

Die Rolle der atypischen Protein Kinase C Isoformen PKC λ/ι und PKC ζ in Podozyten

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Kirstin Worthmann

geboren am 17.10.1979, in Soltau

2011

Referent: Prof. Dr. Walter Müller
Institut für Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Mario Schiffer
Institut für Nephrologie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 11.02.2011

Zusammenfassung

Die atypischen Proteinkinase C (aPKC) Isoformen $\lambda/1$ und ζ haben aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten viele gemeinsame Funktionen in der Zelle. Beide Isoformen sind in Podozyten exprimiert, aber ihre zelluläre Funktion bleibt unklar. Während der komplette PKC $\lambda/1$ Knockout eine embryonale Letalität zur Folge hat, entwickelt die PKC ζ Knockout Maus lediglich in späteren Stadien einen Phänotyp in den sekundären lymphatischen Organen. Um die zelluläre Rolle beider Isoformen zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Rolle der aPKC Isoformen in Podozyten genauer analysiert.

Um die embryonale Letalität zu umgehen und die Rolle von aPKC $\lambda/1$ in Podozyten untersuchen zu können, generierten wir mit Hilfe des Cre-loxP Systems Podozyten-spezifische aPKC $\lambda/1$ Knockout Mäuse. Diese Mäuse entwickelten im Alter von 3 Wochen Veränderungen in der Fußfortsatzarchitektur und in der Expression verschiedener Schlitzmembranmoleküle. Sie entwickelten eine Proteinurie und Glomerulosklerose und starben im Alter von 4-5 Wochen an Nierenversagen. Um die Mechanismen zellbiologisch zu analysieren, generierten wir stabile Podozytenzelllinien, die defizient für aPKC $\lambda/1$ oder ζ waren. Dazu haben wir die Mäuse mit Immorto-transgenen Tieren gekreuzt und monoklonale Podozytenzelllinien aus den Glomeruli generiert. Auch in Kultur zeigten die PKC $\lambda/1$ Knockout Podozyten einen Phänotyp mit verminderter Synaptopodin und WT-1 Expression, sowie einer geringeren Zellausdehnung und Expression der Adhäsionsmoleküle Vinculin und Integrin $\beta 1$. In Phalloidin-färbungen konnten wir Veränderungen des Aktin Zytoskeletts nachweisen, die mit zellulären Veränderungen nach Puromycin aminonukleosid (PAN) Behandlung vergleichbar sind. PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen zeigten eine erhöhte Aktivität der kleinen GTPase Rac1. Die PKC ζ Knockout Podozyten zeigten keine auffälligen Veränderungen des Aktin Zytoskeletts, jedoch in vielen anderen Experimenten ähnliche, aber mildere Veränderungen. Um einen Überblick über die molekularen Prozesse zu erhalten, die den Phänotyp in Kultur beeinflussen, haben wir vergleichende Mikroarray-Analysen an aPKC Knockout und PAN-stimulierten Zellen durchgeführt. Dadurch haben wir einige transkriptionelle Signaturen identifiziert, die eine mögliche Erklärung für den Phänotyp der PKC $\lambda/1$ Knockout und PAN-stimulierten Zellen geben. Wir identifizierten die Def-6 mRNA in den PKC $\lambda/1$ Knockout und PAN-stimulierten Zellen als ein deutlich überrepräsentiertes Genprodukt. Def-6 ist ein Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (GEF), der Rac1 aktiviert und dessen Expression den Aktin zytoskelettalen Phänotyp erklären könnte. Wir konnten zeigen, dass Def-6 in den Glomeruli in Podozyten lokalisiert ist und dass eine Überexpression von konstitutiv

aktivem Def-6 in kultivierten Podozyten zu einer vermehrten Bildung von Lamellipodien und Filopodien führt und den Phänotyp von PKC λ 1 Knockout Zellen imitiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PKC λ 1 im Gegensatz zu PKC ζ für die Aufrechterhaltung der podozytären Homöostase essentiell ist und auch in kultivierten Podozyten eine wichtige Rolle für die Zellarchitektur spielt.

Schlagwörter: Podozyten, aPKC, Aktin Zytoskelett.

Abstract

The atypical protein kinase C (aPKC) isoforms $\lambda/1$ and ζ share several cellular functions due to their structural similarities. Both isoforms are expressed in podocytes but their distinct functions remain elusive. The total body knockout (KO) of PKC $\lambda/1$ leads to embryonic lethality, whereas the PKC ζ knockout mouse develops in later states only changes in the lymphatic organs. In this proposal we analysed the role of the aPKC isoforms in podocytes in more detail.

To avoid the embryonic lethality and to analyse the role of PKC $\lambda/1$ in podocytes, we generated podocyte specific aPKC $\lambda/1$ knockout mice using the Cre-loxP system. At the age of three weeks the knockout mice developed changes in their foot process architecture and in the expression of different slit diaphragm molecules. Furthermore, they developed proteinuria and glomerulosclerosis and died at the age of 4-5 weeks from renal failure. To analyse the mechanisms on a cellular level, we generated stable podocyte cell lines deficient for PKC $\lambda/1$ or PKC ζ . We crossed the mice to immorto-transgenic animals and cultured monoclonal podocyte cell lines from the glomeruli. The aPKC $\lambda/1$ knockout podocytes in culture developed a phenotype with a decrease in synaptopodin and WT-1 expression, a reduced spreading and a lower expression of the adhesion molecules vinculin and integrin $\beta 1$. Phalloidin stainings revealed obvious changes of the actin cytoskeleton, similar to the changes seen after treatment with puromycin aminonucleoside (PAN). Moreover, the aPKC $\lambda/1$ knockout podocytes show an increased expression of the activated small GTPase Rac1. The PKC ζ knockout podocytes did not display this strong actin cytoskeleton phenotype, but in most of the experiments developed similar but milder changes.

To reveal molecular processes influencing the cytoskeletal phenotype in cell culture, we analysed the transcriptome of aPKC knockout and PAN treated cells using a microarray. We identified some transcripts that could explain the phenotype of the PKC $\lambda/1$ knockout and PAN treated cells. We identified the Def-6 mRNA as significantly overrepresented in the PKC $\lambda/1$ knockout and PAN treated cells. Def-6 is a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Rac1. Def-6 causes membrane ruffling in other cells and gives us a possible explanation for the observed phenotype. We found that Def-6 is expressed in podocytes *in vivo* and that an overexpression of constitutive active Def-6 leads to increased lamellipodia and filopodia formation in cultured podocytes, thereby imitating the PKC $\lambda/1$ knockout phenotype.

In summary, we could show that PKC $\lambda/1$, but not PKC ζ , is essential for podocyte homeostasis and plays a crucial role for cell architecture and cytoskeletal rearrangements in podocytes.

Keywords: podocytes, aPKC, actin cytoskeleton.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	5
Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis.....	15
1 Einleitung	16
1.1 Aufbau und Funktion der Niere	16
1.2 Der glomeruläre Filter	17
1.3 Proteine der Schlitzmembran.....	19
1.4 Das podozytäre Zytoskelett	21
1.5 Polarität in Podozyten.....	25
1.6 Protein Kinase C Isoformen.....	27
1.6.1 Struktur der PKC Isoformen	27
1.6.2 PKC Aktivierung und Lokalisation in Zellen.....	28
1.6.3 Atypische PKCs.....	29
1.7 Def-6 und Swap-70.....	31
1.8 Puromycin aminonukleosid (PAN) Nephrose	33
1.9 Zielsetzung.....	34
2 Material	35
2.1 Chemikalien.....	35
2.2 Oligonukleotide (Primer).....	35
2.3 Antikörper.....	35
2.4 Plasmide.....	38
2.5 Zellen	39
2.5.1 Murine Podozyten.....	39
2.5.2 HEK293 Zellen	39
3 Methoden.....	40
3.1 Tierexperimentelle Arbeiten	40
3.1.1 Mäusestämme	40
3.1.2 Haltung	41

3.1.3 Genotypisierung aus Schwanzspitzen-Biopsien	41
3.1.4 Organentnahme	41
3.1.5 Anfertigung von Gefrier- und Paraffingewebeschnitten	42
3.1.6 Uringewinnung	43
3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	43
3.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration	43
3.2.2 Bestimmung der Bakteriendichte	44
3.2.3 Plasmid-Präparation	44
3.2.4 Agarosegelelektrophorese	44
3.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen	45
3.2.6 Transformation von kompetenten Bakterien-Zellen	45
3.2.7 RNA Isolation aus Gewebe oder Zellen	45
3.2.8 Reverse Transkription (cDNA Synthese)	46
3.2.9 Real-time-PCR	46
3.2.10 Konventionelle PCR	47
3.3 Proteinbiochemische Methoden	47
3.3.1 Bestimmung der Protein-Konzentration	47
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.3.3 Westernblot	49
3.3.4 Coomassiefärbung	50
3.3.5 Co-Immunpräzipitation	50
3.4 Zellkultur	51
3.4.1 Kultivierung muriner Podozyten	51
3.4.2 Generierung monoklonaler Zelllinien aus murinen Glomeruli	52
3.4.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	53
3.4.4 Zellernte	54
3.4.5 Transiente Transfektion	54
3.4.6 Gewinnung genomischer DNA aus Zellen	55
3.5 Färbungen	55
3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierschnitten	55
3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung auf Zellen	55
3.5.3 Phalloidin-Färbung	56
3.5.4 PAS-Färbung	56
3.6 Rho/Rac/Cdc42 Aktivitäts-Assay	57
3.7 Mikroarray	57
3.8 Erstellung der <i>Heatmaps</i>	58
3.9 Elektronenmikroskopie	59
3.10 Statistische Auswertungen	59

4 Ergebnisse	60
4.1 Generierung und Untersuchung der Podozyten-spezifischen aPKC λ 1 Knockout Maus60	
4.1.1 Die Podozyten-spezifische Deletion von aPKC λ 1 bewirkt einen schweren glomerulären Phänotyp	60
4.1.2 Der Verlust von aPKC λ 1 verursacht Störungen in der regulären Fußfortsatzarchitektur	64
4.1.3 Veränderte Expression von Schlitzmembranmolekülen in den Podozyten-spezifischen aPKC λ 1 Knockout Mäusen	65
4.2 Untersuchungen an PKC λ 1 und PKC ζ monoklonalen Podozytenzelllinien	68
4.2.1 Herstellung und Charakterisierung der monoklonalen Podozytenzelllinien ...	68
4.2.2 Lokalisation von PKC λ 1 und PKC ζ in Podozyten	72
4.2.3 Morphologische Unterschiede zwischen den Podozytenzelllinien.....	73
4.2.4 Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle.....	74
4.2.5 Ausdehnung der PKC λ 1 und PKC ζ defizienten Zellen.....	77
4.2.6 Veränderungen des Aktin Zytoskeletts bei PKC λ 1 Defizienz	79
4.2.7 Expression der kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42.....	81
4.3 Transkriptom-Analyse der Podozyten mittels Mikroarray	82
4.4 Expression von Def-6 und Swap-70	91
4.4.1 Bestätigung der Mikroarray-Daten mittels rt-PCR.....	91
4.4.2 PAN-Versuche in Podozyten	92
4.4.3 Def-6 Expression <i>in vivo</i>	94
4.4.4 Def-6 und Swap-70 Expression in Podozyten	96
4.4.5 Bindung von PKC λ 1 und PKC ζ an Def-6 und Swap-70.....	97
5 Diskussion	100
5.1 Phänotyp der aPKC Knockout Mäuse	100
5.2 PKC λ 1-Defizienz in Podozyten führt zu Dedifferenzierung und zu Veränderungen des Aktin Zytoskeletts	103
5.3 Mikroarray Analysen der Podozyten	105
5.4 Def-6 und Swap-70 in Podozyten.....	109
5.5 Schlussfolgerung.....	110
6 Literatur	113
7 Lebenslauf	125
8 Publikationen.....	126
9 Danksagung	128
10 Erklärung zur Dissertation	129

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout
+/+	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AKT	Proteinkinase B
aPKC	Atypische PKC
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp2/3	<i>Actin-related protein 2/3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinonsäure, engl. <i>bichinocic acid</i>
bdH ₂ O	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
Ca.	circa
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
cDNA	Komplementäre DNA
cPKC	<i>Conventional PKC</i>
CRIB	Cdc42/Rac interaktive Bindungsregion
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4-,6-Diamidino-2-Phenylindol
Def-6	<i>Differentially expressed in FDCP-6</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHL	DBL Homologie-like Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Embryonische Fibroblasten
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
Engl.	englisch
ERK	<i>Extracellular-regulated kinase</i>
et al.	und andere
F	Phenylalanin
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fötale Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FL	<i>Full-length</i>
FP	Fußfortsatz, engl. <i>foot process</i>
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
G	Gouche
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran

GBP	Guanylat-bindendes Protein
GDP	Guanin-Diphosphat
GEC	Glomeruläre Endothelzellen, engl. <i>Glomerular endothelial cell</i>
GEF	Guanin Nucleotid Austauschfaktor, engl. <i>Guanin nucleotide exchange factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanin-Triphosphat
GTPase	Guanin-Triphosphatase
h	Stunden
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HPRT-1	Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase-1
IBP	<i>IRF-4-binding protein</i>
IF	Immunfluoreszenz
IL-1	Interleukin-1
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositoltriphosphat
kDa	Kilodalton
kn	<i>Knock-down</i>
KO	Knock-out
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LN	Lupus Nephritis
loxP	Locus of X-over of P1
m	Murin
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCD	<i>Minimal change disease</i>
MEK5	<i>Mitogen/extracellular-signal-regulated kinase kinase 5</i>
mg	Milligramm
MGN	Membranöse Glomerulopathie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-	Amino-
n.s.	Nicht signifikant
NEO	Neomycin
NES	Kernexportsignal, engl. <i>nuclear export signal</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
ng	Nanogramm
NGF	Nervenwachstumsfaktor, engl. <i>nerve growth factor</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal, engl. <i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
nPKC	<i>Novel PKC</i>
OD	Optische Dichte
P	Passage
P/S	Penicillin/Streptomycin
PA	Phosphatidsäure

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	<i>p21 activated kinase 1</i>
PAN	Puromycin aminonukleosid Nephrose
PAR-6	<i>Partitioning defective-6</i>
PAS	Periodsäure-Schiff
PB1	Phox und Bem1
PBD	p21 Bindungsdomäne
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin Homologie
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phospho-Inositol-3 Kinase
PIP3	Phospho-Inositoltriphosphat
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
pmol	pikomol
PS	Phosphatidylserin
PS	Protaminsulfat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBD	Rho Bindungsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	<i>Real time-PCR</i>
s	Sekunden
SD	Schlitzmembran, engl. <i>slit diaphragm</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH3	<i>Src homology-3</i>
siRNA	<i>Silencing RNA</i>
SLAT	<i>Swap70-like adaptor of T-cells</i>
SV40	Simian Virus 40
Swap-70	<i>Switch-associated protein 70</i>
τ	Protein <i>tau</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAg	Large tumor antigen
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-beta 1</i>
Thr	Threonin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit

U	Umdrehungen
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
Ü/N	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	<i>Versus</i> (gegen)
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
WT-1	Wilms Tumor-1
x	Fach
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
Zip/p62	<i>Zeta-interacting protein/human 62-kDa Lck-binding protein</i>
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>
α	Anti
γ -INF	γ -Interferon

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau von Niere und Nephron.....	16
Abbildung 2 Aufbau eines Glomerulus.....	18
Abbildung 3 Rasterelektronenmikroskopie von glomerulären Kapillaren der Ratte.....	20
Abbildung 4 Das Zytoskelett von Podozyten Fußfortsätzen.....	21
Abbildung 5 Aktin Zytoskelett in normalen und „effaced“ Podozyten.	23
Abbildung 6 Zellpolarität und der Par3-aPKC-Par6 Komplex.	26
Abbildung 7 Domänen-Struktur der Protein Kinase C (PKC) Isoformen.	28
Abbildung 8 Domänenstruktur von Def-6 und Swap-70.	32
Abbildung 9 Generierung monoklonaler Zelllinien aus Immorto-transgenen Mäusen.	53
Abbildung 10 Podozyten-spezifischer Verlust von aPKC λ /1.....	61
Abbildung 11 Phänotyp der Podozyten-spezifischen aPKC λ /1 Knockout Mäuse.	62
Abbildung 12 Histologie der Podozyten-spezifischen aPKC λ /1 Knockout Maus.....	63
Abbildung 13 Elektronenmikroskopische Analyse von aPKC λ /1 Knockout Glomeruli.....	64
Abbildung 14 Immunfluoreszenz Aufnahmen von Wildtyp und PKC λ /1 Knockout Glomeruli.	66
Abbildung 15 Expression von WT-1, Nephrin und CD2AP in Wildtyp und aPKC λ /1 Knockout Nieren.....	67
Abbildung 16 PCR der isolierten monoklonalen Zelllinien.....	68
Abbildung 17 Western Blot Analyse der monoklonalen Zelllinien.....	69
Abbildung 18 Expression Podozyten-spezifischer Proteine in den PKC λ /1 Zelllinien.....	70
Abbildung 19 Expression Podozyten-spezifischer Proteine in den PKC ζ Zelllinien.	71
Abbildung 20 Real-time PCR der differenzierten PKC λ /1 und PKC ζ Zellen.	72
Abbildung 21 Lokalisation von PKC λ /1 und PKC ζ nach PAN-Stimulation.....	73
Abbildung 22 Morphologie der undifferenzierten und differenzierten PKC λ /1 und PKC ζ Zelllinien.	74
Abbildung 23 Expression von Adhäsionsmolekülen in Immunfluoreszenz und rt-PCR.....	75
Abbildung 24 Expression von Adhäsionsmolekülen im Western Blot.....	76
Abbildung 25 Expression der Adhäsionsmoleküle Vinculin und Integrin β 1 nach PAN Stimulation.	77
Abbildung 26 Ausdehnung der PKC λ /1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen.	78
Abbildung 27 Veränderungen des Aktin Zytoskeletts in PKC λ /1 defizienten Zellen.	80
Abbildung 28 Expression und Aktivität der kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42.....	81
Abbildung 29 mRNA Expression der kleinen GTPasen RhoA und Rac1.	82

Abbildung 30 Gleichsinnig regulierte Gene der verschiedenen Mikroarrays.....	87
Abbildung 31 Gleichsinnig regulierte Gene in den PKC λ /t, PKC ζ und PAN-stimulierten Zellen.....	88
Abbildung 32 Bestätigung der Mikroarray-Daten mittels Real-time PCR der verschiedenen Zelllinien.	92
Abbildung 33 PAN Stimulation in den PKC λ /t Wildtyp und Knockout Podozyten.	93
Abbildung 34 Def-6 und Swap-70 mRNA Expression in Nieren unterschiedlicher Wildtyp und Knockout Mäuse.	94
Abbildung 35 Def-6 Expression in PKC λ /t Wildtyp und Knockout Glomeruli.	95
Abbildung 36 Überexpression von Def-6 und Swap-70 in Podozyten.	97
Abbildung 37 Bindung von PKC λ /t und PKC ζ an Def-6 und Swap-70.	98
Abbildung 38 Modell zur Wirkung von PAN über PKC λ /t auf das Aktin Zytoskelett.	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Primer für rt-PCR.....	35
Tabelle 2	Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen oder Western Blot Analysen.....	36
Tabelle 3	Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen.....	37
Tabelle 4	Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....	38
Tabelle 5	Verwendete Plasmide.....	38
Tabelle 6	PCR-Bedingungen bei Genotypisierungen.....	47
Tabelle 7	Zusammensetzung der unterschiedlich konzentrierten Trenngele.....	48
Tabelle 8	Anzahl über- und unterrepräsentierter Gene in PKC λ_1 KO vs. WT, PKC ζ KO vs. WT und PAN vs. Kontroll- Zellen.....	83
Tabelle 9	Die 30 am stärksten überrepräsentierten Gene aller Arrays.....	84
Tabelle 10	Die 30 am stärksten unterrepräsentierten Gene aller Arrays.....	85
Tabelle 11	Ausschließlich in PKC λ_1 Knockout Zellen und PAN-stimulierten Zellen überrepräsentierte Gene.....	89
Tabelle 12	Ausschließlich in PKC λ_1 Knockout Zellen und PAN-stimulierten Zellen unterrepräsentierte Gene.....	90
Tabelle 13	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der PKC λ_1 und PKC ζ Knockout Podozyten im Vergleich zum PAN Modell.....	110

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

Die Aufgabe der Säugerniere ist neben sekretorischen Funktionen die Regulation des Säure-Base-Haushaltes. In der Niere werden täglich ca. 180 l Primärharn gebildet. Den menschlichen Körper verlassen pro Tag jedoch nur etwa 1,5 l Urin. Die für den Körper noch wertvollen Stoffe und Elektrolyte und ein Großteils des Wassers (99 %) werden wieder in das Blut rückresorbiert. Der konzentrierte Endharn wird schließlich ausgeschieden.

Die Niere lässt sich in zwei Regionen unterteilen, die äußere Nierenrinde (Cortex) und das innere Nierenmark (Medulla) (Abbildung 1A). Beide Regionen enthalten eine Vielzahl Funktionseinheiten (1-2 Millionen), die Nephron. Die Nephron bestehen aus dem Tubulusapparat und einem Gefäßknäuel, dem Glomerulus, der von Ausläufern des Tubulus ummantelt wird (Bowman-Kapsel).

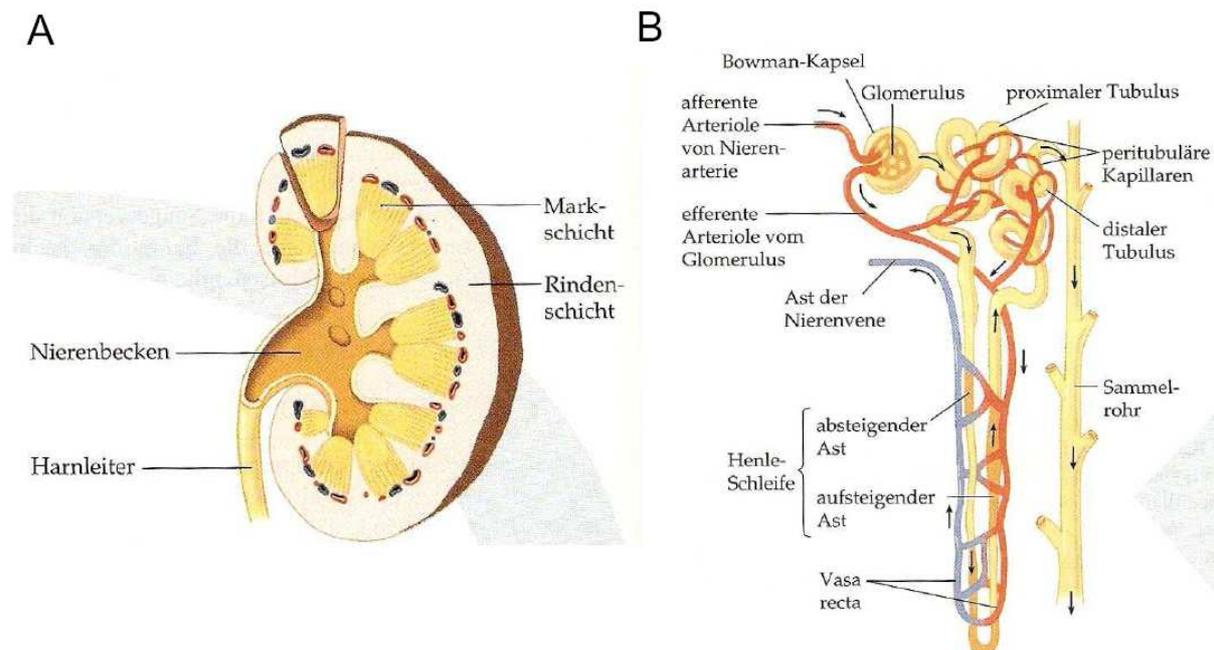


Abbildung 1 Schematischer Aufbau von Niere und Nephron.

(A) Die Niere besteht aus der äußeren Rindenschicht (Cortex) und der inneren Markschiicht (Medulla). Der konzentrierte Urin gelangt in das Nierenbecken und wird über den Harnleiter in die Harnblase geleitet und final ausgeschieden. (B) Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron bestehend aus Glomerulus, proximalem Tubulus, Henle-Schleife und distalem Tubulus (Bilder aus *Campbell, 1998 (1)*).

Durch den Blutdruck werden Wasser, Harnstoff, Salze und andere niedermolekulare Substanzen aus dem Blut in das Lumen der Bowman-Kapsel filtriert, hochmolekulare Proteine und Zellen bleiben im Blut zurück. Der so entstandene Primärharn gelangt aus der

Bowman-Kapsel in den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife und den distalen Tubulus (Abbildung 1B). Jeder dieser Abschnitte enthält spezifische Ionen- und Wasserkanäle, über die der Primärharn konzentriert wird. Jedes Nephron wird über eine afferente Arteriole mit Blut versorgt, die sich in die Glomerulus-Kapillaren auffächert. Beim Verlassen des Glomerulus vereinigen sich die Kapillaren wieder zur efferenten Arteriole. Diese fächert sich anschließend wieder in Kapillaren auf, die das Tubulussystem umgeben. So können Tubuli und Kapillaren Substanzen und Flüssigkeit zwischen Blutplasma und Primärharn über das Interstitium austauschen. Der distale Tubulus mündet in das Sammelrohr, in dem die Filtrate vieler Nephrone zusammenlaufen. Die Sammelrohre entleeren sich schließlich in das Nierenbecken.

1.2 Der glomeruläre Filter

Die Ultrafiltration des Blutplasmas geschieht durch die Kapillarwand der Glomeruli. Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus glomerulären Endothelzellen (GECs), der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten (siehe Abbildung 2) (2). Die Plasmamoleküle werden durch den glomerulären Filter abhängig von ihrer Größe, Form und Ladung filtriert (3;4). Die bisherigen Daten zeigen, dass alle drei Zonen der glomerulären Kapillarwand intakt sein müssen, um eine normale Barrierefunktion zu erzielen, neuere Studien weisen allerdings dem Podozyten eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere zu (5).

Die Funktion der Filtrationsbarriere wird durch viele systemische und renale Erkrankungen beeinflusst, was zu einem Proteinverlust durch den Urin (Proteinurie) und dadurch zu fortschreitenden Nierenerkrankungen führen kann (6). Eine Fehlfunktion des Glomerulus ist eine häufige Ursache für ein Nierenversagen, daher ist es sehr wichtig, die molekulare Biologie des Glomerulus und seiner zellulären Komponenten zu verstehen (6).

Podozyten sind spezialisierte, hoch differenzierte Epithelzellen, die sich außen auf den glomerulären Kapillaren befinden. Podozyten können strukturell in drei Segmente aufgeteilt werden: Zellkörper, Primärfortsätze und Fußfortsätze (engl. *foot processes*, FPs) (7). Die stark verzweigten Fußfortsätze bedecken die gesamte Oberfläche der Kapillarbögen (Abbildung 3A). Zellkörper und Primärfortsätze sind normalerweise nicht in Berührung mit der GBM, sie befinden sich frei im Lumen der Bowman Kapsel und bilden einen „sub-zellulären Raum“ zwischen dem Zellkörper und den Fußfortsätzen. Aus dem Zellkörper formieren sich große Primärfortsätze, die sich aber sofort weiter in viele kleine Fußfortsätze verzweigen (7).

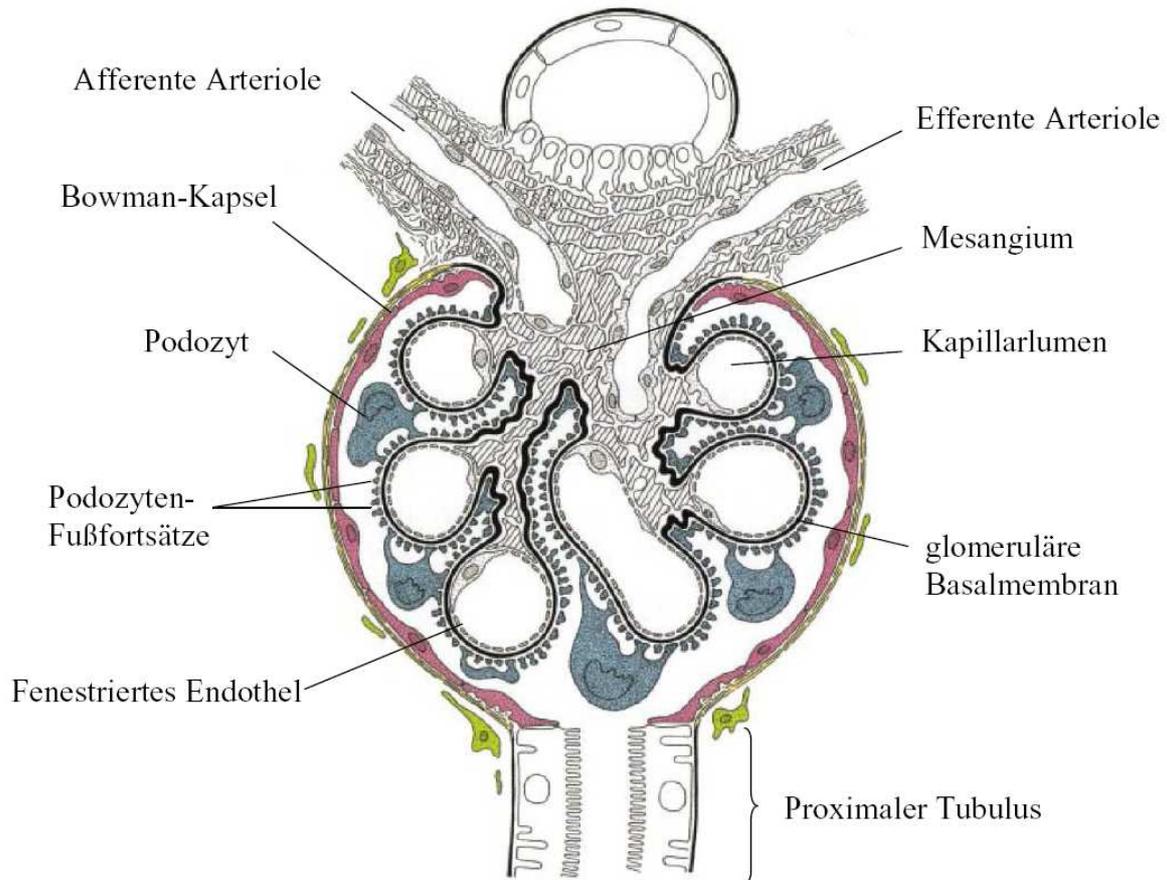


Abbildung 2 Aufbau eines Glomerulus.

Schematische Darstellung eines Glomerulus und seiner Kompartimente (Modifiziert nach Kriz *et al.*, 1998 (8)).

Fußfortsätze benachbarter Podozyten greifen ineinander und bilden zwischen sich 30-40 nm breite Filtrationsschlitze, die von einer extrazellulären Proteinstruktur überbrückt werden, die Schlitzmembran (engl. *slit diaphragm*, SD) genannt wird (9). Die Filtrationsschlitze sind der Ort, an dem ein stetiger Flüssigkeitsstrom durch das viszerale Epithel stattfindet (10). Sie bilden die letzte Barriere für große Proteine. Eine Erkrankung der Podozyten, die mit einem Verlust von Fußfortsätzen einhergeht, führt daher typischerweise zu Proteinurie (7).

Podozyten sind polarisierte Epithelzellen mit einer apikalen und einer basalen Zellmembrandomäne. Die Grenze zwischen basaler und apikaler Membran wird durch die Schlitzmembran bestimmt. Die apikale Membran und die Schlitzmembran sind durch eine Schicht aus Sialoglykoproteinen, unter anderem Podocalyxin bedeckt, die eine stark negative Oberflächenladung der Podozyten verursachen (11). Über die basale Membran wird die Fixierung an die GBM vermittelt. Beide Membranen zeigen eine heterogene Lipidzusammensetzung. Sie enthalten zum Teil Cholesterin-reiche Domänen (*lipid rafts*)

(12;13), passend zu spezifischen Membranproteinen der Podozyten, die ebenfalls floßartig angeordnet sind (14;15).

Der Zellkörper der Podozyten enthält einen großen Zellkern, ein gut ausgebildetes Golgi-System, viel raues und glattes Endoplasmatisches Retikulum, viele Lysosomen und Mitochondrien. Im Gegensatz zum Zellkörper, enthalten die Fortsätze nur wenige Zellorganellen (10).

1.3 Proteine der Schlitzmembran

Der Schlitzmembrankomplex besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine, wozu unter anderem Nephrin (16), CD2AP (14;17), FAT (18), ZO-1 (19), P-Cadherin (20), Podocin (21) und Neph1-3 (22-24) gehören. Dies ist aber nur ein kleiner Teil der Moleküle, die eine wesentliche Rolle in der funktionellen und strukturellen Aufrechterhaltung der Schlitzmembran spielen (Abbildung 3B).

Mutationen im Gen NPHS1, welches für Nephrin kodiert, finden sich im kongenitalen nephrotischen Syndroms des Finnischen Typs, einer autosomal-rezessiven Krankheit, die durch massive Proteinurie *in utero* und Nephrose bei Geburt gekennzeichnet ist (25;26). Das Genprodukt von NPHS1, Nephrin, ist ein 180 kDa Transmembranprotein, das in der Niere ausschließlich in Podozyten und dort hauptsächlich an der Schlitzmembran exprimiert wird (27). Eine Inaktivierung von NPHS1 führt in der Maus zu Proteinurie und partiellem Fußfortsatz-*Effacement* (ein Verlust der normalen Fußfortsatzstruktur durch ein Verschmelzen der Fußfortsätze) (28). Neph-1 ist ein Homolog von Nephrin, dessen Fehlen in der Maus ebenfalls zu Proteinurie, *Effacement* und frühem postnatalem Tod führt (23). Neph-1 ist ebenfalls ein Transmembranprotein, das von Podozyten stark exprimiert wird (24) und auch an der Schlitzmembran lokalisiert ist (29). Neph-1 bildet Homo- und mit Nephrin Heterodimere (30) und interagiert ebenfalls mit Podocin (24) und ZO-1 (31). Podocin ist das Genprodukt von NPHS2 und ebenfalls an der Schlitzmembran exprimiert (21). Mutationen dieses Gens verursachen ein autosomal-rezessives, Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom (32) und eine fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) (33;34). Podocin assoziiert mit CD2AP und Nephrin in *lipid rafts* (14).

ZO-1 ist ein typisches Protein an der zytoplasmatischen Seite von *Tight Junctions*. Es war das erste Protein, dessen Lokalisation an der intrazellulären Seite der Schlitzmembran gezeigt werden konnte. ZO-1 interagiert mit dem Aktin Zytoskelett und nimmt an Signalprozessen über Tyrosinphosphorylierung teil (19). Eine *in vivo* Unterbrechung der Neph1-Nephrin Interaktion mit verschiedenen Antikörpern bewirkt Proteinurie und reduziert die Neph1 und

Nephrin Proteinexpression. Eine Kombination der Antikörper bewirkt außerdem eine Reduktion der ZO-1 Expression (29).

Ein weiteres Schlüsselprotein der Schlitzmembran ist das 500 kDa große Protein FAT, ein Mitglied der Cadherin Superfamilie. FAT-defiziente Mäuse zeigen Fußfortsatz-*Effacement* und Proteinurie, was auf eine wichtige Rolle bei der Bildung der Schlitzmembran hindeutet (35).

P-Cadherin gehört ebenfalls zu den Cadherinen und wird bereits in den frühen Phasen der glomerulären Entwicklung exprimiert (36). Es kolokalisiert mit Nephrin und ZO-1 in der späten *S-shaped body* Entwicklungsphase und befindet sich in reifen Glomeruli in der Schlitzmembran (20).

Das Adaptermolekül CD2AP befindet sich auf der intrazellulären Seite der Schlitzmembran. In der Niere wird CD2AP vor allem von Podozyten exprimiert. Ein Fehlen von CD2AP führt in Mäusen zu massiver Proteinurie und zum Tod 5-6 Wochen nach der Geburt, was wieder auf eine essentielle Rolle von CD2AP im Filtrationsprozess hinweist (37). CD2AP bindet direkt an andere Schlitzmembranproteine wie Nephrin (17) und Podocin (14) und hat eine Aktin-Bindungsdomäne (38).

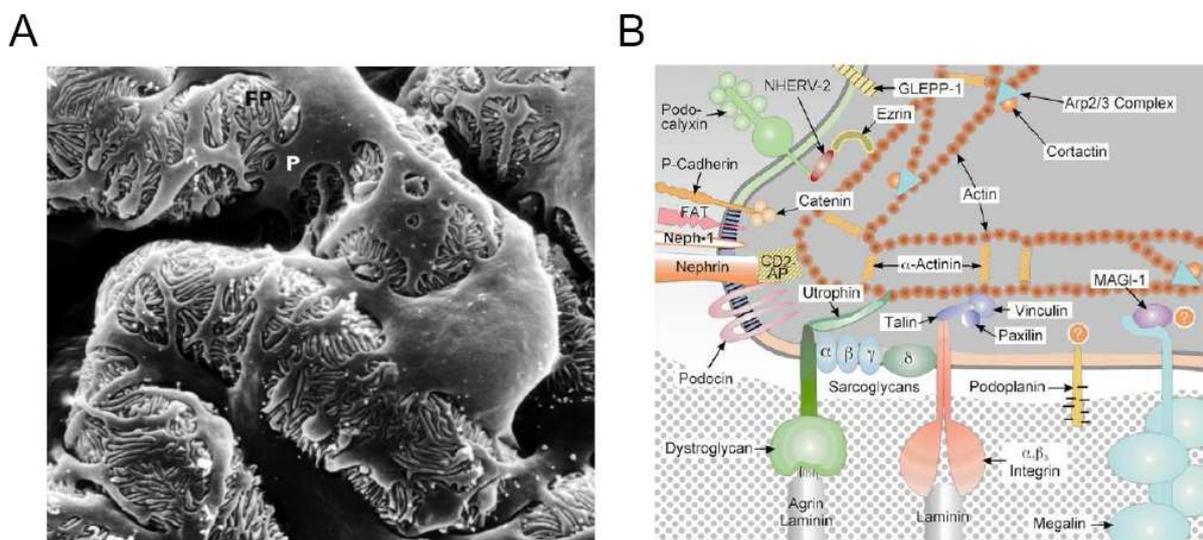


Abbildung 3 Rasterelektronenmikroskopie von glomerulären Kapillaren der Ratte.

(A) Die Kapillaroberfläche ist von stark verzweigten Podozyten (P) und ihren Fußfortsätzen bedeckt. Rattenniere in 6000 facher Vergrößerung (Bild aus *Pavenstädt et al.* (10)).

(B) Schematische Zeichnung eines Podozyten mit Molekülen der Schlitzmembran (Bild aus *Kerjaschki et al.* (39)).

1.4 Das podozytäre Zytoskelett

Die komplexe Struktur der Podozyten und die Aufrechterhaltung der Fußfortsätze erfordert ein gut strukturiertes Zytoskelett. Das podozytäre Zytoskelett kann in drei Kompartimente unterteilt werden: 1. der Zellkörper der Podozyten enthält eine dünne Schicht kortikales Aktin und das Mikrotubuli organisierende Zentrum nahe des Kerns; 2. die Primärfortsätze enthalten Mikrotubuli und Intermediärfilamente wie Vimentin und Desmin und 3. die interdigitierenden Fußfortsätze, die zwei Arten Aktin enthalten. Einerseits parallele Aktinfilamente, die zentral über dem Level der interzellulären Verbindungen verlaufen und andererseits ein subkortikales Aktinnetzwerk direkt an der interzellulären Verbindung und an der apikalen und basalen Plasmamembran (40-42).

Die Mikrofilamente der Fußfortsätze bilden schleifenförmige Bündel, die entlang der Längsachse der Fußfortsätze verlaufen. Die Biegungen dieser Bündel liegen am Übergang zu den Primärfortsätzen und werden durch das Mikrotubuli-assoziierte Protein τ mit den Mikrotubuli verbunden (43) (Abbildung 4).

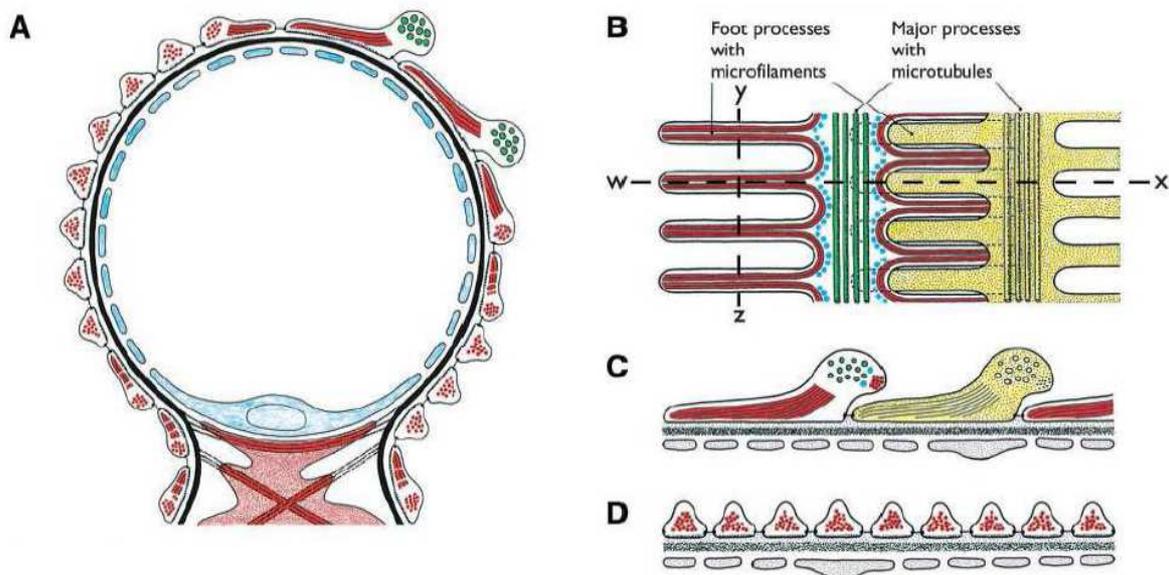


Abbildung 4 Das Zytoskelett von Podozyten Fußfortsätzen.

(A) Querschnitt durch eine glomeruläre Kapillarschlinge. Die Fußfortsätze (zum Teil quer angeschnitten) bedecken die GBM und enthalten einen kompletten Aktin-basierten kontraktilem Apparatur (in rot dargestellt). (B-D) zeigt das Zytoskelett detaillierter. (B) Blick von oben auf die Primär- und Fußfortsätze. (C) Schnitt eines Fußfortsatzes parallel (w-x Linie) und (D) senkrecht (y-z Linie) zur Längsachse. Die Aktin-Filamente (rot) enden in der Basis der Fußfortsätze. Am anderen Ende stehen sie in direktem Kontakt zu den Mikrotubuli (grün), die längs der Primärfortsätze verlaufen. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein τ (blau) vermittelt den Kontakt zwischen Mikrotubuli und den Aktinfilamentbündeln (Bild aus Pavenstädt *et al.* (10)).

Die Dynamik des Zytoskeletts spielt in vielen Prozessen wie Zellteilung, Zellmigration, interzellulärer *Junction*-Bildung, intrazellulärer Transport und bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität eine zentrale Rolle. In Podozyten ist das Zytoskelett besonders während der Entwicklung, bei der Aufrechterhaltung des glomerulären Filters und in pathologischen Zuständen von besonderer Bedeutung (10). Während der glomerulären Entwicklung wandelt sich die klassische *Adherens Junction* undifferenzierter Podozyten in eine hochspezialisierte *Junction*, die Schlitzmembran, um. Gleichzeitig bilden sich die interdigitierenden Fußfortsätze mit den oben beschriebenen einzigartigen Aktin Zytoskelett- und Mikrotubuli-Strukturen (44).

