII Puffer (Escherichia coli)  
(Invitrogen Life technologies, Carlsbad, USA)

E. coli MC 1061 für Ampicillin oder Kanamycin Resistenz

E.coli MC 1061 P3 für Ampicillin und Tetracyclin Resistenz

#### **3.1.4 Antibiotika Stocklösungen und Konzentrationen**

Tetracyclin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Tetracyclin Lösung:

1mg/ ml (0,1g in 50ml A.d. + 50ml Ethanol)

Ampicillin (Serva Electrophoreris GmbH Heidelberg, Deutschland)

Ampicillin Lösung:

10mg/ ml in A.d.

Kanamycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Kanamycin Lösung :

0,5mg/ ml in A.d.

Antibiotika Endkonzentration in LB Flüssigmedium und Agar

Ampicillin 100 µg/ ml

Ampicillin/ Tetracyclin 25 µg/ ml; 7,5 µg/ ml

Kanamycin 50 µg/ ml (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

### 3.1.5 Transformation

LB Agar

250 ml H<sub>2</sub>O

8,75 g LB Agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

75 µl 10M NaOH

10 cm Petrischale, Kunststoff (Sarstedt AG&Co, Sarstedt)

LB Flüssigmedium

6 g LB Broth Base (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) ad 300 ml ddH<sub>2</sub>O (pH Titration auf 7,0 mit NaOH)

Transformationsansatz

Inkubator (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)

1 µg zu amplifizierendes Plasmid

50 µl E. coli MC1061 oder MC1061 P3 Suspension

10 cm LB Agarplatte mit Antibiotikum in o.g. Konzentration

#### 3.1.5.1 Minikultur

Inkubationsschüttler (Infors-HT, Multitron)

15 ml Röhren, steril (Cellstar)

3 ml LB Flüssigmedium mit Antibiotikum in o.g. Konzentration

Bakterienkolonie der Agarplatte aus 5.5.1

#### 3.1.5.2 Maxikultur

Inkubationsschüttler (Infors-HT, Multitron)

500 ml Glaskolben, steril

200 ml LB Flüssigmedium mit Antibiotikum in o.g. Konzentration

200 µl der Bakterien/LB-Medium Suspension aus 5.1.5.1

### 3.1.5.3 Maxi-Präparation

Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

100 % Isopropanol

70 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) zum Waschen

200 µl H<sub>2</sub>O (für Chromatographie, HPLC)

### 3.1.5.4 Restriktionsenzymverdau und DNS Photometrie

1 µg Plasmid DNA

3 µl Reaktionspuffer (NEBuffer 1, 2, 3; New England Biolabs Inc.)

0,5 µl Restriktionsendonuklease 1 (10.000 U/µl, New England Biolabs Inc.)

0,5 µl Restriktionsendonuklease 2 (10.000 U/µl, New England Biolabs Inc.)

25 µl H<sub>2</sub>O

Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Photometer (Eppendorf BioPhotometer)

### 3.1.5.5 Agarose- Gelelektrophorese

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 500 mM EDTA, pH 8,0)

Vier Tropfen Ethidiumbromidlösung 0,025%, wässrige Lösung (250 µg/ml) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

1% Agarose NEEO, Ultra-Qualität (Roth)

### 3.1.5.6 Vektoren, Plasmide und Restriktionskarten

CDM.F.GFP

CDM.sIg

CDM.sIg.Nephrin.cyt. (Dr. Gerd Walz, Universität Freiburg, Deutschland)

CDM.sIg.Nephrin.cyt.1087-1208

CDM.sIg.Nephrin.cyt.1087-1215

CDM.sIg.Nephrin.cyt.1087-1221

CDM.sIg.Nephrin.cyt.1087-1241

Die angegebenen Werte beschreiben die Länge des exprimierten Proteins vom N-Terminus zum C-Terminus ausgehend von der physiologischen Gesamtlänge des

Proteins.

CDM.sIg.Nephrin.WT

CDM.F.β-Arrestin2

CDM.sIg.Nephrin.cyt.S1146A

CDM.sIg.Nephrin.cyt.S1146D

CDM.sIg.Nephrin.cyt T1120AT1125A (Dr. Gerd Walz, Universität Freiburg, Deutschland)

CDM.sIg.Nephrin.cyt.T1120A (Quack, JBC, 2011)

CDM.sIg.Nephrin.cyt.T1125A (Quack, JBC, 2011)

CDM.sIg.Nephrin.cyt.Y1217A

CDM.sIg.Nephrin.cyt.Y1217F

pEGFP.AT1-Rezeptor

pEGFP.AT1-Rezeptor Δ319

CDM.F.Nck2. (Nina Jones, Kanada)

### 3.1.5.7 Sequenzierung

1,5 ml *Safe-Lock* Eppendorf Gefäße (Eppendorf)

750-1500 ng Plasmid

20 pmol Primer

Eurofins MWG Operon SmartSeq Kit

## 3.1.6 Zellkultur

### 3.1.6.1 Zellen und Medien

HEK 293T-Zellen (Human embryonic kidney)

COS 7 (African green monkey kidney)

Podozyten (murin)

Podozyten (human)

PBS Dulbecco (Phosphat buffered Saline) w/o Ca<sup>++</sup>, w/o Mg<sup>++</sup>, low Endotoxin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Trypsin/ EDTA Solution 0,05 %/ 0,02 % w/v in PBS w/o Ca<sup>++</sup>, w/o Mg<sup>++</sup> (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

## HEK293T

VLE Dulbesso's MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g/L Glucose, L-Glutamin, Na-Pyrovat, *very low Endotoxin* (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 10% FBS Superior (Fetales Kälberserum) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

## Murine Podozyten

RPMI 1640 mit stabilem Glutamin (2,0 g/ml NaHCO<sub>3</sub>) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 10% FBS Superior (Fetales Kälberserum) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 400 Units Penicillin/Streptomycin

+ 100 Units rekombinantes Interferon  $\gamma$  (E.coli) (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, United States of America)

## Humane Podozyten

RPMI 1640 mit stabilem Glutamin (2,0 g/ml NaHCO<sub>3</sub>) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 10% FBS Superior (Fetales Kälberserum) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 1% ITS (Insulin, Transferrin, Selenium) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

## 3.1.6.2 Transfection

0,25 M Calciumchlorid-dihydrat p.a. ( Merck Darmstadt, Deutschland)

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

49,8 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat) (Merck Darmstadt, Deutschland)

280 mM NaCl (Applichem)

1,47 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; wasserfrei; Suprapur (Merck Darmstadt, Deutschland)

## 3.1.6.3 Stimulatoren und Inhibitoren

autoklaviertes H<sub>2</sub>O

DMSO (Dimethyl Sulphoxide) Hybri-Max® (Sigma-Aldrich)

Angiotensin II, human (Sigma-Aldrich)



U73122 (Cayman Chemical Company)

U0126 (Calbiochem)

Genistein (Calbiochem)

### 3.1.7 Co- Immunopräzipitation

PBS (Phosphat buffered saline)

136,8 mM NaCl (Applichem), 2,6 mM KCl (Merck), 4,28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck),  
1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

Lysis-Puffer-Stocklösung

5 ml 10% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 25 ml 2x Lysispuffer (40 mM Tris HCL,  
pH 7,5 (Trizma Hydrochlorid, Sigma); 2 mM EDTA, pH 8,0 (Sigma); 300 mM  
KCl (Merck) ad 1000 ml H<sub>2</sub>O), 500 µl 100 nM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (ICN BioMedicals, Ohio,  
USA), 19,5 ml H<sub>2</sub>O, Complete Mini (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deut-  
schland)

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) Sigma 10 mM in 100% Isopropanol

GammaBind Plus Sepharose in 20% Ethanol (GE Healthcare Bioscience Uppsala,  
Sweden)

Reduzierender Proteinpuffer nach Lämmli (2x Lämmli)

900 µl 2x Lämmli Stocklösung

(50 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8; 20 g SDS (Sodiumdodecylsulfate) (Biomol GmbH  
Hamburg, Deutschland);

100 ml Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland);

1 g Bromphenol Blau (Pharmazia Biotechnoligy, Uppsala, Schweden)

ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

100 µl 1M DTT (1,4-Dithiothreitol) (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland)

### 3.1.8 Biotin-Assay

PBS (Phosphat buffered saline) mit Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup>

146 mM NaCl (Applichem)

2,6 mM KCl (Merck)

4,28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

0,1 mM CaCl (Sigma)

1 mM MgCl (Merck)

PBS (Phosphat buffered saline) mit Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> und Glycin

146 mM NaCl (Applichem)

2,6 mM KCl (Merck)

4,28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,1 mM CaCl

1 mM MgCl

100 mM Glycin

Anti-Nephrin Immunglobulin (Meerschweinchen), polyclonal (Progen, Heidelberg, Deutschland)

Protein A Sepharose CL- 4B in 20% Ethanol (GE Healthcare Bioscience Uppsala, Sweden)

EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin (Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido) Hexanoate) (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland)

### 3.1.9 SDS-Page-Gelelektrophorese und Western Blot

Material für zwei Polyacrylamidgele	Trenngel (Vol. in µl)	Sammelgel (Vol. in µl)
Trenngelpuffer	4500	0
Sammelgelpuffer	0	1665
Rotiphorese Gel® 30	3000	535
Wasser	1500	1135
10% APS	90	40
TEMED	15	5

Trenngelpuffer pH 8,8: 360 mM Tris HCl; 1140 mM Tris Base; 14 mM SDS

Sammelgelpuffer pH 6,9: 484 mM Tris HCl; 16 mM Tris Base; 14 mM SDS

Laufpuffer: 191,8 mM Glycin; 3,46 mM SDS; 23,9 mM Tris Base

Transferpuffer: 49,5 mM Tris Base; 383,6 mM Glycin; 20 % Methanol

Proteinwaschpuffer: 12,9 mM Tris HCL, pH 7,5; 129 mM NaCl; 0,13 % Tween 20 (Merck)

Rotiphorese Gel® 30 (30 % Acrylamid/ Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1) (Karl Roth GmbH&Co KG Karlsruhe, Deutschland)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) (Karl Roth GmbH&Co KG Karlsruhe, Deutschland)

10% APS (Ammoniumperoxidisulfat) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

BSA (hitzeinaktiviert) (Bovines Serum Albumin) (VWR International Ltd. leics, England) 5 % in Proteinwaschpuffer

Nitrocellulose Transfer Membran (Whatman Protran GmbH, Dassel, Deutschland)

### 3.1.10 Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper und deren eingesetzte Verdünnung

- Anti-Flag.M2 Immunglobulin (Maus), monoklonal  
(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:400

- Anti-Nephrin Immunglobulin (Meerschweinchen), polyklonal  
(Progen, Heidelberg, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:250

- Streptavidin, HRP konjugiert  
(Thermo scientific, Darmstadt, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:500

- Anti-human- Immunglobulin G, HRP konjugiert (Schaf), polyklonal  
(Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:500

(Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, USA)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:750

- Anti-p-ERK Immunglobulin (Kaninchen), polyklonal  
(Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, USA)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:1300

- Anti-PLC  $\beta_1$  Immunglobulin (Maus), monoklonal

(Santa-Cruz, Heidelberg, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:200

Sekundärantikörper und deren eingesetzte Verdünnung

- Anti Maus Immunglobulin, polyklonal, Ziege

(Dako, Hamburg, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:10.000

- Anti Meerschweinchen Immunglobulin, polyklonal, Esel

(MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:20.000

Anti Kaninchen Immunglobulin, polyclonal, Esel,

(GE Healthcare, Solingen, Deutschland)

Inkubation von Nitrozellulose Membranen: 1:7500

### 3.1.11 Enhanced Chemolumineszens Western Blot

Lösung A:

17,7 ml A.d.

2 ml 1M Tris pH 8,5

88 µl 90 mM Cumarin

200 µl 250 mM Luminol

Lösung B:

18 ml A.d.

2 ml 1 M Tris pH 8,5

12 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

### 3.1.12 RNA Knockdown

20 µl siRNA (5 nmol siRNA gelöst in 250 µl siRNA-Puffer)

20 µl Kontroll-siRNA

1x siRNA Puffer (Thermo scientific)

VLE Dulbecco's MEM (3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1 g/L Glucose, L-Glutamin, Na-Pyrovat, *very low Endotoxin*) (Biochrom)

VLE Dulbecco's MEM (3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1 g/L Glucose, L-Glutamin, Na-

Pyrovat, *very low Endotoxin*) (Biochrom) + 10 % FBS Superior  
 VLE Dulbecco's MEM (3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g/L Glucose, L-Glutamin, Na-  
 Pyrovat, *very low Endotoxin*) (Biochrom) + 10 % FBS Superior  
 DharmaFECT Duo Lipofektions-Reagenz (Thermo Scientific)  
 CDM.sIg.Nephrin.cyt (gelöst in RNAse freiem H<sub>2</sub>O)  
 pEGFP.AT1-Rezeptor (gelöst in RNAse freiem H<sub>2</sub>O)  
 CDM.F.β-Arrestin2 (gelöst in RNAse freiem H<sub>2</sub>O)

### 3.1.13 Tierexperiment: isolierte Perfusion muriner Nieren

Maus (Stamm:Balb/C), 3-8 Wochen alt, männlich  
 PBS (steril)  
 10 ml Injektionsspritze mit 21G Nadel und Katheter (Durchmesser der einzubrin-  
 genden Kanüle: 0,4 mm)  
 Ligatur (4-0 bis 6-0)  
 Chirurgische Klemmen (5)  
 Chirurgische Scheren (2) und Pinzetten (2) (in zweifacher steriler Ausführung)  
 Gefäßclip  
 Sterile Wattestäbchen

### 3.1.14 Tierexperiment: Isolierte Glomeruli

Dynabeads (Dynabeads Epoxy M-450) (Invitrogen)  
 Kollagenase A -Verdau-Lösung (1,5 mg/ml Kollagenase A) (Roche Applied  
 Science)  
 Zellsieb (2), 100 µm (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)  
 2 ml Eppendorf Gefäß (autoklaviert/ steril)  
 Magnet (Invitrogen)

### 3.1.15 Tierexperimentelle Hinweise

LANUV-Aktenzeichen / Organentnahmenummer: O 68/08

Erklärung über die Teilnahme an der Tierversuchskunde:

Die versuchstierkundliche Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Dok-

toranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gem. §9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde im Umfang von 40 Stunden mit Erfolg absolviert.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase-Chain-reaction, PCR) ermöglicht die Vervielfältigung einzelner DNA Abschnitte, durch enzymatische in vitro Amplifikation. Zwei spezifisch konstruierte Oligonukleotid- Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) mit vorgelagerten Restriktionsschnittstellen bilden durch Anlagerung an die DNA-Matrize (Template) die Ausgangspunkte der DNA-Synthese in 5′/3′-Richtung. Die Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase, amplifiziert die DNA-Matrize komplementär, beginnend am 3′ Ende eines Primers. Durch zyklische Wiederholung des Melting (Lösen der DNA-Doppelstränge des Templates), dem Annealing (Anlagerung eines Primers an einen DNA-Einzelstrang) und der anschließenden Elongation des komplementären DNA-Stranges, wird eine exponentielle Vermehrung des DNA-Templates ermöglicht.

Der PCR Ansatz erfolgt aus 0,1 µg DNA, 2 x 0,5 µl Primer, 5 µl 10 x PCR Puffer, 1 µl AccuPrime-Polymerase ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Der Ansatz wird im Thermocycler zunächst für 3 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend werden 25 Zyklen aus Melting (30 sec. bei 95 °C), Annealing (30 sec. bei 58 °C) und Elongation (72 °C) durchgeführt. Die Dauer der Amplifikation wird nach der Größe der DNA-Matrize gewählt, die verwendete AccuPrime-Polymerase amplifiziert 1 kBp/min.

Zur Größenkontrolle werden 5 µl des PCR-Produkts der Agarose-Gelelektrophorese unterzogen (s.u.). Das PCR-Produkt wird durch Phenolextraktion und anschließende Glycogenfällung gereinigt und konzentriert. 45 µl des PCR-Produktes werden mit 50 µl Phenol versetzt und anschließend für 5 min bei 20817 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird nacheinander mit 5 µl 3 M Natriumacetat, 150 µl Ethanol (100%) und 1 µl Glycogen vermischt, für mindestens 120 min bei -20 °C gefällt und anschließend für 15 min bei 20817 g zentrifugiert. Die Entsalzung des DNA-Pellet erfolgt durch wiederholtes waschen mit Ethanol (70 %). Das DNA-Pellet wird nach der Trocknung in ca. 150 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Ein Restriktionsenzymverdau, entsprechend der durch die eingesetzten Primer definierten DNA-Schnittstellen, wird vorgenommen. Der Restriktionsansatz aus 3 µl Puffer 10x, 10 U der Restriktionsendonukleasen, 0,4 µl BSA und 26 µl H<sub>2</sub>O wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die analytische Trennung erfolgt durch eine erneute Agarose-Gelelektrophorese mit 1,5 % Low-melting-Agarose für 30 min bei 85 V. Diese ermöglicht eine Extraktion der DNA aus der Agarose ohne Denaturierung durch ihren geringen Schmelzpunkt.

### 3.2.2 Site-directed Mutagenese

Zur Untersuchung des intrazellulären Signals werden zielgerichtete Basen-spezifische Mutationen mit Hilfe der Site-directed Mutagenese induziert, basierend auf der Arbeit von Hutchiso C.A. et al. [75] modifiziert nach dem Protokoll von Zheng L. et al. [76]. Grundlage dieser Methode ist die PCR sowie der Gebrauch zweier DNA Primer, die umgeben von zwei komplementären Arealen, ein nicht komplementäres Areal zur Matrize aufweist, welches Mutationen i.S. von Basenaustausch, Insertion und Deletion ermöglicht.

Ein 50 µl Standardansatz (50-100 ng Template, 0,4 µM Primer, 200 µM dNTPs, 2 U DNA Polymerase) wird der PCR unterzogen. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt durch Phenolextraktion. Anschließend wird ein Restriktionsenzymverdau und Ligation in einen geeigneten Vektor vorgenommen. Das Produkt wird nun in einen kompetenten Bakterienstamm transformiert. Die Erfolgskontrolle der Mutation wird durch die Selektion einzelner Bakterienstämme und Sequenzierung ermöglicht.

