
**Analyse der Podozytenfunktion
bei
glomerulärem
Filtrationsversagen**

**Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München**

vorgelegt von
Simone Monika Blattner
aus
Ludwigshafen am Rhein

2005



MEINEN ELTERN

Ehrenwörtliche Versicherung.

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt ist.

München, den

.....

(Unterschrift)

Erklärung.

Hiermit erkläre ich, dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den

.....

(Unterschrift)

Dissertation eingereicht: 19.10.2005
Erstgutachter: Prof. Harry MacWilliams
Zweitgutachter: PD Dr. Angelika Böttger
Sondergutachter: Prof. Matthias Kretzler

Mündlichen Prüfung am: 18.05.2006

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abkürzungsverzeichnis	5
3	Einleitung.....	8
3.1	Aufbau und Funktion der Niere in Mammaliern	8
3.2	Die funktionelle Einheit der Filtrationsbarriere.....	9
3.2.1	Relevanz der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion von Podozyten	11
3.2.2	Das podozytäre Cytoskelett und assoziierte Moleküle	14
3.3	Veränderungen der podozytären Schlitzmembran und Verlust der Filtrationsbarriere.....	16
3.3.1	Proteinurie durch Veränderungen an Schlitzmembran und Cytoskelett.	19
3.3.2	Zell-Matrix Interaktion von Podozyten und ILK-Signaltransduktion ...	21
3.3.3	Proteasomische Degradation von mutierten Schlitzmembran-Molekülen	27
3.3.4	Experimentelle Modelle humaner glomerulärer Erkrankungen	30
3.4	Aufgabenstellung und Ziele.....	32
4	Material.....	33
4.1	Chemikalien	33
4.2	Verbrauchsmaterial	35
4.3	Reaktionssets	35
4.4	Molekulargewichtsstandards	36
4.5	Enzyme	36
4.6	Oligonukleotide und Sonden	36
4.7	Biologisches Material	38
4.7.1	Zelllinien.....	38
4.7.2	Mäuse.....	38
4.8	Zellkulturmedien und Zusätze	38
4.9	Antikörper	39
4.9.1	Primäre Antikörper	39
4.9.2	Unspezifische Antikörper (Kontroll-Antikörper).....	41
4.9.3	Sekundäre Antikörper	41
4.10	Verwendete Geräte	42
5	Methoden	43
5.1	Molekularbiologische Methoden	43

5.1.1	RNA-Isolation aus Gewebe und Zellkulturmaterial	43
5.1.2	Reverse Transkription, cDNA-Synthese.....	44
5.1.3	Real-time RT-PCR (TaqMan®)	45
5.1.4	Konventionelle PCR	46
5.2	Methoden der eukaryotischen Zellkultur	46
5.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien (Podozyten)	46
5.2.2	Zellkultur von murinen Podozyten	47
5.2.3	Zellkultur von humanen Podozyten.....	47
5.2.4	Stimulation von murinen Podozyten mit Puromycin und ILK-Inhibitor	48
5.2.5	Stimulation humaner Podozyten mit Xanthin-Xanthinoxidase	48
5.2.6	Behandlung humaner Podozyten mit Proteasom-Inhibitoren.....	48
5.3	Proteinchemische Standardmethoden	49
5.3.1	Herstellung von Gesamtzellsaten aus Zellen	49
5.3.2	Herstellung von Gesamtzellsaten aus Gewebe	49
5.3.3	Herstellung von Kernextrakten.....	50
5.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Zell- und Gewebelysaten	50
5.3.5	Konzentrationsbestimmung von Protein im Urin	51
5.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
5.3.7	Coomassie-Färbung von Proteingelen	52
5.3.8	Ponceau S-Färbung von Proteinen.....	52
5.4	Protein-Sequenzanalyse	52
5.5	Immunologische und immunbiochemische Methoden	53
5.5.1	Western Blot	53
5.5.2	Chemilumineszenz-Detektion von Proteinen	54
5.5.3	Strippen von Western Blot-Membranen	54
5.5.4	Immunpräzipitation von Proteinen	54
5.5.5	Indirekte Immunfluoreszenz	55
5.5.6	Albumin-ELISA.....	56
5.5.7	Kinase-Assay	57
5.5.8	Immunhistochemie.....	57
5.6	TUNEL-Färbung zum Nachweis von Apoptose.....	58
5.7	Bestimmung der Zelladhäsion	59
5.8	MTT-Test zur Zellzahlbestimmung.....	60
5.9	Nachweis der Ubiquitinierung.....	61
5.10	Bestimmung der Protein-Halbwertszeit mittels Cycloheximid	62
5.11	Tierexperimentelle Arbeiten	63

5.11.1	Haltung der Tiere	63
5.11.2	Induktion eines Nierenschädigung mit Adriamycin	63
5.11.3	Applikation der Inhibitoren	63
5.11.4	Gewinnung von Urin und Blut.....	63
5.11.5	Organentnahme	64
5.11.6	Messung von Creatinin im Urin.....	64
5.11.7	Messung der Blut-Werte	64
6	Ergebnisse.....	66
6.1	Die ILK und ihre Funktion in Podozyten	66
6.1.1	ILK-Inhibitor MC-5 inhibiert ILK Downstream-Targets <i>in vitro</i>	66
6.1.2	Die Lokalisation von ILK wird durch den Inhibitor nicht beeinflusst ..	68
6.1.3	Inhibition der ILK erhöht die Apoptose-Rate von Podozyten.....	69
6.1.4	Einfluß von oxidativem Stress und ILK-Inhibition auf die Proliferation	70
6.1.5	Einfluß von oxidativem Stress und ILK-Inhibition auf die Adhäsion....	71
6.1.6	Die nucleäre Translokation von β -Catenin ist ILK-abhängig	72
6.1.7	ILK-abhängige Repression des Schlitzmembran-Moleküls P-Cadherin	77
6.2	Inhibition der ILK-Aktivität <i>in vivo</i> mit ILK-Inhibitor MC-5 in Mäusen mit eingeschränkter Nierenfunktion.....	78
6.3	ILK verbindet die Fokalkontakte mit dem Cytoskelett	82
6.3.1	ILK-Inhibition hat Auswirkung auf die Stressfaser-Formation in Podozyten	82
6.3.2	Expression des cytoskelett-assoziierten Moleküls CLP-36 in Podozyten ..	83
6.3.3	Interaktion der ILK mit CLP-36	84
6.3.4	CLP-36 wird in Podozyten phosphoryliert	87
6.3.5	ILK Kinase Assay mit CLP-36	89
6.4	Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in gesunden und geschädigten humanen Glomeruli und Podozyten	90
6.4.1	Co-Lokalisation und molekulare Interaktion von CLP-36 mit Alpha-Actinin-4 in humanen Podozyten.....	90
6.4.2	Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein in renalen Erkrankungen	93
6.4.3	mRNA-Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in renalen Erkrankungen	94
6.4.4	Der Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein kann durch Inhibition der Proteasomen verhindert werden.....	96

6.4.5	Oxidativer Stress <i>in vitro</i> führt zu vermehrter Ubiquitinierung von Proteinen in Podozyten.....	98
6.4.6	Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein nach oxidativem Stress wird durch einen Proteasom-Inhibitor verhindert.....	100
6.4.7	Ubiquitinierung von nativem Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein ...	101
6.5	Tierexperimentelle Studie zur Analyse der Auswirkungen von Proteasomen auf die Nierenfunktion bei kranken Mäusen.....	105
6.5.1	Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen in Inhibitor-behandelten Mäusen	106
6.5.2	Funktionelle Parameter der Nierenfunktion in Blut und Urin und	107
6.5.3	Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 mRNA und Protein im Tiermodell	111
7	Diskussion	114
7.1	ILK Signaltransduktion in Podozyten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	114
7.1.1	Funktion des ILK-Inhibitors MC-5.....	115
7.1.2	ILK-abhängige Translokation von β -Catenin in den Nucleus	116
7.1.3	Auswirkungen der ILK auf die Podozyten-Funktion <i>in vitro</i>	117
7.1.4	„Crosstalk“ zwischen Zell-Matrix-Adhäsion und Schlitzmembran bei Podozyten	120
7.1.5	Inhibition der ILK-Aktivität <i>in vivo</i> bei nephrotischen Mäusen.....	121
7.2	ILK, das Cytoskelett und das cytoskeletale Molekül CLP-36.....	123
7.2.1	Interaktion von ILK und CLP-36 in murinen Podozyten	124
7.2.2	Phosphorylierung von CLP-36	125
7.3	Proteasomale Degradation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 bei renaler Schädigung in Mammaliern.....	126
7.3.1	Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in humanen Podozyten.....	127
7.3.2	Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 bei humaner Nierenschädigung.....	127
7.3.3	Proteasomale Degradation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36	129
7.3.4	Ubiquitinierung von Alpha-Actinin-4 und CLP-36.....	130
7.3.5	Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 im Tiermodell.....	131
7.4	Ausblick	133
8	Zusammenfassung	135
9	Literatur	137
10	Publikationen	150
11	Lebenslauf.....	151
12	Danksagung	152

2 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenz-Thiazolin-6-Sulfonsäure)
ADR	Adriamycin
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbammat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FCS	Fetal Calf Serum
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GBM	Glomeruläre Basalmembran

h	Stunde
HRP	Horseradish-(Meerrettich-)Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IgA	IgA Nephropathie
ILK	Integrin-linked Kinase
IP	Immunpräzipitation
ITS	<u>I</u> nsulin- <u>T</u> ransferrin- <u>S</u> elenium
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LN	Lupus-Nephritis
M	Molar (= mol/l)
MBP	Myelin basic protein (basisches Myelin)
MCD	Minimal Change Disease
mg	Milligramm
MGN	Membranöse Glomerulopathie
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumiodid
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung (Standard deviation)

SDS	Sodium Dodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
sog.	sogenannt
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit 0,01 % Tween20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran
TNF	Tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor
ÜN	über Nacht
U	Unit
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

3 Einleitung

3.1 Aufbau und Funktion der Niere in Mammaliern

Die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten erfolgt bei Säugetieren größtenteils über die Nieren. Mammalier scheiden wasserlöslichen Harnstoff, anorganische Ionen, Glucose, Aminosäuren und andere Exkretstoffe über den Harn aus. Zunächst werden durch Druckfiltration größere Mengen an Primärharn gebildet (150-180 Liter/Tag), der bereits alle Exkretstoffe enthält. In einem weiteren Schritt erfolgt die Resorption der noch verwertbaren Substanzen und eines Großteils des Wassers (Säugetiere: 99%). Ausgeschieden wird zuletzt nur ein mit Exkretstoffen hochkonzentrierter Endharn (Urin) (Wehner und Gehring, 1990).

Makroskopisch unterteilt sich die Niere in zwei unterschiedliche Zonen (siehe Abbildung 3.1 A). Die äußere Rindenschicht (Cortex) mit den Glomeruli und die innere Markschiicht (Medulla), in der sich hauptsächlich feine Blutgefäße und die Henle-Schleifen befinden und beide Regionen enthalten zahllose kleine Exkretionskanälchen (Tubuli)(Campbell, 1998). Die Spitzen der durch die Bertin-Säulen voneinander abgegrenzten Markpyramiden ragen als Nierenpapillen (Papillae renales) in die Nierenkelche, die wiederum in das Nierenbecken münden. Das Nierenbecken zählt zusammen mit dem Ureter bereits zu den ableitenden Harnwegen (Stevens et al., 1997).

Die Funktionseinheit der Wirbeltierniere ist das Nephron (ca. 1 Million Nephronen/Niere), das aus einem als Glomerulus bezeichneten Blutkapillarknäuel und einem einzelnen langen Tubulus besteht. Das blinde Ende des Tubuluskanals umgreift den Glomerulus becherförmig und bildet so die Bowman-Kapsel (Abbildung 3.1 B). Das Nephron wird über eine afferente Arteriole, die sich in die Glomerulus-Kapillaren auffächert, mit Blut versorgt. Diese Kapillaren vereinigen sich beim Verlassen des Glomerulus und formen die efferente Arteriole. Die Ultrafiltration mit Bildung des Primärharns findet innerhalb des Glomerulus statt. Hierbei werden durch den Blutdruck Wasser, Harnstoff, Salze und andere niedermolekulare Substanzen aus dem Blut in das Lumen der Bowman-Kapsel gepresst. Die Flüssigkeit im Lumen der Kapsel ist das so genannte Ultrafiltrat bzw. der Primärharn.

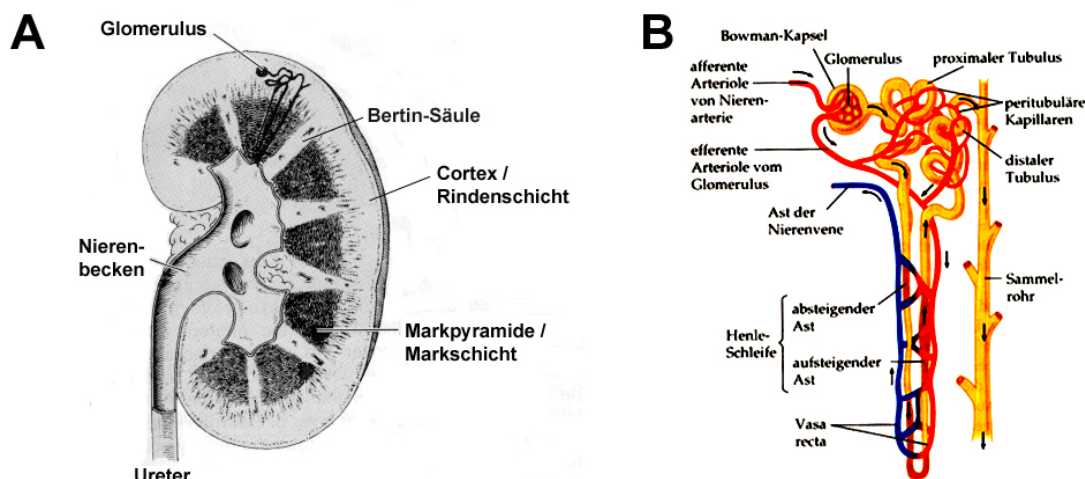


Abbildung 3.1 Aufbau von Niere und Nephronen. Makroskopischer Aufbau einer Säuger-Niere (A; modifiziert nach (Junqueira L.C. et al., 1998)). Das Nephron ist die anatomische und funktionelle Einheit der Säuger-Nieren (B; aus (Campbell, 1998)).

Bei der Filtration ist auch die Molekülgröße der Substanzen von Bedeutung. Nur niedermolekulare Substanzen <70 kDa können den Filter ungehindert passieren. Hochmolekulare Substanzen, Proteine und Blutzellen werden zurückgehalten (Wehner and Gehring, 1990). Aus der Bowman-Kapsel gelangt das Ultrafiltrat in das Tubulus-System des Nephrons, das für die Resorption von Ionen und Wasser zuständig ist. Der Tubulus lässt sich in drei verschiedene Regionen einteilen: Proximaler Tubulus, die Henle-Schleife und distaler Tubulus (Abbildung 3.1 B). Letzterer mündet in ein Sammelrohr, das die Flüssigkeit vieler Nephronen in das Nierenbecken leitet. Dieser konzentrierte Sekundärharn (Endharn, Urin) wird über den Ureter der Blase zugeleitet und ausgeschieden.

3.2 Die funktionelle Einheit der Filtrationsbarriere

Bei der Bildung des Primärharns durch Filtration des Blutes an der so genannten Filtrationsbarriere können niedermolekulare Solute und Wasser den Filter ungehindert passieren. Makromoleküle wie Blutplasma-Proteine und Blutzellen werden jedoch zurückgehalten. Der molekulare Aufbau dieser Filtrationsbarriere ermöglicht eine Filtration des Blutes nach Größe und Ladung. Die glomeruläre Filtrationseinheit setzt sich aus drei Komponenten zusammen: Dem fenestrierten Kapillarendothel mit Poren

von je etwa 70 nm Durchmesser (Stevens et al., 1997), der glomerulären Basalmembran (GBM) und den viszeralen glomerulären Epithelzellen (Podozyten) (Smoyer and Mundel, 1998).

Letztere sind die größten und differenziertesten Zellen innerhalb des Glomerulus (Pavenstadt, 1998) und bilden ausgehend vom Soma primäre Zellausläufer aus, die sich weiter in feinere, sekundäre Fußfortsätze verzweigen. Die Adhäsion der sekundären Fußfortsätze an der glomerulären Basalmembran (GBM) wird über $\alpha3\beta1$ -Integrine (Kerjaschki et al., 1989) und Dystroglycan (Raats et al., 2000; Regele et al., 2000) vermittelt, während die Zellkörper der Podozyten mit dem darin enthaltenen Zellkern frei im Lumen der Bowman-Kapsel flottieren. Die sekundären Fußfortsätze verzahnen sich mit den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten und bilden ein dichtes Netzwerk interdigitierender Zellausläufer, die das gesamte glomeruläre Kapillarknäuel bedecken und so die Filtrationsschlitz bilden (siehe Abbildung 3.2, Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4). Der 30 bis 40 nm breite Spalt (Barisoni and Mundel, 2003; Wartiovaara et al., 2004) besitzt fast die Größe eines Albumin-Moleküls und wird von der sogenannten Schlitzmembran überbrückt (Reiser et al., 2000) (siehe Abbildung 3.2 B und Abbildung 3.3 B).

Den Podozyten kommt bei der Ultrafiltration des Harns eine Schlüsselrolle zu, da sie zum einen mit ihren Zellausläufern die Filtrationsschlitz und die Schlitzmembran bilden und zum andern durch Podocalyxin-Moleküle an ihrer apikalen Zelloberfläche eine stark negative Ladung aufweisen (Kerjaschki et al., 1984). Beide Aspekte führen zu einer trennscharfen Filtrationsbarriere in Hinsicht auf Ladungs- und Größenselektivität (Pavenstadt, 1998). Darüber hinaus sind die Podozyten maßgeblich an der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen für die GBM beteiligt und sind mitverantwortlich für die Strukturhaltung des glomerulären Gefäßkonvolutes (Kriz et al., 1996).

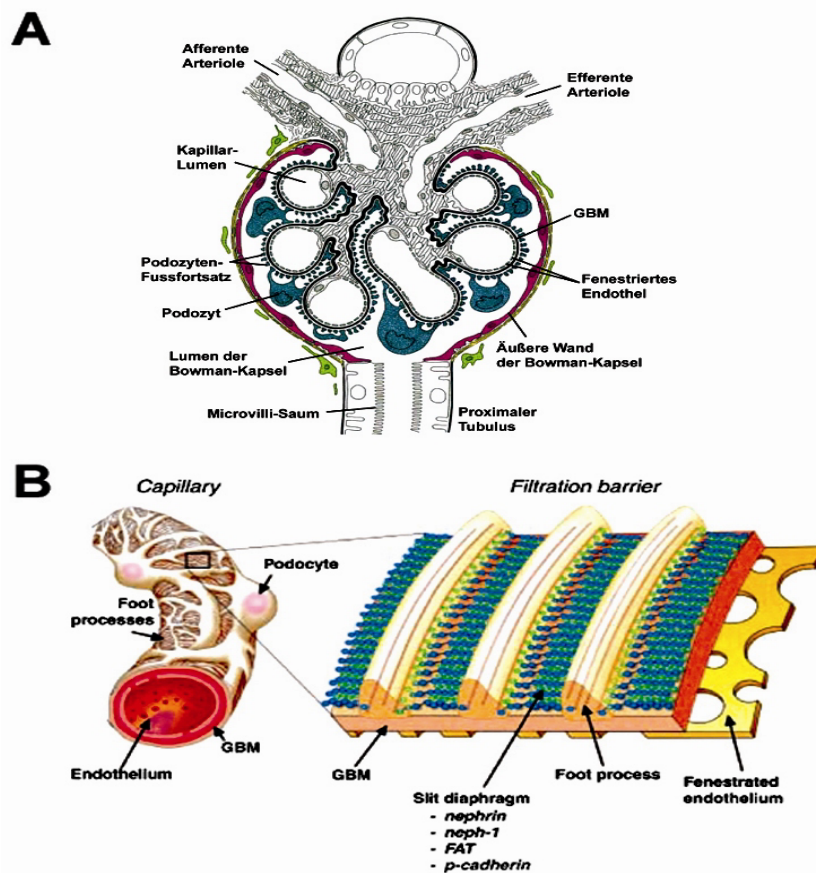


Abbildung 3.2 Aufbau eines Glomerulus und der Filtereinheit in der Niere. A, Schematische Darstellung der Struktur eines Glomerulus mit seinen verschiedenen Kompartimenten (modifiziert nach (Kriz et al., 1998)). B, Plastische Darstellung der renalen Filtereinheit mit der Schlitzmembran; modifiziert nach (Tryggvason and Pettersson, 2003).

3.2.1 Relevanz der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion von Podozyten

Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozyten aus der Sicht der Bowman-Kapsel zeigt deutlich die von seinen primären und sekundären Fußfortsätzen und von den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten gebildeten Filtrationsschlitz (Abbildung 3.3 A), in deren Mitte die Schlitzmembran zu finden ist.

Renale Epithelzellen werden durch „*Tight Junctions*“ miteinander verbunden (Smoyer and Mundel, 1998), und auch die Schlitzmembran, die zwei Podozyten miteinander verbindet, wurde zunächst als eine modifizierte „*Tight Junction*“ beschrieben. Dafür spricht das Vorhandensein des „*Tight Junction*“-assoziierten Moleküls Zonula Occludens-1 (ZO-1) an der cytoplasmatischen Seite der Schlitzmembranen (Schnabel et

al., 1990), die Entwicklung der Schlitzmembran aus einer „*Tight Junction*“ Verbindung während der Nierenentwicklung und der „*Tight Junction*“ ähnlichen Funktion der Schlitzmembran, die die apikale Zellmembran-Domäne der Podozyten von deren basolateralen Seite abteilt (Schnabel et al., 1989).

Neuere Publikationen ordnen die Podozyten-Schlitzmembran aufgrund ihrer Co-Lokalisation von ZO-1 mit P-Cadherin, α -, β - und γ -Catenin einer modifizierten „*Adherens Junction*“ zu (Reiser et al., 2000). Im Gegensatz zu klassischen „*Adherens Junctions*“ (Yonemura et al., 1995) ist Vinculin nicht Teil dieses Komplexes. Die Verbindung des Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem F-Actin des Cytoskeletts wird durch ZO-1 vermittelt (Itoh et al., 1997). Die im Transmissions-Elektronen-Mikroskop als Reißverschluss („*zipper-like*“) erscheinende Struktur der Podozyten-Schlitzmembran (Reiser et al., 2000) ist gut vereinbar mit dem vorgeschlagenen Modell von auf Cadherin basierenden Zell-Zell-Kontakten (Shapiro et al., 1995).

Außer P-Cadherin befinden sich in der Reißverschluss-ähnlichen Struktur der Schlitzmembran noch drei weitere Transmembran-Moleküle mit großen, extrazellulären Domänen. Hierbei handelt es sich um das Cadherin-ähnliche Molekül FAT (Inoue et al., 2001), um das erst kürzlich beschriebene Protein Nephrin-1 (Donoviel et al., 2001) und um Nephrin (NPHS1) (Kestila et al., 1998) (Abbildung 3.3).

In unmittelbarer Nähe zu den extrazellulären Proteinen der Schlitzmembran befindet sich das Haarnadel-ähnliche Transmembran-Protein Podocin mit zwei cytoplasmatischen Enden, das innerhalb des Glomerulus nur in Podozyten exprimiert wird (Boute et al., 2000b). Podocin interagiert mit Nephrin und dem CD2-assoziierten Protein (CD2AP) (Schwarz et al., 2001). CD2AP lokalisiert im Cytoplasma innerhalb der Podozyten-Fußfortsätze auf Seiten der Schlitzmembran und verankert Nephrin und Podocin mit dem F-Actin der Zellen (Lehtonen et al., 2002).

Mutationen innerhalb von Schlitzmembran-assoziierten Molekülen führen häufig zu einem Verlust der Filtrationsfähigkeit der Niere (siehe Abschnitt 3.3.1) und gehen mit einer starken Ausscheidung von hochmolekularen Proteinen im Urin (Proteinurie) einher. Schema B von Abbildung 3.3 zeigt das Zusammenspiel und die Lokalisation von Molekülen, die für die einwandfreie Funktion der Podozyten relevant sind.

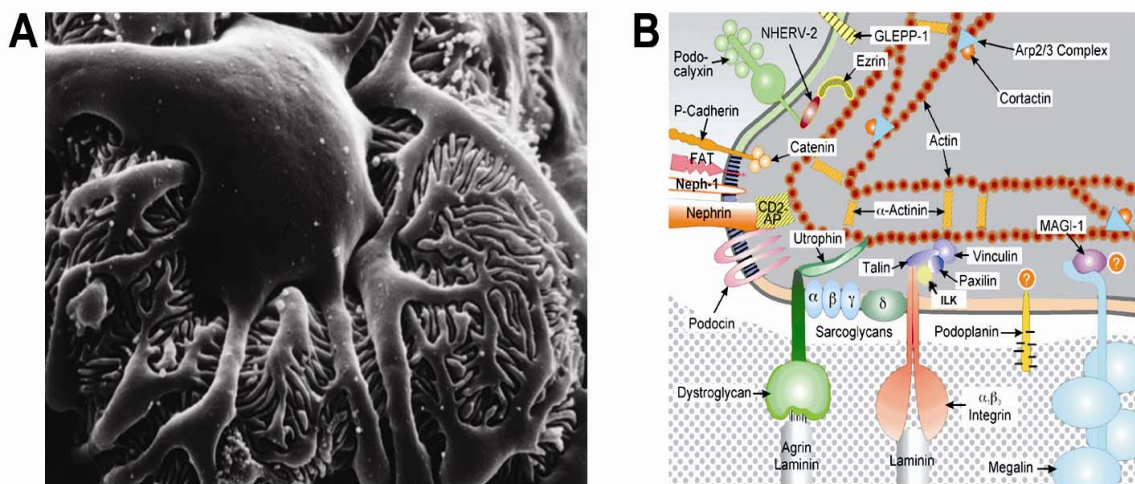


Abbildung 3.3 Morphologie und molekularer Aufbau der Podozyten-Fußfortsätze bei Bildung der Schlitzmembran. Abbildung A zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines auf einer Kapillarschlinge aufsitzenden Podozyten. Zu sehen ist der Zellkörper des Podozyten und dessen breitere, primären Fußfortsätze, die sich in die feineren, sekundären Fußfortsätze verzweigen. Die sekundären Fußfortsätze benachbarter Podozyten formen die Filtrationsschlitz. Blickwinkel vom Lumen der Bowman-Kapsel bei einer 10.500fachen Vergrößerung (aus (Smoyer and Mundel, 1998)). Das vereinfachte Schema in B zeigt das Zusammenspiel und die Lokalisation der Podozyten-relevanten Moleküle innerhalb der sekundären Podozyten-Fußfortsätze. Die Schlitzmembran wird gebildet durch die Transmembran-Moleküle Nephrin, Neph-1, FAT und P-Cadherin. Die Verankerung der Podozyten in der GBM erfolgt hauptsächlich durch $\alpha 3 \beta 1$ -Integrine und Dystroglycan; modifiziert nach (Kerjaschki, 2001).

Da durch die Ultrafiltration an der Schlitzmembran Scherkräfte auf die Podozyten mit ihrem frei im Primärharn flottierenden Zellkörper einwirken, spielt die Adhäsion der Podozyten an die GBM eine wichtige Rolle. Auch eine Verschiebung der Podozyten-Fußfortsätze gegeneinander könnte zu einer Verbreiterung der Filtrationsschlitz führen und eine verminderte Filtrationsfähigkeit der Niere zur Folge haben.

Die Adhäsion der Podozyten an die glomeruläre Basalmembran (GBM) wird zwei transmembranären, heterodimeren Proteinkomplexen zugeschrieben: $\alpha 3 \beta 1$ -Integrine (Kerjaschki et al., 1989) und Dystroglycan (Raats et al., 2000; Regele et al., 2000). Beide lokalisieren an der basalen Membran der Fußfortsätze (siehe Abbildung 3.3 B). Integrine vermitteln eine stabile Interaktion der Podozyten mit der GBM und sind heterodimere Transmembranproteine, die aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut sind. Jedes Heterodimer besitzt hierbei spezifische Bindungscharakteristika. Liganden für die podozytären $\alpha 3 \beta 1$ -Integrine sind die extrazellulären Matrix Proteine der renalen GBM

Fibronectin, Laminin und Collagen. An der cytoplasmatischen Seite der Integrine finden sich die Fokaladhäsions-Moleküle Paxillin, Talin und Vinculin (Kreidberg et al., 1996), die die Interaktion mit dem Actin-basierten Cytoskelett vermitteln. Bekannte Signaltransduktionsmoleküle, die an der Integrin-Signaltransduktion beteiligt sind, sind die Focal Adhesion Kinase (FAK) (Giancotti and Ruoslahti, 1999) und die Integrin-linked Kinase (ILK) (Dedhar, 2000; Kretzler et al., 2001a).

Der Dystroglycan Komplex besteht aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten, den α - und β -Dystroglycanen. α -Dystroglycan enthält einen Cluster an Sialinsäure-reichen Kohlehydrat-Seitenketten und ermöglicht so eine elektrostatische Bindung zu den kationischen Bereichen von Agrin und Laminin α 5 Ketten der GBM. Die β -Untereinheit durchspannt die Zellmembran und bindet an ein Zelltyp-spezifisches Actin-Linker Protein (Henry and Campbell, 1999). In Podozyten ist es das Protein Utrophin (Kerjaschki, 2001).

Weitere Adhäsionsmoleküle, über deren Funktion in Podozyten noch nicht viel bekannt ist, sind Podoplanin (Breiteneder-Geleff et al., 1997) und Megalin (Kerjaschki and Farquhar, 1983). An die intrazelluläre Domäne von Megalin bindet MAGI-1, das seinerseits an Synaptopodin und Alpha-Actinin-4 bindet (Patrie et al., 2002).

3.2.2 Das podozytäre Cytoskelett und assoziierte Moleküle

Die außerordentliche Morphologie der Podozyten, die mit ihren primären und sekundären Fußfortsätzen die feinen Filtrationsschlitze bilden, kann nur durch ein ausgereiftes inneres Stützwerk aufrechterhalten werden. Das Cytoskelett der primären Podozyten-Fußfortsätze besteht hauptsächlich aus Mikrotubuli, die keine einheitliche Polarität aufweisen (Kobayashi et al., 1998) (Abbildung 3.3). Die sekundären Fußfortsätze hingegen besitzen ein auf Mikrofilamenten basierendes Cytoskelett. Dieser kontraktile Apparat besteht hauptsächlich aus F-Actin, Myosin-II, Alpha-Actinin-4, Talin und Vinculin. Innerhalb dieser Podozyten-Fußfortsätze lokalisiert ein F-Actin Bündel in der Region apikal der Ebene der Schlitzmembran und steht nicht in direktem Kontakt mit der Plasmamembran (Ichimura et al., 2003). Ein kortikales F-Actin Netzwerk befindet sich direkt unterhalb der cytoplasmatischen Seite der

Schlitzmembran, der basalen und der apikalen Seite des Fußfortsatzes (Drenckhahn and Franke, 1988). Filamente des kortikalen Actin-Netzwerkes stehen mit den Actin-Bündeln des apikalen Bereiches der sekundären Fußfortsätze in Kontakt. Die Mikrofilamente der Podozyten-Ausläufer werden durch das Actin-bündelnde Protein Alpha-Actinin-4 vernetzt (Kaplan et al., 2000). Alpha-Actinin-4 ist eines von vier stark homologen Alpha-Actinin-Proteinen, die „head-to-tail“ Homodimere (Molekulargewicht der Untereinheiten: ca. 100 kDa) formen (Djinovic-Carugo et al., 1999) und ubiquitär exprimiert werden. Die Alpha-Actinine unterteilen sich in muskuläre (Alpha-Actinin-2 und -3) und nicht-muskuläre Isoformen (Alpha-Actinin-1 und -4) (Beggs et al., 1992; Blanchard et al., 1989). In Skelett- und Herzmuskel-Zellen lokalisiert Alpha-Actinin in den Z-Scheiben, wo es anti-parallele Actin-Filamente angrenzender Sarkomere quervernetzt.

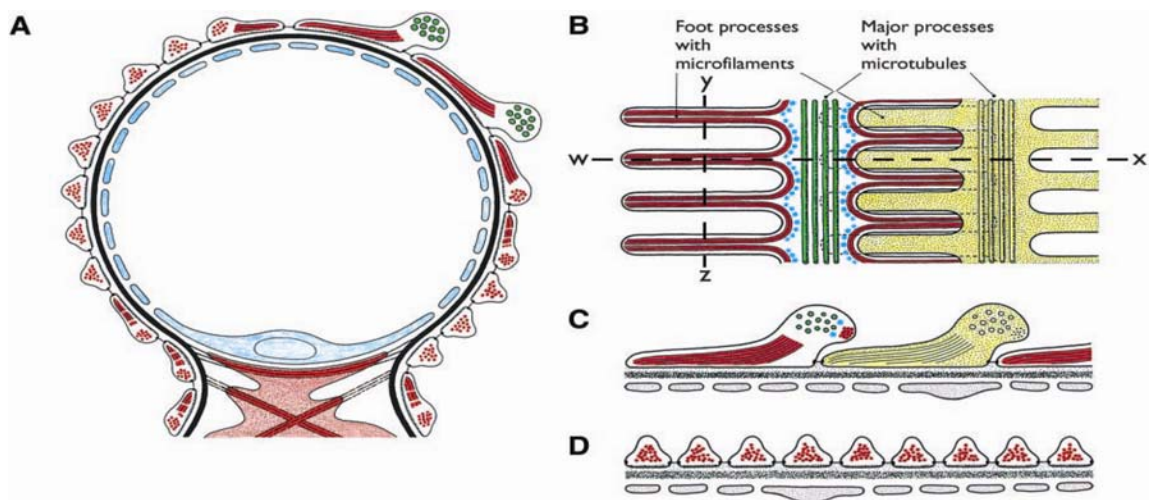


Abbildung 3.4 Aufbau des Cytoskeletts innerhalb der Podozyten-Fußfortsätze. Das Schema aus (Pavenstadt et al., 2003) zeigt einen Querschnitt durch eine Kapillarschlinge mit den aufsitzenden, sekundären Podozyten-Fußfortsätzen. Zwei primäre Fußfortsätze sind ebenfalls gezeigt (A). Die primären Fußfortsätze beinhalten longitudinal angeordnete Bündel von Mikrotubuli (grün). Details der Anordnung der cytoskeletalen Elemente in Podozyten-Fußfortsätzen wird in B-D gezeigt. B: Aufsicht auf zwei interdigitierende Podozyten-Fußfortsätze (weiß und gelb) mit Mikrotubuli in den primären Ausläufern (grün) und Actin-Filamenten (rot) in den sekundären Fußfortsätzen. Schema C korrespondiert zu der in B angezeigten w-x Linie und zeigt zwei primäre Ausläufer (weiß und gelb) mit ihren sekundären Fortsätzen. Die Actin-Filamente (rot) enden am basalen Ende der sekundären Fußfortsätze. D zeigt einen Schnitt entlang der y-z Linie von B. In den sekundären Ausläufern befindet sich nur ein auf Actin-Filamenten basierendes Cytoskelett (rot).

In nicht-muskulären Zellen ist Alpha-Actinin in die Organisation des kortikalen Cytoskeletts involviert und lokalisiert an Stressfasern und in Fokalkontakten, wo es mit einer Reihe von cytoskeletalen und membran-assoziierten Molekülen interagiert. Die bislang am besten definierte Funktion von Alpha-Actinin ist das Bündeln und Quervernetzen von Actin-Filamenten (Otey and Carpen, 2004).

Ein weiteres Protein, das innerhalb von ausdifferenzierten Podozyten mit Actin interagiert, ist Synaptopodin. Innerhalb der Niere ist die Expression von Synaptopodin auf Podozyten beschränkt und wird ansonsten nur noch innerhalb des Gehirns in Dendriten des Telencephalons exprimiert (Mundel et al., 1997a).

Wie bereits in 3.2.1 beschrieben ist das F-Actin des podozytären Cytoskeletts direkt oder indirekt über Adaptermoleküle an Transmembran-Proteine gebunden. Abweichungen in der Anordnung des Cytoskeletts durch F-Actin Umlagerung, Verlust von Adaptermolekülen bzw. Verlust der Verankerung des Cytoskeletts an die Membranmoleküle führen zu einer veränderten Podozyten-Morphologie, die mit einem Verlust der glomerulären Filtrationseinheit einhergeht (siehe hierzu Abschnitt 3.3.1)

3.3 Veränderungen der podozytären Schlitzmembran und Verlust der Filtrationsbarriere

Aufgrund von detaillierten ultrastrukturellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die vielfältigen Ursachen von glomerulären Erkrankungen auf eine einheitliche morphologische Alteration der Podozyten zurückzuführen ist (Remuzzi et al., 1993). Podozyten sind somit „Hauptverdächtige“ bei der Entwicklung von renalen Erkrankungen (Kriz, 2002).

Die verschiedenen glomerulären Erkrankungen führen häufig zu einem chronischen Nierenversagen mit drastisch erhöhten Proteinspiegeln im Urin (Proteinurie) und machen nicht selten eine Dialyse-Behandlung und/oder eine Nieren-Transplantation erforderlich. Die Proteinurie ist auf den Verlust der Siebfunktion durch morphologische Veränderungen der Podozyten und somit der Schlitzmembran zurück zu führen. Die Menge von Protein im Urin lässt auf den Grad des Ausfalls der Filtrationsbarriere bzw. die Menge der geschädigten, nicht mehr funktionstüchtigen Nephrone in der Niere

schließen. Zu Beginn einer Nieren-Erkrankung wird zunächst selektiv Albumin ausgeschieden, das durch die funktionstüchtige Filtrationsbarriere gerade noch aufgrund deren Größenselektivität zurückgehalten wird (siehe Abschnitt 3.2, (Reiser et al., 2000)). Albumin ist ein lösliches, monomeres Protein, das circa die Hälfte der Blutserum Proteine ausmacht und im Blut als Trägerprotein für Steroidhormone, Fettsäuren und Schilddrüsenhormone dient. Kleine Veränderungen an der podozytären Schlitzmembran gehen mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere und mit einem Austritt von Albumin in den Urin (selektive Proteinurie) einher. Größere Umstrukturierungen der Filtrationsbarriere haben eine unselektive Proteinurie zur Folge, die sich durch den Verlust von Makromolekülen auszeichnet. Dieser nicht kontrollierte Verlust von Makromolekülen führt unbehandelt zu Mortalität der Betroffenen.

Schädigung der Podozyten, zum Beispiel durch freie Radikale und ROS (reaktive Sauerstoff-Spezies), führt häufig zu einer Re-Organisation der Schlitzmembran und der Feinstruktur der sekundären Fußfortsätze. Bislang wurden vier Hauptursachen für die Entstehung der abgeplatteten, „Pfannkuchen-förmigen“ Fußfortsätze und dem damit einhergehenden Verlust der Filtrationsschlitz identifiziert (siehe Abbildung 3.5). Einige davon sind auf genetische Mutationen, andere auf erworbene Konditionen zurück zu führen (Barisoni and Mundel, 2003):

1. Beeinträchtigungen der Anordnung der Moleküle an der Schlitzmembran
2. Veränderungen an der apikalen Membran von Podozyten
3. Veränderungen der glomerulären Basalmembran oder der Adhäsion der Podozyten an die GBM
4. Abnormitäten des Actin-Cytoskeletts oder von cytoskelett-assoziierten Molekülen

Nach einem teilweisen Verlust von Nephronen kommt es zu einer kompensatorischen Hyperfiltration der verbleibenden. Dies geht einher mit einer Hypertrophie der Podozyten und einer Verbreiterung der sekundären Fußfortsätze. Die Podozyten sind die einzigen postmitotischen Zellen des Glomerulus. Unter pathologischen Bedingungen konnten bei Podozyten *in vivo* bislang nur Kernteilungen, aber keine erneuten Zellteilungen beobachtet werden ((Nagata et al., 1995) und (Nagata et al., 1993)). Da ausdifferenzierte Podozyten nach Abschluß der Organogenese nicht mehr zu

mitotischer Zellteilung befähigt (Kriz et al., 1994; Rennke, 1994) sind, macht sich der Verlust dieses Zelltyps bei renalen Erkrankungen besonders deutlich bemerkbar.

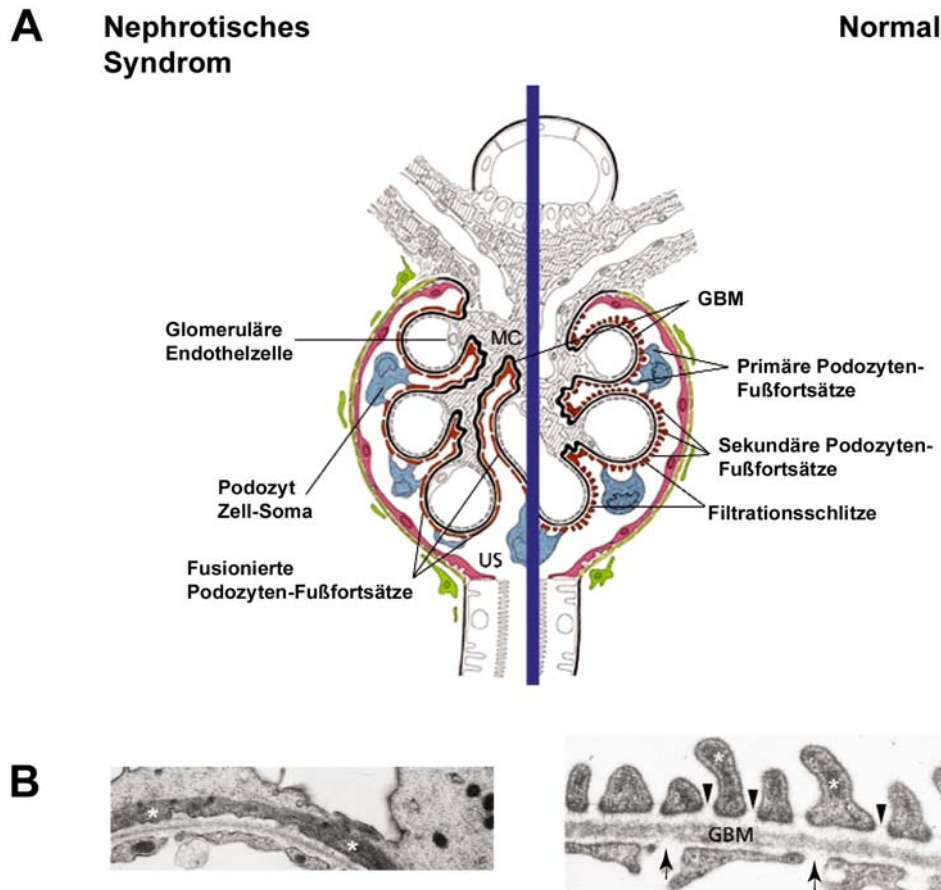


Abbildung 3.5 Veränderung der Podozyten-Fußfortsätze bei Nierenerkrankungen. A zeigt die Struktur eines Glomerulus im Querschnitt. Auf der rechten Seite die Ansicht eines gesunden Glomerulus; in der linken Hälfte ein Glomerulus mit seinen morphologischen Veränderungen bei Erkrankungen. GBM, glomeruläre Basalmembran; MC, Mesangialzellen; US, Lumen der Bowman-Kapsel. B: Ultrastruktur der Podozytenfußfortsätze anhand von Elektronenmikroskopie. Die Abbildung zeigt den Zustand der Podozyten in einer gesunden und in einer krankhaft veränderten Säuger-Niere. Die Pfeile zeigen das fenestrierte Endothelium und die Pfeilköpfe die Filtrationsschlitze zwischen Podozytenfußfortsätzen mit der Schlitzmembran an. Der Stern (*) markiert die Lokalisation der Actin-Filamente. Bei einem Nephrotischen Syndrom mit starker Proteinurie sind keine einzelnen Fußfortsätze mehr erkennbar und das dichte Band an Actin-Filamenten verläuft parallel zu der GBM. Abbildung modifiziert nach (Somlo and Mundel, 2000).

3.3.1 Proteinurie durch Veränderungen an Schlitzmembran und Cytoskelett

Sekundäre Podozyten-Fußfortsätze besitzen ein aufwendiges und dynamisches, auf Actin-Filamenten basierendes Cytoskelett. Dieses Cytoskelett erhält die komplizierte Architektur der Podozyten-Fußfortsätze und die exakte Positionierung der Transmembran-Moleküle entlang der Schlitzmembran aufrecht (Barisoni and Mundel, 2003). Veränderungen an der Podozyten-Schlitzmembran oder des podozytären Cytoskeletts führen zur Ausscheidung von hochmolekularen Proteinen im Urin.

Im Jahr 1998 erfolgte die positionelle Klonierung des Gens, das für die Entstehung des kongenitalen nephrotischen Syndroms des finnischen Typs (CNF) verantwortlich ist (Kestilä et al., 1998). Bei CNF handelt es sich um eine hereditäre Form von Nierenerkrankung, die mit massiver Proteinurie einhergeht. Betroffene Kinder sind nur durch eine bilaterale Nephrektomie mit anschließender Nierentransplantation im ersten Lebensjahr zu retten. In den Nieren der betroffenen Kinder sind die Podozyten-Fußfortsätze vollständig abgeflacht und nicht in der Lage eine adäquate Schlitzmembran zu bilden. Bei dem defekten Gen handelt es sich um NPHS-1, das für das Schlitzmembran-Molekül Nephrin codiert. Nephrin^{-/-} Mäuse zeichnen sich ebenfalls durch eine starke Proteinurie und durch den Verlust der Podozyten-Fußfortsätze aus (Putala et al., 2001). Erst kürzlich wurde durch Retrovirus-vermittelte Mutagenese („Gene Trapping“) das Podozyten-Protein Neph-1 identifiziert, dessen Aufbau mit IgG-ähnlichen Domänen stark dem von Nephrin gleicht (Donoviel et al., 2001). Der homozygote *Knock-out* des Neph-1 Gens führt ebenfalls zu verbreiterten Fußfortsätzen und Proteinurie (Donoviel et al., 2001).

Die Funktion der beiden Mitglieder der Cadherin Superfamilie, P-Cadherin und FAT, in der Niere wurden ebenfalls durch *knock-out* Mäuse analysiert. Hierbei zeigte sich, dass P-Cadherin^{-/-} Mäuse lebensfähig und fertil sind und dabei keine Schädigungen der Niere aufweisen (Radice et al., 1997). Auch Menschen, die eine Mutation im CDH3-Gen, das für P-Cadherin codiert, aufweisen, zeigen zwar Haar- und Netzhautprobleme, jedoch keinen renalen Phänotyp (Sprecher et al., 2001). Mäuse, denen das Protein FAT fehlt, sterben perinatal. Die Glomeruli zeichnen sich durch das Fehlen der Schlitzmembran und einer Fusion der sekundären Podozyten-Fußfortsätze aus (Ciani et al., 2003).