Podozyten sind in vielen humanen glomerulären Erkrankungen, wie Minimal Change Disease (MCD), Fokal segmentaler Glomerulosklerose (FSGS), membranöser Glomerulopathie (MGN), diabetischer Nephropathie (DN) und Lupus Nephritis (LN), betroffen (39;45). Charakteristisch sind Veränderungen in der Struktur der Schlitzmembran und Fußfortsatz-*Effacement* aufgrund von Veränderungen des podozytären Zytoskeletts (46). Das molekulare Netzwerk der Fußfortsätze besteht aus Aktinfilamenten und Aktin-assoziierten Molekülen wie Myosin, α -Actinin und Synaptopodin (39;47). In gesunden Podozyten bilden die Fußfortsätze ein interdigitierendes Netzwerk mit benachbarten Fußfortsätzen (Abbildung 5A und B). Die dadurch entstandenen Filtrationsschlitz werden von der Schlitzmembran, die die letzte Barriere für große Proteine bildet, überspannt (45). Bei verschiedenen glomerulären Erkrankungen kommt es zu einer Retraktion der sekundären Fußfortsätze. Dadurch vereinfacht sich die Fußfortsatzstruktur und das normale interdigitierende Muster geht verloren (*Effacement*). Hierbei verändert sich das Aktin Zytoskelett von parallelen Aktinbündeln zu einem dichten Netzwerk aus kurzen Aktinfilamenten (Abbildung 5C). Fußfortsatz-*Effacement* erfordert eine aktive Reorganisation der Aktinfilamente (48). Diese dynamischen und verschachtelten Prozesse geschehen schnell und können vollständig reversibel sein. Zum Beispiel können in Ratten Podozyten *Effacement*-ähnliche Veränderungen durch Protaminsulfat innerhalb Minuten ausgelöst und in wenigen Minuten durch Heparansulfat-Perfusion wieder rückgängig gemacht werden (49). Im Menschen kann bei Steroid-sensitiver Minimal Change Disease, die auftretende Proteinurie und das Podozyten-*Effacement* innerhalb weniger Tage mit Glucocorticoid Therapie vollständig behandelt werden (50).

Die Dynamik des Aktin Zytoskeletts wird in Podozyten von einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle beeinflusst.

Mutationen im Gen für ACTN4, das alpha-actinin-4 kodiert, sind mit der autosomal-dominanten familiären FSGS assoziiert (51). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die mutierte Form des Proteins stärker an Aktin bindet, was einen Einfluss auf die Podozytenstruktur haben könnte (52). Eine Podozyten-spezifische transgene Expression dieser Mutante führt in Mäusen zu FSGS (53) und in kultivierten Podozyten zu einer geringeren Zellausdehnung, eingeschränkter Beweglichkeit und zu einer geringeren Zahl aktinreicher peripherer Ausläufer (54).

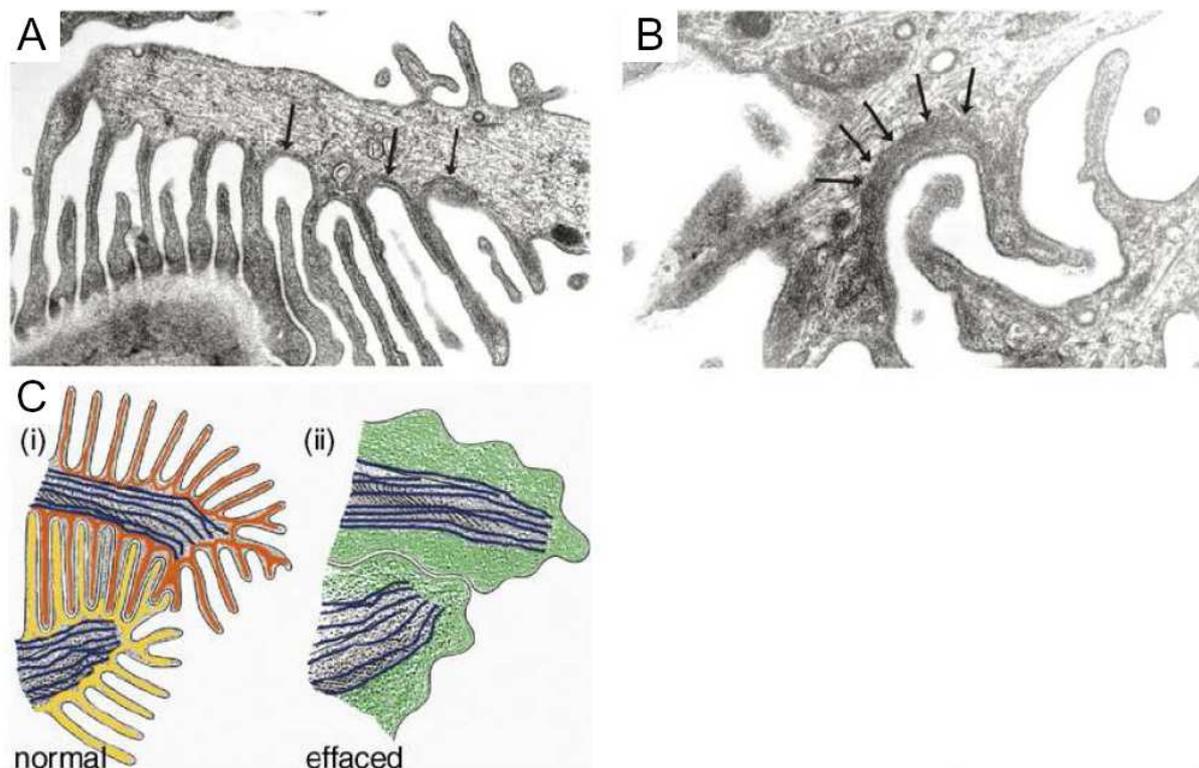


Abbildung 5 Aktin Zytoskelett in normalen und „effaced“ Podozyten.

(A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Primärfortsatzes von dem sich mehrere Fußfortsätze abzweigen. Das Zytoskelett der Primärfortsätze besteht hauptsächlich aus Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Die Fußfortsätze enthalten Bündel paralleler Aktinfilamente (Pfeile), die die benachbarten Fußfortsätze verbinden. (B) Höhere Auflösung ($\times 65000$). (C) Aufsicht auf normale (i) und „effaced“ (verschmolzene) (ii) Podozytenfußfortsätze. In gesunden Podozyten interdigitieren die Fußfortsätze zweier benachbarter Zellen. Die Aktinbündel der benachbarten Podozyten sind hier in gelb und rot dargestellt und die Mikrotubuli der Primärfortsätze in blau. Zwischen den „effaced“ Podozyten bildet sich eine meanderförmige Zellgrenze aus, da die Fußfortsätze nicht mehr ineinander greifen. Es bildet sich eine Zytoplasmasschicht, die mit unorganisierten, kurzen Aktinfilamenten gefüllt ist (grün) (Bild aus *Faul et al., 2007* (55)).

Ein anderes Protein, das ebenfalls eine große Rolle für die Aufrechterhaltung des podozytären Aktin Zytoskeletts spielt, ist Synaptopodin. Synaptopodin gehört zur Gruppe der

prolinreichen Aktin-assoziierten Proteine, die in stark dynamischen Zellkompartimenten, wie zum Beispiel in der dentrischen Spindel im Gehirn oder den Podozytenfußfortsätzen in der Niere vorkommen (56). Synaptopodin-defiziente Mäuse zeigen Defizite in der Synapsenbildung und einen Proteinverlust über den Urin (57). Undifferenzierte Podozyten exprimieren kein Synaptopodin und weisen ein kortikales Aktin Zytoskelett auf (57;58). Sie zeigen nur eine geringe RhoA, aber eine starke Rac1 und Cdc42 Expression (59). Differenzierte Podozyten hingegen zeigen gut entwickelte Stressfasern, eine starke Synaptopodin (57) und RhoA Expression (59). *Asanuma et al.* konnten zeigen, dass die Ablation von Synaptopodin zu einer verminderten RhoA Expression und Aktivität führt und die Überexpression zur Hochregulation von RhoA. Synaptopodin bindet bevorzugt an die GDP-gebundene Form von RhoA und verhindert durch die kompetitive Bindung die Smurf1-vermittelte Ubiquitinierung und somit den Abbau von RhoA (59).

Die kleinen Guanosin Triphosphatasen (GTPasen) Rho, Rac und Cdc42 kontrollieren Signalwege, die Membranrezeptoren mit dem Auf- und Abbau des Aktin Zytoskeletts und assoziierter Integrin Adhäsionskomplexe verbinden (60).

Rho (drei Isoformen, RhoA, RhoB und RhoC), Rac (drei Isoformen, Rac1, Rac2 und Rac3) und Cdc42 gehören zur Familie der Rho GTPasen. Wie alle GTPasen wechseln sie zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen Form und einer aktiven GTP-gebundenen Form. Der Wechsel zwischen den beiden Formen wird durch eine große Familie GEFs (Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren, engl. *guanine nucleotide exchange factors*) kontrolliert, die die GDP/GTP Austauschrate erhöhen (61). Im Gegenzug gibt es auch eine große Familie GTPase aktivierender Proteine (GAPs), die die intrinsische GTPase Aktivität der Rho GTPasen steigern (62). Die kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 beeinflussen über verschiedene Signalwege die Bildung unterschiedlicher Aktinfilamente. Rho bewirkt die Aktinpolymerisation durch die Aktivierung von mDia, welches die Elongation von Aktinfilamenten fördert. Weiterhin aktiviert es die p160Rho Kinase, die die *Myosin light-chain phosphatase* phosphoryliert und inaktiviert, was zu einem Anstieg der Myosin II Aktivität führt, die Aktinfilamente vernetzt und Kontraktionskräfte generiert. Rac und Cdc42 aktivieren beide über unterschiedliche Wege den Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) Komplex, der Aktinpolymerisation in allen eukaryotischen Zellen vermittelt (63). Obwohl sowohl Rac als auch Cdc42 den gleichen Komplex aktivieren, verursachen sie unterschiedliche morphologische Strukturen. Die Rac Aktivierung führt zur Bildung von Lamellipodien, die von Cdc42 zur Bildung von Filopodien (60). Lamellipodien und Filopodien sind die zwei Haupttypen von Plasmamembranausstülpungen in sich bewegenden Zellen (64). Die Funktion

von Lamellipodien ist die Motilität über glatte Oberflächen, Filopodien hingegen dienen der Erkundung von extrazellulärer Matrix und der Oberfläche anderer Zellen. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Zellausläufern ist die Anordnung ihrer Aktinfilamente. Lamellipodien enthalten ein verzweigtes Netzwerk aus Aktinfilamenten, Filopodien hingegen unverzweigte Bündel von Aktinfilamenten, die axial angeordnet, eng gepackt und von einheitlicher Polarität sind (65;66).

1.5 Polarität in Podozyten

Polarität ist ein gemeinsames Merkmal vieler Zelltypen und die Grundvoraussetzung für die Entwicklung vielzelliger Organismen. Die Polarität der Zelle bezieht sich auf die meist asymmetrische Anordnung verschiedener Zellbereiche, wie der Plasmamembran, intrazellulärer Organellen und des Zytoskeletts (67). Eine Zelle muss immer optimal an die jeweilige Umgebung und Funktion angepasst sein, daher kann die Form und Polarität von Zellen sehr variabel sein.

Podozyten haben eine außergewöhnliche Form und Funktion. In der Filtrationsbarriere nehmen sie die Rolle eines molekularen Siebes ein, beeinflussen aber auch benachbarte Zelltypen innerhalb des Glomerulus durch sezernierte Faktoren oder Signalprozesse an der Schlitzmembran (10;68).

Während der Entwicklung (Glomerulogenese) macht der Podozyt große Veränderungen durch. In der *comma-shaped body* Phase sind die Podozyten-Vorläuferzellen noch apikal miteinander verbunden. Während der Reifung über die *S-shaped body* Phase bis zur *capillary loop* Phase wandert der apikale Verbindungsgürtel in Richtung basale Seite, der apikale Anteil der Zellen dehnt sich in den Raum der Bowman Kapsel aus und an der basalen Seite entstehen Zellausläufer. Diese Translokation von apikal nach basal erfordert viele sequentielle Prozesse bis zum reifen Podozyten (69;70). Hierbei ändern sich die interzellulären Verbindungen komplett in ihrer Zusammensetzung und Form von einem *Tight* und *Adherens Junction*-ähnlichen Komplex zur Schlitzmembran (44).

Zellpolarität erfordert eine koordinierte Interaktion verschiedener Signalmoleküle. Zu diesen Polaritätsmolekülen gehört der *partitioning defective* (PAR) Komplex, der Crumbs und der Scribble Komplex. Polaritätskomplexe kooperieren mit den kleinen GTPasen Rac, Rho und Cdc42. Somit vermitteln sie den Vesikeltransport, die Phosphatidyl-Inositol-Phosphat-Regulation und die Organisation von Mikrotubuli und Aktin Zytoskelett (71-73). Die Polaritätskomplexe befinden sich in unterschiedlichen Regionen. In Epithelzellen bewirken der PAR und der Crumbs Komplex apikale Polarität wohingegen der Scribble Komplex an

der basolateralen Zelloberfläche agiert. Die unterschiedliche Verteilung der Komplexe geht mit der asymmetrischen Organisation der *Junctions* einher. *Adherens Junctions* vermitteln Cadherin-basierende Zell-Zell Adhäsion, *Tight Junctions* bilden eine interzelluläre Diffusionsbarriere (67). Die podozytäre Schlitzmembran zeigt Eigenschaften von *Adherens* und *Tight Junctions*, z. B. durch die Expression der Proteine *zonula occludens-1* (ZO-1) und P-Cadherin (19;20).

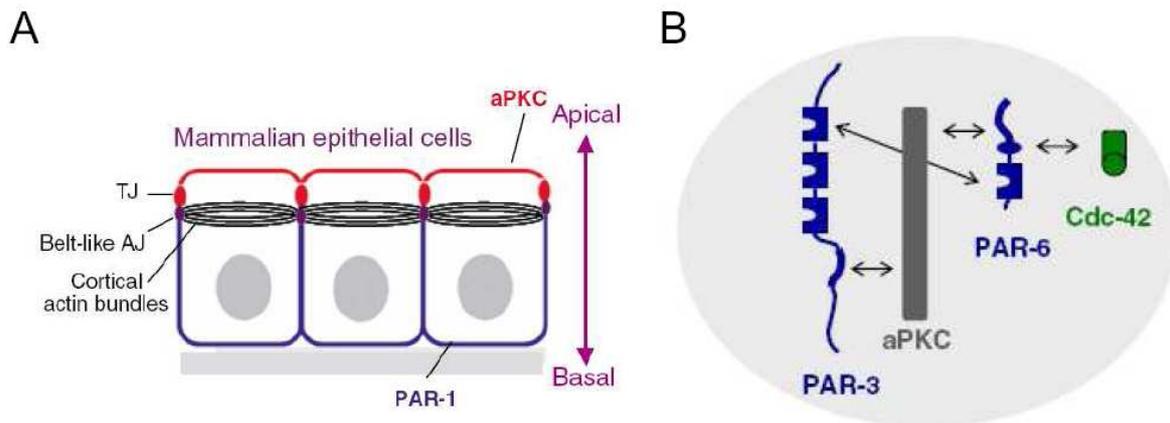


Abbildung 6 Zellpolarität und der Par3-aPKC-Par6 Komplex.

(A) Apikal-basale Polarität in kultivierten Epithelzellen. Die roten Linien markieren den aPKC Komplex, die blauen die Par-1 Verteilung (Bild aus *Suzuki et al., 2006* (74)). (B) Der Par3-aPKC-Par6 Komplex ist einer der Hauptproteinkomplexe an *Tight Junctions*. Die Doppelpfeile markieren direkte Interaktionen (Bild aus *Ebnet et al., 2008* (75)).

In Epithelzellen befindet sich der PAR Komplex an *Tight Junctions* und reguliert dort die apikobasolaterale Polarität (73). Der Kern des PAR Komplexes besteht aus aPKC und Par-6 zusammen mit dem Gerüstprotein Par-3 (Abbildung 6). Par-6 und Par-3 sind PDZ-Domänenhaltige Adapter-Proteine, wobei Par-6 auch für die Aktivität von aPKC erforderlich ist (73). Die Interaktion mit der GTP-gebundenen Form der kleinen GTPasen Rac und Cdc42 bewirkt eine Konformationsänderung von Par-6 (76;77) und dies bewirkt die Phosphorylierung und Aktivierung von aPKC (78). Par-3 rekrutiert Par-6 und aPKC an die Stellen, an denen ihre Aktivität erforderlich ist (67). Inzwischen gibt es viele Beweise dafür, dass der PAR Komplex für den Podozyten eine wichtige Rolle spielt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von aPKC in isolierten Glomeruli zu Fußfortsatz *Effacement* und zum Verlust der regulären Fußfortsatz-Architektur führt (79). Passend dazu konnte der PAR Komplex als neue Komponente der Schlitzmembran identifiziert werden (80). Die bereits länger bekannten Komponenten der Schlitzmembran Neph1 und Nephrin binden an die PDZ Domänen von Par-3 und verankern den Komplex so an der Schlitzmembran. Auch aPKC wird über Par-3 an den Nephrin-Podocin-Neph1 Komplex gebunden (79;80).

1.6 Protein Kinase C Isoformen

Die Protein Kinase C (PKC) Familie besteht aus 10 Serin/Threonin Kinasen, die an vielen verschiedenen Signalwegen beteiligt sind. Sie haben einen Einfluss auf viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und andere Wachstumsfaktor-abhängige Zellantworten (81;82).

1.6.1 Struktur der PKC Isoformen

Die PKC Isoformen teilen bestimmte strukturelle Abschnitte (Abbildung 7). Sie enthalten eine hoch konservierte katalytische Domäne, die aus Motiven besteht, die für die ATP/Substrat-Bindung und Katalyse notwendig sind und regulatorische Domänen, die das Enzym in der inaktiven Konformation halten. Die regulatorischen Domänen befinden sich am N-Terminus des Proteins und enthalten eine autoinhibitorische Pseudosubstrat Domäne und zwei Bindungsmodule C1 und C2. Die Pseudosubstrat Sequenz enthält ein Alanin anstatt der Serin/Threonin Phosphoakzeptorstelle, ähnelt aber sonst einem PKC Substrat (83).

Die PKC Isoformen werden, basierend auf ihren unterschiedlichen regulatorischen Domänen, in drei Unterfamilien eingeteilt. Zu den *conventional* PKCs (cPKC) zählen die Isoformen α , β I, β II (eine Spleissvariante von β I mit 43 zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus) und γ . Die regulatorischen Domänen der cPKCs enthalten eine C1 Domäne, die als Diacylglycerol (DAG)/ Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)-bindendes Motiv fungiert und eine C2 Domäne, die Calcium-abhängig anionische Phospholipide bindet. Die C1 Domäne besteht aus einer Tandemsequenz von 50 Aminosäuren, C1A und C1B, jede mit 6 Cysteinen und 2 Histidinen, die zwei Zn^{2+} koordinieren. Die *novel* PKCs (nPKC; δ , θ , ϵ , η) haben auch zwei C1 und eine C2 Domäne, allerdings ist die Reihenfolge der Domänen anders als bei den cPKCs. In der C2 Domäne der nPKCs fehlt außerdem der Calcium-koordinierende saure Rest, was den großen Unterschied zwischen cPKC und nPKCs ausmacht. Die nPKCs werden Calcium-unabhängig von DAG/PMA aktiviert. Atypische PKCs (aPKCs; ζ und ι/λ) haben keine Calcium-sensitive C2 Domäne, sie haben eine atypische C1 Domäne (keine Tandem-Sequenz), die PIP_3 oder Ceramide bindet, aber kein DAG oder PMA. Zusätzlich haben sie eine PB1 (Phox und Bem1) Domäne, die Protein-Protein Interaktionen mit anderen PB1-enthaltenden Gerüstproteinen wie z. B. PAR-6 (*partitioning defective-6*) und MEK5 vermittelt (84;85). Die Aktivität der aPKCs wird primär durch Protein-Protein Interaktionen und Phosphorylierung durch *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK-1) reguliert.

Als eine 11. PKC-Isoform wird in manchen Publikationen die Serin/Threonin Kinase PKC μ (Protein Kinase D1, PKD) genannt, die dort unter den *novel* PKCs eingeordnet wird (86). Sie

wird aber nur PKC-abhängig aktiviert und zählt nicht selbst zur PKC Familie. PKC μ unterscheidet sich in wesentlichen Strukturen von den „echten“ PKC Isoformen: sie enthält eine saure Domäne (87), eine PH Domäne innerhalb der regulatorischen Domäne und keine typische Pseudosubstratbindestelle (88).

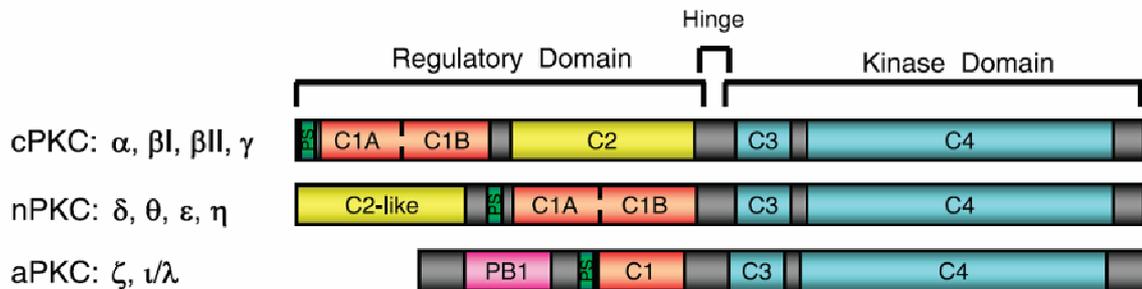


Abbildung 7 Domänen-Struktur der Protein Kinase C (PKC) Isoformen.

PKCs haben eine konservierte Kinase Domäne (blau) und variabelere regulatorische Domänen. Alle PKC Isoformen haben ein Pseudosubstratmotif (grün) N-terminal zur C1 Domäne (rot). Tandem C1 Domänen sind die Sensoren für DAG/PMA in den cPKC und nPKC Isoformen, die einzelne C1 Domäne in den aPKCs bindet kein DAG/PMA. Die C2 Domänen (gelb) sind Calcium-abhängige Phospholipid-bindende Module in den cPKCs. Die nPKC C2 Domäne bindet kein Calcium. Variable Regionen der PKC Isoformen sind grau dargestellt (Bild aus *Steinberg, 2008* (83)).

1.6.2 PKC Aktivierung und Lokalisation in Zellen

Initial wurde die Aktivierung von PKCs am Beispiel von PKC α durch eine Translokation in die Membran beschrieben. PKC α befindet sich normalerweise im Zytosol. Bei Aktivierung wird IP $_3$ generiert, wodurch intrazelluläres Calcium freigesetzt wird, das an die C2-Domäne bindet und ihre Affinität zur Membran erhöht. An der Membran diffundiert PKC α innerhalb der Lipiddoppelschicht und es kommt zu einer weiteren Interaktion der C1A-Domäne mit DAG. Bei dieser zweiten Interaktion spielt Phosphatidylserin (PS) eine wichtige Rolle, indem es die intramolekulare Interaktion zwischen der C1A- und C2-Domäne zerstört und somit die C1A-Domäne für die Interaktion mit DAG freilegt (89). Die starke Bindung an die Membran bewirkt eine Konformationsänderung, die die autoinhibitorische Pseudosubstrat Domäne aus der substratbindenden Tasche vertreibt und somit die Aktivierung ermöglicht (83). Die Aktivierung besteht somit aus der Freisetzung des Pseudosubstrats aus der substratbindenden Tasche und der nachfolgenden Phosphorylierung der Kinase-Domäne (90). Dieses Schema der PKC Translokation erklärt allerdings nicht die komplexe Lokalisation der PKCs in den Zellen. Zum Beispiel translokieren die cPKCs schnell und transient nach Phospholipase C (PLC)-vermittelter DAG Anreicherung zur Plasmamembran. In einigen Zellen mit

biphasischer DAG Antwort werden PKC α und PKC β II über eine Art Autophosphorylierung von der Membran freigelassen (91). Sie akkumulieren dann perinukleär in Endosomen, die die kleine GTPase Rab11 enthalten (92). Dies geschieht durch einen Phospholipase D (PLD) abhängigen Prozess, in dem Phosphatidsäure (PA, engl. *phosphatidic acid*) entsteht, die in DAG umgewandelt wird (93). PKC Isoformen translokieren auch in bestimmte Membrankompartimente wie *lipid rafts* oder Caveolae (94). Caveolae sind Sphingolipid-/Cholesterol-angereicherte Detergenz-resistente Membranen, die Plasmamembraneinstülpungen in Caveolin-exprimierenden Zellen bilden. Ceramid ist ein weiteres Lipid, das PKC α und PKC β II Signale inhibitorisch an perinukleären Membranen reguliert (95). Ceramid ist eines der Lipide in *lipid rafts* oder Caveolae. Die Ansammlung von Ceramid an der Plasmamembran ist durch PKC δ reguliert (96). Die Ceramid-Ansammlung führt wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung von PKC ζ durch Dissoziation von PKC ζ -14-3-3 Komplexen (97).

1.6.3 Atypische PKCs

Die Untergruppe der atypischen PKCs besteht aus den Isoformen PKC λ/ι , wobei λ die murine und ι die humane Isoform darstellt, und PKC ζ . Das Besondere an den aPKCs ist, dass sie kein DAG zur Aktivierung benötigen. Sie können durch andere Lipide wie z. B. Ceramid (97) oder Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PIP3), ein Produkt der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) aktiviert werden (98). Die aPKCs spielen eine wichtige Rolle in Prozessen wie Proliferation (99), Differenzierung (100), Polarität (79), Glucose-Transport (101) und Zellüberleben (102).

Die Zinkfingerdomänen (C1) der aPKCs sind zu 35-48% mit denen der anderen PKC Isoformen identisch. Die Zinkfingerdomänen von PKC ζ und PKC λ/ι sind untereinander zu 74 % identisch (103). Als Substrate dienen den aPKCs nicht nur zytosolische, sondern auch nukleäre Proteine. Ein Beispiel ist der Transkriptionsfaktor Sp-1, mit dem PKC ζ einen Komplex bildet und das Protein an der DNA-Bindungsdomäne phosphoryliert (104). PKC ζ und auch PKC λ/ι konnten beide bereits nukleär detektiert werden. Durch verschiedene Stimulantien konnte eine Translokation zwischen Kern und Zytosol beobachtet werden. PKC ζ wandert in PC12 Zellen nach NGF (engl. *nerve growth factor*) Stimulation transient in den Kern (100), PKC λ/ι konnte auch in ruhenden HepG2 Zellen bereits in Zytosol und Kern detektiert werden. Nach Stimulation mit PDGF (engl. *Platelet derived growth factor*) oder EGF (engl. *epidermal growth factor*) translokiert PKC λ/ι ins Zytoplasma und in kompaktere Strukturen des Kerns (105). Proteine, die größer als 40-60 kDa sind, können nicht durch

passive Diffusion durch die Kernporen in den Kern gelangen (106). Um schnell in den Kern zu gelangen, benötigen Proteine konservierte Kernlokalisierungssignale (NLSs, engl. *nuclear localization signals*), die trimere NLS-importin α -importin β Komplexe bilden können, was eine schnelle Translokation in den Kern bewirkt (107). Oder sie müssen mit einem Protein interagieren, das ein NLS enthält, um mit diesem Protein zusammen in den Kern transportiert zu werden. Im Gegensatz dazu gibt es auch kurze Leucin-reiche Kernexportsignale (NESs, engl. *nuclear export signals*) in vielen Proteinen. Für PKC ζ und PKC $\lambda/1$ konnte jeweils ein NLS und ein NES identifiziert werden. *Perander et al.* konnten ein Cluster aus vier basischen Aminosäuren im N-terminalen Teil der Zinkfingerdomäne der beiden Proteine identifizieren (**KRF/LNRR**), welches es in den klassischen und neuen Isoformen nicht gibt. Diese an der Oberfläche liegenden Aminosäuren bilden das NLS (103). PKC $\lambda/1$ befindet sich in unbehandelten Zellen meist hauptsächlich im Zytosol und nur zu einem kleinen Teil im Kern. Nach Leptomycin B Behandlung, wobei der CRM1-abhängige Transport aus dem Kern verhindert wird, akkumuliert PKC $\lambda/1$ im Kern. Dies machte deutlich, dass PKC $\lambda/1$ ein NES besitzt. Interessanterweise akkumuliert PKC ζ nach Leptomycin B Behandlung nicht so stark im Kern, was zeigt, dass das NES von PKC ζ stärker ist als das NLS. In PKC $\lambda/1$ ist das NLS stärker als das NES, so dass der Kernimport wesentlich effektiver ist. Insgesamt wird die Stärke der NLSs und NESs wahrscheinlich durch intramolekulare Interaktionen reguliert (103).

Die Funktion der aPKCs wurde auch bereits in Mausmodellen untersucht. Die PKC ζ Knockout Mäuse werden scheinbar gesund geboren, nach ca. 2 Wochen zeigen sie jedoch Veränderungen in den sekundären lymphatischen Organen (*Peyer's patches* und Milz). In genaueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von PKC ζ in den Embryonischen Fibroblasten (EFs) zu einer Störung des NF- κ B Signalweges führt (108). Im Gegensatz dazu führt der totale PKC $\lambda/1$ Knockout schon im Embryo zum Tode (101). Daher wurden Leber-spezifische (109), Pankreas β -Zell-spezifische (110) und Muskel-spezifische PKC $\lambda/1$ Knockout Mäuse (101) generiert. Hierbei wurde das Cre-loxP System verwendet. Es wurden jeweils Mäuse gezüchtet, in denen PKC $\lambda/1$ von zwei loxP Sequenzen flankiert ist und diese mit Tieren gekreuzt, die die Cre Rekombinase unter Kontrolle eines Gewebespezifischen Proteins exprimieren. So konnte PKC $\lambda/1$ spezifisch in der Leber, im Pankreas oder im Muskel deletiert werden. Alle drei spezifischen Deletionen beeinflussten die Insulin-Sensitivität oder -Sekretion in den untersuchten Zelltypen.

Für beide aPKCs konnten bereits viele zelluläre Signalwege und Funktionen identifiziert werden (111). aPKCs sind in verschiedenen Zellen in die Mitogen-aktivierte Protein Kinase

(MAPK) Kaskade involviert. In Schilddrüsenzellen aktiviert überexprimiertes aktives PKC ζ ERK1 und ERK2, was eine PKC ζ -*knockdown* (PKC ζ -kd) Mutante nicht bewirkt (112). PKC ζ ist außerdem an der NF- κ B Aktivierung über die Signaltransduktion von TNF α und IL-1 beteiligt. Der PKC ζ -kn blockiert die NF- κ B Antwort auf diese Stimuli (113;114). Die Bindung an diese Rezeptor-Signalkomplexe geschieht bei PKC ζ und PKC $\lambda/1$ über das Adapterprotein ZIP/p62 (*zeta-interacting protein/ human 62-kDa Lck-binding protein*) (113). Als Teil des Par3-aPKC-Par6 Komplexes spielen die aPKCs eine wichtige Rolle in der Zellpolarität (siehe 1.5), z. B. bei der Bildung von *Tight Junctions* oder im Falle der Podozyten bei der Bildung der Schlitzmembran (79).

1.7 Def-6 und Swap-70

Def-6 (*Differentially expressed in FDCP6*), auch als SLAT (*Swap70-like adaptor of T-cells*) oder IBP (*IRF-4-binding protein*) bezeichnet, wurde in einer Yeast 2-Hybrid Analyse bei dem Vorhaben IRF-4-bindende Proteine zu identifizieren aus humaner Lymphknoten cDNA kloniert. Das Protein enthält 631 Aminosäuren und hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 74 kD. Die Aminosäuresequenz ist zu 92 % mit seinem Mausomolog und zu 45 % mit Swap-70 (*Switch-associated protein 70*) identisch (115). Swap-70 besteht aus 585 Aminosäuren. Das 70 kD große Protein wurde ursprünglich aus aktivierten B-Zellen als Teil eines Komplexes isoliert, der den Isotypenwechsel von Immunglobulinketten reguliert (116). Def-6 und Swap-70 besitzen eine sehr ähnliche Struktur mit jeweils einem N-terminalen EF-Hand Motiv, einer zentralen Pleckstrin Homologie (PH) Domäne und einer C-terminalen α -helikalen DBL Homologie (DHL) Region. Die Def-6 Sequenz enthält eine potentielle NLS (Aminosäuren K328-R340) (115) und Swap-70 drei NLS Sequenzen (siehe Abbildung 8). Die NLS Sequenzen lassen vermuten, dass diese Proteine nach bestimmten Stimulationen fähig sind, in den Kern zu wandern (117).

Def-6 und Swap-70 agieren beide als GEFs für die kleine GTPase Rac1, was zur Aktivierung von Rac1 führt (118;119). Jedoch sind beide Proteine keine typischen GEFs, da die klassische Anordnung der DHL und PH Domänen in ihnen umgekehrt ist. Def-6 existiert in zwei Konformationen. Normalerweise wird Def-6 durch eine intramolekulare Wechselwirkung in einer geschlossenen Konformation gehalten und die GEF Aktivität dadurch verhindert. Eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes Y210 durch eine Src-Kinase und eine Bindung an Zellmembran-assoziiertes PIP₃ zerstört die intramolekulare Interaktion und aktiviert die GEF Funktion (118).

Def-6 und Swap-70 interagieren beide mit dem zytoplasmatischen Teil der Integrinkette $\alpha 7A$, die spezifisch in Muskelzellen exprimiert wird. Die Interaktion von Def-6 mit Integrin $\alpha 7A$ wird durch die Phosphorylierung von Def-6 verhindert, im Gegenzug wird so die GEF Aktivität stimuliert. Eine Überexpression von Def-6 führt in C2C12 Myoblasten zu erhöhten Rac1-GTP Levels und dadurch zu einer gestörten Differenzierung (120).

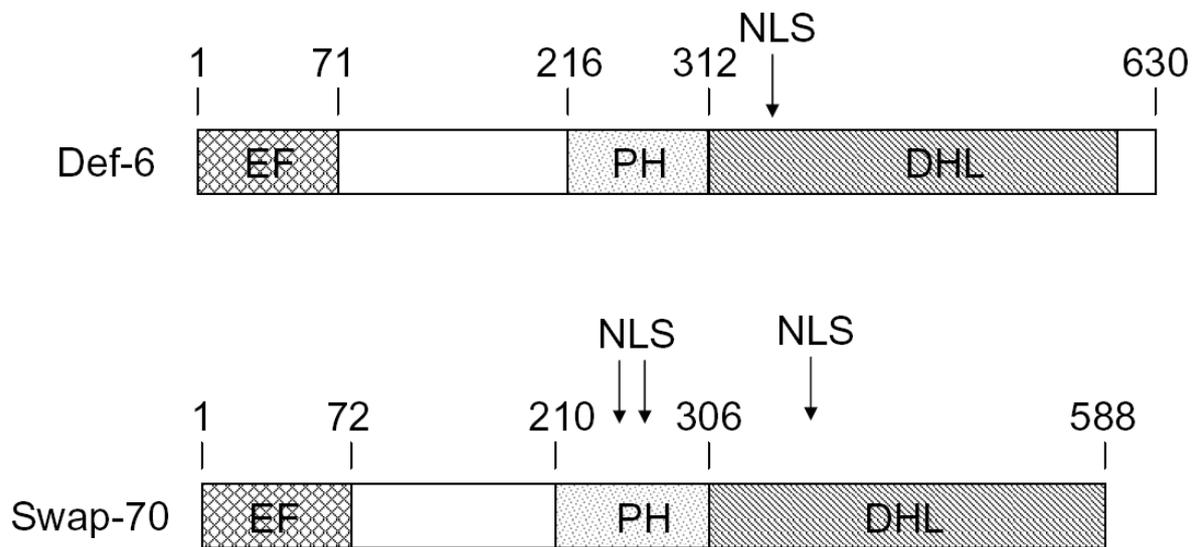


Abbildung 8 Domänenstruktur von Def-6 und Swap-70.

Def-6 und Swap-70 enthalten eine sehr ähnliche Domänenstruktur mit einem EF-Hand Motiv, einer Pleckstrin Homologie Domäne (PH) und einer DBL Homologie Region (DHL). NLS Sequenzen sind mit einem Pfeil markiert. Die Nummern über den Strukturen geben die Aminosäurepositionen im Protein wieder.

Die Lokalisation von ekto exprimiertem Def-6 wurde bereits in NIH-3T3, HeLa und C2C12 Zellen untersucht. In allen Zelltypen war das Protein an den Rändern von Lamellipodien und an Fokalkontakten lokalisiert (120).

Def-6 und Swap-70 scheinen beide noch zusätzliche Funktionen außer der Funktion als GEF zu haben. Beide aktivieren nicht nur Rac1, sondern binden auch an das aktivierte Rac1 (121). Def-6 agiert *upstream* von Rac1, Cdc42 und RhoA und wird über den PI3K Signalweg aktiviert, was in NIH 3T3 Zellen zur Bildung von Lamellipodien und Filopodien führt (122). *Mavrakis et al.* konnten zusätzlich zeigen, dass eine Überexpression von Def-6 in H₂O₂ gestressten NIH-3T3 Zellen zu starken Veränderungen in der Zellmorphologie führt. Def-6 reichert sich hier an der Plasmamembran in *membrane ruffles* und Filopodien an. Diese durch Def-6 verursachten Veränderungen im Aktin Zytoskelett sind Kennzeichen von Rac1, Cdc42 und Rho GTPase Aktivität (122). Swap-70 bindet außerdem an F-Aktin und ist durch diese

Bindung ebenfalls an der Bildung von Membranhäufungen („*membrane ruffles*“) nach Wachstumsfaktorstimulation beteiligt (123).

Def-6 und Swap-70 werden beide sehr stark in B- und T-Zellen exprimiert. Funktionell konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung des T-Zell-Rezeptors zur Rekrutierung von Def-6 an die immunologische Synapse führt (118).

Es gibt zwar bereits Knockout Modelle für Def-6 und Swap-70 in der Maus, jedoch wurden in diesen Modellen vor allem Lymphozyten-spezifische Funktionen untersucht (124-126). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass Def-6 eine Rolle bei der Signalweiterleitung über den T-Zell Rezeptor und bei der Reifung von Th2-Zellen spielt (127). Im Knockout Modell wurde außerdem gezeigt, dass der Verlust von Def-6 zu einer spontanen Entwicklung von systemischer Autoimmunität führt (126). Untersuchungen zu Def-6 und Swap-70 in der Niere gibt es bisher nicht.

1.8 Puromycin aminonukleosid (PAN) Nephrose

Das Puromycin aminonukleosid (PAN)-induzierte Nephrose Modell ist bisher eines der am besten beschriebenen Tiermodelle für ein nephrotisches Syndrom, aus dem sich FSGS entwickelt (128). In der Ratte findet man nach PAN Injektion in den glomerulären Epithelzellen typische Veränderungen, die mit der Minimal Change Disease im Menschen assoziiert sind (129). Die Ratten entwickeln schon 4-5 Tage nach einer einmaligen intraperitonealen PAN Injektion eine schwere Proteinurie (130). Die Anzahl der Fußfortsätze und Filtrationsschlitz ist deutlich reduziert und es bilden sich neue *Junctions* zwischen benachbarten Fußfortsätzen an den Stellen, wo sich eigentlich die Schlitzmembran befinden sollte. Die Schlitzmembranen, die normalerweise direkt über der Basalmembran liegen, befinden sich nun weiter oben über den neugebildeten *Junctions* (131). Ähnliche Veränderungen an den Fußfortsätzen und Filtrationsschlitz konnten auch nach Perfusion der Rattenniere mit dem Polykation Protaminsulfat (PS) beobachtet werden (49). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess eine Umverteilung des Aktin Zytoskeletts und eine veränderte Regulation Zytoskelett-assoziiierter Proteine, wie zum Beispiel Nephrin und Podocin, beinhaltet (132). Die glomerulären Proteine Dendrin und Nephrin zeigen normalerweise ein lineares Muster entlang der Kapillarschlingen. Nach PAN Behandlung wird dieses Muster unterbrochen und scheint eher granulär (133).

In vitro Studien zeigen, dass PAN zu einer Abrundung der Podozyten und zu einer verminderten Adhäsion an Plastik führt (134). In kultivierten undifferenzierten Podozyten verursacht eine PAN Stimulation eine verminderte Proteinexpression mehrerer Proteine des

Zytoskeletts wie Aktin, Vimentin, Keratin, β -Tubulin, Laminin und Heparansulfat. Außerdem führt es zu einem Verlust der Integrin β 1-haltigen Fokalkontakte. Diese verminderten Proteinlevel sind dabei keine Folge einer allgemeinen Reduktion der Proteinsynthese (135). PAN vermindert auch die mRNA und Proteinexpression von Integrin α 3 und Integrin β 1, die die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix vermitteln. Dies könnte ein Grund für die verminderte Adhäsion der Podozyten sein (136). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass PAN in Podozyten zu Veränderungen des Aktin Zytoskeletts und einem Verlust der Synaptopodin Expression führt (137).

1.9 Zielsetzung

Podozytäre Schädigungen sind die Hauptursache vieler glomerulärer Nierenerkrankungen, die im fortgeschrittenen Stadium zu Nierenversagen führen können. Die in Podozyten exprimierten aPKC Isoformen PKC λ 1 und PKC ζ haben in vielen Zellen unterschiedliche Funktionen. Sie ähneln sich strukturell sehr stark und unterscheiden sich von allen anderen PKC Isoformen durch den Mechanismus ihrer Aktivierbarkeit. Ziel dieser Studie ist es, die Rolle von PKC λ 1 und PKC ζ in Podozyten genauer zu untersuchen und Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Isoformen herauszuarbeiten.

Zu diesem Zweck wurde ein Podozyten-spezifisches PKC λ 1 Knockout Mausmodell entwickelt. Aus den Podozyten-spezifischen PKC λ 1 Knockout und aus konstitutiven PKC ζ Knockout Mäusen wurden Podozyten isoliert und kultiviert. Diese Modellsysteme standen in den weiteren Untersuchungen für alle anfallenden Fragestellungen zur Verfügung.

In den *in vivo* und *in vitro* Experimenten soll vorrangig der Einfluss der aPKC Isoformen PKC λ 1 und PKC ζ auf die Zellpolarität, Podozytenarchitektur, Zusammensetzung der Schlitzmembran und das Aktin Zytoskelett untersucht werden.

Das Hauptziel der Untersuchungen ist es, aPKC bedingte Mechanismen von Podozytenfunktionsstörungen zu identifizieren und mögliche neue Zielgene für Behandlungsstrategien zu identifizieren.

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Chemikalienherstellern Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), J.T. Baker (Deventer, Niederlande) oder Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen.

2.2 Oligonukleotide (Primer)

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms Primer 3 erstellt und durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 1 Verwendete Primer für rt-PCR.

Gen	Vorwärts-Primer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')
HPRT -1	CAG TCC CAG CGT CGT GAT TA	AGC AAG TCT TTC AGT CCT GTC
Integrin β 1	CTG GTC CAT GTC TAG CGT CA	CTC CTG TGC ACA CGT GTC TT
FAK	CAC ATG CAG TCT CTG TGT CAG	GGT GTA TGT GTC TTC CTC ATC G
Vinculin	ACC TGC AGA CCA AAA CCA AC	AGC TGG TCT ACA CGG TCA CA
Def-6	CAC CAA CGT GAA ACA CTG GA	TGG TGG TGG GTC GCT TAT
Swap-70	AGG CCC TGG AGC AGT ATG A	TTG TCC TTC CAG CTC TTG GT
RhoA	TCC TGG TTG GGA ACA AGA AG	GCC TTC TTC AGG TTT TAC CG
Rac1	CTG ACT CCC ATC ACC TAC CC	CTT GAG TCC TCG CTG TGT GA
WT-1	ATC TGA AGA CCC ACA CCA GG	ATC TGA AGA CCC ACA CCA GG
Synaptopodin	GGC CCA TCC TCT ATC CTG TA	GAC CAA AGA GTT CAG CCT CG

2.3 Antikörper

Folgende Primärantikörper (Tabelle 2) und Sekundärantikörper (Tabelle 3 und Tabelle 4) wurden für die Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blot Analysen verwendet. Das Molekulargewicht ist nur bei Antikörpern genannt, die im Western Blot verwendet wurden.