### 3.2.3 Ligation

Methodisches Ziel ist die enzymatische Verknüpfung kohäsiver DNA-Enden durch die T4-DNA-Ligase, welche eine Veresterung der 5'Phosphat und der 3'Hydroxy-Gruppe katalysiert. Die Ligation ermöglicht die Insertion von kodierenden DNA-Abschnitten (Insert) in Expressionsvektoren (Plasmide). Zunächst werden das gewünschte Insert und der Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, so dass komplementäre kohäsive DNA-Enden entstehen. Ein Restriktionsansatz aus 3 µl Puffer (10x), 10 U Restriktionsenzymen, 0,4 µl BSA und 26 µl H<sub>2</sub>O wird jeweils mit dem isolierten Insert und dem Vektor versetzt und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dem Restriktionsansatz des Vektors wird nach 150 min 10 U alkalische Phosphatase (CIAP) hinzugefügt, um einer Religation des Vektors vorzubeugen. Die Proben werden anschließend bei 85 V für 30 min in der Agarose-Gelelektrophorese mit 1,5 %iger Low-melting-Agarose aufgetrennt. Das gewünschte Insert und der Vektor werden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und bei 70 °C für 5 min geschmolzen. Eine Kontrollprobe, ohne Insert, wird aus 35 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl Puffer (10x), 160 U T4-DNA-Ligase und 2 µl des geschmolzenen Vektors angefertigt. Anschließend werden zur Integration des Inserts in den Vektor 21,2 µl der Kontrollprobe mit 4 µl des geschmolzenen Inserts versetzt und für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert.



### 3.2.4 Sequenzierung

Zum Ausschluss möglicher Mutationen oder Erfolgskontrolle einer Mutationsinduktion werden 15 µl Plasmid DNA, gelöst in ddH<sub>2</sub>O, in einer Konzentration von 50-100 ng/ µl mit 20 pmol des entsprechenden Primers versetzt. Im Auftrag wurde die Sequenzierung durch Eurofins MWG Operon durchgeführt.

Die Sequenzierung erfolgt maschinell durch Didesoxyribonukleosid-Triphosphat-Methode (Kettenabbruchmethode) nach Sanger et al. [77] in ABI 3730XL Sequenzierungsmaschinen.

Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTP) sind spezifische DNA-Polymerase-Inhibitoren, die einen Kettenabbruch des Matrizen-komplementären-Strangs induzieren durch die zusätzliche Dehydroxilierung des C'3 Kohlenstoffatoms der Ribose.

Die Matrize wird mit Fluoreszenz-Farbstoff modifizierten ddNTPs in einem Reaktionsansatz mit einem komplementären Primer der PCR unterzogen und linear amplifiziert. In der anschließenden Kapillarelektrophorese können die am Ende des DNA-Strangs, durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregten, ddNTPs optisch registriert werden. Das Farbsignal gibt nun, vom kleinsten zum größten DNA Strang, die Basenabfolge an (Chromatogramm).

### 3.2.5 Transformation/ Amplifikation

Transformation beschreibt die Nicht-virale DNA-Insertion in einen Mikroorganismus aus ihrer Umgebung. Die Fähigkeit einer Bakterienkultur rekombinante DNA-Plasmide aufzunehmen, kann durch natürliche Kompetenz vorhanden sein oder muss durch den Vorgang der Permeabilisierung ermöglicht werden; es entstehen sog. kompetente Bakterienstämme. Die transformierte DNA wird an die Tochterzellen vererbt. Die Amplifikation des rekombinanten DNA-Plasmids erfolgt v.a. in der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterienkultur. Im Anschluss kann die Plasmid DNA durch Lyse und Aufreinigung extrahiert und weiterverwendet werden.

Die Transformation und Amplifikation erfolgte mit *Escherichia coli* Kulturen der Genotypen MC1061 P3 (Ampicillin- und Tetracyclinresistenzinduktion) und MC1061 (Kanamycinresistenzinduktion). 50 µl der Bakteriensuspension werden mit 0,25 µg des zu amplifizierenden Plasmids vermischt, für 15 min bei 4 °C und anschließend 5 min bei 37 °C inkubiert. Die transformierten Bakterien werden auf einer 10 cm Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen und für 12- 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Resistenzinduktion durch das Plasmid ermöglicht das selektive Wachstum der transformierten Bakterien.

### 3.2.6 Minikultur

Zur Vermehrung der erfolgreich amplifizierten Plasmid-DNA werden größere Bakterienkulturen angelegt und innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Mit einer sterilen Pipettenspitze wird eine einzelne Kultur in 3 ml LB-Medium unter entsprechendem Antibiotikazusatz (MC1061P3 - Ampicillin/Tetracyclin, MC1061 - Ampicillin) resuspendiert. Diese Kultur wird bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator für 6- 12h inkubiert.

### 3.2.7 Maxikultur, Maxipräparation und Restriktionsenzymverdau

Zunächst wird ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium unter entsprechendem Antibiotikazusatz (MC1061P3-Ampicillin/Tetracyclin, MC1061-Ampicillin) befüllt. Anschließend werden 200 µl der Bakteriensuspension aus der Minikultur mit einer sterilen Pipettenspitze in die Maxikultur überführt und für 15 Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Im Anschluss kann die Maxipräparation erfolgen. Dafür werden die Bakterienkulturen zunächst in Zentrifugengefäße überführt und bei 4 °C für 15 min bei 4418 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterien-Pellet wird folgend nach dem Protokoll der Firma Qiagen (Maxi-Prep. Kit®) verarbeitet. Die aufgereinigten DNA-Pellets werden mit 200 µl HPLC-Wasser resuspendiert. Absorbtionsspektrometrisch werden die DNA-Pellets hinsichtlich DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren in Lösung), der Verunreinigung mit Polysacchariden (230 nm / 260 nm Ratio) und Proteinen (260 nm / 280 nm Ratio) untersucht. Die Stoffmengenkonzentration der absorbierenden DNA in der Lösungsflüssigkeit ergibt sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz. Die Prüfung der korrekten Amplifikation erfolgt mit Hilfe des Restriktionsenzymverdaus. Die Auftrennung der DNA Plasmide erfolgt durch den Zusatz von Restriktionsendonukleasen, mit einem geeignetem Puffer versetzt, in Vektor und Insert. Der Restriktionsansatz wird für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Proben und ein Größenmarker (Lambda DNA-BstEII-Verdau) werden anschließend in ein 1% Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und bei 85 mV für 20- 30 min gelelektrophoretisch getrennt. Die Beurteilung der korrekten Amplifikation wird unter UV-Licht durchgeführt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen einzelnen Basen der DNA und ermöglicht die floureszensoptische Größenkontrolle von Vektor und Insert im Vergleich zum Größenmarker.

### 3.2.8 Zellkultur

Im Rahmen der experimentellen Tätigkeit wurden HEK 293T, humane und murine Podozyten kultiviert. HEK 293T Zellen werden in 10 ml DMEM-Medium (mit 10 % Kälberserum) in 10cm Petrischalen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Subkultivierung wird das Nährmedium entfernt, die Petrischale mit 5 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin + Calcium für 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird in Abhängigkeit von der Zelldichte und Verwendungszweck eine 1:3 - 1:10 Passage durchgeführt.

Imortalisierte Humane und Murine Podozyten werden in 10 ml RPMI-Medium (mit 10 % FCS und 1 % ITS) bzw. 10ml RPMI-Medium (+10 % FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 100 U Interferon  $\gamma$ ) T75 Zellkulturflaschen bei 33 °C (Permissive Temperatur) und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein Wachstumarrest und die Expression von Oberflächenmarkern (Nephrin, Podocin, CD2AP u.a.) differenzierter *in vivo* Podozyten wird u.a. durch die Inkubation bei 37 °C und den Entzug von Interferon  $\gamma$  ermöglicht. Um einem Expressionsverlust von Nephrin in kultivierten Podozyten vorzubeugen erfolgt die Stimulation mit 100  $\mu$ M 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Vit. D<sub>3</sub>) für 12 - 14 Tage. Zur Subkultivierung wird das Medium entfernt, die T75 Zellkulturflasche mit 7 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin + Calcium für 3-5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Resuspension der Zellen erfolgt durch Zugabe von 7 ml der o.g. Medien und Überführung in ein 50 ml Eppendorf-Gefäß. Das Pelletieren der gelösten Zellen bei 621g für 4 min bei Raumtemperatur ermöglicht das Entfernen des Trypsins bei geringem Zellverlust. Anschließend werden die Zellen, nach absaugen des Trypsin-Medium-Gemischs, in 6ml Medium resuspendiert. In Abhängigkeit der Zelldichte wird eine 1:3- 1:5 Passage durchgeführt. Der Austausch des Mediums erfolgt alle 48 h. Am 12. - 14. Tag sind die Podozyten vollständig ausdifferenziert und können experimentell genutzt werden.

### 3.2.9 Transfektion

Am Folgetag der Subkultivierung werden die experimentell zu nutzenden Zellen mit Hilfe der Calcium-Phosphat Methode [78] der Transfektion unterzogen. Die Phagozytosefähigkeit von Calciumphosphat-Kristallen der HEK293T-Zellen wird genutzt, um kopräzipitierte DNA in die Zelle zu integrieren. 15  $\mu$ g DNA werden in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert. In einer sterilen Sicherheitswerkbank werden zunächst 500  $\mu$ l 0,25 M Calciumchlorid in die Eppendorf-Gefäße hinzugefügt und anschließend 500  $\mu$ l 2 x HEBS auf einem Vortexer hineingetropt. Eine gleichmäßige Verteilung der Suspension über das Kulturmedium der Zellen

folgt. Der Transfektionsstopp erfolgt nach 6-8 stündiger Inkubation durch den Austausch des Kulturmediums und entfernen des nicht phagozytierten Calciumphosphatkristall/DNA – Präzipitats. Der pEGFP Anteil des genutzten Angiotensin<sub>1</sub>-Rezeptor-Vektors ermöglicht die quantitative floureszenzoptische Erfolgskontrolle der Transfektion.

### **3.2.10 Zellstimulation**

Die Stimulation oder Inhibition eines Signalwegs der HEK293T mit Angiotensin II bzw. einem spezifischen Inhibitor wird in Abhängigkeit des zu untersuchenden Signalwegs durchgeführt. Zunächst wird die Menge des Kulturmediums auf 5 ml reduziert, um die einzusetzende Reagenzmenge zu reduzieren. Folgend wird aus jeder Petrischale 1 ml Medium entnommen, mit dem Stimulator bzw. Inhibitor in 5 ml Zielkonzentration versetzt und anschließend gleichmäßig auf die Petrischale verteilt. Das Zielvolumen der Kulturschale beträgt 5 ml Kulturmedium. Die Zellen werden nach einer Stimulationsdauer von 5-120 min geerntet.

### **3.2.11 Zellernte**

Die Kulturschalen werden nach Absaugen des Kulturmediums mit 6ml gekühltem PBS (4 °C) gewaschen. Die Zellen werden abgelöst und in ein vorgekühltes (4 °C) 5 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wird anschließend für 5 min bei 621 g und 4 °C zentrifugiert.

Das Zellpellet wird nach Entfernen des Überstands in 200-400 µl Triton-Lysis-Puffer resuspendiert und in ein vorgekühltes (4 °C) 1,5 ml Eppendorf-Gefäß zur Lyse überführt. Nach einer Inkubationsdauer von 15 min auf Eis folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 20817 g und 4 °C. Der proteinreiche Überstand wird erneut in ein vorgekühltes (4 °C) 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und steht der weiteren experimentellen Nutzung i.S. einer Co-Immunopräzipitation oder Lyse zur Verfügung.

### **3.2.12 Co- Immunopräzipitation**

Die Co-Immunopräzipitation dient dem indirekten Nachweis von relevanten Protein-Interaktionen unter folgender Nutzung von spezifischen-Antikörpern gegen präzipitierte Proteine. Für jeden Datenpunkt werden zwei 10 cm Petrischalen HEK293T verwendet. Die mit PBS geernteten Zellen werden mit 200-400 µl Triton-Lysis-Puffer lysiert, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 20817 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

10% des Überstandes werden jeweils als Lysat in ein weiteres 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, mit dergleichen Menge 2 x Lämmli versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. 90 % des Überstandes werden der Co-Immunopräzipitation zugeführt und mit 30 µl Protein-G-Sepharose versetzt. Die Protein-/Protein-G Suspension wird für 60 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Das Protein-G bindet an das sIg-Epitop eines transfizierten Zielproteins. Der Sepharose-Protein-Komplex wird anschließend durch Zentrifugation (955 g, 3 min, 4 °C) pelletiert. Die Aufreinigung und das Entfernen nicht präzipitierter Proteine erfolgt durch dreimaliges Waschen der Protein-Sepharose-Pellets mit 800 µl Triton-Lysis-Puffer. Der letzten Zentrifugation folgend wird der Lysis-Puffer-Überstand entfernt, das Protein-Sepharose-Pellet mit 30 µl 2x Lämmli versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben können nun der Gelelektrophorese und anschließend dem Western-Blot zugeführt werden.

### 3.2.13 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Methodisches Ziel ist die elektrophoretische Größentrennung der Proteine und Fixierung auf einer Nitrozellulose-Membran. Eine spezifische Antikörperbindungsreaktion ermöglicht anschließend die quantitative Analyse der Proteinexpression[79]. Die Denaturierung der Proben mit 2x Lämmli + Dithiothreitol (DTT) und Inkubation bei 95°C linearisiert das Protein zunächst in seiner Primärstruktur durch die Reduktion von Wasserstoff- und Disulfidbrückenbindungen. Das im Polyacrylamidgel enthaltene anionische Tensid SDS (Sodiumdodecylsulfat) bindet an Proteine und negativiert die Gesamtladung in Abhängigkeit der Proteingröße. Das elektrophoretische Laufverhalten wird auf die Größe des Proteins, entsprechend der negativen Gesamtladung des SDS, reduziert. 15 µl der IP-Proben und der Lysate werden auf das Gel geladen. Zunächst laufen die Proteine bei 70 V für 30 min im Sammelgel in Richtung Anode und werden lokal konzentriert. Die Größenauftrennung erfolgt anschließend im Trenngel bei 20 mA für 90 min. Nach Abschluss der Auftrennung erfolgt der elektrophoretische Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran im „Tank-Blot“-Verfahren[79]. Die Proteine werden durch die Anlage einer Spannung von 70 V für 90 min aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen [80].

Die Reduktion und Sättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen der Nitrozellulose wird durch die Inkubation mit BSA (5 % in Proteinwaschpuffer) über Nacht bei 4 °C oder 60 min bei 37 °C erzielt. Die Weiterverarbeitung erfolgt bei Raumtemperatur, die Inkubation mit Proteinwaschpuffer oder Antikörpern wird auf einem Schüttler mit 80 rpm bzw. mit 50 rpm

durchgeführt. Überschüssiges BSA wird durch intensives Waschen (3 x 5 min) mit Proteinwaschpuffer entfernt. Der Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 min folgt ein erneutes Waschen (3 x 5 min) mit Proteinwaschpuffer zur Entfernung ungebundener Antikörper. Anschließend folgen die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 60 min und ein letzter Waschschrift (3 x 5 min) mit Proteinwaschpuffer. Der Sekundärantikörper ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt (Kricka, 1993), das die Visualisierung der Antikörperbindung durch Katalyse einer Chemoluminiszenzreaktion ermöglicht. Zur Induktion der Chemoluminiszenzreaktion wird die Nitrozellulosemembran eine Minute in ECL-Lösung inkubiert. Die Lichtemission der Nitrozellulosemembran wird durch eine UV-sensitive CCD-Kamera aufgefangen und digital dargestellt

### 3.2.14 Biotin-Assay

Ziel dieser Methode ist es das Expressionsverhalten biotinylierter Oberflächenproteine zu untersuchen. Die kovalente Bindung von Biotin an Nephrin und die anschließende Streptavidin-Nachweisreaktion werden genutzt, um das mögliche Ausmaß einer Nephrinendozytose unter Angiotensinstimulation zu beurteilen. Für jeden Datenpunkt werden vier 10 cm Petrischalen HEK293T-Zellen verwendet. Zunächst werden die Petrischalen der HEK293T-Zellen mit 5 ml gekühltem PBS +  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  (4 °C) geerntet, in zwei 15 ml Falcon übertagen und für 5 min bei 621 g (4 °C) zentrifugiert. Die Zellpellets werden in 5 ml frischem und gekühltem PBS +  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  (4 °C) vorsichtig resuspendiert, in ein 15 ml Falcon überführt und erneut für 5 min bei 621 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet in 5ml gekühltem PBS +  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  + 20µl Biotinlösung resuspendiert. Anschließend wird das Falcon für 30 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler entlang seiner Längsachse inkubiert. Das an der Zelloberfläche exprimierte Nephrin bindet kovalent an Biotin. Ungebundenes Biotin wird durch dreimalige Wiederholung der folgenden Aufreinigung entfernt. Zunächst werden die Zellen für 3 min bei 621 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend in 5ml gekühltem PBS +  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  +Glycin resuspendiert. Die Zellsuspension wird für 20 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss der Aufreinigung und erneuter Zentrifugation für 3 min bei 238 g und 4 °C können die Zellen der Lyse unterzogen werden. Die Zelllyse erfolgt durch die Resuspension des Zellpellet in 500 µl Triton-Lysis-Puffer für 30 min bei 4 °C. Folgend werden die Proben für 30 min bei 20817 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand kann nun der Immunpräzipitation zugeführt werden. Überführt in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wird der Überstand mit 2,5 µl Anti-Nephrin-Ig versetzt und für 60 min bei 4 °C

auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss wird in jede Probe 30 µl Protein-A-Sepharose pipettiert und erneut für 60 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Aufreinigung und das Entfernen nicht präzipitierter Proteine erfolgt durch dreimaliges waschen der Protein-Sepharose-Pellets mit 800 µl Triton-Lysis-Puffer und anschließender Zentrifugation für 3 min bei 955 g und 4 °C. Der letzten Zentrifugation folgend wird der Lysis-Puffer-Überstand entfernt, das Protein-Sepharose-Pellet mit 30 µl 2x Lämmli versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

### 3.2.15 RNA Knockdown

Das Ziel des Einsatzes von Small interfering RNA (siRNA) ist es, durch selektives Ausschalten von mRNA oder ganzer Genabschnitte, grundlegende Erkenntnisse über Genfunktionen und Signalkaskaden zu erlangen. SiRNA liegt dabei als einzel- oder doppelsträngiger RNA Abschnitt vor und bildet mit Hilfe weiterer Proteine den sog. RNA-induzierenden Silencing-Komplex (RISC), welcher bei vollständiger Kongruenz zur Ziel-RNA, eine Endoribonuklease (Dicer, RNase-III-Familie) aktiviert, die die Ziel-RNA auftrennt [81]. Bei unvollständiger Kongruenz wird die Ziel-RNA lediglich gebunden, eine Proteinexpression kann dennoch nicht erfolgen.