Die Funktion von Podocin wurde ebenfalls durch positionelle Klonierung entdeckt. Podocin wird von dem Gen *NPHS-2* codiert und Mutationen innerhalb dieses Gens folgen einem autosomal rezessiven Erbgang. Entdeckt wurde die mutierte Variante in Familien mit einer vererblichen Form der FSGS (Boute et al., 2000b). Podocin *knock-out* Mäuse zeigen ebenfalls einen eindeutig renalen Phänotyp mit starker Proteinurie. Die Fußfortsätze sind in den *-/-* Mäusen nur noch fokal erkennbar und unregelmäßig in Form und Größe. Die Schlitzmembran wurde durch eine andere Art von Zell-Zell-Kontakten ersetzt. Aufgrund des starken Proteinverlustes sterben die Tiere perinatal (Roselli et al., 2004).

Im Jahr 1999 zeigten Shih und Kollegen, dass Mäuse, denen das Gen für CD2AP fehlt, eine starke Proteinurie aufweisen und eine deutliche Verbreiterung der Podozyten-Fußfortsätze aufzeigen (Shih et al., 1999).

Die molekularen Komponenten des Cytoskeletts der sekundären Podozyten-Fußfortsätze sind hauptsächlich Actin und Alpha-Actinin (Andrews, 1981; Drenckhahn and Franke, 1988). Die Entwicklung der stark verbreiterten Podozyten-Fußfortsätze wird begleitet durch eine Umverteilung von F-Actin und Alpha-Actinin (siehe Abbildung 3.5 B) und der Disaggregation von podozytären Actin Mikrofildamenten (Ito et al., 1986; Whiteside et al., 1993). Auch die Dynamik des submembranösen, kortikalen Actin Netzwerks ist in den abgeflachten Fußfortsätzen schwerwiegend verändert (Kerjaschki, 2001). Synaptopodin, ein ebenfalls Actin-assoziiertes Protein (Mundel et al., 1991), interagiert in differenzierten Podozyten mit MAGI-1 und Alpha-Actinin-4 (Patrie et al., 2002). Allerdings zeigen Synaptopodin *knock-out* Tiere keine spontanen Veränderungen der Fußfortsatz-Morphologie (Deller et al., 2003).

Dem cytoskeletalen Protein Alpha-Actinin-4 kommt innerhalb von Podozyten eine besondere Bedeutung zu. Im Jahr 2000 wurde (Kaplan et al., 2000) gezeigt, dass Mutationen im Gen für Alpha-Actinin-4, *ACTN4*, für eine hereditäre Form der Fokalen Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) verantwortlich sind. Die Tatsache, dass Mutationen innerhalb von *ACTN4* eine glomeruläre Erkrankung auslösen können, zeigt, dass Alpha-Actinin-4 eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Struktur der podozytären Fußfortsätze bzw. der Schlitzmembran zukommt. Die Bindung von mutiertem Alpha-Actinin-4 an Actin ist im Vergleich zu wildtyp Alpha-Actinin-4 deutlich erhöht (Kaplan et al., 2000). Die weitere Analyse der Alpha-Actinin-4

Mutationen erfolgte anhand von zwei Tiermodellen. Alpha-Actinin-4 *knock-out* Mäuse zeigten ultrastrukturell zunächst eine milde Störung der Fußfortsatz-Architektur. Mit zunehmendem Alter entwickelten die *knock-out* Tiere, verglichen mit den gleichaltrigen wildtyp Tieren, fokale Areale mit Fußfortsatz-Veränderungen und einer stellenweise verdickten GBM. Die homozygoten *knock-out* Tiere entwickelten eine progressive Proteinurie (Kos et al., 2003). In einem zweiten Ansatz wurden „*knock-in*“ Mäuse generiert, die eine mutierte Form von *ACTN4* exprimieren. Diese Tiere zeigten nur teilweise eine Manifestation des erwarteten Phänotyps. Tiere, die eine Proteinurie entwickelten, zeigten auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Retraktion der Podozyten-Fußfortsätze. Die mRNA- und Protein-Spiegel für mutiertes Alpha-Actinin-4 waren in diesen Tieren deutlich erhöht. Das Schlitzmembran-Molekül Nephrin hingegen wurde reprimiert. Mäuse mit normal ausgebildeten Fußfortsätzen zeigten auch keine erhöhten Protein-Ausscheidungen im Urin (Michaud et al., 2003). Der genetische *Knock-out* des Actin-bündelnden Moleküls Alpha-Actinin-4 führt zu denselben podozytären Schädigungen, wie der Verlust der Proteine Nephrin, Neph-1, CD2AP, α 3-Integrin oder Podocalyxin. Das führt zu dem Schluß, dass Alpha-Actinin-4 und ein intaktes Actin-Cytoskelett unverzichtbar für die Podozyten-Architektur sind.

3.3.2 Zell-Matrix Interaktion von Podozyten und ILK-Signaltransduktion

Die Adhäsion der Podozyten an die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist für den Erhalt der renalen Filtrationsbarriere von großer Bedeutung. Ablösung der Podozyten von der GBM durch Apoptose, Nekrose oder durch den Verlust der adhäsiven Zell-Matrix Interaktion führt dazu, dass Podozyten aus der Niere ausgeschwemmt werden (Vogelmann et al., 2003).

Die Adhäsion der Podozyten wird durch Dystroglycan und α 3 β 1-Integrine vermittelt, die beide intrazellulär am podozytären Cytoskelett verankert sind. Die Rolle und Funktion des podozytären Dystroglycan-Komplexes ist bislang noch weitgehend unklar. Eine Verminderung der Dystroglycan mRNA-Expression führt zu Minimal-Change-Disease (MCD; siehe auch 3.3.4) mit Proteinurie und abgeflachten Fußfortsätzen, ist aber bei anderen Nierenerkrankungen wie zum Beispiel der FSGS nicht erkennbar

(Regele et al., 2000). Dystroglycan steht über die α - δ Sarcoglycane mit den α 3 β 1-Integrinen in engem Kontakt (Yoshida et al., 1998).

Integrine sind ebenfalls heterodimere Membranproteine, bei denen jedoch beide Untereinheiten einen transmembranären Bereich besitzen. Mit ihrer globulären Domäne binden sie an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM). Über ihr cytoplasmatisches Ende stehen sie über Proteine der Fokalkontakte wie Talin, Vinculin, Paxillin, ILK (Integrin-linked Kinase) und Alpha-Actinin mit dem Actin-Cytoskelett in Verbindung (Drenckhahn and Franke, 1988; Otey et al., 1993). Bereits vor zehn Jahren wurden der basalen Membran des Podozyten-Fußfortsatzes α 3 β 1-Integrine zugeordnet (Kerjaschki et al., 1989). Mit *knock-out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass α 3-Integrin essentiell an der Bildung der Fußfortsätze beteiligt ist. Alle Tiere starben kurz nach der Geburt an akuter Proteinurie und zeigten eine erhebliche Verbreiterung der Podozyten-Fußfortsätze (Kreidberg et al., 1996). Eine Blockade der extrazellulären β 1-Integrin Bindungsdomäne mit spezifischen Antikörpern führt in Mäusen zu einer Proteinurie durch Inhibition der Podozyten-Adhäsion (Adler and Chen, 1992; Adler et al., 1996). In unterschiedlichen humanen Nierenerkrankungen und im Tiermodell (PAN-behandelte Ratten) fand sich eine gesteigerte Expression der β 1-Untereinheit (Baraldi et al., 1995; Regoli and Bendayan, 1997; Smoyer et al., 1997). Die Lokalisation der α 3 β 1-Integrine bei FSGS und anderen glomerulären Erkrankungen, die eine deutlich veränderte Morphologie der Podozyten aufweisen, bleibt jedoch unverändert (Kerjaschki, 2001).

3.3.2.1 Integrin-Signaltransduktion durch die Integrin-linked Kinase (ILK)

Die Adhäsion von Zellen wird durch Multiprotein-Komplexe aus Adhäsions-Rezeptoren, Proteinen der extrazellulären Matrix und cytoplasmatischen Molekülen vermittelt. Rezeptoren, die für die Adhäsion verantwortlich sind, bestimmen die Spezifität der Zell-Zell oder Zell-Matrix Interaktionen und rekrutieren intrazellulär cytoplasmatische Proteine zu den Fokaladhäsionen, wo sie mit den cytoplasmatischen Bereichen der Rezeptoren interagieren. Diese Proteine übertragen zum einen Signale von außen in die Zelle (*Outside-in Signaling*) zum anderen leiten sie intrazelluläre

Ereignisse nach außen weiter (*Inside-out Signaling*). Die Integrine sind eine große Familie von Adhäsions-Rezeptoren mit mehr als 20 Mitgliedern, die ihre Bindung bzw. Ablösung durch Konformationsänderung erzielen. Sie sind in der Lage, durch Signaltransduktion biologisch wichtige Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Migration und Cytoskelett-Organisation zu regulieren (Hynes, 2002).

Ein cytoplasmatisches Protein, das in den Fokalkontakten lokalisiert und eine zentrale Rolle bei der Integrin Aktivierung und Signaltransduktion spielt, ist die Integrin-linked Kinase (ILK). Die ILK wurde 1996 durch einen Yeast two-Hybrid Screen entdeckt, bei dem die cytoplasmatische Domäne des $\beta 1$ -Integrins als „Bait“ verwendet wurde. Weitere Studien ermittelten auch die cytoplasmatische Untereinheit von $\beta 3$ Integrin als Bindungspartner für die ILK (Hannigan et al., 1996). Die ILK besteht aus 452 Aminosäuren, die in drei strukturelle Domänen unterteilt sind. Am N-Terminus befinden sich 4 Ankyrin-Repeats, gefolgt von einer Pleckstrin-Homologie Domäne, an die Phosphoinositoltrisphosphat (PIP3) binden kann. Am C-terminalen Bereich des Moleküls befindet sich eine Kinase-Domäne mit einer Serin-Threonin Kinaseaktivität, was durch *in vitro* Kinase-Assays mit rekombinantem und aus Zellextrakten immunpräzipitiertem Protein gezeigt wurde (Hannigan et al., 1996).

Neben der Kinaseaktivität scheinen auch die „Scaffolding“ Eigenschaften der ILK in den Fokaladhäsionen eine große Rolle zu spielen. Bislang wurden 10 Interaktionspartner beschrieben. Die LIM-Domänen Proteine PINCH-1 und PINCH-2 binden an die Ankyrin-Repeats (Velyvis et al., 2001; Zhang et al., 2002a). Innerhalb der Ankyrin-Repeats bindet auch ILKAP (ILK-associated phosphatase), das in der Lage ist, die ILK-Aktivität negativ zu regulieren (Leung-Hagesteijn et al., 2001). An die Pleckstrin Homologie-Domäne bindet Phosphoinositoltrisphosphat (PIP3) (Delcomenne et al., 1998). Das Protein des Tumor Suppressor-Gens PTEN (protein tyrosine phosphatase and tensin homolog) kann durch die Dephosphorylierung von Phosphoinositoltrisphosphat zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat die Kinaseaktivität der ILK ebenfalls negativ beeinflussen (Hannigan et al., 2005). An die Kinase-Domäne der ILK bindet über dessen LD1 Motiv das Fokaladhäsions-Protein Paxillin (Nikolopoulos and Turner, 2001) und die beiden nahe verwandten Proteine α - und β -Parvin über deren CH2-Domänen (Tu et al., 2001; Wu, 2004; Yamaji et al., 2001). β -

Parvin ist ebenfalls in der Lage, die Kinase-Aktivität der ILK zu inhibieren (Mongroo et al., 2004).

Bislang wurde gezeigt, dass die ILK in die Phosphorylierung von folgenden Molekülen involviert ist: PKB/Akt, GSK-3 β (Glycogen-Synthase-Kinase 3 β) (Delcommenne et al., 1998), β 1-Integrin (Hannigan et al., 1996), β -Parvin (Yamaji et al., 2001), MLC-20 (Myosin Light Chain-20) (Deng et al., 2001), MYPT-1 (Myosin phosphatase target subunit 1) (Muranyi et al., 2002), CPI-17 (proteinkinase-c-dependent phosphatase inhibitor of 17 kDa) (Deng et al., 2001), PHI-1 (Phosphatase holoenzyme inhibitor 1) (Deng et al., 2001) und α -NAC (nascent polypeptide-associated complex and co-activator α) (Quelo et al., 2004).

Die ILK ist ein nachgeschalteter Effektor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) und aktiviert PKB/Akt zusammen mit der Phosphoinositide-dependent Kinase 1 (PDK-1) durch Phosphorylierung von Serin 473 (Delcommenne et al., 1998). Aktivierte PKB/Akt und die ILK sind beide in der Lage, die GSK-3 β zu phosphorylieren und so deren Aktivität zu hemmen (Delcommenne et al., 1998). Eine Inhibition der GSK-3 β Aktivität führt zu einer Akkumulation von β -Catenin in den Zellen, zu dessen Translokation in den Nucleus und zur *de novo* Synthese von LEF-1 (lymphoid enhancer factor 1) (Novak et al., 1998). LEF-1 und β -Catenin formen einen Komplex und induzieren die Expression von Genen wie Cyclin und c-myc (Novak and Dedhar, 1999; Radeva et al., 1997b). Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über Protein-Protein Interaktionen und die Signaltransduktion der ILK (Abbildung 3.6).

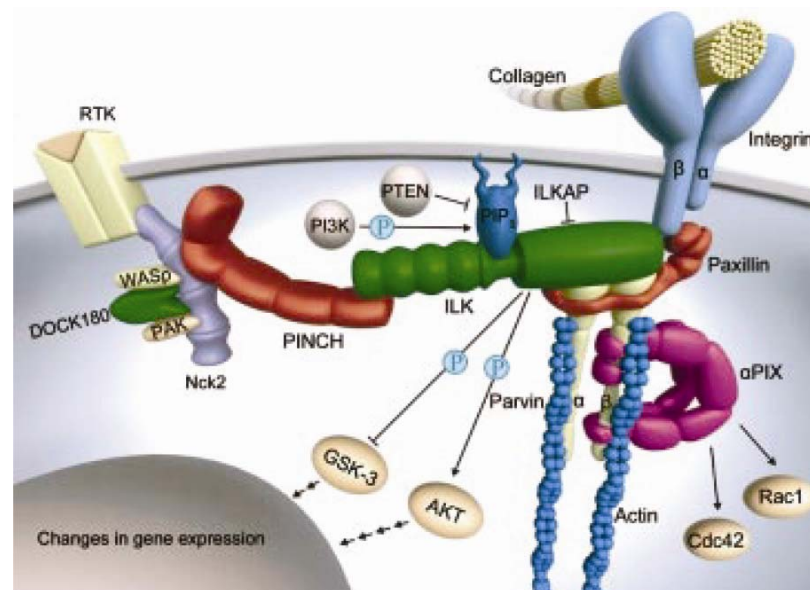


Abbildung 3.6 Integrin-Signaltransduktion und Bindungspartner der Integrin-linked Kinase (ILK). Überblick über die ILK-vermittelten Ereignisse der Integrin-Signaltransduktion und die bereits beschriebenen Bindungspartner (Brakebusch and Fassler, 2003).

3.3.2.2 ILK koppelt Integrine an das Cytoskelett

Mackinnon und Mitarbeiter zeigten anhand von $\beta 1$ -Integrin $^{-/-}$ Nematoden *Caenorhabditis elegans*, dass die ILK nicht mehr fähig ist, in die Zell-Matrix-nahen Fokalkontakte zu lokalisieren (Mackinnon et al., 2002). Das Fehlen der Integrin-linked Kinase in einem weiteren Modell-Organismus, der *Drosophila melanogaster*, führt dazu, dass F-Actin Mikrofilamente nicht mehr an die Integrine gekoppelt werden können (Zervas et al., 2001). In Mammaliern ist das Fehlen der ILK embryonal letal (Sakai et al., 2003).

Innerhalb des Cytoplasmas bildet die ILK zunächst mit PINCH und Parvin einen ternären Komplex, der dann zu Integrinen an der Zell-Matrix Adhäsion rekrutiert wird. Ein Verlust der ILK Expression in Zellen führt zu einer Degradation von PINCH und Parvin. Ein Verlust von PINCH vermindert im Gegenzug auch die Spiegel von ILK und Parvin (Fukuda et al., 2003; Zhang et al., 2002b). Die Interaktion von ILK und Paxillin ist für die Lokalisation des ILK-PINCH-Parvin Komplexes in die Fokalkontakte von großer Bedeutung, denn Mutationen innerhalb der Bindungsregion für Paxillin in der

ILK verhindern die Lokalisation des ternären Komplexes in Fokalkontakte (Nikolopoulos and Turner, 2001).

Die Phosphorylierung von β -Parvin durch die ILK ist für dessen Interaktion mit Alpha-Actinin von großer Bedeutung, denn der intakte ILK-Parvin-Actinin-Komplex wird an F-Actin gekoppelt (Yamaji et al., 2001). Neuere Studien weisen darauf hin, dass Rac und Rho nachgeschaltete Ziele des ILK-PINCH-Parvin Komplexes sind und die ILK dadurch auch einen Einfluß auf die Cytoskelett Dynamik besitzt (Khyrul et al., 2004; Zhang et al., 2004). Die Regulation erfolgt vermutlich über den Guanine nucleotide exchange factor (GEF) α -PIX (PAK-interactive exchange factor α), der an β -Parvin bindet (Mishima et al., 2004). Der Einfluß der ILK auf das Cytoskelett entsteht somit sowohl über deren Kinaseaktivität als auch über deren Funktion als Adaptermolekül.

3.3.2.3 ILK in pathologisch veränderten Nieren

Der erste Hinweis auf eine ILK-Regulation bei glomerulären Nierenerkrankungen wurde durch ein Expressions-Screening mit Glomeruli von Kindern mit CNF (Congenitales Nephrotisches Syndrom des Finnischen Typs) entdeckt. In diesen Proben fand sich eine Hochregulation der ILK auf mRNA Ebene (Kretzler et al., 2001a). Bei *in vitro* Experimenten mit Podozyten fand sich zusätzlich eine Induktion der Kinase-Aktivität der ILK. Eine Hochregulation von ILK mRNA und Protein fand sich ebenfalls in diabetischen Glomeruli und in *in vitro* Hochglucose-Experimenten mit renalen Mesangialzellen (Guo et al., 2001). In zwei gängigen Tiermodellen (GH-transgene Mäuse und der Nephrotoxischen Serum Nephritis) wurde ebenfalls eine glomeruläre ILK Induktion festgestellt (Kretzler et al., 2001a).

Die vermehrte Ablagerung von Proteinen der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin) in die GBM ist ein Kennzeichen für Glomerulopathien. Experimentelle Studien mit glomerulären Mesangialzellen haben gezeigt, dass die Inhibition der Formation des ILK-PINCH-Parvin Komplexes die Ablagerungen von Fibronectin deutlich reduzieren können (Guo and Wu, 2002). Der Einfluß auf die extrazelluläre Matrix der GBM durch die ILK kann auch mittels Matrix Metalloproteinasen erfolgen. Eine Induktion der MMP-9 kann eine weitere Umgestaltung der GBM veranlassen und die Schädigung der Filtrationsbarriere vorantreiben. In geschädigten bzw. gestressten Podozyten *in vitro*

wird die Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) auf mRNA Ebene induziert. Diese MMP-9 Induktion konnte durch die Gabe des kleinmolekularen ILK-Inhibitors MC-5 blockiert werden (von Lutichau et al., 2002).

Die ILK ist über nachgeschaltete Elemente des *Wnt* Signaltransduktionsweges auch in der Lage, einen mesenchymalen Phänotyp in Epithelzellen zu induzieren (Novak et al., 1998). In einer kürzlich erschienen Publikation zeigen Li und Mitarbeiter (Li et al., 2003), dass eine TGF- β 1-abhängige ILK Aktivierung bei der epithelialen zu mesenchymalen Transition (EMT) in Tubulo-interstitieller Fibrose involviert ist. Renale Zellen, die eine EMT durchlaufen, weisen eine Repression des epitheliale Markers E-Cadherin und eine gesteigerte Produktion und Exkretion von Fibronectin auf. TGF- β 1 stimuliert die ILK und PKB/Akt Aktivität (Lee et al., 2004). Eine Überexpression von ILK kann den zuvor beschriebenen TGF- β 1 Effekt imitieren (Li et al., 2003). In glomerulären und tubulären Epithelzellen ist die ILK maßgeblich an der Entstehung eines mesenchymalen Phänotyps beteiligt und nutzt hierfür nachgeschaltete Elemente des *Wnt*-Signaltransduktionsweges.

3.3.3 Proteasomische Degradation von mutierten Schlitzmembran-Molekülen

Mutationen innerhalb des Nephtrin Gens NPHS-1 führen zu der autosomal rezessiv vererbten Erkrankung CNF (Congenitales Nephrotisches Syndrom des Finnischen Typs), die sich durch eine sehr starke, unselektive Proteinurie auszeichnet. Immunfluoreszenzen von Zellen, die die mutierte Form von Nephtrin stabil exprimieren, zeigen das modifizierte Protein nur innerhalb des Endoplasmatischen Reticulums (ER) und nicht an seiner vorgesehenen Lokalisation an der Zellmembran. Weitere Analysen mittels Sucrose-Gradientenzentrifugation stützen die Immunfluoreszenz-Daten zusätzlich. Es steht zur Diskussion, dass die mutierten Nephtrin-Moleküle die Qualitätskontrolle im ER nicht passieren und proteasomal degradiert werden (Liu et al., 2001).

Mutierte Formen von Podocin findet sich ebenfalls hauptsächlich innerhalb des ER und nicht entlang der Zellmembran (Ohashi et al., 2003). Für mutiertes Alpha-Actinin-4, das eine vererbliche Form von FSGS (Fokal Segmentale Glomerulosklerose; siehe auch

3.3.1) auslöst, zeigten Yao und Mitarbeiter Mitte 2004, dass dessen schnelle Degradation durch die zelleigenen Proteasomen erfolgt (Yao et al., 2004).

3.3.3.1 Aufbau und Funktion von Proteasomen

Proteasomen sind große Proteinkomplexe, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und mit ihren Proteasen polyubiquitinierte Proteine in Peptide zerlegen. Sie befinden sich frei im Cytosol oder sind an das ER der Zelle gebunden (Bochtler et al., 1999). Proteasomen nutzen einen einzigartigen Substrat-Erkennungsmechanismus, denn ihre Substrate werden üblicherweise mit einem Protein namens Ubiquitin kovalent modifiziert (Pickart and Cohen, 2004).

Das eukaryotische 26S Proteasom setzt sich aus einem faßähnlichen 20S *Core*-Partikel, der die katalytische Einheit beherbergt, und aus ein oder zwei 19S regulatorischen Partikeln zusammen (siehe Abbildung 3.7). Die 20S Einheit besteht aus zwei ringförmigen α - und zwei ebenfalls ringförmigen β -Untereinheiten, die sich ihrerseits aus je sieben Untereinheiten zusammensetzen: α_{1-7} , β_{1-7} , β_{1-7} , α_{1-7} (Baumeister et al., 1998). Die mittig liegenden β -Untereinheiten enthalten die katalytischen Einheiten (Proteasen). Diese Proteasen werden von jeweils drei Untereinheiten eines β -Rings beherbergt. Somit besitzt das eukaryotische Proteasom insgesamt sechs proteolytisch aktive Einheiten (Groll et al., 1997). Die α -Untereinheit bildet eine Art Vorkammer, deren Funktion bislang noch nicht aufgeklärt ist (Pickart and Cohen, 2004).

Die 19S regulatorische Einheit unterteilt sich nochmals in zwei Komplexe: die „*Base*“ (Basis) und den „*Lid*“ (Deckel). Beide setzen sich wiederum aus mindestens 17 verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die Basis grenzt an die α -Untereinheit des 20S Partikels und enthält alle sechs ATPasen des 19S Partikels. Diesen Untereinheiten kommt eine wichtige Funktion zu: Die Erkennung von polyubiquitinierten Proteinen (Glickman et al., 1998; Thrower et al., 2000). Die 19S Einheit reguliert das Entfalten des Substrates und den Zugang zur katalytischen Einheit (Ciechanover, 2005; Glickman, 2000).

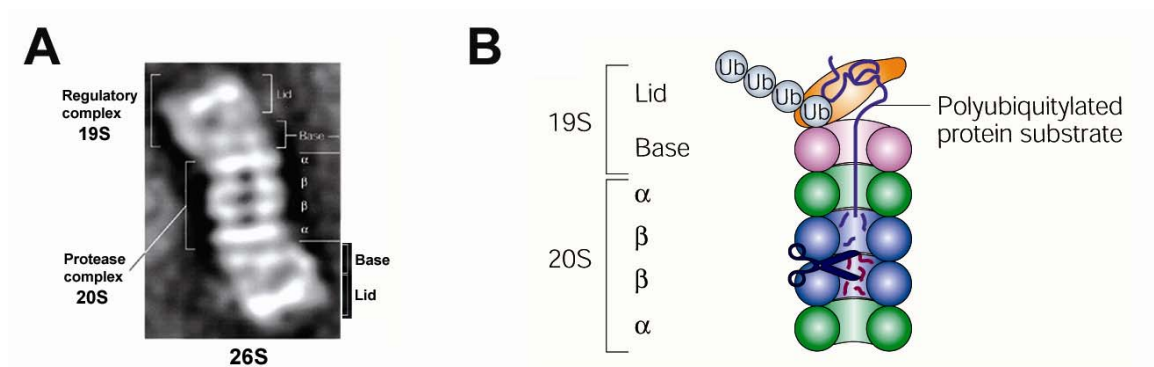


Abbildung 3.7 Aufbau von Proteasomen. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines 26S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* (A). Die schematische Darstellung eines 26S Proteasoms zeigt dessen Struktur und Funktion (B). Abbildungen nach (Ciechanover, 2005) und (Pickart and Cohen, 2004).

In der Regel geht der Degradation eines Proteins eine Markierung mit einer Polyubiquitin-Kette voraus. Ubiquitin ist ein stark konserviertes Protein mit 76 Aminosäure-Resten (ca. 8 kDa), das typischerweise durch K48-Verknüpfungen zu Polyubiquitin-Ketten verbunden wird (Weissman, 2001). Die Ubiquitinierung von Proteinen resultiert aus einer sequentiellen Reaktion von drei verschiedenen Enzymklassen (E1, E2 und E3). Zunächst erfolgt eine ATP-abhängige Aktivierung von freiem Ubiquitin durch ein Ubiquitin aktivierendes Enzym (E1). Das aktivierte Ubiquitin wird im Anschluss auf ein Protein der Klasse E2 (Ubiquitin konjugierendes Enzym) transferiert. Das Enzym E2 assoziiert mit einem Enzym der Klasse E3 (Ubiquitin Protein Ligase), das vermutlich schon an das Substrat gebunden ist, und ermöglicht eine kovalente Bindung von Ubiquitin und einem internen Lysin-Rest des Substrates oder an ein bereits an das Substrat gebundenes Ubiquitin (Hershko and Ciechanover, 1998) (siehe Abbildung 3.8). Eine Kette aus mindestens vier Ubiquitinen ist für die Erkennung und den Abbau durch das 26S Proteasom notwendig.

Die Hauptaufgabe von Ubiquitin scheint die Protein-Degradation zu sein, es besitzt jedoch auch Aufgaben außerhalb dieses Mechanismus (Bochtler et al., 1999).

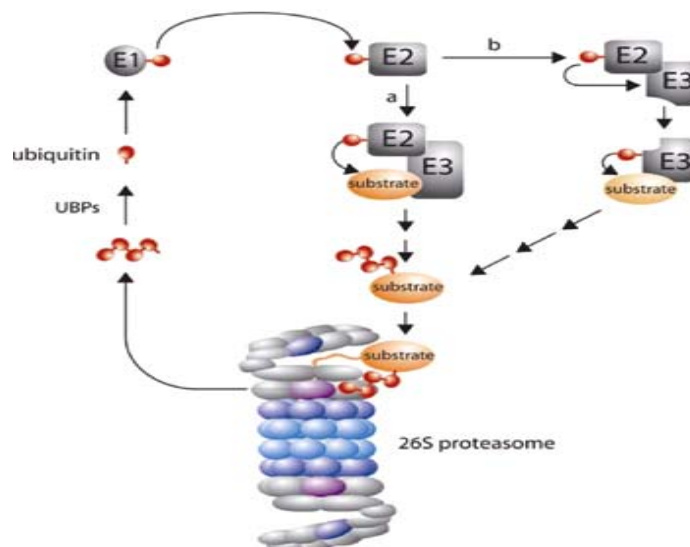


Abbildung 3.8 Ubiquitin-abhängige Degradation von Proteinen. Die Polyubiquitinkette wird über drei Klassen von Enzymen (E1, E2 und E3) an das zu degradierende Protein (Substrat) gekoppelt. Die Erkennung des so modifizierten Substrates erfolgt an der 19S Untereinheit des 26S Proteasoms. Die Degradation findet in den β -Untereinheiten des Proteasoms (20S Partikel) durch Proteasen statt. Schema aus (Wolf, 2004).

3.3.4 Experimentelle Modelle humaner glomerulärer Erkrankungen

Das Versagen der glomerulären Filtrationsbarriere ist die häufigste Ursache für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz. Von der Vielzahl glomerulärer Erkrankungen wurden folgende in dieser Arbeit analysiert:

Membranöse Glomerulopathie (MGN): Bei der membranösen Glomerulopathie ist vorwiegend die glomeruläre Basalmembran betroffen, die deutlich verdickt ist. Die Verdickung ist auf eine vermehrte Ablagerung von Immunkomplexen auf der podozytären Seite der Basalmembran zurückzuführen.

Minimal Change Disease (MC; Minimale Glomerulonephritis): Bei dieser Form der Erkrankung, die häufig Kleinkinder betrifft, sind die Veränderungen in den Glomeruli lichtmikroskopisch nicht erkennbar und entsprechen einem Normalbefund. Das einzige Anzeichen für eine Erkrankung sind hier fettige Ablagerungen in Bereich des proximalen Tubulus oder eine minimale Mesangium-Proliferation. Elektronenmikroskopisch lässt sich jedoch eine gestörte Architektur des Glomerulus mit verbreiterten Podozytenfußfortsätzen erkennen.

IgA-Nephritis (IgA; Berger-Nephritis): Die IgA-Nephritis ist die häufigste Form der Glomerulopathien im Erwachsenenalter. Immunfluoreszenzmikroskopisch werden im Bereich des Mesangiums Depots von IgA-Antikörpern gefunden. 20% aller Fälle mit terminaler Niereninsuffizienz sind auf eine IgA-Glomerulonephritis zurückzuführen.

Primäre Fokal Segmentale Glomerulosklerose (FSGS): Wie der Name dieser Glomerulopathie bereits sagt sind fokale Glomeruli beider Nieren betroffen. Innerhalb der betroffenen Glomeruli sind wiederum nur einzelne Kapillarschlingen-Segmente befallen (segmental). Andere Kapillarschlingen erscheinen normal. Immunhistologische Schnitte mit PAS-Färbung zeigen eine Verödung (Hyalinose) von Schlingenanteilen im Glomerulus und oft eine Vermehrung der Mesangiummatrix. Unbehandelt erfolgt ein Fortschreiten zur terminalen Niereninsuffizienz.

Lupus Nephritis (LN): Im Gegensatz zu den oben erwähnten Erkrankungen (primäre GN) handelt es sich hierbei um eine sekundäre Glomerulopathie. Der auslösende Faktor ist eine Allgemeinerkrankung des rheumatischen Formenkreises, der Lupus erythematodes. Diese Erkrankung kann neben der Niere auch zahlreiche andere Organsysteme befallen (Dermatitis, Arthritis, Perikarditis, ZNS und andere).

Murine Tiermodelle glomerulärer Schädigung:

Zwei vielfach genutzte Tiermodelle für die Analyse von Glomerulopathien sind die Puromycin Aminonucleosid (PAN)-induzierte Glomerulosklerose in der Ratte und das entsprechende Tiermodell in der Maus, bei dem die Nierenschädigung durch Injektionen von Adriamycin (ADR) herbeigeführt wird.

Puromycin Aminonucleosid (PAN) in der Ratte: Das bekannteste Tiermodell zur Analyse des nephrotischen Syndroms ist die Nephropathie, die durch Puromycin Aminonucleosid (PAN) in Ratten ausgelöst wird. Im Jahr 1962 wurden erstmals die Veränderungen der Podozyten in diesem Modell beschrieben (Lannigan et al., 1962). Es entspricht zu einem frühen Zeitpunkt dem Erscheinungsbild der Minimal Change Disease und im späteren Verlauf der FSGS im Menschen (Anderson et al., 1988). Bei PAN Injektionen in Ratten sind die Podozyten das primäre Ziel der Schädigung. Sie zeigen eine Retraktion der Fußfortsätze einhergehend mit verminderter Adhäsion (Lannigan et al., 1962). In der *in vitro* Podozyten-Zellkultur wird Puromycin als „stressauslösendes“ Agens für die Erforschung der pathogenen Mechanismen verwendet (Fishman and Karnovsky, 1985; Smoyer and Ransom, 2002).

Adriamycin (ADR)-induzierte Nephropathie in der Maus: Mäuse sind gegenüber Puromycin Aminonucleosid resistent und entwickeln nach einer Injektion keine Nierenschädigung (Fogo, 2003). Das Modell der ADR-induzierten Nephropathie wurde zunächst in männlichen Wistar-Ratten etabliert und löst - wie bei der PAN-induzierten Nephropathie - ein Krankheitsbild ähnlich der Minimal Change Disease in den Nieren der behandelten Tiere aus (Bertani et al., 1982). Im Gegensatz zu PAN kann ADR auch in Mäusen einen Nierenschaden erzeugen, der dem einer humanen FSGS entspricht (Chen et al., 1998; Wang et al., 2000).

Bei beiden Tiermodellen wird oxidativer Stress durch die direkte Reduktion von PAN bzw. ADR oder durch die Bildung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) durch das Xanthinoxidase-System als Auslöser für die Schädigungen diskutiert (Diamond et al., 1986).

3.4 Aufgabenstellung und Ziele

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Induktion der ILK in verschiedenen humanen Nierenerkrankungen und in entsprechenden Tiermodellen.

Für die normale Funktion von Podozyten sind deren Zell-Matrix-Interaktion und ihr Cytoskelett essentiell. Beide Komponenten können von der ILK beeinflusst werden. Anhand von funktionellen Experimenten mit einem neu entwickelten ILK-Inhibitor sollte die zentrale Rolle der ILK-Induktion und deren Signaltransduktion bei Podozyten-Schädigung genauer analysiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob es sich bei dem erst kürzlich beschriebenen cytoskeletalen Adaptermolekül CLP-36 um einen möglichen Interaktionspartner von ILK handelt. CLP-36 interagiert mit Alpha-Actinin-4, einem cytoskelett-assoziierten Protein, das für die Aufrechterhaltung der Struktur der Podozyten-Fußfortsätze essentiell ist. Mutierte Formen von Alpha-Actinin-4 im Menschen oder dessen *knock-out* in Mäusen führen zu Proteinurie und Nierenversagen. Über die molekularen Regulationsmechanismen der beiden interagierenden Cytoskelett-Moleküle bei erworbenen Nierenerkrankungen war noch nichts bekannt und sollte mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Ansätzen analysiert werden.

4 Material

4.1 Chemikalien

Medien und Lösungen wurden mit Wasser hergestellt, das durch eine Milli-Q UF Plus-Anlage der Firma Millipore (Eschborn) deionisiert worden war. Medien und Lösungen wurden in der Regel autoklaviert (20 min, 121 °C) oder sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter).

ABTS	Roche, Mannheim
Acrylamid-Lösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid;37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Anti-Maus IgM-Agarose	Sigma, Seelze
Aprotinin	Sigma, Seelze
APS (Ammoniumpersulfat)	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<i>Complete Mini</i> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie R 250	Serva, Heidelberg
Cycloheximid	Sigma, Seelze
Dithiotreitol (DTT)	BioRad, München
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Seelze
Eisessig	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma, Seelze
EGTA (Ethylendioxy-bis-(ethylenitril)-tetraacetat)	Sigma, Seelze
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure)	Roche, Mannheim

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Iodoacetamid	Sigma, Seelze
KCl	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Seelze
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
N-Ethylmaleimid	Sigma, Seelze
Natriumvanadat Na ₃ VO ₄	ICN, Eschwege
Natriumchlorid NaCl	Merck, Darmstadt
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Phalloidin-TRITC	Sigma, Seelze
PMSF	Sigma, Seelze
Ponceau S	Sigma, Seelze
Proteaseinhibitor-Cocktail Tabletten "Complete"	Roche, Mannheim
Protein G Sepharose	Sigma, Seelze
Puromycin Aminonucleosid	ICN, Eschwege
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED	BioRad, München
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Xanthin	Sigma, Seelze

4.2 Verbrauchsmaterial

PVDF-Membran:	Immobilon P	Millipore, Eschborn
Röntgenfilme:	Biomax	Kodak, Stuttgart
Blotpapier:		BioRad, München
Einmalkunststoffwaren:		BectonDickinson, Heidelberg; Brand, Wertheim; Eppendorf, Hamburg; Greiner, Frickenhausen; Josef Peske, Aindling-Pichl; Sarstedt, Nümbrecht; TPP, Trasadingen, Schweiz
Kulturgefäße:		Becton Dickinson, Heidelberg; Greiner, Frickenhausen; Nunc, Wiesbaden; TPP, Trasadingen, Schweiz
Einmalhandschuhe:		Semperit, Wien, Österreich
Sterilfilter:		Millipore, Eschborn; Pall, Dreieich

4.3 Reaktionssets

Albumin ELISA	Bethyl, Montgomery, USA
Creatinin Bestimmung nach Jaffé	Merck, Darmstadt
Complete without EDTA, Proteaseinhibitor Mix	Roche, Mannheim
DC Protein Assay Kit	BioRad, München
Protein Assay	BioRad, München
ECL - Enhanced ChemiLuminescence Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

In situ Cell Death Detection Kit	Roche, Mannheim
Mastermix TaqMan	Applied Biosystems, Darmstadt
RNeasy Mini Kit (RNA-Isolation)	Qiagen, Hilden
Ubiquitinated Protein Enrichment Kit	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Vistra Green nucleic acid gel stain	Amersham Biosciences, Freiburg

4.4 Molekulargewichtsstandards

Als Größenreferenzmarker für DNA-Gele wurde der *DNA Molecular Weight Marker VIII* (19-1114 bp) von Roche (Mannheim) verwendet. Für Proteingele wurde der *Broad Range* Standard von Bio-Rad (München) verwendet.

4.5 Enzyme

Superscript I	Invitrogen, Heidelberg
Xanthinoxidase	Sigma, Seelze
Taq-Polymerase (Ampli-Taq)	Applied Biosystems, Darmstadt

4.6 Oligonukleotide und Sonden

Alle Oligodesoxyribonukleotide und TaqMan-Sonden wurden bei der Firma Applied Biosystems in Darmstadt synthetisiert und direkt für PCR-Reaktionen eingesetzt. In der folgenden Übersicht sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und Sonden in 5' → 3'-Orientierung angegeben. Das vor dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt lokalisierte Oligonukleotid wurde mit *fwd*, das danach lokalisierte wurde mit *rev* bezeichnet.

Tabelle 1: Verwendete Oligonucleotide und Sonden

Name	Sequenz (5' →3')
Alpha-Actinin-4 Murin AJ289242; Länge: 120 bp	Fwd: AGTGCATGGTCCCTCTTTGG Rev: CGCTGAGAGCAATCACATCAA Sonde: ACCAGCTGCTGCACCTTCTCCCA; FAM
Alpha-Actinin-4 Human NM_004924; Länge: 91 bp	Fwd: GAGGCCAGAGGATCGCT Rev: ACTTGGAGTTGATGATTTGCGG Sonde: AACCACATCAAGCTGTCGGGCAG; FAM
Alpha-Actinin-1 Human NM_001102; Länge: 132 bp	Fwd: CCAACCCCTACACAACCATC Rev: TTGCGTAGCCTCTCATTGTG
CLP-36 Murin AF053367; Länge: 82 bp	Fwd: TCACCATCGCCACCCTG Rev: ATCCTCTACAAAGAAATGGCCCTT Sonde: TGCACCGACTGTGGCATCAACCTG; FAM
CLP-36 Human AJ310549; Länge: 84 bp	Fwd: TGGCTGCGTCGATTGGA Rev: ACAAACACACCAACAATCCCAG Sonde: CACATTTGTCACACATAGGCAACTTCTG AGCA; FAM
GAPDH Human J02642; Länge: 472 bp	Fwd: CCCATCACCATCTTCCAGGAGC Rev: CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC
P-Cadherin Murin X06340; Länge: 85 bp	Fwd: GCTCTACCACGACGGCAGAG Rev: GCCTCATACTTCTGCGGCTC Sonde: CCTTGATGCCAACGATAACGCTCCG; FAM

Die 18S rRNA Primer und Sonden für die Real-time RT-PCR wurden ebenfalls von Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet. Die amplifizierten Bereiche der 18S rRNA Primer und Sonden werden von Applied Biosystems (Darmstadt) nicht veröffentlicht.

4.7 Biologisches Material

4.7.1 Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien und deren Wachstumsmedien

Zellen	Bezugsquelle	Wachstumsmedium
Murine Podozyten (K5P5)	(Mundel et al., 1997b)	RPMI-1640 + GlutaMAX I, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS
Humane Podozyten (AB81)	(Saleem et al., 2002)	RPMI-1640 + GlutaMax I, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% ITS, 10% FCS

4.7.2 Mäuse

Für die tierexperimentellen Studien wurden Mäuse des Inzucht-Stamms Balb/c AnNCrIBR von Charles River Deutschland (Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden in einem Stall mit geregelter Luftzufuhr und einem Zeitschaltuhr gesteuerten Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Standard-Futter (Sniff, Soest) gehalten.

4.8 Zellkulturmedien und Zusätze

Collagen A	Biochrom AG, Berlin
ITS	Sigma, Seelze
Penicillin / Streptavidin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI-1640 + GlutaMAX I (+ / - Phenolrot)	Invitrogen, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA-Mixtur	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

4.9 Antikörper

4.9.1 Primäre Antikörper

Die folgende Tabelle listet alle spezifischen Antikörper auf, die für die Arbeit verwendet wurden. Die Spezifität bezeichnet das Antigen, gegen das der jeweilige Antikörper gerichtet ist und in welchen Verdünnungen sie in den einzelnen Methoden (Western Blot = WB, Immunfluoreszenz = IF) verwendet wurden.

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Spezifität	Spezies und Isotyp	WB	IF	Bezugsquelle
Actin, AC-40	Maus IgG2a	1:1000	--	Sigma, Seelze
Alpha-Actinin, BM-75.2	Maus, IgM	1:1000	1:100	Sigma, Seelze
Alpha-Actinin-4	Hase, polyklonal	1:2000	1:20	ImmunoGlobe, Himmelstadt
AKT	Hase, polyclonal	1:1000	--	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Ser 473-AKT	Maus, IgG2b	1:1000	--	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
β -Catenin	Maus, IgG1	1:500	1:50	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
P-Cadherin	Maus, IgG1	1:500	--	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
GSK-3 β	Hase, polyclonal	1:1000	1:100	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Ser 9-GSK-3 β	Hase, polyklonal	1:1000	1:100	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
ILK	Maus, IgG1	1:2000	1:50	BD Transduction Laboratories, Heidelberg

Spezifität	Spezies und Isotyp	WB	IF	Bezugsquelle
ILK	Hase, polyklonal, affinitäts-gereinigt	1:2000	--	Upstate, Biomol, Hamburg
Paxillin	Maus, IgG1	1:1000	1:50	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Tubulin	Ratte, IgG2a	1:2000	--	Serotec, Biozol, Eching
Ubiquitin	Maus, IgG	1:250; 4 µg/ml	--	Stressgen, Victoria, Canada
Vinculin	Maus, IgG1	1µg/ml	1:20	Oncogene, San Diego, USA
Phosphoserine	Maus, IgG1	1:500	--	Sigma, Seelze
Phospho-threonine	Maus, IgG2b	1:500	--	Sigma, Seelze
Phosphoserin, Klon 16B4	Maus, IgM	4µg/ml	--	Biomol, Hamburg
Phosphoserin, Klon 4A3	Maus	4µg/ml	--	Biomol, Hamburg
Phospho-threonin, Klon 1E11	Maus	4µg/ml	--	Biomol, Hamburg
Phospho-threonin, Klon 4D11	Maus	4µg/ml	--	Biomol, Hamburg
Phospho-threonin, Klon 14B3	Maus	4µg/ml	--	Biomol, Hamburg
WT-1	Hase, polyklonal	--	--	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

Einige der oben angegebenen Antikörper wurden auch für Immunpräzipitationen eingesetzt (siehe auch Kapitel 5.5.4).

4.9.2 Unspezifische Antikörper (Kontroll-Antikörper)

Die Kontroll-Antikörper wurden bei Immunpräzipitationen, Co-Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenzen jeweils in den Konzentrationen der entsprechenden primären Antikörper eingesetzt.

Tabelle 4: Isotyp-Kontrollen

Spezies und Isotyp	Bezugsquelle
Maus IgM	Chemicon, Hamburg
Hase IgG	Sigma, Seelze
Maus IgG1	Sigma, Seelze

4.9.3 Sekundäre Antikörper

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Konjugation	WB	IF	Bezugsquelle
Maus	Hase	HRP	1:2000	--	DAKO, Hamburg
Hase	Esel	HRP	1:5000	--	Amersham Biosciences, Freiburg
Ratte	Hase	HRP	1:5000	--	Dianova, Hamburg
Maus	Hase	FITC	--	1:100	Dianova, Hamburg
Hase	Ziege	Alexa Fluor 488	--	1:150	MoBiTec, Göttingen
Hase	Ziege	Alexa Fluor 568	--	1:150	MoBiTec, Göttingen
Maus	Ziege	Alexa Fluor 488	--	1:150	MoBiTec, Göttingen
Maus	Ziege	Alexa Fluor 568	--	1:150	MoBiTec, Göttingen

4.10 Verwendete Geräte

Elektrophoresekammern:

Mini Protean II BioRad, München

Inkubatoren für Säugerzellen:

Function Line (5% CO₂); 33°C und 37°C Heraeus Instruments, Hanau

Kühl- und Gefrierschränke: Liebherr, Ochsenhausen

Mikroplatten-Reader: Tecan, GeniosPlus, Crailsheim

Mikroskope:

Licht-Mikroskop DMIL Leica, Wetzlar

Fluoreszenz-Mikroskop DMBRE Leica, Wetzlar

PCR-Geräte:

TaqMan ABI Prism 7000 Applied Biosystems, Darmstadt

TaqMan ABI Prism 7700 Applied Biosystems, Darmstadt

Pipetten:

Gilson Villiers-le-Bel, Frankreich

Semidry Blot-Einheit:

TransBlot SD BioRad, München

Photometer:

Spektrophotometer DU 530 Beckman, München

Sterile Werkbank:

Microflow Nunc, Wiesbaden

Stromgeber:

Power Pac 200 und Pac 300 BioRad, München

Zentrifugen:

Zellkultur: Universal 16 Hettich, Tuttlingen

Kühlraum: Biofuge 13 Heraeus Instruments, Hanau

Tischzentrifuge: Centrifuge 5415D Eppendorf, Hamburg

Vortex-Genie 2 Scientific industries, Bohemia, USA

5 Methoden

Grundlegende Arbeitsmethoden wurden aus den Standardwerken „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 2005 - online Ausgabe), „Current Protocols in Protein Sciences“ (Coligan et al., 2005 - online Ausgabe), oder „Current Protocols in Cell Biology“ (Bonifacino et al., 2005 - online Ausgabe) entnommen und teilweise in leicht abgewandelter Form durchgeführt. Der Zugriff auf die Current Protocols des John Wiley & Sons, Inc. Verlages erfolgte jeweils online durch die Bibliothek der LMU München.