Tabelle 2 Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen oder Western Blot Analysen.

Primärantikörper	Molekulargewicht (kDa)	Verdünnung	Hersteller
PKC λ/ι rabbit		IF: 1:100 in PBS	PD Dr. Michael Leitges, Universität Oslo, Norwegen
Nidogen rat		IF: 1:1000 in PBS	Chemicon, Temecula, CA, USA
Nephrin guinea pig polyclonal		IF: 1:200 in PBS	Acris, Herford, Deutschland
Nephrin (H-300)	180	WB: 1:500 in 2% BSA/TBST	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA
Podocin Rabbit polyclonal		IF: 1:200 in PBS	Sigma, St. Louis, MO; USA
ZO-1 Rabbit polyclonal		IF: 1:200 in PBS	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Par3 Rabbit polyclonal		IF: 1:200 in PBS	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
CD2AP (H-290) Rabbit polyclonal	80	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	Santa Cruz Biotechnologies
GAPDH (FL-335) Rabbit polyclonal	37	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	Santa Cruz Biotechnologies
WT-1 (C-19) Rabbit polyclonal	52	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST IF: 1:50 in PBS	Santa Cruz Biotechnologies
Synaptopodin G1D4 Mouse monoclonal		IF: unverdünnt	Progen, Heidelberg, Deutschland
RhoA Mouse monoclonal	23	WB: 1:500 in TBST	Cytoskeleton, Denver, CO, USA
Rac1 Mouse monoclonal	21	WB: 1:500 in TBST	Cytoskeleton
Cdc42 Mouse monoclonal	21	WB: 1:250 in TBST	Cytoskeleton

Def-6 Polyclonal Rabbit antiserum	74	WB: 1:6000 in 2% BSA/TBST	Dr. Thomas Samson (Universität North Carolina, USA)
Swap-70 Rabbit affinity purified	70	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	Sigma-Aldrich
GFP Rabbit polyclonal	27	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	Cell Signaling Technology®
OctA-Probe (D-8) rabbit polyclonal (Flag)	8 AS	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	Santa Cruz Biotechnologies
Vinculin (H-300) Rabbit polyclonal	117	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	Santa Cruz Biotechnologies
Vinculin-FITC Mouse monoclonal, Clone hVIN-1		IF: 1:50 (2h, RT)	Sigma-Aldrich
Purified mouse anti-CD29 (Integrinβ1)	130	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	BD Transduction Laboratories™
Phospho-FAK (Tyr576/577) Rabbit polyclonal	125	WB: 1:1000 in 2% BSA/TBST	Cell Signaling Technology®
Alexa-Fluor®546 Phalloidin		IF: 1:100 in PBS	Invitrogen

Tabelle 3 Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:20000 in TBST	Santa Cruz Biotechnologies
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:20000 in TBST	Santa Cruz Biotechnologies

Tabelle 4 Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Cy3-conjugated AffiniPure Donkey anti mouse IgG (H+L)	1:500 in PBS	Jackson Immuno Research
Cy3-conjugated AffiniPure Donkey anti rabbit IgG (H+L)	1:500 in PBS	Jackson Immuno Research
Fluorescein (FITC)- conjugated AffiniPure Donkey anti rabbit IgG (H+L)	1:500 in PBS	Jackson Immuno Research
Alexa-Fluor 488 goat anti-guinea pig IgG	1:500 in PBS	Invitrogen
Alexa-Fluor 555 goat anti-rat IgG	1:500 in PBS	Invitrogen
Alexa-Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG	1:500 in PBS	Invitrogen
Alexa-Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG	1:500 in PBS	Invitrogen
Alexa-Fluor 555 donkey anti-mouse IgG	1:500 in PBS	Invitrogen
Alexa-Fluor 488 donkey anti-mouse IgG	1:500 in PBS	Invitrogen

2.4 Plasmide

Folgende Plasmide wurden für transiente Transfektionen in Podozyten oder HEK293 Zellen verwendet.

Tabelle 5 Verwendete Plasmide.

Protein	Plasmid	Herkunft
PKC λ / ι -flag	PKC λ / ι (Maus) in pcDNA6-flag	Prof. Tobias Huber, Universität Freiburg, Deutschland
PKC ζ -flag	PKC ζ (Maus) in pcDNA6-flag	Prof. Tobias Huber, Universität Freiburg, Deutschland
PKC λ / ι -GFP	PKC λ / ι in pGFP3	Prof. Jae-Won Soh, Inha Universität, Korea
PKC ζ -GFP	PKC ζ in pGFP3	Prof. Jae-Won Soh, Inha Universität, Korea
Def-6 FL-GFP	Def-6 FL (bp 1-2015) in pEGFP-C2 (KpnI/ApaI)	Prof. Fred Sablitzky, Universität Nottingham, UK
Def-6 DHL-GFP	Def-6 DHL (bp 1066-1934) in pEGFP-C3 (EcoRI/ApaI)	Prof. Fred Sablitzky, Universität Nottingham, UK

Swap-70 FL-GFP	Swap-70 FL in pEGFP-C1	Ph.D. Sayoko Ihara, Universität Tokio, Japan
Swap-70 PH-GFP	Swap-70 PH in pEGFP-C1	Ph.D. Sayoko Ihara, Universität Tokio, Japan
CD2AP-GFP	CD2AP in pEGFP-N1	PD Dr. Tobias Huber, Universität Freiburg, Deutschland
Flag	p3xFLAG-CMV-14	Sigma-Aldrich

2.5 Zellen

2.5.1 Murine Podozyten

Alle hier verwendeten Podozyten wurden aus transgenen Immorto-Mäusen isoliert, die das Gen für ein thermolabiles Tumorantigen tragen, kodiert vom Simian Virus 40 (SV40) temperatur-sensitiven Mutantenstamm tsA58. Diese Immortomaus trägt außer dem SV40 *large tumor antigen* (TAg) zusätzlich den Haupthistokompatibilitätskomplex H-2K^b Klasse I Promotor in sich, der durch Interferon aktiviert wird. Zellen von dieser Immortomaus proliferieren nur bei 33 °C und in Gegenwart von γ -Interferon (γ -INF). Durch die Zugabe von γ -INF wird der H-2K^b Promotor aktiviert und die Expression des Immortoproteins ausgelöst. Bei einer Temperaturänderung zu 37 °C ohne γ -INF beginnen die Zellen zu differenzieren und stellen ihre Proliferation ein, da die Synthese des Immortoproteins gestoppt und vorhandenes Protein innerhalb kurzer Zeit abgebaut wird (138).

2.5.2 HEK293 Zellen

HEK293 (*Human embryonic kidney*) sind menschliche embryonale Nierenzellen, die mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 transformiert wurden (139). Aufgrund ihres adhärenen Wachstums und der leichten Transfizierbarkeit werden HEK-Zellen gerne als Modellorganismus verwendet. Dabei stehen nicht die Charakteristika der Zellen an sich im Vordergrund, sondern das Verhalten der experimentell eingebrachten Bestandteile (Plasmide) in z. B. Co-Immünpräzipitationen.

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Arbeiten

3.1.1 Mausstämme

PKC λ /i flox:

Nomenklatur: B6,129-Prkci^{flox(CMV-Cre)Lei}

Das Exon mit den Nucleotiden 110-233 im Gen für PKC λ wurde von zwei loxP Sequenzen flankiert, so dass dieses essentielle Exon von PKC λ durch das Hinzufügen einer Cre Rekombinase entfernt werden kann. C57BL/6 und 129P2/SV Hintergrund (140).

Podocin Cre:

Nomenklatur: B6,SJL-Tg^(NPHS2-Cre)

Eine Kassetten, die die Cre Rekombinase kodiert, wurde unter die Kontrolle des NPHS2 (Podocin) Promotors gestellt und das Konstrukt in eine Mauslinie integriert (141).

Immorto:

Nomenklatur: C57BL/6-Tg^(SV40tsA58TAg)

In das Genom der Immorto-Mäuse wurde die Promotorsequenz und der Transkriptionsstart des Haupthistokompatibilitätskomplexes H-2K^b Klasse I (MHC) Gens integriert. Daran wurde die Sequenz des thermolabilen Tumorantigens SV40 *large tumor antigen* (TAg), das vom Simian Virus 40 (SV40) temperatur-sensitiven Mutantenstamm tsA58 kodiert wird, gekoppelt (142).

PKC ζ -/-:

Nomenklatur: 129S2-Prkcz^{tm1Lei}

Das Gen für PKC ζ wurde durch homologe Rekombination inaktiviert, indem eine β -galactosidase/neomycin Kassetten (Lacneo) in die kodierende Sequenz eingefügt wurde, die die transkriptionelle Organisation des PKC ζ Lokus zerstört. 129/SV Hintergrund (108).

CD2AP-/-:

Nomenklatur: Cd2ap^{tm1shaw}129SvJ

In den CD2AP-/- Mäusen wurde das Exon, das die erste SCR Homology 3 (SH3) Domäne von CD2AP kodiert, durch ein Neomycin Resistenz Gen (NEO) ersetzt (37).

3.1.2 Haltung

Alle Tiere wurden im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen bei 21 °C in einem regelmäßigen 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und gezüchtet. Die Tiere erhielten Standardfutter mit freiem Zugang zu Leitungswasser.

3.1.3 Genotypisierung aus Schwanzspitzen-Biopsien

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien der Tiere gewonnen. Dazu wurden die Proben mit 400 µl Extraktionspuffer und 10 µl Proteinase K (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) versetzt und über Nacht bei 55 °C und 1000 U/min geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Proben 5 min bei RT stehen gelassen, 50 µl des Überstandes in ein neues Gefäß pipettiert, dieses mit 50 µl Isopropanol versetzt und durch leichtes Schütteln die DNA ausgefällt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm wurde die DNA abzentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 400 µl TE-Puffer versetzt und durch erneutes Schütteln über Nacht bei 55 °C und 1000 U/min wieder gelöst. Die so isolierte genomische DNA wurde für die Genotypisierungs-PCRs verwendet.

Extraktionspuffer:

100 ml 1M Tris pH 8,0
50 ml 0,5 M EDTA
10 ml 5 M NaCl
25 ml 20% SDS
315 ml bdH₂O

TE (Tris-EDTA)-Puffer:

10 mM Tris (1,21 g/l)
1 mM EDTA (0,372 g/l)
pH 7,5 einstellen,
auf 1 l mit bdH₂O auffüllen

3.1.4 Organentnahme

100 % Avertin:

10 ml 2-Methyl-2-Butanol
10 g Tribromoethanol
bei 4 °C dunkel lagern

Avertin Gebrauchslösung:

31,3 µl 100 % Avertin
1,218 ml Infusionslösung (z. B. PBS)
24 h bei 37 °C schütteln,
bei RT max. 1 Woche dunkel lagerbar

0,4 M Sörensenpuffer:

Stammlösung A: 0,4 M KH₂PO₄ (27,22 g auf 500 ml bdH₂O)
Stammlösung B: 0,4 M Na₂HPO₄ x 2H₂O (71,2 g auf 1000 ml bdH₂O)
Arbeitslösung: 1 Teil Lösung A + 4 Teile Lösung B, pH 7,38

0,26 M Sörensenpuffer:

65 ml Stammlösung A + 260 ml Stammlösung B, auf 500 ml mit bdH₂O auffüllen.

Vor der Organentnahme wurden alle Tiere mit Avertin-Gebrauchslösung betäubt (100 µl/10 g Mausgewicht). Nach Öffnung des Thorax folgte die Perfusion der Organe mit PBS, um das Blut aus den Organen zu spülen. Dazu wurde eine 27 G Nadel in die linke Herzkammer eingeführt und mindestens 10-20 ml PBS (je nach Größe der Maus) mit leichtem Druck durch die Organe gespült. Zum Abfluss des Blutes wurde die Leber vorher angeschnitten. Nach erfolgreicher Perfusion wurden die Organe präpariert, bei Bedarf mit einer Klinge halbiert und je nach Fragestellung weiterbehandelt.

Organe für Gefrierschnitte wurden für wenige Minuten in -35 bis -40 °C kaltes Methylbutan (auf Trockeneis gekühlt) gelegt, anschließend in flüssigem N₂ gefroren und bei -80 °C gelagert. Organe für Paraffinschnitte wurden in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in 0,13 M Sörensenpuffer bei 4 °C fixiert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Wechsel auf reinen Sörensenpuffer, der nach weiteren zwei Tagen noch einmal gewechselt wurde. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin. Organe für RNA-Isolationen wurden einen Tag in RNA-later[®] Lösung (Ambion Inc, Austin, Texas) bei 4 °C gelagert und dann bei -20 °C eingefroren. Organe für Western-Blot Analysen wurden direkt in flüssigem N₂ gefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Anfertigung von Gefrier- und Paraffingewebeschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die gefrorenen Organe in Tissue-Tek O.C.T. Compound auf dem Schneideblock fixiert. Anschließend wurden 6 µm Schnitte am Kryotom Leica CM3050S angefertigt und bei RT über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 10 min in eiskaltem Aceton bei -20 °C fixiert und danach getrocknet. Zur Lagerung wurden die Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.

Die Organe für Paraffinschnitte wurden vor der Einbettung in Paraffin zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe von Wasser befreit. Dies geschah automatisiert im Leica TP1020 Rondell (Programm: 3h 70 % Isopropanol, 1h 80 % Isopropanol, 2x 1h 90 % Isopropanol, 2x 1h 100 % Isopropanol, 1,5h 100 % Isopropanol, 1h Xylol, 2x 1,5h Xylol, 2x 2h Histowax). Anschließend wurden die Organe an der Ausgießstation Leica EG1160 komplett in Paraffin (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) eingebettet. Nach Aushärtung der Paraffinblöcke

erfolgte die Anfertigung der 3 µm Paraffinschnitte am Mikrotom Leica RM2245. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und weiter bei RT gelagert.

3.1.6 Uringewinnung

Die Uringewinnung bei Mäusen erfolgte spontan. Der beim Hochheben der Maus spontan oder nach Bauchmassage austretende Urin wurde auf Parafilm aufgefangen und bei -80 °C gelagert.

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Für alle Arbeiten mit Bakterienkulturen wurde folgendes LB-Medium und LB-Agarplatten verwendet.

LB-Medium:

5 g Trypton/Pepton
5 g Hefeextrakt
2,5 g NaCl
auf 500 ml mit bdH_2O auffüllen
pH 7,5 einstellen
autoklavieren

LB-Agar:

12,5 g BactoTM Agar in 500 ml LB-Medium
autoklavieren
nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C
Antibiotika zugeben

Antibiotika:

Ampicillin bzw. Kanamycin

Konzentration im LB-Medium: 75 µg/ml

Konzentration in LB-Agar-Platten: 100 µg/ml

3.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am Eppendorf Bio Photometer. Hierbei wurde die Absorption der verdünnten DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) gegen bdH_2O gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine OD_{260} von 1,0 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml.

3.2.2 Bestimmung der Bakteriendichte

Die Bestimmung der Bakteriendichte erfolgte am Eppendorf Bio Photometer. Hierbei wurde die Absorption der gegebenenfalls verdünnten Bakteriensuspension gegen reines LB-Medium bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen.

3.2.3 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Für eine Miniprep wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Isolation der Plasmid DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Konzentration der DNA gemessen und diese bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Auf Agarosegelen trennt man DNA-Moleküle nach ihrer Größe. Durch eine angelegte Spannung wandern die DNA-Moleküle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in Richtung Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit doppelsträngiger DNA-Moleküle umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

50 x TAE:

2 M Tris-Base	242,2 g
1 M Eisessig	57,1 ml
0,05 M EDTA	18,61 g $Na_2EDTA \times 2 H_2O$

auf 2 l mit bdH_2O auffüllen,
pH 8,3 mit Eisessig einstellen
Arbeitslösung: 1 x

Agarosegel: 1 % Agarose in 1x TAE + 0,5 µg/ml Ethidiumbromid.

Zur Auftrennung von DNA Molekülen wurden je 10 µl Probe mit Auftragspuffer versetzt und in einer geeigneten Gelkammer auf einem 1 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (Stocklösung: 10 mg/ml, Endkonzentration: 0,5 µg/ml) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V. Als Standard wurde Easy LadderI (Bioline) verwendet. Die Banden auf dem Gel wurden nach dem Lauf mit Hilfe von UV-Licht detektiert und dokumentiert.

3.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen

TSS-Medium:

10 % (w/v) PEG 10000	1 g
5 % (v/v) DMSO	0,5 ml
50 mM MgCl ₂	0,1 g (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)

mit LB-Medium auf 10 ml auffüllen und autoklavieren

Aus einer DH5 α -Glycerinkultur wurde eine 5 ml Vorkultur in LB-Medium angeimpft und Ü/N bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 20 ml frisches LB-Medium gegeben und erneut bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 (exponentielle Wachstumsphase), ca. 2 Stunden, inkubiert. Danach wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt, um das Wachstum der Bakterien zu stoppen. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 4 ml TSS-Medium vorsichtig resuspendiert. Mit sterilen Spitzen wurden 100 μ l Aliquots genommen und diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.2.6 Transformation von kompetenten Bakterien-Zellen

Die kompetenten DH5 α -Zellen (100 μ l) wurden auf Eis aufgetaut und wenige μ l des Plasmids auf die Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 45 min auf Eis inkubiert und danach 2 min bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, für 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das noch mit einem geringen Volumen LB-Medium bedeckte Pellet wurde resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend einzelne Kolonien gepickt.

3.2.7 RNA Isolation aus Gewebe oder Zellen

Die RNA Isolation aus Gewebe oder Zellen erfolgte mit dem RNeasy[®]MiniKit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Proben wurden in 700 μ l RLT-Puffer (+1/10 β -Mercaptoethanol) lysiert, auf QiaShredder Säulen (Qiagen) gegeben und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde mit 700 μ l 70 % Ethanol versetzt und auf die Mini Säulen gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen. Darauf folgte der DNase Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen). Hierbei wurden 70 μ l RDD Puffer mit 10 μ l DNase versetzt, diese auf die Säule gegeben und 15 min inkubiert. Nach dem Verdau wurde einmal mit 350 μ l RW1 Puffer und zweimal mit 500 μ l RPE Puffer gewaschen.

Hierauf folgte eine Zentrifugation ohne Puffer zum Trocknen der Säule. In einem neuen Gefäß wurden 30 µl Wasser auf die Säule gegeben, 1 min inkubiert und die aufgereinigte RNA durch Zentrifugation gewonnen. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert oder sofort in cDNA umgeschrieben.

3.2.8 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde 1 µg RNA mit DEPC Wasser (Applied Biosystems, Ambion, CA, USA) auf ein Gesamtvolumen von 28 µl gebracht. Hierzu wurden je Ansatz 2,3 µl Oligo(dT)₁₅ Primer (Promega, Mannheim, Deutschland) und 2,3 µl Random Primer (Promega) gegeben und der Ansatz 10 min bei 70 °C inkubiert. Dann wurden 9,3 µl M-MLV Puffer (Promega), 2,3 µl dNTPs (Fermentas) und 2,3 µl M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) zugegeben und erst 90 min bei 42 °C und dann 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

3.2.9 Real-time-PCR

Die Real-time-PCR (rt-PCR) erfolgte mit dem Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) System. Die cDNA wurde mit Fast Start Taq Polymerase, SYBR Green (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), genspezifischen Primern und folgenden PCR Bedingungen amplifiziert: 5 min bei 95 °C, 45 Zyklen: 10 s bei 95 °C, 10 s bei 60 °C und 10 s bei 72 °C. Fast Start Taq Polymerase, Puffer, MgCl₂ und dNTPs wurden dem Fast Start Taq DNA Polymerase dNTP Pack (Roche Diagnostics) entnommen.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden mit Master-Mix nach folgendem Schema in 96well Platten pipettiert, mit Folie versiegelt, anzentrifugiert und im Light Cycler 480 gemessen.

Mastermix:

1 ml 10x Puffer
0,8 ml MgCl₂ (25 mM)
0,2 ml dNTPs (10 mM)
0,5 ml 10x SYBR Green
1 ml 0,1 % Tween-20
1,5 ml DEPC-Wasser

Reaktionsansatz:

10 µl Mastermix
1 µl Hin-Primer
1 µl Rück-Primer
0,1 µl Fast Start Taq Polymerase
6,9 µl DEPC-Wasser

Die Überprüfung der Spezifität des Amplifikationsproduktes erfolgte durch Analyse der Schmelzkurven. Alle Proben wurden als Dreifachwerte gemessen und normalisiert gegen das konstitutiv exprimierte Gen Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase-1 (HPRT-1).

3.2.10 Konventionelle PCR

Alle hier durchgeführten PCR-Reaktionen wurden an der PCR-Maschine Primus MWG-Biotech oder Px2 ThermoHybaid durchgeführt. Für die PCR-Reaktionen wurden die Reagenzien des Taq DNA Polymerase Kits (Qiagen) verwendet. Alle PCR-Ansätze und Temperaturprogramme erfolgten nach Standardprotokollen mit jeweils unterschiedlichen Primerpaaren und angepassten Annealing-Temperaturen (Tabelle 6). Als Template wurde 1 μ l genomische DNA, die aus den Schwanzspitzenbiopsien isoliert wurde, eingesetzt.

Tabelle 6 PCR-Bedingungen bei Genotypisierungen.

PCR	Primer	Annealing-Temperatur	Fragmentgröße
Cre	Crehin: AGGTTTCGTTCACTCATGGA Crerück: TGCACCAGTTTAGTTACCC	60 °C	250 bp
PKC λ /flox	loxPhin: TTGTGAAAGCGACTGGATTG loxPrück: CTTGGGTGGAGAGGCTATTC WTrück: AATGTTTCATGTTCAACACTGCT	57 °C	WT: 355 bp Flox: 1000 bp
Immorto	Immortohin: CCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTG Immortorück: TTAGAGCTTTAAATCTCTGTAGGTAG	58 °C	600 bp
PKC ζ	Highzeta5in: GCCATCTCCAACAGCCACAG Highzeta5ex: CCGTTGGCTCGGTACAGCTT MO13: CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	57 °C	WT: 300 bp KO: 800 bp

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben in einer 96well Platte. Hierbei wurden jeweils 5 μ l der verschiedenen BSA-Konzentrationen (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0 mg/ml) als Standardreihe verwendet. Von den Proben wurden ebenfalls 5 μ l eingesetzt. Zu den Standards und Proben wurden 200 μ l Working Reagenz (50A:1B) gegeben und die Platte für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden die

Extinktionen aller Proben bei 546 nm im Plattenlesegerät Tecan Sunrise gemessen und mit Hilfe der Standardreihe die Konzentrationen der Proben berechnet.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine aufgrund des denaturierenden SDS ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht. In einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli ergibt sich somit eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Wanderung des Proteins.

10 x Elektrophoresepuffer:

250 mM Tris 60 g
 1,92 M Glycin 288 g
 1 % SDS 20 g
 auf 2 l mit bidestilliertem Wasser auffüllen,
 pH 8,2 – 8,4
 Arbeitslösung: 1 x

6 x Auftragspuffer:

0,5 M Tris pH 6,8 7 ml
 0,35 M SDS 1 g
 30 % Glycerin 3 ml
 0,6 M DTT 0,93 g
 0,175 mM Bromphenolblau 1,2 mg

Die gewünschte Menge Protein (meist 10 µg) wurde mit 6 x Auftragspuffer versetzt und die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Lysate auf einem SDS-Gel in einer Gelelektrophoresekammer in 1x Elektrophoresepuffer bei 70 V aufgetrennt. Nach Verlassen des Sammelgels wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Page Ruler™Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

Je nach Größe des zu erwarteten Proteins wurden unterschiedlich konzentrierte Trenngele mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet. Bei sehr großen Proteinen (> 130 kDa) wurden 8 % Gele, bei sehr kleinen Proteinen (< 40 kDa) 12 % Gele und bei allen anderen Proteinen 10 % Gele verwendet. Die Zusammensetzung der unterschiedlich konzentrierten Trenngele ist in Tabelle 7 dargestellt. Für alle Gele wurden 4 % ige Sammelgele verwendet.

Tabelle 7 Zusammensetzung der unterschiedlich konzentrierten Trenngele.

	8 %	10 %	12 %
Acrylamid (30%)	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
bdH ₂ O	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl

Sammelgel (4 %):

21,4 ml Acrylamid (30 %)
1,6 ml 10 % SDS
40 ml 0,5 M Tris pH 6,8
95,2 ml bidestilliertes Wasser
+ Bromphenolblau
→ pro Gel 4 ml dieser Lösung
+ 40 µl 10 % APS
+ 4 µl TEMED

3.3.3 WesternblotBlotpuffer:

Glycin 15 g
Tris-Base 30 g
auf 5 l mit bdH₂O auffüllen

1 x TBST:

20 ml 1 M Tris/HCl pH 7,4
18 g NaCl
1 ml Tween 20
auf 2 l mit bdH₂O auffüllen

Entwicklerlösung:

Tetenal Roentgen Liquid
1+3,5 mit Wasser ansetzen

Fixierlösung:

Tetenal Roentgen Superfix
1+4 mit Wasser ansetzen

Um die Proteine eines Polyacrylamidgeles auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P Membran, Millipore, Bedford, MA, USA) zu überführen, wurde das Gel nach folgendem Blotschema in eine Blotapparatur eingebaut. Die Proteine sind aufgrund des basischen Blotpuffers negativ geladen und wandern daher in Richtung Anode.

Blotschema:

oben: Kathode
Schwamm
Filterpapier
Gel
PVDF-Membran
Filterpapier
Schwamm
unten: Anode

Die Membran wurde vor Benutzung kurz in Methanol und anschließend in Wasser geschwenkt. Der Western Blot erfolgte in einer gekühlten Apparatur für 2 h bei 400 mA. Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran wieder in Methanol und anschließend in Wasser geschwenkt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran 1 h in 2 % BSA in TBST (bzw. 5 % Milchpulver) geblockt. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 30 min

in TBST gewaschen und 1 h bei RT mit Sekundärantikörper inkubiert und wieder 30 min mit TBST gewaschen

Die Detektion der HRP-gekoppelten Antikörper erfolgte mit dem SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Nur bei der Detektion der aktiven Formen von RhoA, Rac1 und Cdc42 wurde das Immun-Star[™] WesternC[™] Kit (Biorad, Hercules, CA, USA) mit einer niedrigeren Detektionsgrenze verwendet. Die anschließende Entwicklung erfolgte auf Amersham Hyperfilm[™] ECL-High performance chemiluminescence Filmen (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK).

3.3.4 Coomassiefärbung

Eine Färbung mit Coomassielösung färbt alle auf dem Gel aufgetrennten Proteine blau an. Die Hintergrundfärbung wird nach der Färbung mit 7 % Essigsäure wieder entfärbt.

Färbelösung:

0,2 g Coomassie Brilliant Blue R
0,05 g Coomassie Brilliant Blue G
42,5 ml Ethanol
5 ml Methanol
10 ml Essigsäure
auf 100 ml mit bdH₂O auffüllen

Entfärbelösung:

7 % Essigsäure in H₂O

Das fertige Polyacrylamid-Gel wurde in Färbelösung einige Minuten erhitzt bis das Gel komplett blau angefärbt war. Nach einem Waschschriff in Wasser wurde das Gel in 7 % Essigsäure erneut erhitzt bis die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund abhoben.

3.3.5 Co-Immunpräzipitation

HEK-RIPA:

50 mM Tris-HCl pH 7,5 0,606 g
200 mM NaCl 1,16 g
1 mM EDTA 0,03 g
1 mM EGTA 0,045 g
1 % Triton-X 100 1 ml
0,25 % Na-Deoxycholat 0,25 g
auf 100 ml mit bdH₂O auffüllen, frisch Protease- und Phosphataseinhibitoren zugeben.

Triton-Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,5 6,1 g
150 mM NaCl 8,76 g
1 % Triton-X 100 10 ml
auf 1 l mit bdH₂O auffüllen.

Zur Co-Immunpräzipitation Flag-markierter Proteine wurden HEK293 Zellen mit Plasmiden transient transfiziert, die die zu untersuchenden Proteine in den Zellen exprimieren.

Die transfizierten Zellen wurden in 900 µl HEK-RIPA 15 min auf Eis lysiert und anschließend 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 30 µl Aliquots mit 6 x Auftragspuffer versetzt und bei -80 °C eingefroren. Der restliche Überstand wurde mit 50 µl Flag-beads (50 %ige Suspension) (anti-FLAG M2 affinity gel, Sigma) versetzt und 2 h bei 4 °C rotiert. Danach wurden die Beads 1 min bei 3000 rpm runterzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Beads in 1 ml HEK-RIPA resuspendiert und 5 min bei 4 °C rotiert (5x wiederholen). Dann wurden die Beads mit 6 µl 6 x Auftragspuffer versetzt und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt oder bei -80 °C kurzfristig gelagert.

Vor der Verwendung wurden die Flag-beads zweimal mit Triton-Puffer (+1% BSA) preabsorbiert, zentrifugiert und anschließend in 1 Volumen Triton Puffer (+1% BSA/0,1% NaN₃) zur Lagerung bei 4 °C aufgenommen (50 %ige Suspension).

3.4 Zellkultur

Alle Arbeiten mit murinen Podozyten wurden unter Sterilbänken durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in befeuchteten Brutschränken bei 5 % CO₂ und 33 °C bzw. 37 °C. Bei allen Arbeiten mit lebenden Zellen wurde das RPMI-Medium und PBS im Wasserbad auf 37 °C vortemperiert.

RPMI-Medium:

RPMI-Medium1640 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

+ 10 % FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

+ 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, Invitrogen)

PBS:

DPBS 10x 14200 (Invitrogen), 1:10 in bdH₂O, autoklaviert

3.4.1 Kultivierung muriner Podozyten

Immortalisierte Maus Podozyten wurden zur Proliferation in mit Collagen Typ 1 beschichteten Flaschen in RPMI-Medium mit 10 U/ml γ -Interferon (γ -IFN, Cell Sciences, Canton, MA, USA) bei 33 °C gehalten. Sobald die Zellen 80-90 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert (alle 2-3 Tage). Zur Differenzierung wurden die Zellen 14 Tage in RPMI-Medium ohne γ -IFN bei 37 °C gehalten. Während der Differenzierung wurde alle 2-3 Tage das Medium in den Schalen oder Flaschen gewechselt.

Beschichten der Flaschen:

Die Beschichtung der Flaschen erfolgte für 30 min mit einer Lösung aus 10 ml 20 mM Natriumacetat und 0,2 ml Collagen Typ 1 (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) bei Raumtemperatur. Dann wurden die Flaschen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Verwendung mit PBS gefüllt.

Passagieren der Podozyten:

Vor dem Passagieren wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA (Biochrom AG) bei 33 °C von der Oberfläche gelöst und nach Zugabe von 5 ml Medium 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Medium resuspendiert. Etwa 250 000 Zellen wurden in RPMI-Medium (10 U/ml γ -IFN) pro Flasche bei 33 °C weiterkultiviert.

Differenzieren:

Zum Differenzieren wurden 70 000 Zellen auf Platten mit 10 cm Durchmesser bzw. 5000 Zellen in 24well Platten in RPMI-Medium ausgesät. Die Platten wurden für 14 Tage bei 37 °C kultiviert, bevor sie geerntet wurden.

3.4.2 Generierung monoklonaler Zelllinien aus murinen Glomeruli

Zur Gewinnung monoklonaler Podozyten-Zelllinien aus Immorto-transgenen Mäusen, wurden die Nieren der Tiere möglichst steril entnommen, die Nierenkapsel entfernt und die Nieren vorsichtig durch Siebe verschiedener Maschenweite (180 μ m, 100 μ m, 71 μ m) passiert. Hierbei wurde mit reichlich kaltem PBS gespült, um möglichst viele Tubulifragmente zu entfernen. Auf dem kleinsten Sieb sammelte sich die Glomerulifraktion, die 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in RPMI-Medium aufgenommen und in eine Collagen-beschichtete Kulturflasche mit RPMI-Medium + 50 U/ml γ -INF gegeben, die bei 33 °C kultiviert wurde. Nach 3-4 Tagen wuchsen die ersten Zellen aus den Glomeruli. Nach etwa einer Woche wurden die gewachsenen Zellen trypsiniert und auf neue Flaschen verteilt. Um Einzelzellen zu isolieren, wurden 96well Platten beschichtet und in der ersten Spalte je Vertiefung 1000 Zellen in 100 μ l Medium (100 U/ml γ -INF) gegeben. Um die Zellen weiter zu verdünnen, wurde in alle anderen Vertiefungen 80 μ l Medium (100 U/ml γ -INF) vorgelegt und immer aus der weiter links gelegenen Vertiefung 20 μ l Zellsuspension in die nächste Vertiefung pipettiert. Durch die so entstandene Verdünnungsreihe (*limited dilution*) konnten unter dem Mikroskop einzelne Vertiefungen markiert werden, in denen sich jeweils nur eine

Zelle befand (Abbildung 9). Aus den Einzelzellen wurden monoklonale Zelllinien kultiviert, die zur Kontrolle differenziert und auf die Expression Podozyten-spezifischer Marker untersucht wurden.

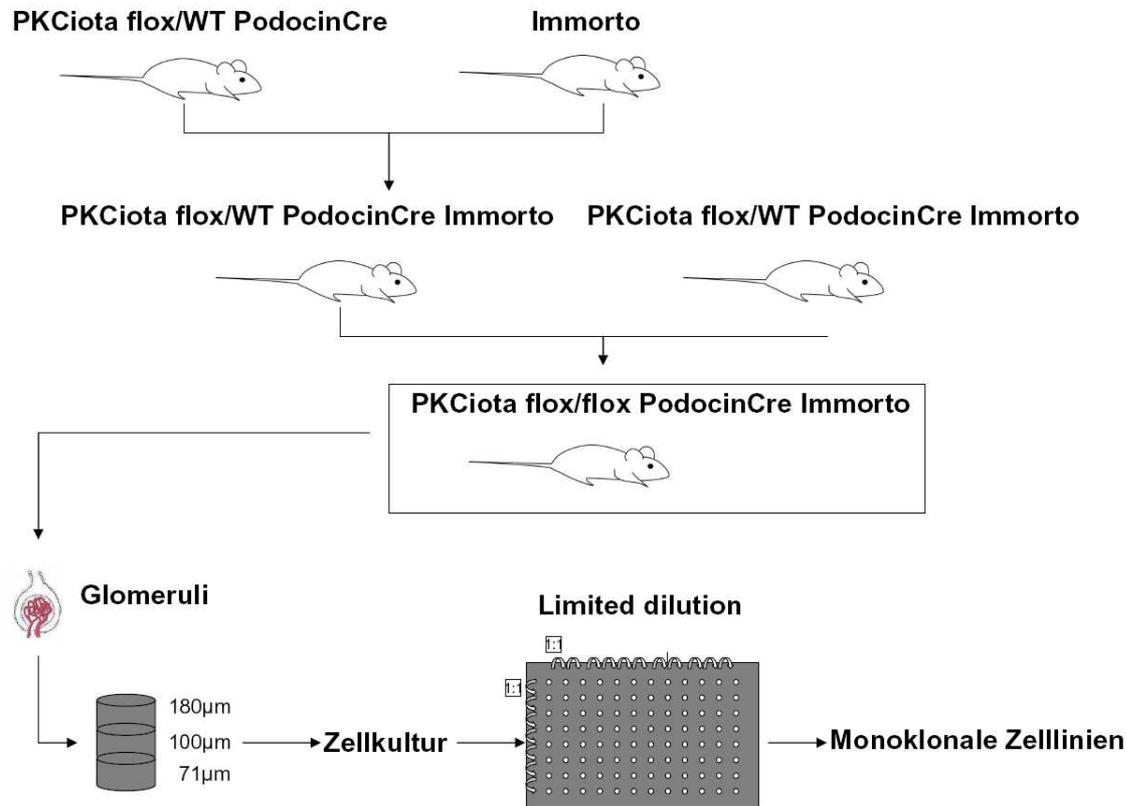


Abbildung 9 Generierung monoklonaler Zelllinien aus Immorto-transgenen Mäusen.

3.4.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen wurden grundsätzlich in mit flüssigem Stickstoff (Linde AG, Hannover, Deutschland) gefüllten Tanks in einer Lösung aus 10 % DMSO in FCS gelagert. Um eine Zellkultur aufzutauen, wurden die Zellen in warmem RPMI-Medium aufgenommen und 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in RPMI-Medium resuspendiert und in eine Flasche mit RPMI-Medium gegeben. Bei Podozyten wurde dem Medium direkt nach dem Auftauen eine erhöhte Konzentration γ -INF (Endkonzentration: 50 U/ml) zugesetzt. Um Zellen einzufrieren, wurde das Zellpellet in 1 ml 10 % DMSO in FCS aufgenommen, die Suspension auf Eis abgekühlt, über Nacht bei -70 °C eingefroren und am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt.

3.4.4 Zellernte

Lyse-Puffer:

1 x RIPA 10 ml
 NaVO₄ (100 mM) 100 µl
 NaF (1M) 500 µl
 Proteaseinhibitor 1 Tablette
 Lagerung bei -20 °C
 Pro 1 ml Lyse-Puffer
 10 µl Ocadaicacid zugeben

1 x RIPA:

50 mM Tris 0,6 g in 100 µl lösen, pH 7,5
 150 mM NaCl 0,88 g
 0,1 % SDS 0,1 g
 0,5 % Na-Deoxycholate 0,5 g
 1 % Nonidet P-40/Tergitol 1 g
 mit der hergestellten 50 mM Tris-Lösung auf
 100 ml auffüllen

Die Zellen wurden vor dem Lysieren mit kaltem PBS gewaschen und dann je nach Plattengröße mit 80-250 µl Lyse-Puffer auf Eis lysiert. Das Lysat wurde für mindestens 1 h bei -80 °C eingefroren oder 1 h bei 4 °C rotiert, dann 15 min bei 11000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Aus dem Überstand wurde die Proteinmenge bestimmt und alle weiteren Experimente durchgeführt.

3.4.5 Transiente Transfektion

Um Podozyten transient zu transfizieren, wurden am Tag vor der Transfektion in einer 24well Platte je 5000 Zellen auf Coverslips ausgesät und in RPMI-Medium mit 10 U/ml γ -Interferon bei 33 °C kultiviert. Die Transfektion der Podozyten erfolgte mit FuGENE[®]HD Transfektionsreagenz (Roche) nach Herstellerangaben. 0,5 µg Plasmid-DNA wurden mit 3 µl FuGENE[®]HD Reagenz in 100 µl serumfreiem Medium gegeben, gevortext, 20 min bei RT inkubiert und auf die zu transfizierenden Zellen in RPMI-Medium gegeben. Dann wurden die Zellen für 48-72 h bei 37 °C kultiviert, bevor sie fixiert oder weiter behandelt wurden.

Die transiente Transfektion der HEK293 Zellen erfolgte genauso wie bei den Podozyten, mit dem Unterschied, dass 2 µg Plasmid und 6 µl FuGENE[®]HD Reagenz eingesetzt wurden.

Für die Transfektion von siRNA wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden ebenfalls am Tag vor der Transfektion ausgesät und bei 33 °C kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. 20 pmol siRNA wurden in 50 µl serumfreies Medium gegeben. In ein anderes Aliquot von 50 µl serumfreiem Medium wurde 1 µl Lipofectamine gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Aliquots vermischt, weitere 20 min bei RT inkubiert und auf die Zellen gegeben, die mit 500 µl antibiotikafreiem

Medium bedeckt sind. Nach 6 h erfolgte der Mediumwechsel auf normales RPMI-Medium mit FCS und Antibiotikum. Nach 48-72 h bei 37 °C wurden die Zellen fixiert oder lysiert.

3.4.6 Gewinnung genomischer DNA aus Zellen

Genomische DNA aus Podozyten wurde mit dem Gen EluteTMMammalian Genomic DNA MiniPrep Kit (Sigma) isoliert. Dazu wurde das Zellpellet nach Herstellerangaben resuspendiert, lysiert und die genomische DNA über eine Säule aufgereinigt. Die isolierte genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert.

3.5 Färbungen

3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierschnitten

Vor der Färbung wurden die aufgetauten Schnitte 5 min mit PBS inkubiert und 30 min mit 10 % Eseserum (Jackson Immuno Research, Suffolk, England) geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Darauf folgte die Inkubation mit verdünntem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der ungebundene Primärantikörper abgewaschen (3x 5 min PBS) und die Schnitte 1 h bei RT mit Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und die Schnitte mit Aquapolymount Eindeckmedium (+DAPI) (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) versiegelt. Die Färbung wurde am Leica DMLB Mikroskop mit der Kamera Leica DFC425C analysiert.

Die Färbungen der Gefrierschnitte für Abbildung 10 und Abbildung 14 erfolgten in Kooperation mit Dr. Björn Hartleben (Universität Freiburg) und wurden an einem Zeiss Lasermikroskop mit 63 x Öl-Objektiv dokumentiert.

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung auf Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf Coverslips ausgesät und gegebenenfalls ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert, mit PBS gewaschen und in PBS bei 4 °C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Zellen 10 min mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und danach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Antikörperbindungen mit 10 % Eseserum blockiert. Die folgende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C (oder 1 h bei RT). Am nächsten Tag wurde der ungebundene

Primärantikörper abgewaschen (3x 5 min PBS) und die Zellen wurden 1 h bei RT mit entsprechendem Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und die Coverslips mit Aquapolymount Eindeckmedium (+DAPI) auf Objektträgern fixiert. Die Färbung wurde am Leica DMLB Mikroskop mit der Kamera Leica DFC425C analysiert.

3.5.3 Phalloidin-Färbung

Die Phalloidinfärbung erfolgte auf Coverslips mit 14 Tage differenzierten Zellen. Die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert, mit PBS gewaschen und in PBS bei 4 °C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Zellen 10 min mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und danach mit PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte mit 10 % FCS in PBS für 30 min bei RT. Die Inkubation mit dem bereits gekoppelten AlexaFluor 546 Phalloidin Antikörper erfolgte in einer 1:100 Verdünnung in PBS für 30 min bei 37 °C. Danach wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen und mit Aquapolymount Eindeckmedium (+DAPI) auf Objektträgern fixiert. Die Färbung wurde am Leica DMLB Mikroskop mit der Kamera Leica DFC425C analysiert.

3.5.4 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung erfolgte auf Paraffinschnitten, die vor der Färbung in einer fallenden Alkoholreihe entparaffiniert werden mussten (3x 5 min HistoClear, 3x 3 min 100 % Ethanol, 2x 2 min 96 % Ethanol, 1x 1 min 70 % Ethanol, 1x kurz 50 % Ethanol und 1x kurz destilliertes Wasser). Nach dem Entparaffinieren wurde mit 0,5 % Periodsäure 10 min oxidiert, 3x 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen und 20 min in Schiffscher Reagenz inkubiert. Darauf folgte die Differenzierung in Sulfitwasser (12 ml 10 % Na₂SO₃, 10 ml 1M HCl, 200 ml bdH₂O) 3x für 2 min und ein ca. 10 minütiger Waschschrift unter fließendem Leitungswasser. Vor dem Eindecken mit Histokitt wurden die Schnitte in umgekehrter Reihenfolge durch die Alkoholreihe gebracht (2x kurz 96 % Ethanol, 3x 2 min 100 % Ethanol, 3x 2 min HistoClear). Die Dokumentation der PAS-Färbung erfolgte am Leica DMLB Mikroskop mit der Kamera Leica DFC425C.

3.6 Rho/Rac/Cdc42 Aktivitäts-Assay

Die Rho, Rac1 und Cdc42 Aktivitäts-Assays erfolgten mit dem Rho Activation Assay Biochem Kit, Rac1 Activation Assay Biochem Kit bzw. dem Cdc42 Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, Denver, CO, USA).