Zunächst werden HEK293T-Zellen auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag der Transfektion werden diese in 4 ml VLE Dulbeccos MEM (1 g/l Glucose + 10% FBS) kultiviert, ein Mediumwechsel auf Dulbeccos MEM (4,5 g/l Glucose + 10 % FBS) erfolgt nach 24 h. Weitere 24 h später ist eine experimentelle Nutzung möglich.

Pro Datenpunkt wird ein 15 ml Gefäß vorbereitet, 2-4 µg Plasmid DNA, 100 pmol siRNA/ Kontroll-siRNA werden zunächst in 1x siRNA Puffer gelöst, hier beispielhaft dargestellt:

1. *Negativ-Kontrolle* (Plasmid DNA ohne Angiotensin II Stimulation)  
(1 µg CDM.sIg.Nephrin.cyt, 0,5 µg CDM.F.β-Arrestin2, 0,5 µg pEGFP.At1-Rezeptor ad 400 µl 1x siRNA Puffer)
2. *Positiv-Kontrolle* (Plasmid DNA, 60 min Angiotensin II Stimulation)  
(1 µg CDM.sIg.Nephrin.cyt, 0,5 µg CDM.F.β-Arrestin2, 0,5 µg pEGFP.At1-Rezeptor ad 400 µl 1x siRNA Puffer)
3. *Ziel siRNA* (siRNA-Galpa q, Plasmid DNA, 60 min Angiotensin II Stimulation)  
(20 µl siRNA, 1 µg CDM.sIg.Nephrin.cyt, 0,5 µg CDM.F.β-Arrestin2, 0,5 µg pEGFP.At1-Rezeptor ad 400 µl 1x siRNA Puffer)
4. *Negativ-Kontrolle Lipid* (60 min Angiotensin II Stimulation)

(400 µl 1x siRNA Puffer)

5. *Negativ-Kontrolle siRNA* (Kontroll-siRNA, Plasmid DNA, 60min Angiotensin II Stimulation)

(20 µl Kontroll-siRNA, 1 µg CDM.sIg.Nephrin.cyt, 0,5 µg CDM.F.β-Arrestin2, 0,5 µg pEGFP.At1-Rezeptor ad 400 µl 1x siRNA Puffer)

Das Gesamtvolumen jedes Datenpunktes beträgt nun 400 µl. Pro Datenpunkt werden 10 µl des Lipofektionsreagenz DharmaFECT Duo und 390 µl VLE Dulbecco's MEM (1 g/l Glucose, ohne FCS, ohne Antibiotikazusatz) in ein steriles 15 ml Tube pipettiert, vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 400 µl des Transfektionsansatzes in die vorbereiteten Probengefäße pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die siRNA und die Plasmide bilden während der Inkubationszeit Lipidkomplexe mit dem Lipofektionsreagenz, welche von den Zellen aufgenommen werden können. Zuletzt werden zu jeder Probe 3,2 ml VLE Dulbecco's MEM (1 g/l Glucose, + 10 % FCS, ohne Antibiotikazusatz) hinzugefügt, vermischt und die Zellen für 24 h mit dem Transfektionsansatz kultiviert. Nach der Zellernte erfolgt die quantitative Messung des Proteingehaltes mit Hilfe der BCA-Methode. Die Menge des Lysispuffers wird auf die maximale Proteinkonzentration bezogen. Die Proben werden der Co-Immunopräzipitation unterzogen, elektrophoretisch getrennt und auf Nitrozellulose übertragen.

### 3.2.16 Tierexperiment: isolierte Perfusion muriner Nieren

Zur Übertragung auf ein physiologisches Modell und Erweiterung der in vitro gewonnen Daten werden murine Nieren mit Angiotensin II stimuliert um ein mögliches Ausmaß der podozytären Nephrinendozytose -durch Isolation der Glomeruli- zu beurteilen.

Die operative Isolation, Perfusion der murinen Nieren und folgende Selektion der Glomeruli erfolgte nach Potthoff S. et al [82].

Die 3-8 Wochen alten männlichen Balb/C Mäuse werden zunächst durch einen Genickbruch getötet. Nach der Desinfektion des Abdomens, erfolgt ein vorsichtiger medianer Längsschnitt der Haut vom Becken bis zum Sternum. Die Haut wird von der abdominalen Muskelfaszie getrennt und lateral fixiert. Nach dem Wechsel des chirurgischen Bestecks wird die abdominale Muskelschicht median längs, von der Blase zum Xyphoid, und anschließend quer inziert. Die vier Muskellappen werden seitlich fixiert. Die viszerale Organe werden stumpf mit sterilen Wattestäbchen verdrängt. Nach der Fasziotomie der Aorta abdominales erfolgt die



Freipräparation von möglichem Fett und Bindegewebe. Eine Stichinzision in die Aorta abdominalis ermöglicht die folgende Perfusion mit gekühltem PBS (4°C). Anschließend kann die Perfusion mit Dynabeads zur Embolisierung und Isolierung der Nieren beginnen.

### **3.2.17 Tierexperiment: Isolierte Glomeruli**

Um spezifische Aussagen über podozytäre Proteinexpressionsveränderungen treffen zu können, müssen diese vor der Zellyse isoliert werden. Die isolierten murinen Nieren werden mit Dynabeads ( $1.2 \times 10^7$  beads/ml PBS), 4,5 µm großen magnetischen Kügelchen, perfundiert. Diese embolisieren das Glomerulum bei arterieller Perfusion und ermöglichen nach Zerkleinerung der Probe eine magnetische Isolation der Glomeruli.

Zunächst wird die PBS Perfusionslösung, der isoliert perfundierten Nieren, durch 5 ml Dynabead-Lösung (100-200 µl Dynabeads in 5 ml sterilen PBS) ersetzt. Nach vollständiger Perfusion wird die Zufuhr gestoppt, die Nieren aus der Fettkapsel entnommen und in ein steriles 15 ml Gefäß überführt. In einer Sterilbank erfolgt die manuelle Zerkleinerung der Nieren mit Hilfe einer sterilen Rasierklinge. Anschließend werden die Gewebeproben für 30 min bei 37 °C in einer Kollagenase-A-Lösung verdaut. Vor und nach dem Verdau werden die Proben vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette vermischt. Die Trennung des unverdauten Gewebes wird durch zweimalige Filterung in einem 100 µm Zellsieb mit sterilem PBS erzielt. Die Proben werden nun 5 min bei 621 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml sterilen PBS auf einem Vortexmischer resuspendiert. Mit Hilfe eines Magneten werden die magnetischen embolisierten Glomeruli am Boden des 2 ml Eppendorf-Gefäßes selektioniert. Ohne das Gefäß vom Magnetfänger zu entfernen, wird der Überstand nach einer Dauer von einer Minute, bis auf 250 µl, entfernt und auf Reste von Tubuli kontrolliert (s.u.).

Das Waschen der Probe erfolgt durch hinzufügen von 1,25 ml sterilem PBS, vorsichtigem Vermischen mit einer 1000 µl Pipette und dem Vortexer. Anschließend verbleibt die Probe erneut für eine Minute auf dem Magnetfänger. Dieser Waschschrift wird solange wiederholt, bis der mikroskopische Gehalt an Glomeruli höher als 95 % bzw. der Gehalt an Tubuli kleiner 5 % ist. Zur Evaluation des Gehalts an Glomeruli wird die Probe in 1ml sterilem PBS verdünnt und jeweils 10 µl mikroskopisch auf die Anzahl der Glomeruli ausgezählt. Ist die Endkonzentration hoch genug können die Isolierten Glomeruli der Lyse unterzogen werden und hinsichtlich der Nephriexpression untersucht werden. Die Stimulation der Isolierten Glomeruli mit 1 µM Angiotensin II wurde zuletzt in RPMI Medium für 60 min bei 37 °C durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Angiotensin-II-induzierte Verstärkung der Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion.

Zur Untersuchung des Einflusses von Angiotensin II auf die Nephринexpression, die konsekutive Nephринendozytose und die Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin2, wurde ein Überexpressionsmodell mit HEK293T Zellen gewählt. HEK293T-Zellen wurden mit Nephрин,  $\beta$ -Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. Nach einer 5, 10, 15, 30 und 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgten die Zellyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti-Flag-Antikörper wurde zum Nachweis, des an Nephрин präzipitierten F. $\beta$ -Arrestin2, eingesetzt.

Abb. 4 zeigt das Ergebnis der Co-Immunopräzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 und Nephрин unter der Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II. Die in Anti-Flag-Antikörper inkubierten Membranen zeigen im zeitkinetischen Verlauf eine zunehmend starke Expression des an Nephрин präzipitierten  $\beta$ -Arrestin2 bei gleichwertiger Proteinexpression in den Zellysaten. Das Maximum der Nephрин- $\beta$ -Arrestin2 Interaktionsverstärkung ist nach einer 60 minütigen Inkubation mit Ang II zu beobachten.

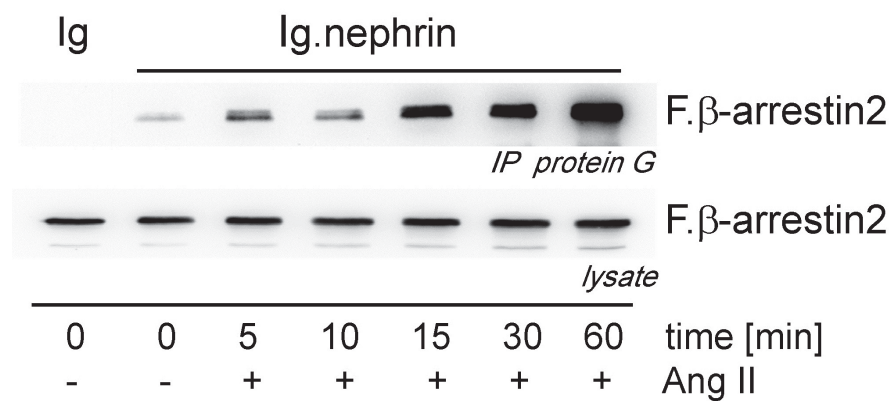


Abbildung 4: Angiotensin II verstärkt die Nephрин- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion zeitabhängig.

HEK293T-Zellen wurden mit dem cytoplasmatischen N-terminal sIg. markierten Nephрин (Ig.Nephрин), dem N-Terminal Flag markierten  $\beta$ -Arrestin2 (F. $\beta$ -Arrestin2) und einem fluoreszierenden AT<sub>1</sub>-Rezeptor (pEGFP.AT<sub>1</sub>-Rezeptor) kotransfiziert. Die Kontrolle wurde mit dem Nephрин-Leervektor (CDM.sIg) durchgeführt. Am Versuchstag erfolgte die Stimulation mit jeweils 1  $\mu$ M Angiotensin II zu den Zeitpunkten 60 min, 30 min, 15 min, 10 min, 5 min vor und unmittelbar zum Zeitpunkt der Zellernte. Die lysierten Zellen wurden der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) mit Protein-G-Sepharose zugeführt. Im Anschluss

erfolgten eine SDS-Page-Gelelektrophorese und ein Western-Blot mit einem Flag Antikörper. Mit zunehmender Angiotensin-II-Stimulationsdauer steigt die Präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephtrin bis auf ein Maximum bei 60 Minuten, um den Faktor 2,5 (n=12).

## 4.2 Signaltransduktion des Angiotensin-II-Effekts.

### 4.2.1 Die heterotrimeren G-Proteine sind für die Signaltransduktion der Angiotensin II vermittelten Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktionsverstärkung entscheidend.

Zur Differenzierung des verantwortlichen Signals des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors auf die verstärkte Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2 Präzipitation wurde eine Rezeptormutante erstellt. Die vollständige Signaltransduktion aller heterotrimeren G-Proteine bedarf mindestens des Erhalts der c-terminalen Aminosäuresequenz bis zur Position 317 von 359 Aminosäuren des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors [83, 84]. Die Restriktion des C-Terminus auf Position 319 ermöglicht die undifferenzierte Untersuchung der heterotrimeren G-Proteine G<sub>q</sub>, G<sub>i</sub> und G<sub>s</sub> unter Ausschaltung weiterer intrazellulärer Signaltransduktion. Mit Hilfe eines Primerpaares (forward Primer CGCGGGAAGCTTatggcccttaactctc reverse Primer GCGGGGGCGGCCCGCCcaatatttcaggagctgg) wurde die DNA des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors innerhalb einer PCR auf das codierende Triplet der Aminosäure 319 limitiert. Nach Verdau mit HindI/Not erfolgte die Isolierung des gewünschten PCR-Produkts und Clonierung in den .pEGFP-Vektor und die Transformation in chemisch kompetente Bakterien. Die Kontrolle des PCR-Produkts erfolgte durch Sequenzierung.

Die Koftransfektion von Nephtrin (CDM.sIg.Nephtrin.cyt),  $\beta$ -Arrestin2 (CDM.F. $\beta$ -Arrestin2), dem c-Terminal unlimitierten AT<sub>1A</sub>-Rezeptor (pEGFP.AT1-Rezeptor) bzw. dem c-Terminal limitierten AT<sub>1A</sub>-Rezeptor (Vektor.AT1-Rezeptor $\Delta$ 319) erfolgte in HEK293T-Zellen. Die Negativkontrolle wurde mit dem Nephtrin Leervektor (CDM.sIg) durchgeführt. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II wurden die Zellen geerntet, lysiert und einer Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose unterzogen. Nach elektrophoretischer Auftrennung von Proben und Lysaten und anschließendem Western-Blot wurden die Nitrozellulosemembranen mit einem Anti-Flag-Antikörper immungefärbt.

Das Resultat der isolierten Signaltransduktion der heterotrimeren G-Proteine unter Restriktion der Aminosäuresequenz des AT<sub>1A</sub>-Rezeptors an Position 319 wird folgend dargestellt (Abb. 5). In der Positivkontrolle gelingt der verstärkte Nachweis von an Nephtrin präzipitiertem  $\beta$ -Arrestin2 unter der Stimulation mit Angiotensin II. Auch unter der Verwendung des c-

terminal limitierten AT<sub>1A</sub>-Rezeptors ist die verstärkte Interaktion zwischen Nephrin und  $\beta$ -Arrestin2 unter der Angiotensin-II-Stimulation zu beobachten. Das Ergebnis zeigt, dass die Signaltransduktion der heterotrimeren G-Proteine relevant für die Vermittlung des Angiotensin-II-Effekts ist.

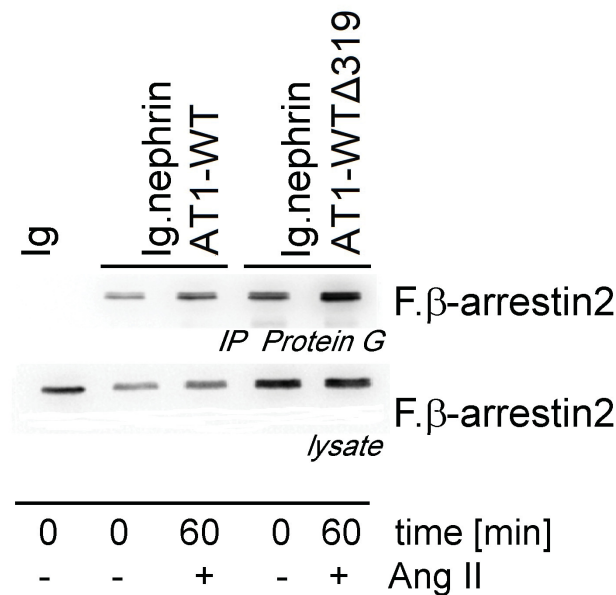


Abbildung 5: Die c-terminale Restriktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors auf das Signal der heterotrimeren-G-Proteine hat keinen Einfluss auf den Angiotensin-II-Effekt.

HEK293T-Zellen wurden mit Ig.Nephrin, F.β-Arrestin2, dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor bzw. der am c-Terminus an Position 319 restringierten AT<sub>1</sub>-Rezeptormutante kotransfiziert. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgten die Zellyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti.Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt. Die Einschränkung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Signal-transduktion der heterotrimeren-G-Proteine unter Restriktion des C-Terminus auf die Aminosäure 319 hat keinen Einfluss auf den Angiotensin-II-Effekt. Eine verstärkte Präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin erfolgt in beiden Versuchsansätzen um den Faktor 1,7. Innerhalb jedes Datenpunktes zeigt sich annähernd eine gleiche Proteinexpression in den Lysaten. Folgernd sollten die heterotrimeren-G-Proteine relevant für die Vermittlung der gesteigerten Interaktion von Nephrin und  $\beta$ -Arrestin2 sein (n=3).

#### 4.2.2 Das Galpha q Protein ist für die Signaltransduktion des Angiotensin-II-Effekts verantwortlich.

Zur Untersuchung des Signalweges der heterotrimeren G-Proteine und ihrer Wirkung auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion wurden verschiedene Rezeptormutanten und Inhibitoren der zytoplasmatischen Signale in Voruntersuchungen durch Herrn Martin Rütze eingesetzt.

In unveröffentlichten Voruntersuchungen (Königshausen E. et al.) konnte bereits dargestellt

werden, dass die kompetitiven AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Candesartan und Irbesartan die verstärkte Nephrin-β-Arrestin2-Interaktion aufheben. Zur weiteren Differenzierung des verantwortlichen intrazellulären Signals wurden zunächst drei Ansätze verfolgt: das G-Protein-Signal (G<sub>q</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>s</sub>), die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und die Phospholipase C (PLC).

Das gesamte G<sub>q</sub>-Protein-Signal des Rezeptors wurde unter Verwendung einer bekannten Doppel-Mutationsvariante des AT<sub>1</sub>-Rezeptors (pEGFP-AT<sub>1</sub>-Rezeptor D125A R126L) ausgeschaltet. Diese Doppelmutation verhindert den GTP-GDP Austausch am heterotrimeren G<sub>q</sub>-Protein, wodurch die Dissoziation der α-Untereinheit von der βγ-Untereinheit unterbunden wird [85]. Eine weitere Aktivierung z.B. des IP<sub>3</sub>/DAG-Signals wird verhindert. Eine deutliche Abschwächung des Bindungsverhaltens zwischen Nephrin und β-Arrestin2 konnte bei gleichzeitiger Stimulation mit Angiotensin II beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das G<sub>q</sub>-Protein-Signal des AT<sub>1</sub>-Rezeptors essentiell für den Angiotensin-II-Effekt ist.