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 RNA-Isolation aus Gewebe und Zellkulturmaterial

Für die Extraktion wurden Reagenzien mit DEPC-Wasser und mit DEPC vorbehandelte Reaktionsgefäße verwendet. RNA, sowohl aus Gewebe als auch aus Zellkulturmaterial, wurde mit dem *RNeasy*-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Zellkulturmaterial wurde nach zweimaligem waschen mit PBS in 350µl RLT-Lysepuffer (aus Qiagen *RNeasy*-Kit Mini) aufgenommen. Nierengewebe wurde zunächst mit einer Rasierklinge auf Eis zu einem Brei zerkleinert, ebenfalls in 350µl RLT-Puffer aufgenommen und zusätzlich für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert.

Die lysierten Zellen bzw. das in Lysispuffer inkubierte Gewebe wurde mit 16.900 x g zentrifugiert (14.000 rpm, 1 min, RT) und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 3 Minuten. Der Überstand wurde wieder in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und mit einem Volumen 70% Ethanol (in DEPC-Wasser) versetzt. Die 700µl wurden auf eine „RNA mini“-Säule aufgetragen und bei RT mit 9.300 x g (10.000 rpm) für 15 sec zentrifugiert. Um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden wurde ein DNase-Verdau mit RNase-freier DNase auf der Säule durchgeführt. Die Säulenmatrix und die daran bindende RNA und DNA wurde zunächst mit 350µl RW1-Puffer gewaschen. Danach wurden 80 µl DNase I (28 Units in RDD-Puffer; beides Qiagen, Hilden) direkt auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Säulenmatrix wurde nach dem

Verdau mit 350µl RW1-Puffer (aus Qiagen *RNeasy*-Kit Mini) gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 500 µl RPE-Puffer (aus Qiagen *RNeasy*-Kit Mini). Hierbei wurden die Puffer mit 9.300 x g (10.000 rpm) bei RT für 15 sec durch die Säulen zentrifugiert. Es folgte ein zusätzlicher Waschschrift mit RPE-Puffer. Um jegliche Ethanolreste zu entfernen, welche später die Elution behindern könnten, wurden die Säulen nochmals bei maximaler Geschwindigkeit der Eppendorf-Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde sie in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (9.300 x g, 10.000 rpm, 1 min, RT) eluiert. Danach wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht 40 µg RNA. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte zwischen 1,9 und 2,0 liegen. Die RNA wurde direkt nach der Präparation revers transkribiert (siehe 5.1.2), oder bei -80°C gelagert.

5.1.2 Reverse Transkription, cDNA-Synthese

Für die weitere Analyse der RNA wurde sie zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese wiederum wurde zur Quantifikation mittels real time RT-PCR (siehe Abschnitt 5.1.3) genutzt.

Die reverse Transkription wurde in einem 45µl Reaktionsansatz mit 9µl 5 x RT-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), 2µl 100mM DTT (Invitrogen, Karlsruhe), 1 µl 25 mM dNTP (Amersham Biosciences, Freiburg), 1µl RNase Inhibitor RNasin (Promega, Mannheim), 0,5µl lineares Acrylamid (Stock: 5mg/ml; Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, England), 1µg Random Hexamere (Stock: 2mg/ml; Roche, Mannheim) und 200 U Superscript I (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Um eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA nachzuweisen wurde jede Probe halbiert und nur zu einer Hälfte mit der Superscript Polymerase inkubiert. Die andere Hälfte, die sog. RT minus (RT-) Probe, wurde ohne Enzym, aber ansonsten identisch behandelt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt für eine PCR (siehe Abschnitte 5.1.3 und 5.1.4) verwendet.

5.1.3 Real-time RT-PCR (TaqMan®)

Die verwendete cDNA wurde wie oben beschrieben hergestellt und in einer 1:10 Verdünnung für die Real-time RT-PCR eingesetzt. Die Real-time RT-PCR wurde auf einem TaqMan® ABI Prism 7000 oder 7700 (beide Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

Das Prinzip der quantitativen PCR für mRNA beruht auf dem Einsatz von sequenzspezifischen Primern und einer ebenfalls sequenzspezifischen Sonde. Letztere ist an beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoffmolekül markiert. Sind beide Farbstoffe an die Sonde gebunden, absorbiert der Quencher (Farbstoff) TAMRA (am 3'-Ende) die Fluoreszenz des anderen Reporter-Farbstoffes FAM oder VIC am 5'-Ende. Die im TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) enthaltene Taq-Polymerase besitzt eine 5'→3' Polymeraseaktivität und eine 5'→3' Exonucleaseaktivität. Durch die Exonucleaseaktivität wird während der Elongationsphase der PCR die spezifisch gebundene Sonde hydrolysiert und der Farbstoff an deren 5'-Terminus freigesetzt. Dessen Fluoreszenz kann dann nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm gemessen werden. Mit jedem neu synthetisierten DNA-Strang wird fluoreszierender Farbstoff freigesetzt. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal ist der Menge synthetisierter DNA proportional. Der C_T-Wert (= „Cycle Threshold“) wurde im Anschluß für jede Probe berechnet. Dieser ist die gebrochene Zykluszahl, bei der das Reporterfluoreszenzsignal eine benutzerdefinierte Schwelle durchbricht.

Für die PCR selbst wurden aus dem TaqMan® Universal PCR Master Mix, den Forward Primern und den Reverse Primern (finale Konzentration von 300 nM) und der Sonde (finale Konzentration von 100 nM) der PCR-Reaktionsmix auf Eis hergestellt. Die verwendeten Sonden und Primer sind in Tabelle 1: Verwendete Oligonucleotide und Sonden aufgeführt. Im TaqMan® Universal PCR Master Mix enthalten sind PCR-Puffer, dNTPs und die bereits erwähnte AmpliTaqGold® (Taq-Polymerase ohne 3'→5' Exonucleaseaktivität). Vom angesetzten PCR-Mastermix wurden jeweils 18µl in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte pipettiert. Danach wurden 2µl Template (cDNA-Verdünnung) dazu pipettiert. Die Vertiefungen der 96-Lochplatte wurden anschließend mit einer passenden Folie versiegelt. Die Platte wurde bei 280 x g zentrifugiert und im TaqMan® ABI PRISM 7000 oder 7700 analysiert. Für die TaqMan® RT-PCR wurde

folgendes Temperatur-Profil verwendet: Die PCR-Ansätze wurden zunächst für 2 Minuten bei 50°C inkubiert. Danach wurde bei 95°C für 10 Minuten die im Master Mix enthaltene AmpliTaqGold® Polymerase aktiviert. Die Amplifikation der Templates erfolgte in 40 Zyklen von jeweils 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C. Die RT-PCR von den Housekeepern erfolgte bei den gleichen Bedingungen. Bei den Versuchen wurden jeweils mehrere Housekeeper (18S rRNA, GAPDH, Cyclophilin) verwendet, um Regulationen der Housekeeper selbst möglichst ausschließen zu können. Zur Bestimmung des C_T-Wertes wurde die ABI PRISMTM Sequence Detection Software (Version 1.0) verwendet. Die Ergebnisse wurden in Relation zu den Housekeepern ausgewertet.

5.1.4 Konventionelle PCR

Einige RT-PCRs wurden nach der reversen Transkription mit einer konventionellen PCR (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1986) durchgeführt und im Anschluß auf einem 5%igen Polyacrylamid-Gel mit Vistra Green nucleic acid gel stain (Amersham Biosciences, Freiburg) analysiert. Die Gele wurden mit einem PhosphoImager (Molecular Dynamics, Krefeld) eingescannt.

Standard-PCR Ansatz (25µl): 16,8 µl ddH₂O, 2,5 µl 10xPCR-Puffer, 4 µl dNTP's (1,25mM), je 0,25 µl forward und reverse Primer (10µM); 0,2 µl AmpliTaq Polymerase, 1µl cDNA als Template. PCR-Puffer und AmpliTaq sind von Applied Biosystems (Darmstadt). Temperaturprofil: 1 x 94°C für 3 min; 30 x 94°C für 45 sec, 56°C für 1 min, 72°C für 45 sec; 1 x 72°C für 7 min.

5.2 Methoden der eukaryotischen Zellkultur

5.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien (Podozyten)

Die Kultur von Säugerzellen wurde unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Konzentration durchgeführt. Um Kontaminationen auszuschließen, wurden die Zellen täglich lichtmikroskopisch überwacht. Kontaminationen durch Mycoplasmen wurden durch einen speziellen Assay (Myco Alert- Mycoplasma Detection Kit, Cambrex, Rockland, USA) ausgeschlossen.

5.2.2 Zellkultur von murinen Podozyten

Zellkulturmedium 33°C: 1640-RPMI, 10% FCS, 1% Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 mg/ml), 10 U/ml murines Interferon- γ (Sigma, München)

Zellkulturmedium 37°C: 1640-RPMI, 10% FCS, 1% Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 mg/ml)

Trypsin / EDTA: 0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA

Immortalisierte murine Podozyten wurden unter bereits früher beschriebenen Bedingungen (Mundel and Kriz, 1996) kultiviert. Die Zellen wurden bei 33°C in dem oben angegebenen Zellkulturmedium dreimal wöchentlich mit Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in einem Verhältnis von 1:10 in T25 Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) passagiert. Zum Ausdifferenzieren wurden die Podozyten in zuvor mit Collagen A beschichtete (Biochrom AG, Berlin) 6-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden) oder T75-Flaschen (Greiner, Frickenhausen) überführt und bei 37°C für 10 Tage kultiviert. Das Medium wurde dabei regelmäßig gewechselt.

Die stabil transfizierten, ILK überexprimierenden murinen Podozyten (wildtyp-ILK und mutierte-ILK) wurden mit den ILK-Konstrukten der Arbeitsgruppe von Professor S. Dedhar (Vancouver, Kanada) (Hannigan et al., 1996) von Dr. Vicente Teixeira im Rahmen seines DAAD-Aufenthaltes in den Laboren der Klinischen Biochemie hergestellt (Kretzler et al., 2001a). Die überexprimierenden Zellen wurden wie die murinen Podozyten ohne stabil transfizierte ILK-Konstrukte kultiviert.

5.2.3 Zellkultur von humanen Podozyten

Zellkulturmedium: 1640-RPMI, 10% FCS, 1% ITS, 1% Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 mg/ml)

Trypsin / EDTA: 0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA

Humane Podozyten wurden unter bereits früher beschriebenen Bedingungen (Saleem et al., 2002) kultiviert. Die Zellen wurden bei 33°C in 10 cm Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) proliferiert und bei 37°C auf Collagen A beschichteten 6-Well-Platten oder 10 cm Zellkulturschalen ausdifferenziert.

5.2.4 Stimulation von murinen Podozyten mit Puromycin und ILK-Inhibitor

Vor der Inkubation mit Puromycin und ILK-Inhibitor MC-5 (Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) wurde am Vortag des Versuches das normale Zellkulturmedium gegen Medium ohne FCS ausgewechselt. Am nächsten Morgen wurde den Zellen mit 10 µg/ml Puromycin (ICN, Eschwege) und / oder 5µM ILK-Inhibitor MC-5 (Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) in serumfreiem Medium zugegeben.

5.2.5 Stimulation humaner Podozyten mit Xanthin-Xanthinoxidase

Um die Zellen zu synchronisieren wurden sie über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 150µM Xanthin (immer frisch angesetzt) und 75mU Xanthinoxidase (Sigma, München) -X/XO- in serumfreiem Medium inkubiert. Durch die beiden Reagenzien entstehen im Medium reaktive freie Sauerstoffradikale (ROS), die aufgrund ihrer geringen Größe durch die Zellmembran in die Zellen gelangen können.

5.2.6 Behandlung humaner Podozyten mit Proteasom-Inhibitoren

Um die Proteasomen in den Zellen zu blockieren wurde Lactacystin (Biotrend, Köln) bzw. Epoxomicin (Calbiochem, Merck, Darmstadt) verwendet. Der Inhibitor wurde nach Herstellerangabe in DMSO gelöst und in einer Lösung von 10µM eingesetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 2 Stunden. Da die Inhibitoren kovalent in der katalytischen Einheit des 20S Proteasoms binden, wurden die Zellen in PBS gewaschen und danach mit anderen Substanzen wie Cycloheximid oder Xanthin / Xanthinoxidase inkubiert. Entsprechende Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO wurden parallel durchgeführt.

5.3 Proteinchemische Standardmethoden

5.3.1 Herstellung von Gesamtzellysaten aus Zellen

2x Lysepuffer: 2% Triton-X 100, 150mM NaCl, 100mM Hepes (pH 7,4),
20mM EGTA (pH 8,0), 2mM Na₃VO₄, Proteaseinhibitor-Cocktail
Complete (Roche, Mannheim)

Die Podozyten wurden mit PBS gewaschen und ein von der Zelldichte abhängiges Volumen 1x Lysepuffer (eiskalt) wurde zugegeben. In dem Lysepuffer wurden die Zellen von den Kulturschalen abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation bei 4°C mit 15.700 x g (13.000 rpm). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 5.3.4). Die so gewonnenen Gesamtzellysate wurden für Immunpräzipitationen und Western Blot-Analysen verwendet.

5.3.2 Herstellung von Gesamtzellysaten aus Gewebe

RIPA Puffer: 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7,4), 1% NP-40 (Nonidet P-40), 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, Proteaseinhibitor-Cocktail Complete (Roche, Mannheim)

Teile von murinem Nierencortex wurden in eiskaltem PBS gewaschen, um überschüssiges Blut zu entfernen. Im Anschluss wurde das Stück mit einer Rasierklinge in einer Petrischale zerteilt und in ein Reaktionsgefäß überführt. 250 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren wurden zugegeben und das Gewebe wurde mit einem Homogenisator weiter zerkleinert. Je nach Größe des Nierenstückchens wurde nochmals RIPA-Puffer zugegeben und das Gewebe 10mal durch eine 25 Gauche Kanüle von BD (Heidelberg) gezogen. Danach wurde das Lysat für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 20 Minuten bei 15.700 x g (13.000 rpm) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt wurde, wie unter Abschnitt 5.3.4 beschrieben, bestimmt.

5.3.3 Herstellung von Kernextrakten

Puffer A: 10 mM Hepes (pH 7,6), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM Pefabloc SC (Roche, Mannheim), 15 ug/ml Aprotinin (Sigma, München), 0,5 ug/ml Leupeptin (Sigma, München)

Puffer A + 0,4% NP-40

Puffer B: 20 mM Hepes (pH 7,6), 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM Pefabloc SC, 15 ug/ml Aprotinin, 0,5 ug/ml Leupeptin

Die Kernextrakte von murinen Podozyten wurden mittels der Hochsalz-Extraktion von Schreiber E et al. (Schreiber et al., 1989) isoliert. Die Protease-Inhibitoren wurden den Puffern jeweils erst kurz vor Gebrauch zugegeben und die gesamte Präparation wurde bei 4°C mit vorgekühlten Reagenzien durchgeführt. Die behandelten Zellen (siehe 5.2.4) wurden mit PBS gewaschen, in PBS abgeschabt und bei 750 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml Puffer A gewaschen. Um die Zellen zu pelletieren wurden sie erneut bei 750 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 80µl Puffer A + 0,4% NP-40 resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch das vorhandene NP-40 erfolgt in dieser Zeit eine chemische Lyse der Zellen. Die so behandelten Zellen wurden abermals bei 750 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei diesen Präparationen als cytoplasmatisches Lysat in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und später ebenfalls im Western Blot analysiert. Das noch vorhandene Pellet wurde einmal mit 200µl Puffer B gewaschen und dann in 50µl Puffer B resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubation auf Eis und eine 15 minütige Zentrifugation bei 7500 x g. Der Überstand, das Kernlysate, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert bis es mittels Western Blot (siehe 5.5.1) analysiert wurde.

5.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Zell- und Gewebelysaten

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der modifizierten Lowry Methode (Lowry et al., 1951) mit Hilfe des DC Protein Assay Kits (BioRad, München). Diesem Assay liegt ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Proteinkonzentration zugrunde. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass im Vergleich zu anderen Methoden zur

Proteinbestimmung größere Mengen von Detergenzien toleriert werden und die maximale Farbreaktion bereits nach 15 min erreicht ist. Zur Durchführung wurden 5 µl Proteinlysat in eine Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen) gegeben und mit 25 µl Lösung A' und 200 µl Reagenz B für 15 min bei RT inkubiert. Die Farbentwicklung wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm in einem Mikroplatten-Reader (Tecan, GeniosPlus, Crailsheim) bestimmt. Als Proteinstandard dienten verschiedene Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) gelöst in dem für die Proben verwendeten Solubilisierungspuffer.

5.3.5 Konzentrationsbestimmung von Protein im Urin

Für diesen Nachweis wurde der BioRad Protein Assay (München) verwendet, der auf der Interaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren beruht (Bradford, 1976). Die Maus-Urine wurden hierfür 1:1000 – 1:5000 in Aqua inject (Braun, Melsungen) verdünnt und 100 µl der Verdünnung in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte (Greiner, Frickenhausen) pipetiert und mit 25 µl Protein Assay Reagenz versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben photometrisch analysiert (600 nm). Die Konzentration wurde durch den Vergleich mit einer BSA-Standardkurve ermittelt.

5.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2 x Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS (w/v),
0,02 % Bromphenolblau (w/v), 2 mM EDTA, 20 mM DTT

Die diskontinuierliche SDS-Page wurde modifiziert nach Laemmli (Laemmli, 1970) in Protean II Apparaturen von BioRad (BioRad, München) durchgeführt. Die zu analysierende Probe (Proteinlysat oder Urin) wurde 1:1 mit 2x Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Es wurden 10 – 15 %ige Trenn- und 4 %ige Sammelgele verwendet. Als Größenmarker wurde der Broad Range Proteinstandard der Firma BioRad (München) aufgetragen.

5.3.7 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Färbelösung: 1g Coomassie R 250 Serva, 400ml Methanol, 100 ml Eisessig,
ad 1000 ml mit H₂O bidest

Entfärbelösung: 200 ml Methanol, 100ml Eisessig, ad 1000 ml H₂O bidest

SDS-PAGE Gele wurden 20 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt bis der überschüssige Farbstoff ausgewaschen war. Nach der Entfärbung traten die Proteinbanden gegen einen farblosen Hintergrund hervor.

5.3.8 Ponceau S-Färbung von Proteinen

Ponceau S-Lösung: 250 mg Ponceau S in 50 ml H₂O + 5 ml Essigsäure

Um die Effizienz des Western-Blot-Transfers zu überprüfen und zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Proteine auf der PVDF-Membran reversibel angefärbt. Dazu wurde die Membran 10 min mit der Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser sukzessive entfärbt bis die Proteinmengen in den verschiedenen Spuren des Gels verglichen werden konnten.

5.4 Protein-Sequenzanalyse

Das Programm PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) wurde verwendet, um die Sekundärstrukturen der Proteine CLP-36 und Alpha-Actinin-4 zu analysieren (Jones, 1998; Jones, 1999; Jones et al., 1994). Die potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden mit dem Tool NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) analysiert. Potentielle Schnittstellen der katalytischen 20S Einheit des Proteasoms wurden ebenfalls online mit NetChop 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop>) Tool erfasst (Kesmir et al., 2002). Beide Programme befinden sich auf der Homepage des „Center for biological sequence analysis“, CBS. Die hierfür verwendeten Sequenzen wurden bei der „Swiss-Prot Protein knowledge“ Datenbank online (<http://us.expasy.org/sprot/>) abgerufen. Die humanen Sequenzen für CLP-36 (Primäre Akzessionsnummer O00151; hierbei fehlt der Sequenz Methionin (M) als erste Aminosäure) und Alpha-Actinin-4 (Primäre Akzessionsnummer O43707) wurden für alle Analysen verwendet.

5.5 Immunologische und immunbiochemische Methoden

5.5.1 Western Blot

Anodenpuffer I: 0,3 M Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol (v/v)

Anodenpuffer II: 25 mM Tris-HCl (pH 10,4) , 20 % Methanol (v/v)

Kathodenpuffer: 25 mM Tris-HCl (pH 9,4) , 20 % Methanol (v/v),
40 mM 6-Aminohexansäure

Blockierungspuffer: 5 % Magermilchpulver in TBS

Waschpuffer: 0,1 % Tween-20 in TBS

Die Western Blot Methode wurde angewandt, um spezifische Proteine in Podozyten-Lysaten nachzuweisen. Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli, 1970) und nachfolgend für die Western-Blot-Analyse (Burnette, 1981; Egger and Bienz, 1987; Towbin et al., 1989) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele und die zuvor in Methanol aktivierte PVDF-Membran 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blot-Systems und der Proteintransfer erfolgte gemäß der Produktvorschrift in einer „Semi-dry blotting“ Apparatur (BioRad, München) bei 2,5 mA/cm² Gelfläche für 1 h. Um den Transfer zu überprüfen und den Proteinstandard zu markieren, wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran durch 10minütiges Schwenken in der Ponceau S Lösung angefärbt (siehe 5.3.8).

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C, oder aber für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer geschüttelt. Danach wurden die Membranen zweimal für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Der in TBS oder Blockierungslösung (je nach Herstellerangabe, siehe Tabelle 3: Primäre Antikörper) verdünnte, primäre Antikörper wurde dann mit der PVDF-Membran für eine weitere Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurde die PVDF-Membran 3 x 10min mit Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre, Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Antikörper wurde in Blockierungspuffer verdünnt (siehe Tabelle 5: Sekundäre Antikörper) und für 1 Stunde bei leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Nach erneuten 3 x 10 min Waschschrinen erfolgte die Detektion.

5.5.2 Chemilumineszenz-Detektion von Proteinen

Für die Detektion von Proteinen wurde das ECL-Kit (Enhanced ChemiLuminescence Kit) bzw. bei schwachen Signalen das ECL Plus-Kit (beide Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Proteine auf der PVDF-Membran, markiert durch die Meerettichperoxidase (HRP)-konjugierten sekundären Antikörper, wurden mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion in einer Dunkelkammer nachgewiesen.

Man inkubiert hierbei die Membranen in einer Substratlösung, die von der Meerettich-Peroxidase katalysiert wird. Es wurden gleiche Teile der ECL-Lösungen A und B für eine Minute bzw. bei ECL Plus-Lösungen 1 Teil Lösung B auf 40 Teile Lösung A gemischt und für 5 Minuten auf die mit Antikörpern behandelte Membran gegeben. Anschließend wurde das Signal mit Kodak X-OMAT Röntgenfilmen in Röntgenkassetten mit Verstärkerfolien detektiert und so dokumentiert.

5.5.3 Strippen von Western Blot-Membranen

Stripping-Puffer: 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5mM Tris-HCl (pH 6,7)

Das Entfernen von Primär- und Sekundärantikörpern ist möglich, indem man die Membranen für 30 Minuten bei 50°C in Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend werden sie zweimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um SDS und 2-Mercaptoethanol zu entfernen. Die Effizienz kann mit einer weiteren Chemilumineszenz-Detektion überprüft werden. Vor einer weiteren Antikörper-Detektion müssen die Membranen zunächst wieder in Blockierungspuffer inkubiert werden.

5.5.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Mittels spezifischen Antikörpern, an Protein G oder an Antikörper-gekoppelten Agarose Beads immobilisiert, können Antigene aus Zell- oder Gewebelysaten präzipitiert werden. Eine Co-Immunpräzipitation wird verwendet, um eine *in vivo* Interaktion von zwei Proteinen nachzuweisen.

Aus Podozyten wurde wie unter 5.3.1 beschrieben Gesamtzellysat gewonnen. Für die Immunpräzipitation wurden im Regelfall 500µg Zellysat in einem Volumen von 500µl 1 x Lysepuffer (Zusammensetzung siehe 5.3.1) eingesetzt. Zum Teil wurden auch Lysate von Nierengewebe verwendet. Unspezifisch bindende Proteine wurden vor der

Immunpräzipitation durch Inkubation mit 30 μ l Protein G Sepharose bzw. 30 μ l Anti Maus IgM Agarose (beide Sigma, München) und 3 μ g Kontroll-Antikörper präabsorbiert. Die an die immobilisierten Antikörper gebundenen Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jedem Ansatz wurde 3 μ g spezifischer Antikörper bzw. die gleiche Menge Kontroll-Antikörper zugegeben und über Nacht auf einem Rotor inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Antigen-Antikörper-Komplex durch die Zugabe von 30 μ l Protein G-Sepharose oder 30 μ l Anti-Maus IgM-Sepharose immobilisiert (3 h Inkubation). Das spezifisch an den Antikörper gebundene Protein konnte durch die Komplexbildung mit der Sepharose / Agarose pelletiert werden, indem die Ansätze jeweils 3 Minuten bei 15.700 x g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit je 1 ml 1x Lysepuffer gewaschen. Danach wurden die Immunpräzipitate über SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 5.3.6) und im Western Blot (siehe 5.5.1) untersucht.

5.5.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Fixierungs-Lösung: 2% Paraformaldehyd, 4% Sucrose in PBS

Permeabilisierungs-Lösung: 0,3% Triton-X 100 in PBS

Blocklösung: 2% FCS, 2% BSA, 0,2% Fisch-Gelatine in PBS

Endogene Proteine können nach Fixierung der Zellen *in situ* durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Durch spezifische Primär-Antikörper und fluoreszenz-markierte Sekundär-Antikörper (beide siehe Tabelle 5: Sekundäre Antikörper) wurden Antigene in hierfür präparierten Zellen sichtbar gemacht und lokalisiert. Adhärente Säugerzellen wurden auf sterilen Deckgläschen (Menzel, Braunschweig) in 6-well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 5 min in Fixierungslösung fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min in 0,3% Triton-X 100 in PBS permeabilisiert und anschließend 30 min mit Blocklösung inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (verwendete Verdünnungen siehe Tabelle 3: Primäre Antikörper, verdünnt in Blocklösung) erfolgte bei RT für 1h. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 1h mit sekundärem Antikörper bei RT im Dunkeln inkubiert. Für das Färben von F-Actin wurden keine

Antikörper, sondern TRITC-markiertes Phalloidin (Sigma, Seelze) verwendet, das an oligo- und polymeres Actin bindet und dieses stabilisiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen dreimal mit je 150µl PBS gewaschen, kurz abgetropft und in 20µl Mowiol (Calbiochem, Merck, Darmstadt) auf einem Objektträger (Menzel, Braunschweig) gelegt und über Nacht bei 4°C getrocknet. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenz-Mikroskop DMBRE der Firma Leica (Bensheim).

5.5.6 Albumin-ELISA

<u>Coating-Puffer:</u>	0,05 M Natriumcarbonat (pH 9,6)
<u>Wasch-Puffer:</u>	50 mM Tris-HCl(pH 8,0), 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20
<u>Blockierungspuffer:</u>	50 mM Tris-HCl(pH 8,0), 0,14 M NaCl, 1 % BSA
<u>Proben-Puffer:</u>	50 mM Tris-HCl(pH 8,0), 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20, 1 % BSA

Um Albumin im Urin von Mäusen quantitativ zu bestimmen wurde der „Mouse Albumin Quantitative ELISA“ der Firma Bethyl, Montgomery, USA verwendet. Eine 96 Loch „MaxiSorb“-Platte von Nunc (Wiesbaden) wurde zunächst mit 50µl Ziege anti-Maus Albumin Antikörper (1:100 verdünnt in Coating-Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Danach wurden die Löcher dreimal mit je 200µl Wasch-Puffer gewaschen und anschließend mit 100µl Blockierungspuffer für 30 Minuten geblockt. Danach erfolgten drei weitere Waschschrte, die wie oben beschrieben durchgeführt wurden. Je Loch wurden dann 50µl Probe oder ein spezieller Maus Albumin Standard (beide verdünnt in Proben-Puffer) pipettiert und für 60 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation folgten fünf Waschschrte mit 200µl Wasch-Puffer und die 60 minütige Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Ziege anti-Maus Albumin Antikörper (1:10.000 verdünnt in Proben-Puffer). Nicht gebundener, überschüssiger Antikörper wurde ebenfalls mit fünf Waschschrten entfernt. Für die anschließende Enzym Substrat Reaktion wurde ABTS der Firma Roche, Mannheim verwendet. In jede Vertiefung wurden 50µl der ABTS-Lösung pipettiert. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten mit 50µl einer 1%igen SDS-Lösung abgestoppt. Anschließend wurde die Platte in einem Mikroplatten-Lesegerät (GeniosPlus, Tecan, Crailsheim) bei 405nm eingelesen. Die Auswertung des ELISAs erfolgte mit Microsoft Excel 2003.

5.5.7 Kinase-Assay

Kinasepuffer: 20 mM Hepes (pH 7,4), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT,
10 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 1 μCi [³²P]γ-ATP

Mit einem *in vitro* Kinase Assay kann die Kinase-Aktivität eines Enzymes gemessen werden, oder dessen Fähigkeit ein bestimmtes Substrat zu phosphorylieren. Hierzu verwendet man radioaktives [³²P]γ-ATP, da Kinasen die Fähigkeit besitzen γ-Phosphatgruppen von ATP auf ein Substrat zu übertragen. Für die Kinase Assays wurde immunpräzipitierte ILK, oder rekombinante ILK (Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) eingesetzt. Als Substrat dienten 5 μg basisches Myelin (MBP), oder 500 ng rekombinantes CLP-36 Protein (von Kristin Bauer, Arbeitsgruppe W. Siess, IPEK - Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, München). Als Positivkontrolle wurden 10 ng rekombinante PKC-δ (Upstate, Biomol, Hamburg) anstelle immunpräzipitierter oder rekombinanter ILK eingesetzt. Die enzymatische Reaktion erfolgte in 50 μl Kinasepuffer in einem Heizblock bei 37°C für 30 Minuten. Im Anschluss wurde die Reaktion mit Probenpuffer abgestoppt, für 10 Minuten bei 95°C gekocht, kurz abzentrifugiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe auch 5.3.6 und 5.5.1). Die Membran wurde in Haushaltsfolie gewickelt und in einer Expositionskassette eines PhosphoImagers (Molecular Dynamics, Krefeld) über Nacht exponiert. Anschließend wurden sie mit der entsprechenden Software (ImageQuant, Molecular Dynamics, Krefeld) ausgewertet.

5.5.8 Immunhistochemie

Ein Teil der Niere wurde direkt nach der Entnahme in Jung Tissue Freezing Medium OTC (Leica Instruments, Nussloch) gelegt, auf Trockeneis gefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert. Ein weiterer Teil wurde für 24 h bei Raumtemperatur in 10 % Formalin (Formal-Fixx Concentrate (Thermo Shandon, Dreieich) 1:5 mit ddH₂O verdünnt) gelagert und anschließend in einem Shandon Citadel Tissue Processor fixiert. Die Immunhistochemien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Maria Pia Rastaldi aus Mailand (Italien), Dr. Stefan Segerer (München) und der Firma Kinetek Pharmaceuticals (Vancouver, Kanada) durchgeführt.

5.5.8.1 Glomerulosklerose-Bewertung

Das Ausmaß der Schädigung der glomerulären Struktur wurde durch einen Glomerulosklerose-Score bestimmt. Hierfür wurde an Nierenschnitten eine PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff Reaktion) durchgeführt (in Kooperation mit PD Dr. S. Segerer). Die Klassifizierung in 4 verschiedene Schweregrade (Grad 0-3) wurde durch die lichtmikroskopische Untersuchung der Glomeruli bei einer 400fachen Vergrößerung durchgeführt. Die Einteilung erfolgte geblendet und je Tier wurden mindestens 100 Glomeruli klassifiziert. In Grad 0 wurden Glomeruli eingeteilt, die nicht krankhaft verändert sind. Bei Grad 1 zeigen die Glomeruli erste Anzeichen von vermehrten Matrix-Molekülen. Glomeruli vom Grad 2 zeigen zusätzlich zur Vermehrung der Mesangium-Matrix noch einzelne, segmental sklerotisierte Schlingenanteile. Die Funktion der Filtrationseinheit ist hier schon stark eingeschränkt. Bei Glomeruli von Grad 3 ist eine globale Sklerose und starke Vermehrung der Mesangium-Matrix zu erkennen.

5.6 TUNEL-Färbung zum Nachweis von Apoptose

Fixierungslösung: 4% Paraformaldehyd in PBS

Blockierungslösung: 3% H₂O₂ in Methanol

Permeabilisierungslösung: 0,1% Triton (v/v) in 0,1% Natriumcitrat (w/v)

DAPI-Lösung: 0,1µg/ml in ddH₂O

Zellen, die apoptotisch werden unterliegen einem charakteristischen Muster struktureller Veränderungen im Nucleus und im Cytoplasma. Der nucleäre Zerfall geht einher mit einer beträchtlichen Schädigung des Chromatins. Das Zerschneiden von genomischer DNA durch endogene Endonukleasen während der Apoptose führt sowohl zu doppelsträngigen, kleinmolekularen DNA-Fragmenten als auch zu Einzelstrangbrüchen (Nicks) in hochmolekularen DNA Strängen. Diese Einzelstrangbrüche können durch eine enzymatische Reaktion identifiziert werden, bei der die terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) fluoreszenz-markierte Nukleotide in die DNA-Strangbrüche eingebaut werden (TUNEL = TdT-mediated dUTP nick end labelling).

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Collagen A-beschichteten Glasplättchen kultiviert und bei 37°C ausdifferenziert. Danach wurden die Podozyten wie unter 5.2.4 beschrieben behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Plättchen aus den Zellkulturschalen genommen, kurz luftgetrocknet und für eine Stunde mit der Fixierungslösung bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit der Blockierungslösung inkubiert. Es folgte wieder ein Waschschrift mit anschließender Inkubation in der Permeabilisierungslösung (2 Minuten bei 2-8°C auf Eis). Nach diesem Schritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen und gleich darauf mit dem TUNEL-Reaktionsmix für 1 Stunde bei 37°C in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert (die Negativkontrolle wurde stattdessen nur mit der Label Solution inkubiert; die Positivkontrolle wurde zuvor mit 10 U DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt). Nach dieser Reaktion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 15 Minuten bei 37°C mit einer DAPI-Lösung inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen in Mowiol gelegt. Die Analyse des TUNEL Assays erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei unterschiedlichen Wellenlängen für DAPI und die FITC-markierte Einzelstrang-DNA. Je Ansatz wurden 1200 Zellen geblindet ausgezählt und mit Excel 2003 (Microsoft) grafisch Dargestellt.

5.7 Bestimmung der Zelladhäsion

Um das Adhäsionsverhalten von Podozyten an Collagen, einer wichtigen Komponente der extrazellulären Matrix, zu überprüfen, wurden am Tag des Adhäsionsversuchs 24-well Zellkulturplatten mit 20µg Collagen A (Biochrom AG, Berlin) pro well beschichtet. Dazu wurden die Platten mit 200 µl Collagen A- Lösung (100 µg/ml in PBS) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit je 1ml PBS gewaschen. Während der Inkubationszeiten wurden die in 75 cm² Flaschen bei 37°C ausdifferenzierten Podozyten geerntet. Die Zellen waren zuvor 24 Stunden mit 10 µg/ml Puromycin und bzw. oder mit 5µM ILK-Inhibitor MC-5 (Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) in serumfreien Medium behandelt worden. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mittels Trypsin-EDTA abgelöst und in dem entsprechenden Medium bei 800 x g für 4 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in

frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer (Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen) bestimmt. Pro Well wurden 250.000 Zellen (1ml Volumen; aufgefüllt mit serumfreien Medium und den entsprechenden Zusätzen) ausgesät. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach der Inkubation wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch absaugen und waschen der Wells mit PBS entfernt. Die verbliebenen adhärenenten Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und erneut in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

5.8 MTT-Test zur Zellzahlbestimmung

Der Assay beruht auf der Spaltung des gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu purpurfarbenen Formazan-kristallen durch mitochondriale Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen. Das dabei entstehende violette Formazanblau kann spektrophotometrisch nachgewiesen werden (Hansen et al., 1989). Je zehntausend Zellen wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Die Podozyten wurden über Nacht mit Serum- und Phenolrot-freiem Medium synchronisiert und anschließend mit Puromycin (ICN, Eschwege) und/oder dem ILK-Inhibitor MC-5 (Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) für 24 h stimuliert. Vier Stunden vor Ablauf der Stimulation wurde jedem Ansatz 30 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) zugegeben und für weitere 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen in 100 µl DMSO gelöst. Der violette Farbstoff wurde mit Hilfe eines ELISA-Plattenlesers quantifiziert (GeniosPlus, Tecan, Crailsheim; Testfilter: 540 nm; Referenzfilter: 620 nm).

5.9 Nachweis der Ubiquitinierung

<u>Elutionspuffer:</u>	1% (w/v) SDS, 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM DTT
<u>Nichtdenaturierender Lysispuffer:</u>	1% (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM Iodoacetamid, 10 mM N-Ethylmaleimid, Complete Inhibitor Cocktail
<u>Waschpuffer:</u>	50 mM Hepes (pH 7,5), 5 mM EDTA (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100

Zum Nachweis von ubiquitinierten CLP-36 und Alpha-Actinin-4 Molekülen wurden Zell bzw. Nierengewebelysate verwendet. Im Fall von Alpha-Actinin-4 reichte eine Immunpräzipitation (siehe 5.5.4) mit Alpha-Actinin spezifischen Antikörpern mit anschließendem Western Blot mit Ubiquitin-spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 3: Primäre Antikörper) aus, um ein spezifisches Signal zu erhalten. Im Fall von CLP-36 war das Signal des Ubiquitin-spezifischen Antikörpers so schwach, dass es nur sehr schlecht dargestellt werden konnte. In diesem Fall wurde eine Recapture-Immunpräzipitation mit sehr sensiblen Polyubiquitin Affinitäts-Beads (Calbiochem, Merck, Darmstadt) durchgeführt. Das Protokoll wurde „Current Protocols in Protein Sciences“ (Coligan et al., 2005 - online Ausgabe) entnommen und leicht modifiziert eingesetzt.

CLP-36 Protein wurde zunächst wie unter 5.5.4 beschrieben mit CLP-36 spezifischem Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend wurde den Protein G Beads mit dem gebundenen Antigen 100 µl Elutionspuffer zugegeben und kurz geschüttelt. Die Proben wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. In dieser Zeit reduziert das im Puffer enthaltene DTT die Disulfidbrücken im Antigen und in dem für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper. Gleichzeitig werden durch das SDS die Polypeptidketten entfaltet. Danach wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch die Zugabe von 20 µl einer 10%igen (w/v) BSA-Lösung wurde verhindert, dass das Antigen an der Gefäßwand kleben bleibt. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und nach der Zugabe von 500 µl des nichtdenaturierenden Lysepuffers für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation

für 3 Minuten bei 15.700 x g (13.000 rpm). Danach wurde der Überstand mit dem von den Protein G Beads gelösten Antigen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Den Ansätzen wurden je 40µl Polyubiquitin Affinitäts-Beads bzw Kontroll-Beads zugegeben und bei 4°C für 2,5 Stunden inkubiert. Die Ansätze wurden nach der Inkubation dreimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und später mittels Immunoblot analysiert (siehe 5.5.1).

5.10 Bestimmung der Protein-Halbwertszeit mittels Cycloheximid

Cycloheximid ist dafür bekannt, dass es die Proteintranslation hemmt, indem es die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen, den Transfer von Aminosäuren von der Aminoacyl-tRNA auf entstehende Peptide und die Freisetzung der deacylierten tRNA von der Donorstelle der Ribosomen verhindert (Obrig et al., 1971).

Für diesen Versuch wurden je hunderttausend humane Podozyten in 6-well Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden) in normalem Wachstumsmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht und die Zellen am Tag darauf mit 10µg/ml Cycloheximid (Sigma, München) mit der entsprechenden Menge DMSO in 1% FCS-haltigem Medium behandelt. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden die Zellen gewaschen, mit Trypsin EDTA abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das Volumen des zugegebenen Lysepuffers (siehe 5.3.1) richtete sich nach der vorhandenen Zellzahl (125.000 Zellen wurde in 90µl Lysepuffer gelöst) und blieb in allen Versuchen konstant. Das Proteinlysate wurde wie in 5.3.1 beschrieben gewonnen und je 5µl wurden mittels Western Blot (5.5.1) analysiert. Somit wurde die Ladung der Western Blots nicht auf die totale Proteinmenge, sondern auf die Zahl der lysierten Zellen normiert.

5.11 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle Tierversuche fanden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzrechts statt.

5.11.1 Haltung der Tiere

Die Unterbringung der männlichen Balb/c Mäuse (18-21 g; Charles River, Sulzfeld) erfolgte in der offenen Haltung des Instituts für „Klinische Biochemie“ der Medizinischen Poliklinik München in Macrolon Typ III Käfigen unter einem 12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus. Wasser und Standardfutter (Sniff, Soest) standen *ad libitum* zur Verfügung.

5.11.2 Induktion einer Nierenschädigung mit Adriamycin

Um eine progressive Nierenschädigung zu induzieren wurde den Mäusen 13 mg/kg Körpergewicht Adriamycin (Adriblastin Lösung 150 mg, Pfizer Pharma, Karlsruhe) durch eine Injektion in eine der Schwanzvenen verabreicht. Im Falle des ILK-Inhibitors MC-5 wurde das chronische Modell mit zwei Adriamycin-Injektionen (Tag 0 und 14) und einer Gesamtlaufzeit von 6 Wochen gewählt (Vielhauer et al., 2004; Wang et al., 2000). Bei der Verabreichung des Proteasom-Inhibitors Epoxomycin (Calbiochem, Merck, Darmstadt) wurde das akute Modell mit einer Gesamtlaufzeit von 7 Tagen gewählt.

5.11.3 Applikation der Inhibitoren

Der ILK-Inhibitor MC-5 wurde den Tieren oral in einer täglichen Dosis von 150mg/kg mittels einer Gavage Fütterungsnadel (20 Gauge) verabreicht (Fine Science Tools, Vancouver, Kanada). Der Proteasom-Inhibitor Epoxomycin wurde alle 24 Stunden in einer Konzentration von 0,5mg/kg intraperitoneal mit einer 26 Gauge Nadel (BD Microlance 3, BD, Heidelberg) gespritzt.

5.11.4 Gewinnung von Urin und Blut

Für die Blutabnahme wurden die Tiere durch eine antagonisierbare Injektionsnarkose anästhesiert. Die intraperitoneal verabreichte Narkose enthält drei Bestandteile: ein Schmerzmittel (Fentanyl 0,05 mg/kg), ein Muskelrelaxans (Medetomidin 0,5 mg/ml) und ein Schlafmittel (Midazolam 5 mg/kg). Mit EDTA-beschichteten Hämatocrit-

Glaskapillaren wurde der Venenplexus hinter dem Auge punktiert und das Blut in einer EDTA-beschichteten Microvette CB300 von Sarstedt (Nürnbrecht) aufgefangen und 2 Minuten bei 100 x g (1000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und nach dem Schockgefrieren in Flüssigstickstoff bei -80°C gelagert. Urin wurde am letzten Tag des Experimentes gewonnen, indem die Tiere für circa 3-5 Minuten in ein eiskaltes Becherglas gesetzt wurden. Da es sich um männliche Tiere handelte wurde so das „Melken“ vermieden. Diese Methode führt häufiger dazu, daß zusätzlich Spermatozoen in den Urin mit abgegeben werden und die Messungen der Proteinkonzentration verfälschen.

5.11.5 Organentnahme

Für die Organentnahme wurden die Tiere durch eine Dislokation der Halswirbel getötet. Das Abdomen wurde eröffnet und beide Nieren entfernt. Jede Niere wurde zerteilt und in verschiedene Gefäße und Reagenzien für die späteren Analysen verbracht: RNA-later (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, England) für Real-time RT-PCR; Jung Tissue Freezing Medium OTC (Leica Instruments, Nussloch) für Immunhistologien; in 10 % Formalin (Formal-Fixx Concentrate (Thermo Shandon, Dreieich) 1:5 mit ddH₂O verdünnt) für eine anschließende Fixierung und PAS-Färbung, 3% Glutaraldehyd (Sigma, München) in PBS für die Elektronenmikroskopie und in Flüssigstickstoff (Linde, Höllriegelskreuth) für Western Blot.

5.11.6 Messung von Creatinin im Urin

Im Urin der Mäuse wurde die Creatinin-Menge mit einem Creatinin-Kit der Firma Merck (Darmstadt) nach der Jaffé Methode bestimmt (Merckotest; Katalognummer: 1.03385.0001). In alkalischem Medium bildet Creatinin mit Pikrinsäure einen Creatinin-Pikrat-Komplex, der der Lösung eine orangene Farbe verleiht. Die Absorption der Lösung ist in einem gewissen Bereich proportional der Creatinin-Konzentration. In einem Mikroplatten-Reader (Tecan, GeniosPlus, Crailsheim) wurde die Farbstoffentwicklung bei 490nm gemessen (Jaffé, 1886).

5.11.7 Messung der Blut-Werte

Das gewonnene EDTA-Blut wurde in einem Minimalvolumen von 200µl mit Aqua inject (Braun Petzold GmbH, Melsungen) verdünnt. Die Verdünnung orientierte sich

nach der geringsten Menge Plasma und das Plasma aller Tiere wurde gleich verdünnt (1:5). Die Messung von Albumin, Creatinin, Cholesterin, Gesamtprotein und BUN erfolgte mit einem Hitachi Analysegerät (Hitachi, Tokio, Japan) im Zentrallabor der Medizinischen Poliklinik, München.