Der Rho Assay nutzt die Rho Bindungsdomäne (RBD) des Rho Effektors Rhotekin, die spezifisch die GTP-gebundene Form von Rho bindet. Das Rhotekin-RBD Protein ist an Glutathione-Sepharose-Beads gebunden, die so einen „*Pulldown*“ von GTP-Rho ermöglichen. Im Western Blot wird das aktive Rho mit einem Rho-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Rac1 und Cdc42 Assay nutzt die Cdc42/Rac interaktive Bindungsregion (CRIB), die auch p21 Bindungsdomäne (PBD) genannt wird, des Cdc42/Rac Effektorproteins p21 activated kinase 1 (PAK). Dieses Motiv bindet spezifisch an die GTP-gebundenen Form von Rac oder Cdc42. Das PAK-PBD ist ebenfalls an Glutathione-Sepharose-Beads gebunden, was einen „*Pulldown*“ von GTP-Rac oder GTP-Cdc42 ermöglicht. Mit spezifischen Antikörpern wird das aktive Rac oder aktive Cdc42 im Western Blot nachgewiesen.

Für die Aktivitäts-Assay wurden die Podozyten 14 Tage differenziert. Die differenzierten Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 200 µl Lysepuffer (+ 0,5 % Natrium-Deoxycholat, 0,1 % SDS, 1x Proteaseinhibitor-Cocktail) lysiert und 2 min bei 11000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Mit einem Teil des Überstandes wurde die Proteinbestimmung durchgeführt.

Für die Assays wurden jeweils 500 µg der Lysate mit Lysepuffer auf gleiches Volumen eingestellt und mit 30 µl Rhotekin RBD beads oder 20 µl PAK-PBD beads 1 h bei 4 °C rotiert. Dann wurden die Beads 1 min bei 11000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Beads mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Beads in 5 µl 6x Auftragspuffer resuspendiert, 5 min bei 95 °C erhitzt und auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Gelaufentrennung wurden die Proteine auf PVDF Membranen geblottet (90 min, 400 mA), 1 h in 5 % Milchpulver geblockt und über Nacht in RhoA, Rac1 (jeweils 1:500) oder Cdc42 Antikörper (1:250) inkubiert.

3.7 Mikroarray

Die Podozyten für die Mikroarray-Analysen wurden 14 Tage bei 37°C differenziert und anschließend die RNA mit dem RNeasy[®]MiniKit (Qiagen) isoliert.

Für die Mikroarray Analyse wurde der „Whole Mouse Genome Oligo Microarray“ (G4122F, ID 014868, Agilent Technologies) verwendet. Dieser Array enthält 45018 Oligonukleotid Sonden, die das gesamte murine Transkriptom umfassen. Die Durchführung der Mikroarrays erfolgte in Kooperation mit Dr. Oliver Dittrich-Breiholz aus dem Institut für Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover. Die Synthese der Cy3-markierten cRNA erfolgte mit dem „Quick Amp Labeling Kit, one color“ (#5190-0442, Agilent Technologies) entsprechend der Herstellerbeschreibung. Die cRNA Fragmentierung, Hybridisierung und die Waschschritte wurden ebenfalls wie empfohlen durchgeführt: „One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol V5.7“ (siehe <http://www.agilent.com> für Details). Die Mikroarray-Chips wurden auf dem Agilent Micro Array Scanner G2565CA bei zwei verschiedenen PMT Einstellungen (100 % und 5 %) gescannt, um den dynamischen Bereich der Messung zu erhöhen (*extended dynamic range mode*). Die Extraktion der Daten erfolgte mit der „Feature Extraction Software V10.7.1.1) mit dem empfohlenen Standard Extraktionsprotokollprogramm: GE1_107_Sep09.xml.

Die erhaltenen Intensitätswerte des grünen Kanals („gProcessedSignal“ oder „gPS“) werden durch globale lineare Skalierung normalisiert: Alle gPS Werte einer Probe werden mit einem Array-spezifischen Skalierungsfaktor multipliziert. Diesen Skalierungsfaktor erhält man aus der Division des Referenz 75th Perzentilwertes (auf 1500 gesetzt für die gesamte Serie) und des 75th Perzentilwertes des jeweiligen Mikroarrays („Array i“ in der unten gezeigten Formel). Dementsprechend wurden alle normalisierten gPS Werte für alle Proben (Mikroarray Datensätze) mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Normalisierter gPS}_{\text{Array } i} = \text{gPS}_{\text{Array } i} \times (75^{\text{th}} \text{ Perzentile}_{\text{Referenz Array}} / 75^{\text{th}} \text{ Perzentile}_{\text{Array } i})$$

Ein unterer Schwellenwert wurde als 1 % des Referenz 75th Perzentilwertes (=15) gesetzt. Alle normalisierten gPS Werte, die unter diese Intensitätsgrenze fallen, werden durch den stellvertretenden Wert 15 ersetzt.

Die Kalkulation der im Verhältnis stehenden Werte der relativen Genexpression erfolgte mit Hilfe von Excel Makros.

3.8 Erstellung der *Heatmaps*

Für die Erstellung der sogenannten *Heatmaps* wurde das Programm Multi Experiment Viewer (MeV) 4.5.1 verwendet. Hierbei wurden zur besseren Darstellung der Dynamik die Intensitätswerte der zu vergleichenden Arrays in Microsoft Excel logarithmiert und

anschließend der Mittelwert über alle Intensitäten jedes Gen gebildet. Die gebildeten Mittelwerte wurden von allen Intensitäten subtrahiert und die erhaltenen Werte als Text-Datei (.txt) gespeichert.

Diese Daten konnten in das Programm MeV geladen werden. Die Grenzen für die Farbmarkierungen wurden jeweils auf den höchsten und niedrigsten Wert des Arrays gesetzt, so dass sich alle Werte im Farbmarkierungsbereich befinden. In den *Heatmaps* stellen die grünen Farben eine reduzierte Genexpression und die roten eine verstärkte Genexpression dar. Zur Clusteranalyse wurde der Unterpunkt „*Hierarchical Clustering*“ ausgewählt. Die Gruppierung der Gene erfolgte mit den Einstellungen „*Euclidean Distance*“ und „*Average linkage clustering*“.

3.9 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Dr. J.U. Becker).

Eine kleine Gewebeprobe mit maximal 1 mm Kantenlänge wurde in 2 % Glutaraldehyd fixiert, danach in 4% Osmiumtetroxid nachfixiert/kontrastiert, entwässert und in Epon eingebettet. Anschließend wurden die Proben mit Uranylacetat (alkoholische gesättigte Lösung) und Bleicitrat (nach Reynolds, 1963 (143)) nachkontrastiert, auf einem Ultramikrotom geschnitten und auf Kupfergrids aufgezogen. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 10 A/B (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

3.10 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel oder mit GraphPad Prism. Von den Einzeldaten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet, die als Fehlerbalken in den Diagrammen wiedergegeben sind. Der Vergleich der Versuchsgruppen erfolgte mit dem Student's t-Test. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung und Untersuchung der Podozyten-spezifischen α PKC $\lambda/1$ Knockout Maus

4.1.1 Die Podozyten-spezifische Deletion von α PKC $\lambda/1$ bewirkt einen schweren glomerulären Phänotyp

Der Par3- α PKC-Par6 Polaritätskomplex wurde kürzlich als neue Komponente der glomerulären Schlitzmembran identifiziert (79). Da beide α PKC Isoformen in kultivierten Podozyten exprimiert werden, war es von großem Interesse, die Funktion der zwei Isoformen *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen und zu klären, welche Isoform für den Podozyten essentiell ist. PKC ζ -defiziente Mäuse zeigen lediglich in späteren Stadien Veränderungen an den sekundären lymphatischen Organen (108), der komplette Knockout (KO) von PKC $\lambda/1$ ist jedoch embryonal letal (144).

Um die Rolle von PKC $\lambda/1$ genauer zu untersuchen, haben wir PKC $\lambda/1$ zellspezifisch entfernt. Wir haben dazu Mäuse, in denen ein essentielles Exon von PKC $\lambda/1$ (Nukleotide 110-233) von zwei loxP Sequenzen flankiert ist („gefloxt“) (140) mit Podocin-Cre Mäusen (141) gekreuzt. Podocin ist ein Protein, das ausschließlich von Podozyten exprimiert wird (141). Die Cre Rekombinase ist das 38 kDa-große Produkt des Cre (*Cyclization recombination*) Gens des Bakteriophagen P1. Cre erkennt die sogenannte loxP (*locus of X-over of P1*) Sequenz des Bakteriophagen P1 und katalysiert eine DNA Rekombination zwischen zwei loxP Sequenzen. Je nach Orientierung der beiden loxP Sequenzen zueinander kann es zu einer Inversion, Exzision, Integration oder Translokation der DNA Sequenz kommen (145). In den Podocin-Cre Mäusen wird die Cre-Rekombinase abhängig vom Podocin-Promotor spezifisch in Podozyten exprimiert. Sie erkennt die loxP Sequenzen, die PKC $\lambda/1$ flankieren, und schneidet es heraus. Um den Podozyten-spezifischen Verlust von PKC $\lambda/1$ zu bestätigen, wurden Gefrierschnitte von 6-Tage-alten Knockout und Wildtyp (WT) Nieren angefertigt. Die Schnitte wurden mit PKC $\lambda/1$ spezifischen Antikörpern gefärbt und zusätzlich mit Nidogen, einem Marker für die glomeruläre Basalmembran. In den Kontrollschnitten kann PKC $\lambda/1$ glomerulär detektiert werden, in den Knockout Glomeruli ist PKC $\lambda/1$ ab der *capillary loop* Entwicklungsphase nicht mehr detektierbar. Dies korreliert mit dem Beginn der Podocin Expression in entwickelnden Glomeruli. Eine gute Kontrolle für die Podozyten-spezifische Deletion ist die PKC $\lambda/1$ Expression in den Tubuli, die auch im Knockout noch detektierbar ist (Abbildung 10).

Die Podozyten-spezifischen PKC λ /1 Knockout Mäuse werden gesund geboren und unterscheiden sich in den ersten zwei Wochen nicht sichtbar von den Wildtyp Nachkommen. Mit etwa drei Wochen zeigen die Knockout Mäuse erste Wachstumsstörungen und im Urin sind deutliche Anzeichen von Proteinurie zu detektieren.

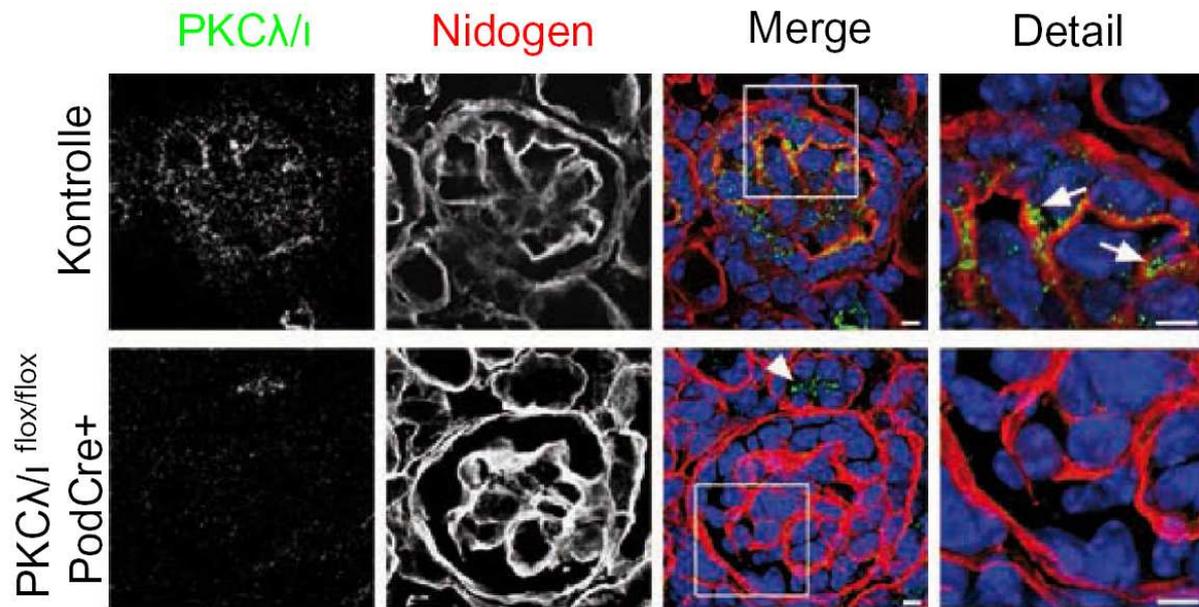


Abbildung 10 Podozyten-spezifischer Verlust von aPKC λ /1.

Der Verlust von aPKC λ /1 kann in Podozyten der Podozyten-spezifischen aPKC λ /1 Knockout Mäuse detektiert werden, in den Tubuli hingegen bleibt aPKC λ /1 unbeeinflusst (Pfeilspitze).

Mit vier Wochen kann man deutliche Größenunterschiede zwischen den gesunden und Knockout Tieren erkennen (Abbildung 11A) und die Proteinurie der Tiere steigt deutlich. Um den Grad der Proteinausscheidung über den Urin zu untersuchen, wurde von den Mäusen Spontan-Urin gesammelt und davon je 1 μ l auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Abbildung 11B). Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt und die erhaltenen Banden detektiert. Auf dem Gel wurde Urin von jeweils drei Kontroll- und Knockout Mäusen und eine BSA Standardreihe aufgetragen. Man erkennt deutlich die starke Proteinurie der Knockout Tiere im Vergleich zu den gesunden Wildtyp Mäusen. Vergleicht man den Proteingehalt des Urins der Knockout Tiere mit der BSA Standardreihe, enthält dieser mindestens 10-20 μ g/ μ l Albumin und noch andere Proteine, die im Gel oberhalb oder unterhalb der Albuminbande laufen (B). Mit 7 Tagen zeigt der Urin von Knockout Tieren keinen Unterschied zu Kontrolltieren (ohne Abbildung). Alle PKC λ /1 Knockout Mäuse sterben spätestens 4-5 Wochen nach Geburt.

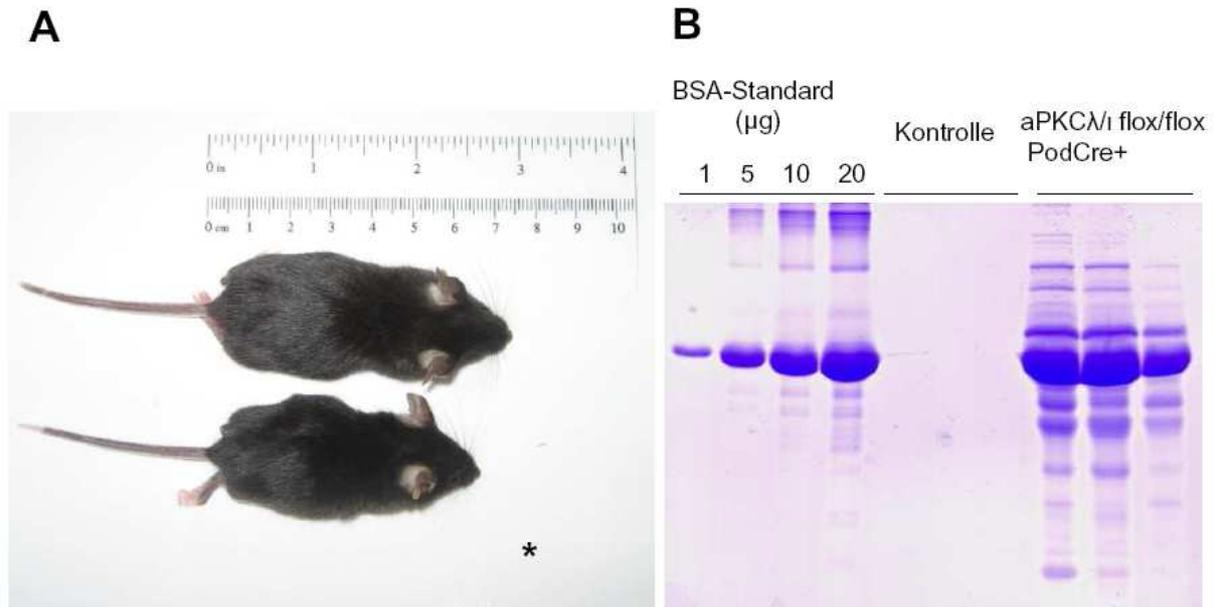


Abbildung 11 Phänotyp der Podozyten-spezifischen aPKC λ 1 Knockout Mäuse.

(A) Im Alter von etwa 4 Wochen zeigen Podozyten-spezifische aPKC λ 1 Knockout Mäuse (*) eine Wachstumsretardierung. (B) In der Coomassiefärbung eines SDS-Geles, auf das je 1 μ l Urin von Kontroll- und Knockout-Tieren aufgetragen wurden, erkennt man in den Knockout Tieren eine signifikante Proteinurie im Vergleich zu den Wildtyp Tieren.

Um die Histomorphologie der Nieren zu untersuchen, wurden Nieren-Paraffinschnitte von 6 Tage und 4 Wochen alten Kontroll- und Knockout-Tieren angefertigt. Diese Schnitte wurden einer Periodsäure-Schiff (PAS)-Färbung unterzogen und die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop verglichen. Im Alter von 1 Woche zeigen die Podozyten-spezifischen PKC λ 1 Knockout Nieren histologisch noch keine Auffälligkeiten (Abbildung 12A). Die Glomeruli und auch die Tubuli zeigen keine Auffälligkeiten. Im Alter von 4 Wochen erkennt man in der Histologie der Nieren deutliche Unterschiede zwischen Kontrollen und Knockout Tieren. Es zeigt sich eine generelle Glomerulosklerose in den Glomeruli, Dilatationen in den Tubuli und Proteinansammlungen (Zylinder) im gesamten Tubulussystem (Abbildung 12B und C).

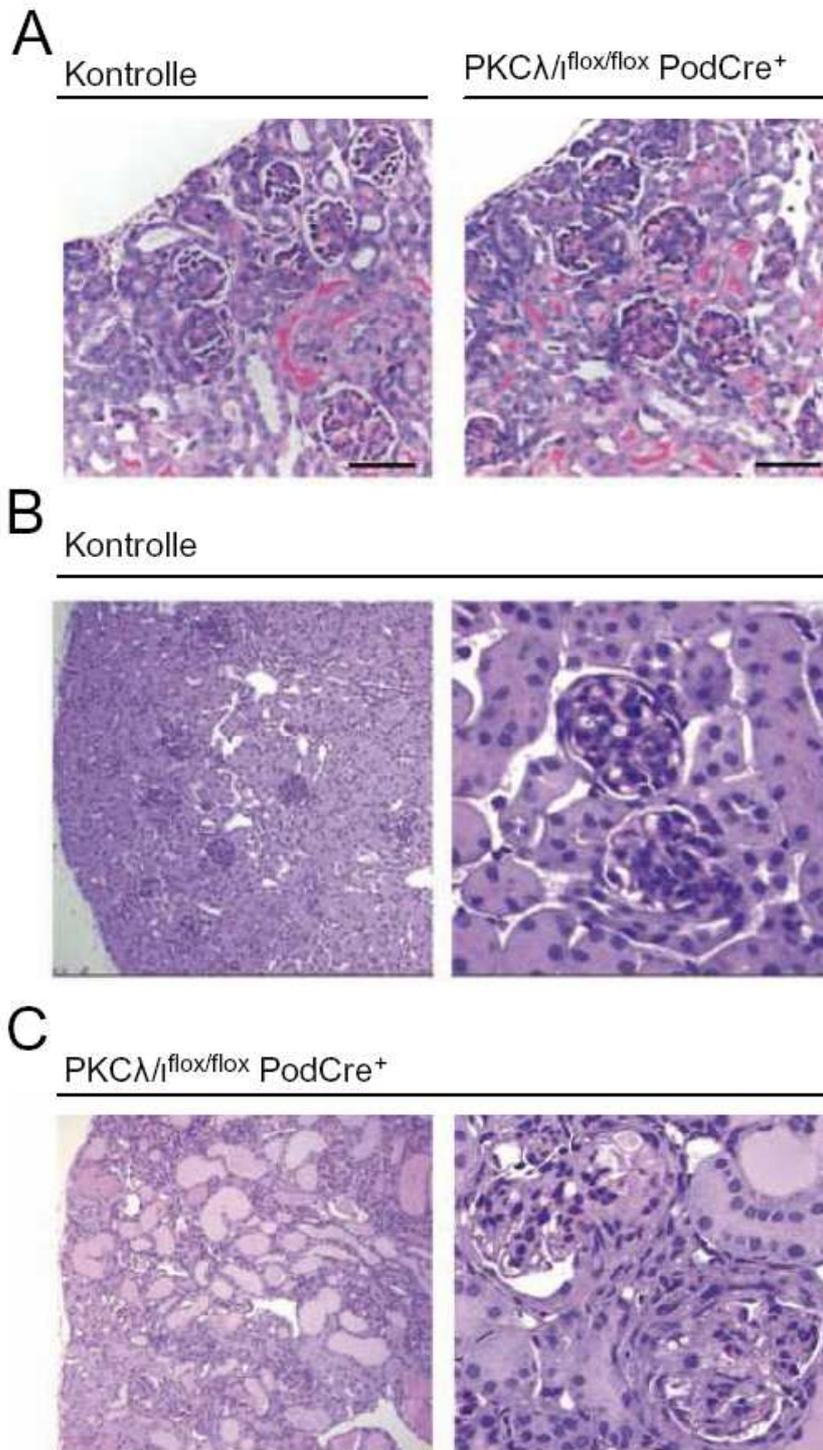


Abbildung 12 Histologie der Podozyten-spezifischen aPKC λ 1 Knockout Maus.

Die Histologie der Nieren von 6 Tage und 4 Wochen alten Wildtyp und Podozyten-spezifischen aPKC λ 1 Knockout Mäusen wurde durch Periodsäure-Schiff (PAS)-Färbung analysiert.

(A) Im Alter von etwa einer Woche zeigen die Podozyten-spezifischen aPKC λ 1 Knockout Mäuse keinen erkennbaren histologischen Phänotyp. Nieren von 6 Tage alten Wildtyp (links) und Knockout (rechts) Mäusen zeigen keine erkennbaren histologischen Unterschiede. (B und C) Im Alter von 4 Wochen entwickeln Podozyten-spezifische aPKC λ 1 Knockout Mäuse segmentale Glomerulosklerose, Tubulus-Dilatationen und Proteinansammlungen im Tubulussystem.

4.1.2 Der Verlust von α PKC $\lambda/1$ verursacht Störungen in der regulären Fußfortsatzarchitektur

Um den Effekt des Podozyten-spezifischen α PKC $\lambda/1$ Knockouts auf die ultrastrukturelle Glomerulusstruktur genauer darzustellen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von 4 Wochen alten Wildtyp und proteinurischen Knockout Tieren gemacht (Abbildung 13).

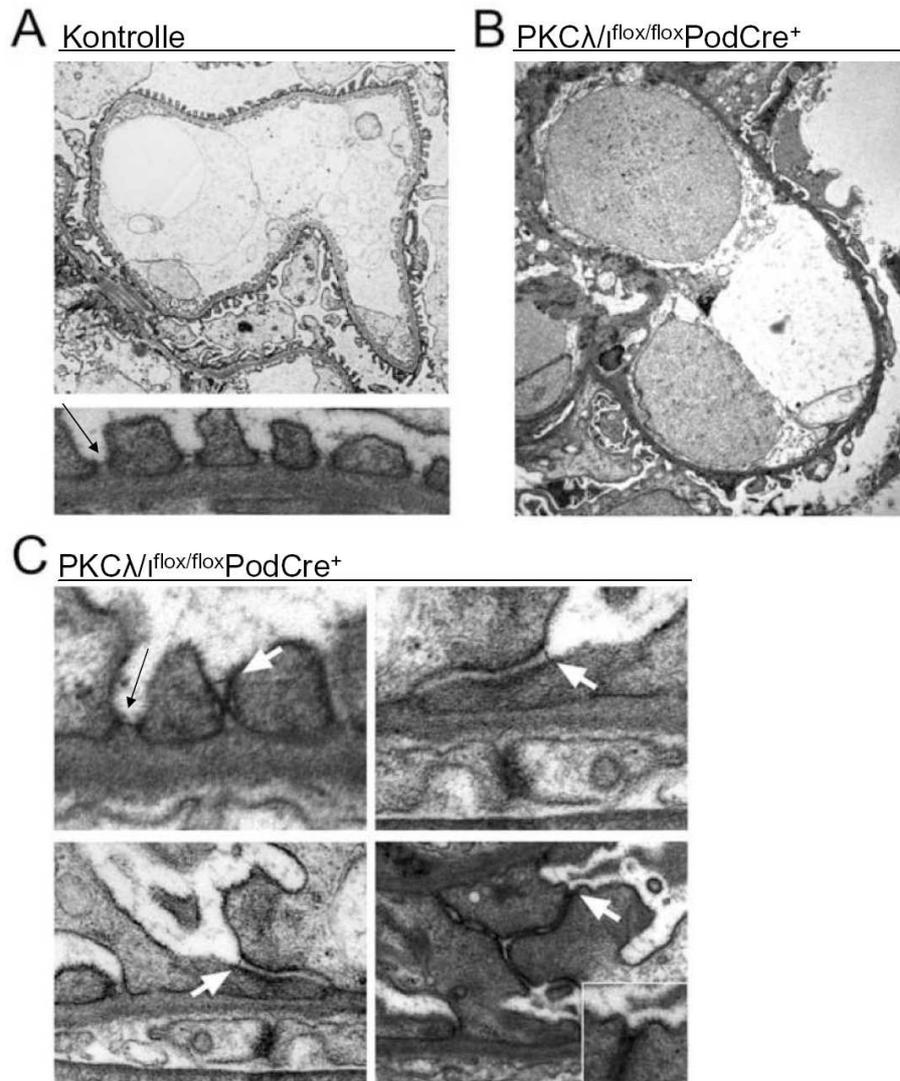


Abbildung 13 Elektronenmikroskopische Analyse von α PKC $\lambda/1$ Knockout Glomeruli.

(A) Ultrastrukturelle Analysen der Glomeruli von 4 Wochen alten Wildtyp Mäusen zeigen die normale Struktur der glomerulären Filtrationsbarriere (oben) mit regulärer Fußfortsatzarchitektur (unten) und normalen Schlitzmembranen (schwarze Pfeile). (B) Die Analyse von 4 Wochen alten α PKC $\lambda/1$ Knockout Mäusen zeigt globales Fußfortsatz-Effacement. (C) In einigen Bereichen können intakte Fußfortsätze beobachtet werden, jedoch zeigen diese zum Teil verschobene Schlitzmembranen (weiße Pfeile) und abnormale Zell-Zell-Verbindungen.

In den Kontrollnieren erkennt man die strukturiert aufgereihten Podozytenfußfortsätze, die glomeruläre Basalmembran und die direkt darüber liegende Schlitzmembran (Abbildung 13A,

schwarzer Pfeil). In den Knockout Tieren sind die Fußfortsätze zum größten Teil „effaced“, sie sind miteinander verschmolzen und gehen zum Teil verloren (Abbildung 13B).

In einer höheren Vergrößerung erkennt man noch einige intakte Fußfortsätze, wobei die benachbarten Fußfortsätze ungewöhnliche Schlitzmembran-Verschiebungen zeigen. Die Schlitzmembranen befinden sich normalerweise direkt über der Basalmembran. In den Knockout Nieren sind die Schlitzmembranen zum Teil verschoben. Weiterhin sind zwischen den Fußfortsätzen benachbarter Zellen ungewöhnliche Zell-Zell-Verbindungen zu detektieren, die man in den Wildtyp Tieren nicht findet (Abbildung 13C).

4.1.3 Veränderte Expression von Schlitzmembranmolekülen in den Podozyten-spezifischen aPKC λ 1 Knockout Mäusen

Die Veränderungen in der Fußfortsatzarchitektur und besonders die veränderten Schlitzmembranen lassen darauf schließen, dass auch die an diesen Stellen normalerweise exprimierten Proteine in den aPKC λ 1 Knockout Mäusen Veränderungen zeigen. Mit Hilfe von konfokaler Lasermikroskopie wurde die Expressionsintensität und die Verteilung des Polaritätsproteins Par3, des *Tight Junction* Markers ZO-1 und der Schlitzmembranmoleküle Nephrin und Podocin untersucht. Hierzu wurden Gefrierschnitte von 4 Wochen alten Wildtyp und Knockout Nieren mit Antikörpern gegen die genannten Moleküle gefärbt. In den Kontrollmäusen zeigten diese Marker eine lineare Verteilung entlang der glomerulären Basalmembran. Im Gegensatz dazu ist die Verteilung von Par3, ZO-1, Nephrin und Podocin in den PKC λ 1 Knockout Mäusen entlang der glomerulären Basalmembran unterbrochen und eher granulär (Abbildung 14). Zusätzlich scheint die Nephrin Expression in den PKC λ 1 Knockout Mäusen im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert zu sein (Abbildung 14C).

Ein weiteres in den Glomeruli exprimiertes Protein ist der Podozytenmarker WT-1. Die Expression von WT-1 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierschnitten von 7, 14, 21 und 28 Tage alten Kontroll- und PKC λ 1 Knockout Nieren untersucht (Abbildung 15A). Um die WT-1 Expression zu quantifizieren, wurden in allen Schnitten die WT-1 positiven Zellen pro Glomerulus ausgezählt (n=30-50 Glomeruli) (Abbildung 15B). An Tag 7 konnten noch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Knockout-Glomeruli detektiert werden. Auf den Nierenschnitten von Tag 7 konnten durchschnittlich 14 WT-1 positive Zellen pro Glomerulus gezählt werden. An Tag 14 zeigten sich ebenfalls noch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout, jedoch sank die Zahl der WT-1 positiven Zellen pro Querschnitt auf durchschnittlich 11, was auf die Ausdehnung des Glomerulus während des Wachstums zurückzuführen ist.

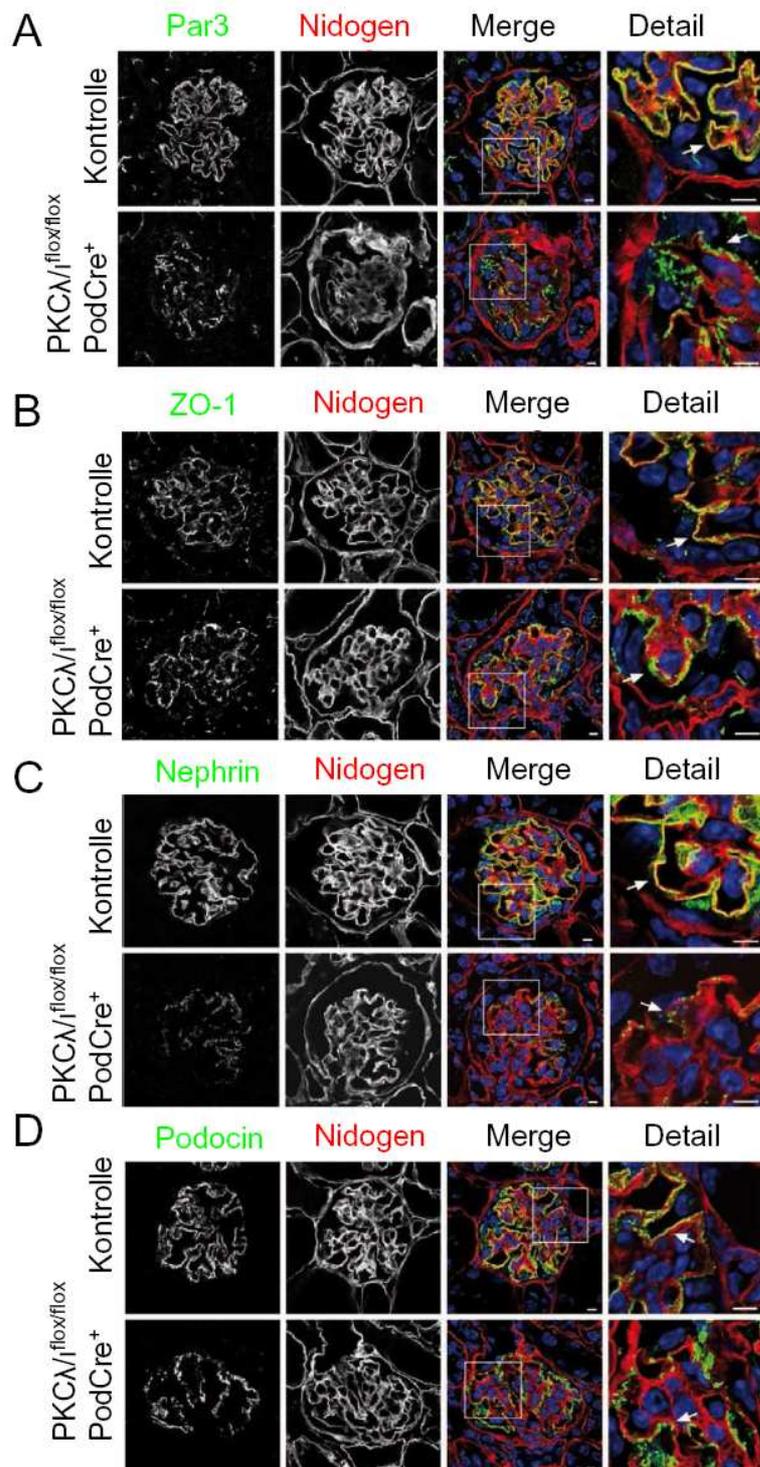


Abbildung 14 Immunfluoreszenz Aufnahmen von Wildtyp und PKC λ ₁ Knockout Glomeruli.

Nieren-Gefrierschnitte von 4 Wochen alten Wildtyp (Kontrolle, jeweils obere Reihe) und Knockout Mäusen (jeweils untere Reihe) wurden mit Antikörpern gegen das Par-Komplex Protein Par3, das *Tight Junction* Protein ZO-1, die Schlitzmembranmoleküle Nephrin und Podocin und Nidogen, einem Marker für die Basalmembran, gefärbt und durch konfokale Lasermikroskopie dargestellt. (A-D) Im Unterschied zu der linearen Färbung von Par3, ZO-1, Nephrin und Podocin in den Wildtyp Mäusen, zeigen diese Moleküle in den Knockout Mäusen eine granuläre Verteilung entlang der glomerulären Basalmembran. Zusätzlich scheint die Nephrin Expression in den Knockout Glomeruli reduziert (C). Größenbalken = 5 μ m.

An Tag 21 und Tag 28 zeigen die PKC λ_1 Knockout Nieren eine signifikant reduzierte Anzahl WT-1 positiver Zellen pro Glomerulus. An Tag 28 sind in den Knockout Nieren nur noch durchschnittlich 3 WT-1 positive Zellen pro Glomerulus zu detektieren, im Gegensatz zu 11 WT-1 positiven Zellen pro Glomerulus in den Wildtyp Mäusen.

Der Zeitpunkt an dem die WT-1 Expression verloren geht, stimmt etwa mit dem Einsetzen der Proteinurie und den histologischen Veränderungen überein. Für die Quantifizierung der WT-1 positiven Zellen wurden pro Zeitpunkt 5 Wildtyp und Knockout Tiere untersucht (Abbildung 15B).

Die Expression verschiedener Schlitzmembranmoleküle wurde außerdem in Nierenlysaten von Kontrolltieren und 28 Tage alten PKC λ_1 Knockout Mäusen untersucht. Die Expression von Nephrin und CD2AP ist in den Knockouts deutlich reduziert, wobei die Expression von GAPDH als Ladungskontrolle unbeeinflusst ist (Abbildung 15C).

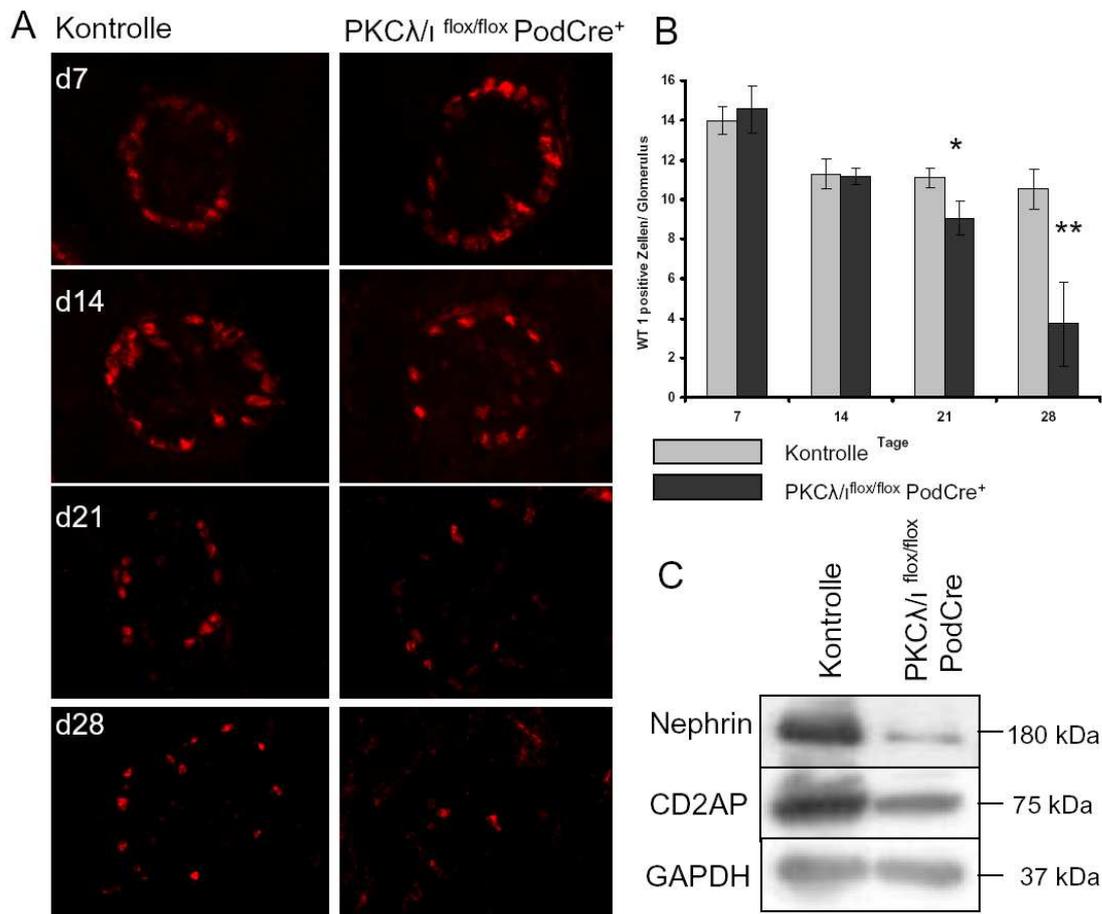


Abbildung 15 Expression von WT-1, Nephrin und CD2AP in Wildtyp und aPKC λ_1 Knockout Nieren.

(A und B) Glomeruli aus 7, 14, 21 und 28 Tage alten aPKC λ_1 Knockout Nieren zeigen eine signifikant reduzierte Zahl WT-1 positiver Zellen pro Glomerulus im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp Tieren (* p<0,05; ** p<0,01). 400 x Vergrößerung. (C) In Nierenlysaten von 4 Wochen alten aPKC λ_1 Knockout Mäusen ist die Expression von Nephrin und CD2AP im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert.

4.2 Untersuchungen an PKC λ / ι und PKC ζ monoklonalen Podozytenzelllinien

4.2.1 Herstellung und Charakterisierung der monoklonalen Podozytenzelllinien

Um den Einfluss der PKC λ / ι - und PKC ζ -Defizienz auf den Podozyten genauer zu untersuchen, haben wir Glomeruli aus den Knockout Mäusen und den Kontrolltieren isoliert und daraus monoklonale Podozyten-Zelllinien kultiviert. Die Podozyten-spezifischen PKC λ / ι Knockout Mäuse wurden dazu mit Immorto-transgenen Mäusen gekreuzt, so dass alle Zellen das Immortotransgen tragen und immortalisiert in Kultur gehalten werden können. Aus diesen Kreuzungen erhielten wir Kontrollzellen, die zwei gefloxtete Allele, aber kein Cre enthalten und Knockout Zellen, die zwei gefloxtete Allele und zusätzlich das Cre Gen enthalten. Von jeder Kontroll- oder Knockout-Zelllinie wurden mindestens drei unterschiedliche Klone kultiviert und untersucht.

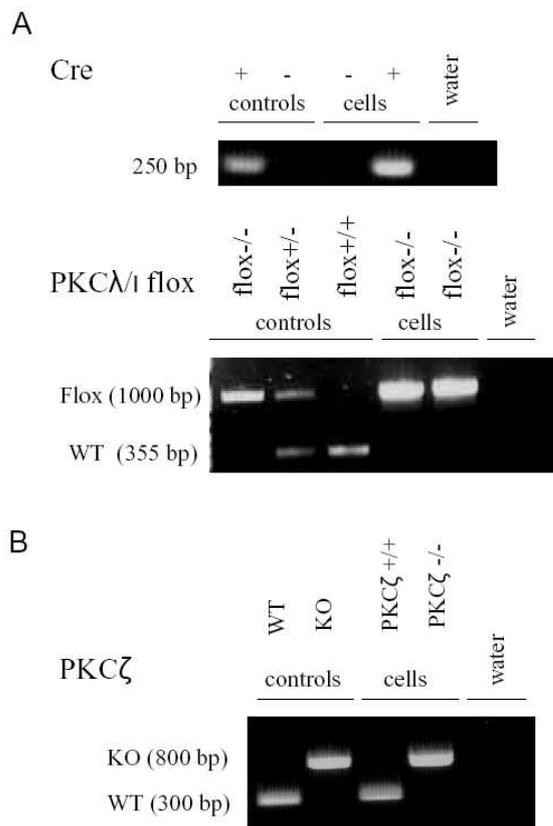


Abbildung 16 PCR der isolierten monoklonalen Zelllinien.

(A) Genomische DNA der Kontrollzelllinie PKC λ / ι flox/flox und der Knockout-Linie PKC λ / ι flox/flox PodCre wurde mit Hilfe von PCR auf das Cre-Gen (oben) und auf die flox-Sequenzen (unten) untersucht. (B) Genomische DNA der PKC ζ Zellen wurde per PCR auf das Vorhandensein von Wildtyp (WT) oder Knockout (KO) Allelen untersucht.

Von den kultivierten monoklonalen Zelllinien wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR bei den PKC λ / ι Zellen auf das Cre-Gen und die flox Sequenzen und bei den PKC ζ

Zellen auf das Vorhandensein von Wildtyp und Knockout Allelen überprüft (beispielhaft in Abbildung 16 dargestellt). Als Kontrolle wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien der Mäuse verwendet.

Das Cre Gen konnte wie erwartet nur in den $PKC\lambda/1$ Knockout Zellen und in der entsprechenden Kontrolle detektiert werden. Beide Zelllinien enthielten außerdem zwei gefloxtete $PKC\lambda/1$ Allele, so dass die Wildtyp Zellen den Genotyp $PKC\lambda/1$ flox/flox und die Knockout Zellen den Genotyp $PKC\lambda/1$ flox/flox Cre⁺ besitzen (Abbildung 16A). Bei den $PKC\zeta$ Zellen wurden wie erwartet in den Wildtyp Zellen nur Wildtyp Allele und in den Knockout Zellen nur Knockout Allele detektiert (Abbildung 16B). Im Folgenden wird der Genotyp $PKC\lambda/1$ flox/flox als $PKC\lambda/1$ Wildtyp ($PKC\lambda/1$ WT) und $PKC\lambda/1$ flox/flox Cre⁺ als $PKC\lambda/1$ Knockout ($PKC\lambda/1$ KO) bezeichnet.