Weitere unveröffentlichte Voruntersuchungen durch Rütze M. zeigen, dass die selektive Inhibition des G<sub>i</sub>-Proteins mit Pertussistoxin (PTX) keine Bindungsveränderung zwischen Nephrin und β-Arrestin2 hervorruft, unter Stimulation mit 1 μM Angiotensin II.

Auch die Inhibition der Phosphoinositid-3-Kinasen mit Ly294002 zeigt eine unverändert hohe Präzipitation von β-Arrestin2 an Nephrin unter der Stimulation mit 1 μM Angiotensin II.

#### **4.2.3 Der RNA-Knockdown des Galpha-q-Proteins verhindert die Angiotensin- II-Signaltransduktion auf die Nephrin-β-Arrestin2 Interaktion.**

Zur weiteren Differenzierung des Signalwegs und Bestätigung des Galpha-q-Protein abhängigen Signalkaskade erfolgte der siRNA abhängige RNA-Knockdown des Galpha-q-Proteins. Eine sog. small-interfering-RNA bildet bei vollständiger Kongruenz zur Galpha-q-RNA-Matrize einen RNA-Induzierenden-Silencing-Komplex und aktiviert eine Endoribonuklease, die durch Zerschneiden der mRNA die Expression des Galpha q Proteins verhindert. Zunächst erfolgt die Kotransfektion von Nephrin, β-Arrestin2, dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor und der Ziel-siRNA in HEK293T-Zellen mit Hilfe von DharmaFect Duo, einem Lipidkomplexbildner [86]. Die Positivkontrolle wurde ohne target-siRNA transfiziert. Eine Negativkontrolle erfolgte mit einer synthetisch hergestellten Kontroll-siRNA, die keine Bindungsmöglichkeit zu allen bekannten Säugetiergenen besitzt. Eine weitere Negativkontrolle enthielt lediglich das Lipofektionsreagenz DharmeFect Duo, um mögliche Einflussmöglichkeiten der Lipidkomplexbildung zur Transfektion auszuschließen. Die Zielprobe, die Positiv- und Negativkontrollen wurden 24 h nach der Transfektion mit 1 μM Angiotensin II stimuliert. Nach der

Zellernte erfolgten die quantitative Messung des Proteingehalts mit Hilfe der BCA-Methode und ein Konzentrationsangleich durch Verdünnung. Anschließend wurden die Proben der Co-Immunopräzipitation mit Protein G unterzogen. Die elektrophoretische Auftrennung und ein Western-Blot folgten. Zuletzt wurden die Proben gegen Flag bzw. die Lysate gegen Flag, Galpha q, Nephrin und Actin gefärbt.

Die siRNA abhängige Ausschaltung des Galpha-q-Proteins wird folgend dargestellt (Abb. 6). Die Positivkontrolle zeigt zunächst die bereits bekannte Angiotensin II induzierte Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktionsverstärkung bei gleicher Expression für Nephrin in den transfizierten Proben. Diese Interaktionverstärkung wird unter G alpha-q-RNA-Knockdown mit einer siRNA auf ein Normalniveau herab reguliert. Die Lipidkontrolle ohne Plasmid DNA zeigt entsprechend kein präzipitiertes Nephrin oder  $\beta$ -Arrestin II. Eine weitere Negativkontrolle mit der Kontroll-siRNA zeigt keine Verstärkung der Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion unter der Stimulation mit Angiotensin II.

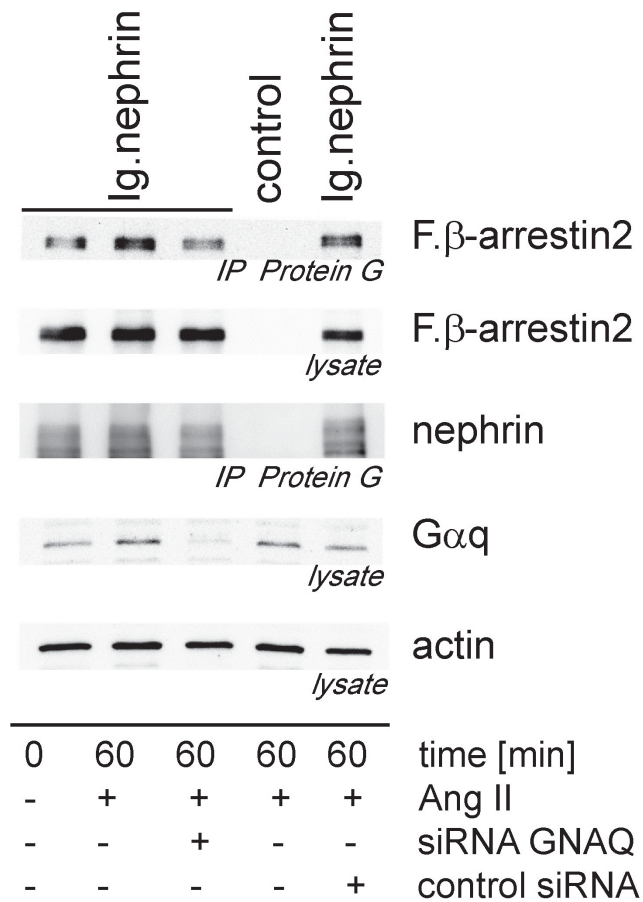


Abbildung 6: Der siRNA Knockdown des Galpha-q-Proteins inhibiert den Angiotensin-II-Effekt auf die Interaktion von Nephrin mit  $\beta$ -Arrestin2.

HEK293T-Zellen wurden mit sIg.Nephrin, F. $\beta$ -Arrestin2, dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor, einer siRNA des Galpha-q-Proteins (siRNA GNAQ) und einer Kontroll-siRNA (control-siRNA) kotransfiziert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert, der Proteingehalt mit der BCA-Methode gemessen und durch Verdünnung angepasst. Anschließend wurde eine Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose, eine SDS-Page-Gelelektrophorese sowie ein Western-Blot durchgeführt. Die Nitrozellulosemembranen wurden in einem Anti-Flag-, Anti-Galpha q-, Anti-Nephrin- und Anti-Actin Antikörper immungefärbt. Unter der Wirkung der spezifischen Ziel-siRNA (siRNA GNAQ) für die mRNA des Galpha-q-Proteins wird die unter Angiotensin-II-induzierte Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion abgeschwächt. Dies verdeutlicht die zwingende Anwesenheit Galpha-q-Proteins für die Signaltransduktion des Angiotensin II induzierten Effektes. Die untransfizierte Kontrollprobe zeigt keinen Nachweis von präzipitiertem  $\beta$ -Arrestin2. Die Kontroll-siRNA hat keinen Einfluss auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Bindungsstärke.

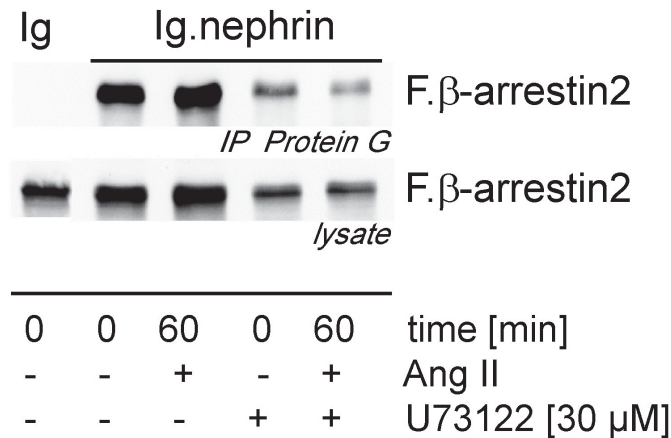
#### 4.2.4 Die Phospholipase C reguliert die Angiotensin II vermittelte Nephren- $\beta$ -Arrestin2 Bindungsstärke.

Ein wichtiger Mechanismus der Signaltransduktion des AT<sub>1</sub>-Rezeptors ist die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch kleine G-Proteine und die folgende Hydrolyse von Phosphatidylinositol (PPI)[87, 88] [89]. Durch die Inhibition der Phospholipase C mit U73122 wurde zunächst versucht die Frage der Relevanz des Enzyms für die Signaltransduktion des Angiotensin-II-Effekts zu beantworten. U73122 hemmt als unspezifischer Agonist der Phospholipase C, Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und Phospholipase D (PLD) (John E. Bleasdale et al., Neuroprotocols, 1992) die Hydrolyse von Phosphatidylinositol zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) sowie die Bindung von Galpha q an die Phospholipasen.

Zunächst wurden HEK293T-Zellen mit sIg.Nephren.cyt, CDM.F. $\beta$ -Arrestin2, und pEGFP.AT1-Rezeptor kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde erneut der Leervektor CDM.sIg eingesetzt. 120 min vor der Zellernte erfolgte die Inhibition mit 30  $\mu$ M U73122, 60 min später die Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II. Die HEK293T Zellen wurden folgend geerntet, lysiert und einer Ko-Immunopräzipitation mit Protein G unterzogen. Die elektrophoretische Auftrennung und Western-Blot folgten. Anschließend wurde eine Immunfärbung der Proben und Lysate gegen Flag bzw. gegen Nephren durchgeführt.

Das Ergebnis der in-vitro-Inhibition der Phospholipase C mit 30  $\mu$ M U73122 wird folgend dargestellt (Abb. 7). Die Positivkontrolle weist erneut eine Interaktionsverstärkung von Nephren und  $\beta$ -Arrestin2 -unter Stimulation mit Angiotensin II- auf. Unter der Inhibition der Phospholipase C wird die Nachweisreaktion des an Nephren präzipitierten  $\beta$ -Arrestin2 signifikant reduziert.





**Abbildung 7: Die Inhibition der PLC führt zum Verlust des Angiotensin-II-Effekts.**

HEK293T-Zellen wurden mit sIg.Nephrin, F.β-Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. 120 min vor der Zellernte erfolgte die Inhibition der Phospholipase C mit 30 μM U73122 bzw. DMSO. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1 μM Angiotensin II erfolgten die Zellyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti.Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt. Die Inhibition der Phospholipase C reduziert die Präzipitation von β-Arrestin2 an Nephrin unter der Stimulation mit Angiotensin II und ist damit essentiell für die Signaltransduktion des Angiotensin-II-Effekts. Innerhalb der Datenpunkte mit/ohne Inhibitor zeigt sich eine gleiche Proteinexpression in den Zelllysaten (n=3).

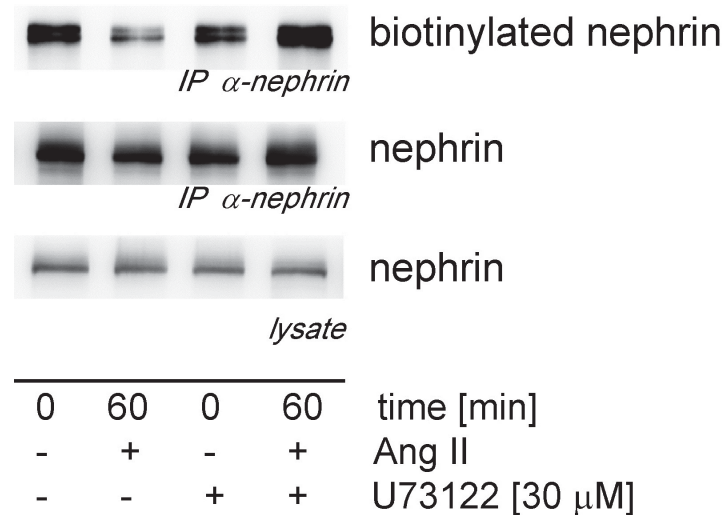
#### 4.2.5 Die Inhibition der Phospholipase C vermindert die Nephrinendozytose nach Angiotensin II Stimulation.

Neben der Beurteilung des Bindungsverhaltens zwischen Nephrin und β-Arrestin2 unter Stimulation mit Angiotensin II ist vor allem die Beurteilung des Oberflächenexpressionsverhaltens von Nephrin relevant, um mögliche Aussagen über die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion des glomerulären Filters zu treffen. Die Frage, ob die Inhibition der Phospholipase C eine Veränderung des Expressionsverhaltens von Nephrin auf der Zelloberfläche unter gleichzeitiger Angiotensin-II-Stimulation bewirkt, wurde mit Hilfe eines Biotin-Assay untersucht. Biotin markiert durch die Ausbildung kovalenter Bindungen alle an der Zelloberfläche exprimierten Proteine. Die isolierte Betrachtung der Nephrinfraktion gelingt durch die folgende Immunopräzipitation. Der Immunnachweis des biotynilierten Nephrin wurde mit Streptavidin durchgeführt.

Zunächst wurden die zu vergleichenden Zellproben mit Nephrin (CDM.sIg.Nephrin.WT), β-Arrestin2 (CDM.F.β-Arrestin2) und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor (pEGFP.AT1-Rezeptor) kotransfiziert, 60 min in DMSO bzw. 30 μM U73122 inkubiert und anschließend jeweils die Hälfte

des Probenmaterials der Datenpunkte für 60 min mit 1  $\mu\text{M}$  Angiotensin II stimuliert. Folgend wurden die Oberflächenproteine biotinyliert, nicht adhäsives Biotin wurde durch wiederholtes waschen mit PBS entfernt. Nach der Zellyse wurde Nephrin immunopräzipitiert. Es folgten die elektrophoretische Auftrennung und ein Western-Blot. Zuletzt wurde eine Immunfärbung der Lysate und der immunpräzipitierten Proben gegen das gesamte in der Probe enthaltene Nephrin (Anti-Nephrin-Antikörper) und gegen das an der Zelloberfläche exprimierte biotinylierte Nephrin (Streptavidin) durchgeführt.

Abb. 8 zeigt das Ergebnis des Biotin-Assay unter Inhibition der Phospholipase C. Unter der Stimulation mit Angiotensin II ist die deutliche Reduktion des an der Zelloberfläche biotinylierten Nephrin, im Vergleich zur unstimulierten Probe, zu beobachten. Die Inhibition der Phospholipase C mit U73122 negiert die Endozytose von biotinyliertem Nephrin unter der Stimulation mit Angiotensin II. Die Gesamtexpression von Nephrin (un-/biotinyliert) ist in allen Proben als gleichwertig zu betrachten.



**Abbildung 8:** Angiotensin II bewirkt eine Endozytose des an der Zelloberfläche exprimierten Nephrin, die Inhibition der Phospholipase C negiert die Endozytose.

HEK293T-Zellen wurden mit Ig.Nephrin und dem  $\text{AT}_1$ -Rezeptor kotransfiziert. 120 min vor der Zellernte erfolgte die Inhibition der Phospholipase C mit 30  $\mu\text{M}$  U73122 bzw. DMSO. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Angiotensin II wurde Biotin hinzugefügt, welches oberflächlich exprimiertes Nephrin kovalent bindet, erfolgt die Zellyse und anschließende die Immunopräzipitation mit einem Anti-Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Die Nachweisreaktion des biotinylierten Nephrin wurde mit Streptavidin durchgeführt, weitere Immunfärbungen folgten mit einem Anti-Nephrin-Antikörper. Die Stimulation mit Angiotensin II führt ohne den Inhibitor zu einer reduzierten biotinylierung des an der Zelloberfläche exprimierten

Nephrin, was einer verstärkten Endozytose gleichzusetzen ist. Unter der Inhibition der Phospholipase C mit U73122 zeigt sich eine verstärkte Biotinylierung des an der Zelloberfläche exprimierten Nephrin. Nephrin verbleibt somit vermehrt an der Zelloberfläche. Die Inhibition der Phospholipase C negiert die unter Angiotensin II auftretende verstärkte Endozytose von biotinyliertem Nephrin. Sowohl die Expression des präzipitierten Nephrin, als auch die Proteinexpression in den Lysaten ist gleichwertig. Die Phospholipase C ist essentiell für die Signaltransduktion des Angiotensin-II-Effekts und der folgenden Endozytose von Nephrin (n=3).

#### 4.2.6 Mek1 reguliert die Angiotensin-II-abhängige Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion.

Die Aktivierung der Phospholipase C ist essentiell für die Signaltransduktion der Angiotensin-II-Wirkung auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion. Die aktivierte Phospholipase C  $\gamma$  spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die *second-messenger* Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). Diacylglycerin ist in der Lage, über Aktivierung der Proteinkinase C eine Queraktivierung der MAP-Kinase RAF<sub>1</sub> durch Phosphorylierung hervorzurufen [90] [91]. RAF<sub>1</sub> aktiviert durch Phosphorylierung u.a. MEK1 (Multienzymkomplex1) [92], dass durch Phosphorylierung von Serin, Threonin oder Tyrosin eines Thr-X-Tyr-Motivs verschiedene weitere Kinasen, u.a. ERK<sub>1/2</sub>, aktiviert [93] [94]. Als Phosphorylierungsziele von ERK<sub>1/2</sub> konnten Serin/Threonin-Kinasen und Transkriptionsfaktoren identifiziert werden [95, 96]. Die direkte Rezeptor-assoziierte Aktivierung der MAP-Kinasen (*mitogen-activated-protein-Kinase*) durch das G-Protein G $\beta\gamma$  über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) konnte in Vorversuchen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 ausgeschlossen werden.

Ob die Aktivität bzw. eine mögliche Queraktivierung der MAP-Kinasen Relevanz für die Signaltransduktion der Angiotensin-II-Wirkung besitzt, wurde mit Hilfe des MEK1-Inhibitors U0126 untersucht. HEK293T-Zellen wurden mit Nephrin (CDM.sIg.Nephrin.cyt),  $\beta$ -Arrestin2 (CDM.F. $\beta$ -Arrestin2) und dem AT1-Rezeptor (pEGFP.AT1-Rezeptor) kotransfiziert. Die Negativkontrolle wurde mit dem Nephrin Leervektor (CDM.sIg.) durchgeführt. 120 min vor der Zellernte wurden jeweils 30  $\mu$ M U0126 in den Kulturschalen gelöst, 60 min vor der Zellernte erfolgte die Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und der Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose unterzogen. Anschließend wurden die Proben und Lysate elektrophoretisch getrennt, geblottet und mit einem Anti-Flag-Antikörper immungefärbt.

Die Auswirkung der MEK1-Inhibition mit U0126 auf die Angiotensin-II-abhängige Präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin wird in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb.9). In der

Positivkontrolle kann der bekannte Angiotensin-II-Effekt auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion beobachtet werden. Die Proteinexpression in den Lysaten ist annähernd gleichwertig. Unter der Inhibition von MEK1 mit U0126 und folgender Stimulation mit Angiotensin II zeigt sich ein Verlust der Bindungsverstärkung von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin.