6 Ergebnisse

6.1 Die ILK und ihre Funktion in Podozyten

6.1.1 ILK-Inhibitor MC-5 inhibiert ILK Downstream-Targets *in vitro*

Die Integrin-linked Kinase (ILK) ist in der Lage PKB/Akt an Serin 473 und GSK-3 β an Serin 9 zu phosphorylieren. In den vergangenen Jahren wurden zunehmend spezifische Antikörper generiert, die Moleküle detektieren, die an bestimmten Aminosäuren phosphoryliert sind. Durch diese Antikörper ist es möglich, zunächst ohne den Einsatz von *in vitro* Kinase Assays, die Signaltransduktion von Kinasen zu analysieren. Mit Hilfe von Antikörpern, die phosphorylierte Formen von PKB/Akt und GSK-3 β erkennen, kann auf die Aktivität der ILK geschlossen werden. Der spezifische ILK-Inhibitor, im Folgenden MC-5 genannt, wurde von der kanadischen Biotechnologie-Firma „Kinetek Pharmaceuticals“ mit Sitz in Vancouver entwickelt. Er wurde in Kanada „*in house*“ auf seine Spezifität hin getestet und der Arbeitsgruppe PD Dr. Kretzler zur Verfügung gestellt. Die Eigenschaften des Inhibitors wurden zunächst in *in vitro* Experimenten genauer untersucht.

Murine Podozyten wurden über Nacht in serumfreiem Medium synchronisiert und anschließend für 24 Stunden mit 0 und 5 μ M ILK-Inhibitor MC-5 behandelt. Um die Wirkungsweise des ILK-Inhibitors im Zellkultur-System zu testen, wurden die Zellen anschließend mittels Immunfluoreszenz (siehe Abbildung 6.1) und Western Blot (siehe Abbildung 6.2) analysiert. Hierbei wurden Antikörper verwendet, die nur an Serin 473 phosphorylierte PKB/Akt und an Serin 9 phosphorylierte GSK-3 β nachweisen. Für den Western Blot wurden als Ladungskontrollen zusätzlich noch Antikörper verwendet, die phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes Protein erkennen. Die Immunfluoreszenz von Podozyten mit und ohne Inhibitor-Behandlung (siehe Abbildung 6.1) zeigt für beide Moleküle ein diffuses Signal im Cytoplasma und am Leitsaum („*Leading edge*“) der Zellen. Bei den ILK-Inhibitor behandelten Zellen ist eine deutliche Reduktion des Signals für Phospho-GSK-3 β (Abbildung 6.1 B) zu erkennen. Die Abnahme der

Signalstärke von Phospho-PKB/Akt nach Inkubation mit 5 μ M MC-5 ist nur sehr gering (Abbildung 6.1 D). Die bereits in der Immunfluoreszenz ermittelten Unterschiede wurden zusätzlich semi-quantitativ mittels Western Blot analysiert.

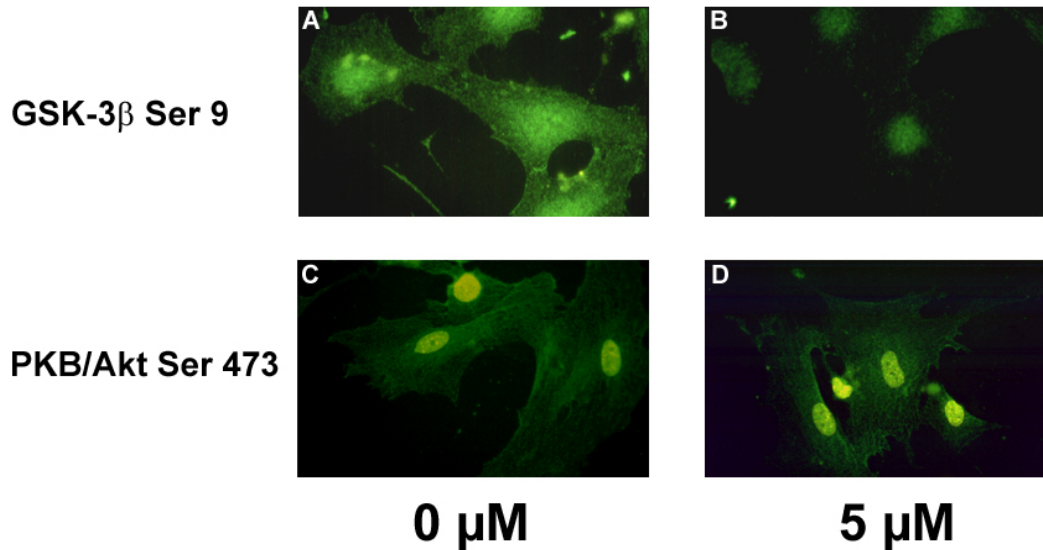


Abbildung 6.1: Phosphorylierung von GSK-3 β und PKB/Akt Molekülen in ILK-Inhibitor behandelten Zellen. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen (630 \times) von murinen Podozyten, die 24 Stunden ohne (A und C) oder mit ILK-Inhibitor (B und D) inkubiert wurden. Antikörper gegen die phosphorylierte Form von GSK-3 β (A und B) und PKB/Akt (C und D) zeigen vor allem eine Reduktion von phosphorylierter GSK-3 β an Serin 9 (GSK-3 β Ser9) nach der Behandlung mit ILK-Inhibitor. Der Einfluß auf die Phosphorylierung von PKB/Akt an Serin 473 ist gering. Die starke nucleäre Färbung vor allem in C und D ist auf den Sekundärantikörper zurückzuführen, der in den entsprechenden Negativ-Kontrollen ein ebenso starkes Kernsignal zeigt.

Gleiche Mengen an Proteinlysate wurden geladen und der Blot wie unter 5.5.1 beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden die Membranen mit den phosphorylierungsspezifischen Antikörpern inkubiert. Danach wurden die Membranen wie unter 5.5.3 beschrieben gestrippt und mit den phosphorylierungsunabhängigen Antikörpern gegen das gesamte Protein inkubiert. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen weisen die MC-5 behandelten Podozyten im Immunoblot ebenfalls verminderte Spiegel von phosphorylierten Molekülen auf, die der ILK Signaltransduktion nachgeschaltet sind. Die Gesamtprotein-Mengen für GSK-3 β und PKB/Akt bleiben gleich, der Pool von Phospho-Serin 9-GSK-3 β hingegen ist deutlich und der Pool von Phospho-PKB/Akt Serin 473 etwas geringer in den ILK-Inhibitor behandelten Zellen (Abbildung 6.2).

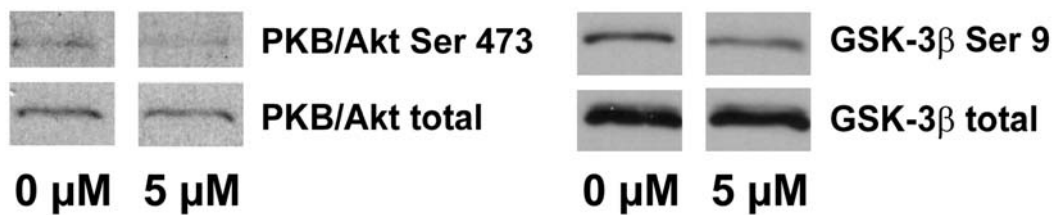


Abbildung 6.2 Immunoblot-Analyse ILK-Inhibitor behandelter Podozyten. Um die Mengen an phosphoryliertem Protein semi-quantitativ zu bestimmen wurden 5 μ g Protein geladen und die Membranen zunächst mit den phospho-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die gestrippten Blots wurden im Anschluß mit Antikörpern inkubiert, die das Molekül unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus erkennen. Zellen, die mit dem ILK-Inhibitor behandelt wurden, zeigen geringer Spiegel von Serin 473 phosphorylierter PKB/Akt und deutlich geringere Spiegel von an Serin 9 phosphorylierter GSK-3 β . Die Gesamtmengen von GSK-3 β und PKB/Akt Protein bleiben unverändert.

6.1.2 Die Lokalisation von ILK wird durch den Inhibitor nicht beeinflusst

Ob der ILK-Inhibitor MC-5 die natürliche Lokalisation des Moleküls beeinflusst, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Murine Podozyten wurden für 24 Stunden mit MC-5 behandelt. Die ILK befindet sich in den unbehandelten und in den behandelten Podozyten innerhalb der Fokalkontakte und in der peri-nucleären Region (siehe Abbildung 6.3). Paxillin, ein weiteres Fokalkontaktprotein, das an die Kinase-Domäne der ILK bindet wurde ebenfalls untersucht (Nikolopoulos and Turner, 2001). Auch die Lokalisation von Paxillin wird durch den ILK-Inhibitor nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

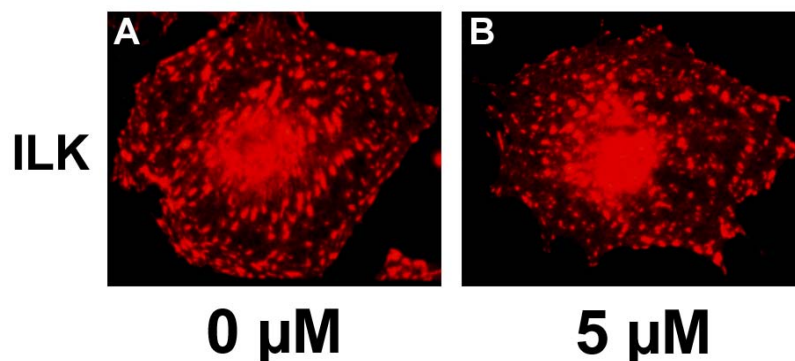


Abbildung 6.3 Die Lokalisation der ILK innerhalb der Fokalkontakte wird durch den ILK-Inhibitor nicht beeinflusst. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (x1000) von murinen Podozyten mit und ohne MC-5-Behandlung zeigt, dass sich die ILK in beiden Fällen in den Fokalkontakten befindet.

6.1.3 Inhibition der ILK erhöht die Apoptose-Rate von Podozyten

Die ILK aktiviert durch Phosphorylierung an Serin 473 die Proteinkinase PKB/Akt und nimmt so Einfluß auf die PKB/Akt regulierte Apoptose-Prävention in der Zelle.

Anhand des TUNEL-Assays wurde zum einen untersucht, ob der Inhibitor zu einem deutlichen Anstieg der Apoptose-Rate führt. Zum anderen wurde die Auswirkung einer ILK-Inhibition auf die Apoptose-Rate von Podozyten analysiert.

Die Podozyten wurden vor der Zugabe des Inhibitors MC-5 über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen für 24 Stunden mit 0 und 5 μM ILK-Inhibitor MC-5 behandelt. Anschließend die Fixation der Zellen und der Nachweis der DNA-Einzelstrangbrüche mit dem TUNEL-Assay. Abbildung 6.4 A zeigt ein qualitatives Ergebnis der TUNEL-Assays. Die Negativkontrolle oben zeigt Zellen, die ohne terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) behandelt wurden und somit keine fluoreszenzmarkierten Nukleotide in die DNA-Einzelstrangbrüche einbauen konnten. Darunter sieht man die Ansätze mit Enzym und den Zellen, die mit 0 oder 5 μM ILK-Inhibitor behandelt wurden, Anregung bei 455 nm (FITC) im Fluoreszenz-Mikroskop. Zusätzlich wurde die DNA in den Zellkernen mit DAPI gefärbt.

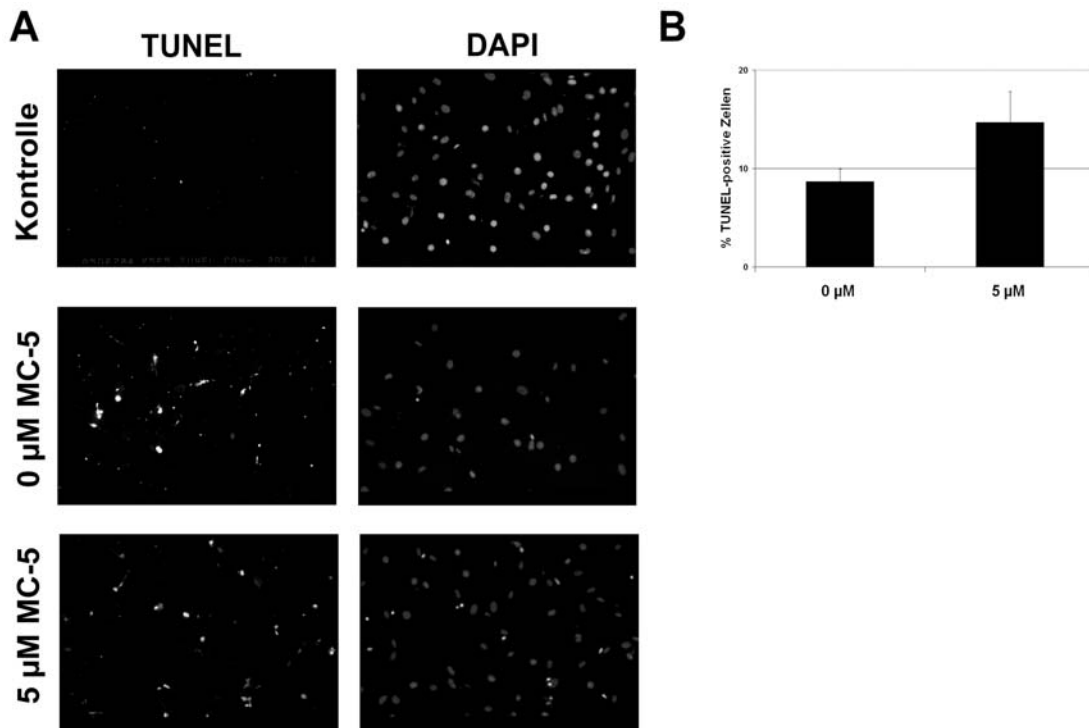


Abbildung 6.4 Inhibition der ILK führt zu einem Anstieg der Apoptose-Rate in Podozyten. Die Abbildung zeigt in A ein qualitatives Ergebnis eines TUNEL-Assays. Die Negativkontrolle ohne Enzym zeigt keine spezifischen Signale für FITC-markierte Nukleotide. Die beiden Ansätze mit ILK-Inhibitor MC-5 und der terminalen Deoxynukleotidyltransferase zeigen Signale der fluoreszenz-markierten Nukleotide, die in die DNA-Strangbrüche eingebaut wurden. B zeigt die quantitative Auswertung der TUNEL-Assays mit einem leichten Anstieg der Apoptose-Häufigkeit um 6% in Zellen mit inhibierter ILK (Angaben in Mittelwerten \pm SD).

6.1.4 Einfluß von oxidativem Stress und ILK-Inhibition auf die Proliferation

Bei Nieren-Schädigung ist die ILK-Aktivität innerhalb von Podozyten erhöht (Kretzler et al., 2001a) und Podozyten durchlaufen häufig erneute Kern- und sogar Zellteilungen. Die Konsequenz einer ILK-Inhibition auf die Proliferationsrate von Podozyten unter oxidativem Stress wurde mit dem spezifischen Inhibitor MC-5 untersucht. Hierbei wurde zunächst die Proliferationsrate von gesunden mit der von geschädigten Podozyten verglichen. Um die Podozyten *in vitro* zu schädigen wurde Puromycin Aminonucleosid verwendet, das *in vivo* bei Ratten eine Nierenschädigung auslöst (Lannigan et al., 1962). Die Proliferation der Zellen wurde mit einem MTT-Assay (siehe 5.8) quantitativ erfasst. Die durch Puromycin angeregte Proliferation ($128 \pm 28\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; $p < 0,05$; $n = 5$) konnte durch die Inhibition

der ILK mit MC-5 deutlich minimiert ($105 \pm 5\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) werden (Teixeira et al., 2005).

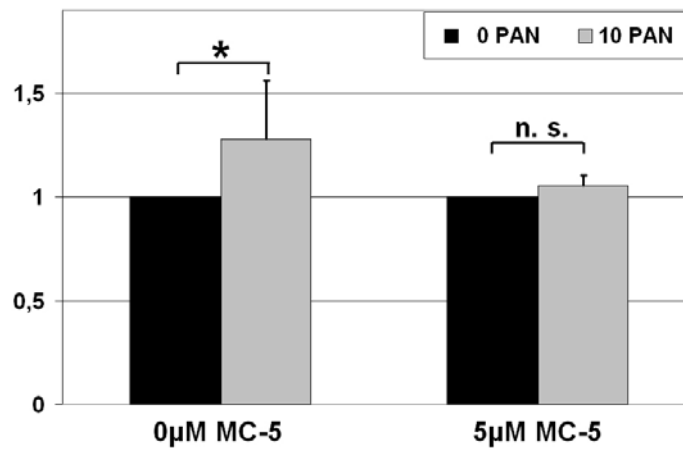


Abbildung 6.5: Oxidativer Stress induziert Proliferation und wird durch ILK-Inhibitor blockiert. Murine Podozyten wurden für 24 Stunden mit 0 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin und ILK-Inhibitor MC-5 (0 und 5 μM) behandelt. Die Proliferation der Podozyten wurde anhand eines MTT-Assays bestimmt. Werden Podozyten durch Puromycin gestresst, proliferieren sie vermehrt. Behandelt man die Zellen gleichzeitig mit dem ILK-Inhibitor MC-5 wird die Puromycin-induzierte Proliferation verhindert. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung; * ist $p < 0,05$.

6.1.5 Einfluß von oxidativem Stress und ILK-Inhibition auf die Adhäsion

Puromycin reduziert die Podozyten-Matrix-Adhäsion. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen hat sich bei geschädigten Podozyten die Zahl der adhärenen Zellen halbiert ($48 \pm 16\%$; * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe; $n = 4$). Co-Inkubation der Zellen mit Puromycin und dem kleinmolekularen ILK-Inhibitor ermöglichte den Podozyten wieder eine verbesserte Adhäsion an die Collagen-Matrix ($85 \pm 27\%$).

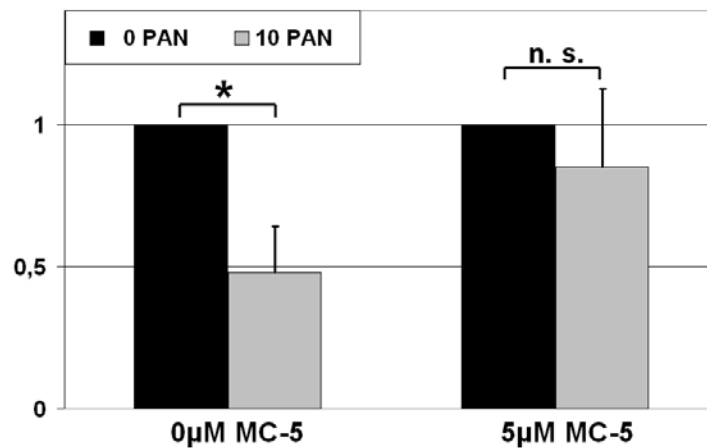


Abbildung 6.6 Der verminderten Adhäsion bei Schädigung kann durch die Inhibition der ILK blockiert werden. Puromycin-behandelte Podozyten weisen im Vergleich zu nicht behandelten Podozyten eine deutlich verminderte Adhäsion an die Collagen Matrix auf. Wird die ILK-Aktivität gleichzeitig mit dem Inhibitor MC-5 vermindert, kann die Adhäsion der der Podozyten auf das Ausgangsniveau angehoben werden. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. * ist $p < 0,05$.

6.1.6 Die nucleäre Translokation von β -Catenin ist ILK-abhängig

Zell-Phänotyp Transformation ist häufig während der Embryonalentwicklung zu beobachten und wird dort durch den *Wnt*-Signaltransduktionsweg gesteuert. Zentrale Merkmale sind unter anderem die durch GSK-3 β regulierte Degradation/Akkumulation von β -Catenin und die Translokation von β -Catenin in den Zellkern, wo β -Catenin zusammen mit LEF-1 das Transkriptom der Zelle beeinflusst. Da ILK in der Lage ist GSK-3 β durch direkte Phosphorylierung zu regulieren, könnte sie auch direkten Einfluß auf den β -Catenin-Pool und dessen Lokalisation innerhalb der Zelle besitzen.

Abbildung 6.7 zeigt die ILK-abhängige Translokation von β -Catenin in den Zellkern von Podozyten. Diese Translokation konnte in zwei unterschiedlichen Ansätzen mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden. Zum einen durch eine stabile Transfektion einer Kinase-aktiven und einer Kinase-inaktiven ILK und zum anderen durch eine pharmakologische Inhibition der Kinase-Aktivität in Podozyten. Abbildung 6.7 A zeigt stabil transfizierte murine Podozyten, die eine Kinase-aktive ILK (wildtyp-ILK) bzw. eine in der Kinase-Domäne mutierte ILK überexprimieren (Kretzler et al., 2001a). Normale Podozyten zeigen β -Catenin fast ausschließlich an den Zell-Zell-Kontakten

und im Cytoplasma. In Podozyten, die wildtyp ILK überexprimieren, lokalisiert β -Catenin ebenfalls an den Zell-Zell-Kontakten und im Cytoplasma. Darüber hinaus findet man in vielen Zellen vermehrt ein nucleäres Signal von β -Catenin (Abbildung 6.7 A, wildtyp-ILK). Wird eine Form der ILK überexprimiert, die durch eine Punktmutation innerhalb der Kinase-Domäne eine deutlich herabgesetzte Kinase-Aktivität besitzt, sammelt sich β -Catenin zwar peri-nucleär an, transloziert aber nicht in den Zellkern (Abbildung 6.7 A, mutierte-ILK).

Mit Hilfe des ILK-spezifischen Inhibitors MC-5 (Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) konnte die Rolle der ILK bei der Translokation von β -Catenin in den Zellkern bestätigt werden (siehe Abbildung 6.7 B). Podozyten, die mit Puromycin behandelt wurden, zeigen eine gesteigerte ILK-Aktivität (Kretzler et al., 2001a) und eine zeit- und dosis-abhängige Translokation von β -Catenin in den Zellkern (Teixeira et al., 2005). Werden die Podozyten gleichzeitig mit 5 μ M ILK-Inhibitor MC-5 und 10 μ g/ml Puromycin behandelt, findet sich in den analysierten Zellen kaum noch nach nucleär transloziertes β -Catenin (Abbildung 6.7 B).

In Podozyten, die die Kinase-inaktive Form der ILK überexprimieren (mutierte-ILK), bleibt die Translokation von β -Catenin in den Nucleus auch bei einer Inkubation mit 10 μ g/ml Puromycin aus (Abbildung 6.7 B, rechts).

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenz von Abbildung 6.7 quantitativ zu stützen wurden Podozyten ebenfalls für 8 Stunden mit 10 μ g/ml Puromycin, 5 μ M ILK-Inhibitor MC-5 oder mit beiden Reagenzien gemeinsam inkubiert. Anschließend wurden Kernextrakte wie unter 5.3.3 beschrieben hergestellt und im Western Blot analysiert (Abbildung 6.8 B). Das während der Präparation anfallende cytoplasmatische Lysat wurde ebenfalls mittels Western Blot untersucht (Abbildung 6.8 A). Im Western Blot wurden je Spur 4 μ g Cytoplasma- bzw. 4 μ g Kernlysate aufgetragen. Als Ladungskontrollen wurden die Membranen zusätzlich mit einem Actin-spezifischen bzw. einem c-jun spezifischen Antikörper inkubiert. Podozyten, die mit 10 μ g/ml Puromycin behandelt wurden, zeigen eine Akkumulation von β -Catenin im Nucleus. Die β -Catenin Protein Spiegel in Zellkernen von Podozyten, die mit 5 μ M ILK-Inhibitor alleine oder in Kombination mit 10 μ g/ml Puromycin behandelt wurden, unterscheiden sich nicht von denen Medium-behandelter Kontroll-Zellen (Abbildung 6.8 A).

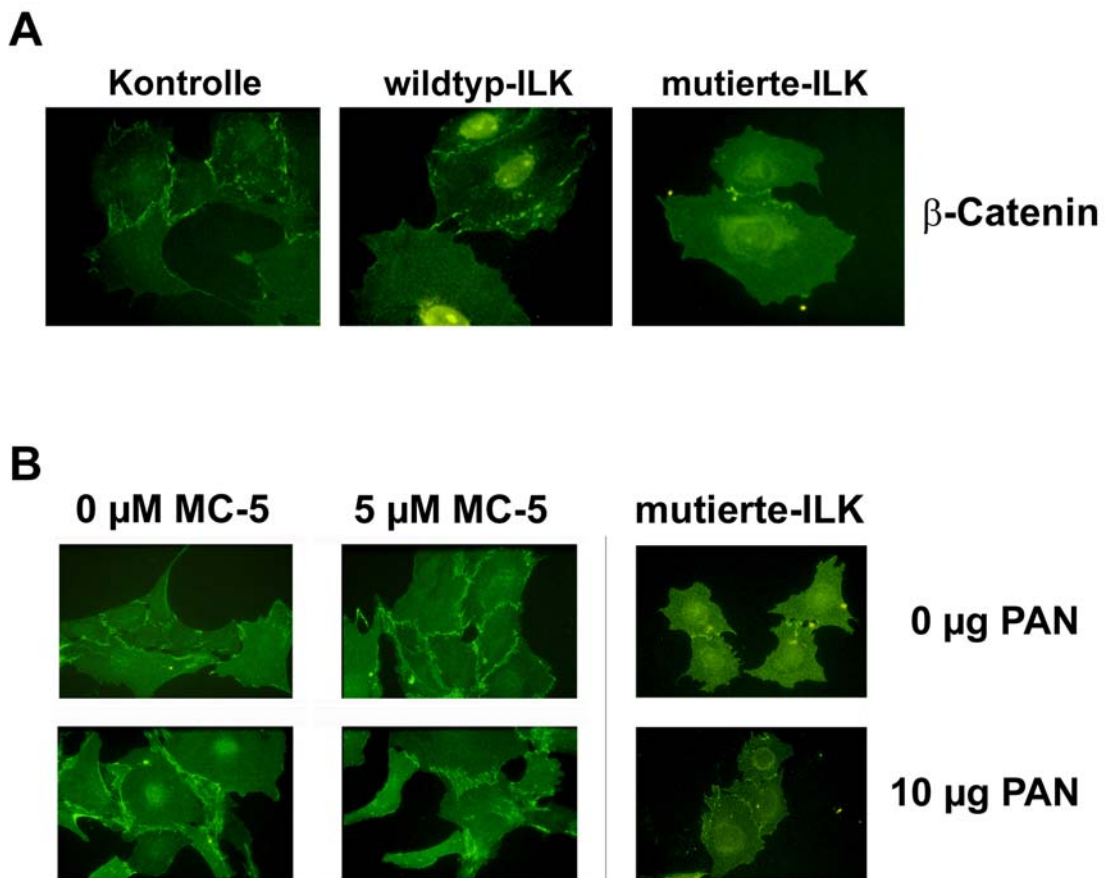


Abbildung 6.7 ILK-abhängige Translokation von β-Catenin in den Zellkern. Die indirekte Immunfluoreszenz zeigt die Lokalisation von β-Catenin in der Submembran-Region von Zell-Zell-Kontakten und innerhalb von Zellkernen. Murine Podozyten, die eine Kinase-aktive ILK (wildtyp-ILK) überexprimieren, zeigen β-Catenin vermehrt im Nucleus. In Podozyten, die eine Kinase-inaktive ILK (mutierte-ILK) überexprimieren, befindet sich β-Catenin zwar vermehrt in der perinucleären Region, aber nicht im Zellkern (A). Murine Podozyten, die für 8 Stunden mit 10μg/ml Puromycin behandelt wurden, zeigen β-Catenin neben seiner Lokalisation an den Zell-Zell-Kontakten auch verstärkt im Nucleus. Bei gleichzeitiger Inkubation mit 5μMILK-Inhibitor MC-5 kann die Translokation von β-Catenin in die Zellkerne unterbunden werden (B). Auch bei Podozyten, die Kinase-inaktive ILK überexprimieren, zeigen bei Inkubation mit 10μg/ml Puromycin keine nucleäre Translokation von β-Catenin (B, rechts).

In der cytoplasmatischen Fraktion sieht man bei den unterschiedlich behandelten Podozyten gleiche Spiegel an β-Catenin. Actin diente als interne Ladungskontrolle (Abbildung 6.8 B). Die Daten in Abbildung 6.8 unterstützen die Beobachtungen der indirekten Immunfluoreszenz aus Abbildung 6.7 und stehen in Einklang mit den in (Teixeira et al., 2005) publizierten Beobachtungen mit ILK-überexprimierenden Podozyten.

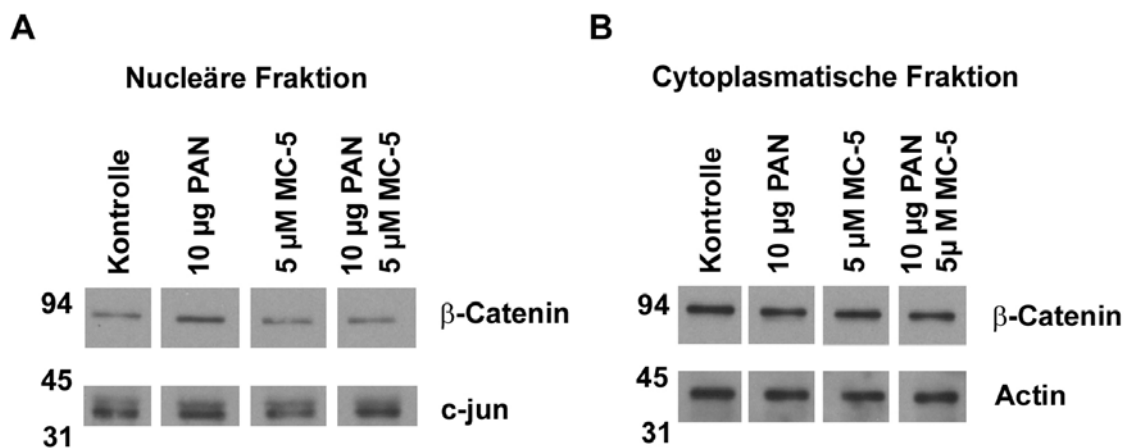


Abbildung 6.8 ILK-abhängige subzelluläre Lokalisation von β -Catenin. Nach Inkubation der Podozyten mit 10 μ g/ml Puromycin bzw. 5 μ M ILK-Inhibitor MC-5 wurde eine Kernextraktion mit darauf folgendem Western Blot durchgeführt (A). Hierbei wurde auch die cytoplasmatische Fraktion (B) analysiert. Die Kernlysate zeigen bei Puromycin (PAN)-behandelten Podozyten eine deutliche Akkumulation von β -Catenin im Zellkern. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit 5 μ M ILK-Inhibitor MC-5 ist die Menge an nucleärem β -Catenin nicht verändert. Es wurde jeweils 4 μ g Protein aufgetragen, als Ladungskontrolle wurde das nucleäre Protein c-jun verwendet. Bei den Kontrollen handelt es sich um Zellen, die mit normalem Medium ohne weitere Zusätze behandelt wurden (A). In der cytoplasmatischen Fraktion findet sich nach der Behandlung der Zellen mit 10 μ g/ml Puromycin (PAN) ein gleich bleibender Pool von β -Catenin Protein. Die Behandlung mit 5 μ M MC-5 alleine oder in Kombination mit 10 μ g/ml Puromycin führte zu keiner Veränderung. Es wurde jeweils 4 μ g Protein aufgetragen, als interne Ladungskontrolle wurde Actin verwendet (B).

Anhand der Vorarbeiten *in vitro* wurde die nucleäre Translokation β -Catenin auch bei Adriamycin-induzierter Nephropathie *in vivo* analysiert (siehe auch 3.3.4 und 5.11.2). Nieren von gesunden und von Adriamycin (ADR) behandelten Tieren wurden mittels Co-Immunfluoreszenzen an immunhistologischen Schnitten untersucht. Um die Zellkerne der Podozyten in den Glomeruli zu markieren, wurde ein Antikörper gegen das Molekül WT-1 verwendet. WT-1 ist ein podozyten-spezifisches Zinkfingerprotein und nucleär lokalisierter Transkriptionsfaktor. Dort kontrolliert WT-1 die Expression von weiteren Podozyten-spezifischen Molekülen (Abbildung 6.9 B, E und H). Tiere mit glomerulärer Schädigung zeigen im Vergleich zu gesunden Tieren einen erhöhten Spiegel an ILK-Protein (Abbildung 6.9 J und K). Eine Induktion der ILK kann zu einer vermehrten Translokation von β -Catenin in den Nucleus führen. In den Podozyten gesunder Nieren findet sich ein diffuses, cytoplasmatisches Signal von β -Catenin (Abbildung 6.9 A). Bei einer gleichzeitigen Färbung des Zellkern- und Podozyten-

spezifischen Proteins WT-1 (Abbildung 6.9 B) findet man in der Überlagerung der beiden Bilder keine Co-Lokalisation (Abbildung 6.9 C). Innerhalb der Glomeruli von Adriamycin (ADR) behandelten Tieren findet sich cytoplasmatisch β -Catenin. Zusätzlich finden sich noch häufig stark gefärbte, punktuelle Signale innerhalb des Glomerulus (Abbildung 6.9 D und G), die mit WT-1 (Abbildung 6.9 B, E und H) colokalisiert sind (Abbildung 6.9 F und I). Eine vermehrte Translokation von β -Catenin in den Zellkern, bei parallel erhöhten ILK-Protein Spiegeln, findet sich also auch *in vivo* in pathologisch veränderten Säugernieren.

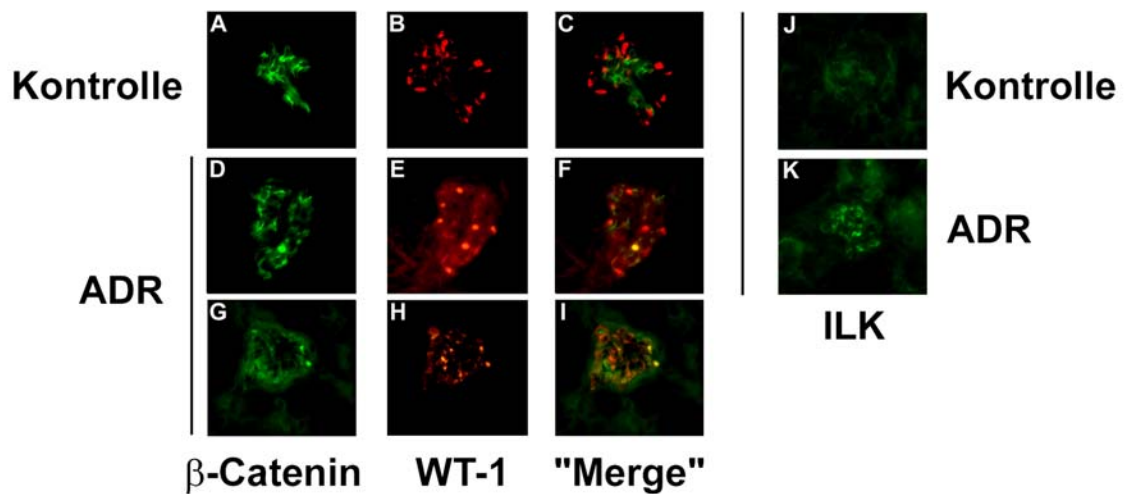


Abbildung 6.9 Nucleäre Translokation von β -Catenin in den Zellkern von Podozyten *in vivo*. Glomeruli von Mäusen mit einer Adriamycin-induzierten Nierenerkrankung (ADR) zeigen eine ILK-Induktion auf Protein-Ebene (J und K). Doppel-Immunhistochemien zeigen, dass in gesunden Nieren β -Catenin in der Regel ein diffuses Signal im Cytoplasma (A) hervorruft und nicht in die Zellkerne (B) der Podozyten transloziert. Die Überlagerung beider Bilder A und B zeigt keine Co-Lokalisation von β -Catenin und dem podozyten-spezifischen Transkriptionsfaktor WT-1 (Podozyten-Zellkerne (C)). In erkrankten Nieren (D-I) mit induzierter ILK befindet sich β -Catenin zusätzlich zu cytoplasmatischen Lokalisation auch in Zellkernen von Podozyten. Die Co-Lokalisation von β -Catenin mit WT-1 nach dessen Translokation in den Nucleus ist in der Überlagerung (F und I) als gelbes Signal zu erkennen.

6.1.7 ILK-abhängige Repression des Schlitzmembran-Moleküls P-Cadherin

Die ILK reguliert die Expression des integralen Zellmembranmoleküls E-Cadherin (Oloumi et al., 2004). Murine Podozyten exprimieren das Schlitzmembranmolekül P-Cadherin, bei dem es sich um ein Typ I Membranmolekül handelt und der Cadherin Familie angehört. Mit Hilfe des ILK-Inhibitors wurde die Regulation von P-Cadherin auf mRNA- und Protein-Ebene in Podozyten untersucht.

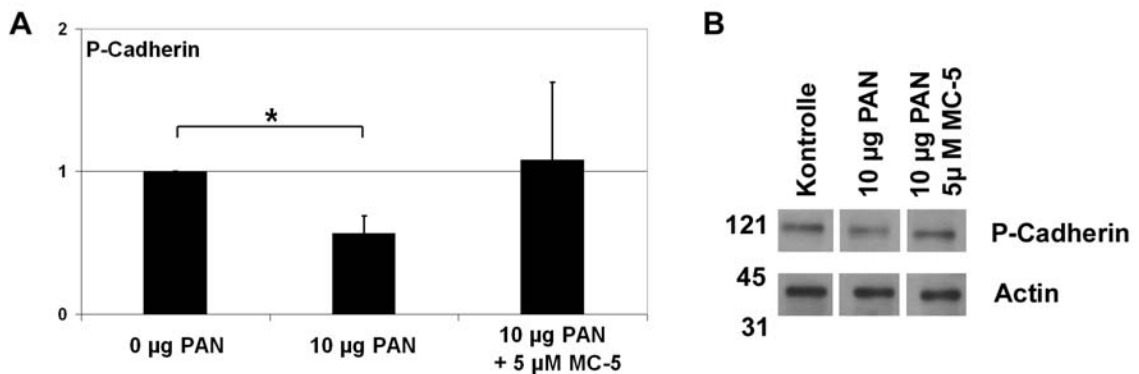


Abbildung 6.10 ILK-abhängige Regulation des Schlitzmembran-Moleküls P-Cadherin. Puromycin-induzierter Podozyten-Schaden führt zu einer verminderten mRNA-Expression von P-Cadherin, die durch die gleichzeitige Inhibition der ILK Aktivität wieder auf das Ausgangsniveau angehoben werden kann. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 5$; $P < 0,05$) von 5 durchgeführten real-time RT-PCRs in Bezug zu 18S rRNA als Housekeeper (A). Die Menge an P-Cadherin Protein in den behandelten Podozyten folgt der mRNA-Regulation des Moleküls. Je Spur wurden 4 µg Proteinlysate geladen. Als Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen Actin verwendet (B).

Abbildung 6.10 A zeigt die Zusammenfassung von fünf durchgeführten Einzelexperimenten. Die mRNA-Expression von P-Cadherin ist nach einer 24-stündigen Inkubation mit 10 µg/ml Puromycin deutlich reduziert. Gleichzeitig führt eine solche Behandlung in Podozyten zu einer gesteigerten Kinase-Aktivität und Induktion der ILK (Kretzler et al., 2001a). Vermehrte Mengen an ILK-Protein können auch in kranken Nieren von *Mus musculus* nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6.9). Bei gleicher Behandlung zeigt sich auch eine Repression von P-Cadherin auf Protein-Ebene im Western Blot (Abbildung 6.10 B). Bei gleichzeitiger Inhibition der ILK-Aktivität mit 5 µM MC-5 wird P-Cadherin nicht reprimiert (Abbildung 6.10) Vergleichbare Resultate liefern ILK-überexprimierende Podozyten mit einer Repression von P-Cadherin (Teixeira et al., 2005).

6.2 Inhibition der ILK-Aktivität *in vivo* mit ILK-Inhibitor MC-5 in Mäusen mit eingeschränkter Nierenfunktion

Die Integrin-linked Kinase wird in einer Reihe von humanen Nieren-Erkrankungen und in verschiedenen Tiermodellen induziert. Im Fall des Adriamycin-Modells finden sich, ebenso wie in humanen diabetischen Glomeruli (Guo et al., 2001), erhöhte ILK-Protein Spiegel (siehe Abbildung 6.9 J und K) und der ILK-Inhibitor konnte die Funktion geschädigter Podozyten hinsichtlich Adhäsion, Proliferation *in vitro* verbessern.

Die Wirkung des ILK-Inhibitors MC-5 *in vivo* wurde zunächst an gesunden Tieren getestet, indem die phosphorylierungsspezifischen Antikörper für PKB/Akt (Serin 473) und GSK-3 β (Serin 9) für die Immunhistologie verwendet wurden. Bei beiden Molekülen handelt es sich um Proteine, die durch die ILK phosphoryliert werden können und deren Phosphorylierungsstatus unter anderem auch auf die ILK-Aktivität schließen lässt. Bei Tieren, die mit MC-5 behandelt wurden, fanden sich weniger phosphorylierte PKB/Akt und GSK-3 β Moleküle (persönliche Mitteilung, Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada).

Für dieses Tierexperiment wurde bei 18 männlichen Balb/c Mäusen (n = 9 je Gruppe) mit zwei intravenösen Injektionen von je 13 mg/kg Körpergewicht Adriamycin (ADR) an den Tagen 1 und 14 ein chronischer Nierenschaden induziert (siehe 5.11.2). Die Tiere entwickelten in der ersten Woche des Experimentes eine zunächst starke Proteinurie als Zeichen für die Schädigung des glomerulären Filtrationsapparates. Da eine Glomerulosklerose, die Vernarbung der Glomeruli, erst nach einer längeren Entzündungsphase eintritt lag der Endpunkt des Experimentes bei Woche 6 nach der ersten ADR-Injektion. Die Behandlung der Tiere mit 150 mg/kg Körpergewicht ILK-Inhibitor MC-5 oder dessen Carrier (5% Tween-80 in Wasser) erfolgte oral über Magensonde zwischen den Tagen 20 bis 45. Tag 45 war gleichzeitig der Endpunkt des Experimentes.

Die Exkretion von Albumin in den Urin wurde mit einem spezifischen ELISA gegen murines Albumin gemessen. Die ermittelten Albumin-Werte wurden dann auf die Menge von ausgeschiedenem Creatinin im Urin bezogen, um für unterschiedlich konzentrierten Urin zu korrigieren. Die Werte von gesunden Tieren bzw. von den Tieren vor der Injektion von Adriamycin liegen bei unter 50 μ g/mg Albumin und sind

in Abbildung 6.11 nicht zu erkennen. Eine Woche nach der Induktion der Nephropathie durch Adriamycin ist ein starker Anstieg der Albumin-Exkretion im Urin der Tiere erkennbar (Abbildung 6.11). Die Einteilung der Tiere in die Gruppen erfolgte randomisiert und erst bei der Auswertung der Albumin-ELISA Daten wurde festgestellt, dass die mit ILK-Inhibitor MC-5 behandelten Tiere eine nicht signifikant stärkere Proteinurie hatten als die Tiere der Carrier-Gruppe (Abbildung 6.11, Woche 1 ADR). Die Behandlung mit dem ILK-Inhibitor und dem Carrier erfolgte von Tag 20 bis Tag 45. Die Albumin-Exkretion der ILK-Inhibitor Tiere am Endpunkt des Experimentes war deutlich reduziert ($p < 0,05$; *) verglichen mit deren Albuminurie-Werten von Woche 1. Die Verminderung der Albuminurie der Carrier-behandelten Tiere war nicht signifikant (n.s.) verglichen mit deren Ausgangswerten von Woche 1. Ein Unterschied in der Albumin-Ausscheidung am Ende des Experimentes war bei den beiden untersuchten Gruppen nicht erkennbar.

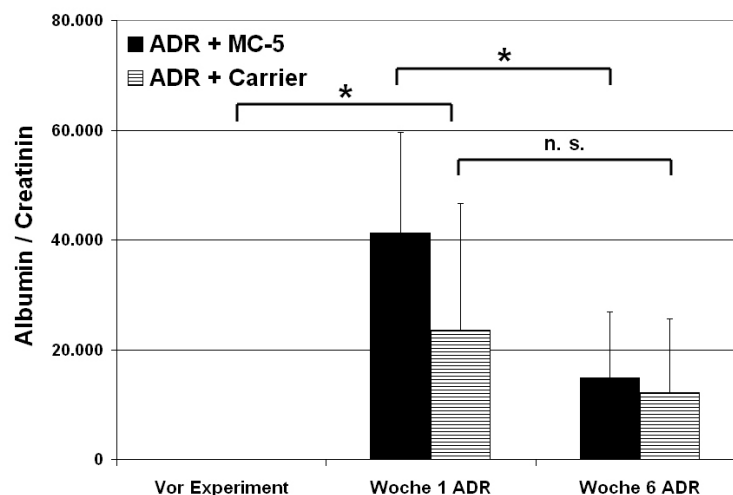


Abbildung 6.11 Albumin Exkretion in den Urin als funktioneller Parameter der Nierenfunktion. Die Albumin-Werte im Urin der Mäuse wurden vor dem Experiment, eine Woche nach Induktion des Modells und am Ende des Experimentes bestimmt. Der Urin von Woche 1 mit signifikant erhöhten Albumin-Werten zeigt die erfolgreiche Induktion des Modells an. Die Werte von gesunden Tieren (vor Experiment) liegen unter $50 \mu\text{g}/\text{mg}$ Albumin und sind mit der verwendeten Skalierung nicht sichtbar. Die Verteilung der Tiere auf die beiden Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die Albumin-Exkretion am Ende des Experimentes (Woche 6 ADR) der Carrier-behandelten Tiere zeigt keinen signifikanten Unterschied zu deren Werte von Woche 1 (n.s.). Die Reduktion der Albuminurie im Urin der ILK-Inhibitor-Tiere ist im Vergleich zu deren Werte aus Woche 1 (vor Behandlungsbeginn) signifikant (* = $p < 0.05$).

Zusätzlich zur Analyse der Nierenfunktion anhand der ausgeschiedenen Menge an Albumin wurde die Struktur der Filtrationseinheit der Niere, dem Glomerulus, klassifiziert. Die Klassifizierung in 4 verschiedene Grade (Grad 0-3) wurde lichtmikroskopisch an PAS-gefärbten Nierenschnitten durchgeführt. Die Einteilung in die Grade erfolgte blind und je Tier wurden mindestens 100 Glomeruli bewertet. Abbildung 6.12 A zeigt das quantitative Ergebnis der Klassifizierung. Abbildung 6.12 B zeigt je eingeteilten Grad exemplarisch einen Glomerulus. Die Schädigung der Glomeruli durch das verabreichte Adriamycin ist offensichtlich (Abbildung 6.12 A und B) und sehr viele Glomeruli zeigen eine segmentale oder globale Vernarbung der Schlingensegmente. Das Ausmaß dieser Schädigung durch Vermehrung der extrazellulären Matrix und Vernarbung (Sklerose) in den Glomeruli wurde anhand der Einteilung in die vier Grade erfasst. ILK-Inhibitor MC-5 behandelte Tiere zeigen dabei einen höheren Anteil an weniger stark betroffenen Glomeruli (Grad 1 und 2) als die Carrier Tiere. MC-5 behandelte Tiere weisen zudem signifikant ($p < 0,05$) weniger global geschädigte Grad 3 Glomeruli auf als die Mäuse, denen der Carrier verabreicht wurde.