Danach musste überprüft werden, ob es sich bei den isolierten glomerulären Zellen wirklich um Podozyten handelt, da aus den Glomeruli auch andere glomeruläre Zellen (Mesangialzellen, Parietalzellen, Endothelzellen) auswachsen könnten. Dazu wurden die Zellen 14 Tage ausdifferenziert und die Lysate im Western Blot auf die Expression verschiedener Podozytenmarker untersucht. In allen vier hier gezeigten monoklonalen Zelllinien und auch in den anderen untersuchten Klonen konnten die podozytären Proteine Nephrin bei 180 kDa und WT-1 bei 52 kDa detektiert werden. Als Ladungskontrolle wurde die Membran zusätzlich mit GAPDH inkubiert und entwickelt. Die $PKC\lambda/1$ und $PKC\zeta$ Wildtyp und Knockout Zellen zeigten eine etwa gleich starke Nephrin Expression. Die Expression von WT-1 ist ebenfalls detektierbar, jedoch in beiden Knockout Zelllinien deutlich reduziert.

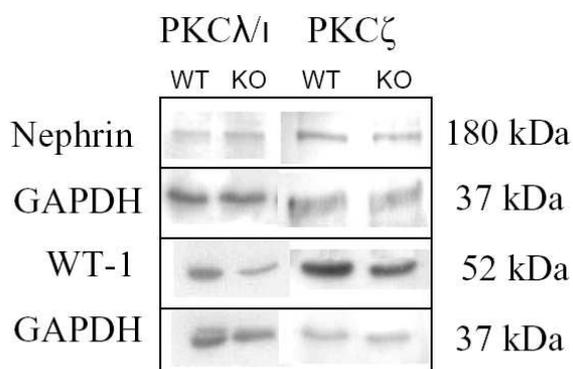


Abbildung 17 Western Blot Analyse der monoklonalen Zelllinien.

Jeweils 20 µg der Zelllysate wurden auf die Expression von Nephrin und WT-1 untersucht. Zur Ladungskontrolle wurde die jeweilige Membran mit GAPDH normalisiert.

Außer im Western Blot wurden die Zellen auch mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert. Die verschiedenen Zelllinien wurden 14 Tage auf Coverslips differenziert, anschließend fixiert und mit Antikörpern gegen die Podozytenmarker Synaptopodin und WT-1 gefärbt. Eine Expression von Synaptopodin kann in Podozyten erst im ausdifferenzierten Zustand detektiert werden, WT-1 jedoch wird auch schon von undifferenzierten Zellen exprimiert (10). In allen untersuchten PKC λ /1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen konnte nach 14 Tagen Differenzierung deutlich das mit Aktinfasern assoziierte Protein Synaptopodin detektiert werden (Abbildung 18A und Abbildung 19A).

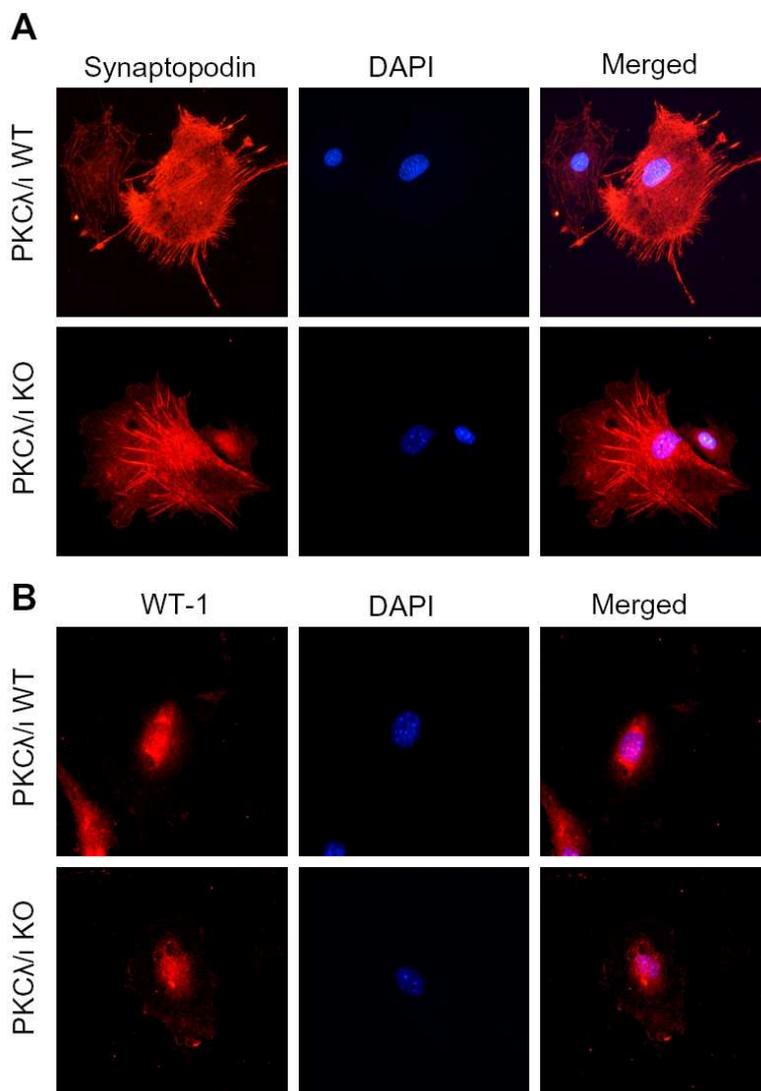


Abbildung 18 Expression Podozyten-spezifischer Proteine in den PKC λ /1 Zelllinien.

Die PKC λ /1 Wildtyp und Knockout Zelllinien wurden nach 14 Tagen Differenzierung auf die Expression der Podozytenmarker Synaptopodin (A) und WT-1 (B) untersucht. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau) (400 x Vergrößerung).

In den PKC λ /1 Knockout Zellen war die Synaptopodin Expression jedoch deutlich schwächer und auf das Zentrum der Zelle reduziert. Die Expression in den Fußfortsätzen war kaum noch

zu detektieren. WT-1 konnte in allen untersuchten Zelllinien im Kern detektiert werden (Abbildung 18B und Abbildung 19B). Hier konnte man ebenfalls, konsistent mit den Ergebnissen des Western Blots, eine etwas schwächere WT-1 Expression in den PKC ζ /t Knockout Zellen erkennen.

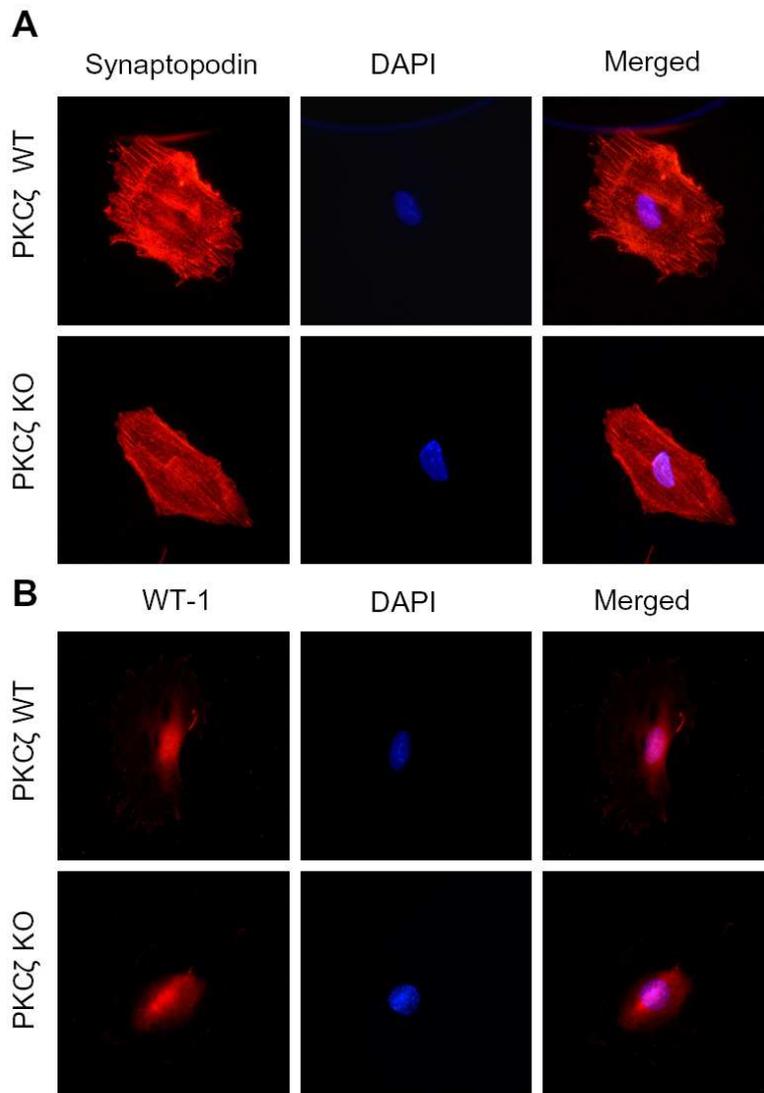


Abbildung 19 Expression Podozyten-spezifischer Proteine in den PKC ζ Zelllinien.

Die PKC ζ Wildtyp und Knockout Zelllinien wurden nach 14 Tagen Differenzierung auf die Expression der Podozytenmarker Synaptopodin (A) und WT-1 (B) untersucht. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau) (400 x Vergrößerung).

Da die Expression von Synaptopodin und WT-1 auf Proteinebene deutlich reduziert war, sollte untersucht werden, ob die Gene für diese Proteine auch bereits auf mRNA Ebene reguliert sind. Dazu wurden die Zellen wieder 14 Tage differenziert und diesmal die mRNA aus den Zellen gewonnen. Nach dem Umschreiben in cDNA wurde die mRNA Expression von Synaptopodin und WT-1 in der Real-time PCR (rt-PCR) untersucht. Als Normalisierung

diente hier das konstitutiv exprimierte Gen HPRT-1. Die Ergebnisse der rt-PCR zeigten ebenfalls eine Reduktion von Synaptopodin und WT-1 in den PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Knockout Zellen (Abbildung 20).

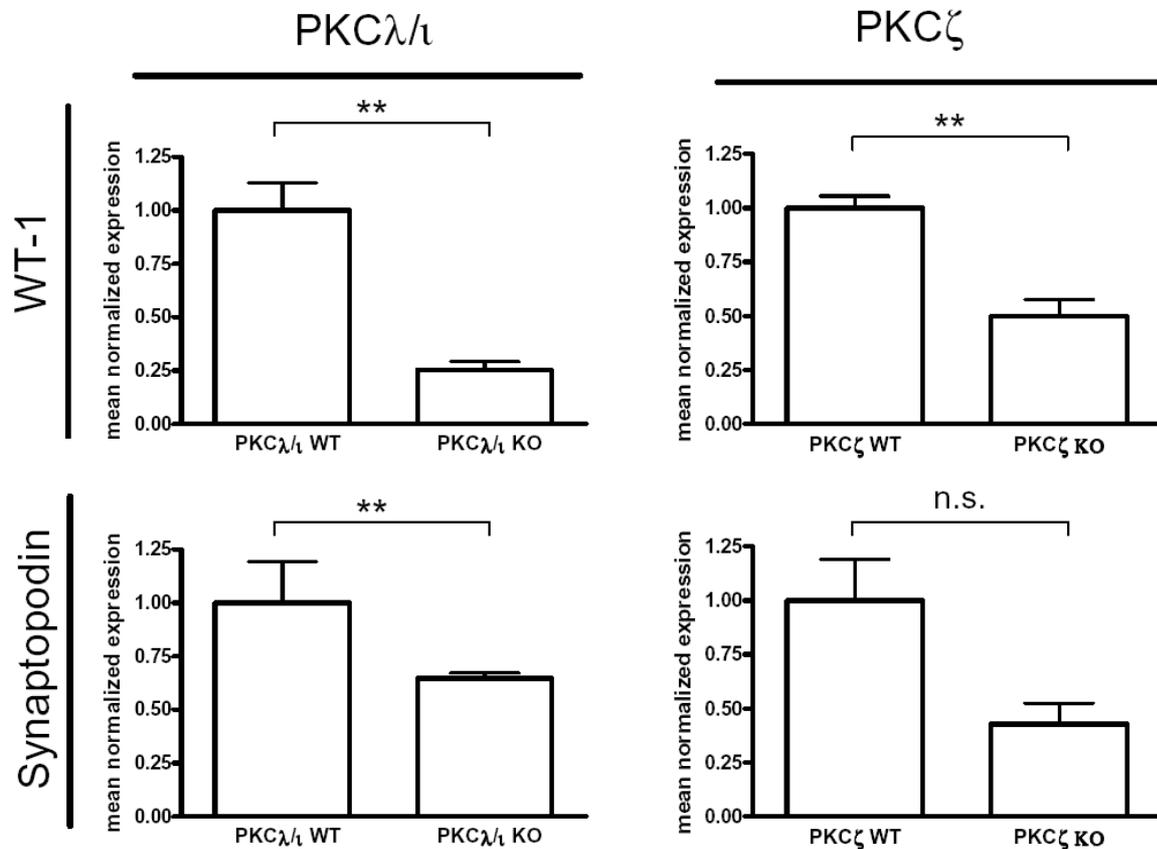


Abbildung 20 Real-time PCR der differenzierten PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Zellen.

Die PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Zelllinien wurden nach 14 Tagen Differenzierung mittels rt-PCR auf die mRNA Expression der Podozytenmarker WT-1 (oben) und Synaptopodin (unten) untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT-1. **p<0,01. n. s. = nicht signifikant.

4.2.2 Lokalisation von PKC $\lambda/1$ und PKC ζ in Podozyten

Die atypischen PKCs spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung der glomerulären Schlitzmembran (79). Für ihre Funktion ist auch die Lokalisation innerhalb der Zelle entscheidend. Um die Lokalisation von PKC $\lambda/1$ und PKC ζ in Podozyten darzustellen, wurden GFP-Konstrukte der beiden Proteine in Podozyten transient transfiziert und die GFP-Fluoreszenz unter dem Mikroskop detektiert (Abbildung 21). Zusätzlich wurden die transfizierten Podozyten 24 h mit 100 μ g/ml Puromycin aminonukleosid (PAN, Sigma) stimuliert und ebenfalls die Lokalisation von PKC $\lambda/1$ und PKC ζ untersucht. Die Puromycin aminonukleosid-induzierte (PAN) Nephrose ist ein gut beschriebenes *in vivo* und *in vitro* Modell für Veränderungen der Fußfortsatzarchitektur, die zu Glomerulosklerose führen

können (128). In dieser Arbeit wird PAN als Vergleichsmodell für den zellulären Phänotyp bei Podozytenschädigungen verwendet.

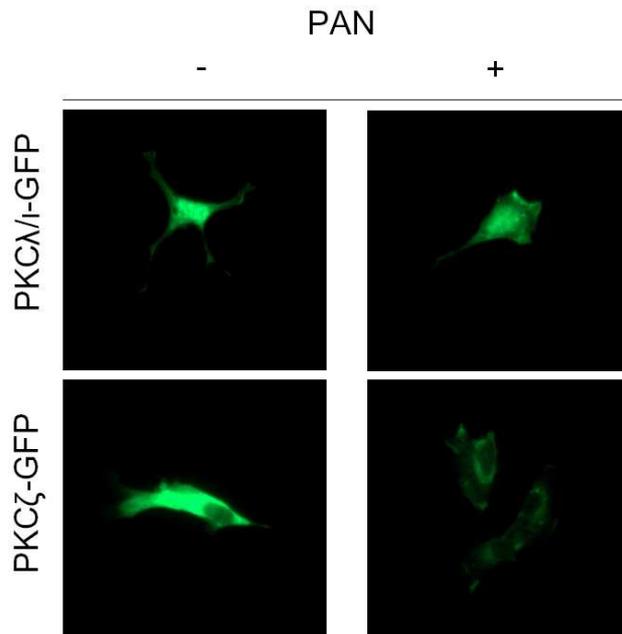


Abbildung 21 Lokalisation von PKC λ 1 und PKC ζ nach PAN-Stimulation.

Überexpression von PKC λ 1-GFP und PKC ζ -GFP in Podozyten. Die Lokalisation der beiden PKC Isoformen ändert sich nach Stimulation mit PAN (400 x Vergrößerung).

In den unstimulierten Podozyten ist PKC λ 1-GFP in der gesamten Zelle und auch im Kern lokalisiert. Im Gegensatz dazu ist PKC ζ -GFP nicht im Kern, sondern nur im Zytosol exprimiert. Nach PAN Stimulation ist PKC λ 1-GFP noch immer stark im Kern exprimiert, aber zusätzlich auch zum Teil in der Membran. PKC ζ -GFP befindet sich nach PAN Stimulation nicht im Kern, sondern reichert sich perinukleär an. Die Expression im Zytosol wird dafür wesentlich schwächer.

4.2.3 Morphologische Unterschiede zwischen den Podozytenzelllinien

Da sich schon in ersten Untersuchungen erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Wildtyp und Knockout Zelllinien herausstellten, sollten die Zellen nun genauer auf allgemeine zelluläre Funktionen und Eigenschaften untersucht werden.

Als erstes und auffälligstes Merkmal zeigten sich Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen den einzelnen Zelllinien. Im proliferierenden Zustand bei 33 °C sollten die Podozyten ein kopfsteinpflasterartiges Muster aus dicht aneinander liegenden Zellen bilden. Nach 10-14 Tagen bei 37 °C sind die Podozyten ausdifferenziert. Sie breiten sich aus und bilden Ausläufer, mit denen sie mit den benachbarten Zellen in Kontakt treten. Die beiden Kontrollzelllinien PKC λ 1 und PKC ζ Wildtyp zeigen genau diese erwartete Morphologie

(Abbildung 22). Die PKC λ/ι Knockout Zellen (PKC λ/ι flox/flox PodCre+) zeigen schon während der Proliferation eine ungewöhnliche Morphologie. Die Podozyten wachsen eher langgestreckt und zum Teil übereinander. Durch das Übereinanderwachsen lösen sich die Zellen von der Collagenoberfläche ab und flotieren im Medium. Im differenzierten Zustand scheinen die Podozyten viel weniger ausgebreitet und daher kleiner zu sein. Außerdem sind die Zellausläufer wesentlich kürzer. Die PKC ζ Knockout Zellen zeigen bei genauer Betrachtung eine milde Variante dieser veränderten Morphologie. Bei 33 °C erkennt man ebenfalls Andeutungen von Zellanhäufungen. Bei 37 °C ist kaum ein Unterschied zu den Kontrollzellen zu erkennen.

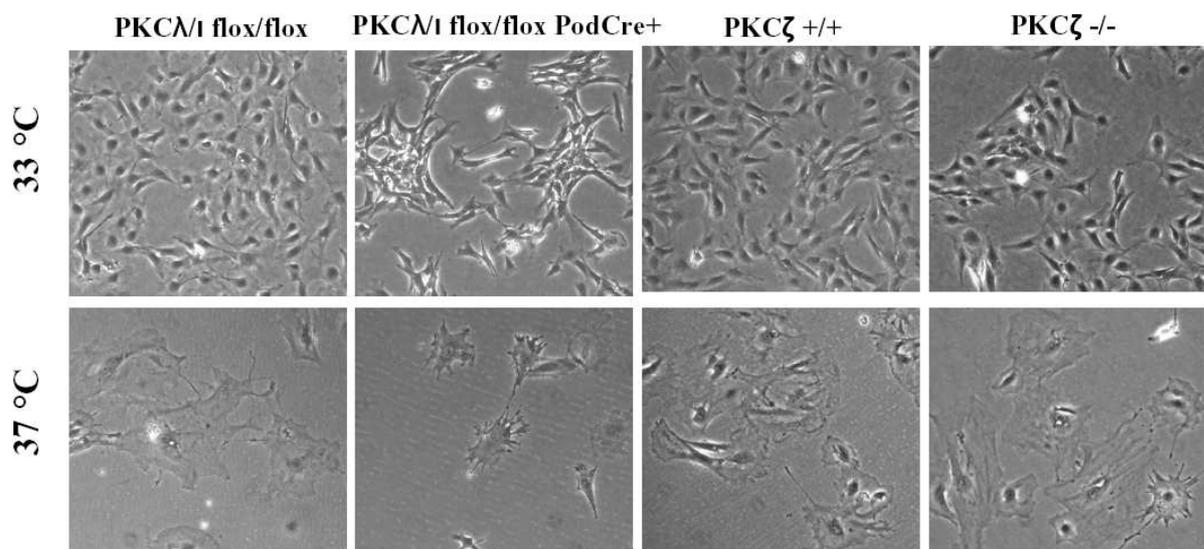


Abbildung 22 Morphologie der undifferenzierten und differenzierten PKC λ/ι und PKC ζ Zelllinien.

Die Morphologie der verschiedenen Zelllinien wurde im proliferierenden Zustand bei 33 °C mit γ -INF (obere Reihe) und im differenzierten Zustand nach 14 Tagen bei 37 °C ohne γ -INF (untere Reihe) verglichen (200 x Vergrößerung).

4.2.4 Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle

Eine wichtige Eigenschaft der Podozyten ist ihre Adhäsion an die glomeruläre Basalmembran. Die Adhäsion erfolgt über Fokale Adhäsionen (Fokalkontakte), Proteinkomplexe, die das Aktin Zytoskelett einer Zelle an eine Matrix koppeln. Ein Hauptbestandteil dieser Proteinkomplexe ist das Aktin-bindende Strukturprotein Vinculin (146). Der Kontakt zu Proteinen der Matrix wird über verschiedene transmembrane Integrine vermittelt. Die Integrine sind über Adaptermoleküle wie z. B. Vinculin an das Aktin Zytoskelett gekoppelt. In den Fokalen Adhäsionen spielt außerdem die Signalübertragung eine wichtige Rolle. Zu den signalübertragenden Proteinen gehört unter anderem die Kinase

FAK (*focal adhesion kinase*). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von FAK in Podozyten im Mausmodell vor Proteinurie und *Effacement* schützt (147).

Um die Anzahl und Ausdehnung der Fokalen Kontakte in den PKC λ 1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen zu beurteilen, wurden die ausdifferenzierten Zellen mit einem Antikörper gegen Vinculin gefärbt und so die Fokalen Kontakte markiert. Um die Fokalen Kontakte zu quantifizieren, wurden pro Zelllinie mindestens 30 Einzelzellen fotografiert und anschließend die Zahl der Vinculin-positiven Flächen pro Zelle ausgezählt. Die PKC λ 1 Knockout Zellen zeigten in der Färbung signifikant weniger Vinculin als die Wildtyp Zellen (Abbildung 23A, obere Reihe).

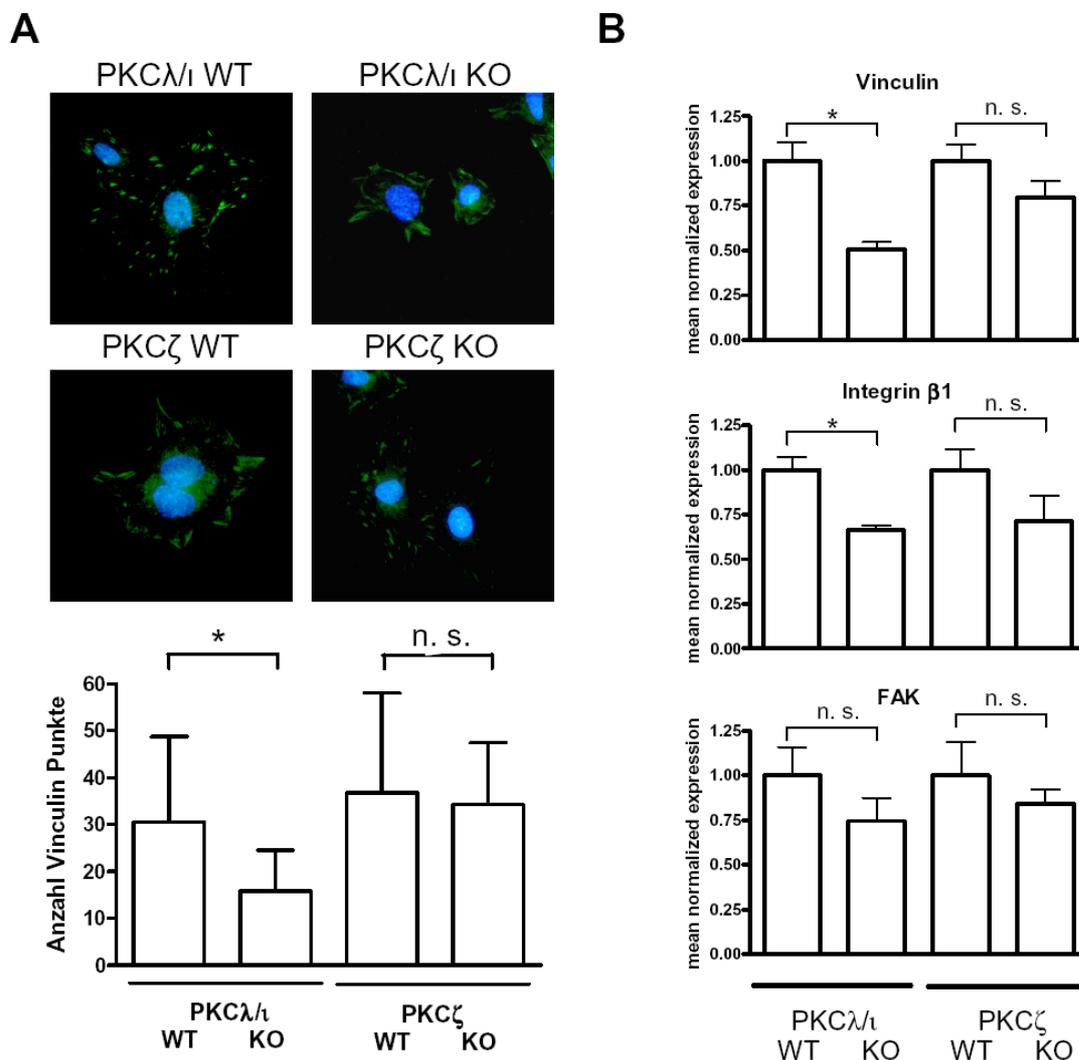


Abbildung 23 Expression von Adhäsionsmolekülen in Immunfluoreszenz und rt-PCR.

(A) Eine Immunfluoreszenzfärbung auf differenzierten Podozyten gegen Vinculin zeigt eine signifikante Reduktion der Vinculin Punkte in den PKC λ 1 Knockout Zellen (400 x Vergrößerung).

(B) Die mRNA-Expression von Vinculin, Integrin β 1 und FAK in der Real-time PCR zeigt ebenfalls eine Reduktion in beiden aPKC Knockout Zelllinien.*p<0,05. n. s. = nicht signifikant.

Bei den PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen zeigte sich hingegen kein großer Unterschied in der Anzahl der Fokalen Kontakte (Abbildung 23A, untere Reihe). Dieser Befund konnte auch auf RNA-Ebene bestätigt werden. Von den entsprechenden Zelllinien wurde RNA gewonnen, diese in cDNA umgeschrieben und in der rt-PCR eingesetzt. Außer auf Vinculin wurde die mRNA der Zellen auf die Expression der Adhäsionsmoleküle Integrin β 1 und FAK untersucht.

Für alle drei Adhäsionsmoleküle zeigte sich in den PKC $\lambda/1$ Knockout und in den PKC ζ Knockout Zellen eine Reduktion der mRNA Expression (Abbildung 23B). Signifikant war jedoch nur die mRNA Expression von Vinculin und Integrin β 1 in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen reduziert. Eine Reduktion auf mRNA Ebene muss jedoch nicht zwingend auch eine Reduktion auf Proteinebene bedeuten. Daher wurden zusätzlich Zelllysate im Western Blot auf die Expression der Adhäsionsmoleküle Vinculin, phospho-FAK (pFAK) und Integrin β 1 untersucht. Für Vinculin konnte im Western Blot wie schon in der Immunfärbung und in der rt-PCR eine Reduktion in beiden Knockout Zelllinien detektiert werden (Abbildung 24). Integrin β 1 scheint auf Proteinebene vor allem in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen reduziert zu sein, in den PKC ζ Knockout Zellen ist die Integrin β 1 Proteinexpression unbeeinflusst. Die Doppelbande für Integrin β 1 zeigt das kleinere pre-Integrin β 1 und das größere N-glykosylierte reife Integrin β 1 (148). Phospho-FAK scheint auf Proteinebene vor allem im PKC ζ Knockout reduziert zu sein.

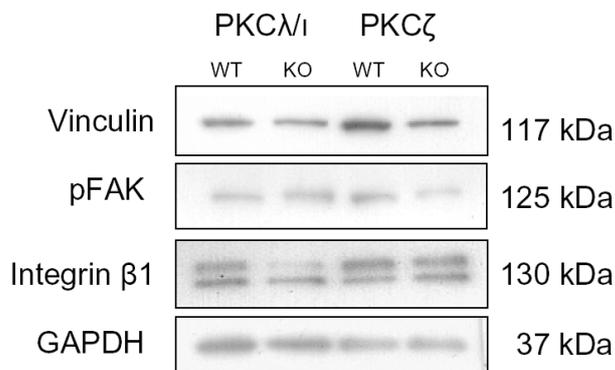


Abbildung 24 Expression von Adhäsionsmolekülen im Western Blot.

Je 10 μ g Zelllysate von differenzierten PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen wurde im Western Blot auf die Expression von Vinculin, pFAK und Integrin β 1 untersucht. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet.

In einem weiteren Versuch wurden Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen PAN behandelt. Am Abend vor der Stimulation wurden die Zellen zur Synchronisierung auf Hungermedium (1% FCS) gesetzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PAN einen Effekt auf Adhäsionsmoleküle hat (136). Der Effekt von PAN auf die

Wildtyp Podozyten wurde hier überprüft, da in den weiteren Versuchen ebenfalls Stimulationsversuche mit PAN durchgeführt wurden. Nach PAN Stimulation zeigte sich die mRNA Expression der Adhäsionsmoleküle Vinculin und Integrin $\beta 1$ in den Podozyten bereits bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ oder höher signifikant um mindestens das Zweifache verringert (Abbildung 25). Eine Kontrolle ohne Stimulation wurde zusätzlich 24 h auf Hungermedium gehalten, dort zeigte sich keine signifikante Regulation der Adhäsionsmoleküle.

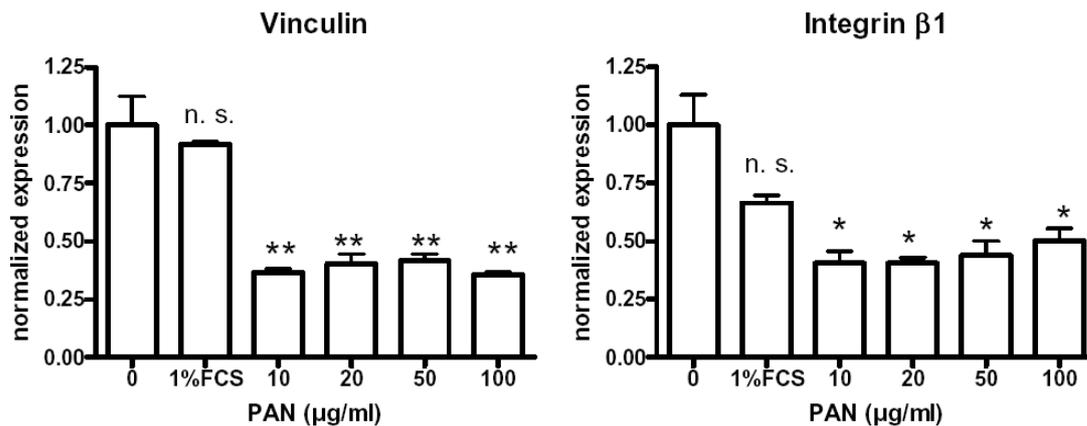


Abbildung 25 Expression der Adhäsionsmoleküle Vinculin und Integrin $\beta 1$ nach PAN Stimulation.

Differenzierte Podozyten wurden 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen PAN stimuliert und die mRNA Expression von Vinculin und Integrin $\beta 1$ in der rt-PCR untersucht. Eine zusätzliche Probe wurde 24 h in Hungermedium gehalten (1% FCS). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n. s. = nicht signifikant.

4.2.5 Ausdehnung der PKC $\lambda 1$ und PKC ζ defizienten Zellen

Während der Differenzierung breitet sich der Zellkörper der Podozyten normalerweise auf der Oberfläche auf. Die Zelle wird flacher und die Fußfortsätze bilden langgestreckte Zellausläufer. So verändern sie sich von einer eher rundlichen Form zu einer stark verzweigten aufgespreizten Zelle. Bei den PKC $\lambda 1$ Knockout Zellen fiel schon lichtmikroskopisch auf, dass sie sich nicht wie die entsprechenden Wildtyp Zellen ausdehnen und wesentlich kleiner erscheinen. Um dies quantitativ zu erfassen, wurden die 14 Tage differenzierten Zellen mit Vinculin gefärbt und unter dem Mikroskop fotografiert. Zur Auswertung der Zellausdehnung wurde das Programm Image J 1.42q (National Institutes of Health, USA) verwendet. Es wurde jeweils der größte Durchmesser von 50 Zellen gemessen und aus den erhaltenen Werten ein Mittelwert gebildet. Die PKC $\lambda 1$ Knockout Zellen zeigten eine um mehr als die Hälfte reduzierte Ausdehnung im Vergleich zu den Wildtyp Zellen (Abbildung 26A und B). Die PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Ausdehnung.

Die gleichen Vinculin Färbungen und Messungen der Zellausdehnung wurden mit Zellen wiederholt, die mit *silencing* RNA (siRNA) gegen PKC λ 1 oder PKC ζ behandelt wurden. Im Vergleich zu den Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, zeigten die Zellen mit PKC λ 1 siRNA eine signifikant reduzierte Ausdehnung. Die Verringerung der Zellausdehnung der mit PKC ζ siRNA behandelten Zellen war nicht signifikant (Abbildung 26C). In einem weiteren Versuch wurden Zellen für 24 Stunden mit 100 μ g/ml PAN behandelt. Diese Zellen zeigten ebenfalls eine um mehr als die Hälfte reduzierte Ausdehnung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

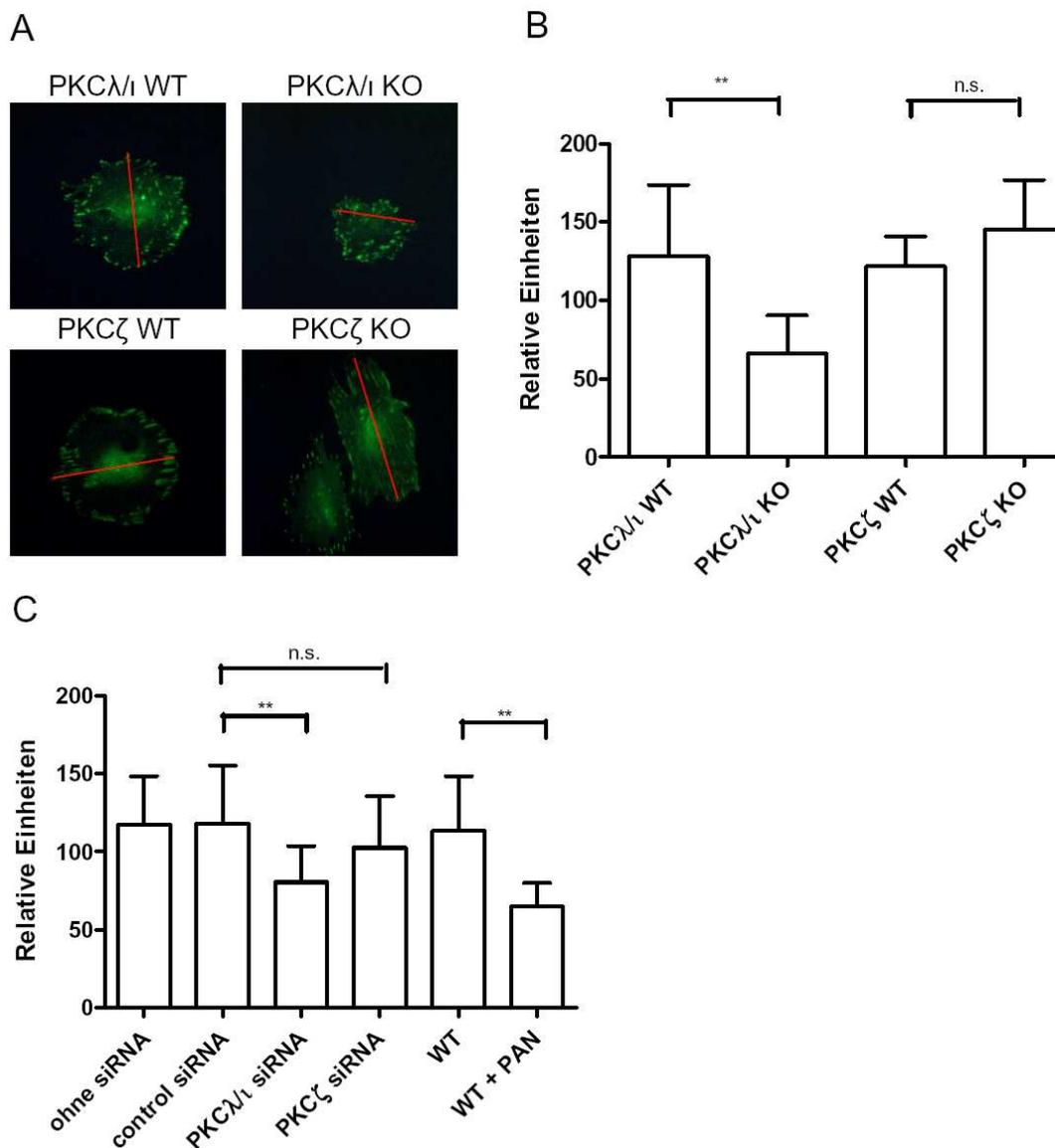


Abbildung 26 Ausdehnung der PKC λ 1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen.

(A) Vinculin-Immunfärbung der Wildtyp und Knockout Zellen und (B) Messung des mittleren Durchmessers, um die Ausdehnung der Zellen zu bestimmen (400 x Vergrößerung). (C) Mittlerer Durchmesser der mit PKC λ 1 siRNA, PKC ζ siRNA oder PAN behandelten Zellen (jeweils 50 Zellen). ** $p < 0,01$. n.s. = nicht signifikant.

4.2.6 Veränderungen des Aktin Zytoskeletts bei PKC λ /1 Defizienz

Die bisher untersuchten Veränderungen in der Expression der Adhäsionsmoleküle und der stark reduzierten Zellausdehnung der PKC λ /1 Knockout Zellen deuten bereits auf Veränderungen in der Organisation des Aktin Zytoskeletts hin. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die ausdifferenzierten PKC λ /1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen das Aktin-bindende Phalloidin gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. In gesunden, normal differenzierten Podozyten sollte ein gut ausgebildetes Netzwerk aus Aktinfasern erkennbar sein, das sich über die gesamte Zelle erstreckt. Dieses erkennt man zum Beispiel in den PKC λ /1 Wildtyp Zellen. Die PKC λ /1 Knockout Zellen zeigen außer ihrer gut zu erkennenden reduzierten Ausdehnung auch deutliche Veränderungen im Aktin Zytoskelett.

Es sind kaum noch Stressfasern zu erkennen und ein Großteil des Aktins verdichtet sich an den Zellrändern und bildet Membranhäufungen (*membrane ruffles*) (Abbildung 27A). Um diese Veränderungen zu quantifizieren, wurden die gefärbten Zellen unter dem Mikroskop fotografiert und alle Zellen mit verändertem Zytoskelett gezählt. Zusätzlich wurde die Gesamtzahl der Zellen bestimmt, um eine prozentuale Darstellung der Zellen mit verändertem Zytoskelett zu ermöglichen (Abbildung 27B).

In den PKC λ /1 und PKC ζ Wildtyp Zellen gab es auch einen geringen Anteil Zellen, in denen das Aktin Zytoskelett verändert war und nicht die normale Struktur an Stressfasern zeigte. In den PKC λ /1 Knockout Zellen hingegen waren kaum noch Zellen mit normaler Zytoskelettstruktur zu erkennen. Bis zu 80 % der Zellen zeigten deutliche Veränderungen im Aktin Zytoskelett. Bei den PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen zeigten sich kaum Unterschiede in der Anzahl Zellen mit verändertem Aktin Zytoskelett. Um die Veränderungen der PKC λ /1 Knockout Zellen mit einer anderen Methode zu bestätigen, wurden Wildtyp Zellen mit 10 μ M aPKC Pseudosubstrat (Biosource, Camarillo, CA, USA), das gegen beide atypische Isoformen gerichtet ist, für 2 h bei 37 °C behandelt.

Als Kontrolle diente 10 μ M *Scrambled* Peptid (gleiche Aminosäuren in einer nicht funktionellen Reihenfolge). Desweiteren wurden Wildtyp Zellen mit PKC λ /1 siRNA und mit Kontroll siRNA behandelt und ebenfalls die Zellen mit verändertem Zytoskelett ausgezählt. Wie bei den PKC λ /1 Knockout Zellen, zeigte sich auch nach Behandlung mit aPKC Pseudosubstrat und PKC λ /1 siRNA eine signifikant erhöhte Anzahl Zellen mit verändertem Aktin Zytoskelett. In einem weiteren Versuch wurden die Zellen erneut 24 Stunden mit 100 μ g/ml PAN behandelt. Die Aktin Zytoskelett Veränderungen nach dieser Stimulation

waren ähnlich ausgeprägt wie in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen. Es bildeten sich in fast 80 % der Zellen typische Phalloidin-gefärbte Membranhäufungen an den Zellrändern.

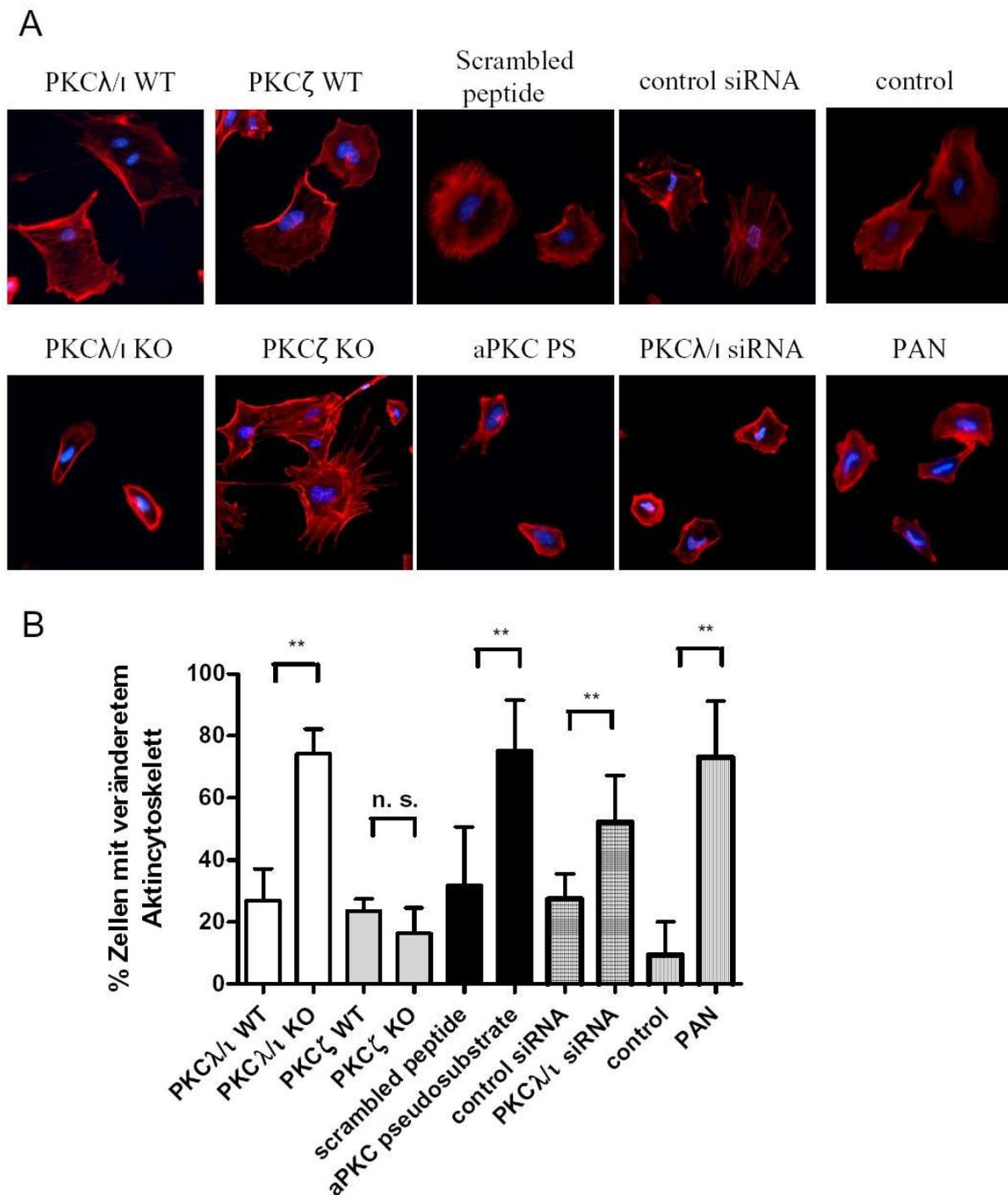


Abbildung 27 Veränderungen des Aktin Zytoskeletts in PKC $\lambda/1$ defizienten Zellen.