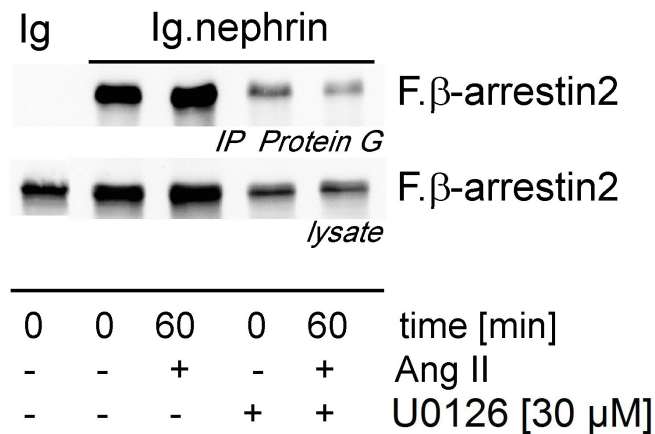


Abbildung 9: Die Inhibition von MEK1 mit U0126 führt zum Verlust des Angiotensin-II-Effekts.

HEK293T-Zellen wurden mit sIg.Nephrin, F.β-Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. 120 Minuten vor der Zellernte erfolgte die Inhibition von MEK1 mit 30  $\mu$ M U0126 bzw. DMSO. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgten die Zelllyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti-Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt. Die Negativkontrolle zeigt keine Bindungsfähigkeit von  $\beta$ -Arrestin2. In der Positivkontrolle ist unter der Angiotensin-II-Wirkung die verstärkte Präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin zu beobachten. Die Inhibition der MAP-Kinase MEK1 mit U0126 führt zu einem Verlust der Angiotensin-II-induzierten Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion. Die Proteinexpression von  $\beta$ -Arrestin2 ist innerhalb der beiden Datenpunkte gleichwertig (n=3).

## 4.3 Die posttranslationale Modifikation von Nephrin

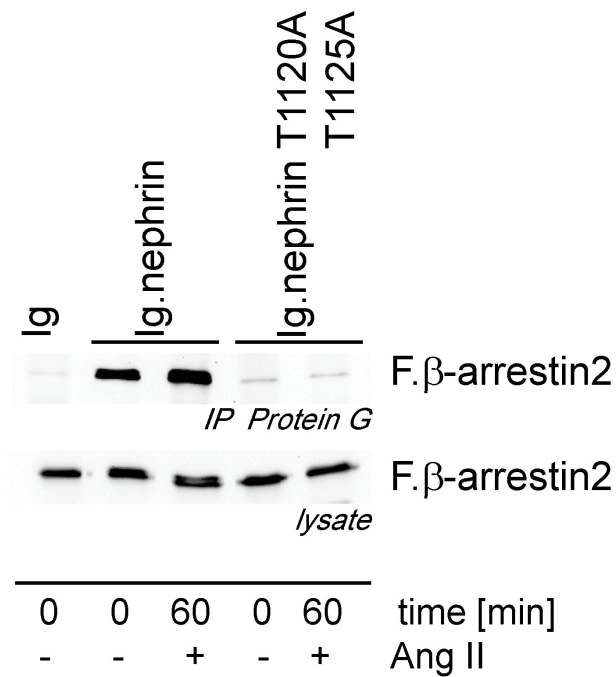
### 4.3.1 Die posttranslationale Modifikation von Nephrin an Position 1120 und 1125 ist relevant für die Wirkung von Angiotensin II.

Um Regulationsstellen für eine posttranslationale Veränderung i.S. einer De-/Phosphorylierung am Protein Nephrin zu finden, wurde zunächst ein Softwarebasiertes Screening mit Hilfe von *NetPhos 2.0* durchgeführt. Zwei relevante Zielstrukturen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C  $\alpha$  konnten u.a. im Threonin an Position 1120 und 1125 identifiziert werden [97]. Die Phosphorylierung dieser Strukturen ist Voraussetzung für

die  $\beta$ -Arrestin2-Bindung an Nephtrin im Rahmen einer in vitro Hyperglykämie.

Ob eine posttranslationale Modifikation dieser beiden Phosphorylierungsmotive auch für die Wirkung von Angiotensin II relevant ist, wurde zunächst mit Hilfe der Doppelmutation des Threonin an Position 1120 und 1125 von Nephtrin (CDM.sIg.NephtrinT1120A T1125A) untersucht. Beide Phosphorylierungsmotive wurden durch den Ersatz von Threonin durch Alanin unter Erzeugung einer Punktmutation ausgeschaltet. HEK293T Zellen wurden mit CDM.sIg.Nephtrin.cyt. bzw CDM.sIg.NephtrinT1120AT1125A, CDM.F. $\beta$ -Arrestin2 und pEGFP.AT1-Rezeptor ko-transfiziert. Die Negativkontrolle erfolgte mit dem Nephtrin-Leervektor. 60 Minuten vor der Zellernte erfolgte die Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II. Die Zellproben wurden einer Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose unterzogen, anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Anti-Flag-Antikörper immungefärbt

Das Ergebnis der Phosphorylierungsstudie der Phosphorylierungsmotive Thr<sub>1120</sub> und Thr<sub>1125</sub> wird in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 10). In der Positivkontrolle mit Nephtrin.cyt. zeigt sich nach 60-minütiger Stimulation mit Angiotensin II eine verstärkte Präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephtrin. Unter Ausschaltung der beiden Phosphorylierungsmotive in der Doppelmutante des Nephtrinproteins Nephtrin.T1120A T1125A zeigen sich ein insgesamt verringerter Nachweis von  $\beta$ -Arrestin2 und keine verstärkte Interaktion zwischen Nephtrin und  $\beta$ -Arrestin2 unter der Stimulation mit Angiotensin II. Die posttranslationale Modifikation von Nephtrin Thr<sub>1120/1125</sub> ist relevant für die Bindung zwischen Nephtrin und  $\beta$ -Arrestin2, jedoch nicht für die Modulation des Angiotensin-II-Effektes auf die Interaktion zwischen Nephtrin mit  $\beta$ -Arrestin2.



**Abbildung 10:** Der Verlust des Phosphorylierungsmotiv Nephtrin THR1120/THR1125 verhindert die Bindung von  $\beta$ -Arrestin2.

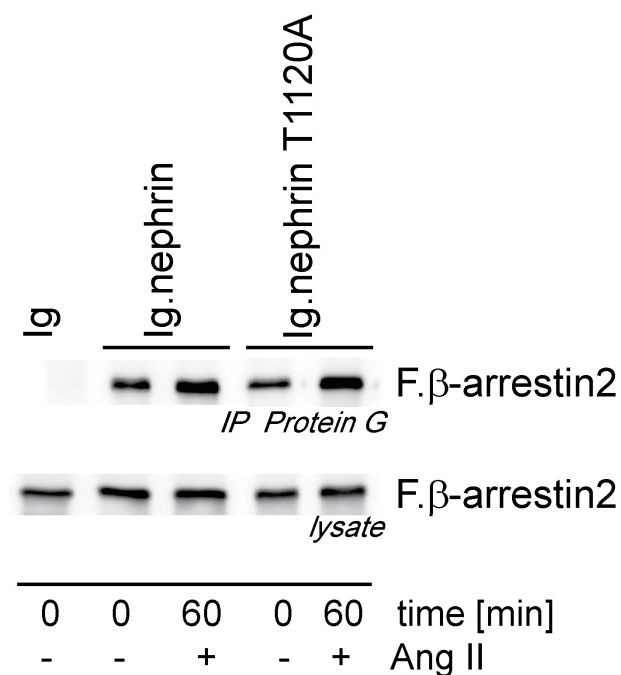
HEK293T-Zellen wurden mit der Doppelmutante sIg.NephtrinT1120AT1125A, F.β-Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgten die Zellyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti-Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt. Die Negativkontrolle mit dem Leervektor zeigt keinen Präzipitationsnachweis von  $\beta$ -Arrestin2. In der Positivkontrolle ist sowohl eine Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2-Bindung, als auch eine Bindungsverstärkung unter der Stimulation mit Angiotensin II zu beobachten. Eine Ausschaltung der beiden Motive durch Punktmutation von Threonin zu Alanin führt nahezu zum Verlust der Bindungsfähigkeit von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephtrin. Die posttranslationale Modifikation von Nephtrin an den beiden Phosphorylierungsmotiven Thr<sub>1120</sub> und Thr<sub>1125</sub> ist essentiell für die Bindung von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephtrin (n=3).

#### 4.3.2 Die posttranslationale Modifikation von Nephtrin am Threonin<sub>1120</sub> hat keinen Einfluss auf den Angiotensin-II-Effekt.

Zur Differenzierung der Relevanz der beiden Phosphorylierungsmotive Threonin<sub>1120</sub> und Threonin<sub>1125</sub> für die Wirkung von Angiotensin II auf die Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion wurden Einzelmutanten (CDM.sIg.Nephtrin T1120A, CDM.sIg.Nephtrin T1125A) dieser Motive genutzt [97]. Das Threonin in Position 1120 wurde mit Hilfe der Quick-Change-Mutagenese durch Alanin ersetzt, in der Folge ist dieses Phosphorylierungsmotiv ausgeschaltet.

HEK293T-Zellen wurden mit CDM.sIg.Nephrin.cyt bzw. CDM.sIg.Nephrin.T1120A, CDM.F.β-Arrestin2 und pEGFP.AT1-Rezeptor kotransfiziert. Als Negativkontrolle dient der Nephrin-Leervektor CDM.sIg. Die Hälfte der Zellproben wurde 60 min vor der Zellernte mit 1 μM Angiotensin II stimuliert, geerntet, lysiert und mit Protein-G-Sepharose Co-immunopräzipitiert. Anschließend wurden die Proben und Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und dem Western-Blot unterzogen. Die Immunfärbung wurde mit einem Anti-Flag-Antikörper durchgeführt.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Phosphorylierungsstudie von Nephrin am Threonin<sub>1120</sub> unter Ausschaltung des Motivs durch Punktmutation (Abb. 11). In der Positivkontrolle ist die bekannte verstärkte Präzipitation von β-Arrestin2 an Nephrin unter der Wirkung von Angiotensin II zu beobachten. Die Kontrollprobe mit NephrinT1120A weist ebenso eine verstärkte Interaktion von β-Arrestin2 nach der 60 minütigen Stimulation mit Angiotensin II auf. Die posttranslationale Modifikation i.S. einer Phosphorylierung von Nephrin am Threonin<sub>1120</sub> hat keine Relevanz für die verstärkte Präzipitation von β-Arrestin2 und Nephrin unter der Stimulation mit Angiotensin II.



**Abbildung 11:** Die Ausschaltung des Phosphorylierungsmotivs Nephrin<sub>THR1120</sub> hat keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von β-Arrestin2 oder den Angiotensin-II-Effekt.

HEK293T-Zellen wurden mit sIg.NephrinT1120A, F.β-Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1 μM Angiotensin II erfolgten die Zellyse und die Immunprä-

zipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti.Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt. Eine Punktmutation des Threonin<sub>1120</sub> durch die nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin verhindert eine posttranslationale Modifikation. In der Positivkontrolle ist die verstärkte Angiotensin-II-induzierte Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion zu beobachten. Auch unter der Transfektion der Nephtrinmutante Nephtrin<sub>T1120A</sub> bleibt der Angiotensin-II-Effekt bestehen. Die alleinige posttranslationale Modifikation i.S. einer Phosphorylierung des Threonin<sub>1120</sub> im Gesamtmotiv Thr<sub>1120/1125</sub> hat keine Relevanz für die  $\beta$ -Arrestin2-Bindung oder den Angiotensin-II-Effekt. Der Angiotensin-II-Effekt bleibt unter Ausschaltung des Phosphorylierungsmotivs erhalten (n=3).

#### 4.3.3 Die Nephtrin-Domäne 1215-1221 ist essentiell für die Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion.

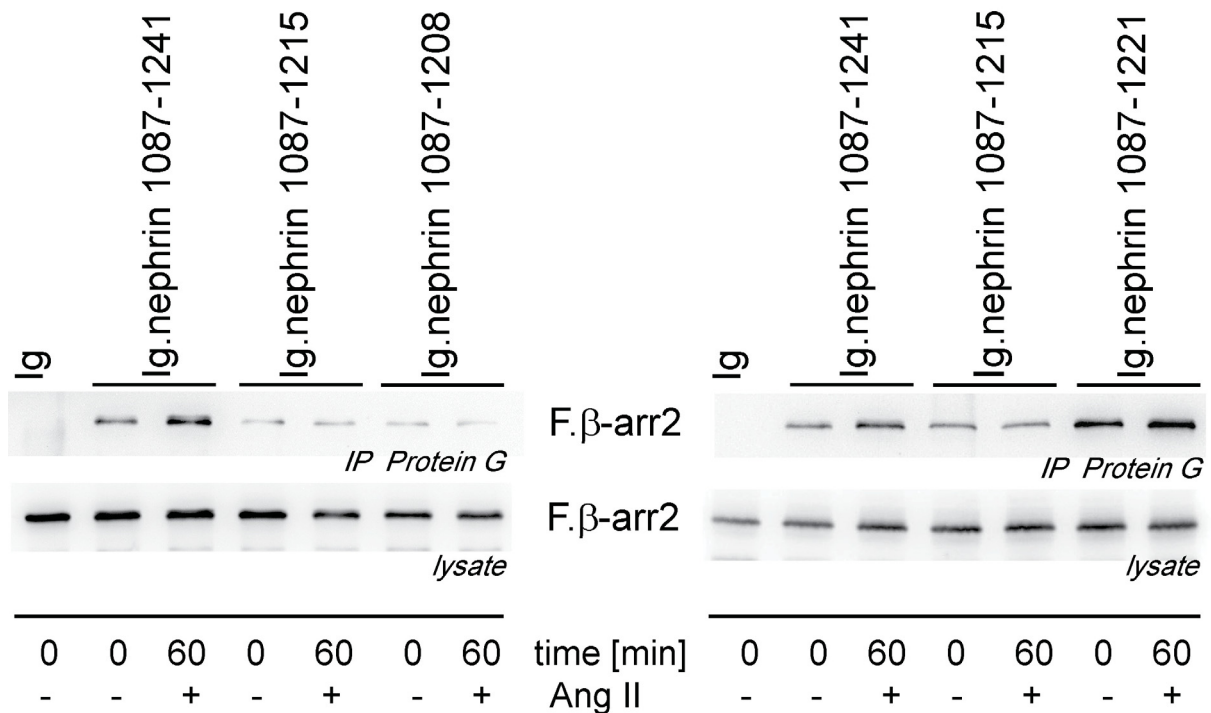
Die Aminosäuren Tyr<sub>1193</sub> [35] und indirekt Thr<sub>1125</sub> konnten bereits als wichtige Phosphorylierungsmotive für die Nephtrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion identifiziert werden. Das Regulationsmotiv für die verstärkte Nephtrin- $\beta$ -Arrestin-Interaktion und folgende Endozytose unter der Stimulation mit Angiotensin II bleibt in den bisherigen Untersuchungen allerdings unbekannt. Im Rahmen der weiteren Untersuchung der sieben bekannten c-terminalen Tyrosin-Phosphorylierungsmotive von Nephtrin wurden verschiedene *Nephtrin truncations* [35] zur Erstellung einer *Truncation Map* genutzt. Mit Hilfe unterschiedlicher Primer wurden mehrere verschiedene C-terminale Kettenabbrüche an Nephtrin induziert, was den zytoplasmatischen Abschnitt des Proteins limitiert. Eine Vergleichstransfektion dieser restringierten Proteine ermöglicht die Lokalisierung möglicher posttranslationaler Modifikationsmotive und Proteininteraktionsmotive im entsprechenden Proteinabschnitt, nach einer Expressionskontrolle.

HEK293T-Zellen wurden mit den im C-Terminus restringierten sIg.Nephtrin-truncations 1087-1241/1087-1221/1087-1215/1087-1208, F. $\beta$ -Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgten die Zelllyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti.Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt.

Das Ergebnis des Truncation mapping -einer graduellen Restriktion des C-Terminus von Nephtrin- und der folgenden Bindungsstudie wird in Abb. 12 gezeigt. Das c-Terminal nicht-restringierte Nephtrin<sub>1087-1241</sub> geht unter der Stimulation mit Angiotensin II die bekannte starke Bindung durch den verstärkten Nachweis des präzipitierten  $\beta$ -Arrestin2 ein. Nach aufsteigender c-terminaler Länge weisen Nephtrin<sub>1087-1208</sub> und Nephtrin<sub>1087-1215</sub> nur eine sehr geringe Affinität zu  $\beta$ -Arrestin2 auf, sowohl mit als auch ohne die Stimulation durch Angiotensin II. Der



bekannte Effekt des Angiotensin II tritt erst nach der zusätzlichen Expression der c-terminalen Aminosäuren zwischen Position 1215 und 1221 im Rahmen der Kotransfektion von Neph<sub>rin</sub><sub>1087-1221</sub> auf. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Regulationsmotiv für die Angiotensin II induzierte Neph<sub>rin</sub>- $\beta$ -Arrestin2 Interaktionsverstärkung im Aminosäureabschnitt 1215-1221 zu finden ist.



**Abbildung 12:** Der C-Terminale Abschnitt Neph<sub>rin</sub><sub>1215-1221</sub> reguliert die Angiotensin II induzierte Interaktionsverstärkung von Neph<sub>rin</sub> an  $\beta$ -Arrestin2.

Die Neph<sub>rin</sub> Truncations CDM.sIg.Neph<sub>rin</sub>.1087-1208, CDM.sIg.Neph<sub>rin</sub>.1087-1215, CDM.sIg.Neph<sub>rin</sub>.1087-1221 und der vollständige c-terminale Neph<sub>rin</sub>abschnitt CDM.sIg.Neph<sub>rin</sub>.1087-1241 wurden jeweils in zwei Zellproben mit CDM.F. $\beta$ -Arrestin2 und pEGFP.AT1-Rezeptor kotransfiziert. Die Negativkontrolle erfolgte mit dem Neph<sub>rin</sub>-Leervektor CDM.sIg. Eine Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II fand 60 min vor der Zellernte statt. Die Zellen wurden folgend geerntet, lysiert und mit Protein-G-Sepharose co-immunopräzipitiert. Nachfolgend wurden die Proben und Lysate elektrophoretisch getrennt und dem Western-Blot unterzogen. Die Immunfärbung erfolgte mit einem Anti-Flag-Antikörper. Unter der Co-Immunopräzipitation mit dem im c-Terminus restringiertem Neph<sub>rin</sub><sub>1087-1208</sub> und Neph<sub>rin</sub><sub>1087-1215</sub>, geht die durch Angiotensin II induzierte verstärkte Präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Neph<sub>rin</sub> verloren. Erst nach der Expression der c-terminalen Aminosäuren 1216-1221 tritt der Angiotensin-II-Effekt erneut auf (n=5).