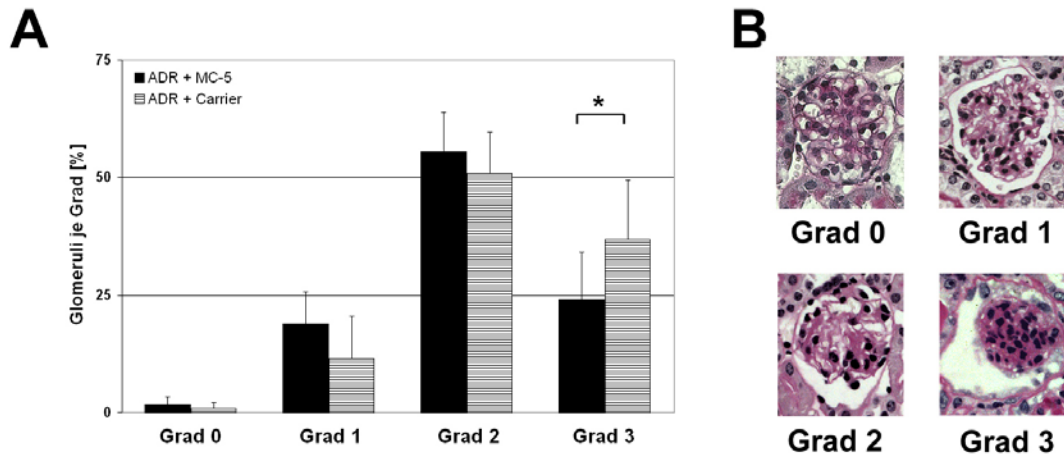


Abbildung 6.12 Quantifizierung des Glomerulosklerose-Grades bei ILK-Inhibitor und Carrier-behandelten ADR-Tieren. Das Ausmaß der Glomerulosklerose (A) wurde bestimmt, indem die Nieren der Tiere geblindet bewertet wurden. Hierbei wurden je Tier mindestens 100 Glomeruli klassifiziert. A zeigt bei beiden Gruppen die Induktion glomerulärer Schäden durch das Adriamycin (ADR). Tiere, die mit dem ILK-Inhibitor MC-5 behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu den Carrier-Kontroll-Tieren signifikant weniger krankhaft veränderte Glomeruli von Grad 3 ($p < 0,05$) und mehr Glomeruli von Grad 0, 1 und 2. Abbildung B zeigt exemplarisch Glomeruli der einzelnen Grade. In Grad 0 wurden Glomeruli eingeteilt, die nicht krankhaft verändert sind. Grad 1 Glomeruli zeigen erste Anzeichen von vermehrter Matrix. Glomeruli vom Grad 2 zeigen zusätzlich zur Vermehrung der Mesangium-Matrix noch einzelne, segmental sklerotisierte Schlingenanteile. Die Funktion der Filtrationseinheit ist hier schon stark eingeschränkt. Bei Glomeruli von Grad 3 ist eine globale Sklerose und starke Vermehrung der Mesangium-Matrix zu erkennen.

6.3 ILK verbindet die Fokalkontakte mit dem Cytoskelett

6.3.1 ILK-Inhibition hat Auswirkung auf die Stressfaser-Formation in Podozyten

Die Integrin-linked Kinase verbindet durch ihre Interaktion mit $\beta 1$ oder $\beta 3$ -Integrinen und weiteren Adaptermolekülen der Fokalkontakte (Paxillin) die extrazelluläre Matrix (ECM) mit dem Cytoskelett der Zelle. Für Podozyten ist ihr Cytoskelett von großer Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung ihrer speziellen Zell-Morphologie (Oh et al., 2004). Um einen möglichen Einfluß der ILK auf die Actin Organisation in Podozyten zu untersuchen, wurden diese 24 Stunden mit 0, 1 und 5 μM des ILK-Inhibitors behandelt und anschließend deren F-Actin mittels Phalloidin-TRITC angefärbt (siehe Abbildung 6.13). Abbildung 6.13 A zeigt die Veränderungen des Actin Cytoskeletts in MC-5 behandelten Podozyten. Unbehandelte Podozyten besitzen ein stark ausgeprägtes Actin Cytoskelett mit langen, den ganzen Zellkörper durchziehenden F-Actin Fasern (Abbildung 6.13 A, links). In ILK-Inhibitor behandelten Zellen ist diese Actin Organisation verändert. Sie besitzen weniger gut ausgebildete, verkürzte Stressfasern und eine zunehmend kortikale Lokalisation des F-Actins. Darüber hinaus findet sich verstärkt akkumuliertes F-actin in den Zellen (Abbildung 6.13 A, mitte und rechts). Das akkumulierte F-Actin lokalisiert vorzugsweise in der Nähe der subkortikalen Areale der Podozyten. Zellen, die mit 1 μM ILK-Inhibitor behandelt wurden zeigen eine leicht verminderte Ausbildung von Stressfasern, bei 5 μM MC-5 wird die Abnahme von intakten, langen F-Actin Fasern deutlich (Abbildung 6.13 B; n = 3, T-Test nach Student $p < 0.05$). Zudem kann eine Zunahme an kortikalem Signal und Akkumulation von F-Actin beobachtet werden. Die Veränderungen am Cytoskelett wurden auch von (Sakai et al., 2003) an murinen ILK $-/-$ Zellen beschrieben, die aus renalem Gewebe generiert wurden.

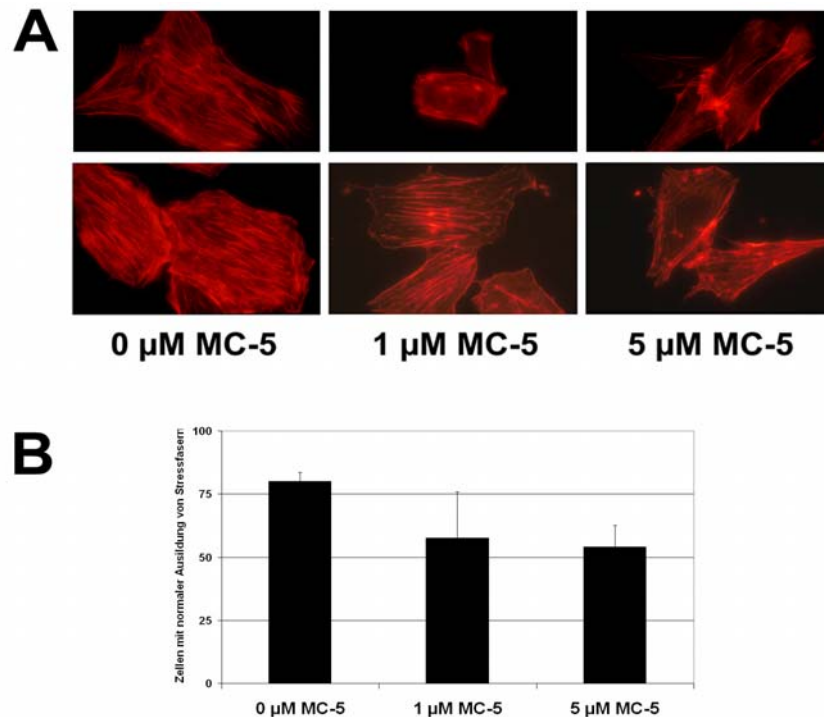


Abbildung 6.13 Inhibition der ILK beeinflusst die Actin Stressfaser-Bildung in Podozyten. Murine Podozyten wurden 24 Stunden mit 0, 1 und 5 μM ILK-Inhibitor behandelt, fixiert und das F-Actin mit Phalloidin-TRITC angefärbt (A). Podozyten besitzen üblicherweise ein ausgeprägtes Cytoskelett mit langen Stressfasern, die sich durch den gesamten Zell-Korpus ziehen (siehe A, 0 μM MC-5). Zellen, die mit dem ILK-Inhibitor MC-5 behandelt wurden, zeigten weniger ausgeprägte Stressfasern. Zunehmend wurde eine kortikale Lokalisation des F-Actins und Aggregate sichtbar. Ergebnisse der Phalloidin-TRITC-Färbung aus A sind in B quantitativ dargestellt. Hierfür wurden je 100 Zellen pro Versuch ($n=3$) geblindet bewertet und nur Zellen mit einem normal ausgeprägten Cytoskelett gezählt. Podozyten mit deutlicher Akkumulation von F-Actin und Zellen mit hauptsächlich kortikalem F-Actin bzw. nur teilweise ausgeprägtem Cytoskelett wurden nicht gezählt.

6.3.2 Expression des cytoskelett-assoziierten Moleküls CLP-36 in Podozyten

CLP-36 ist ein PDZ-LIM Domänen Molekül, das erst in den letzten Jahren näher analysiert wurde. Es interagiert mit mehreren Alpha-Actinin Isoformen (Bauer et al., 2000; Kotaka et al., 2000; Vallenius et al., 2000) und mit der Kinase Clik1 (Vallenius and Makela, 2002). Aufgrund seiner LIM-Domäne könnte es in der Lage sein, innerhalb von Podozyten mit der Ankyrin-Domäne der ILK zu interagieren.

Abbildung 6.14 zeigt eine RT-PCR mit cDNA von murinem Nierencortex und der murinen Podozyten-Zelllinie K5P5 (A) und das Ergebnis eines Western Blots mit

Podozytenlysat (15µg) und CLP-36 spezifischem Antikörper (B; hergestellt gegen humanes CLP-36 von Dr. Kristin Bauer in der Arbeitsgruppe von Professor W. Siess (IPEK, München)). CLP-36 wird von Podozyten exprimiert.

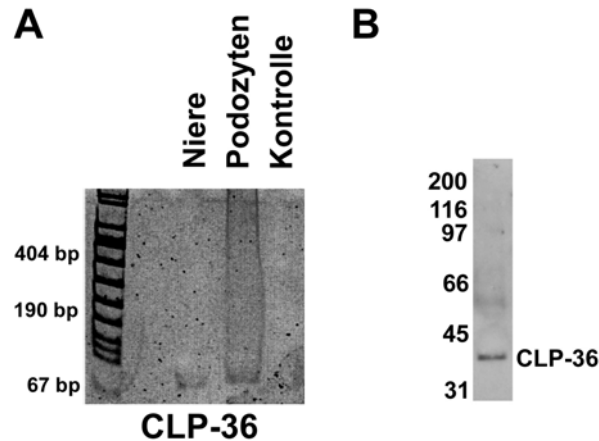


Abbildung 6.14 Expression von CLP-36 in Podozyten. A zeigt das 5%ige Polyacrylamid-Gel einer RT-PCR mit murinem Nierencortex und muriner Podozyten cDNA als Template. Die parallel durchgeführte Wasserkontrolle war negativ. Teil B der Abbildung zeigt das Ergebnis eines Western Blots mit aus Podozyten isoliertem Zell-Lysat. Im Western Blot ist unter Verwendung des CLP-36 spezifischen Antikörpers auch bei längerer Exposition nur eine singuläre Bande von der erwarteten Größe (36 kDa) erkennbar.

6.3.3 Interaktion der ILK mit CLP-36

CLP-36 interagiert mit F-Actin und Alpha-Actinin und lokalisiert hauptsächlich entlang der Stressfasern (Bauer et al., 2000; Vallenius et al., 2000), die an ihren Enden an adhäsive Matrixkontakte, den Fokalkontakten, anknüpfen. Die ILK kann mit ihrer Ankyrin-Repeat Domäne unter anderem mit LIM Domänen von Proteinen interagieren. CLP-36 lokalisiert hauptsächlich entlang der Stressfasern, befindet sich aber auch an deren Enden und co-lokalisiert in der Immunfluoreszenz mit den Fokalkontakt-Proteinen Vinculin und Paxillin (Abbildung 6.15). Paxillin ist innerhalb der Fokalkontakte ein Interaktionspartner der ILK (Nikolopoulos and Turner, 2001). Die Doppel-Immunfluoreszenz für Vinculin und CLP-36 in Podozyten zeigt Vinculin innerhalb der Fokalkontakte und CLP-36 zumeist an den Stressfasern der Zelle (Abbildung 6.15 A). In der Überlagerung beider Abbildungen („Merge“) finden sich gelbe Signale, die auf eine Co-Lokalisation in den entsprechenden Bereichen hindeuten. Es sind hauptsächlich

Bereiche, an denen die Actin-Filamente mit den fokalen Adhäsionen in Kontakt treten. Doppel-Immunfluoreszenzen mit CLP-36 und Paxillin zeigen in der Überlagerung ebenfalls gelbe Areale an den Übergängen der Stressfasern zu Fokalkontakten, wie sie auch bei Vinculin gesehen wurden (Abbildung 6.15 B). Bei Versuchen mit ILK und CLP-36 Antikörpern zeigte sich eine Co-Lokalisation beider Moleküle an den Spitzen von Actin-Filamenten, die in den Fokalkontakten verankert werden (Abbildung 6.15 C). CLP-36 ist häufig entlang der Stressfasern und an deren den Übergängen zu den Fokalkontakten zu finden. Punktuelle, fokalkontaktähnliche Signale von CLP-36 sind nur begrenzt zu finden.

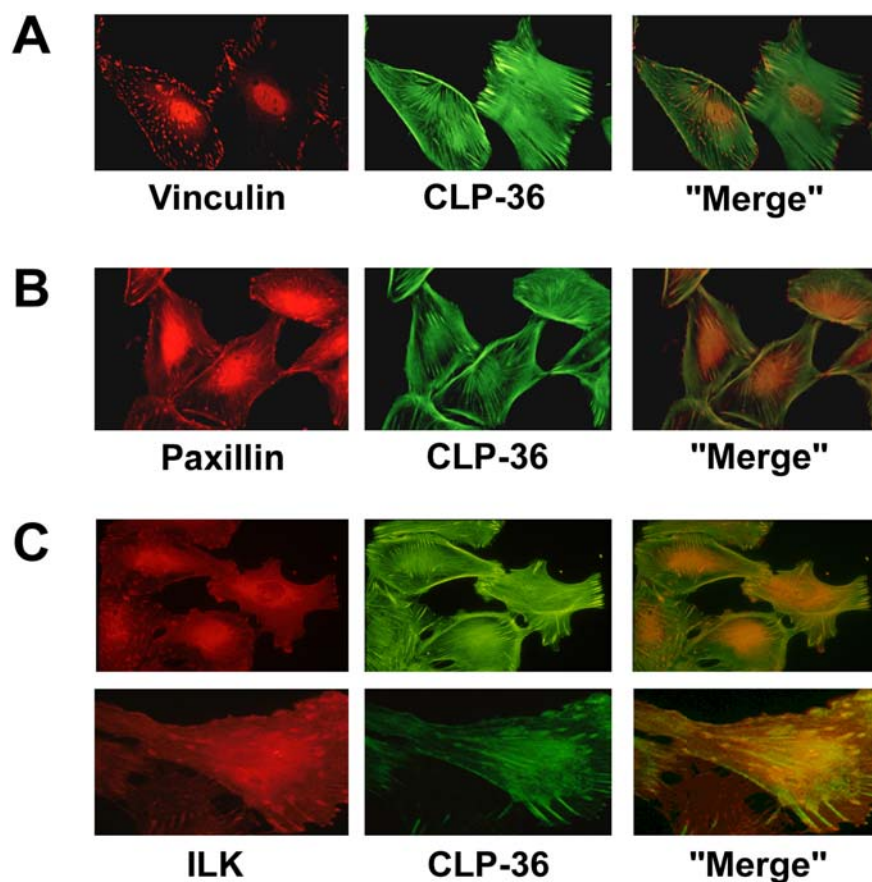


Abbildung 6.15 CLP-36 co-lokalisiert an den Enden der Stressfasern mit Fokalkontakt-Molekülen. Doppel-Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen CLP-36 (A-C), Vinculin (A), Paxillin (B) und ILK (C) zeigen die Lokalisation der Moleküle innerhalb der Podozyten. Vinculin, Paxillin und die ILK lokalisieren im Cytoplasma und in den Fokalkontakten der Podozyten. CLP-36 assoziiert meist entlang von F-Actin, ist aber auch in Strukturen zu finden, die auch Vinculin, Paxillin und ILK aufweisen (A-C „Merge“). Eine klare Co-Lokalisation von CLP-36 mit Vinculin, Paxillin und der ILK ist an den Enden der Stressfasern zu sehen, die an die Fokalkontakte gekoppelt sind (A-C „Merge“). Entsprechenden Negativkontrollen mit Isotyp-Antikörpern zeigen keine dieser Strukturen (nicht gezeigt).

Eine gemeinsame Lokalisation von Molekülen in gleichen Bereichen einer Zelle bedeutet nicht, dass die untersuchten Moleküle molekular miteinander interagieren. Um die potentielle Interaktion von Molekülen zu überprüfen, wurden Co-Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern und entsprechenden Isotyp-Kontrollen durchgeführt (siehe 5.5.4).

Die Immunpräzipitationen wurden wie unter 5.5.4 beschrieben durchgeführt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Abbildung 6.16 zeigt drei Immunpräzipitationen (A und B mit CLP-36 Antikörper, C mit ILK Antikörper).

Bei den Immunpräzipitationen mit Vinculin und Paxillin Antikörpern zeigt sich bei der Inkubation der Membran mit CLP-36 Antikörper kein Signal, was auf keine direkte Interaktion dieser Proteine hindeutet. Die Integrin-linked Kinase hingegen interagiert mit CLP-36. Das LIM Domänen Protein CLP-36 wird bei Immunpräzipitationen mit ILK-spezifischem Antikörper co-präzipitiert (Signal in Abbildung 6.16 C (IP ILK)).

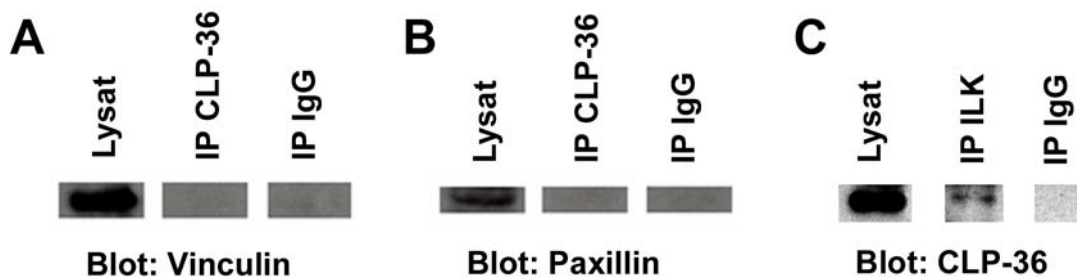


Abbildung 6.16 CLP-36 interagiert mit der Integrin-linked Kinase. Immunpräzipitationen mit Podozyten-Zellysaten und CLP-36 Antikörper (A und B) zeigen im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Vinculin (A) und Paxillin (B) keinen gemeinsamen pull-down der Proteine. Immunpräzipitate mit einem polyklonalen ILK Antikörper zeigen im Western Blot mit CLP-36 Antikörper ein deutliches Signal, das auf eine molekulare Interaktion der ILK mit CLP-36 *in vivo* schließen lässt. Als Isotyp-Kontrolle dienten unspezifische IgG Antikörper.

6.3.4 CLP-36 wird in Podozyten phosphoryliert

Da CLP-36 mit der Integrin-linked Kinase interagiert (siehe Abbildung 6.16), könnte CLP-36 auch von der ILK phosphoryliert werden.

Zunächst wurde die Protein-Sequenz von CLP-36 mittels im Internet öffentlich zur Verfügung stehenden Programmen analysiert. Hierfür wurde die murine FASTA-Sequenz von CLP-36 aus der Swiss-Prot Datenbank (<http://us.expasy.org/sprot/>) mit der Akzessionsnummer O70400 verwendet. Die Sequenz wurde mit Hilfe von NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; (Blom et al., 1999)) auf der Seite der Technischen Universität von Dänemark („Center for Biological Sequence Analysis“; CBS) *in silico* analysiert. Da es sich bei der ILK um eine Kinase mit Serin/Threonin-Aktivität handelt, wurde die Sequenz von CLP-36 nur auf phosphorylierbare Serin- und Threonin-Reste hin untersucht. Abbildung 6.17 zeigt die potentiell phosphorylierbare Serin- und Threonin-Reste in der Primärsequenz von CLP-36. Insgesamt wurden 15 potentielle Phosphorylierungsstellen oberhalb des berechneten Grenzwertes gefunden, 11 davon wären Phosphorylierungen an Serin-Resten, 4 davon an Threonin-Resten. Um die Daten der Sequenzanalyse im Podozyten-Zellkultursystem zu überprüfen wurden Antikörper verwendet, die phosphorylierte Serin- oder Threonin-Reste erkennen können. Hierzu wurde aus Gesamtzelllysaten CLP-36 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitationen wurden geblottet und mit Antikörpern inkubiert, die phosphorylierte Serin- bzw. Threonin-Reste erkennen (siehe Tabelle 3: Primäre Antikörper).

Die Ergebnisse aus Abbildung 6.18 zeigen, dass das in Podozyten exprimierte CLP-36 Protein phosphoryliert vorliegt. Ob CLP-36 gleichzeitig an Serin- und an Threonin-Resten phosphoryliert wird, oder nur jeweils eine Modifikation trägt kann mit dieser Methode nicht gezeigt werden.

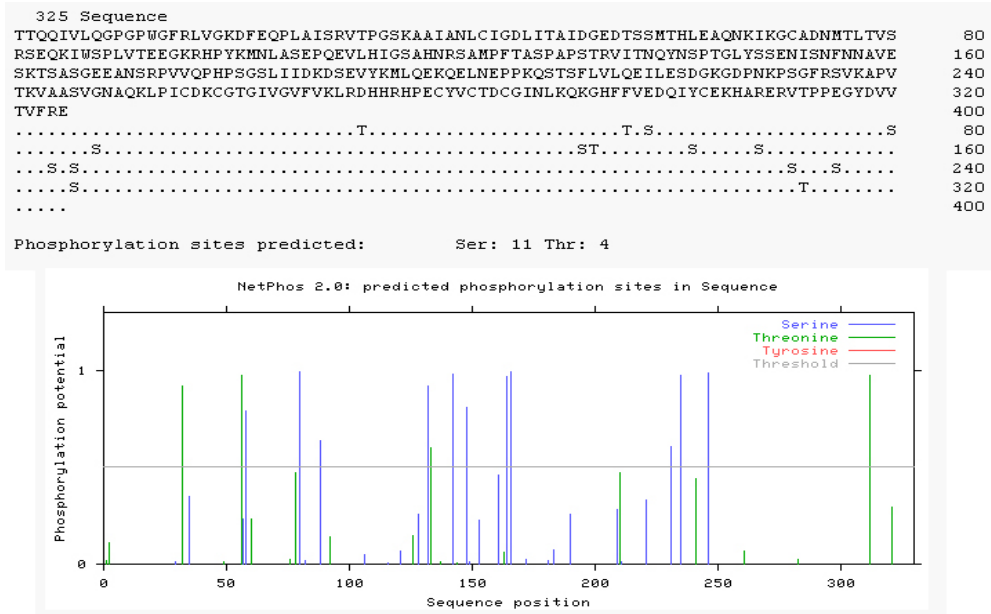


Abbildung 6.17 Murine CLP-36 Proteinsequenz mit potentiell phosphorylierbaren Serin- und Threonin-Resten. Die Analyse der Primärsequenz mit dem online zugänglichen Programm NetPhos 2.0 (siehe Text) ergibt 11 Serin- und 4 Threoninreste, die phosphoryliert werden können. Die Tyrosin-Reste, die potentiell phosphoryliert werden könnten, sind nicht dargestellt.

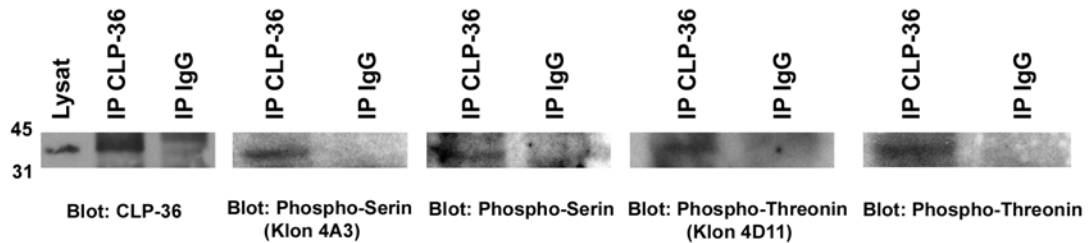


Abbildung 6.18 CLP-36 wird in Podozyten an Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert. CLP-36 wurde immunpräzipitiert und im Western Blot mit Antikörpern, die spezifisch phosphorylierte Serin- und Threonin-Reste erkennen, untersucht. Die Western Blot-Analysen zeigen, dass CLP-36 in Podozyten phosphoryliert wird. Zumindest ein Teil des CLP-36 Pools einer Zelle liegt in einer phosphorylierten Form vor. Für den Nachweis der CLP-36 Phosphorylierung *in vitro* wurden je zwei verschiedene Antikörper gegen phosphoryliertes Serin und gegen phosphoryliertes Threonin verwendet.

6.3.5 ILK Kinase Assay mit CLP-36

Ob die Phosphorylierungen von CLP-36 in Podozyten auch auf die Integrin-linked Kinase zurückzuführen sind, wurde mit einem *in vitro* Kinase Assay (siehe 5.5.7) untersucht. Hierfür wurde ILK immunpräzipitiert bzw. rekombinante ILK (Kinetek, Vancouver, Kanada) eingesetzt. Als Substrat wurde basisches Myelin (Myelin Basic Protein; MBP) oder aufgereinigtes, rekombinantes GST-CLP-36 (von Kristin Bauer, Arbeitsgruppe W. Siess, IPEK, München) zugegeben. Eine zusätzliche Positivkontrolle mit PKC- δ und MBP wurde ebenfalls durchgeführt (hier nicht gezeigt). Abbildung 6.19 zeigt das Ergebnis eines mit gereinigten Proteinen durchgeführten Kinase Assays. Die rekombinante ILK ist aktiv und hat das ihr angebotene Substrat MBP *in vitro* phosphoryliert. Auf Höhe von CLP-36 ist kein Signal zu erkennen, was bedeutet, dass das im Reaktionsansatz vorhandene rekombinante CLP-36 Protein von der ILK *in vitro* nicht phosphoryliert wurde. Kinase Assays mit immunpräzipitierter ILK und immunpräzipitiertem nativem CLP-36 zeigten ebenfalls keine direkte *in vitro* Phosphorylierung von CLP-36 durch die Integrin-linked Kinase (Daten nicht gezeigt). Nach der Auswertung mit einem PhosphoImager wurden die Membranen mit einem CLP-36 spezifischen Antikörper inkubiert und nachgewiesen, dass das Protein in der Kinase Reaktion vorhanden war (Ladungskontrolle).

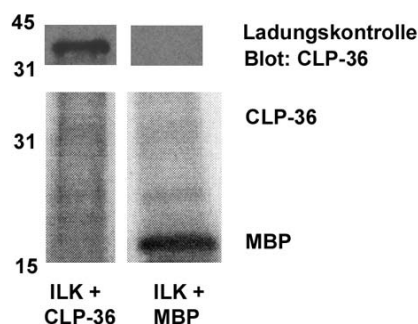


Abbildung 6.19 Kinase Assay mit ILK und CLP-36. Basisches Myelin (MBP, myelin basic protein) und rekombinantes CLP-36 (K. Bauer, Arbeitsgruppe Siess W, München) wurden mit rekombinanter ILK (Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) und in Anwesenheit von $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{ATP}$ inkubiert. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Membranen über Nacht auf einem PhosphoImager Screen exponiert. Die rekombinante ILK hat MBP *in vitro* phosphoryliert. CLP-36 konnte von der Integrin-linked Kinase *in vitro* nicht phosphoryliert werden (kein Signal auf der zu erwartenden Höhe). Das Vorhandensein von CLP-36 Protein in der Reaktion wurde mit einem spezifischem CLP-36 Antikörper nachgewiesen (Ladungskontrolle).

6.4 Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in gesunden und geschädigten humanen Glomeruli und Podozyten

Das Adaptermolekül CLP-36 interagiert in murinen Podozyten mit der ILK (siehe 6.3.3) und mit mehreren Isoformen von Alpha-Actinin, wie Alpha-Actinin-1 in humanen Blutplättchen und Alpha-Actinin-4 in Darmepithelzellen (Bauer et al., 2000; Vallenius et al., 2000). Funktionen für CLP-36, oder auch dessen Regulation bei pathologischen Prozessen sind nicht bekannt.

Mutationen innerhalb des Genes *ACTN4*, das für Alpha-Actinin-4 codiert, sind verantwortlich für die Entwicklung einer vererbten Form der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) im Menschen (Kaplan et al., 2000). Diese autosomal dominant vererbte Form der FSGS beginnt im jungen Erwachsenen-Alter oder später mit einer leichten Proteinurie und endet meist mit einem Nierenversagen, das Dialyse oder Transplantation notwendig macht.

Ob die beiden Moleküle, CLP-36 und dessen Bindungspartner Alpha-Actinin-4, bei anderen, nicht vererbten, Nierenerkrankungen reguliert werden soll im Folgenden untersucht werden.

6.4.1 Co-Lokalisation und molekulare Interaktion von CLP-36 mit Alpha-Actinin-4 in humanen Podozyten

Hierbei wurde zunächst geklärt, in welchen Bereichen der humanen Niere CLP-36 und Alpha-Actinin-4 exprimiert werden und ob sie auch innerhalb der Podozyten miteinander interagieren. Mit einer RT-PCR wurde die Expression von Alpha-Actinin-1 und -4 in der humanen Niere analysiert. Hierbei ist die Expression von humanem Alpha-Actinin-1 auf Zellen außerhalb des Glomerulus beschränkt. Innerhalb der glomerulären Struktur wird nur Alpha-Actinin-4 exprimiert. Abbildung 6.20 A zeigt die Expression von humanem Alpha-Actinin-4 in der Niere, nicht aber in Muskelgewebe (links). Innerhalb der Niere wird Alpha-Actinin-4 in Glomerulus-Zellen, in cortikalen Strukturen der Niere (Tubulus-System) (Abbildung 6.20 A, mitte) und in humanen Podozyten (Saleem et al., 2002) (Abbildung 6.20 A, rechts) exprimiert.

Alpha-Actinin-1, wird nur in humanen Nierenzellen exprimiert, die sich außerhalb der Glomeruli befinden (Abbildung 6.20, mitte). Humanes CLP-36 wird ebenfalls in glomerulären Zellen und in der humanen Podozyten-Zelllinie exprimiert (Abbildung 6.20 B).

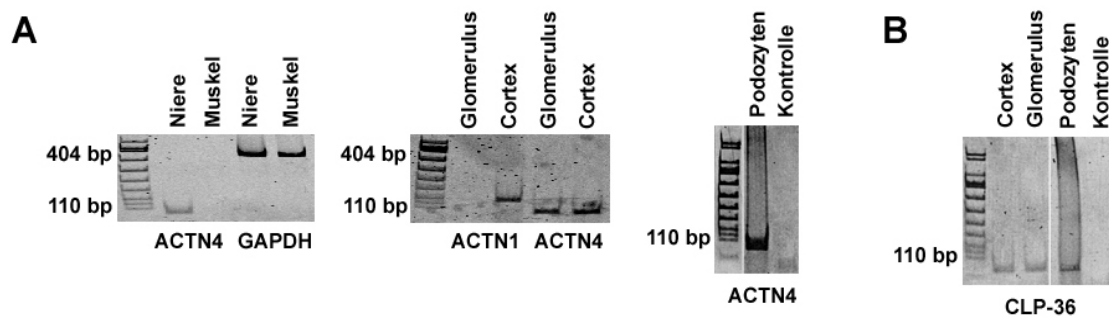


Abbildung 6.20 Humane glomeruläre Zellen exprimieren Alpha-Actinin-4 und CLP-36. A: RT-PCR mit cDNA von humanem Muskel- und Nierengewebe. Die nicht muskuläre Isoform Alpha-Actinin-4 (ACTN4) wird in der menschlichen Niere exprimiert. Als Negativkontrolle diente menschliches Muskelgewebe. Innerhalb der humanen Niere liegen die beiden Alpha-Actinin Isoformen 1 (ACTN1) und 4 unterschiedlich exprimiert vor. Alpha-Actinin-1 wird nur in Zellen außerhalb des Glomerulus exprimiert, Alpha-Actinin-4 hingegen wird außerhalb des Glomerulus und in glomerulären Zellen exprimiert. Humane Podozyten exprimieren ebenfalls Alpha-Actinin-4. B Expression von CLP-36 mRNA in humane Nierencortex, humanen Glomeruli und in einer humanen Podozyten-Zelllinie.

Immunfluoreszenzen mit Alpha-Actinin (Abbildung 6.21 A und D) und CLP-36 (Abbildung 6.21 B und E) spezifischen Antikörpern zeigen deren Lokalisation entlang der F-Actin Stressfasern (Abbildung 6.21 D-F). Bei vielen Zellen finden sich auch verstärkte Signale für Alpha-Actinin und CLP-36 an den Enden der Stressfasern (Abbildung 6.21 A-C), die mit den Molekülen der Fokalkontakt-Komplexe interagieren und so das Cytoskelett verankern.

Um die molekulare Interaktion der beiden Moleküle in den Podozyten zu bestätigen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Abbildung 6.22 zeigt die Western Blots mit den Immunpräzipitationen mit polyklonalem CLP-36 und monoklonalem Alpha-Actinin IgM Antikörper und den entsprechenden IgM und IgG Isotyp-Kontrollen. Das Signal der Alpha-Actinin Immunpräzipitation im Western Blot auf der Höhe von circa 100 kDa zeigt die erfolgreiche Aufreinigung von Alpha-Actinin-4 aus den Podozyten-Zellysaten. Auf derselben Membran kann mit dem CLP-36 spezifischen Antikörper auf

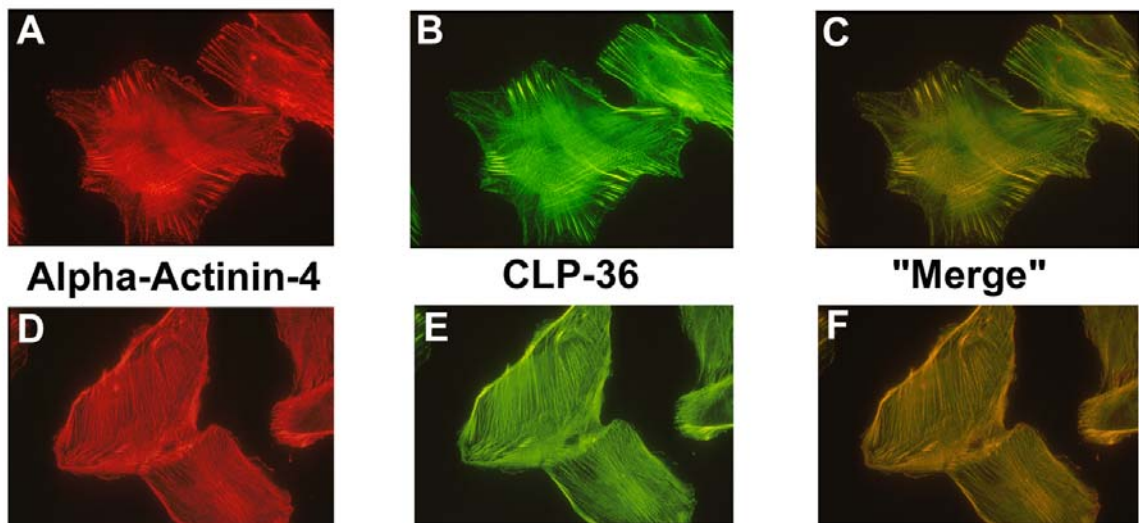


Abbildung 6.21 Co-Lokalisation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in humanen Podozyten. In der Doppel-Immunfluoreszenz zeigen die Moleküle Alpha-Actinin (A und D) und CLP-36 (B und E) eine deutliche Co-Lokalisation in den Podozyten hauptsächlich entlang der Stressfasern (D-F) und deren Enden (A-C). Im „Merge“ zeigt sich die Co-Lokalisation als gelbes Signal (C und F).

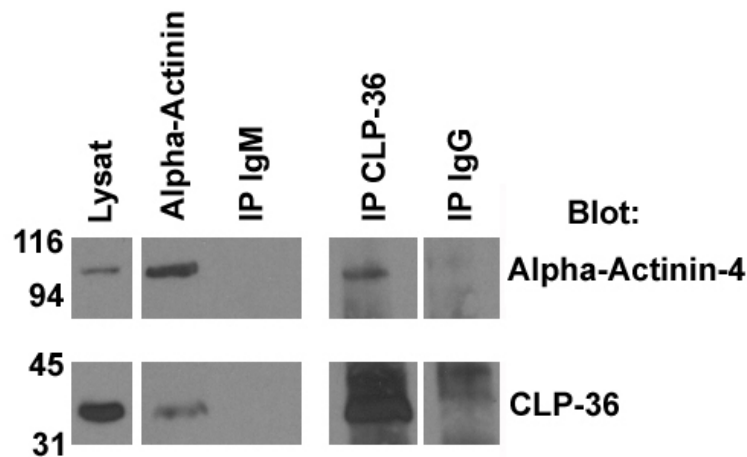


Abbildung 6.22 Molekulare Interaktion von Alpha-Actinin-4 mit CLP-36 in humanen Podozyten. Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen Alpha-Actinin und CLP-36 und den entsprechenden unspezifischen Isotyp-Antikörpern als Kontrollen wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Immunpräzipitation von Alpha-Actinin (~100 kDa) zeigt, dass neben dem aufgereinigten Alpha-Actinin auch CLP-36 (~36 kDa) co-präzipitiert. Alpha-Actinin co-präzipitiert auch bei der Immunpräzipitation mit spezifischem CLP-36 Antikörper, was auf eine starke Interaktion der beiden Moleküle schließen lässt. In den Kontrollen mit unspezifischem IgM oder IgG Antikörper wurde weder CLP-36 noch Alpha-Actinin präzipitiert.

der Höhe von 36 kDa ebenfalls ein Signal detektiert werden. CLP-36 co-präzipitiert mit Alpha-Actinin. Im Gegenzug co-präzipitiert Alpha-Actinin-4 bei der Immunpräzipitation mit CLP-36 Antikörper. Dieses Ergebnis lässt auf eine starke molekulare Interaktion von Alpha-Actinin und CLP-36 innerhalb der humanen Podozyten schließen.

6.4.2 Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein in renalen Erkrankungen

Um die Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in verschiedenen erworbenen glomerulären Erkrankungen zu untersuchen, wurden zunächst Nierenbiopsien von Patienten immunhistologisch analysiert.

Hierfür wurden drei Alpha-Actinin Antikörper verwendet, die alle zu demselben Ergebnis führten. Da in den Glomeruli nur Alpha-Actinin-4 und nicht Alpha-Actinin-1 exprimiert wird (siehe Abbildung 6.20), ist das Signal der Alpha-Actinin Antikörper in der Immunhistologie höchstwahrscheinlich auf Alpha-Actinin-4 zurückzuführen.

Glomeruli von Nieren ohne glomeruläre Schädigung zeigen ein starkes Signal für Alpha-Actinin-4 (Abbildung 6.23 A, CON) und CLP-36 (Abbildung 6.23 B, CON) Protein. In den Biopsien von Patienten mit Membranöser Glomerulopathie und Lupus Nephritis sieht man ein ähnlich verteiltes, allerdings schwächeres Signal (Abbildung 6.23 A und B, LN, MGN). Glomeruli von Biopsien mit Minimal Change Nephropathie und IgA Nephritis (Abbildung 6.23 A und B, MCN und IgA) zeigen eine ausgeprägte Reduktion von Alpha-Actinin-4 und CLP-36. Der stärkste Verlust an Protein wurde bei Patienten mit Fokal Segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) beobachtet (Abbildung 6.23 A und B, FSGS). Dieses verminderte Signal war nicht nur bei Glomeruli mit segmentalen Verödungen erkennbar, sondern bei allen Glomeruli der FSGS Patienten.

Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde die Signalstärke von Glomeruli von 5-10 Patienten pro Erkrankung mittels Densitometrie analysiert. Für die Messung wurde zunächst die gesamte Fläche des Glomerulus und im Anschluß der prozentuale Anteil des positiven Signals pro Glomerulus bestimmt. Die Signalintensität der Glomeruli von erkrankten Nieren wurde mit der Signalintensität der Kontroll-Glomeruli (CON = 1) in Relation gesetzt. Die Datenpunkte in Abbildung 6.23 C sind in Mittelwert

± SEM gezeigt. Ein anderes, podozyten-spezifisches Molekül, Synaptopodin, wurde in erkrankten Nieren nicht reprimiert (Daten nicht gezeigt).

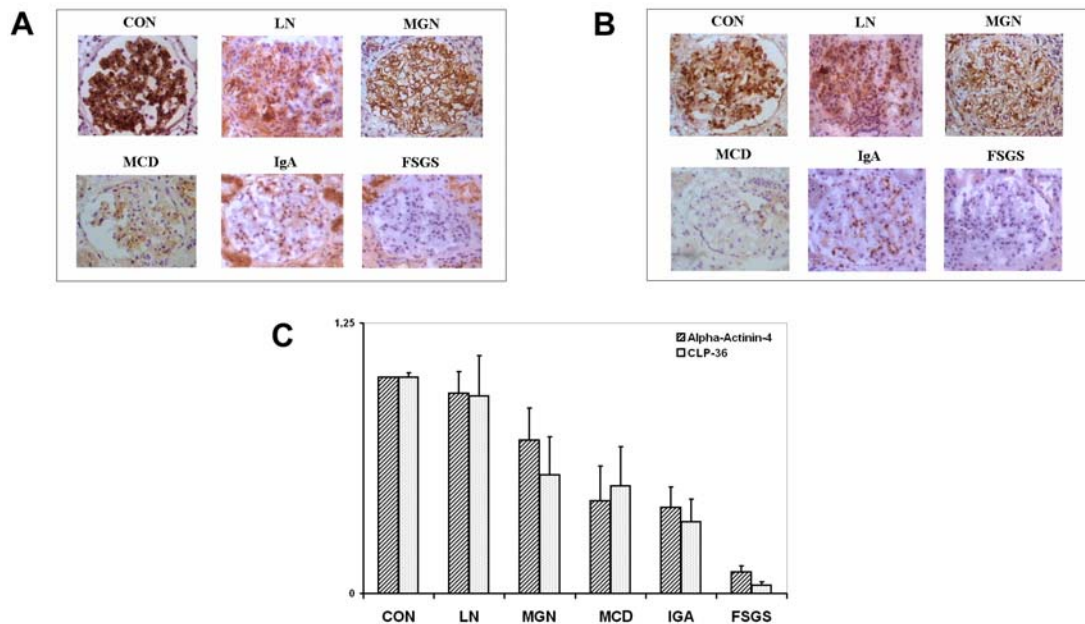


Abbildung 6.23 Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein in humanen glomerulären Erkrankungen. Die Regulation der cytoskelett-assoziierten Moleküle Alpha-Actinin-4 (A) und CLP-36 (B) wurden auf Protein-Ebene mittels Immunhistologie an Nierenbiopsien untersucht. Hierfür wurden Biopsien gesunder Areale von Tumornephrektaten und Biopsien von Patienten mit unterschiedlichen Nierenerkrankungen untersucht. Innerhalb der Kontroll-Nieren (CON) ist die deutliche Anfärbung beider Proteine in einem podozytären Verteilungsmuster erkennbar. Patienten mit Lupus Nephritis (LN) oder Membranöser Glomerulopathie (MGN) zeigen ein deutlich erkennbares Signal für Alpha-Actinin-4 und CLP-36. Patienten mit Minimal Change Disease (MCD) und IgA Nephropathie (IgA) zeigen hingegen stark verringerte Mengen an glomerulärem Alpha-Actinin-4 und CLP-36. Bei Patienten mit FSGS ist fast kein Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein mehr vorhanden. Der Verlust der beiden Moleküle wird in der densitometrischen Erfassung der Signalstärke (C) deutlich. Ausgewertet wurden 5-10 Glomeruli je Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Abkürzungen: CON = Kontrolle; LN = Lupus Nephritis; MGN = Membranöse Glomerulopathie; MCD = Minimal Change Disease; IgA = IgA Nephropathie; FSGS = Fokale segmentale Glomerulosklerose.

6.4.3 mRNA-Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in renalen Erkrankungen

Durch die Multi-Center-Studie „ERCB“ (European Renal cDNA Bank) (Cohen et al., 2002) ist es möglich, die glomerulären mRNA-Spiegel für Alpha-Actinin-4 und CLP-36 bei den in Abbildung 6.23 immunhistologisch untersuchten Erkrankungen quantitativ

durch real-time RT-PCR zu erfassen. Mit Alpha-Actinin-4 und CLP-36 spezifischen Primern (siehe Tabelle 1: Verwendete Oligonucleotide und Sonden) wurde je Erkrankungsgruppe die cDNA von mindestens 8 verschiedenen Patienten analysiert. Für die Analyse wurden GAPDH und 18S rRNA als Housekeeper verwendet, die beide vergleichbare Werte lieferten. Auf mRNA-Ebene konnte weder für Alpha-Actinin-4 noch für CLP-36 eine Regulation bei den unterschiedlichen Nierenerkrankungen nachgewiesen werden. Die Expressionsdaten aus den erkrankten Nierengeweben wurden - wie zuvor die immunhistologischen Daten (Abbildung 6.23 C)- auf die Expression der gesunden Kontroll-Nieren normiert und sind in

Abbildung 6.24 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Die mRNA Expression eines dritten, ebenfalls Actin-assoziierten und podozyten-spezifischen Moleküls, Synaptopodin, wurde parallel ermittelt. Auch hier konnte keine Veränderung der Gen-Expression in den Glomeruli der unterschiedlichen Nierenerkrankungen festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt).

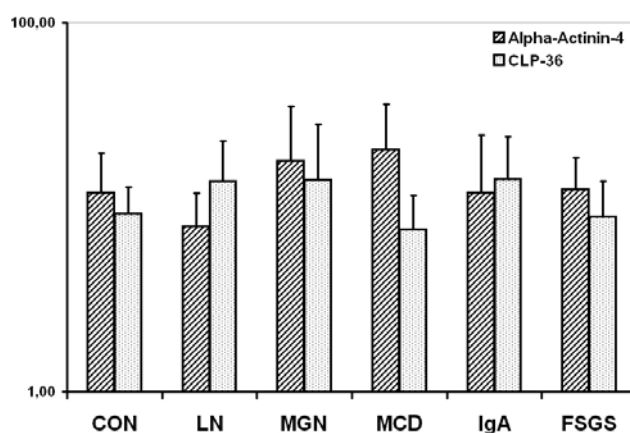


Abbildung 6.24 mRNA Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in humanen glomerulären Erkrankungen. Die Expressionslevel von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 zeigen bei den unterschiedlichen humanen Erkrankungen keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen. Zur Analyse wurde die cDNA von microdissezierten Glomeruli verwendet. Die gezeigten Expressionsdaten beziehen sich auf 18S rRNA als Housekeeper. Abkürzungen: CON = Kontrolle; LN = Lupus Nephritis; MGN = Membranöse Glomerulopathie; MCD = Minimal Change Disease; IgA = IgA Nephropathie; FSGS = Fokale segmentale Glomerulosklerose.

des 26S Proteasoms degradiert werden könnte. Die Analyse der humanen Sequenz von CLP-36 ist in Abbildung 6.25 B gezeigt. Beide Moleküle besitzen eine große Anzahl an potentiellen Schnittstellen, die zu deren Degradation durch den Proteasom-Komplexes führen könnten.