(A) Phalloidin Färbungen von PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen und von Zellen, die mit einem aPKC Pseudosubstrat (PS), PKC $\lambda/1$ siRNA oder PAN behandelt wurden (400 x Vergrößerung). (B) Quantifizierung der Zellen mit verändertem Aktin Zytoskelett. ** $p < 0,01$. n. s. = nicht signifikant.

4.2.7 Expression der kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42

Veränderungen des Aktin Zytoskeletts werden häufig durch das Gleich- oder Ungleichgewicht der kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 bestimmt (149). Da die PKC λ /1 Knockout Zellen einen offensichtlichen Aktin Zytoskelett Phänotyp zeigen, wurde die Expression und Aktivität der kleinen GTPasen in den verschiedenen Podozytenzelllinien untersucht.

Die aktiven GTP-gebundenen Formen von RhoA, Rac1 und Cdc42 können nicht durch spezifische Antikörper im Western Blot von den GDP-gebundenen inaktiven Formen unterschieden werden. Daher wurde für die Detektion von aktivem RhoA, Rac1 und Cdc42 jeweils ein Aktivierungs Assay der Firma Cytoskeleton verwendet, der die aktiven Formen mithilfe spezifischer Beads präzipitiert und detektiert. Die ausdifferenzierten Podozyten wurden lysiert und je 500 μ g für die Assays eingesetzt. Das an die Beads gebundene aktive RhoA, Rac1 oder Cdc42 wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

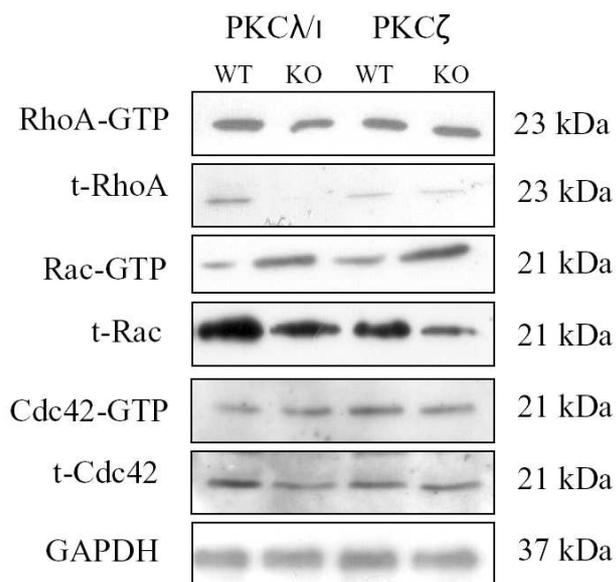


Abbildung 28 Expression und Aktivität der kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42.

Western Blot Analysen der aktiven GTP-gebundenen Formen von RhoA, Rac1 und Cdc42 zeigen deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke und Aktivität zwischen Wildtyp und Knockout Zellen.

In beiden Wildtyp Zelllinien (PKC λ /1 und PKC ζ Wildtyp) konnte aktives RhoA-GTP und nur wenig aktives Rac1-GTP detektiert werden (Abbildung 28). In den PKC λ /1 Knockout Zellen zeigte sich eine etwas geringere Expression an aktivem RhoA-GTP, aber erheblich mehr aktives Rac1-GTP. In den PKC ζ Knockout Zellen war kein Unterschied an RhoA-GTP zu erkennen, jedoch ebenfalls deutlich mehr Rac1-GTP. Das aktive Cdc42-GTP zeigte keine

Regulation in den unterschiedlichen Zelllinien. Als Ladungskontrolle diente Lysat, das bereits vor der Inkubation mit den Beads separiert wurde. Hiervon wurden jeweils 50 μg auf ein Gel aufgetragen und die Membran des anschließenden Western Blots mit dem gleichen Antikörper inkubiert, der auch die an die Beads gebundenen aktiven Formen nachweist.

Interessanterweise zeigten sich in den Zelllysaten ebenfalls erhebliche Unterschiede in der Expression der Totalproteine RhoA, Rac1 und Cdc42 (t-RhoA, t-Rac1 und t-Cdc42) (Abbildung 28).

In den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen lässt sich kaum t-RhoA nachweisen und auch die Expression von t-Rac1 und t-Cdc42 ist deutlich reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Bei den PKC ζ Zellen zeigt sich kein Unterschied in der Expression von t-RhoA und t-Cdc42 zwischen Wildtyp und Knockout. Die Expression von t-RhoA ist allerdings insgesamt geringer als in den PKC $\lambda/1$ Wildtyp Zellen. Die Expression von t-Rac1 ist in den PKC ζ Knockout Zellen wie auch in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen wesentlich geringer als im Wildtyp. Die Regulation an aktivem und totalem Rac1 scheint in beiden Knockout Linien gegenläufig reguliert zu sein.

In einem weiteren Experiment wurde die mRNA Expression von RhoA und Rac1 in der rt-PCR untersucht. Hier zeigten sich für RhoA und Rac1 in beiden Knockout Zelllinien deutlich reduzierte mRNA Level (Abbildung 29).

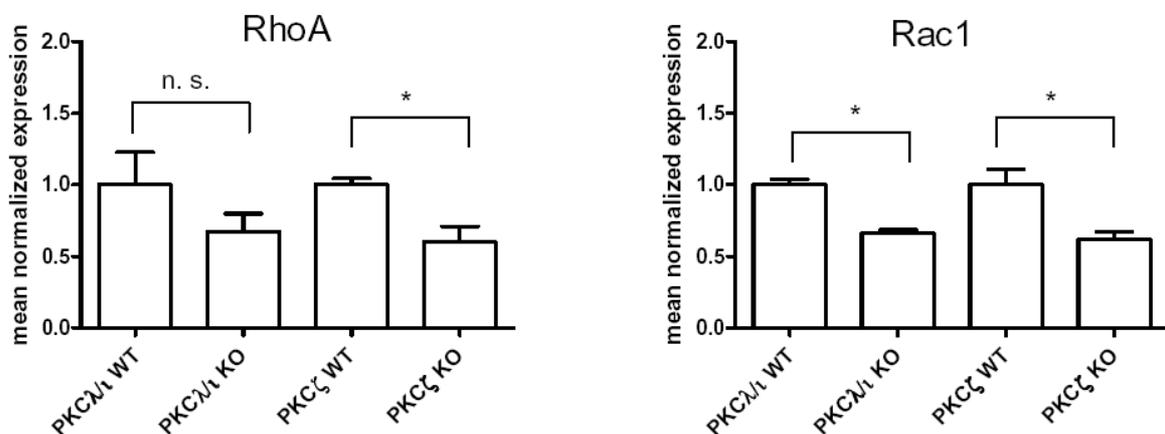


Abbildung 29 mRNA Expression der kleinen GTPasen RhoA und Rac1.

Rt-PCR Analyse der PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen auf die mRNA Expression der kleinen GTPasen RhoA und Rac1. * $p < 0,05$. n. s. = nicht signifikant.

4.3 Transkriptom-Analyse der Podozyten mittels Mikroarray

Die bislang erhaltenen Ergebnisse zu den PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Zellen zeigten, dass die PKC Isoformen verschiedene zelluläre Funktionen beeinflussen. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Defizienz zu erkennen, wählten wir einen Mikroarray-Ansatz, der uns genauere Informationen über die Regulation verschiedenster Gene innerhalb

des Transkriptoms geben sollte. Die PKC λ 1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen für den Mikroarray wurden 14 Tage differenziert bevor die RNA der Zellen isoliert wurde. Die Qualität der RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bionalyzer (Agilent Technologies) vor dem Einsatz im Mikroarray untersucht. Von jeder Zelllinie wurden zwei unterschiedliche Klone untersucht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich alle untersuchten Podozytenlinien etwa in der gleichen Kultivierungspassage befanden (P13-15).

Der Mikroarray „Whole Mouse Genome Oligo Microarray“ untersucht mit über 45 000 Gensonden die RNA auf die Expression von etwa 20 000 unterschiedlichen Genen. Die erhaltenen Genlisten wurden nach mehrerer Filterkriterien sortiert (siehe Methoden) und nur die Gene in die weitere Auswertung übernommen, die in beiden untersuchten Klonen entweder mindestens zweifach überrepräsentiert ($>2,0\uparrow$) oder unterrepräsentiert ($>2,0\downarrow$) waren. In einem weiteren Mikroarray wurde RNA aus Zellen untersucht, die zuvor 24 h mit 100 $\mu\text{g/ml}$ PAN stimuliert wurde. Als Vergleich dienten unstimulierte Zellen. Die Auswertung der PAN-Arrays erfolgte nach den gleichen Kriterien wie bei den PKC λ 1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Zellen.

Tabelle 8 Anzahl über- und unterrepräsentierter Gene in PKC λ 1 KO vs. WT, PKC ζ KO vs. WT und PAN vs. Kontroll- Zellen.

x-fache Regulation	Überrepräsentierte Gene		Unterrepräsentierte Gene	
	Gene	%	Gene	%
PKCλ1 KO vs. WT				
>2	295	100	365	100
>5	160	54	108	30
>10	87	29	32	9
>100	11	4	8	2
PKCζ KO vs. WT				
>2	201	100	163	100
>5	110	37	47	13
>10	66	22	19	5
>100	8	3	1	0.3
PAN vs. Kontrolle				
>2	582	100	413	100
>5	136	46	51	14
>10	32	11	14	4
>100	0	0	0	0

Aus den Arraydaten der PKC λ 1 Zellen erhielten wir 295 Gene, die in den Knockout Zellen mindestens 2 fach überrepräsentiert und 365 Gene, die mindestens 2 fach unterrepräsentiert sind. Einige Gene waren sogar mehr als 100 fach reguliert (Tabelle 8).

In den PKC ζ Podozyten waren 201 Gene in den Knockout Zellen mindestens 2 fach überrepräsentiert und 163 Gene mindestens 2 fach unterrepräsentiert. In den PKC ζ Zellen waren ebenfalls einige Gene mehr als 100 fach reguliert.

Die Arraydaten der mit PAN stimulierten Zellen ergaben allgemein eine größere Anzahl regulierter Gene. In den stimulierten Zellen waren 582 Gene mindestens 2 fach überrepräsentiert und 413 Gene mindestens 2 fach unterrepräsentiert. Ein Teil der Gene war auch 5 fach oder mehr als 10 fach reguliert, jedoch gab es nicht wie in den PKC λ_1 oder PKC ζ Arraydaten Gene, die mehr als 100 fach reguliert sind.

Tabelle 9 Die 30 am stärksten überrepräsentierten Gene aller Arrays.

PKC λ_1 WT vs. KO		PKC ζ WT vs. KO		Kontrolle vs. PAN	
Gen	x-fache Regulation	Gen	x-fache Regulation	Gen	x-fache Regulation
Hoxc9	569.17	Ctsz	577.65	Tnfrsf18	26.08
Ap1p1	381.47	Hoxc9	349.35	Pvr14	19.03
Krt18	249.64	Kif21b	289.23	Ms4a10	17.35
Cxcl12	205.70	Cd97	232.42	Ckmt1	15.79
G6pc2	192.04	Tubb2b	209.08	Bmp8a	13.76
Tgfb3	192.03	Gypc	203.18	Depdc7	13.38
Dpysl4	153.24	Cd248	133.69	Mst1	13.03
Htati2	137.58	Bhlhb9	120.58	Egfr	12.84
Emb	134.92	Cldn1	97.86	Unc45b	12.77
Pdgfd	115.15	Casp1	86.42	S100a15	12.69
Hoxc6	111.51	B3galnt1	69.96	Aldh1a3	12.12
Six1	95.58	Ucp2	50.56	Rasgef1a	12.00
Flrt3	95.40	Cd302	47.57	C1qtnf5	11.87
Galnt4	94.93	Ckb	45.49	Ggtla1	11.82
Dlgh3	86.53	Hoxd9	44.73	Grifin	11.47
Has2	80.79	Hoxc6	44.45	Apobec1	11.16
Hoxc10	80.37	Fbln2	43.26	Scn3b	10.90
Lox	71.89	Tmem144	43.16	Dcn	10.66
Armcx1	71.78	Plcl2	41.39	Gpr135	10.63
Cbr3	70.50	Hs3st3a1	40.09	Nefh	10.61
Foxc2	68.02	Cgref1	37.61	Ppp2r2c	10.58
Cgref1	65.87	Magee1	36.35	Map3k6	10.57
Abcg1	59.74	Dmrt2	32.30	Fez1	10.36
Mbp	55.52	Zfp296	32.03	Hhex	10.36
Aytl1	53.83	P2ry6	31.23	Krtap3-2	10.17
Def6	50.87	Hps1	27.93	Psd2	10.11
H60	48.79	Ldhd	25.98	Slc5a11	10.03
Magee1	42.66	Mpped2	25.88	Tjp3	9.63
Smoc2	40.89	Peli2	25.41	Aqp8	9.46
Tshz3	36.34	Cd38	23.64	Rlf	9.17

In Tabelle 9 und Tabelle 10 sind die jeweils 30 stärksten über- und unterrepräsentierten Gene aus den Arrays der PKC λ_1 Knockout, PKC ζ Knockout und PAN stimulierten Zellen dargestellt. In den PKC λ_1 Knockout Zellen ist Hoxc9 das am stärksten überrepräsentierte Gen

(569 fach), in den PKC ζ Knockout Zellen Ctsz (578 fach) und in den PAN stimulierten Zellen Tnfrsf18 (26 fach). Das jeweils am stärksten unterrepräsentierte Gen ist in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen Armcx2 (251 fach), in den PKC ζ Knockout Zellen Erdr1 (88 fach) und in den PAN stimulierten Zellen Cldn2 (37 fach). Insgesamt ist in den PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Knockout Zellen eine stärkere Genregulation als in den PAN-stimulierten Zellen zu erkennen.

Tabelle 10 Die 30 am stärksten unterrepräsentierten Gene aller Arrays.

PKC $\lambda/1$ WT vs. KO		PKC ζ WT vs. KO		Kontrolle vs. PAN	
Gen	x-fache Regulation	Gen	x-fache Regulation	Gen	x-fache Regulation
Armcx2	250.61	Erdr1	88.14	Cldn2	36.59
Pitx1	227.63	Pdpn	67.95	Cxcl7	27.35
Gbp1	200.94	Tmem51	25.48	Cxcl10	20.95
Gcnt1	115.80	Eps8l2	23.64	Adamts16	17.37
Nkx2-3	98.12	Eml2	23.00	Abp1	17.30
Napsa	96.27	Bmp4	17.74	Ccl7	14.51
Sdk1	93.51	Lmod1	16.70	Ccl2	13.63
Sall3	84.07	Sgca	16.68	Lama1	13.00
Ucp2	70.45	Nppa	14.48	Acta1	12.80
Gypc	70.16	Cd200	13.78	Galnt14	12.26
Col4a6	63.22	Fras1	13.61	Cnn1	11.48
Cd74	57.18	Pcsk9	13.14	Actc1	10.79
Cd302	51.22	Cdh13	11.86	Slco1a6	10.58
Tlr1	45.93	Aldh1a1	10.93	Irg1	9.81
Unc93b1	42.70	Ugt2b38	10.58	Sema5a	9.02
Myo5b	36.82	Ctsh	10.09	Megf6	8.96
Klk1b24	31.92	Myo5b	8.25	Gpr56	8.89
Tbx15	31.66	Adora1	8.25	Pkhd1	7.96
Pice1	24.94	Wnt10a	7.91	Ptpkr	7.72
Lama1	21.36	Fbp2	7.80	Asb5	7.63
Setbp1	21.32	Col4a6	7.78	Dhrs3	7.59
Zcchc3	20.82	Tacstd2	7.64	Bmf	7.51
Irg1	20.63	Gramd1b	7.42	Lincr	7.48
Kcnj14	20.60	Eya2	7.38	Tmem145	7.33
Lrrc33	15.94	Tnfrsf1b	7.30	Sept4	7.24
Fbxl7	15.58	Mpp7	7.28	Cdh6	7.08
Ctsh	14.50	Podn	7.23	Sox8	7.05
Gldc	13.26	Tmem141	7.06	Fhod3	6.96
Chst1	13.19	Pla2g2d	6.57	Tspan18	6.65
Casp1	11.91	Ppargc1a	6.52	Gjb2	6.60

Zur Identifizierung der zellbiologisch für den PKC $\lambda/1$ oder PAN Phänotyp relevanten Gene, erstellten wir Listen mit den in den verschiedenen Versuchsgruppen gleichsinnig regulierten Genen. In einem Vergleich der Gene, die in den PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Knockout Zellen reguliert sind, ergaben sich 35 Gene, die in beiden Knockout Zelllinien mindestens 2 fach überrepräsentiert sind und 32 Gene, die in beiden mindestens 2 fach unterrepräsentiert sind (Abbildung 30A).

Vergleicht man die Gene, die in den PKC ζ Knockout Zellen und in den mit PAN stimulierten Zellen reguliert sind, findet man 16 Gene, die unter beiden Bedingungen mindestens 2 fach überrepräsentiert sind und 13 Gene, die in beiden mindestens 2 fach unterrepräsentiert sind (Abbildung 30B).

Von den Genen, die in den PKC λ_1 Knockout Zellen und in den mit PAN stimulierten Zellen reguliert sind, waren 36 Gene mindestens 2 fach überrepräsentiert und 35 Gene unter beiden Bedingungen mindestens 2 fach unterrepräsentiert (Abbildung 30C). Desweiteren wurden alle drei Konditionen (PKC λ_1 , PKC ζ und PAN) miteinander verglichen und es ergaben sich 8 Gene, die unter allen drei Bedingungen mindestens 2 fach überrepräsentiert sind und 3 Gene, die in allen mindestens 2 fach unterrepräsentiert sind (Abbildung 31).

Die Genlisten der gleichsinnig regulierten Gene wurden mit Hilfe des Programm Multi Experiment Viewer (MeV) weiterverarbeitet, indem für die unterschiedlichen Bedingungen *Heatmaps* erstellt wurden. In die vorderen Spalten wurden die Intensitäten aller Wildtyp Zelllinien oder Kontrollen geladen und in die hinteren Spalten die Intensitäten aller Knockout oder stimulierten Zellen. Die Farbkodierung zeigt die Stärke der Regulation an, eine starke Genexpression ist rot dargestellt und eine schwache Genexpression grün. Am linken Rand der *Heatmaps* wurden die einzelnen Gene vom MeV Programm zusätzlich nach ähnlicher Expression gruppiert (*Hierarchical Clustering*). Gene, die in der *Heatmap* durch die Gruppierung nahe beieinander stehen, ähneln sich daher stärker als Gene, die weiter voneinander entfernt aufgelistet sind. In Abbildung 30 sind *Heatmaps* der Gene dargestellt, die in den PKC λ_1 Knockout Zellen und in den PAN stimulierten Zellen gleichsinnig reguliert sind. Abbildung 31 zeigt *Heatmaps* der Gene, die in den PKC λ_1 Knockout, PKC ζ Knockout und in den PAN stimulierten Zellen gleichsinnig reguliert sind.

Der in den vorherigen Untersuchungen beobachtete Phänotyp mit Veränderungen des Aktin Zytoskeletts, verminderter Zellausdehnung und veränderter Expression von Adhäsionsmolekülen, trat vor allem in den PKC λ_1 Knockout Zellen und in den PAN stimulierten Zellen auf. In den PKC ζ Knockout Zellen konnte nur ein abgeschwächter Phänotyp detektiert werden. Die Gene, die in den PKC λ_1 und PKC ζ Knockout Zellen gleichsinnig reguliert sind, sind also vermutlich nicht die Gene, die diesen Phänotyp verursachen. Und auch die Gene, die in allen drei Bedingungen gleichsinnig reguliert sind, können nicht für den Phänotyp verantwortlich sein. Um den Unterschied zwischen den beiden atypischen PKCs zu finden, wurden die Gene genauer betrachtet, die in den PKC λ_1 Knockout Zellen und in den PAN stimulierten Zellen gleichsinnig reguliert sind, jedoch keine Regulation in den PKC ζ Knockout Zellen zeigen.

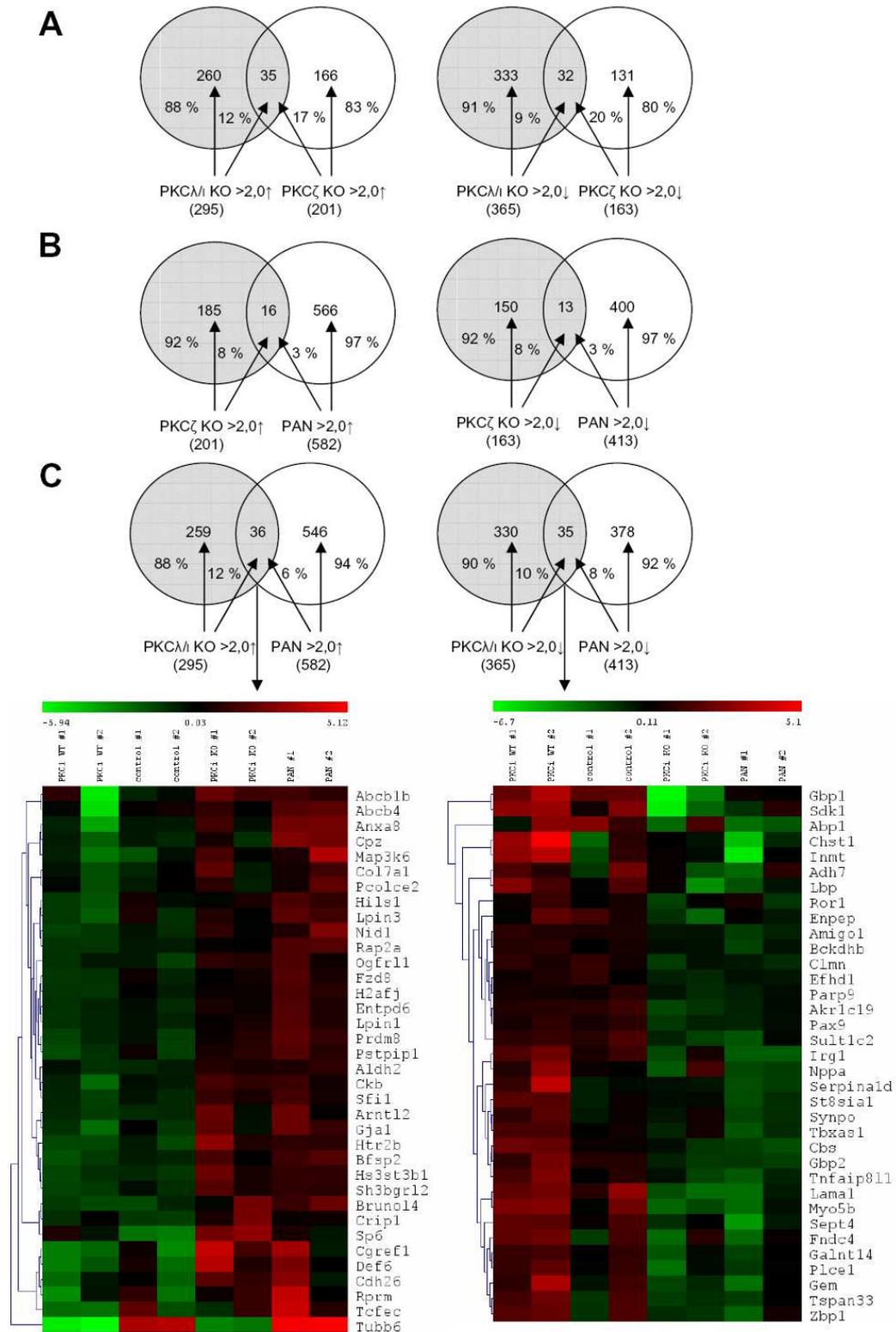


Abbildung 30 Gleichsinnig regulierte Gene der verschiedenen Mikroarrays.

Anzahl der überlappenden Gene in den Vergleichssituationen (A) PKCλ1 KO vs. PKCζ KO, (B) PKCζ KO vs. PAN und (C) PKCλ1 KO vs. PAN. Die Prozentzahlen geben den Anteil der überlappenden Gene an der Gesamtzahl regulierter Gene wieder. (C) In der *Heatmap* des Vergleichs PKCλ1 KO vs. PAN sind die Intensitäten der Regulation als farbiger Code dargestellt (grün = geringe Expression, rot = starke Expression). An der linken Seite wurden die Gene nach ähnlicher Regulation durch eine Clustersoftware (MeV) gruppiert.

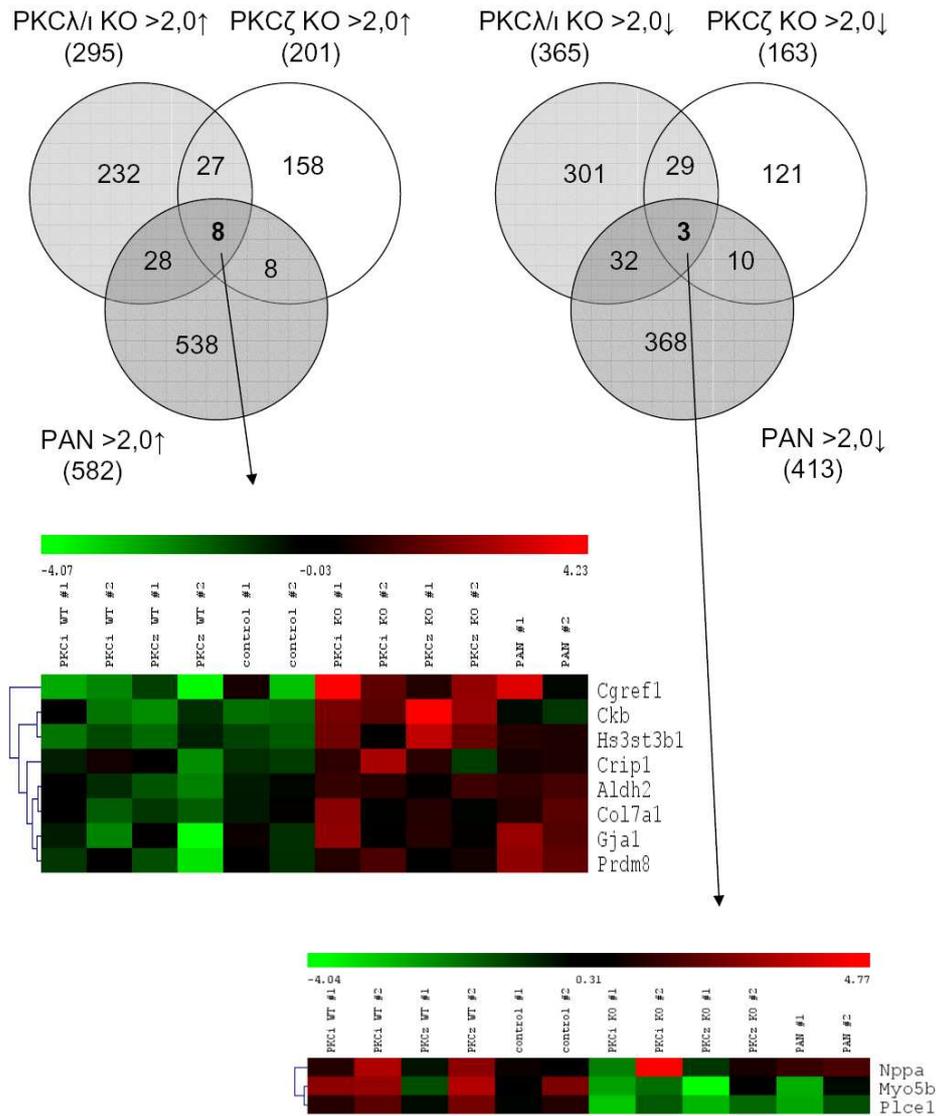


Abbildung 31 Gleichsinnig regulierte Gene in den PKC λ 1, PKC ζ und PAN-stimulierten Zellen.

Überlappende Gene der PKC λ 1, PKC ζ und PAN Arrays. In den *Heatmaps* sind die Intensitäten der Regulation als farbiger Code dargestellt (grün = geringe Expression, rot = starke Expression). An der linken Seite wurden die Gene nach ähnlicher Regulation durch eine Clustersoftware (MeV) gruppiert.

Tabelle 11 zeigt die 28 Gene, die nur in den PKC λ 1 Knockout Zellen und in den PAN stimulierten Zellen überrepräsentiert sind, zusammen mit der jeweiligen Genbeschreibung und der Regulationsstärke in den verglichenen Arrays. Tabelle 12 zeigt die 32 Gene, die in beiden Bedingungen unterrepräsentiert, jedoch nicht in den PKC ζ Knockout Zellen reguliert sind. Die Regulationsstärke der gezeigten Gene ist in Tabelle 11 und Tabelle 12 als Mittelwert der jeweils zwei unterschiedlichen Zellklone bzw. der zwei Stimulationsversuche dargestellt.

Tabelle 11 Ausschließlich in PKC λ / μ Knockout Zellen und PAN-stimulierten Zellen überrepräsentierte Gene.

Die grau hinterlegten Gene werden in der Diskussion genauer betrachtet.

* Swap-70 ist in den Daten des PAN Arrays nicht >2,0 überrepräsentiert, zeigte sich jedoch in der rt-PCR als signifikant überrepräsentiert und wurde deshalb in die Tabelle aufgenommen.

Gensymbol	Überrepräsentiertes Gen	Accession	x-Fache Regulation	
			PKC λ / μ WT vs. KO	control vs. PAN
Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B	NM_011075	54.6	3.3
Abcb4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	NM_008830	19.5	2.8
Anxa8	Annexin A8	NM_013473	8.0	7.4
Arntl2	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2	NM_172309	5.0	4.4
Bfsp2	Beaded filament structural protein 2, phakinin	BC062815	6.6	4.7
Brunol4	Bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)	NM_133195	9.3	7.5
Cdh26	Cadherin-like 26	NM_198656	10.9	4.7
Cpz	Carboxypeptidase Z	NM_153107	2.1	9.4
Def6	Differentially expressed in FDCP 6	NM_027185	50.9	5.0
*Swap-70	Mus musculus SWA-70 protein (Swap70)	NM_009302	2.3	1.4
Entpd6	Adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5830401O07 product:ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6, full insert sequence	AK030789	2.6	3.5
Fzd8	12 days embryo embryonic body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9430006K02 product:inferred: transmembrane receptor {Mus musculus}; frizzled homolog 8 (Drosophila) homolog {GNF expression},...	AK034561	2.6	2.7
H2afj	H2A histone family, member J	NM_177688	2.7	2.8
Hils1	Histone H1-like protein in spermatids 1	NM_018792	4.0	2.3
Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	NM_008311	14.3	4.3
Lpin1	Lipin 1 (Lpin1), transcript variant 2	NM_015763	2.5	2.9
Lpin3	Lipin 3	NM_022883	4.2	3.8
Map3k6	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	NM_016693	5.6	10.6
Nid1	Nidogen 1	NM_010917	3.9	7.1
Ogfr1	Opioid growth factor receptor-like 1	BC019747	3.3	3.9
Pcolce2	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	NM_029620	2.1	2.8
Pstpip1	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1	NM_011193	4.5	3.7
Rap2a	Adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5830461H18 product:hypothetical Ras small GTPase, Rab type/Ras small GTPase, Ras type/Ras small GTPase, Rho type containing protein, full insert sequence. [AK018024]	AK018024	2.5	2.5
Rprm	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	NM_023396	7.3	7.0
Sfi1	Adult male tongue cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2310047115 product:hypothetical protein, full insert sequence.	AK019095	4.0	3.1
Sh3bgrl2	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	NM_172507	6.6	3.2
Sp6	Trans-acting transcription factor 6	NM_031183	6.6	7.4
Tcfec	Transcription factor EC	NM_031198	8.0	5.2
Tubb6	Adult male aorta and vein cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A530059D09 product:unclassifiable, full insert sequence	AK041002	7.2	2.7

Tabelle 12 Ausschließlich in PKC α Knockout Zellen und PAN-stimulierten Zellen unterrepräsentierte Gene.

Die grau hinterlegten Gene werden in der Diskussion genauer betrachtet.

Gensymbol	Unterrepräsentiertes Gen	Accession	x-Fache Regulation	
			PKC α /WT vs. KO	control vs. PAN
Abp1	Amiloride binding protein 1 (amine oxidase, copper-containing)	NM_029638	0.33	0.06
Adh7	Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	NM_009626	0.26	0.38
Akr1c19	Aldo-keto reductase family 1, member C19	NM_001013785	0.20	0.33
Amigo1	Adhesion molecule with Ig like domain 1	NM_146137	0.42	0.29
Bckdhb	Branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide	NM_199195	0.45	0.41
Cbs	Cystathionine beta-synthase (Cbs), transcript variant 2	NM_178224	0.13	0.23
Chst1	Carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	NM_023850	0.08	0.23
Clmn	Calmin isoform e mRNA for calmin delta, complete cds	AB059646	0.34	0.32
Efhd1	EF hand domain containing 1	NM_028889	0.39	0.45
Enpep	Glutamyl aminopeptidase	NM_007934	0.24	0.43
Fndc4	Fibronectin type III domain containing 4	NM_022424	0.21	0.44
Galnt14	Adult male kidney cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:0610033M06 product:RIKEN cDNA 0610033M06 gene, full insert sequence.	AK002747	0.25	0.08
Gbp1	Guanylate nucleotide binding protein 1	NM_010259	0.01	0.32
Gbp2	Guanylate nucleotide binding protein 2	NM_010260	0.18	0.21
Gem	GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)	NM_010276	0.10	0.30
Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase	NM_009349	0.11	0.27
Irg1	Bone marrow macrophage cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:i830053P18 product:immunoresponsive gene 1, full insert sequence.	AK152177	0.20	0.11
Lama1	Mus musculus laminin, alpha 1 (Lama1), mRNA [NM_008480]	NM_008480	0.05	0.08
Lbp	Lipopolysaccharide binding protein	NM_008489	0.12	0.24
Parp9	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	NM_030253	0.42	0.46
Pax9	Paired box gene 9 (Pax9)	NM_011041	0.27	0.40
Ror1	10, 11 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2810404D04 product:unclassifiable	AK012979	0.35	0.34
Sdk1	Sidekick homolog 1 (chicken)	NM_177879	0.01	0.30
Sept4	Septin 4	NM_011129	0.21	0.14
Serpina1d	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1d	NM_009246	0.20	0.40
St8sia1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	NM_011374	0.25	0.40
Sult1c2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	NM_026935	0.22	0.21
Synpo	Adult male hippocampus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C630029A17 product:synaptopodin	AK141564	0.37	0.41
Tbxas1	Thromboxane A synthase 1, platelet	NM_011539	0.33	0.38
Tnfaip8l1	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	NM_025566	0.17	0.25
Tspan33	Tetraspanin 33	NM_146173	0.12	0.36
Zbp1	Z-DNA binding protein 1	NM_021394	0.12	0.42

4.4 Expression von Def-6 und Swap-70

4.4.1 Bestätigung der Mikroarray-Daten mittels rt-PCR

Aus den Mikroarray-Daten ergaben sich viele interessante Gene, die in den PKC λ /1, PKC ζ und PAN-stimulierten Zellen reguliert sind und auch einige, die gleichzeitig unter mehreren Bedingungen reguliert sind. Da die PKC λ /1 Knockout Zellen und die PAN stimulierten Zellen einen sehr ähnlichen Phänotyp zeigen, hatten wir ein besonderes Augenmerk auf die Gene, die in den PKC λ /1 Knockout Zellen und in den PAN Zellen gleichsinnig reguliert sind, aber in den PKC ζ Knockout Zellen keine Regulation zeigen. Von den 28 ausschließlich in den PKC λ /1 Knockout und PAN stimulierten Zellen überrepräsentierten Genen (Tabelle 11) legten wir unseren Fokus besonders auf das Gen für Def-6, von dem bereits gezeigt werden konnte, dass es die Balance der kleinen GTPasen RhoA und Rac1 reguliert und außerdem Aktinhaltige Membrananhäufungen (*membrane ruffles*) bewirkt (122). Da unsere Zellen einen Aktin Zytoskelett Phänotyp und außerdem eine erhöhte Rac1 Aktivität zeigen, erschien uns Def-6 als möglicher Kandidat, um diesen Phänotyp zu erklären. Ein Homolog von Def-6 ist Swap-70, das in den PKC λ /1 Knockout Zellen ebenfalls 2 fach überrepräsentiert, jedoch in den PAN Arrays nur schwach reguliert ist. Aufgrund seiner strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu Def-6 wurde es ebenfalls in den weiteren Untersuchungen berücksichtigt (122;123).

In den Mikroarrays war Def-6 in den PKC λ /1 Knockout Zellen durchschnittlich 51 fach und Swap-70 etwa 2 fach überrepräsentiert. Nach PAN-Stimulation war Def-6 5 fach, Swap-70 jedoch im Mikroarray nur tendentiell (1,4 fach) überrepräsentiert. In den PKC ζ Knockout Zellen waren Def-6 und Swap-70 kaum reguliert.

Zur Bestätigung der Daten aus den Mikroarrays wurde die mRNA Expression der Zellen in der rt-PCR untersucht. Die RNA, die auch in den Mikroarrays verwendet wurde, wurde in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern für Def-6 und Swap-70 in der rt-PCR untersucht. Die Ergebnisse der rt-PCR bestätigten die Mikroarray Analysen. Def-6 war in den PKC λ /1 Knockout Zellen mehr als 200 fach überrepräsentiert, Swap-70 2,5 fach. Nach PAN-Stimulation war Def-6 4 fach und Swap-70 2 fach überrepräsentiert. In den PKC ζ Knockout Zellen waren Def-6 und Swap-70 wie auch in den Mikroarrays kaum reguliert (Abbildung 32). Bei der 24 h PAN Stimulation wurde als Kontrolle eine Probe für 24 h auf Hungermedium (1 % FCS) gesetzt, um zu zeigen, dass diese Behandlung keine Auswirkung

auf die Expression von Def-6 und Swap-70 hat. Die rt-PCRs wurden wie auch die Mikroarrays mit cDNAs von zwei unterschiedlichen Zellklonen wiederholt.

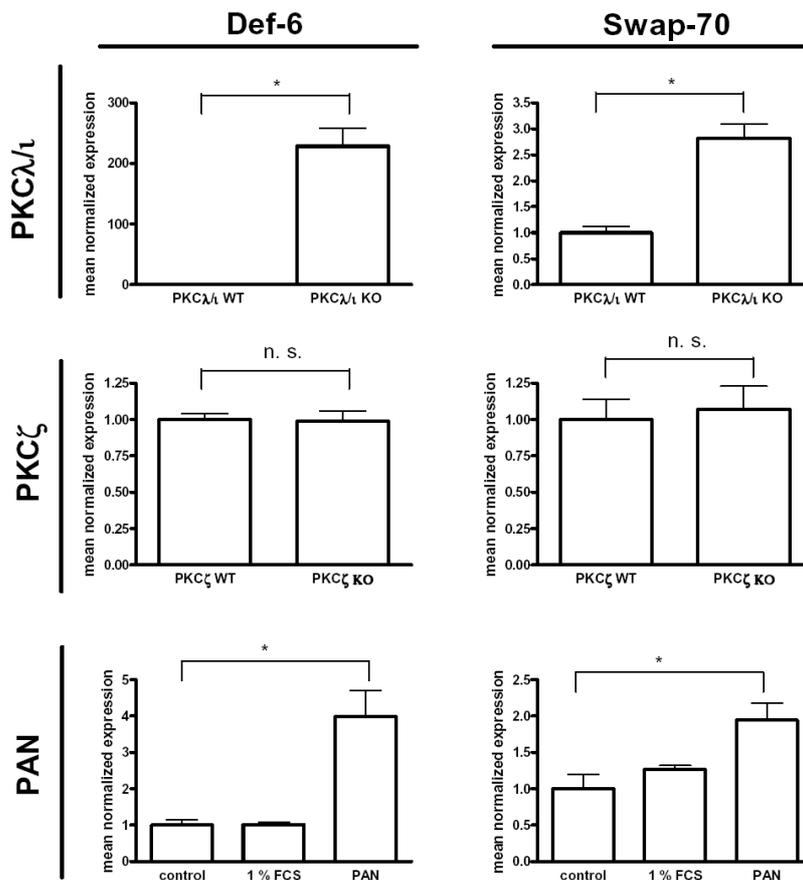


Abbildung 32 Bestätigung der Mikroarray-Daten mittels Real-time PCR der verschiedenen Zelllinien.

Real-time PCR Ergebnisse der RNAs, die auch im Mikroarray eingesetzt wurden. Def-6 und Swap-70 mRNA sind in den PKCλ1 Knockout Zellen und nach PAN Stimulation überrepräsentiert, in den PKCζ Knockout Zellen jedoch kaum reguliert. Eine Kontrolle mit 1 % FCS zeigt ebenfalls keine Regulation. * $p < 0,05$. n. s. = nicht signifikant.

4.4.2 PAN-Versuche in Podozyten

Aus den bisherigen Untersuchungen zeigte sich, dass Def-6 in den PKCλ1 Knockout Zellen und in den Zellen nach PAN-Stimulation jeweils deutlich überrepräsentiert ist und auch Swap-70 eine signifikante Regulation zeigt. Zur Wirkung von PAN auf Podozyten gibt es mehrere Veröffentlichungen (150;151), jedoch wurden bislang Def-6 und Swap-70 noch nicht in diesen Zusammenhang gestellt. In der Literatur wurden bislang sehr unterschiedliche PAN-Konzentrationen auf Podozyten angewendet, die Stimulationsdauer betrug meist 24 oder 48 h (136;137;150). In einem einführenden Dosis-Experiment mit den Konzentrationen 0, 10, 20, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ PAN wurde die Dosis, die benötigt wird, um die Def-6 und Swap-70

mRNA positiv zu regulieren, auf 100 $\mu\text{g/ml}$ festgelegt. Eine zweifache Regulation wurde schon mit 10 $\mu\text{g/ml}$ erreicht, den größten Effekt erhielten wir jedoch mit 100 $\mu\text{g/ml}$.