#### 4.3.4 Der Phosphorylierungszustand des Tyrosin<sub>1217</sub> reguliert den Angiotensin II-Effekt auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus dem *truncation mapping* zeigen, dass ein relevantes Regulationsmotiv für die Vermittlung des Effekts von Angiotensin II auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion in der Nephrin-Domäne 1215-1221 liegt. Die Aminosäuresequenz dieser Domäne lautet Gly-Ili-Tyr-Asp-Gln-Val-Ala (G-I-Y-D-Q-V-A). Das einzige mögliche Phosphorylierungsmotiv in diesem Proteinabschnitt ist das Tyrosin<sub>1217</sub>.

Zur Bestätigung dieser Erkenntnisse wurden zwei Nephrinmutanten mit Hilfe der site-directed-Mutagenese erstellt. Zunächst wurde das Phosphorylierungsmotiv vollständig ausgeschaltet unter Nutzung einer Punktmutation des Tyrosin<sub>1217</sub> (Y<sub>1217</sub>) und Ersatz durch die Aminosäure Asparagin (Y<sub>1217</sub>D) (CDM.sIg.NephrinY1217D). Die Punktmutation von Tyrosin<sub>1217</sub> zu Asparagin ist ein sog. Einzelnukleotid-Polymorphismus, eine Variation des menschlichen Genoms. Asparagin simuliert den Zustand der dauerhaften Phosphorylierung. Als Negativkontrolle wurde eine weitere Mutante durch Punktmutation des Tyrosin<sub>1217</sub> (Y<sub>1217</sub>) zu Alanin (Y<sub>1217</sub>A) erzeugt (CDM.sIg.NephrinY1217A).

HEK293T-Zellen wurden mit sIg.NephrinY1217A/Y1217D, F. $\beta$ -Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgten die Zelllyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti-Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt.

Folgend wird das Ergebnis der Phosphorylierungsstudie von Nephrin am Tyrosin<sub>1217</sub> dargestellt (Abb. 13). Die Kontrollprobe zeigt die verstärkte Angiotensin II induzierte Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion. Die Veränderung des Phosphorylierungsmotivs durch die Punktmutation von Tyrosin<sub>1217</sub> zu Asparagin<sub>1217</sub> führt unter dem Einfluss von Angiotensin II zur Bindung von  $\beta$ -Arrestin2. Eine Interaktionsverstärkung zwischen Nephrin und  $\beta$ -Arrestin2 ist jedoch nicht mehr zu beobachten.

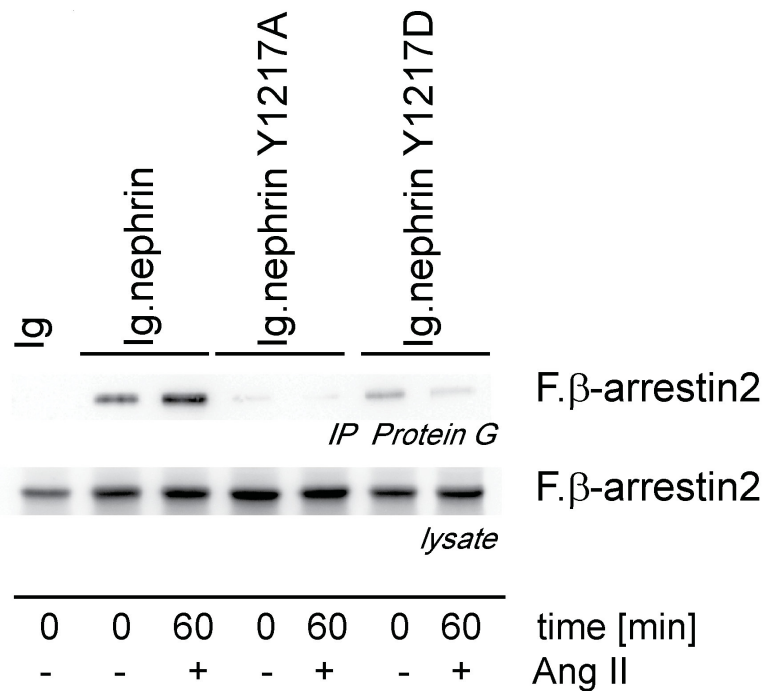


Abbildung 13: Die Phosphorylierung von Nephtrin am Tyrosin<sub>1217</sub> führt zum Verlust des Angiotensin-II-Effekts und zu einer weiteren Reduktion der Präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephtrin.

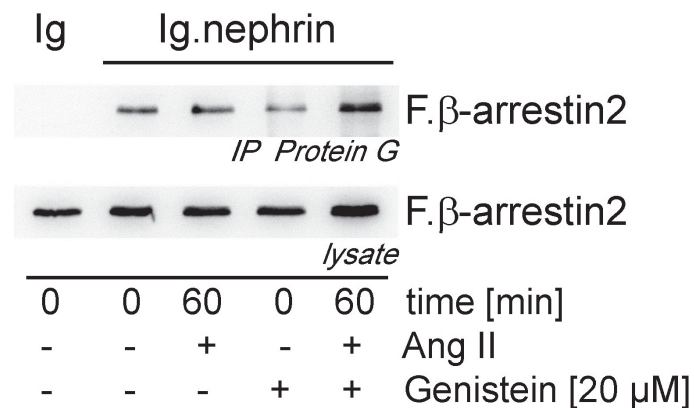
HEK293T-Zellen wurden mit Nephtrin (CDM.sIg.Nephtrin.cyt)/ NephtrinY1217A (CDM.sIg.NephtrinY1217A)/ NephtrinY1217D (CDM.sIg.NephtrinY1217D),  $\beta$ -Arrestin2 (CDM.F. $\beta$ -Arrestin2) und dem AT1-Rezeptor (pEGFP.AT1-Rezeptor) kotransfiziert. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgte die Zellernte, Zellyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Nach der SDS-Page-Gelelektrophorese und dem Western-Blot folgte die Immunfärbung mit einem Anti-Flag-Antikörper. In der Positivkontrolle ist unter Stimulation mit Angiotensin II eine verstärkte Interaktion zwischen Nephtrin und  $\beta$ -Arrestin2 zu beobachten. Ein Expression von Nephtrin<sub>Y1217A</sub> führt zum Verlust der Bindung, sowie des Angiotensin-II-Effekts, durch den Ersatz der nicht-phosphorylierbaren Aminosäure Alanin. Der Zustand einer Dauerphosphorylierung wird durch die Punktmutation von Tyrosin<sub>1217</sub> zu Asparagin simuliert. Dies führt bei bestehender Bindungsfähigkeit von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephtrin zu einer Reduktion der Präzipitation unter der Stimulation mit Angiotensin II. Die Phosphorylierung von Nephtrin in Position 1217 kann den Angiotensin-II-Effekt negieren (n=5).

#### 4.3.5 Die spezifische Inhibition von Proteintyrosinkinasen beeinflusst den Angiotensin-II-Effekt nicht.

Die Ergebnisse des Phosphorylierungszustandes von Y1217 weisen auf die Rolle von Tyrosinkinasen für den Angiotensin-II-Effekt hin. Um den Einfluss der Proteintyrosinkinasen zu untersuchen, wurde der spezifische Inhibitor Genistein eingesetzt [98]. Mögliche regulatorische Wirkungen von Serin/Threonin-Kinasen, cAMP-abhängige Kinasen oder der Proteinki-

nase C bleiben unter der Wirkung von Genistein erhalten.

HEK293T-Zellen wurden mit sIg.Nephrin, F.β-Arrestin2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. 120 min vor der Zellernte erfolgte die Inhibition der Proteintyrosinkinasen mit 20 μM Genistein. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1 μM Angiotensin II erfolgten die Zellyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti-Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt. Das Ergebnis der Immunfärbungen unter Inhibition der Proteintyrosinkinasen mit Genistein ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 14). In der Positivkontrolle zeigt sich die bekannte verstärkte Präzipitation von Nephrin und β-Arrestin2 unter der 60-minütigen Stimulation mit Angiotensin II. Auch unter der Inhibition der Proteintyrosinkinasen mit 20 μM Genistein und anschließender Stimulation mit 1 μM Angiotensin II bleibt verstärkte Bindung zwischen Nephrin und β-Arrestin2 erhalten, bei gleichstarker Proteinexpression in den Zelllysaten.



**Abbildung 14: Eine spezifische Inhibition der Proteintyrosinkinasen hat keinen Einfluss auf den Angiotensin-II-Effekt.**

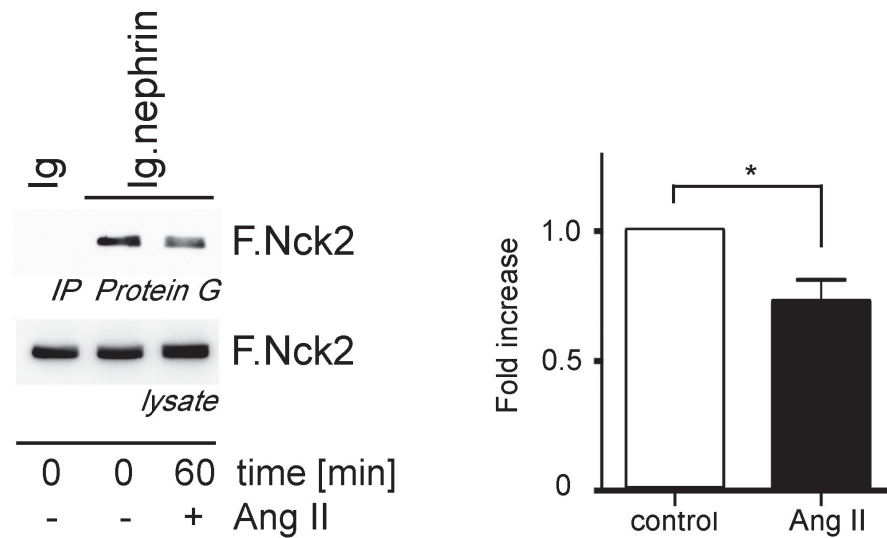
HEK293T-Zellen wurden mit Nephrin (CDM.sIg.Nephrin.cyt), β-Arrestin2 (CDM.F.β-Arrestin2) und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor (pEGFP.AT<sub>1</sub>-Rezeptor) kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Nephrin-Leervektor eingesetzt (CDM.sIg). 120 min vor der Zellernte erfolgte in der Hälfte der Zellproben die Inhibition der Proteintyrosinkinasen mit 20 μM Genistein bzw. DMSO. 60 min vor der Zellernte wurden die entsprechenden Zellproben mit 1 μM Angiotensin II stimuliert. Der Zellernte folgten die Lyse der Proben und eine Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Im Anschluss der elektrophoretischen Auftrennung der Proben und Lysate wurde ein Western-Blot durchgeführt. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit Hilfe eines Anti-Flag-Antikörpers immungefärbt. Die Positivkontrolle zeigt die Angiotensin-II-induzierte Nephrin-β-Arrestin2 Präzipitation. Die spezifische Inhibition der Proteintyrosinkinasen beeinflusst die verstärkte Angiotensin-II-induzierte Präzipitation von β-Arrestin2 an Nephrin nicht (n=6).

#### 4.4 Das zytoskelettale Adapterprotein Nck2 interagiert mit Nephrin am Phosphorylierungsmotiv Tyrosin<sub>1217</sub>.

Der für die Vermittlung des Angiotensin-II-Effekts relevante Aminosäureabschnitt konnte im Nephrin-C-Terminus auf die Sequenz G-I-Y-D-Q-V-A eingegrenzt und das Phosphorylierungsmotiv Tyr<sub>1217</sub> identifiziert werden. Bereits 2006 konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung verschiedener YDxV-Motive durch Kinasen der Src-Familie über Adapterproteine der Nck-Familie zu einer zytoskelettalen Reorganisation von Actin und Nephrin führen [46]. Fehlausbildungen der podozytären Fußfortsätze und ein kongenitales Nephrotisches Syndrom konnten unter der Ausschaltung der Adapterproteine Nck in transgenen Mäusen beobachtet werden [46]. Folgende Veröffentlichungen dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass das Motiv Tyr<sub>1217</sub> unter der podozytären Schädigung mit Puromycin zunehmend dephosphoryliert wird [99].

Die Frage, ob Angiotensin II ebenfalls die Interaktion zwischen Nephrin und Nck/Actin beeinflusst, wurde mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation beantwortet. Hek293T-Zellen wurden mit Nephrin (CDM.sIg.Nephrin.cyt), einem c-terminal Flag markiertem Nck2 (CDM.F.Nck2) und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor (pEGFP.AT<sub>1</sub>-Rezeptor) kotransfiziert. Die Negativkontrolle erfolgte mit dem Nephrin-Leervektor CDM.sIg. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1 µM Angiotensin II erfolgte die Zellernte, Lyse und Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und dem Western-Blot folgte die Immunfärbung mit einem Anti-Flag-Antikörper.

Der Einfluss von Angiotensin II auf die Nephrin-Nck-Interaktion ist in der folgenden Abbildung dokumentiert (Abb. 15). Es zeigt sich eine Reduktion des an Nephrin präzipitierten Nck unter der Wirkung von 1 µM Angiotensin II bei gleichwertiger Proteinexpression in den Zelllysaten.



**Abbildung 15:** Angiotensin II induziert einen signifikanten Bindungsverlust zwischen Nephrin und dem zytoskeletalen Actin-Adapterprotein Nck.

HEK293T-Zellen wurden mit sIg.Nephrin, F.Nck2 und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor kotransfiziert. Nach einer 60 minütigen Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgten die Zellyse und die Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose. Proben und Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und geblottet. Ein Anti.Flag-Antikörper wurde zur Immunfärbung eingesetzt. Unter der Einwirkung von Angiotensin II ist der Nachweis des an Nephrin gebundenen Nck reduziert. Die Stimulation mit Angiotensin II induziert einen signifikanten Bindungsverlust um den Faktor 0,25 zwischen Nephrin und des zytoskelettalen Actin-Adapterprotein Nck2 (\*n=5, p=0,0079).

## 4.5 Untersuchung des Angiotensin-II-Effekts in murinen Podozyten.

### 4.5.1 Angiotensin II induziert die Endozytose von Nephrin in murinen Podozyten.

Im Rahmen von Biotin Assays von Martin Rütze et al. konnte bereits im Modell mit HEK293T-Zellen die Angiotensin II induzierte in vitro Endozytose von Nephrin nachgewiesen werden. Ebenso konnte die Inhibition der Nephrinendozytose unter der Wirkung des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Candesartan dargestellt werden.

Die Übertragung dieses Modells auf ein geeigneteres Zellmodell wurde in Form der Verwendung von immortalisierten murinen Podozyten vollzogen.

Podozyten mit einer stabilen Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors wurden zur experimentellen Nutzung herangezogen. Unter der Reduktion der Temperatur auf 37 °C und dem Entzug von Interferon- $\gamma$  erfolgen die Differenzierung der Podozyten und die zunehmende Expression von Nephrin. Die Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II erfolgte 60 min vor der Zellernte.

Nach der Zellernte wurden die Proben dem Procedere des Biotin-Assays, der Zellyse und anschließend der Immunopräzipitation. Der elektrophoretischen Auftrennung der Proben folgte ein Western-Blot. Der Nachweis von biotinylierten Nephrin, dem gesamten zellulären Nephrin und Actin wurde durch die Immunfärbung mit Streptavidin, einem Anti-Nephrin-Antikörper bzw. einem Anti-Actin-Antikörper durchgeführt.

Das Biotin-Assay zeigt die Expressionsänderung von Nephrin an der Zelloberfläche unter der Wirkung von Angiotensin II in murinen Podozyten (Abb. 16). Sichtbar wird eine signifikante Reduktion des an der Oberfläche exprimierten biotinylierten Nephrins unter der Stimulation mit Angiotensin II, bei annähernd gleicher Expression des präzipitierten Nephrins und des gesamten zellulären Nephrins. Der Nachweis der Angiotensin II-induzierten  $\beta$ -Arrestin2-abhängigen Endozytose von Nephrin zeigt sich somit auch im murinen Podozyten.

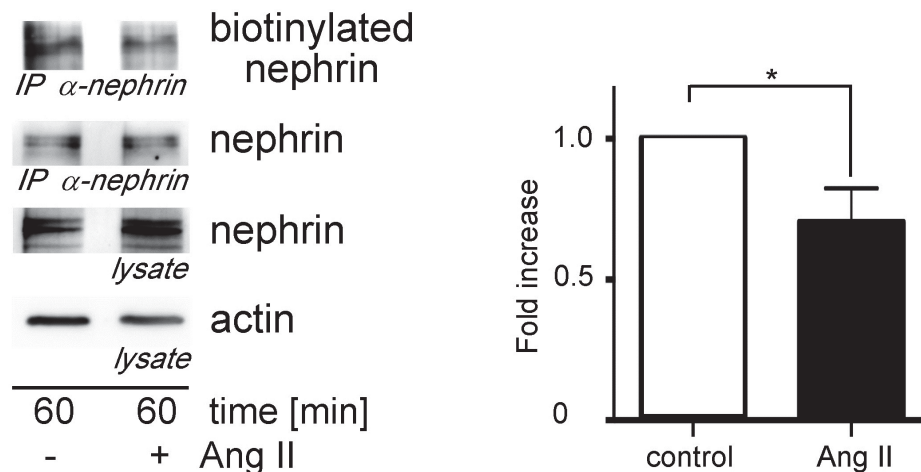


Abbildung 16: Angotensin II induziert die Endozytose von Nephrin in murinen Podozyten.

Mit dem  $AT_1$ -Rezeptor stabil transfizierte ausdifferenzierte murine Podozyten wurden für 60 min mit  $1\mu M$  Angiotensin II stimuliert. Nach der Zellernte, der Biotinylierung des an der Zelloberfläche exprimierten Nephrin und der Zellyse erfolgte die Co-Immunopräzipitattion mit einem Anti-Nephrin-Antikörper. Der SDS-Page Gelelektrophorese schloss sich ein Western-Blot an. Der Nachweis des biotinylierten Nephrin wurde mit Streptavidin durchgeführt. Weiterhin wurde die gesamte zelluläre Nephrinfraktion mit einem Nephrin-Antikörper nachgewiesen. Nach der Stimulation mit Angiotensin II erfolgt ein densidometrisch signifikant reduzierter Nachweis des an der Zelloberfläche biotinylierten Nephrin (Faktor 0,25). Sowohl das in der Immunpräzipitation gebundene Nephrin, als auch die gesamte zelluläre Nephrinexpression sind in beiden Proben gleichwertig (\*n=5, p=0,03).