Experimentell wurde die proteasomische Degradation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in humanen Podozyten *in vitro* untersucht. Hierbei wurde zunächst die Halbwertszeit beider Moleküle ermittelt, indem die Proteinsynthese in den Zellen mit 10µg/ml Cycloheximid geblockt wurde. Cycloheximid hemmt die Translations-Maschinerie, indem es die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen, den Transfer von Aminosäuren von der Aminoacyl-tRNA auf neu entstehende Peptide und die Freisetzung der deacylierten tRNA von der Donorstelle der Ribosomen blockiert. Abbildung 6.26 A zeigt die Zahl der vorhandenen Zellen während des Experimentes mit und ohne Cycloheximid-Behandlung. In diesem Zeitrahmen hat die Blockade der Proteintranslation auch Auswirkungen auf die Proliferationsrate der Podozyten. Zellen, die als Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden, waren davon nicht betroffen.

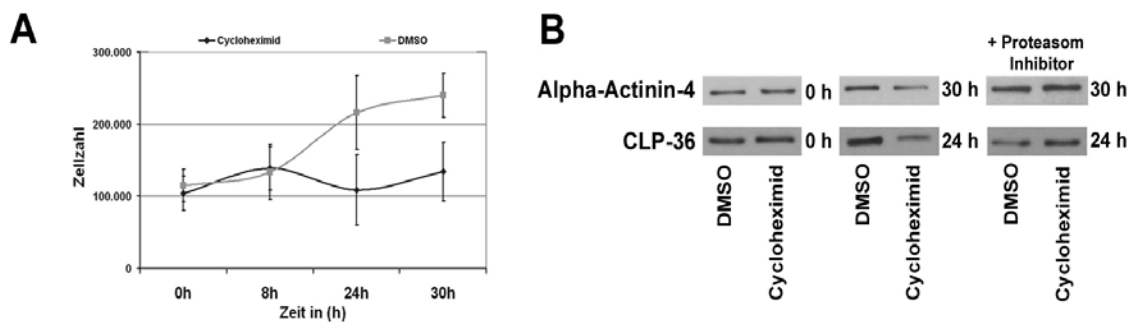


Abbildung 6.26 Die Degradation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 wird durch einen Proteasom-Inhibitor verhindert. Zunächst wurde die Halbwertszeit von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein bestimmt. Hierfür wurden Zellen mit 10µg/ml Cycloheximid, oder mit dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert. Nach 0, 8, 24 und 30 Stunden Behandlung wurden die Zellen ausgezählt (A) und in der entsprechenden Menge 1xLysispuffer lysiert. Die Menge des Lysispuffers richtete sich hierbei nach der vorhandenen Zellzahl. Für den Western Blot wurden jeweils gleiche Mengen an Zell-Lysat (je 5 µl) aufgetragen (B).

Die Ladung der Western Blots wurde nicht auf die totale Proteinmenge, sondern auf die Zellzahl normiert. Gleiche Proteinmengen werden aufgetragen, wenn kurzlebige

Proteine untersucht werden. Über einen Zeitraum von mehr als 24 Stunden akkumulieren die langlebigen Proteine in den Zellen und eine Beladung nach gleicher Proteinmenge resultiert in einem stärkeren Signal im Vergleich zu den Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Die Cycloheximid behandelten Zellen zeigen bei Stunde 0 keine Unterschiede in der Signalintensität im Vergleich zu der entsprechenden DMSO-Kontrolle. Nach 24 Stunden Inkubation mit 10 μ g/ml Cycloheximid war die Menge an CLP-36 Protein reduziert, die Menge von Alpha-Actinin-4 war erst nach 30, in einigen Ansätzen auch erst nach 33 Stunden reduziert. Die ungefähre Halbwertszeit von CLP-36 Protein beträgt um die 20-24 Stunden, das von Alpha-Actinin-4 um die 30-35 Stunden (Abbildung 6.26 B). Behandelt man die Podozyten zuvor mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomicin (10 μ M), ist es möglich den Abbau der beiden untersuchten Moleküle zu verhindern (Abbildung 6.26 B, rechts).

6.4.5 Oxidativer Stress *in vitro* führt zu vermehrter Ubiquitinierung von Proteinen in Podozyten

Ein vermehrtes Auftreten von freien Radikalen (reactive oxygen species, ROS) konnte bislang bei verschiedenen glomerulären Erkrankungen und in den entsprechenden Tiermodellen nachgewiesen werden. Podozyten sind innerhalb des Glomerulus ein primäres Angriffsziel für freie Radikale und Schädigungen dieser Zellen sind der erste Schritt bei der Entstehung eines Nierenschadens (Binder et al., 1999; Deman et al., 2001; Kriz, 1997). Eine Folge von oxidativem Stress ist die Modifikation und Schädigung von intrazellulären Proteinen. Geschädigte Moleküle werden von der Zelle erkannt und durch Proteasomen degradiert. Dieser proteasomischen Degradation geht in der Regel eine Ubiquitinierung mit Poly-Ubiquitin-Ketten voraus.

Um freie Sauerstoffradikale im Zellkultur-System zu erzeugen, wurde zunächst die Xanthin-Xanthinoxidase-Reaktion etabliert. Die kultivierten Podozyten wurden in serumfreiem Medium mit 150 μ M Xanthin (X) und 75 mU Xanthinoxidase (XO) inkubiert und nach 0, 1, 2 und 4 Stunden lysiert. Gleiche Mengen an Protein wurden mittels Western Blot und einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper analysiert, der mono- und poly-ubiquitinierte Proteine erkennt. Abbildung 6.27 zeigt einen exemplarischen Blot mit je 12 μ g Protein je Spur. Die breite Signalfrent, hauptsächlich

im höher molekularen Bereich, entspricht dem ganzen Pool ubiquitiniertes Proteine im Zellysat. Abbildung 6.27 (linke Seite) zeigt einen deutlichen Anstieg von ubiquitinierten Molekülen in Podozyten nach der Induktion von oxidativem Stress (1, 2 und 4 Stunden). Die Menge der nachgewiesenen, ubiquitinierten Proteine bleibt durch deren gleichzeitigen Abbau in den Proteasomen relativ konstant. Werden zusätzlich zu dem oxidativen Stress die Proteasomen mit einem spezifischen Inhibitor (hier Lactacystin) blockiert, akkumulieren die ubiquitinierten Proteine in den Zellen (Abbildung 6.27, rechte Seite). Die Wirkung des Proteasom-Inhibitors ist schon vor Induktion des oxidativen Stresses bei Stunde 0 (0h) sichtbar. Der Anstieg des Signals bei den Zeitpunkten 1h, 2, und 4h zeigt, dass die ubiquitinierten Moleküle in den Zellen akkumulieren (Abbildung 6.27, rechte Seite). Die Aktivität der Proteasomen in den Podozyten scheint durch den oxidativen Stress nicht herabgesetzt zu werden, da die ubiquitinierten Moleküle in den Kontrollzellen über den angegebenen Zeitraum nicht akkumulieren.

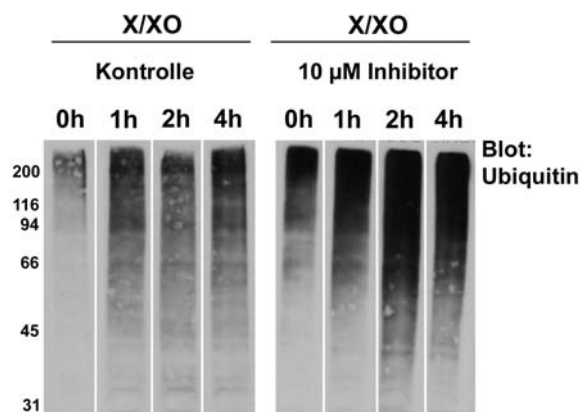


Abbildung 6.27 Vermehrte Ubiquitinierung von Proteinen in oxidativ gestressten Podozyten. Die Bildung der Superoxid-Radikale erfolgte durch die Reaktion von 75mU Xanthinoxidase (XO) mit 150µM Xanthin (X) im Zellkultur-Medium. Nach 0, 1, 2 und 4 Stunden wurden die Zellen lysiert und gleiche Protein-Mengen (12µg je Spur) für die Western Blot Analyse mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper aufgetragen. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt den sprunghaften Anstieg von ubiquitinierten Proteinen in Zellen, die eine Stunde und länger oxidativem Stress ausgesetzt waren (DMSO-Kontrolle). Zellen der rechten Hälfte vor dem oxidativen Stress 2 Stunden mit 10µM Proteasom-Inhibitor Lactacystin behandelt. Hier zeigt sich eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen in den Zellen noch deutlicher (und bereits bei Stunde 0 = 2 Stunden nach Inhibitor der Proteasomen), da durch die Proteasomen-Blockade kein Turnover der ubiquitinierten Proteine mehr erfolgen kann.

6.4.6 Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein nach oxidativem Stress wird durch einen Proteasom-Inhibitor verhindert

Es wurde die Auswirkung von starkem oxidativem Stress auf die beiden cytoskelett-assoziierten Proteine Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in Podozyten untersucht. Hierbei konnte eine deutliche Reduktion von CLP-36 Protein, aber nur eine leichte Verminderung von Alpha-Actinin-4 festgestellt werden (Abbildung 6.28, links; aufgetragen wurden 6µg Proteinlysate je Spur). Ob dem Verlust der Proteine ein Abbau durch Proteasomen zugrunde liegt, wurde durch die vorherige Inkubation mit 10µM Lactacystin (bzw. dessen Lösungsmittel DMSO) untersucht. Durch die vorherige Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin (Abbildung 6.28, rechts; 6µg Proteinlysate je Spur) konnte die Degradation beider Moleküle nach der Induktion von oxidativem Stress weitestgehend verhindert werden. Der Verlauf mRNA-Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 wurde parallel analysiert und zeigte in dem kurzen Zeitintervall keine Expressionsunterschiede (Daten hier nicht gezeigt).

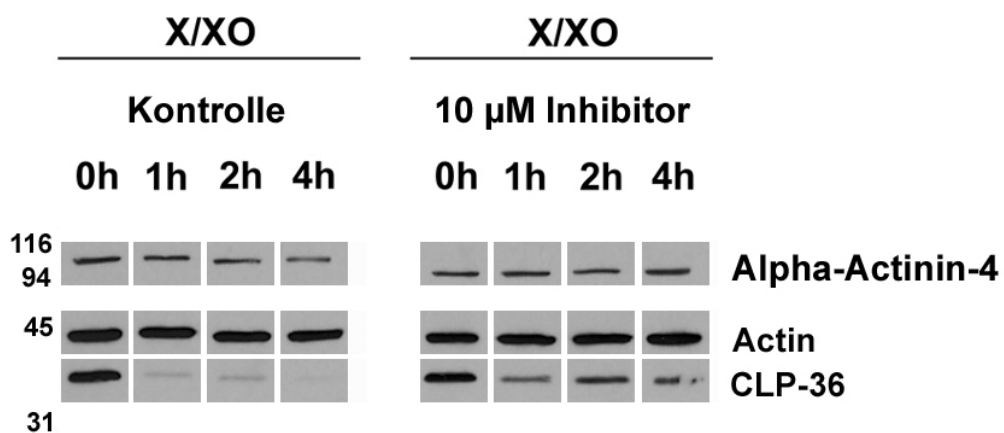


Abbildung 6.28 Verlust von CLP-36 und Alpha-Actinin-4 nach oxidativem Stress kann durch Inhibition der Proteasomen verhindert werden. Humane Podozyten wurden 2 Stunden vor Induktion von oxidativem Stress (X/XO) mit DMSO (Kontrolle), oder mit 10µM Proteasom-Inhibitor Lactacystin (Inhibitor, rechte Seite) behandelt. Danach wurden die Zellen gewaschen und durch Xanthin (X; 150µM) und Xanthinoxidase (XO; 75mU) oxidativem Stress ausgesetzt. Bei den Kontroll-Zellen ist ein rascher, starker Verlust von CLP-36 Protein erkennbar. Alpha-Actinin-4 zeigt unter denselben Versuchsbedingungen nur eine leichte Reduktion. Eine Inhibition der Proteasomen mit Lactacystin konnte der Verlust von CLP-36 deutlich vermindern. Actin diente als Ladungskontrolle.

6.4.7 Ubiquitinierung von nativem Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein

Proteine, die für einen proteasomalen Abbau vorgesehen sind, werden mit ein oder mehreren Poly-Ubiquitin-Ketten markiert. Hierbei wird durch eine Reaktion spezifischer Enzyme (E1-, E2- und E3-Ligasen; siehe 3.3.3.1) Ubiquitin, oder bereits vorgefertigte Poly-Ubiquitin-Ketten auf einen Lysin-Rest des Ziel-Proteins transferiert.

Zunächst erfolgte eine Sequenz-Analyse von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 auf Lysin-Reste, die potentiell ubiquitiniert werden könnten. Da es sich um ein sehr flexibles System handelt für das bislang keine Konsensus-Sequenz beschrieben wurde, wurden zunächst Hydrophobizität und Sekundärstruktur der beiden Moleküle untersucht. Es ist bekannt, dass eine Ubiquitinierung bevorzugt an Lysin-Resten mit einem hydrophoben Umfeld, oder innerhalb von Loops und α -Helices erfolgt (Catic et al., 2004; Laney and Hochstrasser, 1999). Die Sequenzen wurden der Swiss-prot Datenbank (<http://us.expasy.org/sprot/>) entnommen (Akzessionsnummer für Alpha-Actinin-4: O43707; CLP-36: O00151). Aus einem Kyte-Doolittle Plot (siehe Abbildung 6.29 A und Abbildung 6.30 A) geht hervor, dass die Primärsequenz von Alpha-Actinin-4 mehrere, eher kurze Bereiche mit überwiegend hydrophoben Aminosäureresten umfasst. Besonders hydrophobe Bereiche befinden sich an den Positionen 83-91, 116-132, 143-158, 473-477, 792-798, 825-834, 847-855. Lysin-Reste in diesen Bereichen sind mit einem blauen Punkt in Abbildung 6.29 B gekennzeichnet. Die Sekundärstruktur wurde mit dem Programm PSIPRED analysiert (siehe 5.4). Lysin-Reste, die in α -helikalen Bereichen liegen, sind mit einem roten Punkt markiert. Die Proteinsequenz von Alpha-Actinin-4 besitzt somit 44 Lysin-Reste, die potentiell ubiquitiniert werden könnten (Abbildung 6.29). Die Primärsequenz von CLP-36 wurde ebenfalls analysiert. Eher hydrophobe Regionen fanden sich in den Bereichen der Aminosäurereste 15-18, 26-32, 38-52, 77-81, 186-190, 214-221, 241-250, 264-272, 283-287 und 322-325 (siehe Abbildung 6.30A). Lysin-Reste in diesen Bereichen sind wieder mit einem blauen Punkt markiert (Abbildung 6.30 B). Lysin-Reste, die innerhalb einer α -Helix Struktur liegen, wurden mit einem roten Punkt gekennzeichnet (Abbildung 6.30 B). In der Primärsequenz von humanem CLP-36 finden sich demnach 11 Lysin-Reste, an die Ubiquitin oder Poly-Ubiquitin-Ketten transferiert werden könnten.

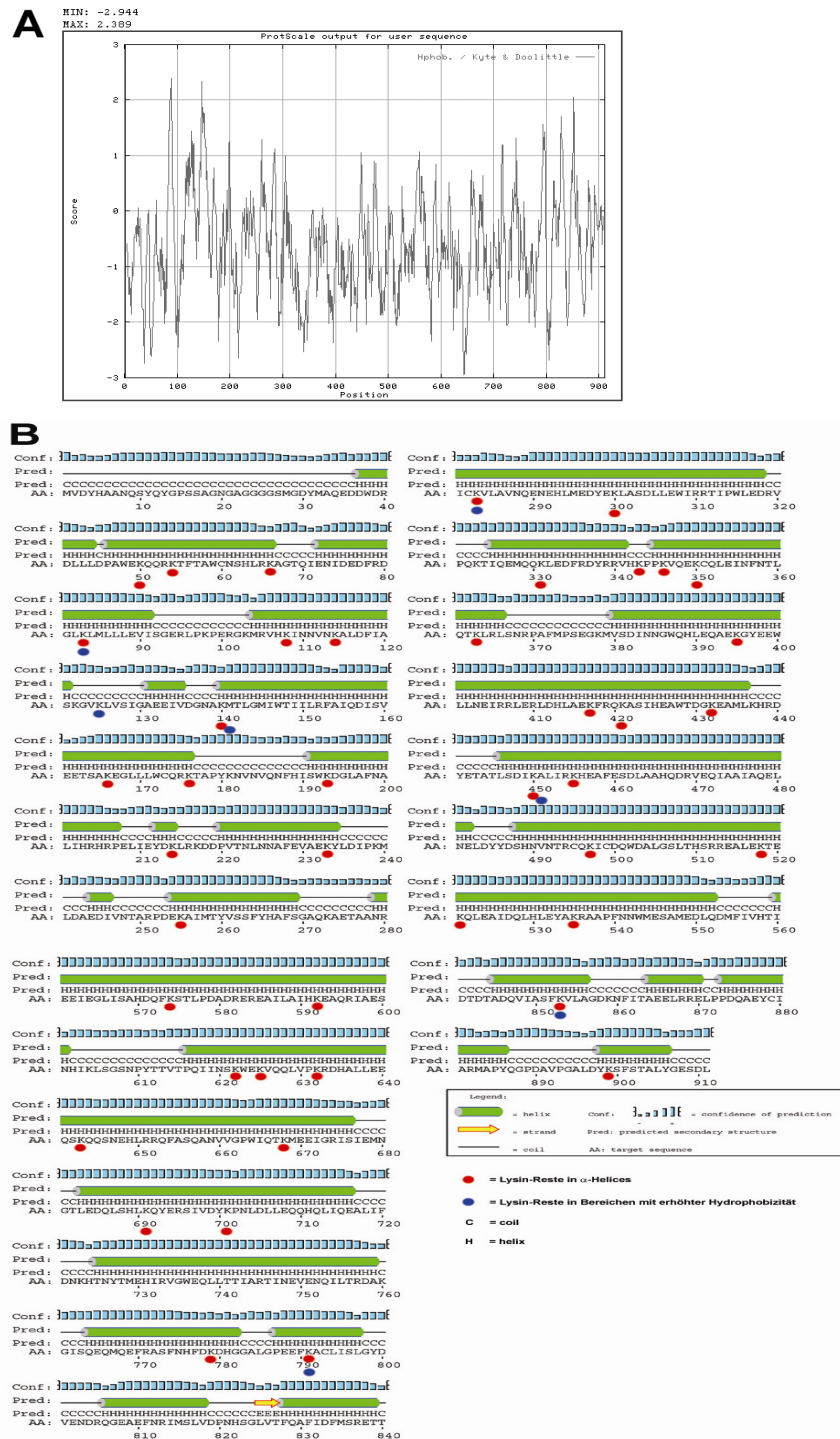


Abbildung 6.29 Analyse der Sekundärstruktur von Alpha-Actinin-4 auf potentiell ubiquitinierbare Lysin-Reste. Die Primärsequenz von Alpha-Actinin-4 wurde zunächst auf hydrophobe Bereiche mit einem Hydrophobizitäts-Blot untersucht (A). Lysin-Reste, die in eher hydrophoben Bereichen liegen, sind in B mit einem blauen Punkt gekennzeichnet. Die Sekundärstruktur des Proteins wurde mit dem Programme PSIPRED analysiert (B). Lysin-Reste in α -helikalen Bereichen sind mit einem roten Punkt markiert. Insgesamt befinden sich in der humanen Sequenz von Alpha-Actinin-4 44 Lysin-Reste, die potentiell durch Ubiquitin modifiziert werden können.

Antikörper ein Signal auf der Höhe von Alpha-Actinin-4 (ca. 100 kDa) und darüber eine breite Signalfrent, die auf Poly-ubiquitiniertes Alpha-Actinin-4 Protein schließen lässt. Die parallel durchgeführten Kontrollen mit einem unspezifischen IgM-Antikörper waren negativ. Im Anschluss wurde die Membran gestrippt und mit Alpha-Actinin-4 spezifischem Antikörper inkubiert (Abbildung 6.31 A, unten).

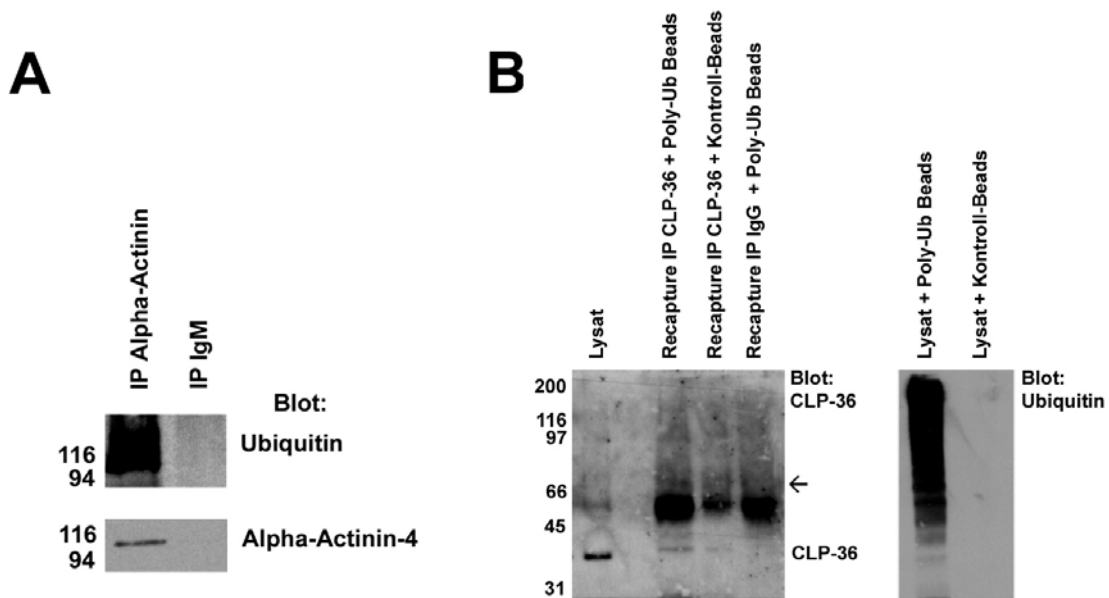


Abbildung 6.31 Ubiquitinierung von Alpha-Actinin-4 und CLP-36. A: Alpha-Actinin-4 wurde immunpräzipitiert und im Western Blot mit einem Ubiquitin Antikörper analysiert. Der Schmier oberhalb der eigentlichen Molekülgröße lässt auf Poly-ubiquitiniertes Alpha-Actinin-4 schließen. Die Membran wurde gestrippt und mit Alpha-Actinin-4 spezifischem Antikörper inkubiert, um die Immunpräzipitation von Alpha-Actinin-4 nachzuweisen. B zeigt eine Recapture-Immunpräzipitation mit CLP-36 (links) und die Effizienz der darin verwendeten Poly-Ub Beads (rechts). Die Recapture-IP von CLP-36 mit den Poly-Ub Beads zeigt ein schwaches Signal auf Höhe von ca. 70kDa (Pfeil), was auf die Ubiquitinierung von nativem CLP-36 Protein mit einer Ubiquitin-Kette bestehend aus 4 Ubiquitinen, oder auf 4 Mono-Ubiquitinierungen an unterschiedlichen Lysin-Resten zurückzuführen sein könnte.

Um eine Ubiquitinierung von nativem CLP-36 Protein nachzuweisen, wurden verschiedene Methoden angewandt. Immunpräzipitationen von CLP-36 mit anschließendem Ubiquitin-spezifischen Blot, wie für Alpha-Actinin-4 in Abbildung 6.31 A, zeigten kein entsprechendes Signal (Daten nicht gezeigt). Der *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay mit immunpräzipitiertem CLP-36 Protein war ebenso negativ, wie die einfache Aufreinigung ubiquitiniertes Moleküle mit den Beads des „Poly-Ubiquitin Enrichment Kits“ (Calbiochem, Merck, Darmstadt).

Die Effektivität der Beads, die ubiquitinierte Proteine aufzureinigen ist in Abbildung 6.31 B (rechts) gezeigt. Podozytenlysate wurden mit Poly-Ub Beads bzw. Kontroll-Beads inkubiert und anschließend mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper im Western Blot untersucht. Die Poly-Ub Beads präzipitieren sehr viele mono- bzw. poly-ubiquitinierte Proteine aus dem Podozytenlysate.

Abbildung 6.31 B zeigt eine „Recapture-Immunpräzipitation“, bei der zunächst CLP-36 durch eine IP angereichert wurde (unspezifischer IgG-Antikörper als Kontrolle). Das angereicherte Protein wurde wieder von der Sepharose abgelöst (siehe 5.9) und in einem zweiten Immunpräzipitations-Schritt mit den Poly-Ub Beads bzw. den mitgelieferten Kontroll-Beads inkubiert. Diese zweite Immunpräzipitation wurde auf einem Western Blot mit CLP-36 spezifischem Antikörper inkubiert (siehe dazu Abbildung 6.31 B, linke Seite). Das zuvor immunpräzipitierte CLP-36 Protein ist auf der Höhe von 36 kDa zu erkennen, das starke Signal bei 50kDa ist auf die schweren Immunglobulin-Ketten der in der Immunpräzipitation verwendeten Antikörper zurückzuführen. Zusätzlich findet sich in dem Ansatz von CLP-36, der anschließend mit Poly-Ub Beads inkubiert wurde eine schwache Bande auf Höhe von etwa 70 kDa (Abbildung 6.31 B, Pfeil). Diese Bande wurde bei einem der durchgeführten Experimente gesehen und würde CLP-36 Protein entsprechen, das mit einer Polyubiquitin-Kette (4 Ubiquitine) oder 4 einzelnen Ubiquitin-Molekülen modifiziert ist.

6.5 Tierexperimentelle Studie zur Analyse der Auswirkungen von Proteasomen auf die Nierenfunktion bei kranken Mäusen

Die durch die *in vitro* Daten gewonnenen Einsichten sollten auch *in vivo* am Tiermodell der Adriamycin-induzierte Nephropathie im akuten Status untersucht werden. Der Nierenschaden wurde in männlichen Balb/c Mäusen mit einer einzelnen intravenösen Injektion von 13 mg/kg Körpergewicht Adriamycin (ADR) induziert. Die Entwicklung der akuten Proteinurie wurde überprüft, indem Urin mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele im Anschluß mit Coomassie gefärbt wurden. Der Verlust der Filtrationsbarriere einhergehend mit Proteinurie zeigte sich ab Tag 3-4 nach der ADR-Injektion (Daten hier nicht gezeigt). Tabelle 6 Gruppeneinteilung im Tierversuch“ zeigt

den Versuchsaufbau. Der Endpunkt des Experimentes war 1 Woche nach Injektion von Adriamycin. Blut, Urin und Gewebe wurde wie Material und Methoden-Teil beschrieben (siehe 5.11) gesammelt und entsprechend aufgearbeitet.

Tabelle 6 Gruppeneinteilung im Tierversuch

Gruppenbezeichnung (n)	Adriamycin (ADR)	Behandlung
NaCl (n=5)	Physiologische Kochsalzlösung	PBS
ADR (n=8)	13 mg/KG ADR	PBS
ADR+C (n=8) (ADR + Carrier)	13 mg/KG ADR	5% DMSO in PBS
ADR+I (n=8) (ADR + Inhibitor)	13 mg/KG ADR	0,5 mg/kg Epoxomicin in 5% DMSO (in PBS)

6.5.1 Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen in Inhibitor-behandelten Mäusen

Um die Wirksamkeit des Proteasom-Inhibitors Epoxomicin im zu analysierenden Zielorgan, der Niere, nachzuweisen, wurde wie unter 5.3.2 beschrieben Zellysat aus dem murinen Nierencortex aufgearbeitet.

Im folgenden Western Blot (siehe Abbildung 6.32) wurden jeweils gleiche Mengen Proteinlysate (je 20µg) aufgetragen und die Membran mit einem Antikörper gegen Ubiquitin inkubiert. Bei diesem Versuchsansatz werden alle mit Ubiquitin modifizierten Proteine des Nierengewebes nachgewiesen und zeigen sich als diffuses Signal über die gesamte Spur, hauptsächlich in Bereichen größer als 45 kDa. Das stärkste Signal findet sich bei Proteasom-Inhibitor (Epoxomicin) behandelten Tieren.

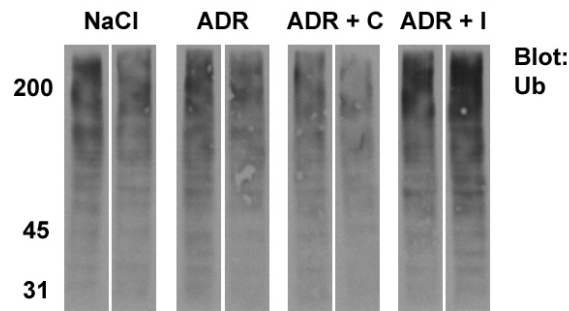


Abbildung 6.32 Akkumulation ubiquitinerter Proteine nach Epoxomicin-Behandlung *in vivo* ubiquitinierte Proteine. Jeweils gleiche Mengen (je 20 μ g) Nierenlysat wurden im Western Blot mit Ubiquitin Antikörper untersucht. Proteine, die mit mindestens einem Ubiquitin modifiziert wurden, zeigen sich im Blot und ergeben in ihrer Gesamtheit ein diffuses Signal über die ganze Spur. In Proteasom Inhibitor-behandelten Tieren (ADR + I) finden sich vermehrt ubiquitinierte Proteine, die nicht degradiert werden können. Die zeigt sich am intensiveren Signal im oberen Drittel des Western Blots.

6.5.2 Funktionelle Parameter der Nierenfunktion in Blut und Urin und

Am Versuchsende wurde den Tieren Blut und Urin entnommen (siehe 5.11.4) und die diagnostischen Parameter analysiert. Die Blutwerte in Abbildung 6.33 zeigen eine Hypo-Proteinämie und Hypo-Albuminämie. Ansteigende Creatinin-, Cholesterin- und Stickstoff (BUN)-Werte im Serum der Tiere deuten ebenfalls auf einen renalen Funktionsverlust hin. Diese funktionalen Parameter im Blut sind deutliche Anzeichen für eine schwere Schädigung der Niere und die Induktion des nephrotischen Syndroms durch Adriamycin.

Der Endpunkt des Experimentes lag sieben Tage nach Induktion der ADR-Nephropathie und sechs Tage nach der täglichen, intraperitonealen Injektion mit PBS, Carrier oder dem Proteasom-Inhibitor Epoxomicin (siehe

Tabelle 6). Den Mäusen wurde Urin entnommen und die Creatinin- und die Albumin-Spiegel wie unter 5.11.6 und 5.5.6 beschrieben bestimmt. Abbildung 6.34 zeigt die finalen Albumin-Spiegel im Urin der Mäuse, die zum Ausgleich der Konzentrationsunterschiede mit dem ermittelten Creatinin-Wert verrechnet wurden. Die

Werte der gesunden Kontroll-Gruppe (NaCl) sind so niedrig, dass sie im Schema von Abbildung 6.34 nicht mehr dargestellt werden ($414 \pm 176 \mu\text{g}/\text{mg}$).

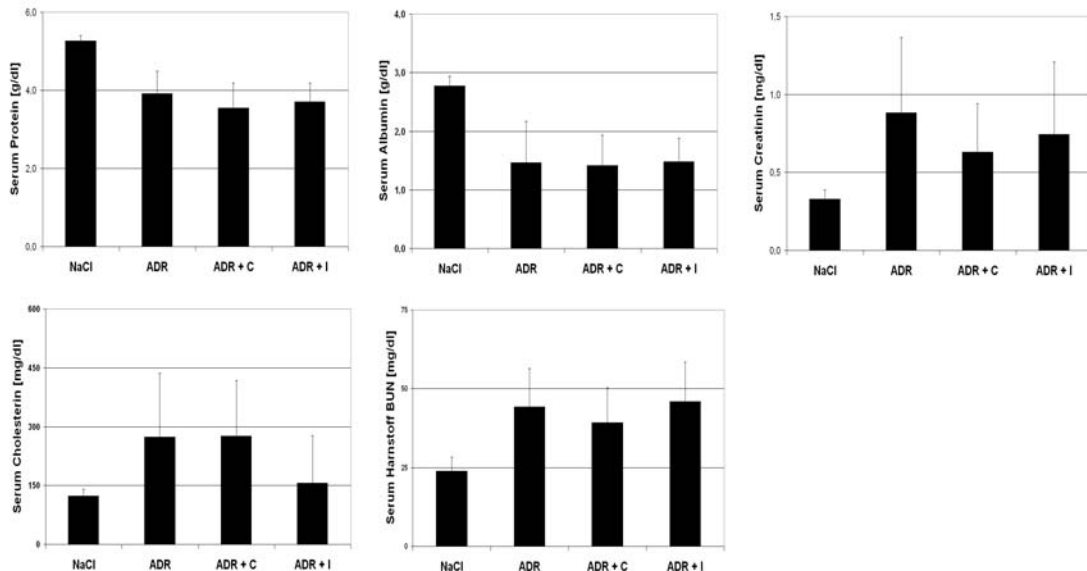


Abbildung 6.33 Blutwerte der Mäuse mit ADR-Nephropathie. Werte für Serum-Protein, Serum-Albumin, Serum-Creatinin, Serum-Cholesterin und Serum-Harnstoff (BUN). Die starke Proteinurie der ADR-behandelten Mäuse wurde begleitet von Hypo-Proteinämie, Hypo-Albuminämie und ansteigenden Creatinin-, Cholesterin- und Stickstoff (BUN)-Werten im Serum. Diese Veränderungen im Vergleich zur gesunden Kontroll-Gruppe (NaCl) stehen im Einklang mit der Entwicklung eines starken Nierenschadens (Nephrotisches Syndrom) in den ADR-behandelten Tieren. Die Werte der Proteasom-Inhibitor behandelten Tiere zeigen nur bei der Menge an Serum-Cholesterin einen abweichenden Trend im Vergleich zu den beiden anderen ADR-behandelten Gruppen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD.

Tiere, die mit Adriamycin (ADR)- behandelt wurden, zeigen alle stark erhöhte Albumin-Werte im Urin durch die Induktion des Modells. Tiere, die mit Carrier (ADR +C) oder Epoxomicin (ADR + I) behandelt wurden, zeigen geringere Mengen an Albumin im Urin als die ADR-Tiere, die mit PBS behandelt wurden. Zwischen diesen beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 6.34). Eine signifikante Reduktion der Albumin-Ausscheidung im Urin ergibt sich bei dem Vergleich der ADR-Gruppe mit der Gruppe der Epoxomicin-behandelten Tiere (ADR + I; $p < 0,05$). Ein Vergleich der ADR + I Gruppe mit der Carrier-Gruppe (ADR + C) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

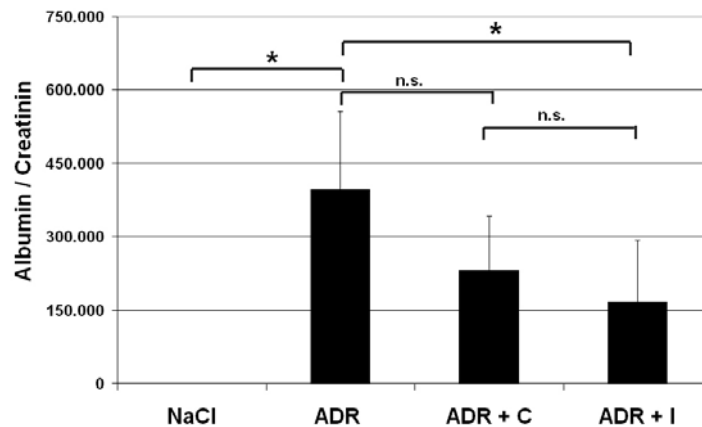


Abbildung 6.34 Albumin-Exkretion im Urin von Proteasom-Inhibitor behandelten Mäusen mit Nephropathie. Die Menge des in den Urin ausgeschiedenen Albumins wurde mit einem ELISA speziell für murines Albumin nachgewiesen. Die Albumin-Mengen wurden mit dem Creatinin-Gehalt des Urins verrechnet. Die signifikant erhöhten Mengen an Albumin in allen mit Adriamycin behandelten Tieren weisen auf eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und Induktion des Modells hin. Die Proteinurie der Carrier-behandelten Gruppe (ADR + C) war im Vergleich der ADR-Gruppe nicht deutlich gesenkt. Die Verminderung der Albumin-Ausscheidung der Epoxomicin-behandelten Tiere (ADR + I) war verglichen mit der ADR-Gruppe signifikant reduziert und der Unterschied zur Carrier-Gruppe (ADR + C) erwies sich als nicht signifikant. Werte sind als Mittelwerte \pm SD. * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

Darüber hinaus wurde auch die Menge an ausgeschiedenem Gesamtprotein im Urin mittels Bradford bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse entsprechen den in Abbildung 6.34 gezeigten Albumin ELISA-Daten.

Die lichtmikroskopische Analyse der Nierenschnitte mit Perjod-Säure-Schiff-Reaktion (PAS) machen den durch das Adriamycin entstandenen Nierenschaden offensichtlich. Die Gruppen ADR und ADR + C zeigten bei einer geblindet durchgeführten Bewertung der Immunhistologien die stärksten Schädigungen. Die Schädigungen der Epoxomicin-behandelten ADR-Tiere (ADR + I) erschienen weniger stark ausgeprägt (siehe Abbildung 6.35). Die Adriamycin-behandelten Tiere (ADR) zeigen am Ende des Experimentes hyaline Ablagerungen innerhalb der Bowmanschen Kapsel, eine vermehrte Bildung von Matrix-Molekülen in den Glomeruli und viele intra-tubuläre Proteinablagerungen.

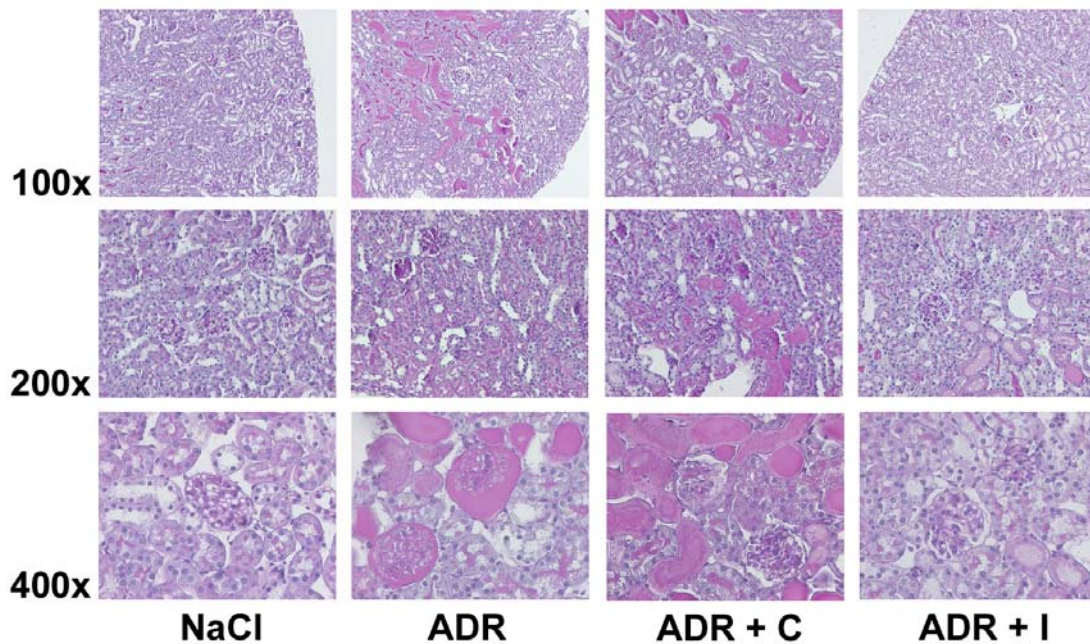


Abbildung 6.35 PAS-Färbung an Nierenschnitten von Tieren mit ADR-Nephropathie. Die Nierenschnitte der Tiere, die mit physiologischer Kochsalzlösung injiziert wurden, zeigen eine normale Morphologie (NaCl). ADR-behandelte Tiere entwickelten einen deutlich erkennbaren Nierenschaden mit glomerulären Läsionen und glomerulären hyalinen Ablagerungen. Es kommt zu einer verstärkten Bildung von extrazellulärer Matrix, Tubulus-Dilatationen und intra-tubuläre Proteinansammlungen. Dieselben morphologischen Veränderungen können an Mäusen beobachtet werden, die mit ADR und dem Carrier DMSO (ADR + C) behandelt wurden. Proteasom-Inhibitor behandelte ADR-Tiere (ADR + I) zeigen weniger intra-tubuläre Protein-Ablagerungen und weniger Bildung von Matrix-Material innerhalb der Glomeruli. Die gewählte Vergrößerung für die Aufnahme ist links angezeigt.

Bei den Epoxomicin-behandelten Tieren (ADR + I) waren die vorhandenen Nierenschäden abgemildert. Es zeigten sich weniger häufig hyaline Ablagerungen und intra-tubuläre Proteinablagerungen im Vergleich zu den anderen beiden ADR-behandelten Gruppen (ADR und ADR + C).

Am Endpunkt des Modells für die akute Nephropathie war an den Glomeruli noch keine Sklerose (Glomerulosklerose) erkennbar (siehe Abbildung 6.12) und ein Glomerulusklerose-Score wie im chronischen Modell wurde nicht erhoben.

6.5.3 Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 mRNA und Protein im Tiermodell

Die mRNA aus den murinen Nieren wurde wie 5.1.1 beschrieben aufgereinigt und gleich darauf in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Mit Hilfe der real-time RT-PCR wurden die Mengen an muriner Alpha-Actinin-4 und CLP-36 mRNA quantitativ erfasst.

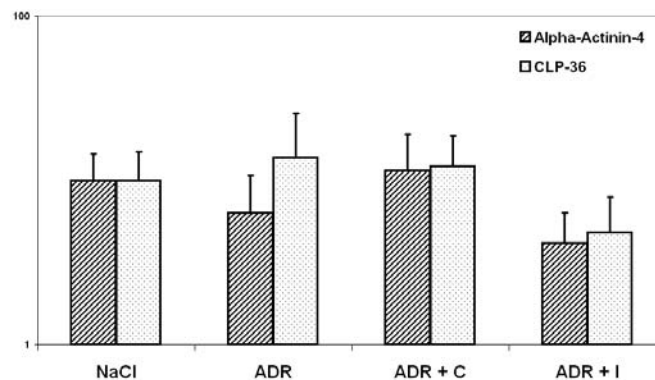


Abbildung 6.36 mRNA-Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in ADR-induzierter Nephropathie. Die mRNA Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 im Tierexperiment wurde mittels real time RT-PCR in Relation zu 18S rRNA als Housekeeper bestimmt. Die Expressions-Level von CLP-36 und Alpha-Actinin-4 in den Gruppen ADR, ADR + C und ADR + I sind im Verhältnis zu den gesunden Kontroll-Tieren (NaCl) angegeben. Die Expression von CLP-36 und Alpha-Actinin-4 ändert sich nicht in den ADR und ADR + C behandelten Tieren. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

Die beiden cytoskelett-assoziierten Moleküle Alpha-Actinin-4 und CLP-36 werden im Modell der akuten ADR-Nephropathie im Vergleich zu gesunden Tieren auf mRNA-Ebene nicht reguliert (Abbildung 6.36). Die Expressionsdaten der drei ADR-behandelten Gruppen sind in Relation zu der Expressions-Rate in gesunden Nieren (NaCl Gruppe) angegeben. Abbildung 6.36 zeigt die Expressionswerte von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 normalisiert auf 18S rRNA als Housekeeper. Eine Normalisierung der Expressionsdaten auf andere Housekeeper (GAPDH und Cyclophilin) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Eine stabile mRNA Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in Glomeruli von gesunden und geschädigten Glomeruli konnte zuvor auch an den humanen glomerulären Erkrankungen gezeigt werden

Abbildung 6.24). Der Schädigungsmechanismus betrifft Mensch und Maus gleichermaßen.

Die Regulation der Protein-Ebene der beiden Moleküle wurde anhand von Nierenschnitten und immunhistologischen Methoden untersucht. Abbildung 6.37 A zeigt Glomeruli einer Alpha-Actinin-4 spezifischen Immunfluoreszenz. Die Unterschiede der Signalintensität zwischen den tierexperimentellen Gruppen wurden quantitativ mittels Densitometrie erfasst und grafisch in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 6.37 B). Für jedes Tier wurde die Signalstärke von mindestens 12 Glomeruli gemessen und in drei Kategorien eingeteilt: Glomeruli global gefärbt, Glomeruli segmental gefärbt und Glomeruli nicht gefärbt.

Es zeigt sich eine deutliche Färbung des ganzen Glomerulus (global) in gesunden Tieren (NaCl). Bei 70% der bewerteten Glomeruli war das spezifische Signal global, bei 30% segmental über den Glomerulus verteilt. Kein Glomerulus war negativ für Alpha-Actinin-4 Protein. Bei Tieren, die nach ADR-Applikation an einem schweren Nierenschaden leiden, weisen über die Hälfte der bewerteten Glomeruli (58%) kein Alpha-Actinin-4 Protein mehr auf (ADR). Ähnlich verhält es sich mit Tieren, die mit dem Carrier DMSO behandelt wurden (ADR + C). Im Gegensatz dazu zeigen die Tiere, die mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomicin behandelt wurden (ADR + I) in 92% der Glomeruli -zumindest segmental- ein Alpha-Actinin-4- spezifisches Signal. Durch die Blockade der Proteasomen *in vivo* ist es möglich, den Verlust von Alpha-Actinin-4 zu verhindern. Die Funktion des Inhibitors *in vivo* wurde durch die Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen in Abbildung 6.32 gezeigt.