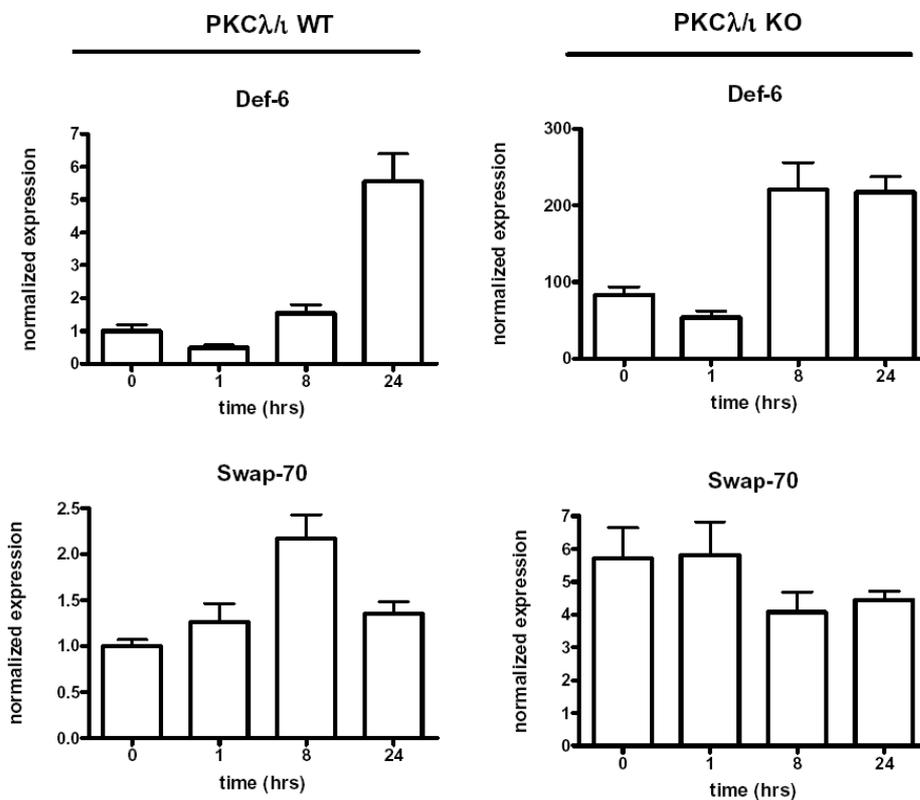


Abbildung 33 PAN Stimulation in den PKC λ 1 Wildtyp und Knockout Podozyten.

Differenzierte PKC λ 1 Wildtyp und Knockout Podozyten wurden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ PAN für unterschiedliche Zeitpunkte stimuliert und die mRNA Expression von Def-6 und Swap-70 in der rt-PCR untersucht.

Um den Effekt von PAN auf die PKC λ 1 Wildtyp und Knockout Podozyten genauer zu untersuchen, wurden diese für 1, 8 und 24 Stunden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ PAN stimuliert, erneut die RNA der Zellen isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und in der rt-PCR eingesetzt (Abbildung 33). Bei den PKC λ 1 Wildtyp Zellen zeigte sich erst nach 24 h eine signifikant erhöhte Expression von Def-6. In den PKC λ 1 Knockout Zellen zeigte sich wie erwartet schon vor Stimulation eine deutlich erhöhte Def-6 mRNA Expression (fast 100 fache), die nach 8 und 24 Stunden Stimulation mit PAN zusätzlich um das 2-3 fache anstieg. Die Swap-70 mRNA Expression stieg in den Wildtyp Zellen nach 8 h PAN Stimulation auf etwa das 2 fache und nach 24 h auf etwas das 1,5 fache. In den PKC λ 1 Knockout Zellen zeigte sich wie für Def-6 vor Stimulation eine erhöhte mRNA Expression von Swap-70, die sich jedoch nicht durch eine PAN Stimulation steigern ließ.

4.4.3 Def-6 Expression *in vivo*

In vitro konnten wir bereits zeigen, dass die mRNA von Def-6 und auch die von Swap-70 in den PKC λ /I Knockout Podozyten überrepräsentiert ist. Als nächstes war es wichtig zu klären, ob dies auch *in vivo* zutrifft. Hierfür wurde RNA aus den Nieren 4 Wochen alter PKC λ /I Wildtyp und Knockout Mäusen isoliert. Dies ist der Zeitpunkt an dem die Tiere bereits stark erkrankt sind. Die PKC ζ Wildtyp und Knockout Tiere, die keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen, waren zum Zeitpunkt der Organentnahme etwas älter (8 Wochen).

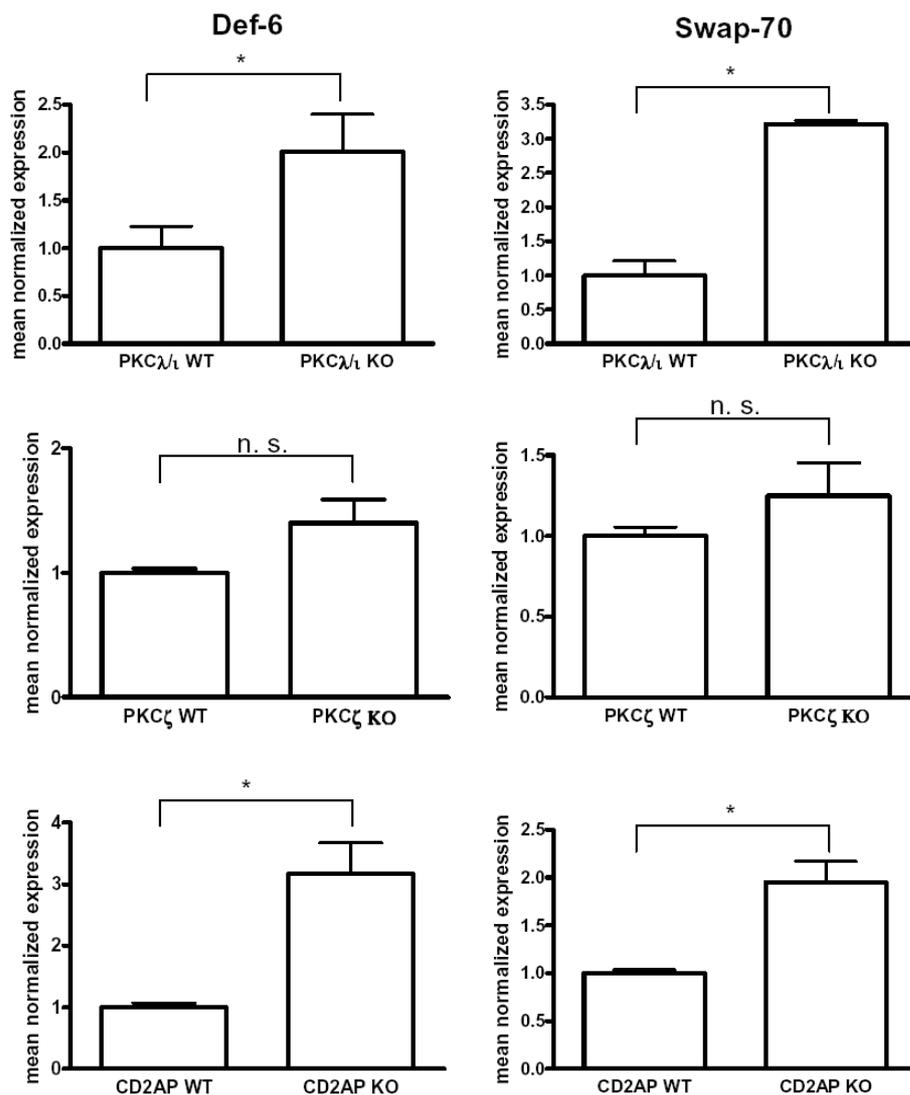


Abbildung 34 Def-6 und Swap-70 mRNA Expression in Nieren unterschiedlicher Wildtyp und Knockout Mäuse.

cDNA aus PKC λ /I, PKC ζ und CD2AP Wildtyp und Knockout Nieren wurden in der rt-PCR auf die mRNA Expression von Def-6 und Swap-70 untersucht. *p<0,05. n. s. = nicht signifikant.

Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in der rt-PCR auf die mRNA Expression von Def-6 und Swap-70 untersucht. In den PKC λ 1 Knockout Nieren zeigte sich wie auch *in vitro* eine gesteigerte Def-6 mRNA Expression und auch Swap-70 war deutlich überrepräsentiert. In den PKC ζ Knockout Nieren war die Def-6 und Swap-70 mRNA ebenfalls tendentiell hochreguliert, jedoch nicht signifikant (Abbildung 34).

Als weiteres Tiermodell wurden in diesem Experiment CD2AP Wildtyp und Knockout Mäuse untersucht. Die CD2AP Knockout Maus entwickelt mit etwa 3 Wochen ebenfalls einen glomerulären Phänotyp mit Proteinurie und Fußfortsatz-*Effacement*, der nach etwa 6 Wochen zum Tod durch Nierenversagen führt (37). Von den CD2AP Wildtyp und Knockout Mäusen wurden im Alter von 5 Wochen (erkrankte Tiere) Nieren entnommen und die cDNA in der rt-PCR ebenfalls auf die mRNA Expression von Def-6 und Swap-70 untersucht. Wie in den erkrankten PKC λ 1 Knockout Mäusen zeigte sich auch in den CD2AP Knockout Tieren eine signifikant erhöhte mRNA Expression von Def-6 und Swap-70 (Abbildung 34).

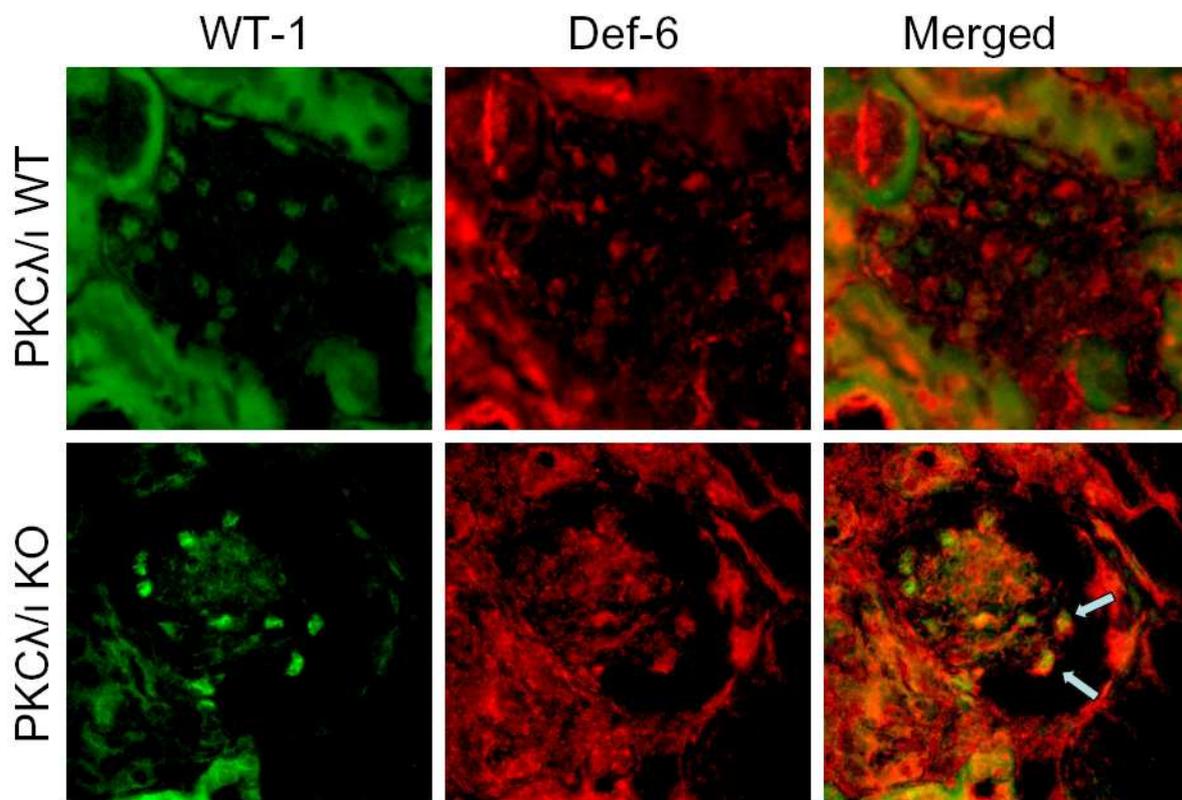


Abbildung 35 Def-6 Expression in PKC λ 1 Wildtyp und Knockout Glomeruli.

Gefrierschnitte von 4 Wochen alten PKC λ 1 Wildtyp und Knockout Nieren wurden mit Antikörpern gegen WT-1 (grün) und Def-6 (rot) gefärbt (Vergrößerung 400 x). In den PKC λ 1 Knockout Glomeruli kolokalisiert Def-6 in einigen Zellen mit WT-1 (weiße Pfeile).

In Immunfluoreszenzfärbungen konnte Def-6 ebenfalls in der Niere und dort vor allem in den Glomeruli detektiert werden. Nieren-Gefrierschnitte 4 Wochen alter PKC λ_1 Wildtyp und Knockout Mäuse wurden mit einem Antikörper gegen Def-6 und zusätzlich mit WT-1 gefärbt, um die Podozyten in den Glomeruli zu markieren (Abbildung 35). Hierbei wurde ein Antiserum gegen Def-6 verwendet, das uns freundlicherweise von Dr. Thomas Samson (Universität von North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt wurde. In beiden Genotypen konnten wir in den Glomeruli Zellen detektieren, die eine Expression von Def-6 zeigen. Im Unterschied zum Wildtyp, kolokalisiert die Def-6 Expression in den Knockout Glomeruli zum größten Teil mit der WT-1 Expression in den Podozyten (Abbildung 35, weiße Pfeile). Die bereits gezeigte erhöhte Def-6 mRNA Expression führt *in vivo* also zu einer verstärkten Proteineexpression von Def-6 in den PKC λ_1 Knockout Podozyten.

4.4.4 Def-6 und Swap-70 Expression in Podozyten

Die Lokalisation von Def-6 wurde bereits in mehreren Zelltypen untersucht und das Protein an den Rändern von Lamellipodien und an Fokalkontakten detektiert (120). Auch für Swap-70 konnte nach Stimulation mit PDGF eine Anreicherung in Membranhäufungen (*membrane ruffles*) gezeigt werden (119).

In diesem Experiment sollte die Lokalisation von GFP-markiertem Def-6 und Swap-70 in kultivierten Podozyten untersucht werden. Dazu wurden die Podozyten transient mit den GFP-Konstrukten Def-6 FL (komplette Sequenz, engl. *full-length*), Def-6 DHL (enthält nur die DHL Domäne, konstitutiv aktiv), Swap-70 FL (komplette Sequenz) und Swap-70 PH (enthält nur die PH Domäne) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend mit Phalloidin und DAPI gefärbt, um die Zellstrukturen besser sichtbar zu machen.

Nach Überexpression von Def-6 FL erkennt man eine Expression von Def-6 im gesamten Zytosol, perinukleär, und vor allem an den Zellrändern (Abbildung 36). Betrachtet man die Phalloidinfärbung, zeigt sich eine Kolokalisation von Def-6 und Aktin an den Zellrändern.

Nach Überexpression von konstitutiv aktivem Def-6 bilden die Podozyten vermehrt Lamellipodien, an deren Rändern sich Def-6 und auch das Phalloidin-gefärbte Aktin anhäuft. In den überlappenden Bildern (*merged*) erkennt man die Kolokalisation von Def-6 DHL mit Aktin. Das überexprimierte Swap-70 FL ist, wie auch Def-6 FL, in der gesamten Zelle, aber verstärkt perinukleär und an den Zellausläufern exprimiert. Es kolokalisiert ebenfalls mit Aktin an den Zellrändern. Das überexprimierte Swap-70 PH, dem unter anderem die Aktin-Bindungsstelle fehlt, ist hingegen fast ausschließlich im Kern exprimiert, an den Zellrändern sind keine Anreicherungen von Swap-70 PH zu erkennen.

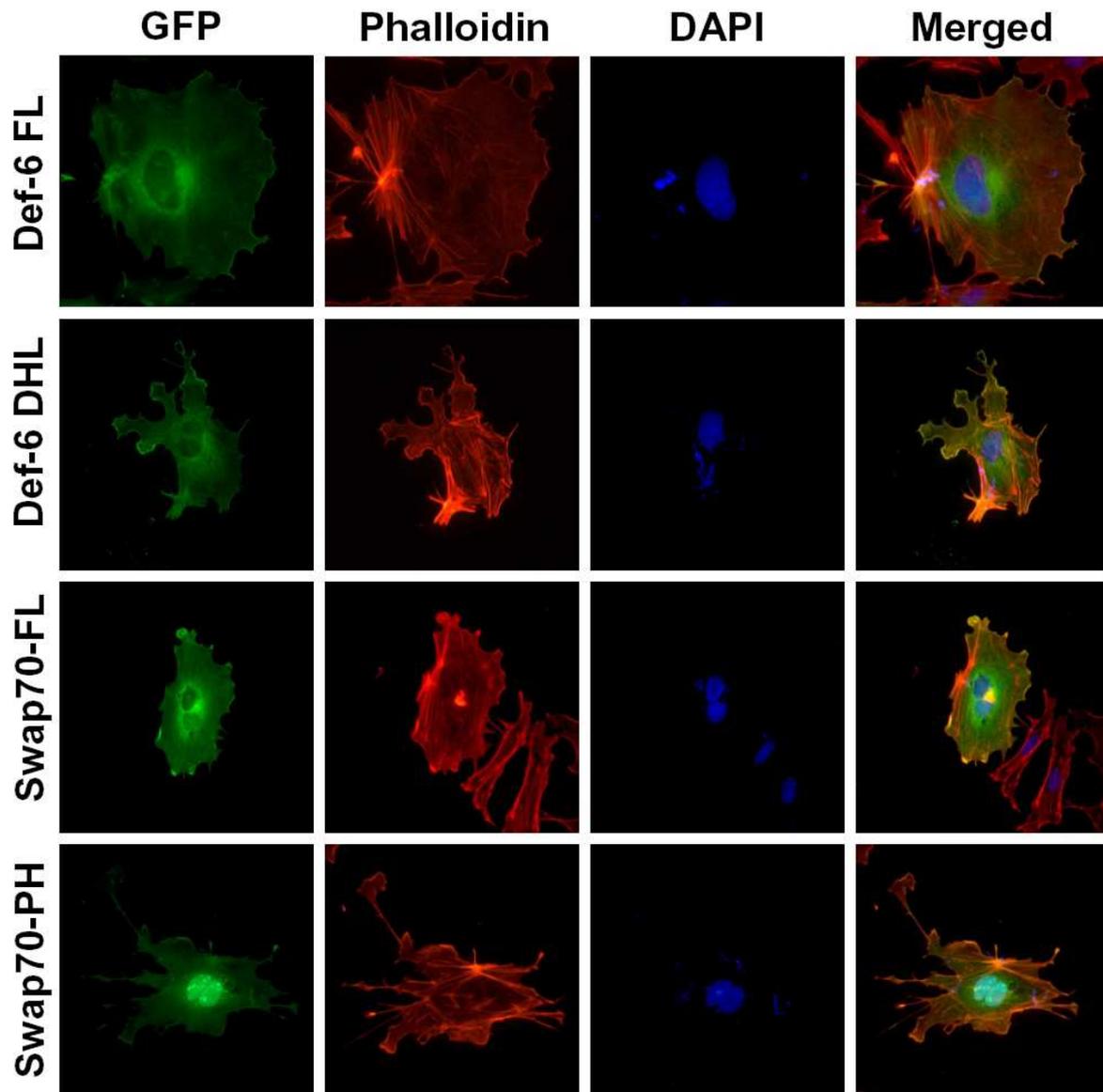


Abbildung 36 Überexpression von Def-6 und Swap-70 in Podozyten.

Podozyten wurden mit GFP-Konstrukten (grün) für Def-6 FL, Def-6 DHL, Swap70-FL und Swap70-PH transfiziert und mit Phalloidin (rot) und DAPI (blau) gefärbt (400 x Vergrößerung).

Der Phänotyp der Podozyten nach Überexpression von konstitutiv aktivem Def-6 DHL ähnelt stark dem in den PKC λ/ι Knockout Zellen beobachteten Phänotyp, so dass ein gemeinsamer Mechanismus nahe liegend ist.

4.4.5 Bindung von PKC λ/ι und PKC ζ an Def-6 und Swap-70

Wenn die PKC λ/ι Defizienz die mRNA und Proteinlevel von Def-6 und Swap-70 beeinflusst, die PKC ζ Defizienz jedoch kaum, scheinen die beiden sich stark ähnelnden PKC Isoformen in diesem Fall eine unterschiedliche Regulation zu bewirken. Für Def-6 und Swap-70 sind ebenfalls sehr ähnliche Funktionen beschrieben, jedoch ist Swap-70 bei PKC λ/ι Defizienz viel

schwächer reguliert als Def-6. Beide aPKC Isoformen haben eine PB1 Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (84). Eine Regulation von Def-6 durch die Bindung an eine der aPKCs über diese oder eine andere Bindungsdomäne wäre möglich. Im Folgenden wurde daher die Bindung von PKC λ_1 und PKC ζ an Def-6 und Swap-70 untersucht, um mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten in ihrem Bindungsverhalten zu erkennen.

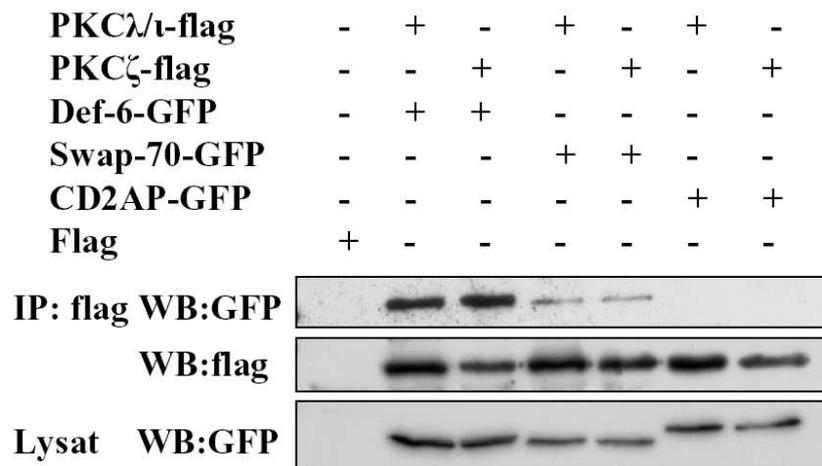


Abbildung 37 Bindung von PKC λ_1 und PKC ζ an Def-6 und Swap-70.

HEK293 Zellen wurden mit PKC λ_1 -flag oder PKC ζ -flag und zusätzlich mit Def-6-GFP, Swap-70-GFP oder CD2AP-GFP transfiziert. Nach der Immunpräzipitation von PKC λ_1 - und PKC ζ -flag wurden die gebundenen GFP markierten Proteine per Western Blot nachgewiesen.

Für die Bindungsexperimente wurden HEK293 Zellen mit PKC λ_1 -flag oder PKC ζ -flag Konstrukten und mit Def-6 FL-GFP und Swap-70 FL-GFP transfiziert. Aus den Lysaten der transfizierten HEK293 Zellen wurden anschließend mit Flag-Beads alle Proteine, die direkt oder indirekt an PKC λ_1 oder PKC ζ binden, aus dem Lysat isoliert. Im Western Blot wurden die an die Flag-Beads gebundenen Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Im Western Blot konnte mit einem GFP-Antikörper gezeigt werden, dass PKC λ_1 und PKC ζ beide an Def-6 binden (Abbildung 37). PKC λ_1 und PKC ζ binden ebenfalls beide an Swap-70, aber deutlich schwächer als an Def-6. Als Kontrolle wurde der Blot mit Flag-Antikörper inkubiert. Dies bewies eine etwa gleichstarke Transfektionseffizienz in allen Proben. Im Lysat wurde zusätzlich die Transfektionseffizienz der GFP-Konstrukte überprüft. Parallel wurden HEK293 Zellen mit PKC λ_1 -flag oder PKC ζ -flag und CD2AP-GFP transfiziert und co-immunpräzipitiert. Hier zeigten beide aPKC Isoformen jedoch keine Bindung. Um unspezifische Bindungen an die Flag-Sequenz auszuschließen, wurde die Immunpräzipitation mit einem Kontroll-Flag-Konstrukt durchgeführt. Hier zeigte sich erwartungsgemäß keine Bindung an eines der GFP-markierten Proteine.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PKC $\lambda/1$ die Struktur des Aktin Zytoskeletts in Podozyten beeinflusst und der Phänotyp den Veränderungen nach PAN-Stimulationen stark ähnelt. Der PKC $\lambda/1$ Knockout scheint hierbei eine größere Auswirkung auf die Zellen zu haben, als der PKC ζ Knockout.

5 Diskussion

Der Podozyt als Teil der glomerulären Filtrationsbarriere ist ein hoch differenzierter und polarisierter Zelltyp, der morphologisch und funktionell in Zellkörper, Primärfortsätze und Fußfortsätze unterteilt wird (10). Um diese dreidimensionale Struktur während der glomerulären Entwicklung zu generieren und zu erhalten, muss es bestimmte Polaritätssignalwege geben, die aber in Podozyten bislang noch nicht untersucht wurden. Es ist anzunehmen, dass auch bei Reparaturmechanismen und glomerulären Schädigungen ähnliche zelluläre Programme ablaufen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine PKC ζ Knockout Maus (stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung) und eine Podozyten-spezifische aPKC λ_1 Knockout Maus generiert und analysiert, um die Rolle von aPKCs für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Podozyten *in vivo* und später auch *in vitro* zu untersuchen.

5.1 Phänotyp der aPKC Knockout Mäuse

Die PKC ζ Knockout Maus zeigt keinen spontanen, renalen Phänotyp. Die Mäuse werden normal und in mendelscher Verteilung geboren. Lediglich in den sekundären lymphatischen Organen (*Peyer's patches* und Milz) zeigen die Knockout Tiere Veränderungen, die auf eine Störung des NF- κ B Signalweges zurückzuführen sind (108).

Da der komplette Knockout von aPKC λ_1 embryonal letal ist (144), generierten wir einen Podozyten-spezifischen Knockout von aPKC λ_1 . Die Podozyten-spezifischen Knockout Mäuse werden gesund geboren, entwickeln jedoch mit drei Wochen Wachstumsstörungen, eine starke Proteinurie und eine progressive Glomerulosklerose. Außerdem kommt es zu einem Verlust der regulären Fußfortsatzarchitektur mit *Effacement* und anderen strukturellen Störungen. Die Schlitzmembranen zwischen den Fußfortsätzen befinden sich nicht wie normalerweise direkt über der Basalmembran, sondern sind verschoben. Bei diesem Mausmodell deutet einiges auf ein Problem bei der Aufrechterhaltung der glomerulären Struktur und nicht auf einen Entwicklungsphänotyp hin. Eine Erklärung für den fehlenden Entwicklungsphänotyp könnte eine Redundanz zwischen den beiden aPKC Isoformen sein, da sie sich strukturell und funktionell sehr ähneln. Möglicherweise wird die Funktion von aPKC λ_1 während der Entwicklung von aPKC ζ kompensiert. Eine funktionelle Redundanz der beiden Isoformen konnte, zum Beispiel im Insulin-stimulierten Glucosetransport (140;152), bereits beobachtet werden. Dies könnte eine Folge der evolutionär konservierten PKC Domänen sein. Atypische PKCs enthalten eine atypische C1 Domäne und eine PB1 Domäne,

die Protein-Protein Interaktionen mit anderen PB1-enhaltenden Gerüstproteinen vermittelt (84;85). Die C1 Domänen von PKC ζ und PKC $\lambda/1$ sind untereinander zu 74 % identisch (103). Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das späte Auftreten des Phänotyps könnte der verwendete Promotor liefern. Der Podocin Promotor aktiviert die Cre Rekombinase relativ spät während der glomerulären Entwicklung (141) und könnte so einen eventuellen Entwicklungsphänotyp verschleiern.

Ein ungewöhnlicher Befund sind bei den aPKC $\lambda/1$ Knockout Mäusen die verschobenen Schlitzmembranen und die *Tight Junction* ähnlichen Zell-Zell-Verbindungen. Die Podozyten scheinen durch das Fehlen von aPKC $\lambda/1$ ihre Orientierung zu verlieren und die Mechanismen, die für die Bildung und Platzierung der Schlitzmembran zuständig sind, sind durch das fehlende aPKC $\lambda/1$ gestört. Interessanterweise gibt es eine ältere Publikation, in der ebenfalls in Podozyten verschobene Schlitzmembranen beobachtet wurden. *Kurihara et al.* konnten bereits 1992 in Ratten nach PAN Stimulation eine ungewöhnliche Schlitzmembranarchitektur und ein vermehrtes Auftreten von *Tight Junctions* zwischen Podozyten nachweisen (131).

In Gefrierschnitten erkrankter 4 Wochen alter Podozyten-spezifischer aPKC $\lambda/1$ Knockout Mäuse, konnten wir in den Glomeruli eine veränderte Verteilung der Moleküle ZO-1, Par3, Nephrin und Podocin zeigen. Die untersuchten Proteine waren nicht mehr linear entlang der glomerulären Basalmembran exprimiert. Das Muster war unterbrochen und es zeigte sich eine eher granuläre Verteilung der Proteine. Das Fehlen von aPKC $\lambda/1$ stört also die normale Verteilung von ZO-1, das mit *Tight Junctions* assoziiert ist, von Par3, welches die Polarität der Zellen beeinflusst und der für die Schlitzmembran essentiellen Moleküle Nephrin und Podocin. In weiteren Färbungen auf Nierenschnitten neugeborener Wistar Ratten, in denen alle Stadien der glomerulären Entwicklung nebeneinander dargestellt werden können, konnten wir zusammen mit der Gruppe von Prof. Huber in Freiburg die Translokation von aPKC $\lambda/1$ und Par3 während der glomerulären Entwicklung zeigen (153). Dabei erhielten wir einen einzigartigen Befund: In den frühen Phasen der glomerulären Entwicklung (*comma shaped body*) befinden sich aPKC $\lambda/1$, Par3 und ZO-1 an der apikalen Membranseite. Während der *s-shaped body* Phase verlagert sich die Expression von aPKC $\lambda/1$, Par3 und ZO-1 entlang der lateralen Seite zur Zellbasis. Nachdem diese „Polaritätsumkehr“ erfolgt ist, kann erst die Nephrin und Podocin Expression in der späten *s-shaped body* und frühen *capillary loop* Phase nachgewiesen werden, die sofort an der basolateralen Seite der Podozyten lokalisieren. In dem Komplex kolokalisieren aPKC $\lambda/1$, Par3, ZO-1 mit Nephrin und Podocin und in dem sich entwickelnden Glomerulus kommt es zur Ausbildung der Schlitzmembran. Die Polaritätsumkehr während der Entwicklung bestimmt demzufolge die zielgerichtete

Lokalisation der Schlitzmembranmoleküle Nephrin und Podocin zur basalen Seite der Podozyten. Diese Polaritätsumkehr ist bislang nur in Podozyten beschrieben und aPKC $\lambda/1$ als Teil des Polaritätskomplexes scheint eine große Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung der Schlitzmembran zu spielen. Durch diesen Befund lassen sich auch die verschobenen Schlitzmembranen in den aPKC $\lambda/1$ Knockout Nieren erklären. Die Polarität der Podozyten und die strukturierte Formierung der Fußfortsätze ist durch das Fehlen von aPKC $\lambda/1$ gestört, die Schlitzmembranmoleküle Nephrin und Podocin werden nicht mehr an ihren Zielort rekrutiert und es bilden sich Schlitzmembranen an anderen unüblichen Stellen aus.

In einer parallel veröffentlichten Arbeit von *Hirose et al.* konnte der von uns beobachtete Phänotyp der Podozyten-spezifischen aPKC $\lambda/1$ Knockout Maus bestätigt werden (80). In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Podozyten-spezifische aPKC $\lambda/1$ Knockout Maus generiert und ein ähnlicher Phänotyp mit Wachstumsstörungen, Proteinurie und Glomerulosklerose in den Knockout Tieren beobachtet. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, konnten sie jedoch bereits an Tag 1 nach der Geburt eine Proteinurie detektieren, was wahrscheinlich an der Wahl des Cre-Promotors lag. *Hirose et al.* verwendeten anstelle des Podocin Promotors einen Podozyten-spezifischen Nephrin Promotor, der die Cre-Rekombinase wesentlich früher in der glomerulären Entwicklung aktiviert. Diese Erkenntnisse klären auch weitgehend die oben gestellte Frage, ob der von uns beobachtete spät auftretende Phänotyp durch eine Kompensation von aPKC $\lambda/1$ durch aPKC ζ oder durch die späte Aktivierung der Cre Rekombinase durch den Podocin-Promotor hervorgerufen wird. Vergleicht man unsere und die Ergebnisse von *Hirose et al.*, dann ist es wahrscheinlich, dass die Wahl des Podocin-Promotors für den späten Phänotyp verantwortlich ist. Jedoch kann eine mögliche Redundanz der beiden aPKC Isoformen weiterhin nicht ausgeschlossen werden. Dies wäre über einen Doppel-Knockout beider aPKCs genauer analysierbar.

Bei weiteren Untersuchungen an den aPKC $\lambda/1$ Knockout Nieren zeigte sich eine global reduzierte Expression von Nephrin und CD2AP im Western Blot und eine signifikant geringere Zahl WT-1 positiver Zellen in den Knockout Glomeruli. Die reduzierte Nephrin Expression wurde auch bereits in den Immunfluoreszenzfärbungen beobachtet. Eine geringere Zahl WT-1 positiver Zellen in den Glomeruli kann immer zwei Gründe haben: Zum einen könnte die Zahl der Podozyten in den Glomeruli geringer sein, zum anderen könnten die Podozyten ihre WT-1 Expression verlieren, zum Beispiel aufgrund einer Dedifferenzierung.

Dasselbe gilt für die niedrigere Nephtrin Expression. Eine mögliche Dedifferenzierung wurde in folgenden Experimenten in kultivierten Podozyten genauer untersucht.

5.2 PKC λ / ι -Defizienz in Podozyten führt zu Dedifferenzierung und zu Veränderungen des Aktin Zytoskeletts

In unseren bisherigen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Deletion von PKC λ / ι *in vivo* zu einem starken glomerulären Phänotyp mit Proteinurie und Glomerulosklerose führt. Um den Einfluss von PKC λ / ι und PKC ζ auf den Podozyten genauer zu untersuchen, generierten wir monoklonale Podozytenzelllinien aus Podozyten-spezifischen PKC λ / ι Knockout und PKC ζ Knockout Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren. Wir konnten in den Zelllinien die Expression von WT-1, Nephtrin und Synaptopodin zeigen und so die Zellen als Podozyten charakterisieren. Hierbei zeigte sich bereits, dass beide Knockout Zelllinien auf mRNA Ebene eine geringere WT-1 und Synaptopodin Expression aufweisen (Abbildung 20). Auf Proteinebene zeigen jedoch nur die PKC λ / ι Knockout Podozyten eine deutlich reduzierte WT-1 und Synaptopodin Expression (Abbildung 18). Diese verminderte Expression der Podozytenmarker bestätigt die Vermutung, dass die Differenzierung der Zellen gestört ist. Insbesondere eine geringere Synaptopodinexpression ist als ein Zeichen für Dedifferenzierung zu werten (154).

Morphologisch zeigten vor allem die PKC λ / ι Knockout Podozyten in Kultur einen Phänotyp. Schon im proliferierenden Zustand zeigten sie nicht die für Podozyten typische Morphologie, sondern wuchsen langgestreckt und zum Teil übereinander. Sie erreichten niemals eine Konfluenz, sondern wuchsen übereinander in Clustern. Dieses Wachstumsverhalten ist auf die gestörte Polarität der PKC λ / ι Knockout Podozyten zurückzuführen. Die Zellen zeigen kein gerichtetes Wachstum und keine Kontaktinhibition. Im differenzierten Zustand sind die PKC λ / ι Knockout wesentlich kleiner als die Kontrollzellen und zeigen deutlich kürzere Zellausläufer. Diese verminderte Zellausdehnung konnten wir durch Messung des mittleren Zelldurchmessers in Vinculin-Färbungen bestätigen. Zusätzlich konnte auch die in Fokalen Kontakten vorkommenden Proteine FAK und Integrin β 1 in geringerer mRNA und Proteinexpression in den PKC λ / ι Knockout Podozyten nachgewiesen werden. In vergleichenden Experimenten zeigten die PKC ζ Zellen keine signifikanten Veränderungen. Diese Ergebnisse machten einen Phänotyp, der das Aktin Zytoskelett beeinflusst, wahrscheinlich. In Phalloidin-färbungen der monoklonalen Zelllinien, konnte besonders in den PKC λ / ι Knockout Podozyten ein verändertes Aktin Zytoskelett detektiert werden. In diesen Zellen waren kaum noch Stressfasern zu erkennen und ein Großteil des Aktins lagerte sich an

den Zellrändern und bildete Membranhäufungen (*membrane ruffles*) (Abbildung 27). Die gleichen Effekte auf das Aktin Zytoskelett sahen wir auch nach PAN Stimulation, wie es bereits von *Rico et al.* (137) und vielen anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde. Ebenfalls bekannt ist die Wirkung von PAN auf Integrin $\beta 1$. *Coers et al.* konnten bereits nach PAN Stimulation den Verlust von Integrin $\beta 1$ -haltigen Fokalkontakten beschreiben (135). In einer anderen Veröffentlichung von *Krishnamurti et al.* konnte eine auf mRNA und Proteinlevel reduzierte Expression von Integrin $\alpha 3$ und $\beta 1$ in glomerulären Epithelzellen nachgewiesen werden (136). Auch die verminderte Adhäsion nach PAN Stimulation, wie von *Fishman et al.* beschrieben (134), könnte die Folge einer verminderter Integrin $\beta 1$ Expression sein.

Das Zytoskelett der Podozyten spielt aufgrund der komplexen Struktur der Zellen bei der Aufrechterhaltung des glomerulären Filters und in pathologischen Zuständen eine besondere Rolle (10). Bei Veränderungen des Aktin Zytoskeletts sind oft die kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 involviert, die Signalwege kontrollieren, die Membranrezeptoren mit dem Auf- und Abbau des Aktin Zytoskeletts und assoziierter Integrin Adhäsionskomplexe verbinden, wodurch Prozesse wie Morphologie, Bewegung und Adhäsion reguliert werden (60). In Podozyten konnte bereits eine differenzierungs-abhängige Expression von RhoA und Rac1 beschrieben werden. Die Aktivität von RhoA ist in differenzierten Podozyten größer als in undifferenzierten, was die verstärkten Stressfasern in den differenzierten Podozyten erklärt (59). Und auch für Rac1 konnte eine verstärkte Aktivität in 7 Tage differenzierten Podozyten gezeigt werden, während die Aktivität nach 14 Tagen wieder auf das Ausgangsniveau abfällt (155). Eine erhöhte Rac1 Aktivität erklärt auch das verstärkte Auftreten von Lamellipodien und Zellausläufer in differenzierten Podozyten, die wir ebenfalls in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen nachweisen konnten (Abbildung 22).

Auch im PAN Rattenmodell ist ein Einfluss auf die kleinen GTPasen gezeigt worden. An Tag 7 (zum Zeitpunkt der stärksten Proteinurie) steigt die RhoA Aktivität. Die Rac1 Aktivität steigt erst signifikant an Tag 14, wenn der Regenerationsprozess wieder einsetzt (155).

In den hier untersuchten PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Knockout Podozyten konnte eine deutlich verstärkte Aktivität von Rac1 im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp Zelllinien detektiert werden, die Aktivität von RhoA und Cdc42 war hingegen kaum beeinflusst (Abbildung 28). Die verstärkte Rac1 Aktivität ist vermutlich ein Grund für den auffälligen Aktin Zytoskelett Phänotyp, da bereits gezeigt werden konnte, dass Rac1 Aktivität zur Bildung von Lamellipodien führt, wie wir sie auch verstärkt in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen detektieren können (60). Jedoch zeigen beide aPKC Knockout Zelllinien eine erhöhte Rac1 Aktivität, so dass vermutlich auch die verminderte Expression von t-Cdc42 eine Rolle für den

Phänotyp spielt, die nur in den PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen auftritt. Die reduzierte Expression der Totalproteine RhoA, Rac1 und Cdc42 in den Knockout Zellen ist ein Phänomen, das nicht durch unspezifische Antikörper hervorgerufen werden kann, da für die Aktivitätsassays und für die Gesamtllysate derselbe Antikörper verwendet wurde. In der rt-PCR konnte außerdem eine geringere mRNA Expression von RhoA und Rac1 in den PKC $\lambda/1$ und PKC ζ Knockout Podozyten nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Annahme, dass auch die Proteinlevel tatsächlich vermindert sind. Da schon die RNA Mengen beeinflusst sind, ist der Grund für die geringen Proteinlevel nicht auf translationaler Ebene zu suchen, sondern muss transkriptionell bedingt sein. Die Ursache kann also entweder eine verminderte Transkription sein, so dass von Beginn an weniger mRNA produziert wird, oder es wird genügend mRNA hergestellt, diese aber sofort wieder degradiert. Alternativ wäre ebenfalls ein rapider Abbau der Proteine in den Knockouts denkbar.

Betrachtet man die Lokalisation der beiden aPKCs in Podozyten, ist es sehr auffallend, dass PKC $\lambda/1$ außer im Zytosol auch im Kern, PKC ζ jedoch in unstimulierten Zellen und auch nach PAN-Stimulation nicht im Kern lokalisiert ist. In der Literatur konnten beide Isoformen bereits im Kern detektiert werden. PKC ζ wandert nach NGF Stimulation transient in den Kern (100). PKC $\lambda/1$ konnte auch in unstimulierten Zellen bereits im Kern detektiert werden. Nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren transloziert PKC $\lambda/1$ ins Zytoplasma und in kompaktere Strukturen des Kerns (105). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, enthalten beide Isoformen ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und ein Kernexportsignal (NES). Das NLS von PKC $\lambda/1$ ist stärker als das NES, so dass der Kernimport wesentlich effektiver ist (103). Die verstärkt nukleäre Lokalisation von PKC $\lambda/1$ bewirkt vermutlich entscheidende Unterschiede in Aktivierungsprozessen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, für die PKC ζ eine geringere Rolle spielt.

5.3 Mikroarray Analysen der Podozyten

Da die bisherigen Analysen auf multiple Zellmechanismen hindeuten, die den Phänotyp beeinflussen, haben wir eine Mikroarray Analyse durchgeführt. Mit einer Mikroarray Analyse kann man die zu untersuchenden Proben auf die Expression einer Vielzahl von Genen testen. Vergleicht man die unterschiedlich behandelten Proben, oder wie in diesem Fall die Wildtyp und Knockout Zellen, erhält man einen Überblick über alle Gene, die unterschiedlich reguliert sind. Im besten Fall identifiziert man ganze Gengruppen, die einer bestimmten Funktion oder einem Signalweg zugeordnet werden können.

In dieser Arbeit wurde der „Whole Mouse Genome Oligo Microarray“ (Agilent Technologies) verwendet und wir haben PKC λ 1 und PKC ζ Wildtyp und Knockout Podozyten sowie unstimulierte und mit PAN stimulierte Podozyten miteinander verglichen. In den PKC λ 1 und PKC ζ Knockout Zellen fanden wir jeweils mehrere Hundert Gene, die in ihrer Expression mehr als zweifach im Vergleich zum Wildtyp beeinflusst waren. In den PAN-stimulierten Zellen waren etwa doppelt so viele Gene reguliert, jedoch zeigten diese im Unterschied zu den beiden Knockout Zelllinien eine wesentlich schwächere Regulation. Einzelne Gene der PKC λ 1 oder PKC ζ Knockout Zellen waren in diesen bis zu 600 fach reguliert, in den PAN-stimulierten Zellen war die stärkste Regulation 26 fach. Dieser unterschiedliche Effekt in den Knockout Zelllinien im Vergleich zu den PAN-stimulierten Zellen könnte mit der Stimulationsdauer zusammenhängen. Die Zellen wurden für 24 h mit PAN behandelt, die Knockout Zellen jedoch sind dauerhaft defizient für PKC λ 1 oder PKC ζ .