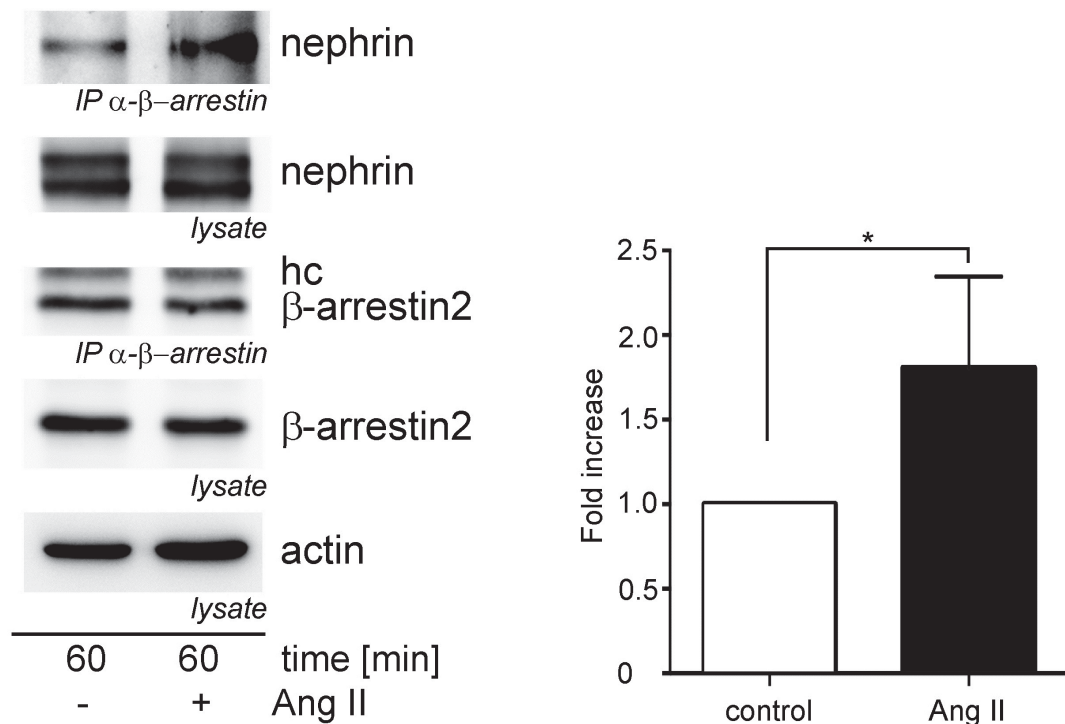
#### **4.5.2 Angiotensin II verstärkt die Nephrin- $\beta$ -Arrestin-II-Interaktion in isolierten murinen Glomeruli.**

Zur Übertragung der in vitro gewonnenen Erkenntnisse, dass Angiotensin II die Interaktion zwischen Nephrin und  $\beta$ -Arrestin verstärkt und die Nephrinendozytose im Podozyten induziert, wurden murine Glomeruli isoliert. Die Nutzung dieser Methode erlaubt die Betrachtung einer podozytären Proteinexpression.

Die Nieren männlicher, 3-8 Wochen alter Balb/C-Mäuse wurden nach der initialen Tötung mit gekühltem PBS (4 °C) perfundiert. Die Isolierung der Glomeruli erfolgte nach der Embolisierung mit 5ml einer Dynabeads-PBS-Suspension (s.o). Anschließend wurden die selektierten Glomeruli für 60 min bei 37 °C in RPMI-Medium inkubiert und mit 1  $\mu$ M Angiotensin II stimuliert. Nach der Lyse wurden die Proben der Co-Immunopräzipitation mit einem Anti- $\beta$ -Arrestin Antikörper zugeführt und darauffolgend Proben und Lysate elektrophoretisch aufgetrennt und dem Western-Blot unterzogen. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit Hilfe eines Anti-Nephrin-, eines Anti- $\beta$ -Arrestin2- und eines Anti-Actin-Primärantikörpers immungefärbt.

Die Stimulation isolierter muriner Glomeruli mit 1  $\mu$ M Angiotensin II führt zu einer signifikanten Zunahme der Präzipitation von Nephrin an  $\beta$ -Arrestin2 (Abb. 17). Die Proteinexpression von  $\beta$ -Arrestin2 ist in der Co-IP als auch in den Lysaten, mit und ohne Stimulation, als gleichwertig zu betrachten. Eine Induktion der Expression von  $\beta$ -Arrestin2 ist unter der Wirkung von Angiotensin II nicht anzunehmen.





**Abbildung 17:** Die Stimulation isolierter muriner Glomeruli mit Angiotensin II verstärkt die präzipitation von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin.

3-8 Wochen alte männliche Balb/C-Mäuse wurden getötet, die Nieren isoliert mit PBS perfundiert und die Glomeruli mit magnetischen Dynabeads embolisiert. Nach Extraktion der Nieren und magnetischer Isolation der Glomeruli erfolgte die 60-minütige Stimulation mit 1  $\mu$ M Angiotensin II. Die Zellen wurden lysiert und einer Co-Immunopräzipitation mit einem Anti- $\beta$ -Arrestin2-Antikörper zugeführt. Die Immunfärbung erfolgte mit einem Anti-Nephrin-Antikörper. Unter der Stimulation mit Angiotensin II zeigt sich eine signifikante –um den Faktor 1,8-2,4- verstärkte Bindung von Nephrin an das immunpräzipitierte  $\beta$ -Arrestin2. Die Expressionskontrollen von Nephrin, dem immunpräzipitierten  $\beta$ -Arrestin2 und dem gesamten zellulären  $\beta$ -Arrestin2 fallen in beiden Versuchsansätzen gleichwertig aus. Die Stimulation isolierter muriner Glomeruli mit 1  $\mu$ M Angiotensin II für 60 min führt zu einer verstärkten Nephrin- $\beta$ -Arrestin2-Interaktion (\*n=4, p=0,03).

## 5. Diskussion

Infusionen mit Angiotensin II zeigen in vivo -Aldosteron unabhängig- eine signifikante transiente Erhöhung der glomerulären Permeabilität innerhalb von Minuten [100]. Die transiente Steigerung der glomerulären Permeabilität unter der Ang II Infusion ging in den Experimenten von Axelsson et al. ohne eine signifikante Erhöhung des systemischen Blutdrucks einher. Buter et al. beobachteten eine Reduktion einer Proteinurie bei Diabetikern unter Substitution von Losartan innerhalb von drei Tagen. Auch dieser Effekt ging ohne eine signifikante Änderung des systemischen Blutdrucks einher und zeigte sich reversibel nach dem Absetzen der Medikation [101].

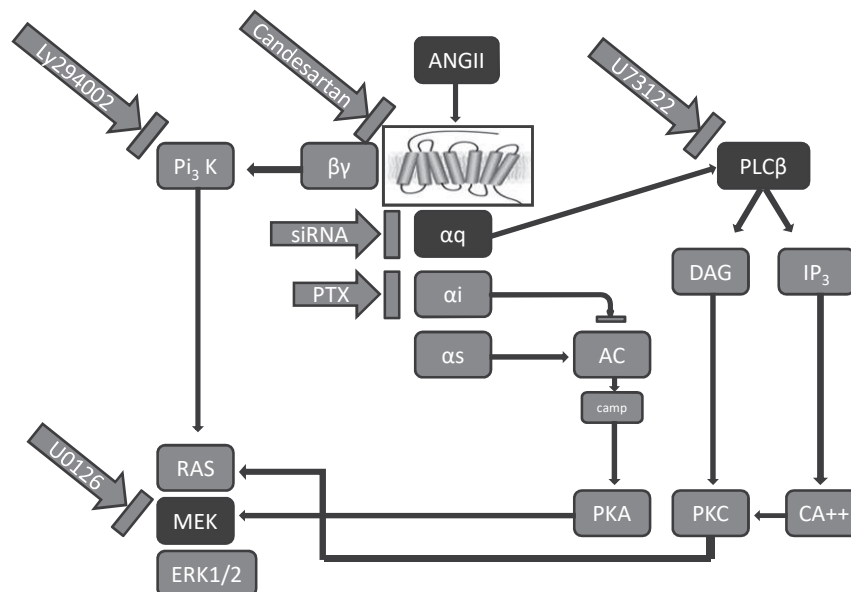
Davis et al konnten eine signifikante Reduktion einer Albuminurie und des Blutdrucks bei Patienten mit einer diabetischen Nephropathie nachweisen unter der Therapie mit dem Angiotensin-Rezeptorantagonisten Irbesarten. Die Vergleichsmedikation mit einem Ca-Antagonisten war in der Lage den Blutdruck signifikant zu senken, eine Reduktion der Proteinurie konnte jedoch nicht beobachtet werden [102]. Ca-Antagonisten waren auch in weiteren Experimenten in der Lage den systemischen Blutdruck signifikant zu reduzieren, eine signifikante Reduktion der Proteinurie blieb jedoch aus [103]. Eine signifikante Reduktion des Blutdrucks und die damit einhergehend veränderte intraglomeruläre Hämodynamik können eine bestehende Albuminurie reduzieren [104]. Die Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) durch Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-Rezeptor-Blockern (ARB) reduziert und verzögert eine bestehende Albuminurie bzw. die Progression [105] [106] [107]. Der alleinige antihypertensive Effekt eines medikamentösen Eingriffs in das RAA-System (Ca-Antagonisten vs. AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten) liefert keine hinreichende Erklärung für die Reduktion einer glomerulären Proteinurie. Der nephroprotektive anti-albuminurische Effekt von ACE-Hemmern und Angiotensin-Rezeptor-Blockern übersteigt den alleinigen Benefit eines antihypertensiven Effektes [105] [108] [109]. Dies unterstützt die Vorstellung eines Blutdruck-unabhängigen Regulationsmechanismus der glomerulären Schlitzmembran. Die o.g. Befunde lassen die Hypothese zu, dass ein weiterer -AT<sub>1</sub>-Rezeptor abhängiger- molekularer Regulationsmechanismus für die Entwicklung einer glomerulären Proteinurie begünstigend oder gar mitursächlich sein könnte. Blutdruck-unabhängige Effekte von ACE-Hemmern und Angiotensin-Rezeptor-Blockern wurden bereits in der Vergangenheit postuliert, um die nephroprotektiven Effekte dieser Medikamentengruppen zu erklären [106] [110].

Unter der Stimulation mit Angiotensin II konnte im Zellmodell eine verstärkte Präzipitation

von Nephrin an  $\beta$ -Arrestin2 beobachtet werden (Abb. 4). Dies führt hypothetisch zu einer raschen Destabilisierung des glomerulären Filters und ermöglicht und unterstützt die Entwicklung einer glomerulären Proteinurie i.S. einer Albuminurie. Auch die Stimulation isolierter muriner Glomeruli mit Angiotensin II zeigte eine signifikante Bindungsverstärkung von Nephrin an das immunpräzipitierte  $\beta$ -Arrestin2 (Abb.17).

$\beta$ -Arrestin2, eine für diese Arbeit wesentliche Schlüsselstruktur zur Regulation des essentiellen Strukturproteins Nephrin, konnte bereits in der Vergangenheit als Bindungspartner identifiziert und in seiner Funktion u.a. zur Endozytose von Nephrin charakterisiert werden [35]. Die Interaktion zwischen Nephrin und  $\beta$ -Arrestin2 nimmt mit der Dauer der Stimulation zu. Ein Interaktionsmaximum wurde nach 60 Minuten dokumentiert.

Dieser neue molekulare Mechanismus bietet einen Erklärungsansatz für die erhöhte glomeruläre Permeabilität unter der Angiotensin-II-Stimulation und den - Blutdruck unabhängigen - nephroprotektiven Effekt von Angiotensin-Rezeptorantagonisten und ACE-Hemmern.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Signaltransduktion und der verwendeten Inhibitoren.**

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte der AT<sub>1</sub>-Rezeptor als Zielrezeptor des hier dargestellten Angiotensin II-Effektes indentifiziert werden. Eine Vorbehandlung der transfizierten Zellen mit Candesartan verhindert die verstärkte Bindung von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin

unter der Einwirkung von Angiotensin II (s.o.). Die Restriktion der Aminosäuresequenz bis zur Aminosäure 319 des Rezeptorproteins und den damit hervorgerufenen Restriktion auf das G-Protein-Signals zeigt keinen Verlust des Angiotensin II-Effekts auf die Nephrin- $\beta$ -ArrestinII Interaktion (Abb. 5). Ein Knockdown der mRNA des G-alpha-q-Protein mit Hilfe einer siRNA ruft einen Verlust des Angiotensin II-Effekts auf die Nephrin- $\beta$ -Arrestin2 Interaktion hervor (Abb. 6), so dass schlussfolgernd das G-alpha-q Signal essentiell für die Signaltransduktion des Angiotensin II Effekts ist. Auch die Phospholipase C konnte als unvermeidliches Bindeglied zur Vermittlung des Angiotensin II Signals identifiziert werden. Die Inhibition der Phospholipase C mit U73122 negiert den Angiotensin II Effekt (Abb. 7). Daten von Koenigshausen et al. in unserer Arbeitsgruppe zeigen keinen Einfluss der Inhibition des G-alpha-i-Proteins mit Pertussistoxin auf den Angiotensin II Effekt [115].

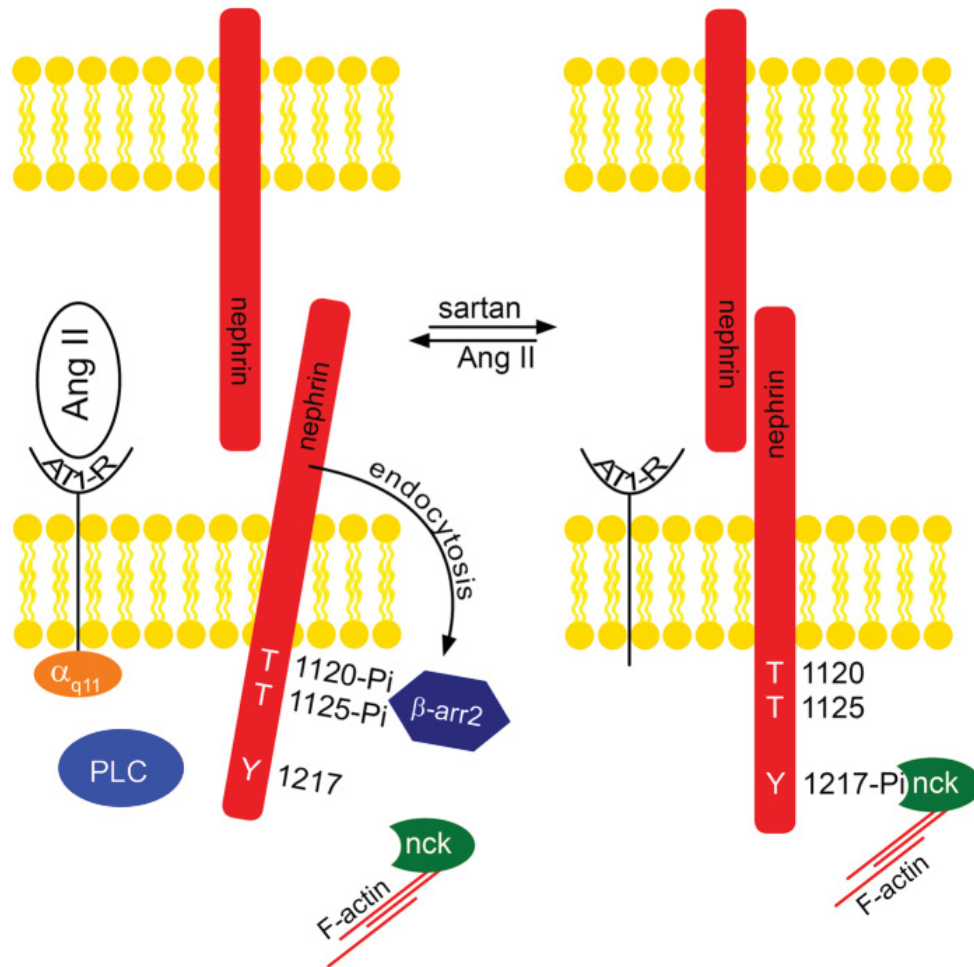
Die Rolle der MAP-Kinasen bleibt zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit weitestgehend unklar für die Signaltransduktion des Angiotensin II Effekts. In Vorversuchen konnte eine direkte Aktivierung durch den Phosphoinositol-3-Kinase-Weg mit Hilfe des Inhibitors LY294002 weitestgehend ausgeschlossen werden. Eine mögliche Queraktivierung durch die aktivierte Phospholipase C und Diazylglycerin und konsekutiver Aktivierung der Proteinkinase C und RAF1 ist hypothetisch möglich. Die  $\beta$ -Arrestin2 abhängige Endozytose von Nephrin vermittelt durch die Proteinkinase C-alpha i.R. einer hyperglykämischen Stoffwechsellage wurde bereits 2011 durch Quack, I. und Woznowski, M. et al. nachgewiesen werden [97]. Die Notwendigkeit einer funktionierenden Signaltransduktion von MEK1 für den Angiotensin II Effekt wurde i.R. der Inhibition mit U0126 festgestellt (Abb. 9). Welche folgende Funktion MEK1 im Verlauf bzgl. des Angiotensin II Effekts ausübt ist nicht gesichert und verbleibt zukünftig zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte in kultivierten immortalisierten murinen Podozyten eine Angiotensin II induzierte Nephrinendozytose nachgewiesen werden (Abb.16). Die Phospholipase C ist eine essentielle Komponente dieses Endozytoseprozesses (Abb. 7, 8). Durch die vermehrte Endozytose des Strukturproteins Nephrin im glomerulären Filter ist eine konsekutive Erhöhung der Permeabilität des glomerulären Filters für Makromoleküle zu postulieren. Eine mögliche Ursache der verminderten Biotinylierung von Nephrin könnte die in Studien von Collino, F. et al nachgewiesene Abstoßung von Proteinen der Zelloberfläche sein [111]. In dieser Studie konnten durch Proteasen hervorgerufene Abspaltungen des Proteins Nephrin von der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Ein Nachweis von Nephrin-Abbruchartefakten gelang

in dieser Arbeit nicht, so dass primär von einer Endozytose als Ursache der verminderten Nephrin-Biotinylierung ausgegangen wird.