Der CLP-36 spezifische Antikörper liefert ein spezifisches Signal mit humanem Gewebe, humanen und murinen Podozytenlysaten, jedoch nur sehr bedingt an murinem Gewebe. Immunfluoreszenzen, die bislang mit diesem Antikörper an den murinen Nierenschnitten durchgeführt wurden, zeigten nur ein sehr schwaches, schlecht auswertbares Signal. Die Ergebnisse entsprechen denen von Alpha-Actinin-4, sind aber weniger stark ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

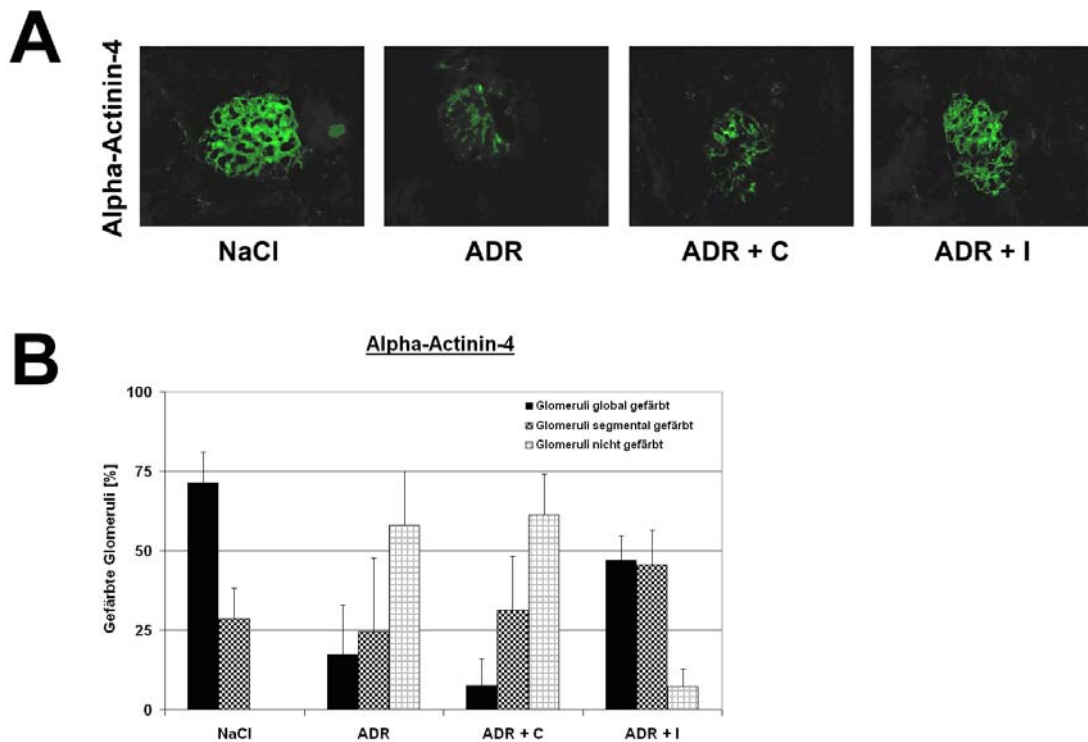


Abbildung 6.37 Die Degradation von Alpha-Actinin-4 Protein in Adriamycin-geschädigten Nieren kann mit einem Proteasom-Inhibitor verhindert werden. Teil A der Abbildung zeigt die Immunfluoreszenz für Alpha-Actinin-4 Protein an Glomeruli von allen vier untersuchten Gruppen (siehe

Tabelle 6). In gesunden Glomeruli (NaCl) ist ein starkes Signal für Alpha-Actinin-4 erkennbar, das aber in den geschädigten Nieren fast ganz verschwindet. ADR-behandelte Tiere zeigen einen starken Verlust von Alpha-Actinin-4 Protein in den Glomeruli. Auch bei den Carrier-behandelten Tieren (ADR + C) findet man eine deutliche Abnahme von Alpha-Actinin-4 Protein. Glomeruli von Mäusen, die mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomicin (ADR + I) behandelt wurden, zeigen ein mit gesunden Nieren vergleichbares Signal für Alpha-Actinin-4 Protein. Der Verlust des cytoskelett-assoziierten Moleküls konnte durch einen Proteasom-Inhibitor *in vivo* verhindert werden. Die densitometrische Quantifikation der Signalstärke für Alpha-Actinin-4 Protein zeigt das Diagramm in B. In gesunde Glomeruli (NaCl) ist Alpha-Actinin-4 Protein über den ganzen Glomerulus verteilt (globales Signal). Glomeruli der ADR-Tiere besitzen kaum noch, oder nur ein segmental verteiltes Alpha-Actinin-4 Protein (vergleichbar mit den humanen IgA und FSGS Daten). Bei Tieren der ADR + C-Gruppe ist das Signal von Alpha-Actinin-4 vergleichbar mit dem der ADR-Tiere. Der Verlust von Alpha-Actinin-4 Protein bei ADR-Nephropathie kann durch die Gabe des Proteasom-Inhibitors Epoxomicin *in vivo* verhindert werden.

7 Diskussion

7.1 ILK Signaltransduktion in Podozyten *in vitro* und *in vivo*

Die Modifikation der podozytären Zell-Architektur durch cytoskeletale Veränderungen, Unterbrechung von Zell-Zell-Kontakten und Abweichungen bei der fein abgestimmten Zell-Matrix-Interaktion sind entscheidende Ereignisse bei der Entwicklung einer glomerulären Proteinurie (Kriz and Lemley, 1999; Whiteside et al., 1993). Diese Hypothese wurde kürzlich durch Studien gestützt, die vererbare Formen des Nephrotischen Syndroms in Mensch und Maus molekular analysierten. Bei den dadurch identifizierten Molekülen handelt es sich in erster Linie um podozyten-spezifische Proteine, die an der Zell-Zell-Interaktion unter Bildung der Schlitzmembran und an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt sind (Boute et al., 2000a; Kaplan et al., 2000a; Kestilä et al., 1998; Kreidberg et al., 1996).

Die Integrin-linked Kinase (ILK) wurde erst kürzlich als Zell-Matrix Molekül identifiziert, das bei proteinuren Erkrankungen aktiviert wird. Die ILK wird im Congenitalen Syndrom des Finnischen Typs *in vivo* und bei Podozytenschädigung mit Puromycin Aminonucleosid *in vitro* auf mRNA- und Protein-Ebene induziert. Diese Induktion wird ergänzt durch eine Steigerung der Kinase-Aktivität der ILK in *in vitro* Kinase Assays (Kretzler et al., 2001b).

Die ILK kann in Epithelzellen durch die direkte Phosphorylierung von GSK-3 β an Serin 9 die nachgeschalteten Elemente des *Wnt*-Signaltransduktionsweges nutzen (Novak et al., 1998). Es scheint, als würde dieser Signaltransduktionsweg bei den Veränderungen aktiviert, die bei podozytärer Schädigung beobachtet werden können. Eine im Jahr 2003 erschienene Publikation von Li und Mitarbeitern (Li et al., 2003) zeigt eine Aktivierung der ILK bei Schädigungen im Tubulus-System in der Niere. Die Aktivierung der ILK ging einher mit der Repression von epithelialen Markern wie E-Cadherin im tubulären Zell-Kompartiment. Der zugrundeliegende Signaltransduktionsweg wurde jedoch nicht näher untersucht.

7.1.1 Funktion des ILK-Inhibitors MC-5

Die kanadische Firma Kinetek hat einen ILK-Inhibitor entwickelt und unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Spezifität des Inhibitors wurde anhand von Kinase-Assays mit mehr als 80 verschiedenen Kinasen untersucht. Hierbei hat sich keine Kreuzreaktion mit anderen Kinasen ergeben (mündliche Mitteilung von Kinetek). Durch die Analyse der ILK-Downstreamtargets GSK-3 β und PKB/Akt mit phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern konnte die Funktion des ILK-Inhibitors MC-5 anhand von Immunfluoreszenzen und Western Blots gezeigt werden (siehe Abbildung 6.1 und Abbildung 6.2). Die Menge an Serin 9 phosphorylierter GSK-3 β und an Serin 473 phosphorylierter PKB/Akt war nach der Inkubation mit dem ILK-Inhibitor geringer, was auf eine effektive Inhibition der Kinase-Aktivität schließen lässt. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die ILK in Podozyten stärker auf die Phosphorylierung der GSK-3 β ausgerichtet ist. Der Phosphorylierungsstatus von GSK-3 β und PKB/Akt wurde auch für die Untersuchung der Wirkungsweise des ILK-Inhibitors MC-5 *in vivo* an immunhistologischen Schnitten verwendet (Daten nicht gezeigt).

Um die Cytotoxizität des ILK-Inhibitors bzw. den Einfluß der ILK auf das Zellüberleben zu untersuchen, wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt (siehe Abbildung 6.4). Hierbei zeigt sich bei der Inkubation der murinen Podozyten für 24 Stunden mit 5 μ M ILK-Inhibitor nur ein leichter Anstieg der Apoptose-Rate um rund 6%. Dieser leichte Anstieg lässt auf eine äußerst geringe Cytotoxizität des ILK Inhibitors in der verwendeten Konzentration schließen. Der Anstieg der Apoptose-Rate muss nicht unbedingt auf die generelle Cytotoxizität des Inhibitors zurückzuführen sein, sondern kann durch die Inhibition der ILK begründet sein. Die ILK wird als eine der beiden Kinasen postuliert, die durch Phosphorylierung der PKB/Akt diese aktivieren (Blattner and Kretzler, 2005). Eine aktive PKB/Akt ist in der Lage, durch verschiedene Effektoren Apoptose zu supprimieren (Dedhar, 2000). Eine aktive PKB/Akt kann durch Phosphorylierung des pro-apoptotischen Bcl-2 Partners BAD (Downward, 1998), der Inaktivierung von Caspase-9 (Cardone et al., 1998) und durch die Phosphorylierung und somit Repression von FKHRL-1, einem Transkriptionsfaktor, der die Expression des Apoptose-induzierenden FAS-Liganden reguliert (Brunet et al., 1999), die Apoptose einer Zelle verhindern. Eine Inhibition der Integrin-linked Kinase könnte zu einer

verminderten Aktivierung von PKB/Akt führen, was zu einem geringeren Schutz der Zelle vor Apoptose führt.

Die Lokalisation der ILK wurde nach deren Inhibition mit dem Inhibitor MC-5 mittels Immunfluoreszenz untersucht. Das Fokalkontakt Protein Paxillin interagiert mit der ILK und bindet in einer Region innerhalb der Kinase-Domäne der ILK. Die Bindung von Paxillin an die ILK ist wichtig für deren Lokalisation in die Fokalkontakte (Nikolopoulos and Turner, 2001). In der Immunfluoreszenz konnte keine Veränderung im Verteilungsmuster der ILK festgestellt werden (siehe Abbildung 6.3). Paxillin befand sich nach der Inkubation mit ILK-Inhibitor ebenfalls mit gleicher Häufigkeit wie in den Medium-behandelten Kontrollzellen in den Fokalkontakten (Daten nicht gezeigt). Der kleinmolekulare Inhibitor MC-5 inhibiert die Kinase-Domäne der ILK, beeinflusst allerdings nicht deren Bindung an Paxillin und deren natürliche Lokalisation in die Fokalkontakte.

7.1.2 ILK-abhängige Translokation von β -Catenin in den Nucleus

Bei Erkrankungen der Niere wie beispielsweise der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (siehe 3.3.4) verändern Podozyten ihren Phänotyp und beginnen zu transdifferenzieren (Barisoni et al., 1999). Auch bei der Entwicklung einer Fibrose in Interstitium der Niere erfolgt eine Epithelial-zu-Mesenchymale Transition (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) (Liu, 2004). Einer Transdifferenzierung gehen zunächst Veränderungen auf transkriptioneller Ebene voraus.

Bei vielen anderen Erkrankungen und auch bei der Schädigung des renalen Tubulussystems konnte die Aktivierung der β -Catenin Signaltransduktion für die Veränderung des Phänotyps von Zellen verantwortlich gemacht werden (Price et al., 2002).

Durch Steigerung der Kinase-Aktivität der Integrin-linked Kinase nach Inkubation der Podozyten mit Puromycin (Kretzler et al., 2001a) oder durch die Überexpression von ILK wurde eine Translokation von β -Catenin in den Zellkern induziert (siehe Abbildung 6.7 und Abbildung 6.8). Dieser Prozess wurde von der Co-Lokalisation von β -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 innerhalb des Nucleus begleitet (Teixeira et al., 2005). Die zelluläre Kompartimentierung von β -Catenin und LEF-1 definiert deren

Funktionalität. Die Lokalisation von β -Catenin an den Cadherinen entlang von Zell-Zell-Kontakten weist auf eine Rolle bei der interzellulären Adhäsion hin, wohingegen seine nucleäre Akkumulation und Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 auf die Kontrolle der Transkription von entsprechenden Ziel-Genen dieses Komplexes deutet (Sellin et al., 2001).

Novak und Kollegen fanden in gastrointestinalen Epithelzellen eine nucleäre Translokation und transkriptionelle Aktivierung von β -Catenin nach einer Überexpression von ILK. Diese Überexpression wurde von einer verminderten Adhäsion der Zellen und einer reduzierten Expression von E-Cadherin begleitet (Novak et al., 1998). Die ILK-abhängige Aktivierung von β -Catenin / LEF-1 in transfizierten Podozyten führt hingegen zu einer verminderten Expression von P-Cadherin (siehe 7.1.4). Die ILK-abhängige Translokation von β -Catenin in den Nucleus bei Puromycin behandelten Podozyten *in vitro* und im Tiermodell mit der Adriamycin-induzierten Nephropathie (siehe Abbildung 6.9) zeigt die Aktivierung dieses „Hauptschalters“ während einer Podozyten-Schädigung.

7.1.3 Auswirkungen der ILK auf die Podozyten-Funktion *in vitro*

Die Integrin-linked Kinase wird beim Congenitalen Syndrom des Finnischen Typs und bei einer Schädigung von Podozyten *in vivo* und *in vitro* induziert (Kretzler et al., 2001b). Puromycin induziert die mRNA-Expression der ILK und steigert deren Kinase-Aktivität in Podozyten *in vitro* (Kretzler et al., 2001b). *In vivo* führt Puromycin zu retraktierten Fußfortsätzen, Veränderungen am Actin-Cytoskelett und zur Ablösung der Podozyten von der GBM (Whiteside et al., 1993). Welche molekularen Mechanismen hinter diesen Veränderungen stehen wurde jedoch nicht aufgezeigt.

Eine Schädigung der Podozyten mit Puromycin führt zu einer Veränderung des Phänotyps (siehe 7.1.2 und 7.1.4), einer verminderten Zell-Matrix Adhäsion und einer gesteigerten, bzw. wieder induzierten Proliferation (siehe Abbildung 6.5 und Abbildung 6.6). Diese Veränderungen sind unter anderem mit Induktion der ILK zu erklären, denn bei gleichzeitiger Inhibition der ILK durch einen spezifischen, kleinmolekularen Inhibitor (siehe 7.1.1) wird die Proliferationsrate wieder verringert und die Adhäsion

der Zellen an die Matrix wieder deutlich gesteigert (siehe Abbildung 6.5 und Abbildung 6.6).

Podozyten proliferieren während der Nierenentwicklung in der Glomerulogenese. Während der Ausreifung des Glomerulus (S-shaped bodies zu capillary loop stage) treten sie in die G₀ Phase, proliferieren nicht mehr und nehmen einen differenzierten Phänotyp an (Mundel and Shankland, 2002). Dieser Phänotyp ist von großer Bedeutung, um ihre Funktion in der Filtrationsbarriere erfüllen zu können. Die Aktivierung des GSK-3 β / β -Catenin Signalweges in Puromycin behandelten Zellen durch eine gesteigerte ILK Aktivität könnte durch Regulation der Expression von Cyclin D1 für den erneut proliferativen Phänotyp verantwortlich sein (Dedhar, 2000; Kretzler et al., 2001a). Eine vermehrte Aktivität von ILK durch deren Überexpression in Darm-Epithelzellen von Ratten resultiert in einer Stimulation des G1/S Cyclin Cdk Komplexes und nachfolgender Progression des Zell-Zyklus (Radeva et al., 1997a). Eine dominant negative Mutante der ILK hingegen induziert in Prostata-Krebszellen einen Block in der G1 Phase des Zell-Zyklus (Tan et al., 2001).

Die deutlich verminderte Proliferationsrate von Podozyten, die gleichzeitig mit Puromycin und dem ILK-Inhibitor behandelt wurden, zeigt den Einfluß der ILK auf die Proliferation von geschädigten Podozyten. Die Induktion der Proliferation in mit Puromycin gestressten Podozyten wurde durch die spezifische Blockade der Kinase Aktivität der ILK mit dem kleinmolekularen Inhibitor MC-5 verhindert. Die Zell-Zyklus Regulation in erkrankten Podozyten, wie beispielsweise in kollabierender FSGS, könnte somit zumindest teilweise auf den Aktivitätsstatus der ILK zurückzuführen sein (Barisoni et al., 2000; Petermann et al., 2003).

ILK-defiziente Chondrozyten zeigen ebenfalls eine verminderte Proliferationsrate und Adhäsions-Defekte, was auf einen starken Einfluß der ILK auf diese beiden Funktionen hindeutet (Grashoff et al., 2003).

Die Adhäsion von Podozyten in der Niere erfolgt hauptsächlich über die α 3 β 1-Integrin vermittelte Verankerung in der glomerulären Basalmembran (Adler and Chen, 1992). Die Interaktion von Integrinen mit deren spezifischen Matrix-Liganden induziert intrazelluläre Prozesse, die als eine „*Outside-in*“ Signaltransduktion bekannt sind. Die Signaltransduktion erfolgt durch die Interaktion von Integrinen mit cytoplasmatischen

Signaltransduktionsmolekülen wie beispielsweise die ILK (Hannigan et al., 1996). Die Signale werden mittels posttranslationaler Modifikationen, wie die Phosphorylierung von entsprechenden Molekülen, weitergeleitet. Im Gegenzug kann die Zelle durch die Modifikation der Integrine auch Signale nach außen senden. Diesen Prozess nennt man „*Inside-out*“ Signaltransduktion.

Die verminderte Adhäsion von geschädigten Podozyten ist u.a. auf eine ILK-vermittelte Integrin *Inside-out* Signaltransduktion zurückzuführen. Nach der Behandlung mit Puromycin wird die Aktivität der ILK gesteigert. Diese nimmt durch *inside-out* Signaltransduktion mit den $\beta 1$ -Untereinheiten von Integrinen Einfluß auf die Adhäsion. Die Adhäsion der Podozyten an der GBM ist hauptsächlich auf die Zell-Matrix Interaktion der $\alpha 3\beta 1$ -Integrine an den Podozyten-Fußfortsätzen zurückzuführen (siehe 3.2.1). Durch die Inhibition der Kinase-Aktivität der ILK mit dem spezifischen Inhibitor MC-5 konnte die Adhäsion der Podozyten an die Matrix wieder erhöht werden (Abbildung 6.6).

Die Kombination von gesteigerter Proliferation und verminderter Adhäsion in geschädigten Podozyten kann zu der Ablösung der Zellen von der GBM führen. Eventuell spielen auch verminderte Zell-Zell-Interaktionen an der glomerulären Filtrationseinheit eine Rolle (siehe auch 7.1.4). Die Soma der Podozyten flottieren frei in der Bowman-Kapsel und sind durch das vorhandene Ultrafiltrat erhöhten Scherkräften ausgesetzt. Eine ILK-vermittelte Abschwächung der Podozyten-Adhäsion durch Integrin *Inside-out* Signaltransduktion und eine gleichzeitig verminderte Zell-Zell-Interaktion durch den Verlust von P-Cadherin Protein (siehe Abschnitt 7.1.4) könnte zur Ablösung und Ausschwemmung von Podozyten führen. In neueren Studien konnten lebensfähige Podozyten im Urin von Patienten mit Proteinurie nachgewiesen werden (Vogelmann et al., 2003).

Die ILK-abhängige Zell-Matrix Adhäsion könnte ein potentieller Mechanismus für den Verlust von Podozyten sein, der bei vielen Glomerulopathien beobachtet werden kann. Eine verminderte Kinaseaktivität der ILK in Podozyten wirkt sich somit schützend auf die Puromycin-induzierten Veränderungen bei der Proliferation, Adhäsion und den Verlust der Schlitzmembran-Komponente P-Cadherin (siehe 7.1.4) aus. Der positive Einfluß des ILK-Inhibitors MC-5 auf die Podozytenfunktion in den *in vitro* Analysen

rechtfertigte, in Kooperation mit der Firma Kinetek (Vancouver, Kanada), auch die Durchführung von *in vivo* Studien (siehe auch 7.1.5).

7.1.4 „Crosstalk“ zwischen Zell-Matrix-Adhäsion und Schlitzmembran bei Podozyten

Die Verankerung der Podozyten-Fußfortsätze an der GBM erfolgt hauptsächlich durch eine Zell-Matrix-Interaktion, die auf zellulärer Seite von $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen vermittelt wird (siehe 7.1.3 und 3.2.1).

Eine Aktivierung der ILK zieht eine verminderte Matrix-Adhäsion nach sich (siehe 7.1.3), die auch mit einer verminderten E-Cadherin Expression einhergeht (Novak et al., 1998). Die Familie der Cadherine besteht aus Glycoproteinen, die die Zellmembran durchspannen und in vielen Zelltypen exprimiert werden. Durch homophile Interaktionen zwischen benachbarten Zellen sind Cadherine für die Aufrechterhaltung von spezifischen Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich. Innerhalb der Zellen verlinkt ein multi-molekularer Komplex die Cadherine mit dem Actin Cytoskelett der Zelle und erhöht so die Zugfestigkeit der Zell-Zell-Kontakte (Behrens, 1999).

Die podozytäre Schlitzmembran wurde erst kürzlich als eine modifizierte „*Adherens Junction*“ postuliert, die verschiedene Gerüst-Proteine (*scaffolding proteins*) wie P-Cadherin, Nephrin, CD2AP und FAT, einem ebenfalls der Cadherin-Familie zugeordneten Protein, beinhaltet (siehe Kapitel 3.2.1, (Pavenstadt et al., 2003; Reiser et al., 2000)). Störungen in der Dynamik dieser Moleküle können zu einem Auseinanderreißen des ausgeklügelten Komplexes führen und schwerwiegende Veränderungen an der glomerulären Filtrationsbarriere nach sich ziehen.

Eine ILK-abhängige Regulation von E-Cadherin wurde bereits 1998 beschrieben (Wu et al., 1998). E-Cadherin wird in der murinen Podozyten Zelllinie jedoch kaum exprimiert und konnte auch auf Protein-Ebene im Western Blot nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die Funktion der Podozyten ist jedoch ein anderes Mitglied der Cadherin Familie interessant: P-Cadherin (siehe 3.2.1). Die Sequenz-Analyse der Promotor-Region des murinen CDH3 Gens, das für P-Cadherin codiert, offenbart eine Bindungsregion für den Transkriptionsfaktor LEF-1 (persönliche Mitteilung von PD Dr. P. Nelson). Die Analyse erfolgte mit Zugriff auf die Software von Genomatix

(Genomatix Software GmbH, München) und wurde von PD Dr. P. Nelson durchgeführt. Die in 7.1.2 diskutierte ILK-abhängige Translokation von β -Catenin in den Nucleus wird durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 begleitet (Teixeira et al., 2005). Beide Moleküle zusammen können im Nucleus somit für die transkriptionelle Regulation von P-Cadherin verantwortlich sein.

Die Ergebnisse mit Puromycin und ILK-Inhibitor behandelten Podozyten zeigen die ILK-abhängige Regulation von P-Cadherin (Abbildung 6.10). Die Induktion der ILK durch Puromycin führt zu einer Repression von P-Cadherin auf mRNA- und Protein-Ebene. Diese Repression kann durch die Inhibition der ILK verhindert werden.

Durch die Translokation und Interaktion von β -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 (Teixeira et al., 2005) bei einer Schädigung der Podozyten könnte es zu einer Repression von P-Cadherin auf mRNA- und Protein-Ebene kommen. Hierfür sprechen sowohl die Ergebnisse eines genetischen Ansatzes mit stabil transfizierten Podozyten, die wildtyp-ILK bzw. eine kinaseinaktive ILK exprimieren (Teixeira et al., 2005) als auch die pharmakologische Intervention mit dem ILK spezifischen Inhibitor MC-5 (Abbildung 6.10).

7.1.5 Inhibition der ILK-Aktivität *in vivo* bei nephrotischen Mäusen

Der ILK-Inhibitor MC-5 verbesserte die Funktion von geschädigten Podozyten *in vitro* hinsichtlich Proliferation, Matrix-Adhäsion und Regulation des Schlitzmembran-Moleküls P-Cadherin (siehe Abschnitt 7.1.3 und 7.1.4). Darüber hinaus konnte die Induktion eines mesenchymalen Phänotyps in den Podozyten durch ILK-abhängige epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) via β -Catenin / LEF-1 mit dem kleinmolekularen ILK-Inhibitor verhindert werden (Abbildung 6.7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bei Nierenerkrankungen beobachteten Veränderungen der Podozyten ILK-abhängig sein könnten.

Da der ILK-Signaltransduktionsweg durch den von Kinetek (Vancouver, Kanada) neu entwickelten ILK-Inhibitor MC-5 auch *in vivo* pharmakologisch zu beeinflussen war, wurden entsprechende Studien mit dem ILK-Inhibitor in verschiedenen renalen

Krankheitsmodellen (Unilaterale Ureter Obstruktion (UUO), Wachstumshormon (GH)-transgenen Mäusen und ADR-induzierte Nephropathie in Mäusen) durchgeführt.

Das chronische Modell der Adriamycin-induzierten Nephropathie in der Maus verläuft homolog zu der humanen Erkrankung der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS). Die pathologischen Veränderungen in den Glomeruli und im Tubulointerstitium der Nieren werden durch entzündliche Reaktionen und den darauf folgenden Vernarbungen des Gewebes hervorgerufen. Die Proteinurie entsteht durch die Schädigung des glomerulären Filtrationsapparates. Das Ausmaß der Proteinurie (Albuminurie) ist bedingt durch den zunehmenden Ausfall von funktionstüchtigen Nephronen in der Niere.

Durch den ILK-Inhibitor MC-5 sollte nach der Verbesserung der Funktionalität von Podozyten *in vitro* auch eine Verbesserung der Podozyten-Funktion *in vivo* erreicht werden, die sich entsprechend positiv auf die Proteinurie der Tiere auswirkt. Als funktionelle Parameter dienten hierbei die Proteinurie-Werte im Urin und die Erfassung gradueller Unterschiede bei der glomerulären Schädigung. Die Integrin-linked Kinase wird in einer Reihe von humanen Nieren-Erkrankungen und in verschiedenen Tiermodellen induziert. Im Fall des Adriamycin-Modells finden sich, ebenso wie in humanen diabetischen Glomeruli (Guo et al., 2001), erhöhte Protein-Spiegel der ILK (siehe Abbildung 6.9). Die Messung der Menge an Albumin im Urin mittels ELISA zeigt eine deutliche Induktion des Modells mit starker Albuminurie (Proteinurie) eine Woche nach der ersten Adriamycin-Injektion. Danach sollte eine zweite Adriamycin-Injektion an Tag 14 die Proteinurie nochmals erhöhen (Vielhauer et al., 2004), was in dieser Versuchsserie nicht zu beobachten war. Zudem stellte sich nach Beginn der Behandlung der Tiere mit ILK-Inhibitor und Carrier heraus, dass die in der ILK-Inhibitor Gruppe randomisierten Tiere zu Beginn der Behandlung eine stärkere Proteinurie (Albuminurie) entwickelt hatten (siehe Abbildung 6.11).

Aufgrund der Limitationen des funktionellen Parameters Albumin wurde mehr Gewicht auf die Analyse der strukturellen glomerulären Schädigung gelegt. Bei der geblindet durchgeführten Bewertung der Glomerulosklerose stellte sich heraus, dass die Schädigung der Glomeruli bei den ILK-Inhibitor behandelten Mäusen signifikant geringer war als die der Carrier behandelten Tiere. Dies bedeutet, dass der ILK-

Inhibitor MC-5 in der Lage war, die durch ADR entstandenen starken Schäden in den Glomeruli messbar abzumildern.

Ein weiterer Versuch mit zusätzlich größeren Fallzahlen mit einem ILK-Inhibitor mit längerer Halbwertszeit (der Inhibitor MC-5 war bis circa 4 Stunden nach der oralen Gavage im Blut der Tiere messbar; Daten hier nicht gezeigt) oder konstanter Applikation durch Mini-Pumpen ist geplant, um mehr Informationen über die Wirkung einer ILK-Blockade *in vivo* bei Nierenerkrankungen zu erhalten.

7.2 ILK, das Cytoskelett und das cytoskeletale Molekül CLP-36

Die ILK hat durch ihre Interaktionspartner auch Einfluß auf das F-Actin Cytoskelett (siehe auch (Blattner and Kretzler, 2005)). Podozyten, die mit dem ILK-Inhibitor behandelt wurden, zeigen eine verminderte Ausbildung von Actin-Stressfasern. Das F-Actin findet sich vermehrt in einem subcortikalen Ring unterhalb der Zellmembran und neigt zur Akkumulation (siehe Abbildung 6.13). Dies entspricht den Beobachtungen bei Fibroblasten von ILK $-/-$ Mäusen, die aus renalem Gewebe kultiviert wurden (Sakai et al., 2003). In Podozyten, den glomerulären Epithelzellen, greift die ILK in die Regulation von F-Actin ein. Diese Funktion der ILK ist nicht generell in allen Epithelzellen zu beobachten (Sakai et al., 2003), untermauert jedoch die wichtige Rolle der ILK in Podozyten. Wie die Regulation der F-Actin-Formation durch die ILK genau funktioniert ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass Adaptermoleküle die Fokalkontakte, in denen die ILK lokalisiert, an F-Actin koppeln.

CLP-36 ist ein 36 kDa großes Molekül, das der PDZ-LIM Domänen Familie angehört und eine N-terminale PDZ und eine C-terminale LIM Domäne besitzt (Bauer et al., 2000). PDZ und LIM Domänen sind beides modulare Motive, die der Interaktion von Proteinen dienen und häufig bei Adaptermolekülen zu finden sind (Ponting et al., 1997; Schmeichel and Beckerle, 1994) und die mit cytoskeletalen Proteinen und Signaltransduktionsmolekülen interagieren. Das Adaptermolekül CLP-36 wurde erstmals 1995 kloniert (Wang et al., 1995) und erst vor kurzem näher charakterisiert.

CLP-36 interagiert mit F-Actin und mit Alpha-Actinin-1 und -4 (Bauer et al., 2000; Kotaka et al., 2000; Vallenius et al., 2000) und lokalisiert hauptsächlich entlang der

zellulären Stressfasern. Da es sich bei Alpha-Actinin-4 um ein Molekül handelt, das in einer mutierten Form mit veränderter Funktion (Kaplan et al., 2000b) und in *knock-out* Mäusen (Kos et al., 2003) Proteinurie auslöst, könnte sein Bindungspartner CLP-36 ebenfalls eine wichtige Rolle bei Nierenerkrankungen spielen (siehe auch 7.3).

Die Expression von CLP-36 in den verschiedenen Geweben wurde in vorangegangenen Arbeiten anhand von Northern Blots untersucht. Humanes CLP-36 wird am stärksten im Herz- und Skelett-Muskel, moderat in Milz, Colon, Placenta und Lunge exprimiert. Leber, Thymus, Pankreas und Niere exprimieren CLP-36 nur schwach (Kotaka et al., 1999). Untersuchungen mit CLP-36 aus *Rattus norvegicus* kommen zu einem ähnlichen Ergebnis (Wang et al., 1995).

Die Expression von CLP-36 in murinem Gewebe wurde bislang noch nicht näher analysiert. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass CLP-36 mRNA in murinem Nierencortex und in der murinen Podozyten-Zelllinie K5P5 exprimiert wird. Im Western Blot mit CLP-36 spezifischem Antikörper konnte das Protein in Zellysat von Podozyten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6.14). Mit murinem Nierengewebe im Western Blot reagiert der Antikörper jedoch nur sehr schwach. Podozyten sind glomeruläre Epithelzellen und Vallenius und Kollegen konnte anhand von *in situ* Hybridisierungen zeigen, dass CLP-36 stark in epithelialen Zellen exprimiert wird (Vallenius et al., 2000). Somit könnte die CLP-36 mRNA im Nierencortex hauptsächlich auf dessen Expression in Podozyten zurückzuführen sein.

7.2.1 Interaktion von ILK und CLP-36 in murinen Podozyten

Über ihre Ankyrin Repeats ist die ILK in der Lage, mit LIM-Domänen anderer Proteine zu interagieren. Die beiden Proteine PINCH-1 und PINCH-2 bestehen aus fünf LIM Domänen und binden an die Ankyrin Repeats der ILK (Zhang et al., 2002a). Abbildung 6.15 und Abbildung 6.16 zeigen, dass CLP-36 an den Übergängen zu den Fokalkontakten mit der ILK co-lokalisiert und interagiert. Diese Interaktion von CLP-36 könnte durch die Bindung seiner LIM-Domäne an die Ankyrin Repeats der ILK zustande kommen. Aufgrund der endständigen Lage der beiden Proteininteraktions-Domänen von CLP-36 käme es bei einer gleichzeitigen Bindung der LIM-Domäne an

die ILK und der Bindung der PDZ-Domäne an Alpha-Actinin (Bauer et al., 2000) vermutlich nicht zu einer sterischen Behinderung. CLP-36 könnte somit ein Adaptermolekül sein, das das Cytoskelett über die ILK an den Fokalkontakten verankert. Die genauen Regionen der Interaktion zwischen ILK und CLP-36 müssten mit Hilfe von rekombinanten Proteinen und „Pull-Down“ Experimenten näher kartiert werden.

7.2.2 Phosphorylierung von CLP-36

Die ILK interagiert mit dem Adapter- und PDZ-LIM Domänen Protein CLP-36 (siehe 7.2.1). Proteine der PDZ-LIM Domänen Familie binden meist über ihre PDZ-Domäne an andere cytoskelett-assoziierte Moleküle, während die LIM-Domänen spezifisch mit Kinasen und Phosphatasen interagieren, die mittels Phosphorylierungen intrazellulär Signale übertragen. CLP-36 ist wahrscheinlich auch ein solches Adaptermolekül, das mit Enzymen unterschiedlicher Signaltransduktionswege interagiert und von diesen auch phosphoryliert wird.

Die Analyse der murinen Primärsequenz von CLP-36 (siehe Abbildung 6.17) ergab, dass dieses Protein hypothetisch an 11 Serin- und 4 Threonin-Resten phosphoryliert werden könnte. Weitere Analysen durch Immunpräzipitationen von CLP-36 mit anschließenden Western Blots mit phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern haben gezeigt, dass das Molekül in Podozyten tatsächlich an Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert wird (siehe Abbildung 6.18). Da eine Phosphorylierung von CLP-36 auf die Serin-/Threonin-Kinase ILK zurückzuführen sein könnte, wurden *in vitro* Kinase Assays mit immunpräzipitierten und rekombinanten Proteinen (aufgereinigt von K. Bauer, Arbeitsgruppe W. Siess, IPEK - Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, München; Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, Kanada) durchgeführt. Hierbei war jedoch keine Phosphorylierung von CLP-36 durch die ILK zu beobachten. Die mit CLP-36 interagierende Kinase Clik1 war *in vitro* ebenfalls nicht in der Lage, CLP-36 zu phosphorylieren (Vallénus and Makela, 2002). Eine Phosphorylierung von CLP-36 durch die ILK *in vivo* kann trotz der negativen *in vitro* Kinase Assays nicht ausgeschlossen werden. Studien mit dem ILK-Inhibitor bzw. die

Expression von dominant negativen ILK-Konstrukten könnten mit anschließender Immunpräzipitation von CLP-36 und Western Blot mit den entsprechenden phosphorylierungsspezifischen Antikörpern weitere Aussagen über die Rolle der ILK bei der Phosphorylierung von CLP-36 liefern.

7.3 Proteasomale Degradation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 bei renaler Schädigung in Mammaliern

Proteine wie CLP-36, die PDZ- und LIM-Domänen besitzen, agieren als Adaptermoleküle. Mit seiner PDZ-Domäne interagiert CLP-36 mit F-Actin und mit seiner LIM-Domäne an andere Signaltransduktionsmoleküle, wie die ILK (siehe 7.2.1). Die Hauptaufgabe besteht vermutlich darin, Signalenzyme an das Actin-Cytoskelett zu lokalisieren. Alpha-Actinin ist ebenfalls ein Kopplungsmolekül, das Integrine mit dem Actin-Cytoskelett, dem Gerüst innerhalb der sekundären Fußfortsätze von Podozyten, verbindet (Smoyer et al., 1997). Mutationen in dem Gen *ACTN4*, das für Alpha-Actinin-4 codiert, sind für eine vererbliche Form der Fokal Segmentalen Glomerulosklerose verantwortlich (Kaplan et al., 2000c). Durch ihre Assoziation an das Cytoskelett können beide Proteine, Alpha-Actinin-4 und CLP-36, innerhalb von Podozyten einen großen Einfluß auf die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere haben. Wie bereits einleitend (3.2.2) beschrieben, ist die Verankerung des Cytoskeletts über Adaptermoleküle an Membranproteine von großer Bedeutung. Darüber hinaus spielt Alpha-Actinin-4 auch eine Rolle für die Beweglichkeit der Zelle und verankert das Actin-Cytoskelett an den β -Integrin Untereinheiten (Honda et al., 1998).

Ob und wie Alpha-Actinin-4 und CLP-36, das in anderen Zellen mit Alpha-Actinin-4 interagiert (Vallénus et al., 2000), in erworbenen renalen Schädigungen reguliert werden, sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

7.3.1 Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in humanen Podozyten

Zunächst wurde die Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 mRNA innerhalb der humanen Niere mittels RT-PCR untersucht. Die nicht muskuläre Isoform Alpha-Actinin-4 wird human in der Niere, nicht aber im Muskel exprimiert. Innerhalb der Niere wird Alpha-Actinin-4 von glomerulären Zellen ebenso wie von Zellen des Tubulus Systems exprimiert. Die stark homologe Isoform Alpha-Actinin-1 hingegen zeigt in der Niere nur eine Expression außerhalb der Glomeruli. CLP-36 wird parallel zu Alpha-Actinin-4 innerhalb der Niere in glomerulären Zellen sowie in tubulären Zellen exprimiert. Die humane Podozyten-Zelllinie exprimiert ebenfalls CLP-36 (Abbildung 6.20).

Um die molekulare Interaktion der beiden Moleküle innerhalb von humanen Podozyten zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzen und Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierbei zeigte sich die Co-Lokalisation beider Proteine hauptsächlich entlang der podozytären Stressfasern, aber auch in Arealen an den Stressfaser-Enden, die in die Fokalkontakte übergehen (Abbildung 6.21). Die molekulare Interaktion von Alpha-Actinin-4 mit CLP-36 wurde mittels Immunpräzipitationen nachgewiesen (Abbildung 6.22). Hierfür wurden ein monoklonaler Alpha-Actinin IgM Antikörper sowie ein polyklonaler, Alpha-Actinin-4 spezifischer Antikörper und der CLP-36 Antikörper verwendet.

7.3.2 Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 bei humaner Nierenschädigung

Die Regulation von Alpha-Actinin-4 und seinem Interaktionspartner CLP-36, der in murinen Podozyten auch mit der Integrin-linked Kinase interagiert (siehe 7.2), sollte bei erworbenen glomerulären Erkrankungen, die mit einer starken Proteinurie einhergehen, untersucht werden. Eine vererbliche Form von Fokal Segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) konnte bereits mit einer mutierten Form von Alpha-Actinin-4 in Verbindung gebracht werden (Kaplan et al., 2000b).

Im Rahmen einer Nierenbiopsie-Studie wurden immunhistologische Färbungen für Alpha-Actinin und CLP-36 Protein an unterschiedlichen glomerulären Erkrankungen

durchgeführt. Hierbei wurde ein Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein festgestellt, der am prominentesten in Patienten mit IgA-Nephropathie und FSGS (siehe 3.3.4) zu sehen war. Patienten mit FSGS zeigten fast einen kompletten Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein in den Glomeruli (siehe Abbildung 6.23).

Zur Definition der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen wurde zu den auf Protein-Ebene untersuchten Erkrankungen an Patientenmaterial der Biopsie-Studie ERCB (European Renal cDNA Bank; (Cohen et al., 2002)) die mRNA-Expression von beiden Molekülen analysiert. Die real-time RT-PCR mit cDNA von mikrodissezierten Glomeruli (vom Tubulus-System abgetrennte Glomeruli) aus Biopsiematerial ergab eine stabile mRNA-Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 bei allen untersuchten Erkrankungen (siehe Abbildung 6.24). Für diese Analyse wurden zwei verschiedene Housekeeper (18S rRNA und GAPDH) verwendet, auf die die Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 standardisiert wurde. Diese Daten könnten das Bindeglied sein, das die familiäre Form der FSGS mit der sporadischen erworbenen Form der FSGS verbindet, und neue Hinweise auf die Entstehung von FSGS und Proteinurie liefern. Ein Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 könnte die Struktur des podozytären Cytoskeletts negativ beeinflussen und zu einer Verbreiterung der sekundären Fußfortsätze und Schädigung der Filtrationsbarriere führen.

Das podozyten-spezifische, Actin-bindende Molekül Synaptopodin wurde ebenfalls analysiert. Hier fand sich weder auf der Protein- noch auf der mRNA-Ebene ein Unterschied in dessen Expression (Daten hier nicht gezeigt), was auf einen spezifischen Mechanismus für den Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 schließen lässt.

Die reduzierten Signale für Alpha-Actinin und CLP-36 in der immunhistologischen Untersuchung könnten die Konsequenz von verschiedenen Faktoren sein. Zum Beispiel könnte eine Verringerung der Menge des Antigens oder eine veränderte Zugänglichkeit des Antigens für den Antikörper zu einem verminderten Signal führen. Der Verlust von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein in den humanen Glomeruli wurde jedoch gleichermaßen bei zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen das Antigen beobachtet (Alpha-Actinin: monoklonaler und polyklonaler Antikörper; CLP-36: Antikörper gegen das ganze Molekül und ein Peptidantikörper).

Im Allgemeinen können verringerte Proteinmengen mit einer verminderten Gen-Expression oder durch intrazelluläre Degradation erklärt werden. Da Punkt eins durch

die Analyse der mRNA beider Moleküle ausgeschlossen werden konnte, wurde Punkt zwei näher untersucht.

7.3.3 Proteasomale Degradation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36

Um zu untersuchen, ob die beiden Proteine Alpha-Actinin-4 und CLP-36 proteasomal degradiert werden, wurde zunächst deren Primärsequenz auf mögliche Schnittstellen durch die 20S katalytische Einheit des Proteasoms untersucht (siehe Abbildung 6.25). Die Analyse zeigt, dass beide Proteine eine große Anzahl an potentiellen Schnittstellen in ihrer Primärsequenz besitzen, die für eine Degradation des Proteins innerhalb des Proteasom-Komplexes sprechen.

Um die proteasomale Degradation experimentell zu untersuchen, wurde zunächst die Halbwertszeit der Proteine ermittelt. Die Halbwertszeit von Alpha-Actinin-4 Protein in der Niere wurde 2004 von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert und betrug in deren Pulse-Chase Experimenten 30 Stunden und länger (Yao et al., 2004). Über die Halbwertszeit von CLP-36 wurde bislang noch nichts veröffentlicht.

Die Versuche mit Cycloheximid und dessen Lösungsmittel DMSO als Kontrolle ergeben eine relativ lange Protein-Halbwertszeit für beide Moleküle, wobei CLP-36 mit 20-24 Stunden schneller degradiert wird als Alpha-Actinin-4 mit 30-35 Stunden (siehe Abbildung 6.26). Nachdem die Halbwertszeiten bekannt waren, wurden vor der Behandlung mit Cycloheximid die Proteasomen mit dem Inhibitor Epoxomicin blockiert. An den Zeitpunkten, an denen mit Cycloheximid-Behandlung bereits eine Abnahme der Proteinmenge zu erkennen war, war nach vorheriger Blockade der Proteasomen die gleiche Proteinmenge wie in den DMSO behandelten Kontrollzellen vorhanden. Dieser Versuch zeigt, dass die Degradation beider Proteine durch die Proteasomen erfolgt.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde der Proteasom Inhibitor Lactacystin verwendet. In diesem Experiment wurden die Podozyten mit Sauerstoffradikalen, die bei der Xanthin-Xanthinoxidase-Reaktion entstehen, oxidativem Stress ausgesetzt. Hierbei zeigte sich ein schneller und starker Verlust von CLP-36 Protein und ein schwächerer Verlust von Alpha-Actinin-4 *in vitro*. Bei der vorherigen Blockade der Proteasomen durch den Inhibitor Lactacystin konnte der Verlust der beiden Proteine verhindert

werden (siehe Abbildung 6.28). Die Resultate aus diesem Versuch und aus dem Experiment mit Epoxomicin und Cycloheximid lassen auf den Abbau beider Moleküle durch die Proteasomen schließen.

7.3.4 Ubiquitinierung von Alpha-Actinin-4 und CLP-36

Durch die kovalente Bindung von ein oder mehreren Ubiquitin-Ketten werden Proteine in der Zelle für den Abbau durch die Proteasomen markiert (Übersichtsartikel (Weissman, 2001)). Dies geschieht meist, wenn die Proteine die Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Reticulum nicht bestehen, oder in ihrer Funktion durch Modifikationen (z.B. durch Oxidation) geschädigt werden. Humane Podozyten, die einem starken oxidativem Stress ausgesetzt wurden, zeigen einen sprunghaften Anstieg von ubiquitinierten Proteinen (siehe Abbildung 6.27). Durch die Degradation der Proteine durch die Proteasomen ist im weiteren Verlauf keine zusätzliche Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen erkennbar. Erst wenn der Protein „Turn-over“ durch eine Proteasom-Inhibition unterbrochen wird, wird die Akkumulation der ubiquitinierten Proteine in der Zelle anhand eines stärkeren Signals deutlich. Bei diesem Experiment wurde der gesamte zelluläre Pool von ubiquitinierten Proteinen nachgewiesen.

Nachdem Alpha-Actinin-4 und CLP-36 proteasomisch degradiert werden, sollte die Ubiquitinierung der beiden Moleküle untersucht werden. Die Sequenzanalyse von humanem Alpha-Actinin-4 und CLP-36 ergab, dass beide potentiell ubiquitinierbare Lysin-Seitenketten in ihrer Primärsequenz aufweisen (siehe Abbildung 6.29 und Abbildung 6.30).