Um die Gene zu identifizieren, die mit dem bisher beobachteten Phänotyp der PKC λ 1 Knockout Zellen in Zusammenhang stehen, haben wir die Listen der regulierten Gene miteinander verglichen. Aus einem Vergleich der Gene, die in beiden Knockout Zelllinien und auch in den PAN-stimulierten Zellen reguliert sind, identifizierten wir 8 Gene, die in allen Bedingungen überrepräsentiert sind (Cgref1, Ckb, Hs3st3b1, Crip1, Aldh2, Col7a1, Gja1, Prdm8) und 3 Gene, die in allen Fällen unterrepräsentiert sind (Nppa, Myo5b, Plce1).

Eines der überrepräsentierten Gene, das *Gap Junction* Protein Gja1 (Connexin43) gehört zur Gruppe der Connexine. *Gap junctions* vermitteln die Zell-Zell Kommunikation in vielen Geweben (156). Sie bestehen aus Kanälen, die benachbarte Zellen miteinander verbinden und so einen Austausch von Ionen, Nährstoffen und Metaboliten erlauben. Jede Zelle bildet einen Halbkanal, so dass zwei Zellen an Zellkontaktstellen eine *Gap Junction* bilden können. Die Halbkanäle sind Oligomere aus 6 Connexin Molekülen (157). Yaoita et al. konnten bereits *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass die Gja1 Expression nach PAN-Stimulation in Podozyten ansteigt (157). Unter normalen Bedingungen findet man keine *Gap Junctions* zwischen Podozyten, unter nephrotischen Bedingungen oder nach Behandlung mit Protaminsulfat konnten jedoch vermehrt *Junctions* mit engem Kontakt bei Podozyten detektiert werden (49;158). Hierbei scheint die Regulation von Gja1 nicht von einem bestimmten Stimulanz wie z. B. PAN abhängig, sondern eher eine allgemeine Antwort der Podozyten auf Schädigung zu sein (157). In unseren Untersuchungen ist Gja1 in den PKC λ 1 Knockout und in den PAN-stimulierten Zellen überrepräsentiert, in denen auch die Zellen stark geschädigt sind. Jedoch finden wir Gja1 genauso stark in den PKC ζ Knockout Zellen überrepräsentiert, die einen wesentlich schwächeren Phänotyp zeigen. *In vivo* konnten elektronenmikroskopisch in den

Podozyten-spezifischen PKC λ 1 Knockout Mäusen vermehrt *Tight Junction*-ähnliche Verbindungen zwischen den Podozyten detektiert werden, wie sie schon von *Kurihara et al.* nach PAN-Behandlung gezeigt wurden (131). Diese in reifen Podozyten eigentlich kaum vorkommenden Zell-Zell-Verbindungen könnten eine Folge der verstärkten Gjal Expression und/oder anderer *Gap Junction* Moleküle sein.

Da die PAN stimulierten Zellen einen ähnlichen zytoskelettalen Phänotyp zeigen wie die PKC λ 1 Knockout Zellen, nahmen wir an, dass die für den Phänotyp verantwortlichen Gene unter beiden Bedingungen ähnlich reguliert sein müssen. Die für die Ausbildung des Phänotyps verantwortlichen Gene sollten in den PKC ζ Knockout Zellen nicht reguliert sein. Daher haben wir uns speziell auf die Gene konzentriert, die in den PKC λ 1 Knockout und PAN-stimulierten Zellen reguliert sind, nicht aber in den PKC ζ Knockout Zellen. In Tabelle 11 und Tabelle 12 sind diese Gene dargestellt. Unter den überrepräsentierten Genen befand sich das Annexin Anxa8, einige Transkriptionsfaktoren (Sp6, Tcfec), Histon-Proteine (H2afj, Hils1) und einige für die Zellstruktur wichtige Proteine (Cdh26, Def-6 und Swap-70).

Annexine sind Ca²⁺ bindende Proteine, die in der Lage sind Ca²⁺ abhängig mit negativ geladenen Membranoberflächen zu interagieren. Die N-terminale Seite der Annexine stellt eine Zieldomäne für viele signalvermittelnde Kinasen wie Rezeptor-Tyrosinkinasen und Proteinkinasen dar (159;160). Für viele Annexine konnte bereits eine Expression in der Niere nachgewiesen werden (161). Inzwischen konnte in Knockout Modellen gezeigt werden, dass Annexine die Rekrutierung von Membranproteinen und damit die Membranstruktur regulieren (162;163).

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die bei der Transkription für die Initiation der RNA-Polymerase eine große Rolle spielen. Die Gene Sp6 und Tcfec sind Transkriptionsfaktoren und können somit durch Bindung an bestimmte DNA Bereiche oder DNA bindende Proteine die Transkription bestimmter Proteine beeinflussen. Sp6 ist an der Entwicklung vieler epithelhaltiger Organe, vermutlich über eine apoptotische Wirkung, beteiligt (164). Tcfec wird NF κ B-abhängig durch LPS induziert (165).

Histon-Proteine sind im Zellkern für die Verpackung der DNA innerhalb der Chromosomen von großer Bedeutung und spielen daher bei der Transkription und DNA Reparatur eine entscheidende Rolle.

Cadherine sind als Adhäsionsmoleküle Bestandteile von *Adherens Junctions*. Sie vermitteln Zell-Zell-Erkennung und Adhäsion (166). Der zytoplasmatische Teil der Cadherine interagiert mit den zytoplasmatischen Cateninen, so dass sich ein Cadherin-Catenin Komplex bildet (167). Diese Cadherin-Catenin Komplexe vermitteln eine lokale Aktin Polymerisation um

Adherens Junctions zu bilden. Die Signalweiterleitung über diese Komplexe erfolgt über die kleinen GTPasen. Rac und Rho sind für die Bildung der *Adherens Junction* wichtig (168;169), während Cdc42 vor allem für die Aufrechterhaltung von *Adherens Junctions* verantwortlich ist (166). Da wir in den PKC λ /1 Knockout und PAN-stimulierten Zellen ebenfalls Veränderungen in den Zell-Zell Kontakten zwischen den Podozyten detektieren konnten, ist es möglich, dass Cadherine bei diesem Phänotyp eine entscheidende Rolle spielen, vor allem da die Regulation der *Junctions* über Rac und Rho vermittelt wird.

Die Proteine Def-6 und Swap-70 werden im nächsten Unterpunkt (5.4) genauer behandelt.

Unter den unterrepräsentierten Genen befand sich eine Gruppe GTP und Guanylat bindender Proteine (Gbp1, Gbp2, Gem) und das Gen Synpo, welches das Protein Synaptopodin kodiert. Guanylat-bindende Proteine (GBPs) binden spezifisch Guanin Nukleotide (GMP, GDP, GTP) und unterscheiden sich von den GTP-bindenden Proteinen durch ihre 2 anstelle von 3 Bindungsmotiven (170). Sie spalten in zwei aufeinanderfolgenden Spaltreaktionen GTP in GMP und gehören zur Familie der GTPasen (170;171). Eine starke Expression der Guanylat bindenden Proteine Gbp1 und Gbp2 konnte in Endothelzellen nach Stimulation mit Interferon γ , TNF oder IL1b gezeigt werden (172). Da diese Proteine in den PKC λ /1 Knockout und PAN-stimulierten Zellen unterrepräsentiert sind, wäre es möglich, dass es zu einer verminderten GTP Hydrolyse in den Zellen kommt. Dies würde die verstärkte Expression von aktivem GTP-Rac in den PKC λ /1 Knockout Zellen erklären. *Balasubramanian et al.* konnten bereits in NIH 3T3 Zellen zeigen, dass eine verstärkte Expression von Gbp2 zu einer verminderten Rac Aktivierung führt (173).

Das Podozyten-spezifische Protein Synaptopodin wird nur in differenzierten Podozyten exprimiert (57). Die in den PKC λ /1 Knockout und PAN-stimulierten Zellen verminderte Synaptopodin deutet, wie bereits vorher in der Immunfluoreszenz in den PKC λ /1 Knockout Podozyten detektiert, auf eine gestörte Differenzierung der Podozyten hin. *Asanuma et al.* konnten außerdem zeigen, dass eine verringerte Synaptopodin Expression zu einer geringeren RhoA Expression und Aktivität führt und im Gegensatz dazu die Überexpression zur Hochregulation von RhoA. Dies erfolgt durch die bevorzugte Bindung von Synaptopodin an die GDP-gebundene Form von RhoA, wodurch die Smurf1-vermittelte Ubiquitinierung und somit der Abbau von RhoA unterbunden wird (59). Die geringere RhoA Expression konnten wir in den PKC λ /1 Knockout Zellen ebenfalls detektieren, sodass dieser Signalweg in den Zellen ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

5.4 Def-6 und Swap-70 in Podozyten

Den überrepräsentierten Genen Def-6 und Swap-70 haben wir uns besonders gewidmet. Def-6 und sein Homolog Swap-70 interagieren beide als GEFs für die GTPase Rac1 (118;119) und lokalisieren an Lamellipodien und Fokalkontakten (120;123).

In den hier durchgeführten Mikroarray-Analysen zeigte sich das Gen für Def-6 in den PKC λ/ι Knockout Zellen und in den PAN-stimulierten Zellen als stark überrepräsentiert und Swap-70 als leicht überrepräsentiert. In den PKC ζ Knockout Zellen waren beide nicht wesentlich reguliert. Die PKC λ/ι Knockout und die PAN-stimulierten Zellen zeigten außerdem in der Zellkultur einen wesentlich auffälligeren Aktin Zytoskelett Phänotyp als die PKC ζ Knockout Zellen, der möglicherweise durch ein Ungleichgewicht der kleinen GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 verursacht wird. Def-6 und sein Homolog Swap-70, deren Überexpression ebenfalls Veränderungen des Aktin Zytoskeletts verursachen kann (120;123), erschienen uns als mögliche Kandidaten, um den Phänotyp der Zellen zu erklären.

In vivo konnten wir erhöhte mRNA Level von Def-6 und auch Swap-70 in PKC λ/ι Knockout und CD2AP Knockout Nieren erkrankter Tiere detektieren, nicht aber in den PKC ζ Knockout Nieren. Dies lässt vermuten, dass die erhöhten Def-6 mRNA Level keine direkte Folge der PKC λ/ι Defizienz sind, sondern eher auf die allgemeine glomeruläre Schädigung, wie sie auch in den CD2AP Knockout Mäusen beschrieben ist, zurückzuführen sind. Ein weiteres Indiz für diese Theorie sind die Def-6 mRNA Level in den Nieren unterschiedlich alter PKC λ/ι Wildtyp und Knockout Tiere. In den Wildtyp Mäusen sinken die Def-6 mRNA Level von Tag 6 zu Tag 30 auf etwa die Hälfte, in den Knockout Tieren steigt Def-6 in der gleichen Zeit um das 2,5 fache (nicht gezeigte Daten). Def-6 scheint erst stark anzusteigen, sobald die Tiere erkranken.

Auf Proteinebene konnten wir zeigen, dass Def-6 in den Glomeruli von Wildtyp und PKC λ/ι Knockout Tieren exprimiert wird und vor allem im Knockout mit dem Podozytenmarker WT-1 kolokalisiert.

Um die zelluläre Rolle weiter zu definieren, führten wir Überexpressionsexperimente mit Def-6 und Swap-70 in Podozyten durch. *In vitro* konnten wir überexprimiertes Def-6 und auch Swap-70 innerhalb der Podozyten am Rand der Zellen in Membranhäufungen nachweisen. Bei der Überexpression von konstitutiv aktivem Def-6 (Def-6-DHL) zeigten sich verstärkt Lamellipodien, in denen Def-6 mit Aktin kolokalisierte. *Samson et al.* konnten bereits zeigen, dass Def-6 Rac1 aktiviert (120). Eine erhöhte Rac1 Aktivität kann wiederum zu Veränderungen des Aktin Zytoskeletts wie vermehrter Lamellipodienbildung führen (60).

Der in den PKC λ 1 Knockout beobachtete Phänotyp ähnelt stark dem nach Überexpression von konstitutiv aktivem Def-6 DHL auftretenden Phänotyp.

5.5 Schlussfolgerung

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war es, die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden atypischen PKC Isoformen PKC λ 1 und PKC ζ in Podozyten zu untersuchen. Der Unterschied demaskierte sich sehr schnell in den jeweiligen Mausmodellen. Die PKC λ 1 Knockout Maus ist embryonal letal und auch der von uns untersuchte Podozyten-spezifische Knockout von PKC λ 1 führt nach 4-5 Wochen zum Tode, während die PKC ζ Knockout Maus keinen schweren Phänotyp zeigt. Auch in den nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen erwies sich das Fehlen von PKC λ 1 als schwerwiegender als die PKC ζ Defizienz für die Zellhomöostase.

Tabelle 13 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der PKC λ 1 und PKC ζ Knockout Podozyten im Vergleich zum PAN Modell.

↑: erhöht, ↓: erniedrigt, n. s. = nicht signifikant

	PKCλ1 KO	PKCζ KO	PAN
Mausmodell	Proteinurie, Glomerulosklerose, verschobene Schlitzmembranen	Kein renaler Phänotyp	Proteinurie, Glomerulosklerose, verschobene Schlitzmembranen <i>Kurihara et al. (131)</i>
Synaptopodin Expression	Protein: ↓ RNA: ↓	Protein: n. s. RNA: ↓	Protein: ↓ RNA: ↓ <i>Asanuma et al. (59)</i>
Veränderungen des Aktin Zytoskeletts	<i>Membrane ruffles</i>	n. s.	<i>Membrane ruffles</i>
Zellausdehnung	↓	n.s.	↓
Fokale Kontakte	↓	n. s.	Nicht untersucht
Rac1 Aktivität	↑	↑	↑ <i>Attias et al. (155)</i>
Def-6 mRNA Level	↑	n. s.	↑
Lokalisation in Podozyten	Zytosol und Kern	Zytosol	-
Bindung an Def-6	Ja	Ja	-
Bindung an Swap-70	Ja	Ja	-

In der vorliegenden Arbeit konnten wir im Mausmodell zeigen, dass PKC $\lambda/1$ im Gegensatz zu PKC ζ eine essentielle Rolle bei der Bildung der Schlitzmembran spielt, indem es als Bestandteil des Par3-aPKC-Par6 Komplexes die Polarität der Podozyten reguliert. In den PKC $\lambda/1$ defizienten Podozyten zeigten sich *in vitro* Störungen in der Zellarchitektur, die in den PKC ζ defizienten Podozyten nicht erkennbar waren. Außer der reduzierten Expression einiger Podozyten-spezifischer Proteine und Adhäsionsmoleküle in den PKC $\lambda/1$ defizienten Zellen, zeigten sich starke Veränderungen in der Struktur des Aktin Zytoskeletts, die auf eine verstärkte Rac1 Aktivität der Zellen zurückzuführen sind.

Als ein in PKC $\lambda/1$ Knockout Zellen und in PAN stimulierten Zellen überrepräsentiertes Gen identifizierten wir in Mikroarrays den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Def-6, der auch in anderen Erkrankungen mit glomerulären Schädigungen eine Rolle spielt.

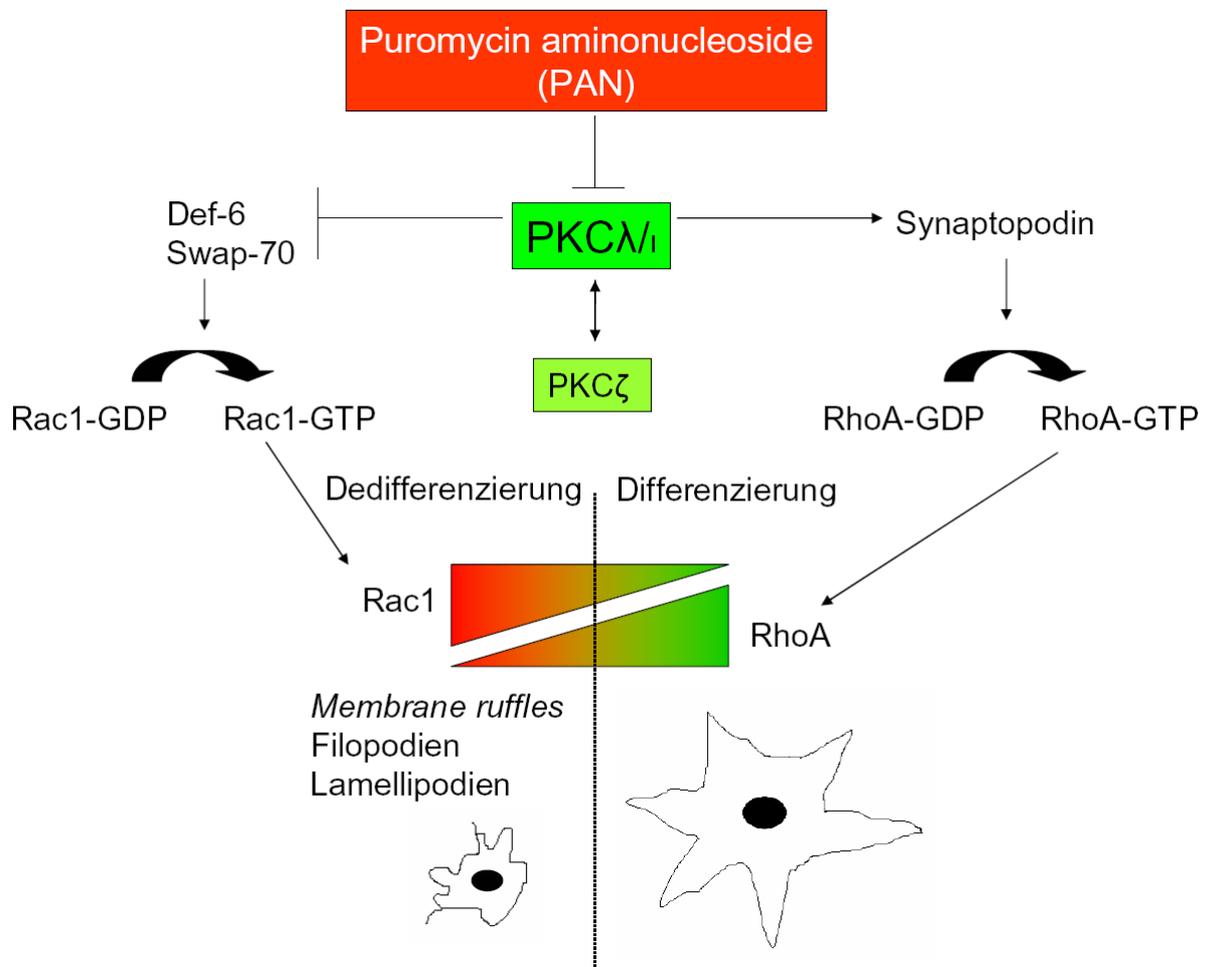


Abbildung 38 Modell zur Wirkung von PAN über PKC $\lambda/1$ auf das Aktin Zytoskelett.

Insgesamt zeigten sich vor allem *in vivo* große Unterschiede zwischen den beiden aPKC Isoformen. *In vitro* bewirkte die PKC $\lambda/1$ Defizienz ebenfalls einen schwereren Phänotyp mit

Veränderungen des Aktin Zytoskeletts. Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Beobachtungen ist die unterschiedliche Lokalisation der beiden Isoformen in Podozyten. In Tabelle 13 sind die Unterschiede und Gemeinsamkeiten des PKC λ /1 Knockouts, des PKC ζ Knockouts und des PAN Modells dargestellt.

Auf Grundlage der aus unseren Experimenten erhaltenen Ergebnissen und der Gemeinsamkeiten des Phänotyps der PKC λ /1 Knockout und der PAN stimulierten Podozyten, entwickelten wir ein Modell, mit dem sich unserer Meinung nach der beobachtete Phänotyp erklären lässt (Abbildung 38).

6 Literatur

- (1) Campbell NA. Biologie. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998.
- (2) Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; 88(2):451-487.
- (3) Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol* 1978; 234(6):F455-F460.
- (4) Rennke HG, Venkatachalam MA. Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. *J Clin Invest* 1979; 63(4):713-717.
- (5) Patrakka J, Tryggvason K. New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5(8):463-468.
- (6) Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396(1):164-169.
- (7) Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 2003; 7(4):255-259.
- (8) Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998; 54(3):687-697.
- (9) Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974; 60(2):423-433.
- (10) Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83(1):253-307.
- (11) Sawada H, Stukenbrok H, Kerjaschki D, Farquhar MG. Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am J Pathol* 1986; 125(2):309-318.
- (12) Orci L, Brown D, Amherdt M, Perrelet A. Distribution of intramembrane particles and filipin-sterol complexes in plasma membranes of kidney. I. Corpuscle of Malpighi. *Lab Invest* 1982; 46(6):545-553.
- (13) Sakai T, Sabanovic S, Hosser H, Kriz W. Heterogeneity of the podocyte membrane in rat kidney as revealed by ethanol dehydration of unosmicated specimens. *Cell Tissue Res* 1986; 246(1):145-151.
- (14) Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108(11):1621-1629.

- (15) Simons M, Schwarz K, Kriz W, Miettinen A, Reiser J, Mundel P et al. Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. *Am J Pathol* 2001; 159(3):1069-1077.
- (16) Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR. Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 1999; 56(4):1481-1491.
- (17) Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 2001; 159(6):2303-2308.
- (18) Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001; 59(3):1003-1012.
- (19) Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990; 111(3):1255-1263.
- (20) Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(1):1-8.
- (21) Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002; 160(1):131-139.
- (22) Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem* 2003; 278(21):19266-19271.
- (23) Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001; 21(14):4829-4836.
- (24) Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstadt H, Walz G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* 2003; 17(1):115-117.
- (25) Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1(4):575-582.
- (26) Norio R. Congenital nephrotic syndrome of Finnish type and other types of early familial nephrotic syndromes. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1974; 10(4):69-72.
- (27) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(14):7962-7967.
- (28) Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; 10(1):1-8.

- (29) Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 2003; 112(2):209-221.
- (30) Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(4):918-926.
- (31) Huber TB, Schmidts M, Gerke P, Schermer B, Zahn A, Hartleben B et al. The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J Biol Chem* 2003; 278(15):13417-13421.
- (32) Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24(4):349-354.
- (33) Caridi G, Bertelli R, Scolari F, Sanna-Cherchi S, Di Duca M, Ghiggeri GM. Podocin mutations in sporadic focal-segmental glomerulosclerosis occurring in adulthood. *Kidney Int* 2003; 64(1):365.
- (34) Winn MP. Not all in the family: mutations of podocin in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(2):577-579.
- (35) Hamano Y, Grunkemeyer JA, Sudhakar A, Zeisberg M, Cosgrove D, Morello R et al. Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J Biol Chem* 2002; 277(34):31154-31162.
- (36) Cho EA, Patterson LT, Brookhiser WT, Mah S, Kintner C, Dressler GR. Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development* 1998; 125(5):803-812.
- (37) Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; 286(5438):312-315.
- (38) Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(4):F734-F743.
- (39) Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108(11):1583-1587.
- (40) Andrews PM, Bates SB. Filamentous actin bundles in the kidney. *Anat Rec* 1984; 210(1):1-9.
- (41) Vasmant D, Maurice M, Feldmann G. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *Anat Rec* 1984; 210(1):17-24.
- (42) Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(12):1589-1600.
- (43) Kriz W, Mundel P, Elger M. The contractile apparatus of podocytes is arranged to counteract GBM expansion. *Contrib Nephrol* 1994; 107:1-9.

- (44) Reeves W, Caulfield JP, Farquhar MG. Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 1978; 39(2):90-100.
- (45) Somlo S, Mundel P. Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24(4):333-335.
- (46) Moeller MJ, Holzman LB. Imaging podocyte dynamics. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 103(2):e69-e74.
- (47) Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(12):3005-3015.
- (48) Schmieder S, Nagai M, Orlando RA, Takeda T, Farquhar MG. Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(9):2289-2298.
- (49) Kerjaschki D. Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin B. *Lab Invest* 1978; 39(5):430-440.
- (50) International Study of Kidney Disease in Children. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int* 1978; 13(2):159-165.
- (51) Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24(3):251-256.
- (52) Pollak MR. Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(12):3016-3023.
- (53) Michaud JL, Lemieux LI, Dube M, Vanderhyden BC, Robertson SJ, Kennedy CR. Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(5):1200-1211.
- (54) Michaud JL, Chaisson KM, Parks RJ, Kennedy CR. FSGS-associated alpha-actinin-4 (K256E) impairs cytoskeletal dynamics in podocytes. *Kidney Int* 2006; 70(6):1054-1061.
- (55) Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007; 17(9):428-437.
- (56) Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; 139(1):193-204.
- (57) Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C et al. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1188-1198.

- (58) Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia BA, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997; 236(1):248-258.
- (59) Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; 8(5):485-491.
- (60) Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 5):891-895.
- (61) Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279(5350):509-514.
- (62) Bernardis A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1603(2):47-82.
- (63) Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 2004; 380(Pt 1):1-17.
- (64) Vignjevic D, Yarar D, Welch MD, Peloquin J, Svitkina T, Borisy GG. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol* 2003; 160(6):951-962.
- (65) Small JV, Isenberg G, Celis JE. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature* 1978; 272(5654):638-639.
- (66) Lewis AK, Bridgman PC. Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* 1992; 119(5):1219-1243.
- (67) Simons M, Hartleben B, Huber TB. Podocyte polarity signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18(4):324-330.
- (68) Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14(3):211-216.
- (69) Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development* 2008; 135(4):609-620.
- (70) Kriz W. Ontogenetic development of the filtration barrier. *Nephron Exp Nephrol* 2007; 106(2):e44-e50.
- (71) Iden S, Collard JG. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(11):846-859.
- (72) Bryant DM, Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(11):887-901.
- (73) Mellman I, Nelson WJ. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(11):833-845.

- (74) Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 6):979-987.
- (75) Ebnet K, Iden S, Gerke V, Suzuki A. Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteins. *Front Biosci* 2008; 13:6520-6536.
- (76) Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2000; 2(8):531-539.
- (77) Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2000; 2(8):540-547.
- (78) Garrard SM, Capaldo CT, Gao L, Rosen MK, Macara IG, Tomchick DR. Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *EMBO J* 2003; 22(5):1125-1133.
- (79) Hartleben B, Schweizer H, Lubben P, Bartram MP, Moller CC, Herr R et al. Neph- Nephtrin proteins bind the Par3-Par6-atypical protein kinase C (aPKC) complex to regulate podocyte cell polarity. *J Biol Chem* 2008; 283(34):23033-23038.
- (80) Hirose T, Satoh D, Kurihara H, Kusaka C, Hirose H, Akimoto K et al. An essential role of the universal polarity protein, aPKClambda, on the maintenance of podocyte slit diaphragms. *PLoS One* 2009; 4(1):e4194.
- (81) Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(3):L429-L438.
- (82) Sabri A, Steinberg SF. Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Mol Cell Biochem* 2003; 251(1-2):97-101.
- (83) Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008; 88(4):1341-1378.
- (84) Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell* 2006; 23(5):631-640.
- (85) Moscat J, Rennert P, Diaz-Meco MT. PKCzeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell Death Differ* 2006; 13(5):702-711.
- (86) Kalive M, Faust JJ, Koeneman BA, Capco DG. Involvement of the PKC family in regulation of early development. *Mol Reprod Dev* 2010; 77(2):95-104.
- (87) Gschwendt M, Johannes FJ, Kittstein W, Marks F. Regulation of protein kinase Cmu by basic peptides and heparin. Putative role of an acidic domain in the activation of the kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(33):20742-20746.
- (88) Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 1994; 19(9):349-353.

- (89) Stahelin RV, Wang J, Blatner NR, Rafter JD, Murray D, Cho W. The origin of C1A-C2 interdomain interactions in protein kinase Calpha. *J Biol Chem* 2005; 280(43):36452-36463.
- (90) Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 2001; 101(8):2353-2364.
- (91) Feng X, Becker KP, Stribling SD, Peters KG, Hannun YA. Regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by autophosphorylation. *J Biol Chem* 2000; 275(22):17024-17034.
- (92) Idkowiak-Baldys J, Becker KP, Kitatani K, Hannun YA. Dynamic sequestration of the recycling compartment by classical protein kinase C. *J Biol Chem* 2006; 281(31):22321-22331.
- (93) Hu T, Exton JH. Protein kinase Calpha translocates to the perinuclear region to activate phospholipase D1. *J Biol Chem* 2004; 279(34):35702-35708.
- (94) Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3):185-194.
- (95) Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. Mechanism of inhibition of sequestration of protein kinase C alpha/betaII by ceramide. Roles of ceramide-activated protein phosphatases and phosphorylation/dephosphorylation of protein kinase C alpha/betaII on threonine 638/641. *J Biol Chem* 2007; 282(28):20647-20656.
- (96) Zeidan YH, Hannun YA. Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2007; 282(15):11549-11561.
- (97) Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1995; 14(9):1961-1969.
- (98) Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 1997; 272(48):30075-30082.
- (99) Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J et al. Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 1993; 74(3):555-563.
- (100) Wooten MW, Zhou G, Seibenhener ML, Coleman ES. A role for zeta protein kinase C in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Cell Growth Differ* 1994; 5(4):395-403.
- (101) Farese RV, Sajan MP, Yang H, Li P, Mastorides S, Gower WR, Jr. et al. Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *J Clin Invest* 2007; 117(8):2289-2301.
- (102) Murray NR, Fields AP. Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272(44):27521-27524.

- (103) Perander M, Bjorkoy G, Johansen T. Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda. *J Biol Chem* 2001; 276(16):13015-13024.
- (104) Pal S, Claffey KP, Cohen HT, Mukhopadhyay D. Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 1998; 273(41):26277-26280.
- (105) Akimoto K, Takahashi R, Moriya S, Nishioka N, Takayanagi J, Kimura K et al. EGF or PDGF receptors activate atypical PKC lambda through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J* 1996; 15(4):788-798.
- (106) Gorlich D. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J* 1998; 17(10):2721-2727.
- (107) Adam SA. Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(3):402-406.
- (108) Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF et al. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell* 2001; 8(4):771-780.
- (109) Matsumoto M, Ogawa W, Akimoto K, Inoue H, Miyake K, Furukawa K et al. PKC lambda in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2003; 112(6):935-944.
- (110) Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Matsuda T, Suzuki K, Inoue H et al. PKC lambda regulates glucose-induced insulin secretion through modulation of gene expression in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 2005; 115(1):138-145.
- (111) Hirai T, Chida K. Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem* 2003; 133(1):1-7.
- (112) Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P et al. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 1995; 14(24):6157-6163.
- (113) Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Moscat J. The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J* 1999; 18(11):3044-3053.
- (114) Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J* 2000; 19(7):1576-1586.
- (115) Gupta S, Lee A, Hu C, Fanzo J, Goldberg I, Cattoretti G et al. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system. *Hum Immunol* 2003; 64(4):389-401.
- (116) Borggreffe T, Wabl M, Akhmedov AT, Jessberger R. A B-cell-specific DNA recombination complex. *J Biol Chem* 1998; 273(27):17025-17035.

- (117) Masat L, Caldwell J, Armstrong R, Khoshnevisan H, Jessberger R, Herndier B et al. Association of SWAP-70 with the B cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(5):2180-2184.
- (118) Gupta S, Fanzo JC, Hu C, Cox D, Jang SY, Lee AE et al. T cell receptor engagement leads to the recruitment of IBP, a novel guanine nucleotide exchange factor, to the immunological synapse. *J Biol Chem* 2003; 278(44):43541-43549.
- (119) Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N, Higuchi M et al. SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature* 2002; 416(6882):759-763.
- (120) Samson T, Will C, Knoblauch A, Sharek L, von der MK, Burridge K et al. Def-6, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, interacts with the skeletal muscle integrin chain alpha7A and influences myoblast differentiation. *J Biol Chem* 2007; 282(21):15730-15742.
- (121) Oka T, Ihara S, Fukui Y. Cooperation of DEF6 with activated Rac in regulating cell morphology. *J Biol Chem* 2007; 282(3):2011-2018.
- (122) Mavrakis KJ, McKinlay KJ, Jones P, Sablitzky F. DEF6, a novel PH-DH-like domain protein, is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1, Cdc42, and RhoA. *Exp Cell Res* 2004; 294(2):335-344.
- (123) Ihara S, Oka T, Fukui Y. Direct binding of SWAP-70 to non-muscle actin is required for membrane ruffling. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 3):500-507.
- (124) Borggreffe T, Keshavarzi S, Gross B, Wabl M, Jessberger R. Impaired IgE response in SWAP-70-deficient mice. *Eur J Immunol* 2001; 31(8):2467-2475.
- (125) Gross B, Borggreffe T, Wabl M, Sivalenka RR, Bennett M, Rossi AB et al. SWAP-70-deficient mast cells are impaired in development and IgE-mediated degranulation. *Eur J Immunol* 2002; 32(4):1121-1128.
- (126) Fanzo JC, Yang W, Jang SY, Gupta S, Chen Q, Siddiq A et al. Loss of IRF-4-binding protein leads to the spontaneous development of systemic autoimmunity. *J Clin Invest* 2006; 116(3):703-714.
- (127) Tanaka Y, Bi K, Kitamura R, Hong S, Altman Y, Matsumoto A et al. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells. *Immunity* 2003; 18(3):403-414.
- (128) Diamond JR, Karnovsky MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am J Pathol* 1986; 122(3):481-487.
- (129) Farquhar MG, VERNIER RL, GOOD RA. Studies on familial nephrosis. II. Glomerular changes observed with the electron microscope. *Am J Pathol* 1957; 33(4):791-817.
- (130) Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975; 8(4):219-232.

- (131) Kurihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farquhar MG. The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1. *Am J Pathol* 1992; 141(4):805-816.
- (132) Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V, Mundel P et al. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol* 2002; 161(4):1459-1466.
- (133) Duner F, Lindstrom K, Hultenby K, Hulkko J, Patrakka J, Tryggvason K et al. Permeability, ultrastructural changes, and distribution of novel proteins in the glomerular barrier in early puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron Exp Nephrol* 2010; 116(2):e42-e52.
- (134) Fishman JA, Karnovsky MJ. Effects of the aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1985; 118(3):398-407.
- (135) Coers W, Huitema S, van der Horst ML, Weening JJ. Puromycin aminonucleoside and adriamycin disturb cytoskeletal and extracellular matrix protein organization, but not protein synthesis of cultured glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 1994; 2(1):40-50.
- (136) Krishnamurti U, Zhou B, Fan WW, Tsilibary E, Wayner E, Kim Y et al. Puromycin aminonucleoside suppresses integrin expression in cultured glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(4):758-766.
- (137) Rico M, Mukherjee A, Konieczkowski M, Bruggeman LA, Miller RT, Khan S et al. WT1-interacting protein and ZO-1 translocate into podocyte nuclei after puromycin aminonucleoside treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(2):F431-F441.
- (138) Krtil J, Platenik J, Kazderova M, Tesar V, Zima T. Culture methods of glomerular podocytes. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30(3):162-174.
- (139) Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36(1):59-74.
- (140) Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Kanoh Y, Miura A, Braun U et al. Protein kinase C-lambda knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol* 2004; 18(2):373-383.
- (141) Moeller MJ, Sanden SK, Soofi A, Wiggins RC, Holzman LB. Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 2003; 35(1):39-42.
- (142) Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L et al. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(12):5096-5100.
- (143) REYNOLDS ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17:208-212.
- (144) Soloff RS, Katayama C, Lin MY, Feramisco JR, Hedrick SM. Targeted deletion of protein kinase C lambda reveals a distribution of functions between the two atypical protein kinase C isoforms. *J Immunol* 2004; 173(5):3250-3260.

- (145) Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 1998; 14(4):381-392.
- (146) Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* 2006; 16(9):453-460.
- (147) Ma H, Togawa A, Soda K, Zhang J, Lee S, Ma M et al. Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(7):1145-1156.
- (148) Fujita S, Watanabe M, Kubota T, Teramoto T, Kitajima M. Alteration of expression in integrin beta 1-subunit correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Lett* 1995; 91(1):145-149.
- (149) Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 1999; 147(5):1009-1022.
- (150) Liu S, Ding J, Fan Q, Zhang H. The activation of extracellular signal-regulated kinase is responsible for podocyte injury. *Mol Biol Rep* 2010; 37(5):2477-2484.
- (151) Marshall CB, Pippin JW, Krofft RD, Shankland SJ. Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2006; 70(11):1962-1973.
- (152) Sajjan MP, Rivas J, Li P, Standaert ML, Farese RV. Repletion of atypical protein kinase C following RNA interference-mediated depletion restores insulin-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 2006; 281(25):17466-17473.
- (153) Huber TB, Hartleben B, Winkelmann K, Schneider L, Becker JU, Leitges M et al. Loss of podocyte aPKC λ /iota causes polarity defects and nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(4):798-806.
- (154) Wu DT, Bitzer M, Ju W, Mundel P, Bottinger EP. TGF-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(11):3211-3221.
- (155) Attias O, Jiang R, Aoudjit L, Kawachi H, Takano T. Rac1 contributes to actin organization in glomerular podocytes. *Nephron Exp Nephrol* 2010; 114(3):e93-e106.
- (156) Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; 84(3):381-388.
- (157) Yaoita E, Yao J, Yoshida Y, Morioka T, Nameta M, Takata T et al. Up-regulation of connexin43 in glomerular podocytes in response to injury. *Am J Pathol* 2002; 161(5):1597-1606.
- (158) Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Lab Invest* 1976; 34(1):43-59.

- (159) Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002; 82(2):331-371.
- (160) Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1197(1):63-93.
- (161) Markoff A, Gerke V. Expression and functions of annexins in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(5):F949-F956.
- (162) Rand JH. "Annexinopathies"--a new class of diseases. *N Engl J Med* 1999; 340(13):1035-1036.
- (163) Perretti M, Flower RJ. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J Leukoc Biol* 2004; 76(1):25-29.
- (164) Hertveldt V, Louryan S, van Reeth T, Dreze P, van Vooren P, Szpirer J et al. The development of several organs and appendages is impaired in mice lacking Sp6. *Dev Dyn* 2008; 237(4):883-892.
- (165) Rehli M, Sulzbacher S, Pape S, Ravasi T, Wells CA, Heinz S et al. Transcription factor Tfec contributes to the IL-4-inducible expression of a small group of genes in mouse macrophages including the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Immunol* 2005; 174(11):7111-7122.
- (166) Harris TJ, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(7):502-514.
- (167) Pokutta S, Weis WI. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23:237-261.
- (168) Yap AS, Kovacs EM. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* 2003; 160(1):11-16.
- (169) Braga VM. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(5):546-556.
- (170) Cheng YS, Patterson CE, Staeheli P. Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol* 1991; 11(9):4717-4725.
- (171) Schwemmle M, Staeheli P. The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem* 1994; 269(15):11299-11305.
- (172) Tripal P, Bauer M, Naschberger E, Mortinger T, Hohenadl C, Cornali E et al. Unique features of different members of the human guanylate-binding protein family. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27(1):44-52.
- (173) Balasubramanian S, Messmer-Blust AF, Jeyaratnam JA, Vestal DJ. Role of GTP Binding, Isoprenylation, and the C-Terminal alpha-Helices in the Inhibition of Cell Spreading by the Interferon-Induced GTPase, Mouse Guanylate-Binding Protein-2. *J Interferon Cytokine Res* 2010.

8 Publikationen

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

- Huber TB, Hartleben B, **Winkelmann K**, Schneider L, Becker JU, Leitges M, Walz G, Haller H, Schiffer M. Loss of podocyte aPKC λ /iota causes polarity defects and nephritic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Apr; 20(4):798-806.
- Müller-Deile J, **Worthmann K**, Saleem M, Tossidou I, Haller H, Schiffer M. The balance of autocrine VEGF-A and VEGF-C determines podocyte survival. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Dec; 297(6): F1656-67.
- **Worthmann K**, Peters I, Kumpers P, Saleem M, Becker JU, Agustian PA, Achenbach J, Haller H, Schiffer M. Urinary excretion of IGFBP-1 and -3 correlates with disease activity and differentiates focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease. *Growth Factors* 2010 Apr; 28(2): 129-38.
- Tossidou I, Teng B, Drobot L, Meyer-Schwesinger C, **Worthmann K**, Haller H, Schiffer M. CIN85/RukL is a novel binding partner of nephrin and podocin and mediates slit diaphragm turnover in podocytes. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13; 285(33): 25285-95.
- Stieger N, **Worthmann K**, Schiffer M. The role of metabolic and hemodynamic factors for podocyte injury in diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. Dezember 2010. **Manuskript in Druck**.
- **Worthmann K**, Leitges M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Haller H, Schiffer M. aPKC λ /i regulates the balance of small GTPases in podocytes. **Manuskript in Vorbereitung**.

Kurzvorträge:

- **Winkelmann K**, Tossidou I, Becker JU, Leitges M, Haller H, Schiffer M. Role of atypical protein kinase C isoforms λ /i in podocytes. ASN Renal Week 2008, Philadelphia, USA
- **Winkelmann K**, Hartleben B, Becker JU, Leitges M, Huber TB, Haller H, Schiffer M. Role of atypical protein kinase C isoforms λ /i in podocytes. WCN 2009, Mailand, Italien
- **Worthmann K**, Leitges M, Haller H, Schiffer M. Protein kinase C λ /iota deficiency causes actin-cytoskeletal rearrangements and signaling defects in podocytes. ASN Renal Week 2009, San Diego, USA.

Poster:

- **Winkelmann K**, Hartleben B, Becker JU, Leitges M, Huber TB, Haller H, Schiffer M. Role of atypical protein kinase C isoforms λ/ι in podocytes. WCN 2009, Mailand, Italien
- **Worthmann K**, Leitges M, Haller H, Schiffer M. Protein kinase C lambda/iota deficiency causes actin-cytoskeletal rearrangements and signaling defects in podocytes. Embo Meeting 2009, Amsterdam, Niederlande.
- **Worthmann K**, Leitges M, Haller H, Schiffer M. Protein kinase C lambda/iota deficiency causes actin-cytoskeletal rearrangements and signaling defects in podocytes. Kongress für Nephrologie 2009, Göttingen, Deutschland.
- **Worthmann K**, Leitges M, Dittrich-Breiholz O, Haller H, Schiffer M. Protein kinase C lambda/iota deficiency causes actin-cytoskeletal rearrangements and signaling defects in podocytes. 8. Internationale Podozyten Konferenz 2010, Bristol, UK.
- **Worthmann K**, Leitges M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Haller H, Schiffer M. Def-6, a novel regulator of small GTPases acts downstream of PAN and PKC λ/ι in podocytes. ASN Renal Week 2010, Denver, USA.

Auszeichnungen:

- Award für die wissenschaftliche Präsentation:
Winkelmann K, Hartleben B, Becker JU, Leitges M, Huber TB, Haller H, Schiffer M. Role of atypical protein kinase C isoforms λ/ι in podocytes. World Congress of Nephrology 2009, Mailand, Italien.

9 Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Mario Schiffer für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und allgemein für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Walter Müller danke ich für die Übernahme der Referenz und für die Beantwortung aller Fragen rund um die Dissertation.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Hermann Haller, in dessen Abteilung ich die Möglichkeit bekam die Experimente zu dieser Arbeit durchzuführen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der AG Schiffer: Irimi Schäfer, Beina Teng, Sandy Zachura, Germaine Puncha, Heike Lührs, Frank Bollig und dem gesamten Nephrologielabor für das gute Klima bei der Arbeit im Labor und auch im Aufenthaltsraum. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für Probleme und habt mich bei vielen Experimenten und vor allem bei der Betreuung der Versuchstiere praktisch hervorragend unterstützt.

Prof. Dr. Tobias Huber und Dr. Björn Hartleben von der Universität Freiburg und PD Dr. Michael Leitges von der Universität Oslo (Norwegen) danke ich für die gute Zusammenarbeit bei dem Mausmodell und Dr. Jan Becker für die kooperative Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie.

Vielen Dank auch an Dr. Oliver Dittrich-Breiholz aus der Physiologischen Chemie der MHH für die Hilfe bei den Mikroarray-Experimenten und die Beantwortung aller Fragen rund um die Auswertung.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Familie und besonders Frank, die mich immer uneingeschränkt unterstützt haben.

10 Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Rolle der atypischen Protein Kinase C Isoformen PKC $\lambda/1$ und PKC ζ in Podozyten“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 14.12.2010

Kirstin Worthmann