Die Intaktheit der Podozytenfußfortsätze zur Aufrechterhaltung der glomerulären Schlitzmembran ist essentiell für die Funktion des glomerulären Filters [112]. Studien konnten eine Reorganisation zytoskelettaler Strukturen unter der Einwirkung von Angiotensin II auf den AT<sub>1</sub>-Rezeptor beobachten. In Vorarbeiten durch Macconi et al. konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass die Angiotensin II Stimulation podozytärer Monolayer zu einer verstärkten Albuminpermeabilität und einer Reorganisation des Actin-Zytoskeletts führt [113]. Hsu et al. demonstrierten 2008 den Einfluss der aktivierten GTPase Rac-1 auf das Remodelling des Actin-Zytoskeletts unter der Stimulation mit Angiotensin II in Podozyten mit einer stabilen AT<sub>1</sub>-Rezeptorexpression. [114]. Die Tyrosin-Phosphorylierung wurde bereits in Vorarbeiten als Regulatoren der Nephrinbindung an  $\beta$ -Arrestin2 [35] [112] und Nck als Adapterprotein zum Zytoskelett identifiziert [46].

Zur weiteren Differenzierung eines möglichen Endozytosesignals durch posttranslationale Modifizierung i.F. von De- oder Phosphorylierung wurde ein Truncation-mapping durchgeführt. Eine potentielle Bindung von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin ist nach der Expression der Aminosäuren von 1087-1215 möglich. Zwei mögliche Phosphorylierungsmotive wurden in diesem Abschnitt hinsichtlich der Interaktion zwischen Nephrin und  $\beta$ -Arrestin2 untersucht. Das Ausschalten des Nephrin Tyrosin-Doppelmotifs T<sub>1120</sub>A/T<sub>1125</sub>A führt zu einem vollständigen Verlust der Interaktion (Abb. 10). Eine Punktmutation im Nephrin Einzelmotif Tyrosin 1120 i.S. eines *Knockdown* ermöglicht weiterhin die Interaktion zwischen Nephrin und  $\beta$ -Arrestin2 und zeigt auch den Effekt der verstärkten Bindung von Nephrin an  $\beta$ -Arrestin2 nach der Stimulation mit Angiotensin II (Abb. 11). Die Phosphorylierung des Motifs Y<sub>1120</sub>/Y<sub>1125</sub> ist essentiell für die Bindung von  $\beta$ -Arrestin2 an Nephrin (Abb. 10).



**Abbildung 19: Übersicht über die dynamische Regulation von Nephrin in der glomerulären Schlitzmembran.**

Erst nach der Expression der zytoplasmatischen Aminosäuresequenz 1216-1221 kann ein erneutes Auftreten des Angiotensin II Effekts beobachtet werden. Innerhalb dieser Sequenz lässt sich eine Tyrosin-Phosphorylierungsdomäne nachweisen lokalisiert in T<sub>1217</sub>. Wird dieses Phosphorylierungsmotif ausgeschaltet (Y<sub>1217</sub>A) lässt sich keine Nephrin-β-Arrestin Bindung nachweisen, die Dauerphosphorylierung (Y<sub>1217</sub>D) führt hingegen zu einer abgeschwächten Bindung. Eine Angiotensin II Stimulation führt zur weiteren Abschwächung dieser Interaktion (Abb. 13). Die Phosphorylierung des Tyrosins an Position Y<sub>1176</sub>, Y<sub>1193</sub> und Y<sub>1217</sub> ist essenziell für die Nephrin-Nck Interaktion [46]. Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Phosphorylierung des Tyrosinmotifs an Position 1217 die Nephrin-Nck Interaktion stärkt und die Position in der glomerulären Schlitzmembran stabilisiert. Gleichzeitig wird die potentiell destabilisierende Bindung an β-Arrestin2 abgeschwächt (Abb. 13,19). Die Angiotensin II

Stimulation reduziert die Nephrin-Nck Interaktion a.e. durch Dephosphorylierung des Tyrosinmotifs (Abb.15, 19).

## 6. Literaturverzeichnis

1. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaetgens, *The endothelial surface layer*. Pflugers Arch, 2000. **440**(5): p. 653-66.
2. Amann, K., C. Wanner, and E. Ritz, *Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(8): p. 2112-9.
3. Satchell, S.C., K.L. Anderson, and P.W. Mathieson, *Angiopoietin 1 and vascular endothelial growth factor modulate human glomerular endothelial cell barrier properties*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(3): p. 566-74.
4. Eremina, V., et al., *Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases*. J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 707-16.
5. Miner, J.H., *The glomerular basement membrane*. Exp Cell Res, 2012. **318**(9): p. 973-8.
6. Kanwar YS, V.M., *Ultrastructure of glomerulus and juxtaglomerular apparatus*. . Handbook of Physiology. Renal Physiology. Vol. Vol. I, Chapter 1. 1992. 3-40.
7. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 253-307.
8. Pavenstadt, H., *The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes*. Exp Nephrol, 1998. **6**(2): p. 98-103.
9. Kerjaschki, D., et al., *A beta 1-integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli*. Am J Pathol, 1989. **134**(2): p. 481-9.
10. Raats, C.J., J. Van Den Born, and J.H. Berden, *Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria*. Kidney Int, 2000. **57**(2): p. 385-400.
11. Regele, H.M., et al., *Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(3): p. 403-12.
12. de Zeeuw, D., H.H. Parving, and R.H. Henning, *Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(8): p. 2100-5.
13. Matsushita, K., et al., *Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis*. Lancet, 2010. **375**(9731): p. 2073-81.
14. Nitsch, D., et al., *Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: a meta-analysis*. BMJ, 2013. **346**: p. f324.
15. Astor, B.C., et al., *Glomerular filtration rate, albuminuria, and risk of cardiovascular and all-cause mortality in the US population*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(10): p. 1226-34.
16. Kuhn, H., *Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes*. Biochemistry, 1978. **17**(21): p. 4389-95.
17. Lohse, M.J., et al., *Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems*. J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8558-64.
18. Attramadal, H., et al., *Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 17882-90.
19. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-65.
20. Oakley, R.H., et al., *Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17201-10.



21. Lohse, M.J., et al., *Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors.* J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3202-11.
22. Lefkowitz, R.J., K. Rajagopal, and E.J. Whalen, *New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors.* Mol Cell, 2006. **24**(5): p. 643-52.
23. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling.* Pharmacol Rev, 2001. **53**(1): p. 1-24.
24. Claing, A., et al., *Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins.* Prog Neurobiol, 2002. **66**(2): p. 61-79.
25. Goodman, O.B., Jr., et al., *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor.* Nature, 1996. **383**(6599): p. 447-50.
26. Laporte, S.A., et al., *The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3712-7.
27. Claing, A., et al., *beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis.* J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42509-13.
28. Shenoy, S.K., et al., *Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin.* Science, 2001. **294**(5545): p. 1307-13.
29. Shenoy, S.K., et al., *Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor.* J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 22166-76.
30. Berthouze, M., et al., *The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization.* EMBO J, 2009. **28**(12): p. 1684-96.
31. Simonin, A. and D. Fuster, *Nedd4-1 and beta-arrestin-1 are key regulators of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 ubiquitylation, endocytosis, and function.* J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38293-303.
32. Lipsky, R., et al., *beta-Adrenergic receptor activation induces internalization of cardiac Cav1.2 channel complexes through a beta-arrestin 1-mediated pathway.* J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17221-6.
33. Dasgupta, P., et al., *Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways.* J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2208-2217.
34. Chen, W., et al., *Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling.* Science, 2003. **301**(5638): p. 1394-7.
35. Quack, I., et al., *beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14110-5.
36. Kestila, M., et al., *Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome.* Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 575-82.
37. Huttunen, N.P., *Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients.* Arch Dis Child, 1976. **51**(5): p. 344-8.
38. Holthofer, H., et al., *Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney.* Am J Pathol, 1999. **155**(5): p. 1681-7.
39. Holzman, L.B., et al., *Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell.* Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1481-91.
40. Ruotsalainen, V., et al., *Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7962-7.
41. Ruotsalainen, V., et al., *Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis.* Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1905-16.
42. Putaala, H., et al., *The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain*

- and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(1): p. 1-8.
43. Putaala, H., et al., *Primary structure of mouse and rat nephrin cDNA and structure and expression of the mouse gene.* J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(6): p. 991-1001.
  44. Barletta, G.M., et al., *Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers.* J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19266-71.
  45. Gerke, P., et al., *Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(4): p. 918-26.
  46. Jones, N., et al., *Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes.* Nature, 2006. **440**(7085): p. 818-23.
  47. Faul, C., et al., *Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton.* Trends Cell Biol, 2007. **17**(9): p. 428-37.
  48. Tryggvason, K., *Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm.* J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(11): p. 2440-5.
  49. Verma, R., et al., *Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin.* J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20716-23.
  50. Lahdenpera, J., et al., *Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases.* Kidney Int, 2003. **64**(2): p. 404-13.
  51. Tryggvason, K., J. Patrakka, and J. Wartiovaara, *Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria.* N Engl J Med, 2006. **354**(13): p. 1387-401.
  52. Fornoni, A., *Proteinuria, the podocyte, and insulin resistance.* N Engl J Med, 2010. **363**(21): p. 2068-9.
  53. Sohn, R.L., et al., *A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9274-9.
  54. Skeggs, L.T., Jr., J.R. Kahn, and N.P. Shumway, *The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme.* J Exp Med, 1956. **103**(3): p. 295-9.
  55. Urata, H. and D. Ganten, *Cardiac angiotensin II formation: the angiotensin-I converting enzyme and human chymase.* Eur Heart J, 1993. **14 Suppl I**: p. 177-82.
  56. Seikaly, M.G., B.S. Arant, Jr., and F.D. Seney, Jr., *Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat.* J Clin Invest, 1990. **86**(4): p. 1352-7.
  57. Navar, L.G., et al., *Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade.* J Am Soc Nephrol, 1999. **10 Suppl 12**: p. S266-72.
  58. Wennmann, D.O., H.H. Hsu, and H. Pavenstadt, *The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes.* Semin Nephrol, 2012. **32**(4): p. 377-84.
  59. Kobori, H., et al., *The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease.* Pharmacol Rev, 2007. **59**(3): p. 251-87.
  60. Moulik, S., et al., *Angiotensin II receptor subtype distribution in the rabbit brain.* Exp Brain Res, 2002. **142**(2): p. 275-83.
  61. van Kats, J.P., et al., *Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions.* Circulation, 1998. **98**(1): p. 73-81.
  62. Steckelings, U.M., et al., *Human skin: source of and target organ for angiotensin II.* Exp Dermatol, 2004. **13**(3): p. 148-54.
  63. Ghiani, B.U. and M.A. Masini, *Angiotensin II binding sites in the rat pancreas and their modulation after sodium loading and depletion.* Comp Biochem Physiol A Physiol, 1995. **111**(3): p. 439-44.
  64. Ganten, D., et al., *Angiotensin-forming enzyme in brain tissue.* Science, 1971. **173**(3991): p. 64-5.

65. Bottari, S.P., et al., *Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications*. Front Neuroendocrinol, 1993. **14**(2): p. 123-71.
66. Ali, M.S., et al., *Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23382-8.
67. Touyz, R.M. and C. Berry, *Recent advances in angiotensin II signaling*. Braz J Med Biol Res, 2002. **35**(9): p. 1001-15.
68. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 415-72.
69. Cervenka, L., et al., *Renal function in the AT1A receptor knockout mouse during normal and volume-expanded conditions*. Kidney Int, 1999. **56**(5): p. 1855-62.
70. Ito, M., et al., *Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3521-5.
71. Gray, M.O., et al., *Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(2): p. 352-63.
72. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers*. Circ Res, 1993. **73**(3): p. 424-38.
73. Apfeldorf, W.J. and H. Rasmussen, *Simultaneous determination of intracellular free calcium and aldosterone production in bovine adrenal zona glomerulosa*. Cell Calcium, 1988. **9**(2): p. 71-80.
74. Dinh, D.T., et al., *Angiotensin receptors: distribution, signalling and function*. Clin Sci (Lond), 2001. **100**(5): p. 481-92.
75. Hutchison, C.A., 3rd, et al., *Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence*. J Biol Chem, 1978. **253**(18): p. 6551-60.
76. Zheng, L., U. Baumann, and J.L. Reymond, *An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(14): p. e115.
77. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
78. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**(2): p. 456-67.
79. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
80. Gultekin, H. and K.H. Heermann, *The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix*. Anal Biochem, 1988. **172**(2): p. 320-9.
81. Amarzguioui, M., et al., *Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 508-17.
82. Potthoff, S.A., et al., *The glomerular proteome in a model of chronic kidney disease*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(7-8): p. 1127-39.
83. Sano, T., et al., *A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23631-6.
84. Shirai, H., et al., *Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor*. Hypertension, 1995. **25**(4 Pt 2): p. 726-30.
85. Feng, Y.H., et al., *Unconventional homologous internalization of the angiotensin II type-1 receptor induced by G-protein-independent signals*. Hypertension, 2005. **46**(2): p. 419-25.
86. Borawski, J., et al., *Optimization procedure for small interfering RNA transfection in*

- a 384-well format*. J Biomol Screen, 2007. **12**(4): p. 546-59.
87. Ushio-Fukai, M., et al., *Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(1): p. 142-9.
  88. Ushio-Fukai, M., et al., *Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19772-7.
  89. Macrez, N., et al., *A betagamma dimer derived from G13 transduces the angiotensin AT1 receptor signal to stimulation of Ca<sup>2+</sup> channels in rat portal vein myocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23180-5.
  90. Cai, H., et al., *Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 732-41.
  91. Kolch, W., et al., *Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation*. Nature, 1993. **364**(6434): p. 249-52.
  92. Macdonald, S.G., et al., *Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(11): p. 6615-20.
  93. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 1991. **65**(4): p. 663-75.
  94. Thomas, G., *MAP kinase by any other name smells just as sweet*. Cell, 1992. **68**(1): p. 3-6.
  95. Blenis, J. and M.D. Resh, *Subcellular localization specified by protein acylation and phosphorylation*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(6): p. 984-9.
  96. Ludwig, S., et al., *3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6687-97.
  97. Quack, I., et al., *PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 12959-70.
  98. Akiyama, T., et al., *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. J Biol Chem, 1987. **262**(12): p. 5592-5.
  99. Jones, N., et al., *Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(7): p. 1533-43.
  100. Axelsson, J., et al., *Rapid, dynamic changes in glomerular permeability to macromolecules during systemic angiotensin II (ANG II) infusion in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(6): p. F790-9.
  101. Buter, H., et al., *Time course of the antiproteinuric and renal haemodynamic responses to losartan in microalbuminuric IDDM*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(4): p. 771-5.
  102. Davis, B.J., et al., *Disparate effects of angiotensin II antagonists and calcium channel blockers on albuminuria in experimental diabetes and hypertension: potential role of nephrin*. J Hypertens, 2003. **21**(1): p. 209-16.
  103. Yasuda, G., et al., *Effects of losartan and amlodipine on urinary albumin excretion and ambulatory blood pressure in hypertensive type 2 diabetic patients with overt nephropathy*. Diabetes Care, 2005. **28**(8): p. 1862-8.
  104. Brenner, B.M. and S. Anderson, *The Gordon Wilson lecture. Why kidneys fail: an unifying hypothesis*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 1987. **98**: p. 59-70.
  105. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 861-9.

106. Haller, H., et al., *Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2011. **364**(10): p. 907-17.
107. Pohl, M.A., et al., *Independent and additive impact of blood pressure control and angiotensin II receptor blockade on renal outcomes in the irbesartan diabetic nephropathy trial: clinical implications and limitations*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(10): p. 3027-37.
108. Izuhara, Y., et al., *Renoprotective properties of angiotensin receptor blockers beyond blood pressure lowering*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(12): p. 3631-41.
109. Ruggenenti, P., et al., *Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term ramipril: REIN follow-up trial. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). Ramipril Efficacy in Nephropathy*. Lancet, 1998. **352**(9136): p. 1252-6.
110. GISEN-Group, T., *Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia)*. Lancet, 1997. **349**(9069): p. 1857-63.
111. Collino, F., et al., *Preeclamptic sera induce nephrin shedding from podocytes through endothelin-1 release by endothelial glomerular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(5): p. F1185-94.
112. Soda, K., et al., *Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes*. J Clin Invest, 2012. **122**(12): p. 4401-11.
113. Macconi, D., et al., *Permeable dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention*. Am J Pathol, 2006. **168**(4): p. 1073-85.
114. Hsu, H.H., et al., *Mechanisms of angiotensin II signaling on cytoskeleton of podocytes*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(12): p. 1379-94.
115. Koenigshausen, E. et al., *Angiotensin II increases glomerular permeability by beta arrestin mediated nephrin endocytosis*. Sci Rep **6**: (2016). 39513.

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Lorenz Sellin für die gute Betreuung und die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas bedanken. Auch und vor Allem möchte ich mich für den Ersteinblick in die medizinische Grundlagenforschung und den Einblick in die Nephrologie bedanken. Die Zeit und die Erfahrungen im Labor haben mich schließlich zum Beginn der Ausbildung zum Facharzt für Nephrologie bewegt.

Frau Dr. Königshausen hatte für alle Doktoranden stets eine offene Tür und stand mir mit einer hervorragenden Anleitung, Rat und Tat beiseite. Insbesondere in schwierigen Zeiten haben Sie mich stets ermuntert einen erneuten Versuch zu wagen. Ein herzliches Dankeschön für die umfassende und gute Betreuung.

Frau Dr. Woznowski möchte ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und Empfehlungen in den frühen Morgenstunden im Labor danken.

Herr Martin Rütze hat mich mit sehr viel Engagement in die Arbeitsabläufe und die Labortätigkeiten eingewiesen. Für die gute Laune und die musikalische Begleitung möchte ich mich bedanken.

Meinen Kommilitonen und Mitdoktorantinnen Senah Kabbany, Sinja Ohlson, Laura Gerbaulet und Barbara Knezic möchte ich für die gute Laune und Unterhaltungen bedanken, die die Wartezeit auf so manches Ergebnis verkürzt und die Arbeit im Labor erleichtert haben.

Ein herzliches Dankeschön auch an Blanka Duvniak und Christina Schwandt für die hilfreichen Hinweise und die Hilfe bei der Zellversorgung.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders danken, dass sie es mir ermöglicht haben einen erheblichen Zeitraum außerhalb des Studiums der Forschungsarbeit zu widmen. Meinen Brüdern möchte ich für den stetigen und netten Antrieb zu Vollendung meiner Promotionschrift danken.

Bei meiner Ehefrau und meinen beiden Kindern möchte ich mich Bedanken, dass sie viel Verständnis für die Forschungsarbeit und meine häufige Abwesenheit hatten. Vielen herzlichen Dank, dass ihr mir den Rücken feigehalten habt, so dass ich meine Promotion abschließen zu konnte.