Die Ubiquitinierung von Alpha-Actinin-4 konnte mit spezifischer Immunpräzipitation und Ubiquitin-spezifischem Antikörper im Western Blot gezeigt werden. Der hochmolekulare Schmier, der erst auf Höhe von Alpha-Actinin-4 bei rund 100 kDa beginnt, zeigt poly-ubiquitinierte Alpha-Actinin-4 Moleküle (Abbildung 6.31). Der Nachweis für CLP-36 gestaltete sich schwieriger. Bei Immunpräzipitationen von CLP-36 mit anschließendem Western Blot für Ubiquitin wurde kein entsprechendes Signal detektiert. Auch mit einem *in vitro* Ubiquitinierungs-Assay mit immunpräzipitiertem CLP-36 und aufgereinigten E1, E2 und E3 Enzymen konnte kein Nachweis von ubiquitiniertem CLP-36 erfolgen. Bei einer Recapture-

Immunpräzipitation (siehe 5.9) zeigte sich im Western Blot eine schwache Bande (Abbildung 6.31, Pfeil), bei der es sich aufgrund ihrer Position um CLP-36 Protein mit einer Poly-Ubiquitin-Kette (bestehend aus 4 Ubiquitinen) bzw. vier Mono-Ubiquitinierungen (Multi-Ubiquitinierung) an unterschiedlichen Lysin-Resten handeln könnte. Eine Poly-Ubiquitin-Kette aus 4 Ubiquitinen ist notwendig, um ein Protein für dessen proteasomale Degradation zu markieren (Übersichtsartikel (Fang and Weissman, 2004)). Damit könnte CLP-36, ebenso wie Alpha-Actinin-4, über proteasomalen Abbau degradiert werden. Eine hochmolekulare, breite Signalfrent („Schmier“), der auf eine vielfache Ubiquitinierung von CLP-36 mit vielen Ubiquitin-Ketten hindeutet, konnte mit den verwendeten Methoden nicht gesehen werden. Der Hinweis auf die vorhandene Poly-Ubiquitinierung von CLP-36 könnte durch Experimente mit rekombinanten Techniken (z.B. *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays) erhärtet werden.

7.3.5 Regulation von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 im Tiermodell

Nach dem Nachweis der proteasomalen Degradation und der Ubiquitinierung von nativem Alpha-Actinin-4 bzw. CLP-36 Protein in Podozyten sollte die Regulation der beiden Moleküle *in vivo* in einem entsprechenden Tiermodell untersucht werden. Um der humanen Form der FSGS möglichst nahe zu kommen, wurde das murine Modell der Adriamycin-induzierten Nephropathie verwendet (siehe 3.3.4). Die Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomicin sollte kurz nach der Induktion der Nierenschädigung durch ADR in der Phase der akuten Proteinurie erfolgen. Da es sich bei Epoxomicin um einen kovalent bindenden Inhibitor handelt, konnte keine Langzeittherapie wie bei dem ILK-Inhibitor im chronischen Modell durchgeführt werden (siehe Abschnitt 7.1.5). Der Inhibitor Epoxomicin wurde für das Experiment ausgewählt, da zu dessen Wirkung *in vivo* schon Publikationen vorlagen (Garrett et al., 2003; Meng et al., 1999). Die Inhibition der proteasomalen Degradation mit einem kovalenten Inhibitor ist ein sehr breiter therapeutischer Ansatz, der auf mehreren Ebenen in die Funktion der damit behandelten Zellen eingreift.

Die Behandlung der Mäuse wurde wie unter 5.11 beschrieben mit den in Tabelle 6 aufgeführten Gruppen durchgeführt. Nach Beendigung des Experimentes wurden Blut,

Urin und Nierengewebe der Tiere analysiert. Dabei zeigte sich eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen in den Nieren der Epoxomicin-behandelten Tiere (siehe Abbildung 6.32). Demzufolge wurde der Proteasom-Inhibitor absorbiert und war in der Lage, Proteasomen innerhalb der murinen Niere *in vivo* zu blockieren. Die immunhistologische Auswertung mittels Densitometrie zeigte, dass die Menge Alpha-Actinin-4 Protein bei ADR-behandelten Tieren deutlich vermindert ist. Diese Regulation von Alpha-Actinin-4 entspricht den bei humanen Nierenerkrankungen gemachten Beobachtungen in 7.3.2. Die Tiere, die mit ADR und dem Carrier DMSO (ADR + C) behandelt wurden, zeigten ebenfalls kaum Alpha-Actinin-4 Protein innerhalb der Glomeruli. In Epoxomicin-behandelten Tieren war hingegen ein deutlicher Anstieg von Alpha-Actinin-4 Protein erkennbar. Das Protein konnte somit durch eine Inhibition der Proteasomen vor seiner Degradation geschützt werden. Aus dem *in vivo* Ergebnis kann zusammen mit den Ergebnissen der *in vitro* Experimente gefolgert werden, dass Alpha-Actinin-4 durch Proteasomen degradiert wird. Die Ergebnisse für CLP-36 sind technisch bedingt weniger klar, entsprechen aber weitestgehend der Regulation, die für Alpha-Actinin-4 beobachtet werden konnte.

Bei der Analyse der mRNA-Expression von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 in den einzelnen Gruppen des Tierexperiments konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Die quantitative real-time RT-PCR wurde mit drei unterschiedlichen Housekeepern (18S rRNA, GAPDH und Cyclophilin) durchgeführt. Auch diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen, die zuvor in humanen glomerulären Erkrankungen gemacht wurden (siehe 7.3.2). Diese parallelen Beobachtungen von Mensch und Maus sprechen für einen generellen Mechanismus, der bei Schädigung in Nieren von Mammalieren ablaufen könnte.

Podozyten-spezifische Proteine wie Synaptopodin, Nephritin und Podocin wurden ebenfalls analysiert (Daten nicht gezeigt). Für Synaptopodin waren in dem gewählten Tiermodell keine Veränderungen auf Protein- und mRNA-Ebene nachweisbar. Diese Daten waren ebenfalls konform mit den humanen Daten (nicht gezeigt). Die Regulation von Nephritin und Podocin entsprach der von Alpha-Actinin-4. Es wurde ein Protein-Verlust in den Glomeruli von ADR-behandelten Tieren beobachtet, der durch den Proteasom-Inhibitor Epoxomicin verhindert werden konnte.

Bei der Messung der Albumin-Werte im Urin der Tiere zeigte sich eine starke Albuminurie bei allen Tieren, die mit ADR behandelt wurden. Der Vergleich der Albumin-Ausscheidungen der Carrier (ADR +C)- und der Epoxomicin(ADR + I)-Gruppe zeigte nur einen leichten, nicht signifikanten Unterschied. Die breite Streuung der Albumin-Werte in diesem Tiermodell (siehe auch 7.1.5) kann dazu führen, dass geringere Unterschiede nicht festgestellt werden können. Auch die Analyse der Blutwerte ergab, dass das Modell der ADR-induzierten Nephropathie in den Tieren, die damit behandelt wurden, induziert wurde. PAS-Färbungen an Nierenschnitten zeigten ebenfalls die durch ADR entstandene, fokale Schädigung der Niere. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) könnte die Ultrastruktur der Podozytenfußfortsätze in den entsprechenden Gruppen untersucht werden. Das Cytoskelett in den Podozytenfußfortsätzen besitzt eine hohe Dynamik und ist verantwortlich für die strukturelle Unversehrtheit der Filtrationsschlitze (Mundel and Shankland, 2002). Alpha-Actinin-4 ist ein Molekül, das das Actin-Cytoskelett quervernetzt und ihm Stabilität verleiht. Die intrazelluläre Lokalisation der nicht degradierten Alpha-Actinin-4 Moleküle bei Proteasom-Inhibitor behandelten Tieren könnte durch Immunogold-markierte Antikörper näher charakterisiert werden.

7.4 Ausblick

Die Aufklärung der komplexen Mechanismen, die bei einer neu entstehenden oder bereits vorangeschrittenen Nierenschädigung ablaufen, ist wichtig für die erfolgreiche Therapie dieser Erkrankungen. Mit dieser Arbeit konnten molekulare Regulationsmechanismen aufgezeigt werden, die bei der Entstehung von Nierenerkrankungen innerhalb der hoch spezialisierten, für Filtration und Funktion der Filtrationsbarriere verantwortlichen Podozyten ablaufen. Die Ergebnisse stellen potentielle Ziele für therapeutische Konsequenzen dar und sollten weiter im Fokus der Forschung stehen.

Eine Inhibition der Integrin-linked Kinase durch entsprechend verbesserte Inhibitoren mit längerer Halbwertszeit ist aufgrund der erzielten Ergebnisse in den *in vitro* Studien weiterhin erstrebenswert. Ebenso verhält es sich mit der Inhibition der Proteasomen-

Aktivität. Aufgrund ihrer Bindungseigenschaften wären transiente Inhibitoren mit weniger toxischen Eigenschaften für weitere tierexperimentelle Studien attraktiv. Transient bindende Proteasom-Inhibitoren stehen zur Verfügung und wurden in den letzten Jahren klinisch erprobt. Momentan werden sie bei der Krebstherapie eingesetzt und könnten nach weiteren Analysen im Tiermodell durchaus eine Anwendung bei Menschen mit Nierenerkrankungen finden.

8 Zusammenfassung

Die Funktion der Niere basiert auf einer intakten glomerulären Filtrationseinheit, für deren Aufrechterhaltung den Podozyten eine tragende Rolle zugeschrieben wird. Podozyten formen die Schlitzmembran und sind durch ihre anionische Glykokalix für die größten- und ladungsselektive Filtration des Blutes im Glomerulus zur Bildung eines proteinfreien Ultrafiltrats verantwortlich. Podozyten-Schädigung führt zu einem Verlust der Filtrationsschlitze, zu einem Ablösen der Podozyten von der GBM und zur Ausscheidung von hochmolekularen Proteinen im Urin (Proteinurie).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von molekularen Regulationsmechanismen. Vorarbeiten zeigten eine Induktion der ILK bei Podozyten-Schädigung in humanen Nierenerkrankungen, zwei Tiermodellen und in Podozyten-Zellkultur. Anhand eines ILK-Inhibitors konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die ILK-Induktion zu einer gesteigerten Proliferation und zu einer verminderten Zell-Matrix-Adhäsion führt. Durch den Einfluß der ILK auf GSK-3 β wurden Elemente des *Wnt*-Signaltransduktionsweges rekrutiert. Die nucleäre Translokation von β -Catenin beeinflusste auf transkriptioneller Ebene das Schlitzmembranmolekül P-Cadherin in Podozyten. P-Cadherin wurde auf mRNA- und Protein-Ebene reprimiert (siehe Abbildung 8.1). Die Applikation des ILK-Inhibitors in einem Proteinuriemodell verminderte die strukturellen Schädigungen innerhalb der Glomeruli.

Immunfluoreszenzen und Co-Immunpräzipitationen ermöglichten die Identifikation eines neuen, cytoskeletalen Interaktionspartners von ILK, bei dem es sich um das kürzlich beschriebene PDZ-LIM Domänen Protein CLP-36 (siehe Abbildung 8.1) handelt. In Podozyten wird CLP-36 an Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert. Eine direkte Phosphorylierung von CLP-36 durch die ILK konnte mit den verwendeten *in vitro* Experimenten zunächst nicht nachgewiesen werden. CLP-36 assoziiert neben F-Actin mit den Alpha-Actinin-Isoformen 1 und 4. Die Expression und molekulare Interaktion von CLP-36 und Alpha-Actinin-4 in Podozyten konnte bestätigt werden. Mutierte Formen von Alpha-Actinin-4 führen bei Menschen zu einem Podozyten-Schaden, einhergehend mit starker Proteinurie.

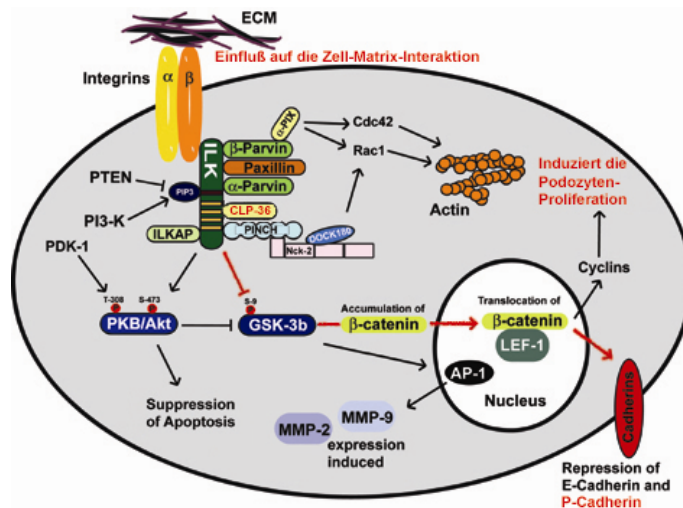


Abbildung 8.1 Schematische Darstellung der ILK-Signaltransduktion. Das Schema zeigt den Wirkungskreis der ILK in Podozyten und Tubulus-Epithelzellen im Kontext der Integrin-Signaltransduktion. Bereiche, die in dieser Dissertation bearbeitet wurden, sind rot unterlegt.

Über die Regulation von nativem Alpha-Actinin-4 und seinem Interaktionspartner CLP-36 war bei erworbenen Nierenerkrankungen noch nichts bekannt. Diese sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Bei humanen Nierenerkrankungen, insbesondere bei FSGS-Patienten, fand sich eine deutliche Reduktion von Alpha-Actinin-4 und CLP-36 Protein bei gleich bleibender mRNA-Expression. Die Analyse der Primärsequenz beider Moleküle ergab, dass diese durch Proteasomen degradiert werden könnten. Die Ubiquitinierung von Alpha-Actinin-4 konnte experimentell bestätigt werden, für CLP-36 fanden sich Hinweise auf eine Poly-Ubiquitinierung. Untersuchungen mit dem Translationsblocker Cycloheximid ergaben eine Halbwertszeit von mehr als 20 Stunden für beide Moleküle. Bei zusätzlicher Inhibition mit einem Proteasom-Inhibitor wurde deren proteasomale Degradation verhindert. Der Verlust beider Proteine bei oxidativem Stress konnte ebenfalls durch Inhibition der Proteasomen unterbunden werden. In dem murinen Proteinuriemodell entsprach die Regulation von CLP-36 und Alpha-Actinin-4 auf Protein- und mRNA-Ebene den Befunden an Patientenmaterial. Die Inhibition der Proteasome blockierte den Verlust von Alpha-Actinin-4 Protein *in vivo*.

Die vorgestellten Daten identifizieren neue molekulare Regulationsmechanismen bei Podozyten-Schädigung und leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis der zellulären Prozesse bei Nierenerkrankungen.

9 Literatur

- Adler, S. and Chen, X.** (1992). Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth. *Am J Physiol* **262**, F770-6.
- Adler, S., Sharma, R., Savin, V. J., Abbi, R. and Eng, B.** (1996). Alteration of glomerular permeability to macromolecules induced by cross-linking of beta 1 integrin receptors. *Am J Pathol* **149**, 987-96.
- Anderson, S., Diamond, J. R., Karnovsky, M. J. and Brenner, B. M.** (1988). Mechanisms underlying transition from acute glomerular injury to late glomerular sclerosis in a rat model of nephrotic syndrome. *J Clin Invest* **82**, 1757-68.
- Andrews, P. M.** (1981). Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus. *Kidney Int* **20**, 549-62.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.** (2005 - online Ausgabe). *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Baraldi, A., Zambruno, G., Furci, L., Ballestri, M., Tombesi, A., Ottani, D., Lucchi, L. and Lusvarghi, E.** (1995). Beta 1 and beta 3 integrin upregulation in rapidly progressive glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* **10**, 1155-61.
- Barisoni, L., Kriz, W., Mundel, P. and D'Agati, V.** (1999). The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **10**, 51-61.
- Barisoni, L., Mokrzycki, M., Sablay, L., Nagata, M., Yamase, H. and Mundel, P.** (2000). Podocyte cell cycle regulation and proliferation in collapsing glomerulopathies. *Kidney Int* **58**, 137-43.
- Barisoni, L. and Mundel, P.** (2003). Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* **23**, 353-60.
- Bauer, K., Kratzer, M., Otte, M., de Quintana, K. L., Haggmann, J., Arnold, G. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Siess, W.** (2000). Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood* **96**, 4236-45.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E.** (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-80.
- Beggs, A. H., Byers, T. J., Knoll, J. H., Boyce, F. M., Bruns, G. A. and Kunkel, L. M.** (1992). Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem* **267**, 9281-8.
- Behrens, J.** (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* **18**, 15-30.
- Bertani, T., Poggi, A., Pozzoni, R., Delaini, F., Sacchi, G., Thoua, Y., Mecca, G., Remuzzi, G. and Donati, M. B.** (1982). Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* **46**, 16-23.

- Binder, C. J., Weiher, H., Exner, M. and Kerjaschki, D.** (1999). Glomerular overproduction of oxygen radicals in Mpv17 gene-inactivated mice causes podocyte foot process flattening and proteinuria: A model of steroid-resistant nephrosis sensitive to radical scavenger therapy. *Am J Pathol* **154**, 1067-75.
- Blanchard, A., Ohanian, V. and Critchley, D.** (1989). The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* **10**, 280-9.
- Blattner, S. M. and Kretzler, M.** (2005). Integrin-linked kinase in renal disease: connecting cell-matrix interaction to the cytoskeleton. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**, 404-10.
- Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S.** (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **294**, 1351-62.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. and Huber, R.** (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 295-317.
- Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K. M.** (2005 - online Ausgabe). Current Protocols in Cell Biology: John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M., Niaudet, P. and Antignac, C.** (2000a). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genetics* **24**, 349-54.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M. C., Niaudet, P. and Antignac, C.** (2000b). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* **24**, 349-54.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brakebusch, C. and Fassler, R.** (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J* **22**, 2324-33.
- Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G. and Kerjaschki, D.** (1997). Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* **151**, 1141-52.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68.
- Burnette, W. N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Campbell, N. A.** (1998). Biologie: Spektrum Akademischer Verlag.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J. C.** (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-21.

- Catic, A., Collins, C., Church, G. M. and Ploegh, H. L.** (2004). Preferred in vivo ubiquitination sites. *Bioinformatics* **20**, 3302-7.
- Chen, A., Sheu, L. F., Ho, Y. S., Lin, Y. F., Chou, W. Y., Chou, T. C. and Lee, W. H.** (1998). Experimental focal segmental glomerulosclerosis in mice. *Nephron* **78**, 440-52.
- Ciani, L., Patel, A., Allen, N. D. and French-Constant, C.** (2003). Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol* **23**, 3575-82.
- Ciechanover, A.** (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 79-87.
- Coffer, P. J., Jin, J. and Woodgett, J. R.** (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335** (Pt 1), 1-13.
- Cohen, C. D., Frach, K., Schlondorff, D. and Kretzler, M.** (2002). Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: a novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int* **61**, 133-40.
- Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W., Wingfield, P. T. and Ploegh, H. L.** (2005 - online Ausgabe). Current Protocols in Protein Sciences: John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Dedhar, S.** (2000). Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 250-6.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. and Dedhar, S.** (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11211-6.
- Deller, T., Korte, M., Chabanis, S., Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G. G., Zuniga, A., Schwarz, K., Bonhoeffer, T., Zeller, R. et al.** (2003). Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10494-9.
- Deman, A., Ceysens, B., Pauwels, M., Zhang, J., Houte, K. V., Verbeelen, D. and Van den Branden, C.** (2001). Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 147-50.
- Deng, J. T., Van Lierop, J. E., Sutherland, C. and Walsh, M. P.** (2001). Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem* **276**, 16365-73.
- Diamond, J. R., Bonventre, J. V. and Karnovsky, M. J.** (1986). A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* **29**, 478-83.
- Djinovic-Carugo, K., Young, P., Gautel, M. and Saraste, M.** (1999). Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell* **98**, 537-46.
- Donoviel, D. B., Freed, D. D., Vogel, H., Potter, D. G., Hawkins, E., Barrish, J. P., Mathur, B. N., Turner, C. A., Geske, R., Montgomery, C. A. et al.** (2001). Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* **21**, 4829-36.
- Downward, J.** (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 262-7.

- Drenckhahn, D. and Franke, R. P.** (1988). Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* **59**, 673-82.
- egger, D. and Bienz, K.** (1987). Colloidal gold staining and immunoprobings of proteins on the same nitrocellulose blot. *Anal Biochem* **166**, 413-7.
- Fang, S. and Weissman, A. M.** (2004). A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1546-61.
- Fishman, J. A. and Karnovsky, M. J.** (1985). Effects of the aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am J Pathol* **118**, 398-407.
- Fogo, A. B.** (2003). Animal models of FSGS: lessons for pathogenesis and treatment. *Semin Nephrol* **23**, 161-71.
- Fukuda, T., Chen, K., Shi, X. and Wu, C.** (2003). PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem* **278**, 51324-33.
- Garrett, I. R., Chen, D., Gutierrez, G., Zhao, M., Escobedo, A., Rossini, G., Harris, S. E., Gallwitz, W., Kim, K. B., Hu, S. et al.** (2003). Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *J Clin Invest* **111**, 1771-82.
- Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E.** (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32.
- Glickman, M. H.** (2000). Getting in and out of the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 149-58.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. and Finley, D.** (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-23.
- Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B. and Fassler, R.** (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* **4**, 432-8.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. and Huber, R.** (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-71.
- Guo, L., Sanders, P. W., Woods, A. and Wu, C.** (2001). The distribution and regulation of integrin-linked kinase in normal and diabetic kidneys. *Am J Pathol* **159**, 1735-42.
- Guo, L. and Wu, C.** (2002). Regulation of fibronectin matrix deposition and cell proliferation by the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex. *Faseb J* **16**, 1298-300.
- Hannigan, G., Troussard, A. A. and Dedhar, S.** (2005). Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* **5**, 51-63.
- Hannigan, G. E., Leung-Hageteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C. and Dedhar, S.** (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91-6.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K.** (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-10.

- Henry, M. D. and Campbell, K. P.** (1999). Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 602-7.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79.
- Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H. and Hirohashi, S.** (1998). Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* **140**, 1383-93.
- Hynes, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.
- Ichimura, K., Kurihara, H. and Sakai, T.** (2003). Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J Histochem Cytochem* **51**, 1589-600.
- Inoue, T., Yaoita, E., Kurihara, H., Shimizu, F., Sakai, T., Kobayashi, T., Ohshiro, K., Kawachi, H., Okada, H., Suzuki, H. et al.** (2001). FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* **59**, 1003-12.
- Ito, K., Ger, Y. C. and Kawamura, S.** (1986). Actin filament alterations in glomerular epithelial cells of adriamycin-induced nephrotic rats. *Acta Pathol Jpn* **36**, 253-60.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S. and Tsukita, S.** (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* **138**, 181-92.
- Jaffé, M.** (1886). *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **10**, 391-400.
- Jones, D. T.** (1998). Do transmembrane protein superfolds exist? *FEBS Lett* **423**, 281-5.
- Jones, D. T.** (1999). GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J Mol Biol* **287**, 797-815.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. and Thornton, J. M.** (1994). A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**, 3038-49.
- Junqueira L.C., Carneiro J. and R.O., K.** (1998). *Basic Histology. 9th Edition.*
- Kaplan, J., Kim, S., North, K., Rennke, H., Correia, L., Tong, H., Mathis, B., Rodriguez-Perez, J., Allen, P., Beggs, A. et al.** (2000a). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* **24**, 251-6.
- Kaplan, J. M., Kim, S. H., North, K. N., Rennke, H., Correia, L. A., Tong, H. Q., Mathis, B. J., Rodriguez-Perez, J. C., Allen, P. G., Beggs, A. H. et al.** (2000b). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* **24**, 251-6.
- Kaplan, J. M., S, H. K., North, K. N., Rennke, H., L, A. C., Tong, H. Q., Mathis, B. J., Rodriguez-Perez, J. C., Allen, P. G., Beggs, A. H. et al.** (2000c). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis [In Process Citation]. *Nat Genet* **24**, 251-6.
- Kerjaschki, D.** (2001). Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* **108**, 1583-7.
- Kerjaschki, D. and Farquhar, M. G.** (1983). Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* **157**, 667-86.

- Kerjaschki, D., Ojha, P. P., Susani, M., Horvat, R., Binder, S., Hovorka, A., Hillemanns, P. and Pytela, R.** (1989). A beta 1-integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli. *Am J Pathol* **134**, 481-9.
- Kerjaschki, D., Sharkey, D. J. and Farquhar, M. G.** (1984). Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* **98**, 1591-6.
- Kesmir, C., Nussbaum, A. K., Schild, H., Detours, V. and Brunak, S.** (2002). Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng* **15**, 287-96.
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R. et al.** (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin- is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell* **1**, 575-582.
- Khyrul, W. A., LaLonde, D. P., Brown, M. C., Levinson, H. and Turner, C. E.** (2004). The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner. *J Biol Chem* **279**, 54131-9.
- Kobayashi, N., Reiser, J., Kriz, W., Kuriyama, R. and Mundel, P.** (1998). Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. *J Cell Biol* **143**, 1961-70.
- Kos, C. H., Le, T. C., Sinha, S., Henderson, J. M., Kim, S. H., Sugimoto, H., Kalluri, R., Gerszten, R. E. and Pollak, M. R.** (2003). Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* **111**, 1683-90.
- Kotaka, M., Kostin, S., Ngai, S., Chan, K., Lau, Y., Lee, S. M., Li, H., Ng, E. K., Schaper, J., Tsui, S. K. et al.** (2000). Interaction of hCLIM1, an enigma family protein, with alpha-actinin 2. *J Cell Biochem* **78**, 558-65.
- Kotaka, M., Ngai, S. M., Garcia-Barcelo, M., Tsui, S. K., Fung, K. P., Lee, C. Y. and Wayne, M. M.** (1999). Characterization of the human 36-kDa carboxyl terminal LIM domain protein (hCLIM1). *J Cell Biochem* **72**, 279-85.
- Kreidberg, J. A., Donovan, M. J., Goldstein, S. L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R. C. and Jaenisch, R.** (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* **122**, 3537-47.
- Kretzler, M., Teixeira, V. P., Unschuld, P. G., Cohen, C. D., Wanke, R., Edenhofer, I., Mundel, P., Schlondorff, D. and Holthofer, H.** (2001a and b). Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *Faseb J* **15**, 1843-5.
- Kriz, W.** (1997). Evolving role of the podocyte in chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res* **20**, 180-3.
- Kriz, W.** (2002). Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc Res Tech* **57**, 189-95.
- Kriz, W., Elger, M., Nagata, M., Kretzler, M., Uiker, S., Koeppen-Hageman, I., Tenschert, S. and Lemley, K. V.** (1994). The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney Int Suppl* **45**, S64-72.
- Kriz, W., Gretz, N. and Lemley, K. V.** (1998). Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* **54**, 687-97.
- Kriz, W., Kretzler, M., Provoost, A. P. and Shirato, I.** (1996). Stability and leakiness: opposing challenges to the glomerulus. *Kidney Int* **49**, 1570-4.

- Kriz, W. and Lemley, K. V.** (1999). The role of the podocyte in glomerulosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **8**, 489-97.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laney, J. D. and Hochstrasser, M.** (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* **97**, 427-30.
- Lannigan, R., Kark, R. and Pollak, V. E.** (1962). The effect of a single intravenous injection of aminonucleoside of puromycin on the rat kidney: a light- and electron-microscope study. *J Pathol Bacteriol* **83**, 357-62.
- Lee, Y. I., Kwon, Y. J. and Joo, C. K.** (2004). Integrin-linked kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 997-1001.
- Lehtonen, S., Zhao, F. and Lehtonen, E.** (2002). CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F734-43.
- Leung-Hagesteijn, C., Mahendra, A., Naruszewicz, I. and Hannigan, G. E.** (2001). Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *Embo J* **20**, 2160-70.
- Li, Y., Yang, J., Dai, C., Wu, C. and Liu, Y.** (2003). Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* **112**, 503-16.
- Liu, L., Done, S. C., Khoshnoodi, J., Bertorello, A., Wartiovaara, J., Berggren, P. O. and Tryggvason, K.** (2001). Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 2637-44.
- Liu, Y.** (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1-12.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Mackinnon, A. C., Qadota, H., Norman, K. R., Moerman, D. G. and Williams, B. D.** (2002). *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* **12**, 787-97.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Eloffson, M., Sin, N. and Crews, C. M.** (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10403-8.
- Michaud, J. L., Lemieux, L. I., Dube, M., Vanderhyden, B. C., Robertson, S. J. and Kennedy, C. R.** (2003). Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1200-11.
- Mishima, W., Suzuki, A., Yamaji, S., Yoshimi, R., Ueda, A., Kaneko, T., Tanaka, J., Miwa, Y., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y.** (2004). The first CH domain of affixin activates Cdc42 and Rac1 through alphaPIX, a Cdc42/Rac1-specific guanine nucleotide exchanging factor. *Genes Cells* **9**, 193-204.
- Mongroo, P. S., Johnstone, C. N., Naruszewicz, I., Leung-Hagesteijn, C., Sung, R. K., Carnio, L., Rustgi, A. K. and Hannigan, G. E.** (2004). Beta-parvin inhibits

integrin-linked kinase signaling and is downregulated in breast cancer. *Oncogene* **23**, 8959-70.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.

Mundel, P., Gilbert, P. and Kriz, W. (1991). Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 KD protein. *J Histochem Cytochem* **39**, 1047-56.

Mundel, P., Heid, H. W., Mundel, T. M., Kruger, M., Reiser, J. and Kriz, W. (1997a). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* **139**, 193-204.

Mundel, P. and Kriz, W. (1996). Cell culture of podocytes. *Exp Nephrol* **4**, 263-6.

Mundel, P., Reiser, J., Zuniga Mejia Borja, A., Pavenstadt, H., Davidson, G. R., Kriz, W. and Zeller, R. (1997b). Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* **236**, 248-58.

Mundel, P. and Shankland, S. J. (2002). Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* **13**, 3005-15.

Muranyi, A., MacDonald, J. A., Deng, J. T., Wilson, D. P., Haystead, T. A., Walsh, M. P., Erdodi, F., Kiss, E., Wu, Y. and Hartshorne, D. J. (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J* **366**, 211-6.

Nagata, M., Yamaguchi, Y. and Ito, K. (1993). Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys. *Anat Embryol (Berl)* **187**, 275-9.

Nagata, M., Yamaguchi, Y., Komatsu, Y. and Ito, K. (1995). Mitosis and the presence of binucleate cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys. *Nephron* **70**, 68-71.

Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* **276**, 23499-505.

Novak, A. and Dedhar, S. (1999). Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci* **56**, 523-37.

Novak, A., Hsu, S. C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelley, C., Grosschedl, R. and Dedhar, S. (1998). Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4374-9.

Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L. and Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* **246**, 174-81.

Oh, J., Reiser, J. and Mundel, P. (2004). Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* **19**, 130-7.

Ohashi, T., Uchida, K., Uchida, S., Sasaki, S. and Nihei, H. (2003). Intracellular mislocalization of mutant podocin and correction by chemical chaperones. *Histochem Cell Biol* **119**, 257-64.

- Oloumi, A., McPhee, T. and Dedhar, S.** (2004). Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta* **1691**, 1-15.
- Otey, C. A. and Carpen, O.** (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 104-11.
- Otey, C. A., Vasquez, G. B., Burridge, K. and Erickson, B. W.** (1993). Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **268**, 21193-7.
- Patrie, K. M., Drescher, A. J., Welihinda, A., Mundel, P. and Margolis, B.** (2002). Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. *J Biol Chem* **277**, 30183-90.
- Pavenstadt, H.** (1998). The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes. *Exp Nephrol* **6**, 98-103.
- Pavenstadt, H., Kriz, W. and Kretzler, M.** (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* **83**, 253-307.
- Petermann, A. T., Pippin, J., Hiromura, K., Monkawa, T., Durvasula, R., Couser, W. G., Kopp, J. and Shankland, S. J.** (2003). Mitotic cell cycle proteins increase in podocytes despite lack of proliferation. *Kidney Int* **63**, 113-22.
- Pickart, C. M. and Cohen, R. E.** (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 177-87.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. and Blake, D. J.** (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* **19**, 469-79.
- Price, V. R., Reed, C. A., Lieberthal, W. and Schwartz, J. H.** (2002). ATP depletion of tubular cells causes dissociation of the zonula adherens and nuclear translocation of beta-catenin and LEF-1. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1152-61.
- Putaala, H., Soininen, R., Kilpelainen, P., Wartiovaara, J. and Tryggvason, K.** (2001). The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* **10**, 1-8.
- Quelo, I., Gauthier, C., Hannigan, G. E., Dedhar, S. and St-Arnaud, R.** (2004). Integrin-linked kinase regulates the nuclear entry of the c-Jun coactivator alpha-NAC and its coactivation potency. *J Biol Chem* **279**, 43893-9.
- Raats, C. J., van den Born, J., Bakker, M. A., Oppers-Walgreen, B., Pisa, B. J., Dijkman, H. B., Assmann, K. J. and Berden, J. H.** (2000). Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* **156**, 1749-65.
- Radeva, G., Petrocelli, T., Behrend, E., Leung-Hagesteijn, C., Filmus, J., Slingerland, J. and Dedhar, S.** (1997a). Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem* **272**, 13937-44.
- Radeva, G., Petrocelli, T., Behrend, E., Leung-Hagesteijn, C., Filmus, J., Slingerland, J. and Dedhar, S.** (1997b). Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem* **272**, 13937-44.
- Radice, G. L., Ferreira-Cornwell, M. C., Robinson, S. D., Rayburn, H., Chodosh, L. A., Takeichi, M. and Hynes, R. O.** (1997). Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* **139**, 1025-32.

- Regele, H. M., Filipovic, E., Langer, B., Poczewski, H., Kraxberger, I., Bittner, R. E. and Kerjaschki, D.** (2000). Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* **11**, 403-12.
- Regoli, M. and Bendayan, M.** (1997). Alterations in the expression of the alpha 3 beta 1 integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia* **40**, 15-22.
- Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M. and Mundel, P.** (2000). The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* **11**, 1-8.
- Remuzzi, G., Zoja, C. and Bertani, T.** (1993). Glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2**, 465-74.
- Rennke, H. G.** (1994). How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int Suppl* **45**, S58-63.
- Roselli, S., Heidet, L., Sich, M., Henger, A., Kretzler, M., Gubler, M. C. and Antignac, C.** (2004). Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol* **24**, 550-60.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-6.
- Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P. D. and Fassler, R.** (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* **17**, 926-40.
- Saleem, M. A., O'Hare, M. J., Reiser, J., Coward, R. J., Inward, C. D., Farren, T., Xing, C. Y., Ni, L., Mathieson, P. W. and Mundel, P.** (2002). A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* **13**, 630-8.
- Schmeichel, K. L. and Beckerle, M. C.** (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* **79**, 211-9.
- Schnabel, E., Anderson, J. M. and Farquhar, M. G.** (1990). The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* **111**, 1255-63.
- Schnabel, E., Dekan, G., Miettinen, A. and Farquhar, M. G.** (1989). Biogenesis of podocalyxin--the major glomerular sialoglycoprotein--in the newborn rat kidney. *Eur J Cell Biol* **48**, 313-26.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W.** (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**, 6419.
- Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M. A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A. S., Holzman, L. B. and Mundel, P.** (2001). Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* **108**, 1621-9.
- Sellin, J. H., Umar, S., Xiao, J. and Morris, A. P.** (2001). Increased beta-catenin expression and nuclear translocation accompany cellular hyperproliferation in vivo. *Cancer Res* **61**, 2899-906.

- Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Nielsen, J., Colman, D. R. and Hendrickson, W. A.** (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-37.
- Shih, N. Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M. L., Kanagawa, O., Miner, J. H. and Shaw, A. S.** (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* **286**, 312-5.
- Smoyer, W. E. and Mundel, P.** (1998). Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med* **76**, 172-83.
- Smoyer, W. E., Mundel, P., Gupta, A. and Welsh, M. J.** (1997). Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol* **273**, F150-7.
- Smoyer, W. E. and Ransom, R. F.** (2002). Hsp27 regulates podocyte cytoskeletal changes in an in vitro model of podocyte process retraction. *Faseb J* **16**, 315-26.
- Somlo, S. and Mundel, P.** (2000). Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nat Genet* **24**, 333-5.
- Sprecher, E., Bergman, R., Richard, G., Lurie, R., Shalev, S., Petronius, D., Shalata, A., Anbinder, Y., Leibu, R., Perlman, I. et al.** (2001). Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin. *Nat Genet* **29**, 134-6.
- Stevens, A., Lowe, J. and Tiedemann, K.** (1997). Histologie.
- Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A. G. and Dedhar, S.** (2001). Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin- Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 133-40.
- Teixeira, V. d. P., Blattner, S. M., Li, M., Anders, H. J., Cohen, C. D., Edenhofer, I., Calvaresi, N., Merkle, M., Rastaldi, M. P. and Kretzler, M.** (2005). Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage. *Kidney Int* **67**, 514-23.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C. M.** (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1989). Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* **27**, 495-501.
- Tryggvason, K. and Pettersson, E.** (2003). Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J Intern Med* **254**, 216-24.
- Tu, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Hua, Y. and Wu, C.** (2001). A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. *J Cell Biol* **153**, 585-98.
- Vallenius, T., Luukko, K. and Makela, T. P.** (2000). CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4. *J Biol Chem* **275**, 11100-5.
- Vallenius, T. and Makela, T. P.** (2002). Clk1: a novel kinase targeted to actin stress fibers by the CLP-36 PDZ-LIM protein. *J Cell Sci* **115**, 2067-73.
- Velyvis, A., Yang, Y., Wu, C. and Qin, J.** (2001). Solution structure of the focal adhesion adaptor PINCH LIM1 domain and characterization of its interaction with the integrin-linked kinase ankyrin repeat domain. *J Biol Chem* **276**, 4932-9.

- Vielhauer, V., Berning, E., Eis, V., Kretzler, M., Segerer, S., Strutz, F., Horuk, R., Grone, H. J., Schlondorff, D. and Anders, H. J.** (2004). CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int* **66**, 2264-78.
- Vogelmann, S. U., Nelson, W. J., Myers, B. D. and Lemley, K. V.** (2003). Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F40-8.
- von Lutichau, I., Djafarzadeh, R., Henger, A., Cohen, C. D., Mojaat, A., Jochum, M., Ries, C., Nelson, P. J. and Kretzler, M.** (2002). Identification of a signal transduction pathway that regulates MMP-9 mRNA expression in glomerular injury. *Biol Chem* **383**, 1271-5.
- Wang, H., Harrison-Shostak, D. C., Lemasters, J. J. and Herman, B.** (1995). Cloning of a rat cDNA encoding a novel LIM domain protein with high homology to rat RIL. *Gene* **165**, 267-71.
- Wang, Y., Wang, Y. P., Tay, Y. C. and Harris, D. C.** (2000). Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* **58**, 1797-804.
- Wartiovaara, J., Ofverstedt, L. G., Khoshnoodi, J., Zhang, J., Makela, E., Sandin, S., Ruotsalainen, V., Cheng, R. H., Jalanko, H., Skoglund, U. et al.** (2004). Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* **114**, 1475-83.
- Wehner, R. and Gehring, W.** (1990). Zoologie: Thieme.
- Weissman, A. M.** (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169-78.
- Whiteside, C. I., Cameron, R., Munk, S. and Levy, J.** (1993). Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* **142**, 1641-53.
- Wolf, D. H.** (2004). From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1601-14.
- Wu, C.** (2004). The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 55-62.
- Wu, C., Keightley, S. Y., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Coppolino, M., Goicoechea, S., McDonald, J. A. and Dedhar, S.** (1998). Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J Biol Chem* **273**, 528-36.
- Yamaji, S., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Koide, Y., Yoshida, M., Kanamori, H., Mohri, H., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y.** (2001). A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol* **153**, 1251-64.
- Yao, J., Le, T. C., Kos, C. H., Henderson, J. M., Allen, P. G., Denker, B. M. and Pollak, M. R.** (2004). Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biol* **2**, e167.

Yoganathan, T. N., Costello, P., Chen, X., Jabali, M., Yan, J., Leung, D., Zhang, Z., Yee, A., Dedhar, S. and Sanghera, J. (2000). Integrin-linked kinase (ILK): a "hot" therapeutic target. *Biochem Pharmacol* **60**, 1115-9.

Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A. and Tsukita, S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci* **108 (Pt 1)**, 127-42.

Yoshida, T., Pan, Y., Hanada, H., Iwata, Y. and Shigekawa, M. (1998). Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem* **273**, 1583-90.

Zervas, C. G., Gregory, S. L. and Brown, N. H. (2001). Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol* **152**, 1007-18.

Zhang, Y., Chen, K., Guo, L. and Wu, C. (2002a). Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem* **277**, 38328-38.

Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., Velyvis, A., Yang, Y., Qin, J. and Wu, C. (2002b). Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. *J Cell Sci* **115**, 4777-86.

Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y. and Wu, C. (2004). Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, alpha-parvins and beta-parvins, in regulation of cell morphology and survival. *J Biol Chem* **279**, 41695-705.

10 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Yang Y, Guo L, Blattner SM, Mundel P, Kretzler M and Wu C.

The formation and phosphorylation of the PINCH1-ILK- α -parvin complex are important for regulation of renal glomerular podocyte adhesion, architecture and survival.
J Am Soc Nephrol. 2005 Jul;16(7)

Teixeira VP*, Blattner SM*, Li M, Anders HJ, Cohen CD, Edenhofer I, Calvaresi N, Merkle M, Rastaldi MP, Kretzler M.

Functional consequences of Integrin-linked kinase activation in podocyte damage.
Kidney Int 2005 Feb;67(2):514-23 * geteilte Erstautorenschaft

Weiter Veröffentlichungen:

Blattner SM, Cohen CD, Rastaldi MP, Li M, Corbelli A, El-Aouni C, Saleem MA, Segerer S, Bayer I, Edenhofer I, Schlöndorff D, Kretzler M

Regulation of Alpha-Actinin-4 and its interactor CLP-36 in podocytes in acquired glomerular diseases

Manuskript in Vorbereitung

Blattner SM, Kretzler M.

Integrin linked kinase in renal disease: Linking cell-matrix signaling to cytoskeletal regulation in podocytes and tubular epithelium.

Curr Opin Nephrol Hypertens. 2005 Jul;14(4):404-10, Review

Cohen CD, Doran PP, Blattner SM, Merkle M, Wang GQ, Schmid H, Mathieson PW, Saleem MA, Henger A, Rastaldi MP, Kretzler M

SLM-2, indentified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of VEGF

J Am Soc Nephrol. 2005 Jul;16(7)

Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Li M, Pesaresi M, Poczewski H, Langer B, Kerjaschki D, Henger A, Blattner SM, Kretzler M, Wanke R, D'Amico G.

Glomerular podocytes possess the synaptic vesicle molecule Rab3A and its specific effector rabphilin-3a.

Am J Pathol. 2003 Sep;163(3):889-99.

Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Grone HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D.

A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation.

J Clin Invest. 2002 Jan;109(2):251-9.

Kretzler M, Teixeira VP, Berger T, Blattner SM, Unschuld PG, Cohen CD, Schlöndorff D.

Altering glomerular epithelial function in vitro using transient and stable transfection.

J Nephrol. 2001 May-Jun;14(3):211-9.

11 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Simone Monika Blattner
Geburtsdatum / -ort: 07.06.1973 in Ludwigshafen am Rhein
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSSBILDUNG

1979 – 1983 Grundschule in Ludwigshafen Oggersheim
1983 – 1992 IGS Ernst Bloch in Ludwigshafen Oggersheim

STUDIUM & BERUFSPRAXIS

10/1992 – 02/1998 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
07/1995 Vordiplom
03/1998 – 06/1999 Diplomarbeit mit dem Thema „Charakterisierung eines Translokations-bruchpunktes auf Chromosom 12 der Wilmstumorzelllinie WT 128“
Betreut durch Prof. Dr. A. Winterpacht; Prof. Dr. B. Zabel
06/1999 Abschluss als Diplom-Biologin
07/1997 – 09/1999 Freie Mitarbeiterin des Zweiten Deutschen Fernsehens - ZDF - in Mainz als Technische Betriebsassistentin (TBA)
10/1999 – 02/2000 Wissenschaftliche Angestellte im Forschungslabor der GSF (Hämatologikum), Klinische Kooperationsgruppe Tumorthherapie durch Hyperthermie, München - Prof. Dr. R. D. Issels
03/2000 – 10/2005 Wissenschaftliche Angestellte im Forschungslabor der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München - PD Dr. M. Kretzler
Ab 11/2005 Research Fellow an der University of Michigan, Ann Arbor

PROMOTION

11/2000– 12/2004 Experimentelle Arbeiten unter Betreuung von PD Dr. M. Kretzler, Medizinische Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Thema: „Analyse der Podozytenfunktion bei glomerulärem Filtrationsversagen“

12 Danksagung

Herrn PD Dr. Matthias Kretzler danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine Begeisterung für die „Podozytologie“ und für die Betreuung meiner Dissertation. Vielen Dank für die Unterstützung und die Möglichkeiten, über den Rand der *Bench* hinaus zu blicken.

Prof. Dr. Detlef Schlöndorff danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut, um die Experimente der vorliegenden Arbeit in den Labors der Medizinischen Poliklinik durchführen zu können.

Prof. Dr. Harry MacWilliams für die Bereitschaft, diese Dissertation vor der Fakultät für Biologie der LMU München zu vertreten.

Dr. Bruno Luckow für seinen Einsatz, allen fachlichen, technischen und organisatorischen Problemen Abhilfe zu schaffen. Mein Dank gilt auch PD Dr. Pete J. Nelson, der für meine Fragen immer ein offenes Ohr hatte.

Dr. Maria Pia Rastaldi from Milan (Italy) for the impassionate discussions about the project and the marvellous collaboration.

Dr. Anna Henger für die Aufmunterung in den schwierigeren Phasen während dieser Arbeit und ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion. Ilka Edenhofer für all die tatkräftige Unterstützung bei der Podozyten-Zellkultur und für die Assistenz während der „heißen Phasen“ der Arbeit. Dr. Anissa Boucherot für die stets lustigen Geschichten aus ihrem Leben. Großer Dank gebührt auch Ingrid Bayer, Sandra Irrgang und Karin Frach. Ebenso Chiraz El-Aouni für ihre Unterstützung bei dem „großen Finale“ der jeweiligen Tierexperimente. Dr. Thorsten Berger für die Einarbeitung und die computertechnischen Diskussionen. Dr. Holger Schmid für den wochenlangen Kampf mit MC-5. Dr. Clemens Cohen für die spannende Zusammenarbeit bei den verschiedenen Projekten und seinem Engagement mit der ERCB.

Allen Mitgliedern der Klinischen Biochemie. Besonders Dr. Barbara Köppler, Dr. Martin Schneider, Anke Mojaat, Yvonne Linde, Tamara Rupp und Dr. Michael Frink.

Vielen Dank auch an meine GRK 438-Mädels Tina, Anja, Melanie, Claudia und Katrin. Ohne Euch und die vielen Radler wäre die Zeit nur halb so schön gewesen!

Liebe Mama! Lieber Papa! Ich möchte mich bei Euch für alles, was ihr mir in meinem Leben so selbstverständlich ermöglicht habt, bedanken.

Meinen Dank auch an meine Freunde, die mich trotz der Entfernung nicht vergessen haben. Danken möchte ich Sandra Gordon für die ihre aufbauenden Worte und ihre Diskussionsbereitschaft.

Barbara Kostolnik danke ich für die gemeinsamen Stunden mit gutem Wein und fantastischem Essen, für ihre Freundschaft, Wärme und dafür, dass ich mich -fast- immer auf sie verlassen konnte. ;-) Und ja, Flügel können nachwachsen!

Sarah Niegl für die Zuversicht und das Aufleben. *Es ist, was es ist*. Ich danke Dir.